

Aus der Klinik für Kinder und Jugendmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

---

Einfluss von Prophenin und Surfactant auf das  
Proliferationsverhalten von *Streptococcus agalactiae*

---

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Amelie von Freyhold-Hünecken  
aus Berlin

Lübeck 2008

- I.     Berichterstatter:                   Prof. Dr. med. E. Herting  
II.    Berichterstatter/in:               Priv.-Doz. Dr. med. B. Schaaf

Tag der mündlichen Prüfung:     27.10.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.10.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|      |                                                    |
|------|----------------------------------------------------|
| Arg  | Arginin (Aminosäure)                               |
| ARDS | acute respiratory distress syndrome                |
| CFU  | colony forming units = Kolonien bildende Einheiten |
| Curo | Curosurf®                                          |
| EOD  | early onset disease                                |
| GBS  | Group B Streptococci = Gruppe B-Streptokokken      |
| Gly  | Glycin (Aminosäure)                                |
| LOD  | late onset disease                                 |
| OD   | optische Dichte                                    |
| PBS  | Pulsating bubble surfactometer                     |
| PF   | Prophenin                                          |
| PF18 | C-terminales Fragment von Prophenin                |
| Phe  | Phenylalanin (Aminosäure)                          |
| Pro  | Prolin (Aminosäure)                                |
| RDS  | respiratory distress syndrome = Atemnotsyndrom     |

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. Einleitung</b>                                                            | <b>1</b>  |
| I.1. Streptokokken                                                              | 1         |
| I.1.1. B-Streptokokken, historischer Rückblick                                  | 1         |
| I.1.2. Mikrobiologische Eigenschaften                                           | 2         |
| I.1.3. Wachstumsmuster                                                          | 3         |
| I.1.4. Serologische Einteilung der B-Streptokokken                              | 3         |
| I.1.5. B-Streptokokken Kolonisation und Infektion bei Erwachsenen               | 3         |
| I.1.6. B-Streptokokken Kolonisation und Infektion bei<br>Früh- und Neugeborenen | 4         |
| I.1.7. Early-onset B-Streptokokken-Infektion                                    | 4         |
| I.1.8. Late-onset B-Streptokokken-Infektion                                     | 6         |
| I.2. Surfactant                                                                 | 7         |
| I.2.1. Zusammensetzung von Surfactant                                           | 9         |
| I.2.2. Entwicklung des Surfactantsystems                                        | 9         |
| I.2.3. Erkrankungen des Surfactantsystems                                       | 10        |
| I.3. Antibakterielle Peptide                                                    | 12        |
| I.4. Fragestellung                                                              | 16        |
| <b>II. Material und Methoden</b>                                                | <b>17</b> |
| II.1. Material                                                                  | 17        |
| II.1.1. Bakterien                                                               | 17        |
| II.1.2. Surfactantpräparat                                                      | 17        |
| II.1.3. Antibakterielles Peptid                                                 | 18        |
| II.1.4. Geräte und Materialien                                                  | 18        |

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.2. Methoden                                                                                                                       | 19        |
| II.2.1. Herstellung eingefrorener Aliquote                                                                                           | 20        |
| II.2.2. Herstellung eines Versuchsansatzes aus einer Startkultur                                                                     | 20        |
| II.2.3. Ermittlung von Wachstumskurven                                                                                               | 22        |
| II.2.4. Ermittlung von Bakterienkonzentrationen mittels optischer Dichte                                                             | 23        |
| II.2.5. Wachstumsversuche mit Prophenin und Curosurf®                                                                                | 27        |
| II.2.6. Messmethoden zur Bestimmung der Oberflächenaktivität                                                                         | 29        |
| II.2.7. Statistische Auswertung                                                                                                      | 31        |
| <b>Ergebnisse</b>                                                                                                                    | <b>33</b> |
| III.1. Versuche zum Proliferationsverhalten von GBS                                                                                  | 33        |
| III.1.1. Wachstumsverhalten und statistische Auswertung von GBS III mit Curosurf® und Prophenin in unterschiedlichen Konzentrationen | 33        |
| III.1.2. Wachstumsverhalten und statistische Auswertung von GBS Ib mit Curosurf® und Prophenin in unterschiedlichen Konzentrationen  | 39        |
| III.1.3. Einfluss von Prophenin auf die Oberflächenspannung von Curosurf®                                                            | 45        |
| <b>IV. Diskussion</b>                                                                                                                | <b>47</b> |
| <b>V. Zusammenfassung</b>                                                                                                            | <b>54</b> |
| <b>VI. Literaturverzeichnis</b>                                                                                                      | <b>56</b> |
| VII. Danksagung                                                                                                                      | 68        |
| VIII. Lebenslauf                                                                                                                     | 69        |

# I. EINLEITUNG

## I.1. Streptokokken

### I.1.1. B-Streptokokken, historischer Rückblick

Streptokokken als Auslöser der Puerperalsepsis sind seit dem 19. Jahrhundert bekannt. Pasteur nahm Proben von Schwangeren im Kindsbettfieber, und beschrieb die gefundenen Bakterien als Organismen „en chainettes“. 1887 beschrieben Nocard und Mollereau den Zusammenhang der bovinen Mastitis und der durch Streptokokken verursachten humanen Mastitis. Es folgten Untersuchungen über die Verwandtschaft von bovinen und humanen Streptokokken und deren Übertragungsmöglichkeiten. In Studien stellte sich heraus, dass dieses extrem selten geschieht (Butter et al 1967). Fünf Jahre nachdem Lancefield die Streptokokken typisiert hatte, erkannte Frey 1938, dass Streptokokken der Gruppe B schwere Infektionskrankheiten hervorrufen können. Er berichtete von drei Fällen puerperaler Sepsis, mit tödlichem Ausgang (Frey 1938). Anschließend wurde nur vereinzelt von neonataler Sepsis und Meningitis, hervorgerufen durch Streptokokken, berichtet. In den 60er und 70er Jahren wurde eine steigende Infektionsrate von Neugeborenen und Müttern verzeichnet. In einer Studie von 1964 sind B-Streptokokken die häufigsten Erreger der neonatalen Sepsis (Eickhoff et al. 1964). Die Todesrate der Erkrankten zu dieser Zeit betrug 20-50%. Ferner fand man heraus, dass B-Streptokokken die wichtigste Ursache von Infektionen der Gebärmutter sind. Während der 80er und frühen 90er Jahre blieben in den U.S.A. die Fälle von early-onset-disease (EOD), hervorgerufen durch B-Streptokokken, nahezu konstant. Mitte der 90er Jahre verringerten sich die Erkrankungsfälle durch Vorsorge und ggf. Therapie.

### I.1.2. Mikrobiologische Eigenschaften

*Streptococcus agalactiae* gehört nach der Einteilung von Lancefield zu der Gruppe B. Es ist ein fakultativer gram-positiver Diplococcus, mit einem Durchmesser von ca. 1 µm. Auf Blutagarplatten weisen die Kolonien einen Durchmesser von 3-4 mm mit einer grau-weißlichen Farbe auf. Sie sind von einer, durch das exprimierte Hämolysin, charakteristischen  $\beta$ -Hämolyszone umgeben (siehe Abbildung 1). Hämolysin bewirkt eine Erythrozytolyse. Neben Hämolysin werden weitere Substanzen von den Bakterien exprimiert, darunter Desoxyribonukleasen, Hyaluronidasen, Hippurikasen, Neuraminidasen, Proteasen, pyrogenes Exotoxin, sowie Lipoteichonsäure, die es ermöglicht, B-Streptokokken an epitheliale Zellen zu binden (Ferrieri 1985). Antikörper gegen Nukleasen der B-Streptokokken sind im Serum von Schwangeren, mit bekannter B-Streptokokken Infektion des Genitaltraktes, nachweisbar (Ferrieri et al. 1973). Neuraminidase, ein extrazelluläres Produkt der B-Streptokokken, scheint ein Virulenzfaktor zu sein. Serotyp I und II produzieren geringe Mengen dieses Enzyms, wohingegen beim Serotyp III grosse Mengen nachgewiesen werden konnte (Milligan et al. 1980). Es wurde herausgefunden, dass mit Serotyp III kolonisierte Kinder, hauptsächlich bei symptomatischem Krankheitsverlauf derjenige Serotyp III vorgefunden wurde, der größere Mengen Neuraminidase produziert. Dieser Typ ist mehrheitlich verantwortlich für ernsthafte B-Streptokokken-Infektionen (Musser 1989).

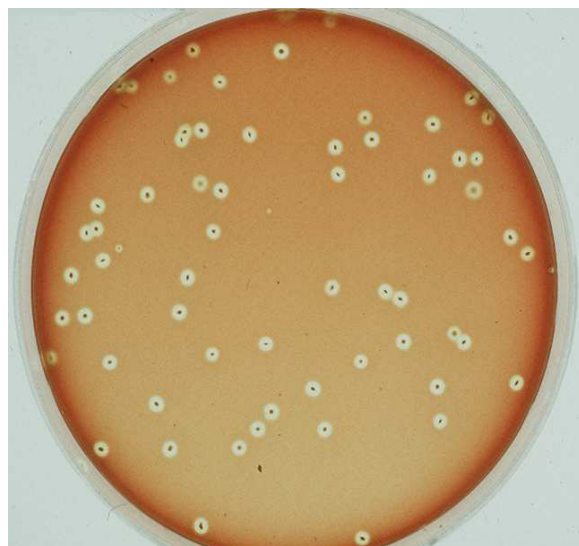


Abbildung 1: Wachstum von  $\beta$ -hämolysierenden B-Streptokokken im Gußagar

### I.1.3. Wachstumsmuster

B-Streptokokken vermehren sich exponentiell durch einfache Teilung. In der exponentiellen Wachstumsphase stellen die Bakterien ihren Stoffwechsel auf das zur Verfügung stehende Nährmedium ein. Nach einer kurzen Adaptationsphase folgt in der Logphase das exponentielle Wachstum. Der Verzögerungsphase folgt die stationäre Phase, in der die Nährstoffe knapper werden und vermehrt Stoffwechselprodukte anfallen. Vermehrung und Absterben entsprechen einander. Es folgt die Absterbephase. Die für einen Vermehrungszyklus benötigte Zeit wird als Generationszeit bezeichnet. Sie variiert unter einzelnen Bakterienstämmen.

### I.1.4. Serologische Einteilung der B-Streptokokken

Lancefield definierte 1934 zwei Zellwandantigene für B-Streptokokken: die gruppenspezifische C-Substanz, die für alle Gruppe B-Stämme spezifisch ist und die typenspezifische S-Substanz, die eine Klassifikation in drei Serotypen erlaubte (I, II, III). Später unterteilte Lancefield den Serotyp I anhand unterschiedlicher Polysaccharide in die Untergruppen Ia und Ib. Heute werden überwiegend die Kapselpolysaccharide Ia, Ib, Ia/c, II-VIII unterschieden (UpToDate online 15.2). Zusätzlich unterscheidet man das X- und das R-Antigen (Wagner 1980).

### I.1.5. B-Streptokokken Kolonisation und Infektion bei Erwachsenen

Durch B-Streptokokken verursachte Infektionen der Schleimhäute verlaufen meist asymptomatisch. Je nachdem, von welchem Bereich des Genitaltraktes ein Abstrich zur Kultivierung genommen wird, variiert die Anzahl an Kolonien. Im äußeren Genitalbereich können etwa doppelt so viele Bakterien isoliert werden, wie an der Cervix (Christensen et al. 1976). In der Schwangerschaft tritt häufig eine Besiedlung des Harntraktes mit asymptomatischer Bakteriurie auf. Der untere Gastrointestinaltrakt ist jedoch am häufigsten von B-Streptokokken besiedelt.

(Baker 1973). Symptomatische Infektionen betreffen die Haut, Weichteile und Knochen. Ebenso treten Bakteriämie, Urosepsis, Pneumonie und Peritonitis auf. Als Risikofaktoren gilt ein Alter von mehr als 60 Jahren, Diabetes mellitus, maligne Neoplasien und HIV-Infektion (Farley et al. 1993). Bei Schwangeren kann eine symptomatische B-Streptokokken Infektion als Harnwegsinfekt, Chorioamnionitis, Endometritis, als Beckenvenen-Thrombophlebitis oder als Endokarditis auftreten (CIDCFN 1992).

#### I.1.6. B-Streptokokken Kolonisation und Infektion bei Früh- und Neugeborenen

Die Kolonisierung des Genitaltraktes der Schwangeren unter der Geburt ist ein wichtiger Faktor für Übertragung, Kolonisation und Infektion des Neugeborenen mit B-Streptokokken. Bei 15-40% der Schwangeren lassen sich B-Streptokokken nachweisen. Eine vertikale Übertragung auf das Neugeborene tritt dabei im Durchschnitt zu 58% auf. Allerdings entwickelt nur 1-2% der Neugeborenen von kolonisierten Müttern eine ernsthafte Infektion (Baker 2000). Die Symptome einer B-Streptokokken Infektion können sich bei Neugeborenen als early-onset-Infektion (EOD) und als late-onset-Infektion (LOD) äußern. Sie unterscheiden sich epidemiologisch und im Alter des Erkrankungsbeginns (Franciosi et al. 1973).

#### I.1.7. Early-onset B-Streptokokken-Infektion

Die EOD tritt in den ersten sechs Lebenstagen auf. Risikofaktoren für das Auftreten einer Infektion sind mütterliche Kolonisationsdichte zum Zeitpunkt der Geburt, Temperatur unter der Geburt, intrautrines Monitoring, B-Streptokokkenbakteriurie oder Harnwegsinfekt, niedrige Antikörpertiter für den entsprechenden Serotyp, Geburt vor der 37. Schwangerschaftswoche (15%) (Pass et al. 1979), eine Chorioamnionitis oder vorzeitiger Blasensprung (mehr als 18 Stunden) (11%) (Eickhoff et al. 1964), Geminigravidität (35%) (Edwards et al. 1981) oder postpartale Bakteriämie (10%) (Faro 1981). Das Risiko einer

Infektionsübertragung korreliert direkt mit dem Ausmaß der genitalen Kolonisierung der Mutter (Pass et al. 1979). Je intensiver die Kolonisierung, desto höher ist das Risiko des Kindes an mehreren Körperstellen kolonisiert zu sein und eine EOD zu entwickeln (Boyer et al. 1983). Meist ist das Neugeborene an den Schleimhautoberflächen des Oropharynx und des Gastrointestinaltraktes kolonisiert, indem es infiziertes Fruchtwasser oder Vaginalsekret schluckt. Häufig sind die B-Streptokokken-Isolate des Neugeborenen identisch mit denen der Mutter (Baker 2000). Fruchtwasser fördert das Wachstum von B-Streptokokken (Hemming et al. 1985). Einige Stämme replizieren sich darin besser als andere (Abbasi et al. 1987). In Studien fand man heraus, dass stark B-Streptokokken kolonisierte Schwangere im zweiten Trimester ein höheres Risiko haben ein Frühgeborenes mit niedrigem Geburtsgewicht zu entbinden (Regan et al. 1996). Es besteht eine hohe Korrelation zwischen dem Auftreten einer B-Streptokokkenbakteriurie und vorzeitigem Blasensprung. Vermutlich verursacht eine ascendierende B-Streptokokkeninfektion einen Blasensprung und in der Folge Frühgeburtlichkeit (Moller et al. 1984). Eine Infektion mit B-Streptokokken kann häufig mit niedrigem Geburtsgewicht (<1500g) assoziiert sein (Stoll et al. 1996). Baker und Kasper beschrieben, dass Neugeborene besonders dann gefährdet sind eine early- bzw. late-onset Infektion zu entwickeln, wenn ein niedriger Serumantikörpertiter der Mutter gegen die Kapselpolysaccharide der Typ III B-Streptokokken vorliegt (Baker et al 1976). Diese Antikörper gehören meist zur Klasse der plazentagängigen IgG. Sehr unreife Neugeborene haben besonders niedrige Serum IgG-Titer, da erst in den letzten zehn Wochen der Schwangerschaft 60% der mütterlichen IgG zum Fetus transportiert werden (Hyvarinen et al. 1973).

Die drei häufigsten Diagnosen einer manifesten B-Streptokokken Infektion sind Septikämie, Pneumonie und Meningitis. Initial zeigen 80% der Neugeborenen respiratorische Auffälligkeiten wie Apnoe, stöhnende Atmengeräusche, Tachypnoe oder Zyanose. Weitere Anzeichen sind Lethargie, Hypothermie oder Fieber, abdominelle Einziehungen, Blässe, Tachykardie und Ikterus (Baker CJ 2000). Pathophysiologisch konnte gezeigt werden, dass B-Streptokokken in das Endothel des Lungengewebes eindringen und dieses schädigen können. Dabei werden vasoaktive Mediatoren ausgeschüttet (Gibson et al. 1995). Die hämodynamischen

Folgen im Tierversuch waren pulmonale Hypertonie, reduzierte kardiale Auswurfleistung und Hypoxämie.

Neugeborenen mit einer EOD hervorgerufen durch B-Streptokokken, zeigen in 40 – 50% eine Beteiligung der Lunge. Bei Frühgeborenen ist es kaum möglich, eine congenitale B-Streptokokken-Pneumonie radiologisch und klinisch vom RDS zu unterscheiden. Auf eine B-Streptokokken Pneumonie hinweisend, aber nicht spezifisch, sind mütterliche Risikofaktoren, Sepsis, Apnoe und Schock in den ersten 24 Lebensstunden, ein Apgarscore von weniger als 5 nach einer Minute, Neutropenie und Cardiomegalie oder Pleuraergüsse radiologisch. Es kann vorkommen, dass das Frühgeborene sowohl an einer B-Streptokokken-Pneumonie als auch an einem RDS leidet (Gross 1994).

Neben der Pneumonie treten Septikämie und Meningitis ebenfalls häufig auf. 5 bis 10% der Neugeborenen mit EOD leiden unter einer Meningitis, die häufig durch den Serotyp III hervorgerufen wird (Baker 1977). Krämpfe in den ersten 24 Stunden treten bei fast 50% der Neugeborenen mit Meningitis auf. Persistierende Krämpfe oder Koma sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Baker et al. 1973). Ein tödlicher Ausgang ist häufig bei niedrigem 5-Minuten Apgar Wert, Schock, Neutropenie, Pleuraerguss, Apnoe und einem verspäteten Therapiebeginn nach Auftritt der Symptome gegeben (Schuchat et al. 1990). Zudem treten tödliche Infektionen häufiger bei Früh- als bei Termingeborenen auf.

#### I.1.8. Late-onset B-Streptokokken-Infektion

Eine LOD tritt zwischen dem 7. Lebenstag und der 12. Lebenswoche auf. Spezifische Risikofaktoren konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Frühgeburtlichkeit wird bisher als Hauptrisikofaktor angenommen (Lin et al. 2003). Vor Eintritt der Symptome sind die Neu- oder Frühgeborenen meist unauffällig (Baker 2000). Häufig äußert sich die Erkrankung mit einer Meningitis, für die in 75-80% der Fälle der Serotyp III verantwortlich ist (Baker et al. 1973). Klinisch zeigt eine Meningitis bei Neugeborenen häufig unspezifische Symptome, die schwer von den Symptomen einer Septikämie zu unterscheiden sind. Die Kardinalzeichen der Meningitis bei älteren Kindern wie Nackensteife und das Kernig- und

Brudzinskizeichen sind meistens nicht vorhanden. Initial liegen meist Fieber, Tachypnoe, Trinkschwäche, Erregbarkeit oder Lethargie vor. Im Gegensatz zur EOD treten stöhnendes Atmen und Apnoe in geringerem Maße auf, weisen dann aber auf eine progressive fulminante Infektion hin. In einer Untersuchung von 112 Überlebenden, 2-8 Jahre nach der Diagnose, zeigten 21% der Kinder neurologische Folgeerscheinungen, darunter geistige Retardierung, spastische Quadriplegie, kortikale Blindheit, Taubheit, Krämpfe, Hydrocephalus, hypothalamische Dysfunktion mit eingeschränkter Wärmeregulation und zentraler Diabetes Insipidus (Edwards et al. 1985, McReynolds et al. 1974, Wald et al. 1986). Seltene Folgen einer B-Streptokokkeninfektion sind Osteomyelitis, Arthritis, Cellulitis und Adenitis. Kotiw et al. berichteten vom Auftreten einer late-onset Infektionen bei gestillten Neugeborenen, deren Mütter an einer klinischen oder subklinischen Mastitis litten. Hierbei konnten sowohl bei der Mutter als auch beim Neugeborenen identische Streptokokkenstämme isoliert werden (Kotiw et al. 2003). Eine late-late-onset Infektion tritt mehr als drei Monaten nach Geburt ein. Betroffen sind häufig Neugeborene mit einem Gestationsalter von weniger als 35 Wochen. Meist liegt eine Bakteriämie ohne Fokus vor.

---

## **I.2. Surfactant**

Surfactant ist ein Kunstwort des englischen Begriffs surface active agent. 1929 beschrieb von Neegard erstmals, dass der Druck, der benötigt wird, um Lungengewebe mit Luft zu füllen, erniedrigt ist, wenn die Lunge mit Flüssigkeit gefüllt ist (von Neegard 1929). Es musste folglich in den Alveolen eine Substanz enthalten sein, die die Oberflächenspannung zwischen Luft und Wasser herabsetzt und damit verhindert, dass die Alveolen während der Expiration kollabieren. 1946 berichtete Thannhauser, dass das Lungengewebe einen hohen Gehalt des Lipids Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) enthält (Thannhauser et

al. 1946). Zu diesem Zeitpunkt wurde noch kein Zusammenhang zwischen dieser Entdeckung und der Herabsetzung der Oberflächenspannung in den Alveolen gesehen. 1955 vermutete Pattle, dass die Alveolen durch eine oberflächenaktive Substanz stabilisiert werden (Pattle RE 1955). Klaus und Clements zeigten, dass die Oberflächenspannung abfiel, wenn auf die extrahierte Oberflächensubstanz der Alveolen Druck ausgeübt wurde. Ebenso fand diese Forschungsgruppe heraus, dass die Substanzen, die die Oberflächenspannung herabsetzen können, vor allem Phospholipide sind. Die Phospholipide können allerdings in ihrer Aktivität durch andere Lipidfraktionen, wie Fettsäuren, Cholesterol und Triacylglycerol, gestört werden. Ebenso berichteten sie, dass synthetisch hergestelltes DPPC die gleiche Aktivität aufwies wie natürliches, aus Rinderlungen extrahiertes DPPC (Klaus et al. 1961). Zur selben Zeit wurde von Avery und Mead beschrieben, dass Lungen Frühgeborener eine höhere Oberflächenspannung aufwiesen als erwartet (Avery et al. 1959). Sie erklärten diese Beobachtung mit einer Insuffizienz oberflächenaktiver Substanz. Robillard entwickelte daraufhin den Therapieansatz der endotrachealen Substitution von synthetischen Phospholipiden. Diese Therapie führte allerdings nicht zum erhofften Erfolg (Robillard et al. 1964). Hingegen konnte durch Einsatz von tierisch gewonnenem Surfactant ein positiver Effekt in Tierversuchen erzielt werden (Rüfer 1967, Enhörning et al. 1972). 1967 entdeckte Gluck, dass DPPC während der embryonalen Entwicklung in der Lunge produziert und in den intraalveolaren Raum sezerniert wird (Gluck et al. 1967). 1971 zeigten sie, dass durch den Gehalt an Lecithin/Sphingomyelin im Fruchtwasser, gewonnen durch Amniozentese, die fetale Lungenreife bestimmt werden kann (Gluck et al. 1971). 1975 entdeckten Hallman et al., dass Phosphatidylglycerol (PG) eine wichtige, unterstützende Substanz zur Ausbreitung von Surfactant auf Oberflächen ist. Ausserdem wiesen sie PG in hohen Konzentrationen bei Kindern mit RDS nach (Hallman et al. 1975). 1980 wurde erstmals von einer erfolgreichen Behandlung des RDS mit bovinem Surfactant berichtet (Fujiwara et al. 1980). Seitdem ist die Therapie des RDS mit Surfactant in der Klinik etabliert. Mittlerweile werden auch weitere pulmonale Erkrankungen in der Neonatalperiode, wie das akute Atemnotsyndrom (kindliches ARDS) (Auten et al. 1991, Khammash et al. 1993), kongenitale Pneumonie (Herting 1997; Herting et al. 2001) und das Mekoniumaspirationssyndrom (Findlay et al. 1996) mit Surfactantgabe therapiert.

### I.2.1. Zusammensetzung von Surfactant

Surfactant besteht zu 90% aus Lipiden, in der Hauptsache Phospholipide. Den Hauptanteil dieser Phospholipide bilden Dipalmitoyl-Phosphatidyl-Cholin (DPPC, 30-40%), andere Phosphatidylcholins (30-40%) und Phosphatidylglycerol (Johansson et al. 1994). DPPC ist die oberflächenaktive Komponente (Stevens et al. 1997). Weiterhin besteht Surfactant aus ca. 10% Proteinen, den Surfactant Proteinen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. Diese Proteine können eingeteilt werden in die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D und die hydrophoben Proteine SP-B und SP-C. SP-A stellt die Hälfte aller Proteine (~ 5%), SP-B, SP-C und SP-D liegen zu etwa 1-2% vor. SP-A und SP-D spielen eine Rolle in der Immunabwehr von inhalierten Pathogenen, SP-A hat zudem eine regulierende Funktion auf die Herabsetzung der Oberflächenspannung.

### I.2.2. Entwicklung des Surfactantsystems

Intrauterin ist die Lunge kaum entfaltet, nimmt nicht am Gasaustausch teil und ist vermindert durchblutet. In den Luftwegen befindet sich von Pneumozyten gebildetes Alveolarsekret, das in die Amnionhöhle gelangt. Die Zusammensetzung des Lungensekrets verändert sich mit der fetalen Reifung. Es werden fünf verschiedene Stadien während der Entwicklung durchlaufen. Die Gasaustauschfläche vergrößert sich im ersten embryonalen Stadium, anschließend entstehen die Lungenstrukturen, die später eine Blut-Luft-Schranke sicherstellen. Im dritten Stadium differenziert sich das Alveolarepithel zu Pneumozyten vom Typ I und II (Wauer 1997). Das vierte Stadium, beginnend ab der 22./23. Gestationswoche, wird auch sakkuläres Stadium genannt. Ab diesem Stadium ist extrauterines Leben möglich, da die Gasaustauschfläche groß genug ist. Die Alveolaroberfläche reifer Neugeborener beträgt  $2,8\text{m}^2$ , verteilt auf 20 bis 24 Millionen Alveolen, die der Erwachsenen  $160\text{m}^2$ , verteilt auf ca. 300 Millionen Alveolen (Walters 2002; Wauer 1997)

Surfactant wird von Pneumozyten Typ II der Lunge synthetisiert. Es befindet sich intrazellulär in den Lammellarkörpern der Typ II Pneumozyten, die Surfactant speichern und durch merokrine Sekretion in den Alveolarraum abgeben. Ab der 12. Schwangerschaftswoche werden im endoplasmatischen Retikulum Surfactantfaktoren gebildet, die ab der 20. Schwangerschaftswoche über den Golgiapparat zu den so genannten Lamellarkörperchen gelangen. Die Lamellarkörperchen bilden die intrazelluläre Speicherform von Surfactantlipiden, SP-B, SP-C und geringen Teilen von SP-A und stellen gleichzeitig Sekretionsvesikel dar. Die Sekretion erfolgt in drei Schritten. Durch Dehnung, z.B. eines intrauterinen Atemzuges, verschmelzen die Lamellarkörper mit der Zellmembran, so dass sich ein Porus bildet. In einem zweiten, noch nicht geklärten Schritt, erfolgt die Abgabe von Surfactant an die Alveolaroberfläche (Dietl et al. 2001).

Während des Geburtsvorganges wird die in der Lunge befindliche alveolare Flüssigkeit resorbiert und mechanisch heraus gepresst. Mit dem ersten Atemzug entfaltet sich die Lunge und wird mit Luft gefüllt. In den ersten fünf bis sechs postpartalen Lebensstunden wird weiterhin die surfactantreiche alveolare Flüssigkeit resorbiert (Wauer 1997). Nach Sekretion wird Surfactant in tubuläres Myelin umgewandelt. Das tubuläre Myelin stellt die extrazelluläre Speicherform des Surfactant dar. Während der Expiration ist die Oberflächenspannung an der Luft/Flüssigkeits-Grenze herabgesetzt. Um dieses zu erreichen wird der Surfactantmonolayer mit DPPC angereichert. Während der Inspiration vergrößert sich die Oberfläche der Alveolen, dabei gewährleisten die Surfactantproteine eine Ausdehnung der Lipide (Oosterlaken-Dijksterhuis et al. 1991). Während dieses Prozesses lösen sich Surfactantbestandteile aus der Grenzschicht und werden wahrscheinlich erneut von Pneumozyten Typ II aufgenommen und wiederverwertet.

### I.2.3. Erkrankungen des Surfactantsystems

Surfactant hat eine komplexe Zusammensetzung. Einer Beeinträchtigung der Zusammensetzung folgen unterschiedliche Erkrankungen. Dieses wurde zuerst

von Avery und Mead erkannt. Sie beschrieben, dass es bei einem Mangel an diesem oberflächenaktiven Material zu einer erhöhten Oberflächenspannung an der Luft/Wasser Grenzschicht in der Lunge von Kindern mit RDS kommt (Avery et al. 1959). Die Hauptursache für das Auftreten eines RDS ist der Surfactantmangel. Lungen von an RDS verstorbenen Kindern enthielten alle normale Surfactantkomponenten, außer dem tubulären Myelin (de Mello et al. 1993). Da SP-A und SP-B essentiell zur Ausbildung des tubulären Myelins sind, kann angenommen werden, dass eines oder beide Proteine unvollständig vorliegen oder gar fehlen. Diese Annahme wurde durch eine Studie bestätigt. Kinder mit RDS wiesen einen unreifen SP-A Metabolismus auf (Moya et al. 1994). 1993 beschrieb Noguee einen Defekt in der SP-B mRNA (Noguee et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass bei Vervollständigung der Sequenz des SP-B Transkriptes erkrankter Kindern eine frame-shift Mutation für die Erkrankung verantwortlich ist (de Mello et al. 1994, Noguee et al. 1994). SP-B Defekte sind assoziiert mit Veränderungen von SP-A und SP-C. Ultrastrukturelle Veränderungen, eine reduzierte Anzahl an Lamellarkörpern oder die Abwesenheit von tubulärem Myelin lässt eine Störung des Surfactantmetabolismus vermuten (de Mello et al. 1994). Serumproteine sind hauptsächlich für die Inaktivierung von Surfactant verantwortlich (Seeger et al. 1992). Ebenso beeinträchtigt Fibrinogen die Surfactantaktivität (Seeger et al. 1993). Surfactant wird von polymerisiertem Fibrinogen inkorporiert. Wird der Fibrinkoagel lysiert, ist die Surfactantaktivität wieder hergestellt (Günther et al. 1994). Anästhetika wie Halothan (Molliex et al. 1994), Drogen (Haagsman HP 1992) oder toxische Agenzien wie Polyurethanrauch (Oulton et al. 1994) beeinflussen in vivo und in vitro die Biosynthese und Funktion des Surfactant.

Seit 1980 Fujiwara et al. den therapeutischen Effekt von Surfactant bewiesen, wird Surfactant in Deutschland seit den 90er Jahren klinisch eingesetzt (Fujiwara et al. 1980). Heutzutage spielt die Surfactanttherapie eine große Rolle in der Klinik. Morbidität und Mortalität von Frühgeborenen konnten signifikant gesenkt werden (Mauskopf et al. 1995, Palta et al. 1994). Nicht nur beim RDS des Neugeborenen, sondern auch bei neonataler Pneumonie und Mekoniumaspirationssyndrom wird mit Surfactant behandelt (Findlay et al. 1996, Herting et al. 2001) Bisher wurden keine spezifischen Immunreaktionen auf die Surfactantproteine beobachtet (Bambang Oetomo et al. 1993, Strayer et al. 1991). Zur intratrachealen

Surfactantgabe ist eine Intubation notwendig. Die Verabreichung erfolgt durch Instillation oder Vernebelung über den Tubus.

---

### **1.3. Antibakterielle Peptide**

Wie alle höheren Organismen hat der menschliche Organismus Strategien entwickelt sich gegen eindringende Mikroorganismen zu schützen. Die meisten Grenzflächen des Körpers zur Umwelt sind mit einer dichten physiologischen Mikroflora besiedelt, die aus einer hohen Anzahl an kommensalen Bakterien besteht. Diese Flora ist harmlos und unter normalen Umständen sogar nützlich für den Körper. Wird das Gleichgewicht dieser Mikroflora gestört, kann es zu lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen kommen und pathogene Keime können in den Körper eindringen (Hornef et al. 2002). Diese Grenzflächen des Körpers zur Umwelt, wie der Gastrointestinaltrakt, der Urogenitaltrakt, der Respirationstrakt und die Haut, müssen durch eine effektive Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen geschützt werden. Neben einer physikalischen Barriere durch spezielle Epithelien spielt auch die chemische Barriere, bestehend aus antibakteriellen Peptiden, eine grosse Rolle (Hornef et al. 2002).

Die angeborene und erworbene Immunabwehr bilden das komplexe Immunsystem höher entwickelter Organismen. Die erworbene Immunabwehr ist spezifisch und durch ihre Fähigkeit zum Gedächtnis und zur Toleranz charakterisiert. Einige Zellen erwerben nach dem ersten Antigenkontakt ein Gedächtnis, um bei erneutem Antigenkontakt schneller und effektiver antworten zu können. Gleichzeitig muss das Immunsystem tolerant gegenüber körpereigenen Antigenen sein, damit die Immunantwort sich nicht gegen den eigenen Organismus richtet (Janeway et al. 1999). Die spezifische Immunabwehr wird durch die B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) vermittelt. Die angeborene Immunabwehr besteht aus einem Phagozytosesystem zu dem Granulozyten, Makrophagen, natürliche

Killerzellen, Mastzellen und Epithel- und Endothelzellen gehören und den unspezifischen antiviralen und bakteriziden Strukturen, wie z.B. Lysozym, C-reaktivem Protein und Interferonen beim Menschen. Defensine, Cathelicidine und Prophenin sind endogen antimikrobiell wirksame Peptide die u.a. von Epithelzellen, Granulozyten und Makrophagen gebildet werden. Durch ihre chemotaktischen Eigenschaften können sie modulierend auf die spezifische Immunabwehr wirken. Defensine sind Peptide mit einem breiten antimikrobiellen Spektrum (Meyerholz 2005). Cathelicidine sind eine Gruppe antibakterieller Proteine, die eine N-terminale Region besitzen, gefolgt von einer variablen, antibakteriellen Domäne. Etwa 20 der charakterisierten Cathelicidine konnten in Säugetieren nachgewiesen werden. LL-37 ist ein beim Menschen auftretendes Cathelicidin. Es konnte im Knochenmark nachgewiesen und aus degranulierenden Granulozyten isoliert werden. Eine starke Aktivität gegen gram-positive und gram-negative Bakterien wurde nachgewiesen (Agerberth et al 1995). Prophenin ist ein Cathelicidin mit 42 Prolin-Resten und 15 Phenylalaninresten. Es wurde als erstes aus Leukozyten vom Schwein isoliert (Harwig et al. 1995). Aus dem Rückenmark des Schweins konnte die cDNA repliziert werden (Pungercar et al. 1993). Über 500 weitere Peptide mit antimikrobiellem Potential wurden inzwischen identifiziert. Diese antibiotischen Peptide wurden in Pflanzen, Insekten, Wirbellosen und Wirbeltieren, sowie in Bakterien nachgewiesen (Boman 2000). Häufig zeigen sie ähnliche Aktivität, unterscheiden sich aber in ihren vielfältigen Strukturen. Man kann hierbei drei Untergruppen an Strukturen unterscheiden: lineare Peptide mit alpha-helikaler Struktur, lineare Peptide mit einer hohen Anzahl an Aminosäureresten und Peptide mit einer oder mehreren Disulphidbrücken.

Obwohl Alexander Flemming bereits 1922 eine bakteriolytische Aktivität in Nasalsekreten beobachtete, wurde die chemische Barriere erst in jüngster Zeit genauer erforscht. 1997 untersuchten Harder et al. Patienten mit Psoriasis, bei denen bekannt ist, dass sie seltener an Infektionen der Haut leiden. Aus Schuppen der Psoriasisherde konnten sie hohe Konzentrationen an antimikrobiellen Peptiden isolieren. Das isolierte humane  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) wirkte bakterizid auf *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, das humane  $\beta$ -Defensin-3 auf *Staphylococcus aureus*. Auf gesunder Haut liessen sich diese Peptide hingegen kaum nachweisen. Die Defensinproduktion konnte aber durch entzündliche Vorgänge oder Kontakt der Haut mit bestimmten Bakterien induziert

werden. Anstelle von Defensinen konnte aus dem stratum corneum gesunder Haut andere antimikrobielle Peptide isoliert werden, die RNase 7 und das Psoriasin, die wirksam gegen Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* bzw. *E. coli* sind (Harder et al. 2001).

Im gesamten Gastrointestinaltrakt konnten Defensine, hBD-1 das Cathelicidin LL37 in den Epithelzellen nachgewiesen werden, in den Panethzellen hD-5 und hD-6. Auch hier wurde durch eine Entzündung im Gastrointestinaltrakt eine Defensinproduktion induziert (Wehkamp et al. 2005). Bei entzündlichen Darmerkrankungen wie M. Crohn wurde eine deutlich verminderte Synthese von hD-5 und hD-6 nachgewiesen (Wehkamp et al. 2005).

In der Henle'schen Schleife der Nieren wird vor allem das hBD-1 exprimiert. Bei Infektionen der Nieren wurde ein Anstieg dieses Defensins auf das Dreifache dokumentiert (Ganz 2001).

Im Respirationstrakt ist die angeborene Immunabwehr von großer Bedeutung. Eine große epitheliale Oberfläche steht mit der Umwelt in Kontakt und ist einer Vielzahl an Mikroorganismen und anderen aerogen übertragbaren Partikeln ausgesetzt (Zhang et al. 2000). In bronchoalveolären Lavagen konnten antibakterielle Peptide, u.a. Defensine und Cathelicidine gefunden werden. Ebenfalls spielen diese antimikrobiellen Peptide bei entzündlichen und infektiösen pulmonalen Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) eine Rolle. Den Surfactantproteinen A und D konnte ebenfalls eine antibakterielle und immunmodulatorische Aktivität nachgewiesen werden (Meyerholz 2005). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass in Schweinelungengewebe neben SP-B und SP-C als antibakterielle Substanzen, drei Peptide der Cathelicidin-Gruppe enthalten sind. Hierzu gehören das Polypeptid Prophenin-1 (PF-1), das Polypeptid Prophenin 2 (PF-2) und ein C-terminales Fragment des Prophenins, bestehend aus 18 Komponenten (PF-18) mit ebenfalls antibakterieller Wirkung. Diese Propheninpolypeptide konnten ebenso in Curosurf® nachgewiesen werden (Wang et al. 1999).

Aus weiteren Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die endogenen antibakteriellen Peptide LL-37 und PF-18 zur Immunabwehr beitragen. Prophenin konnte zusammen mit dem PF18 Fragment aus Surfactant vom Schwein extrahiert werden. Bis dahin wurde angenommen, dass SP-B und SP-C die

einzigsten Polypeptide in Surfactant-Extraktionen waren. PF-18 ist ein antibakterielles Fragment aus PF-1. PF-1 besteht aus 79 Resten, wobei PF-18 mit den C-terminalen Resten 62-79 identisch ist. Harwig et. al. konnten zeigen, dass das Fragment, bestehend aus den Resten 42-79, ebenfalls partiell antibakteriell auf *E. coli* wirkt. Ein Fragment, bestehend aus den Resten 1-41 zeigte hingegen keinerlei antibakterielle Wirkung (Harwig et al. 1995). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der C-terminale Rest für eine antibakterielle Wirkung verantwortlich ist. Curosurf<sup>®</sup>, ein aus Schweinelungen gewonnenes Präparat, enthält Prophenin und das C-terminale Fragment 62-79. Zudem konnte gezeigt werden, dass Curosurf<sup>®</sup> mit einem Phospholipidgehalt von 1 mg/ml und 10 mg/ml bakteriostatisch auf B-Streptokokken wirkt. Curosurf<sup>®</sup> mit einem Phospholipidgehalt von 20 mg/ml wirkte bakterizid auf B-Streptokokken (Herting et al. 1994). Es könnte sein, dass ein Teil dieser antibakteriellen Wirkung auf Prophenin und deren Fragmente zurück zu führen ist (Wang et al. 1999).

## I.4. FRAGESTELLUNG

Heutzutage führt die Behandlung von Infektionserkrankungen mit Antibiotika immer häufiger zu Resistenzen der Keime. Deshalb wird es wichtiger alternative Methoden zur Infektionsbehandlung zu erforschen. Der menschliche Körper produziert selbst antibiotisch wirksame Peptide, um eine erste Invasion von pathogenen Keimen abzuwehren. Prophenin ist eines dieser antibakteriellen Peptide, welches natürlicherweise in Surfactant vom Schwein vorkommt und in-vitro eine antibakterielle Wirkung auf B-Streptokokken zeigt. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass das Surfactant Curosurf® einen bakteriostatischen Einfluss auf die Proliferation von B-Streptokokken hat.

Diese Arbeit soll klären, welche Wirkung Prophenin auf das Wachstum von GBS unter Einfluss von Curosurf® hat. Hierfür werden zwei Typen GBS, Serotyp III und Serotyp Ib, mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Prophenin allein und mit Zugabe von Curosurf® inkubiert. Untersucht wird, ob durch Zugabe von Curosurf® die antibakterielle Wirkung des Prophenins auf die B-Streptokokken beeinflusst wird. Da Proteine die Aktivität von Surfactant herabsetzen können, soll weiterhin untersucht werden, ob das Peptid Prophenin einen Einfluss auf die oberflächenaktive Wirkung von Curosurf® hat. Hieraus könnte abgeleitet werden, ob Prophenin zur antibakteriellen Therapie eingesetzt werden könnte ohne die Aktivität von Curosurf® zu beeinflussen.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1. Material

#### II.1.1. Bakterien

Für die Durchführung der folgenden Versuche wurden zwei Typen Streptococcus agalactiae, Typ Ib und Typ III, ein Bakterienstamm der Lancefieldgruppe B verwendet. Die Streptokokkenisolate wurden aus Haut- oder Schleimhautabstrichen oder aus positiven Blutkulturen gewonnen.

#### II.1.2. Surfactantpräparat

Verwendet wurde das Präparat Curosurf®. Durch Einsatz von Chloroformmethanolextraktion und Flüssigkeitsgelchromatographie kann die Suspension, die zu 99% aus polaren Lipiden und zu 1% aus hydrophilen niedermolekularen Apoprotein besteht, aus Schweinelungen gewonnen werden. In der Versuchsdurchführung wurde das Präparat mit folgenden Chargennummern eingesetzt: Ch-206/02 und Ch-148/01. Das Präparat wurde bei –70°C gelagert und zur Verwendung bei Zimmertemperatur aufgetaut (Serono Pharma GmbH, Unterschleißheim).

### II.1.3. Antibakterielles Peptid

Verwendet wurde das synthetisch hergestellte C-terminale Fragment von Prophenin mit folgender Summenformel:

$\text{NH}_2\text{-PheProProProProPheArgProProProPheGlyProProArgPhePro-NH}_2$ .

### II.1.4. Geräte und Materialien

Standard-I-Nährbouillon (MERCK, Darmstadt)

5% defibriniertes Schafsblut (OXOID GmbH, Wesel)

Gewindereagenzgläser mit luftdicht verschließbaren Kunststoffkappen (SCHUETT Labortechnik GmbH, Göttingen)

Spektralphotometer, Ultrospec III (PHARMACIA BIOSYSTEMS, Freiburg)

Zentrifuge, Rotixairp (HETTICH-Zentrifugen, Tuttlingen)

Thermoshaker: horizontal shaker, Thermoshake (GERHARDT, Bonn)

Vortex Genie (BENDER & HOHEIN AG, Zürich, Schweiz)

Pipetten (Eppendorf)

50 ml Röhrchen: Blue Max <sup>TM</sup> 50 ml konische Röhrchen (Polypropylen, Becton Dickinson Labware Europe, MEYLAN CEDEX, Frankreich)

einmal verwendbare Kunststoffpetrischalen

Eppendorf-cups

100ml Verschraubgläser (Biochrom KG, Berlin)

50 ml Perfusorspritzen (BRAUN, Melsungen)

Columbia base agar (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England)

Standard I-Nährbouillon (MERCK, Darmstadt)

Pulsating-Bubble-Surfactometer (Electronics Corporation, Buffalo, New York, USA)

---

## II.2. Methoden

Die Nährbouillon wurde aus 25g Trockenextrakt der Standard I-Nährbouillon unter Zugabe von 1000 ml aqua dest. hergestellt. Die Lösung wurde in einem 2 l Rundkolben bei 121°C 20 min. autoklaviert.

Die Elektrolytlösung dieser Bouillon beträgt:

Cl<sup>-</sup>: 110mmol/l

K<sup>+</sup>: 11,5 mmol/l

Na<sup>+</sup>: 138 mmol/l

50 ml der Bouillon wurde auf Schraubverschlussgläser à 100 ml und 11,5 ml in Reagenzgläser mit Schraubverschluss verteilt und nochmals bei 121°C 20 min. autoklaviert. Die Gläser wurden bei 4°C gelagert.

Für die Herstellung der Schafsblutagarplatten wurde 39 g Columbia Agar in 1000 ml aqua bidest. in einem Rundkolben gelöst und bei 121°C 20 min. autoklaviert. Anschließend wurde der Agar im 60°C warmen Wasserbad in flüssigem Zustand gehalten und während des Versuchsablaufs die benötigten Mengen entnommen. Nachdem die entnommene Lösung auf ca. 37°C abgekühlt war, wurden 5% defibriertes zimmertemperaturwarmes Schafsbluts hinzugefügt. Der Schafsblutagar wurde in Kunststoffpetrischalen pipettiert, auf die zuvor 100µl Bakteriensuspension aus den Versuchsansätzen pipettiert wurde. Die Petrischalen wurden leicht geschwenkt, um die Suspension gleichmäßig mit dem Agar zu vermengen. Die Petrischalen wurden bei 37°C 24 h inkubiert.

### II.2.1. Herstellung eingefrorener Aliquote

Um jeden Versuch mit annähernd der gleichen Streptokokkenkonzentration starten zu können, wurden Aliquote hergestellt, die bei -70°C gelagert wurden. Hierzu wurden zunächst aus Blutkulturen Rasenausstriche angefertigt und bei 37°C für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Bakterienrasen in 1ml-Eppendorfcups mit 1 ml steriler Standard-I-Nährbouillon überführt und eingefroren. Aus diesen eingefrorenen Kulturen wurden mittels eines Drei-Ösenausstriches auf Blutagarplatten weitere Kulturen angelegt, die bei 37°C für 24 Stunden inkubiert wurden. Aus letzteren Kulturen wurde mittels steriler Öse 10 Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 2 mm in 1 ml steriler Standard-I-Nährbouillon in ein 1 ml-Eppendorfcup überführt und bei -70°C eingefroren und gelagert. Mittels dieser Methode wurde gewährleistet, dass in jeder Startkultur eine etwa ähnlich hohe Bakterienkonzentration nachzuweisen war.

### II.2.2. Herstellung eines Versuchsansatzes aus einer Startkultur

Ein Eppendorfcup mit 1ml-Startkultur wurde in ein Reagenzglas mit 11,5 ml Bouillon überführt und 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden aus der Bakteriensuspension 7,5 ml in 50 ml vorgewärmte Bouillon gegeben und diese für weitere 2 h inkubiert, um die exponentielle Wachstumsphase der Keime zu erreichen (Abbildung 2).

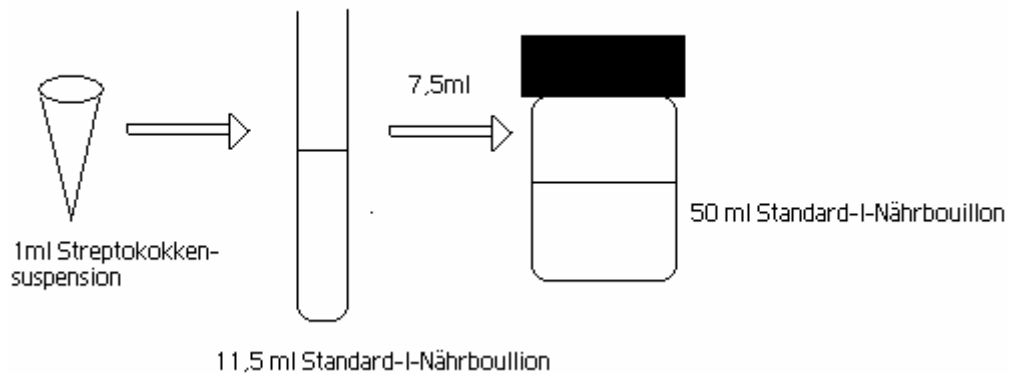


Abbildung 2 : Schema des Probenansatzes. 1ml Streptokokkensuspension wird über 16 h in 11,5ml Standard-I-Nährbouillon inkubiert. 7,5ml daraus werden vor Versuchsbeginn 2 h in 50 ml Standard-I-Nährbouillon inkubiert.

Zum Entfernen des Nährmediums wurden je 25 ml auf zwei 50 ml-Falconröhrchen verteilt und bei 2160 g zentrifugiert. Der Überstand an Bouillon konnte verworfen werden. Die Pellets wurden in wenig steriler 0,9% NaCl resuspendiert, in 25 ml 0,9% NaCl gepoolt und anschliessend nochmals bei gleicher g-Zahl und Zeit zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in ca. 5 ml 0,9% NaCl resuspendiert, um so eine Suspension mit hoher optischer Dichte zu erhalten.

Die auf diese Weise von Nährbouillon gereinigten Bakterien konnten mittels NaCl-Verdünnung in eine Suspension mit gewünschter optischer Dichte gebracht werden. Die optischen Dichten wurden im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Leerwert wurde physiologische Kochsalzlösung verwendet. Zunächst wurden die optischen Dichten durch 10- fache Verdünnungen aus einer Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von ca. 1,9 bei  $E = 595\text{nm}$  hergestellt. Es stellte sich jedoch später heraus, dass diese Methode ungenauer war als das jeweilige erneute Einstellen einer optischen Dichte in 10er Stufen. Die optischen Dichten der vier Versuchsreihen in einem Versuch sollten bei 1,9; 1,0; 0,3 und 0,1 liegen, was je einer Bakterienkonzentration von  $10^8$ ;  $10^7$ ;  $10^6$  und  $10^5$  CFU pro ml entsprach.

### II.2.3. Ermittlung von Wachstumskurven

Vor Beginn der Versuche mussten für jeweils beide Bakterienstämme diejenigen Inkubationszeiten ermittelt werden, die sie benötigten, um die exponentielle Wachstumsphase zu erreichen. Hierfür wurden aus den Suspensionen beider Bakterienstämme zum Zeitpunkt  $t_0$  und dann in 30 Minuten Abständen über 4 Stunden Proben entnommen und die CFU nach Wachstum auf Schafsblutagarplatten ermittelt. Anhand der Auszählungen konnte man annehmen, dass alle Bakterien nach zweistündiger Inkubationszeit die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Diese Zeit wurde dann zur Vorinkubation vor Versuchsbeginn gewählt (Abb. 3).

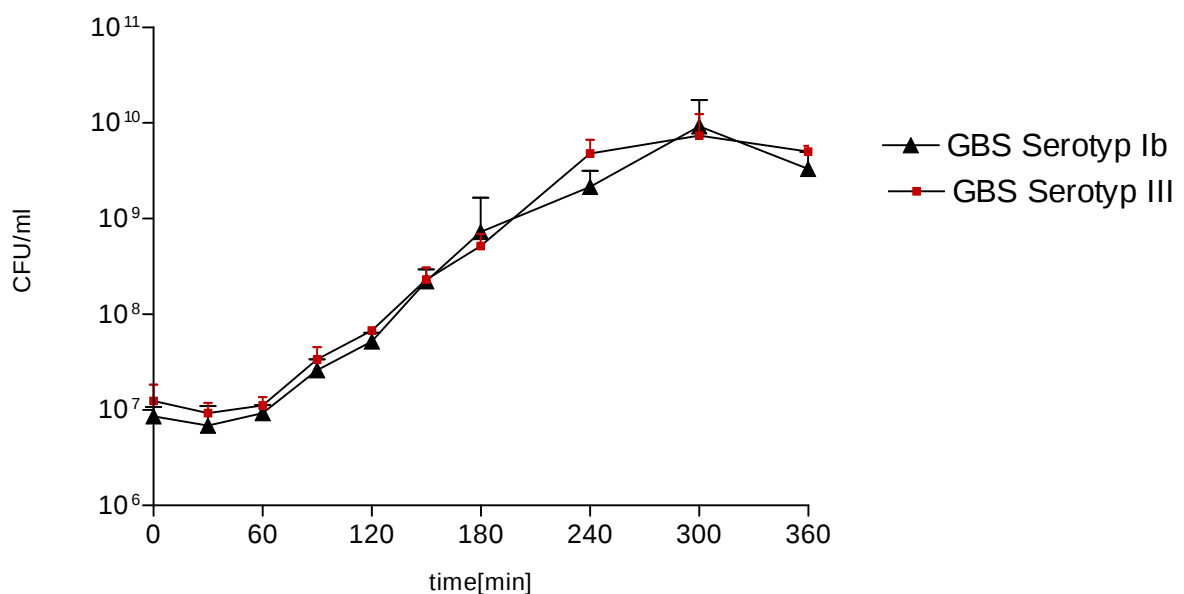


Abbildung 3: Anzahl der CFU in Abhängigkeit von der Zeit. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass die eingesetzten Bakterienstämme ein Wachstumsverhalten entsprechend einer normalen Wachstumskurve von Bakterienkulturen aufweisen.

Der Lagphase von 1 h folgt eine exponentielle Wachstumsphase von 3 h. Nach einer stationären Phase von 1 h geht das Bakterienwachstum in eine Absterbephase über.

#### II.2.4. Ermittlung von Bakterienkonzentrationen mittels optischer Dichten

Die Bakterienkonzentration in einer Suspension korreliert mit der photometrisch gemessenen optischen Dichte. Die optische Dichte berechnet sich aus  $OD = \text{Konzentration} \cdot \text{Streuquerschnitt} \cdot \text{Küvettenlänge}$ . Die Extinktion einer Bakteriensuspension wurde im Photometer im Vergleich zu einem 0,9% NaCl-Leerwert gemessen. Um für jeden Versuchsansatz eine konstante Anzahl an Bakterien einsetzen zu können, musste eine bestimmte Streptokokkenkonzentration einer bestimmten optischen Dichte zugeordnet werden. Hierfür wurden aus der Wachstumsphase in physiologischer Kochsalzlösung zu jeder Stunde über vier Stunden Proben entnommen und die optische Dichte ermittelt. Die entnommenen Proben wurden auf Schafsblutagarplatten ausplattiert, 24 Stunden inkubiert und die Kolonien ausgezählt. Über die Ermittlung der Extinktion nach einer bestimmten Wachstumszeit und die entsprechende Anzahl an CFU in dieser Zeit, kann einer bestimmten optischen Dichte eine definierte Anzahl an CFU zugeordnet werden. Die Abbildungen 4 und 5 geben das Verhältnis zwischen optischer Dichte und CFU pro ml graphisch wieder. Diese Arbeitsweise wurde auch schon in vorangegangenen Studien gewählt (Möller 1998). Mit Hilfe der Regressionsgerade in dieser Darstellungsweise kann eine möglichst konstante Bakterienkonzentration in den Bakteriensuspensionen für die Versuchsansätze ermittelt werden.

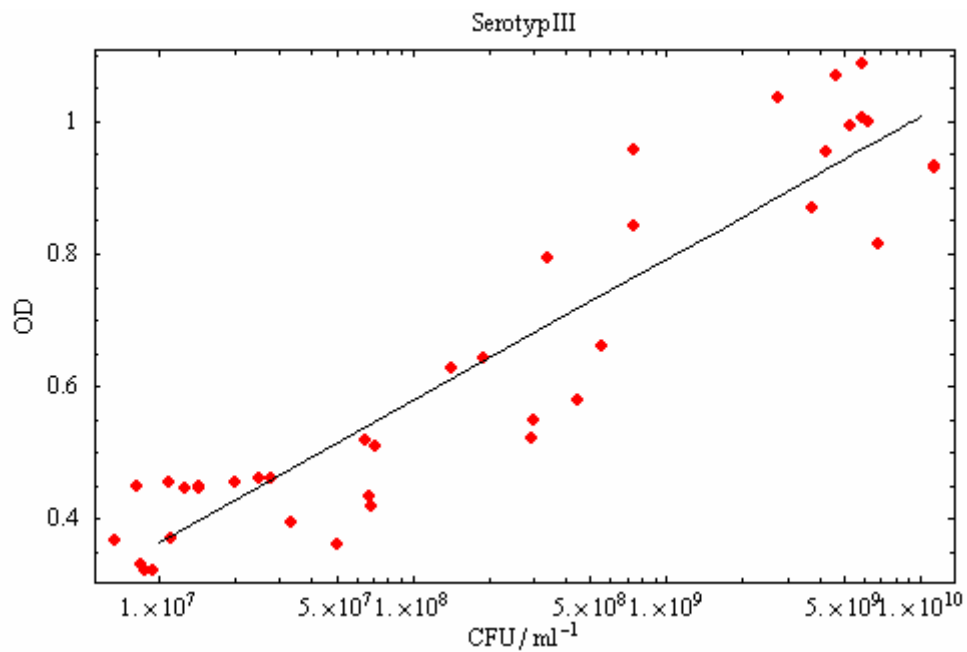


Abbildung 4: Darstellung der optischen Dichte (OD) bei 595 nm in Abhängigkeit von der Kolonienzahl (CFU=colony forming unit) von GBS Typ III in einer NaCl- Lösung.

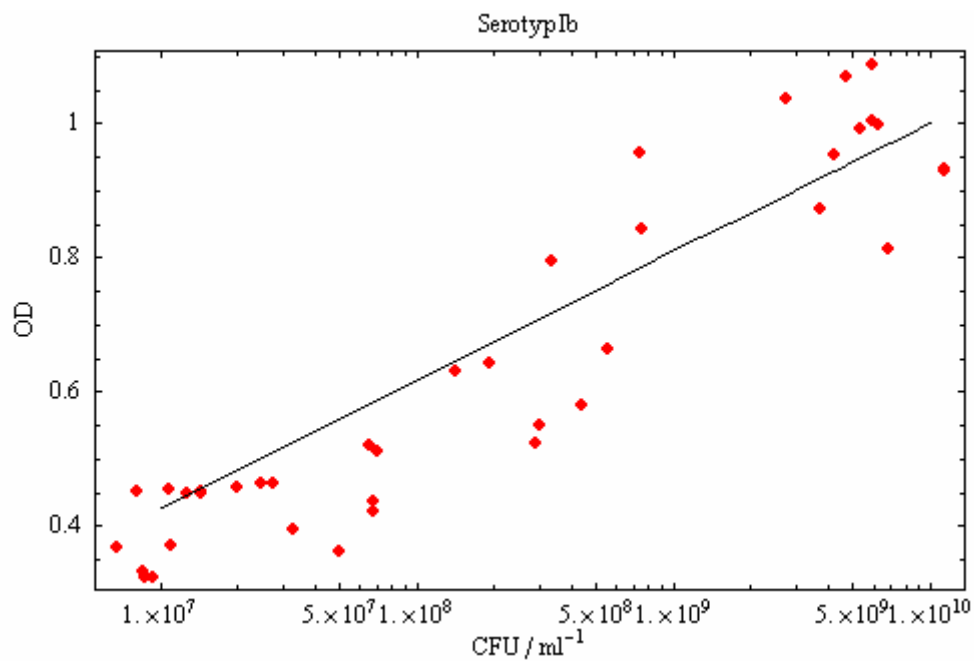


Abbildung 5: Darstellung der optischen Dichte (OD) bei 595nm in Abhängigkeit von der Kolonienzahl (CFU=colony forming unit) von GBS Typ Ib in einer NaCl- Lösung.

Für die Herstellung einer Startkultur wurden die optischen Dichten so eingestellt, dass die Konzentrationen jeweils  $10^8$  CFU/ml,  $10^7$  CFU/ml,  $10^6$  CFU/ml bzw.  $10^5$  CFU/ml betrugen. Im Schüttelinkubator wurden die Streptokokken vier Stunden in 0,9% NaCl inkubiert, zum Zeitpunkt  $t_0$  und zu jeder weiteren Stunde 100  $\mu$ l Proben der Bakteriensuspensionen entnommen, 10 fach verdünnt und jeweils die drei letzten Verdünnungsstufen auf Agarplatten ausplattiert (siehe Abb. 8).

Hierbei sollte kontrolliert werden, ob die ermittelten optischen Dichten mit den entsprechenden Konzentrationen übereinstimmten und ob ein nahezu konstantes Wachstum über vier Stunden zu erreichen war. Abb. 6 und 7 geben den Wachstumsverlauf wieder.

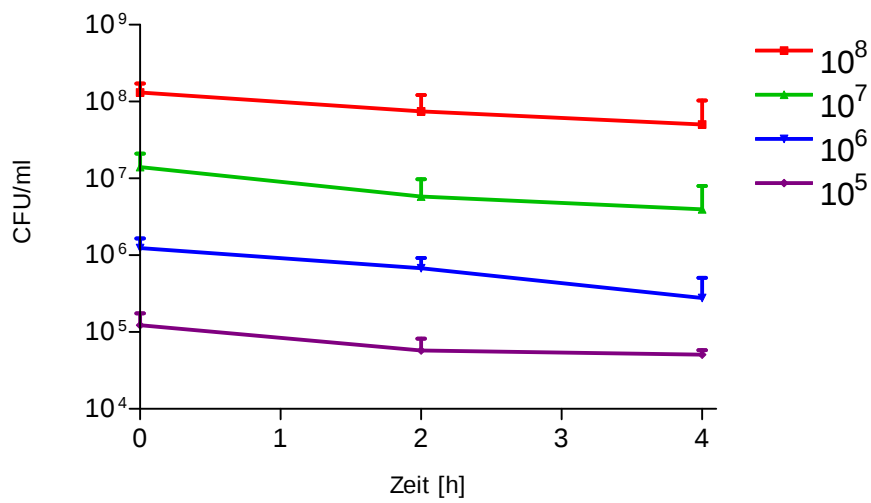


Abbildung 6: Wachstum für den Serotypen Ib mit den Konzentrationen  $10^5$  CFU/ml,  $10^6$  CFU/ml,  $10^7$  CFU/ml und  $10^8$  CFU/ml (n=2).

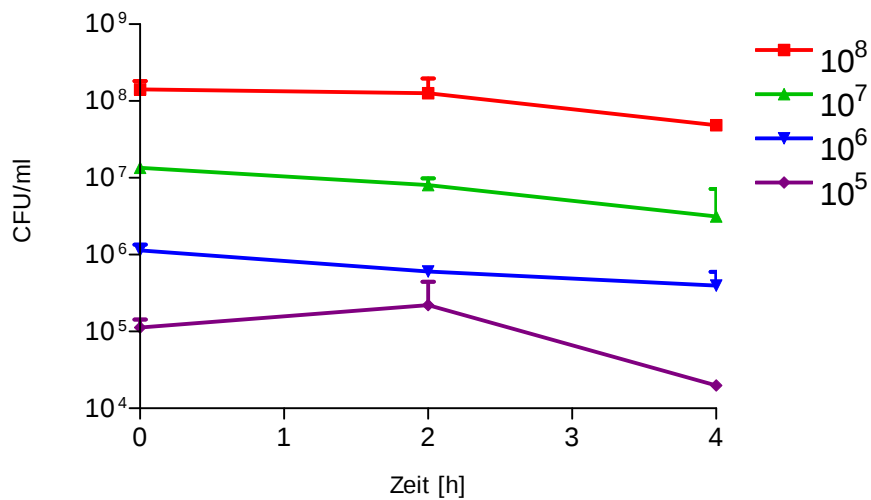


Abbildung 7: Wachstum für den Serotypen III mit den Konzentrationen  $10^5$  CFU/ml,  $10^6$  CFU/ml,  $10^7$  CFU/ml und  $10^8$  CFU/ml (n=2).

### II.2.5. Wachstumsversuche mit Prophenin und Curosurf®

Für jeden Versuchsansatz wurde folgendes Versuchschema viermal pipettiert:

|     |                                  |                                                                                               |
|-----|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| I   | Kontrollansatz                   | 150µl Bakteriensuspension+600µl NaCl 0,9%                                                     |
| II  | Ansatz+Curosurf®                 | 150µl Bakteriensuspension<br>+93,75µl Curosurf®+506,25µl NaCl 0,9%                            |
| III | Ansatz+PF 18 (90µmol)            | 150µl Bakteriensuspension<br>+ 75µl PF-18(90µmol)<br>+525µl NaCl 0,9%                         |
| IV  | Ansatz+PF-18 (90µmol)+ Curosurf® | 150µl Bakteriensuspension<br>+75µl PF-18(90µmol)+<br>93,75µl Curosurf®<br>+431,25µl NaCl 0,9% |
| V   | Ansatz+PF-18 (9µmol):            | 150µl Bakteriensuspension<br>+75µlPF-18(9µmol)+525µl NaCl 0,9%                                |
| VI  | Ansatz+PF-18 (9µmol)+Curosurf    | 150µl Bakteriensuspension<br>+75µlPF-18(9µmol)+<br>93,75µl Curosurf®<br>+431,25µl NaCl 0,9%   |

Die Bakteriensuspensionen aus einer Startkultur wurden wie oben beschrieben hergestellt und entsprechend auf die vier optischen Dichten eingestellt. Zu jedem der vier Versuchsschemata mit je 6 Ansätzen wurde je 150  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension mit spezifischer optischer Dichte hinzu pipettiert und im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert.

Zum Zeitpunkt  $t_0$ ,  $t_2$  und  $t_4$  wurden Proben entnommen, diese 10-fach nach dem Schema in Abbildung 8 verdünnt und die jeweils drei letzten Verdünnungsstufen auf jeweils zwei Blutagarplatten ausplattiert. Pro Probenentnahme wurden 36 Agarplatten angefertigt, d.h. pro Versuch wurden nach ca. 12 Stunden Wachstum bei 37°C 216 Agarplatten ausgewertet.

100  $\mu\text{l}$  Bakterien-  
suspension

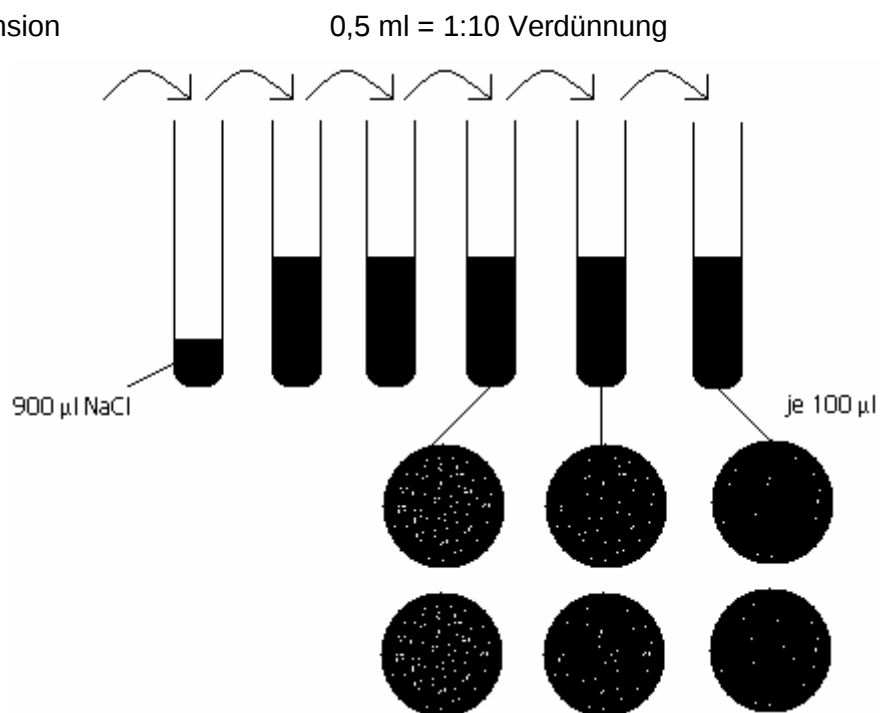
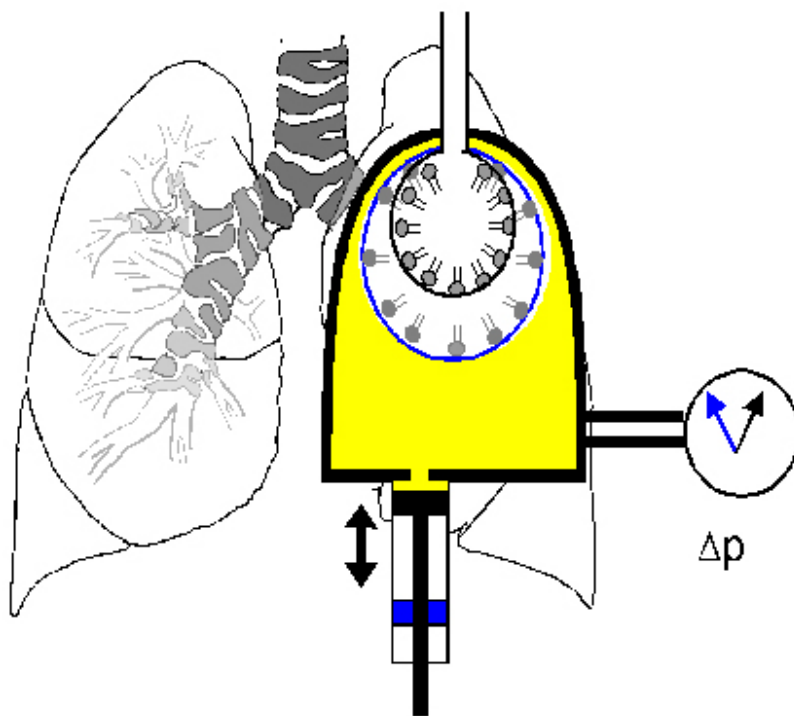


Abbildung 8: Pipettierschema

## II.2.6. Messmethoden zur Bestimmung der Oberflächenaktivität

Das Pulsating-Bubble-Surfactometer (PBS) kann die Oberflächenspannung ( $\gamma$ ) einer Gasblase, die in einer Flüssigkeit pulsiert, mit Hilfe der LaPlace-Formel bestimmen (Enhörning 1977) (Abb.9). Durch Messung von  $\Delta p$  und des Blasenradius kann die Oberflächenspannung ( $\gamma$ ) berechnet werden.

$$\Delta p = 2\gamma/r \rightarrow \gamma = (\Delta p \cdot r)/2$$



Präzisionskolbenpumpe

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Messvorgangs im PBS. Die pulsierende Gasblase ist ein Modell für den Vorgang in einer Alveole. Über den Drucksensor wird der Druck in der Blase gemessen. Über die Präzisionskolbenpumpe wird die Blasengröße verändert.

Das PBS stellt ein Modell für den Vorgang in einer Alveole dar. In dem PBS wurde mittels eines Mikroskops in einer Spezialküvette, die mit Curosurf<sup>®</sup> bzw. Curosurf<sup>®</sup> und Prophenin befüllt wurde, eine Blase auf eine definierte Grösse eingestellt. Mit einer zuvor eingestellten Frequenz (bis 20 Pulsationen/min) lässt man mittels einer Kolbenpumpe die Blase 5 Minuten pulsieren. Die Zunahme des Blasenvolumens von minimalem zu maximalem Blasenradius betrug 50% (Radius min 0,40 bis max 0,55 mm). Während dieses Pulsationsvorgangs wurde über einen Drucksensor der Druck in der Küvette erfasst und aufgezeichnet (alle 0,06 sec.). Der Druck in der Gasblase entsprach dem atmosphärischen Druck. Durch einen Schlot der Küvette stand diese mit der Atmosphäre in Verbindung. Vor Versuchsbeginn musste der Drucksensor auf den atmosphärischen Druck kalibriert werden. Das Gerät ermittelte die Differenz zwischen dem Atmosphären- und dem Küvettendruck ( $\Delta p$ ). Mit  $\Delta p$  und dem Blasenradius  $r$  konnte mittels des LaPlace'schen Gesetzes die Oberflächenspannung berechnet werden. Um die Küvetten frei von oberflächenaktiven Substanzen zu halten, wurden sie nach jedem Versuch mit deionisiertem Wasser gespült und in eine spezielle Reinigungslösung gelegt. Zur Überprüfung der Verlässlichkeit der Messdaten wurden Kalibrierungen mit reinem Wasser oder 40%igem Ethanol durchgeführt und mit Tabellen aus der Literatur verglichen (Hall et al. 1993).

### II.2.7. Statistische Auswertung

Es wurden ausschließlich Daten für die Zeitpunkte  $t_0$  und  $t_2$  in der statistischen Auswertung berücksichtigt, da für einige Versuchsansätze nach vierstündiger Inkubation keine statistisch auswertbaren Daten mehr zu erheben waren. Ausgewertet wurden Agarplatten mit höchstens 300 CFU/ml.

Zur statistischen Auswertung der Daten konnte der MeanDifference Test (Welch's approximate t-Test) angewandt werden. Dieser Test ist legitim, wenn die Daten einer Normal- oder Lognormalverteilung folgen. An die logarithmierten Werte der gemessenen Bakterienkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$  ( $c_2/c_0$ ) wurde eine Normalverteilung angepasst. Dass die Werte näherungsweise lognormal verteilt sind, ist aus den Abbildungen zu entnehmen.

Als Nullhypothese wird definiert: Es besteht kein Wachstumsunterschied zwischen einem Versuchsansatz und der zugehörigen Kontrollgruppe. Bei einem p-Wert  $p < 0,05$  wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen. Bei einem p-Wert  $p > 0,05$  kann die Nullhypothese nicht verworfen werden.

Abbildung 10 zeigt jeweils 5 LogNormal-Verteilungen mit der geometrischen Standardabweichung  $\sigma_g = 1.05$  und den Logarithmen der geometrischen Mittelwerte der Konzentrationen  $\langle c \rangle = -3,85$  und  $\langle c \rangle = -2$ . Es wurden mit einem Zufallszahlengenerator mit dieser Charakteristik jeweils 8 Pseudomesswerte erzeugt, wie in der Realität auch. Die von den verschiedenen Datensätzen überstrichenen Bereiche liegen in den meisten Fällen deutlich auseinander, d.h. die Nullhypothese, dass zwischen den Verteilungen kein Unterschied besteht, ist abzulehnen. In immerhin etwa 5 % der Fälle überlappen sich die Werte aber so, dass die Nullhypothese nicht zurückgewiesen werden kann. Die gezeigte Überlappung kann also als Grenze zwischen den Bereichen der Signifikanz und Nichtsignifikanz angesehen werden. Durch rein visuellen Vergleich der experimentellen Resultate mit diesem Testbild ist also die Signifikanz mit guter Zuverlässigkeit mit bloßem Auge beurteilbar (Abb.10).

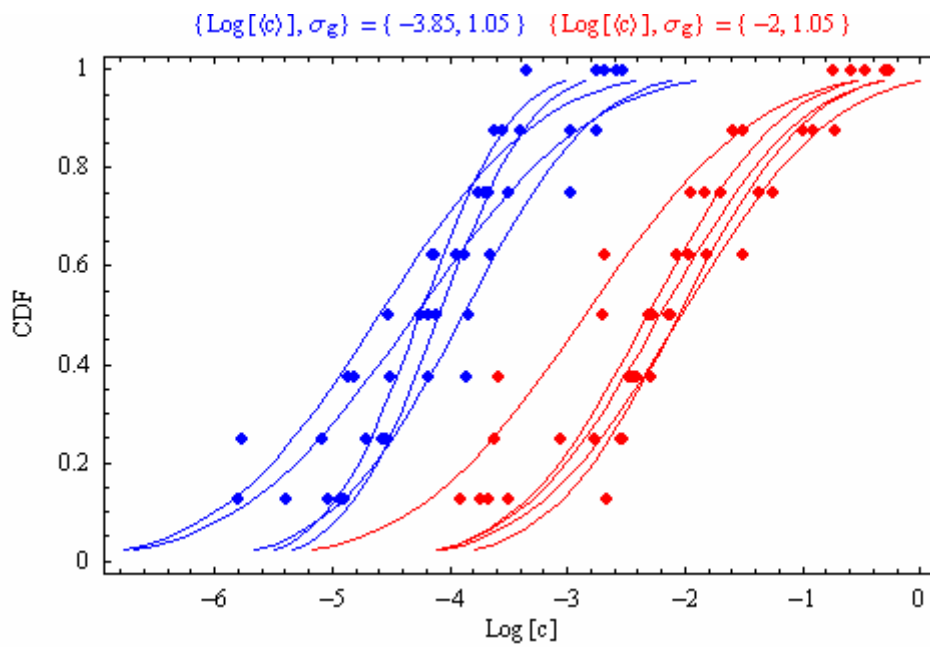


Abbildung 10: 5 LogNormal-Verteilungen mit der geometrischen Standardabweichung  $\sigma_g = 1.05$  und den Logarithmen der geometrischen Mittelwerte der Konzentrationen  $\langle c \rangle = -3.85$  und  $\langle c \rangle = -2$ . (CDF=Cumulative Distribution Funktion, kumulativer Verteilungsfunktion)

### III. ERGEBNISSE

#### III.1. Versuche zum Proliferationsverhalten von GBS

##### III.1.1. Wachstumsverhalten und statistische Auswertung von GBS III mit Curosurf® und Prophenin in unterschiedlichen Konzentrationen

Den Graphen für den Serotypen III ist zu entnehmen, dass die Bakterienkonzentrationen in den Kontrollansätzen und den Ansätzen mit Curosurf® während der vierstündigen Inkubationszeit annähernd konstant blieben bzw. bis zu einer Zehnerpotenz abfielen. Alle vier Konzentrationen zeigten bei den Ansätzen Kontrolle und Curosurf® keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $10^5$  CFU/ml  $p=0,48$ ,  $10^6$  CFU/ml  $p=0,39$ ,  $10^7$  CFU/ml  $p=0,24$ ;  $10^8$  CFU/ml  $p=0,13$ ). Da Curosurf® mit einem Phospholipidgehalt von 10 mg/ml eingesetzt wurde; konnte keine Veränderung des Bakterienwachstums im Vergleich zur Kontrolle erwartet werden (Herting et al. 1994) (Abbildung 11-18).

Die Versuchansätze mit PF 18 [9  $\mu$ mol] zeigten nach vierstündiger Inkubationszeit bei einer Ausgangskonzentration von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  CFU/ml eine Verringerung um etwa drei Zehnerpotenzen (Abbildung 11-16), bei einer Ausgangskonzentration von  $10^8$  CFU/ml eine Verringerung um etwa eine Zehnerpotenz (Abbildung 17 und 18).

Wurde dem Versuchsansatz zusätzlich Curosurf® zugegeben, zeigte sich bei einer Ausgangskonzentration von  $10^5$  CFU/ml eine Verringerung der Bakterienkonzentration nach vierstündiger Inkubationszeit von nur noch etwa einer Zehnerpotenz (Abb. 11 und 12), bei  $10^6$  und  $10^7$  CFU/ml um etwa zwei Zehnerpotenzen (Abbildung 13-16) und bei  $10^8$  CFU/ml um etwa eine halbe Zehnerpotenz (Abbildung 17 und 18). Die Konzentrationen  $10^5$  CFU/ml ( $p=0,004$ ),

$10^6$  CFU/ml ( $p=0,0001$ ) und  $10^7$  CFU/ml ( $p=0,001$ ) zeigten mit den Ansätzen PF 18 [9  $\mu$ mol] und PF 18 [9  $\mu$ mol] + Curosurf<sup>®</sup> einen signifikanten Wachstumsunterschied (Abb. 11-16). Die Konzentration  $10^8$  CFU/ml zeigte durch zusätzliche Zugabe von Curosurf<sup>®</sup> keine signifikante Wachstumsveränderung ( $p=0,069$ ) (Abb. 17 und 18).

Bei den Ausgangskonzentrationen  $10^5$  und  $10^6$  CFU/ml waren in den Versuchsansätzen mit PF 18 [90 $\mu$ mol] nach zweistündiger Inkubationszeit keine Bakterien mehr nachweisbar. Wurde Curosurf<sup>®</sup> hinzugefügt, konnten bei einer Ausgangskonzentration von  $10^5$  CFU/ml nach zwei Stunden Inkubation nur noch eine geringe Anzahl Bakterien nachgewiesen werden. Wird für den 2-Stunden-Wert für den Versuchsansatz PF 18 [90 $\mu$ mol] anstatt einem Nullwert 0,1 eingesetzt, kann kein signifikanter Wachstumsunterschied berechnet werden ( $p=0,32$ ) (Abb. 11 und 12). Bei der Ausgangskonzentration  $10^6$  CFU/ml und dem Versuchsansatz PF 18 [90 $\mu$ mol] + Curosurf<sup>®</sup> konnten noch wenige CFU nachgewiesen werden. Wird der Nullwert für den Ansatz PF 18 [90 $\mu$ mol] wieder durch 0,1 ersetzt, lässt sich ein signifikanter Wachstumsunterschied berechnen ( $p=0,008$ ) (Abb. 13 und 14). Im selben Versuchsansatz mit einer Ausgangskonzentration von  $10^7$  CFU/ml waren nach vier Stunden Inkubationszeit keine Bakterien mehr nachweisbar. Für den 2-Stunden-Wert lässt sich ein signifikanter Wachstumsunterschied berechnen ( $p=0,001$ ) (Abb. 15 und 16).

Bei einer Ausgangskonzentration von  $10^8$  CFU/ml im Versuchsansatz PF 18 [90 $\mu$ mol], konnten nach vierstündiger Inkubationszeit noch etwa  $10^2$  CFU/ml nachgewiesen werden. Nach zweistündiger Inkubationszeit für die Versuchsansätze PF 18 [90 $\mu$ mol] und PF 18 [90 $\mu$ mol] + Curosurf<sup>®</sup> zeigte sich kein signifikanter Wachstumsunterschied ( $p=0,087$ ) (Abb. 17 und 18).

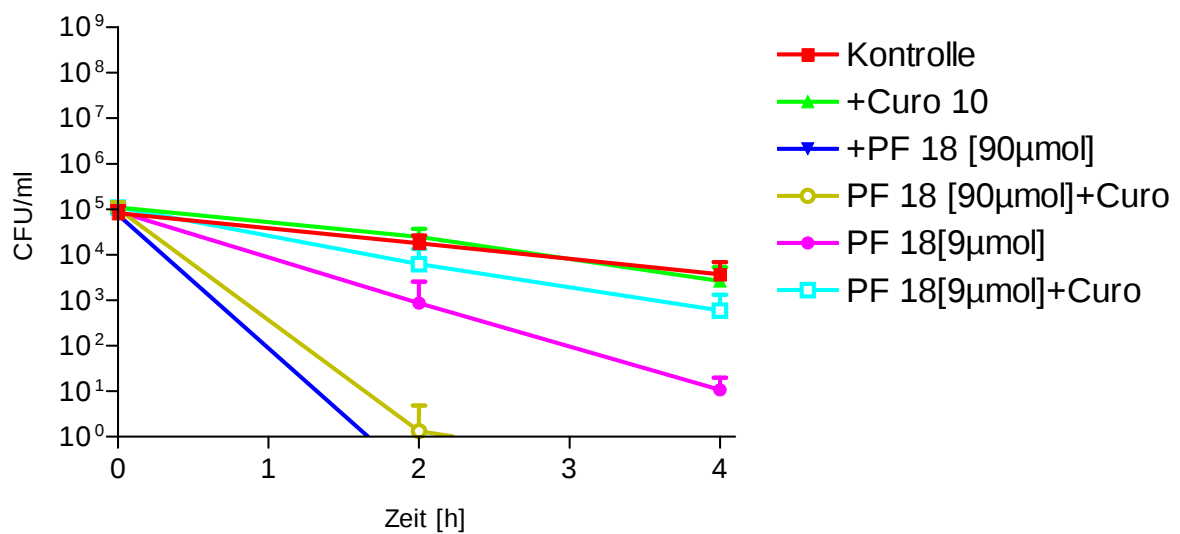


Abbildung 11: Wachstumsverhalten des Serotyp III mit einer Konzentration von  $10^5$  CFU/ml in den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

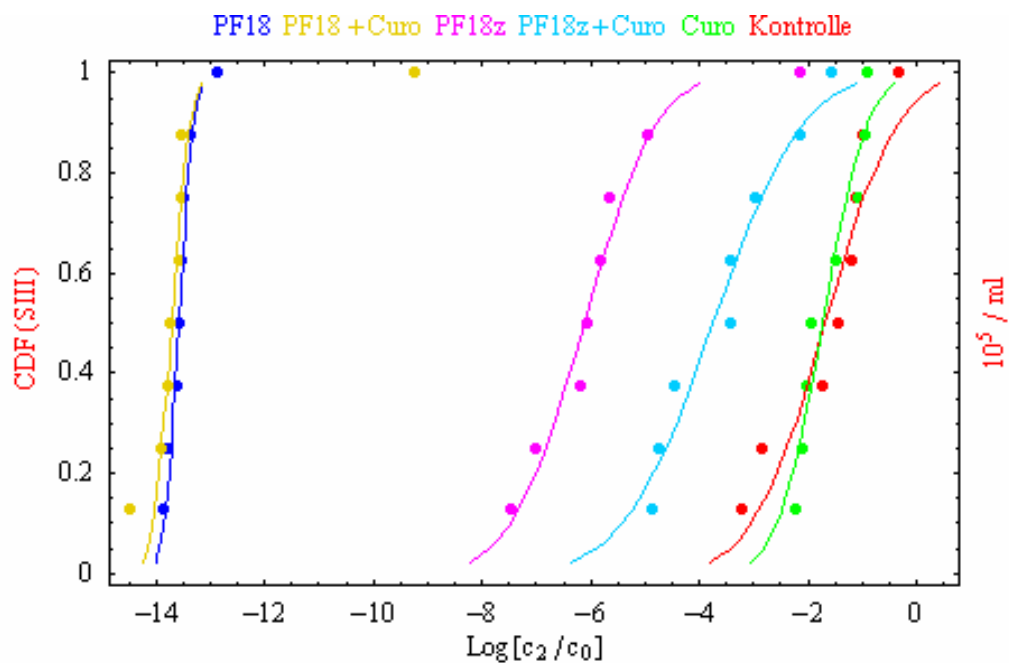


Abbildung 12: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen III und der Konzentration  $10^5$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,48$ ). Die Ansätze PF 18 [9 μmol] und PF 18 [9 μmol] + Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,004$ ). Die Ansätze PF 18 [90μmol] und PF 18 [90μmol] + Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,32$ ).

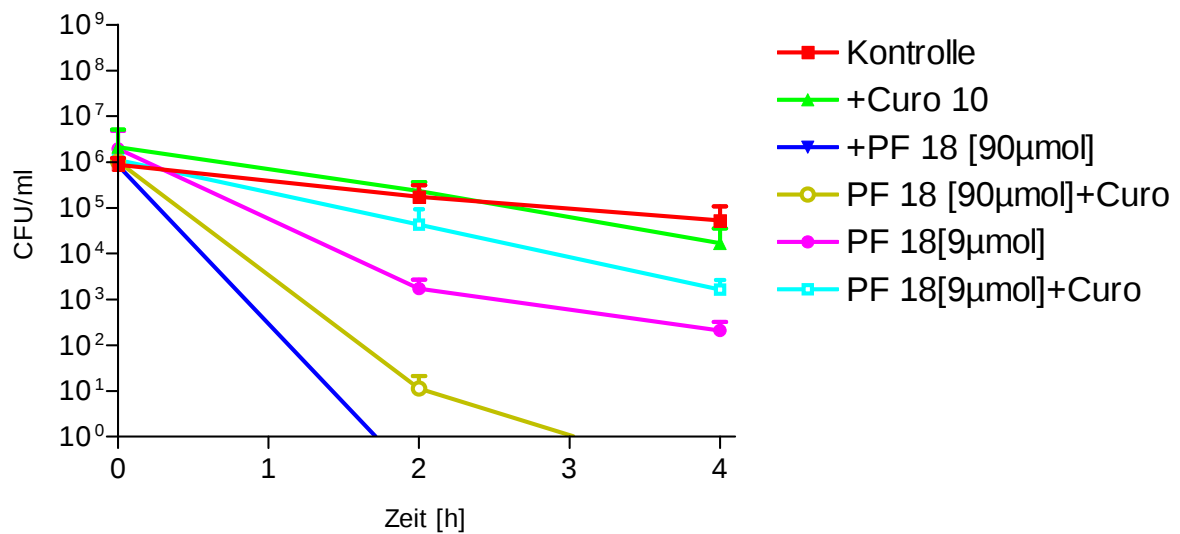


Abbildung 13: Wachstumsverhalten des Serotyp III mit einer Konzentration von  $10^6$  CFU/ml in den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

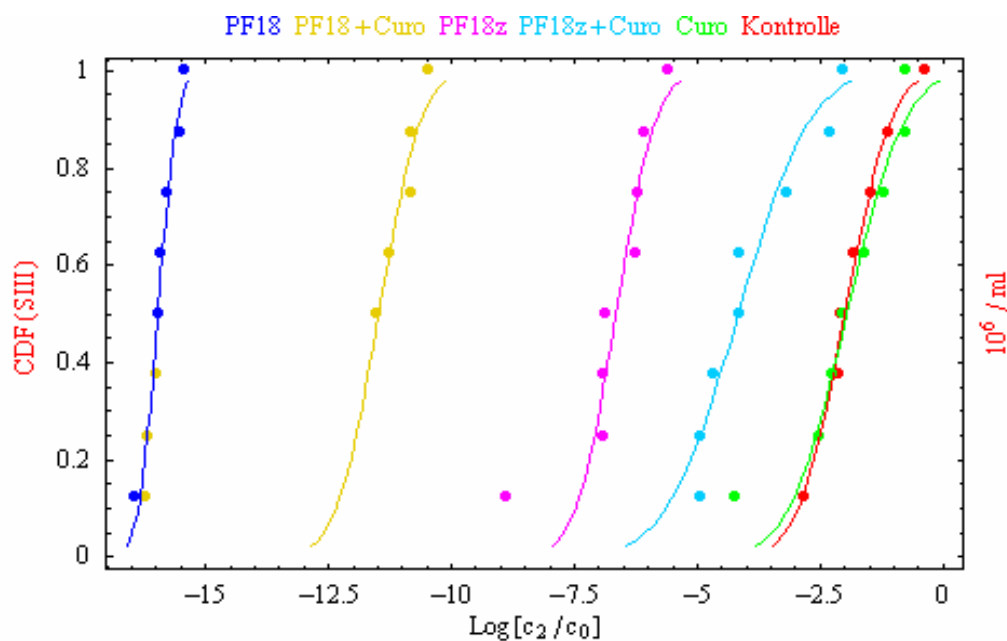


Abbildung 14: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen III und der Konzentration  $10^6$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,39$ ). Die Ansätze PF 18 [9 μmol] und PF 18 [9 μmol] + Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,00004$ ). Die Ansätze PF 18 [90μmol] und PF 18 [90μmol] + Curosurf zeigen ebenfalls einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,008$ ).

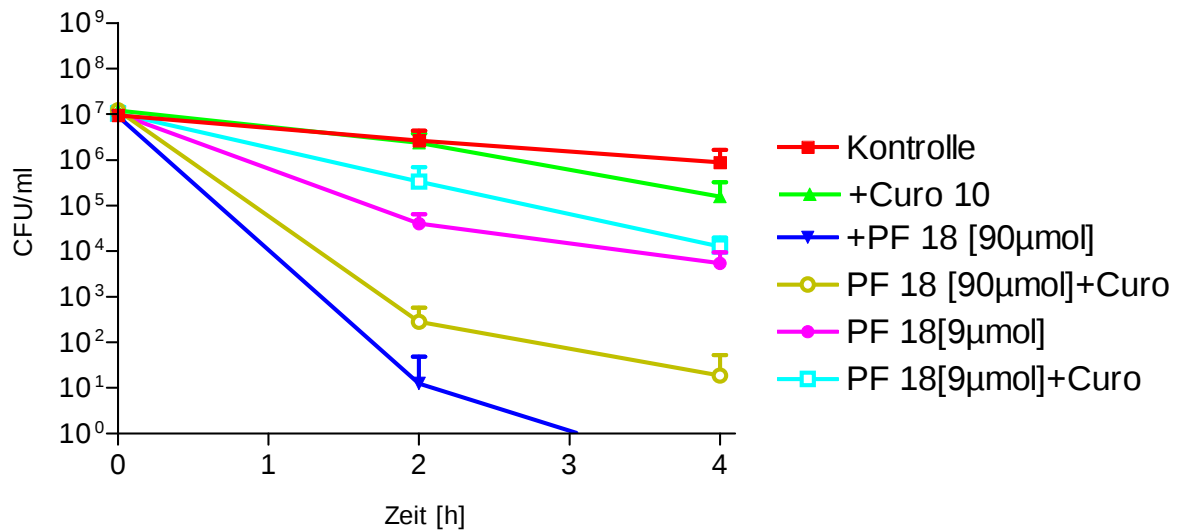


Abbildung 15 : Wachstumsverhalten des Serotyp III mit einer Konzentration von  $10^7$  CFU/ml in den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

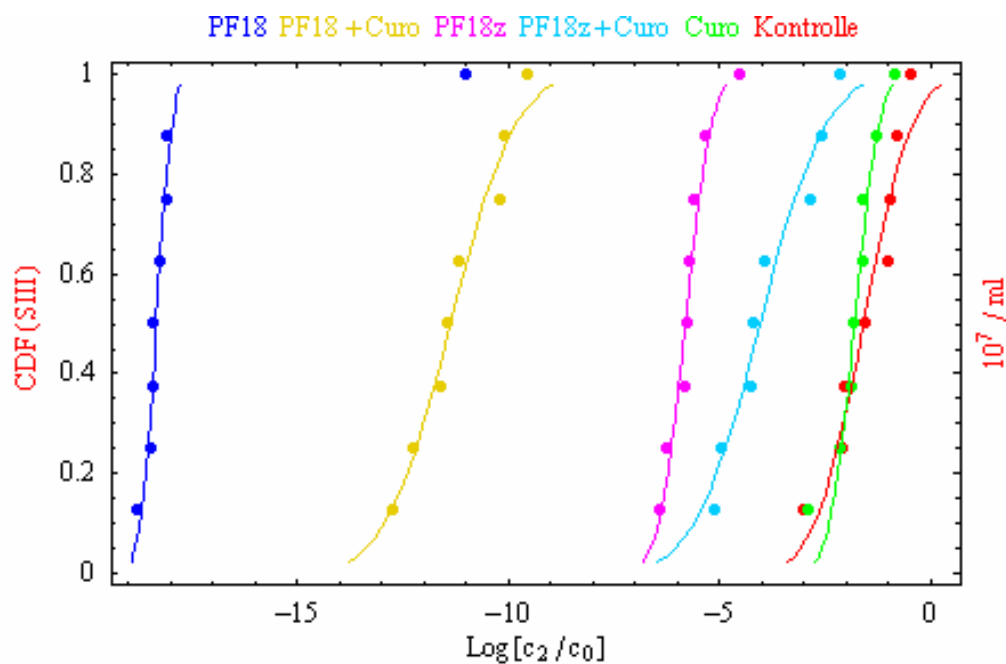


Abbildung 16: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen III und der Konzentration  $10^7$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumunterschied ( $p=0,24$ ). Die Ansätze PF 18 [9 µmol] und PF 18 [9 µmol] + Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,001$ ). Die Ansätze PF 18 [90µmol] und PF 18 [90µmol] + Curosurf zeigen ebenfalls einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,001$ ).

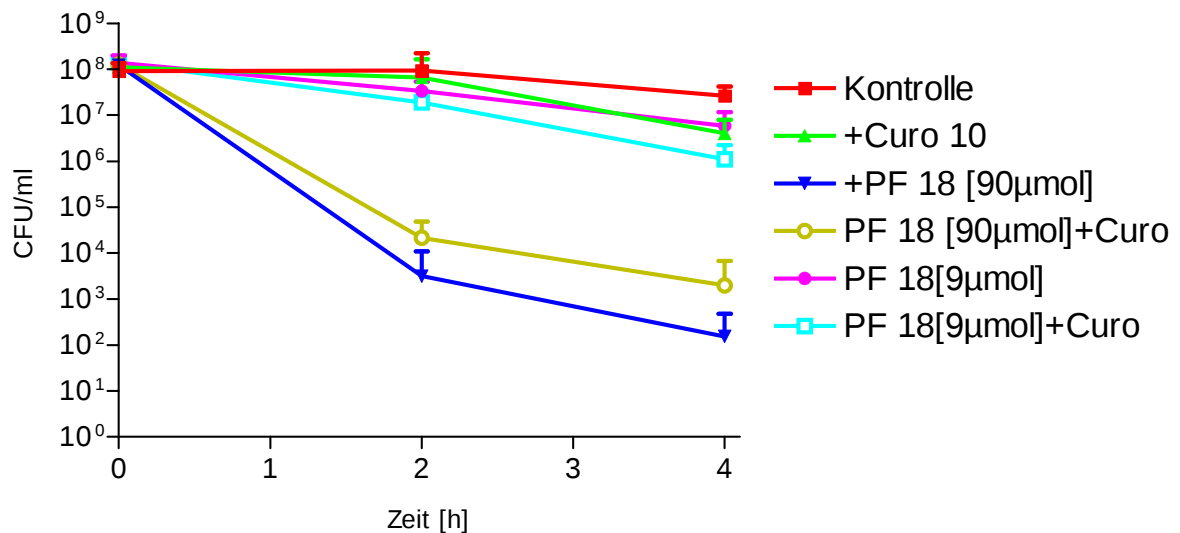


Abbildung 17: Wachstumsverhalten des Serotyp III mit einer Konzentration von  $10^8$  CFU/ml in den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

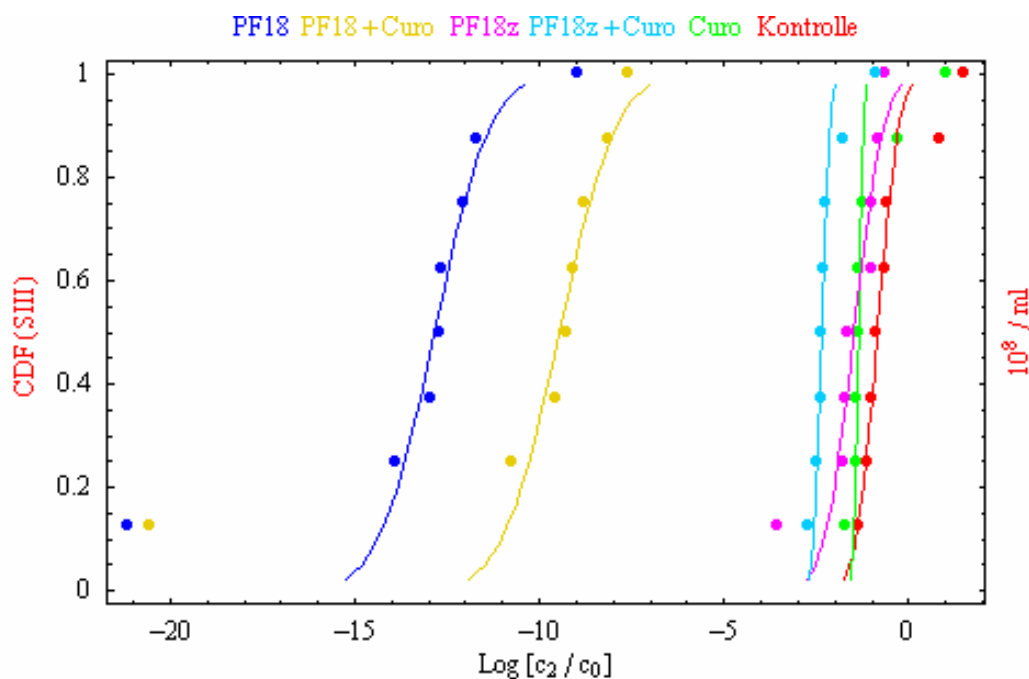


Abbildung 18: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen III und der Konzentration  $10^8$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,13$ ). Die Ansätze PF 18 [9 µmol] und PF 18 [9 µmol] + Curosurf ( $p=0,069$ ), sowie die Ansätze PF 18 [90µmol] und PF 18 [90µmol] + Curosurf ( $p=0,087$ ) zeigen ebenfalls keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,087$ ).

### III.1.2. Wachstumsverhalten und statistische Auswertung von GBS Ib mit Curosurf® und Prophenin in unterschiedlichen Konzentrationen

Die Durchführung der Versuche mit Serotyp Ib entsprach denen des Serotyp III. Die Bakterienkonzentrationen in den Kontrollansätzen des Serotypen Ib blieben während der vierstündigen Inkubationszeit nahezu konstant. Die Konzentrationen  $10^6$  CFU/ml ( $p=0,06$ ) und  $10^7$  CFU/ml ( $p=0,106$ ) mit dem Ansatz Curosurf® zeigten im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Wachstumsunterschied (Abb.21-24). Im Gegensatz hierzu zeigten die Konzentrationen  $10^5$  CFU/ml ( $p=0,035$ ) und  $10^8$  CFU/ml ( $p=0,017$ ) mit den gleichen Versuchsansätzen einen signifikanten Wachstumsunterschied (Abb. 19, 20, 25 und 26).

Der Versuchsansatz mit PF 18 [ $9\mu\text{mol}$ ] zeigte bei den Konzentrationen  $10^5$  und  $10^6$  CFU/ml einen Abfall der Bakterienkonzentrationen um etwa zwei Zehnerpotenzen, bei der  $10^7$  CFU/ml um etwa eine Zehnerpotenz und bei  $10^8$  CFU/ml keine Abnahme. Wurde dem Versuchsansatz PF 18 [ $9\mu\text{mol}$ ] Curosurf® hinzugefügt, zeigten nach vierstündiger Inkubationszeit alle vier Konzentrationen einen Konzentrationsabfall um etwa eine Zehnerpotenz. Nach zweistündiger Inkubationszeit konnte für diese Versuchsansätze mit den Konzentrationen  $10^5$  CFU/ml ( $p=0,0061$ ) und  $10^6$  CFU/ml ( $p=0,0071$ ) ein signifikanter Wachstumsunterschied berechnet werden (Abb. 19-22). Die Konzentrationen  $10^7$  CFU/ml ( $p=0,11$ ) und  $10^8$  CFU/ml ( $p=0,24$ ) zeigten keinen signifikanten Wachstumsunterschied (Abb. 23-26).

Für den Versuchsansatz PF 18 [ $90\mu\text{mol}$ ] konnte bei einer Ausgangskonzentration von  $10^5$  CFU/ml nach zweistündiger Inkubationszeit, bei  $10^6$  CFU/ml nach vierstündiger Inkubation kein Bakterienwachstum mehr nachgewiesen werden. Die Ausgangskonzentration  $10^7$  CFU/ml zeigte eine Abnahme an CFU/ml nach vierstündiger Inkubationszeit von etwa sechs Zehnerpotenzen, die Ausgangskonzentration  $10^8$  CFU/ml um etwa zwei Zehnerpotenzen. Wurde zu diesem Versuchsansatz Curosurf® hinzugefügt, fielen die Endkonzentrationen an CFU/ml nach vierstündiger Inkubation höher aus. Das Bakterienwachstum konnte für die Ausgangskonzentrationen  $10^5$  CFU/ml und  $10^6$  CFU/ml nicht mehr vollständig gehemmt werden. Die Konzentration  $10^7$  CFU/ml zeigte nur noch eine Abnahme an CFU/ml um etwa drei Zehnerpotenzen, die Ausgangskonzentration

$10^8$  CFU/ml nur noch um etwa eine Zehnerpotenz. Wird wieder für die Konzentration  $10^5$  CFU/ml und den Versuchansatz PF 18 [90µmol] nach zweistündiger Inkubationszeit der Nullwert durch 0,1 ersetzt, lässt sich ein signifikanter Wachstumsunterschied berechnen ( $p=0.00000013$ ) (Abb. 19 und 20). Die Konzentrationen  $10^6$  CFU/ml ( $p=0,0000038$ ) (Abb. 21 und 22),  $10^7$  CFU/ml ( $p=0,0038$ ) (Abb. 23 und 24) und  $10^8$  CFU/ml ( $p=0,017$ ) (Abb. 25 und 26) zeigten in diesen Versuchsansätzen ebenfalls einen signifikanten Wachstumsunterschied. Die beiden Serotypen zeigten unter Einfluss von Prophenin und Curosurf® einen Proliferationsunterschied während der Inkubation über zwei bzw. vier Stunden. Prophenin in hoher Konzentration zeigte einen stärkeren Einfluss auf das Proliferationsverhalten des Serotyp III als auf den Serotyp Ib. Dieser Einfluss war abhängig von der Ausgangskonzentration der in den Versuchen eingesetzten Bakterien.

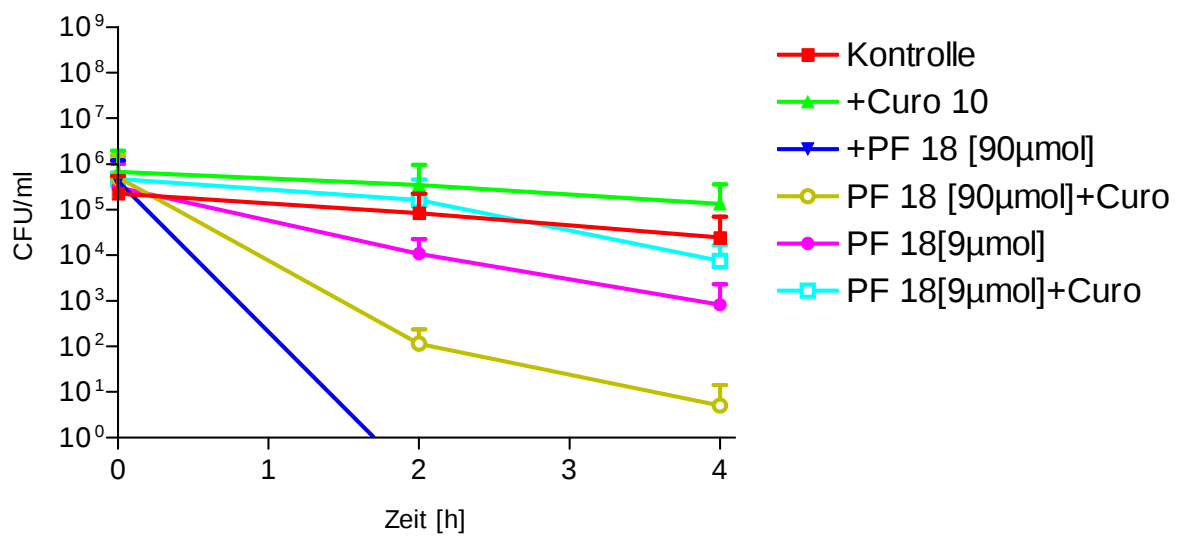


Abbildung 19: Wachstumsverhalten des Serotyp Ib in einer Konzentration von  $10^5$ /ml mit den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

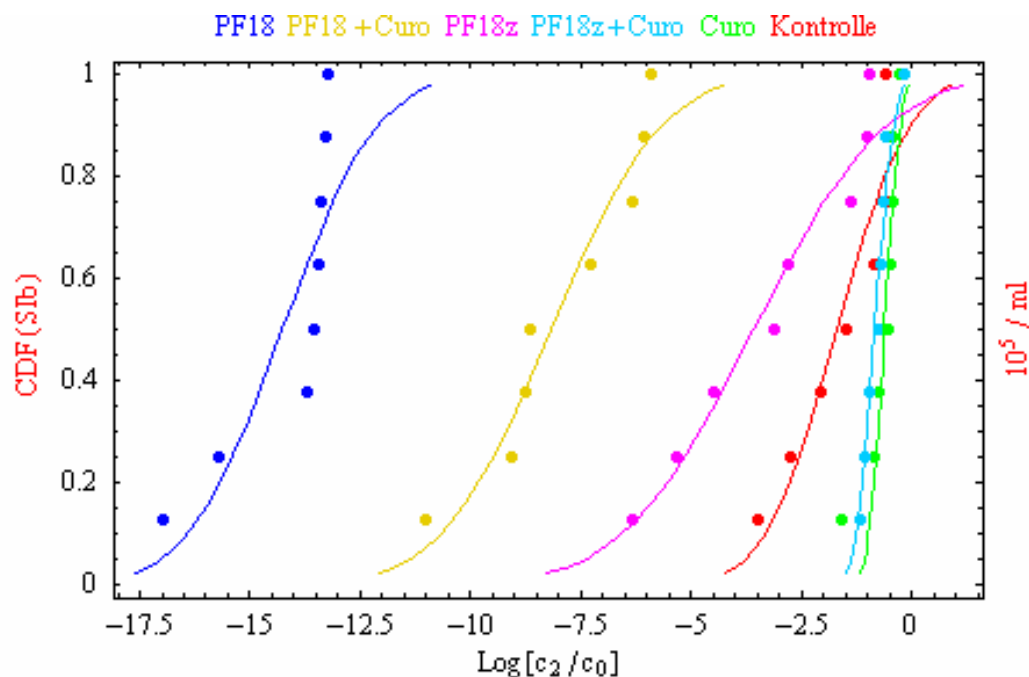


Abbildung 20: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen Ib und der Konzentration  $10^5$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumunterschied ( $p=0,035$ ). Die Ansätze PF 18 [9 µmol] und PF 18 [9 µmol] + Curosurf ( $p=0,0061$ ) und die Ansätze PF 18 [90µmol] und PF 18 [90µmol] + Curosurf ( $p=0,00000013$ ) zeigen ebenfalls einen signifikanten Wachstumsunterschied.

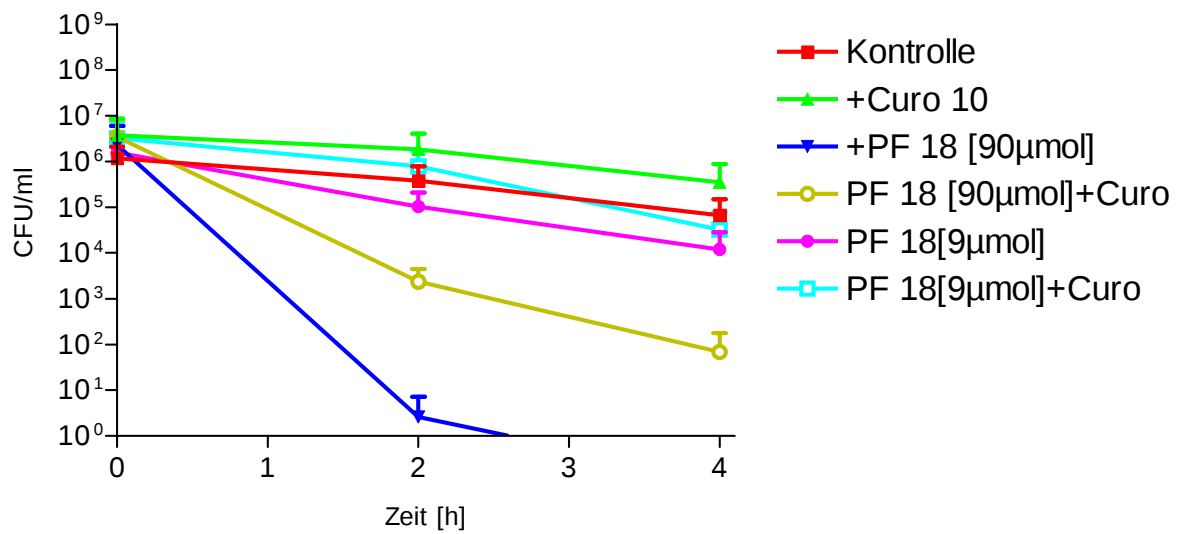


Abbildung 21: Wachstumsverhalten des Serotyp Ib in einer Konzentration von  $10^6$  CFU/ml mit den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

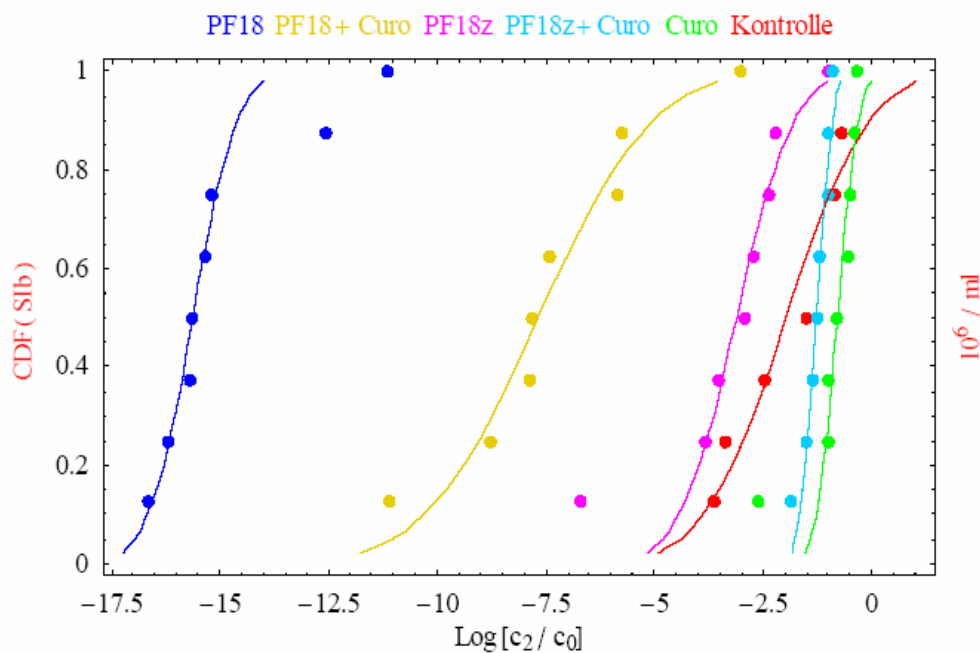


Abbildung 22: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen Ib und der Konzentration  $10^6$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,06$ ). Die Ansätze PF 18 [9 µmol] und PF 18 [9 µmol] + Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,0071$ ). Die Ansätze PF 18 [90µmol] und PF 18 [90µmol] + Curosurf zeigen ebenfalls einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,0000038$ ).

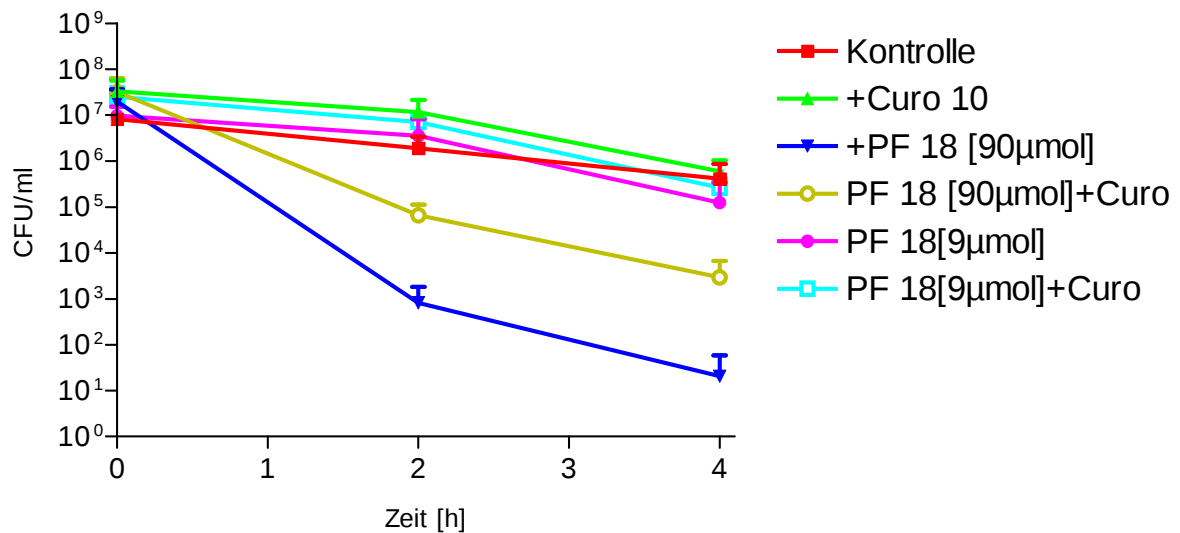


Abbildung 23: Wachstumsverhalten des Serotyp Ib in einer Konzentration von  $10^7$  CFU/ml mit den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

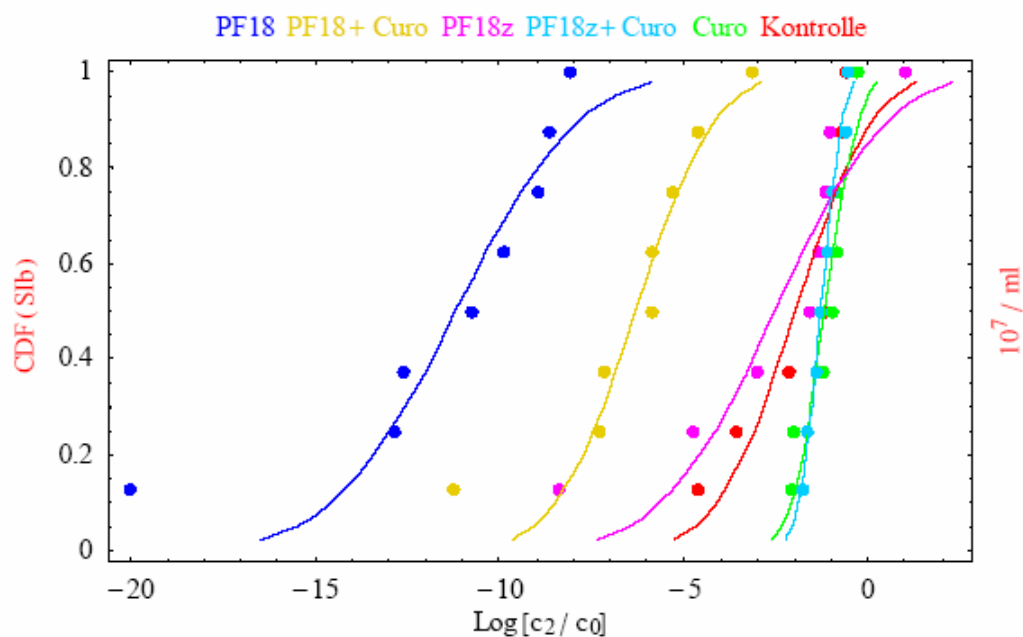


Abbildung 24: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen Ib und der Konzentration  $10^7$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumunterschied ( $p=0,106$ ). Die Ansätze PF 18 [9 µmol] und PF 18 [9 µmol] + Curosurf zeigen ebenso keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,11$ ). Die Ansätze PF 18 [90µmol] und PF 18 [90µmol] + Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,0038$ ).

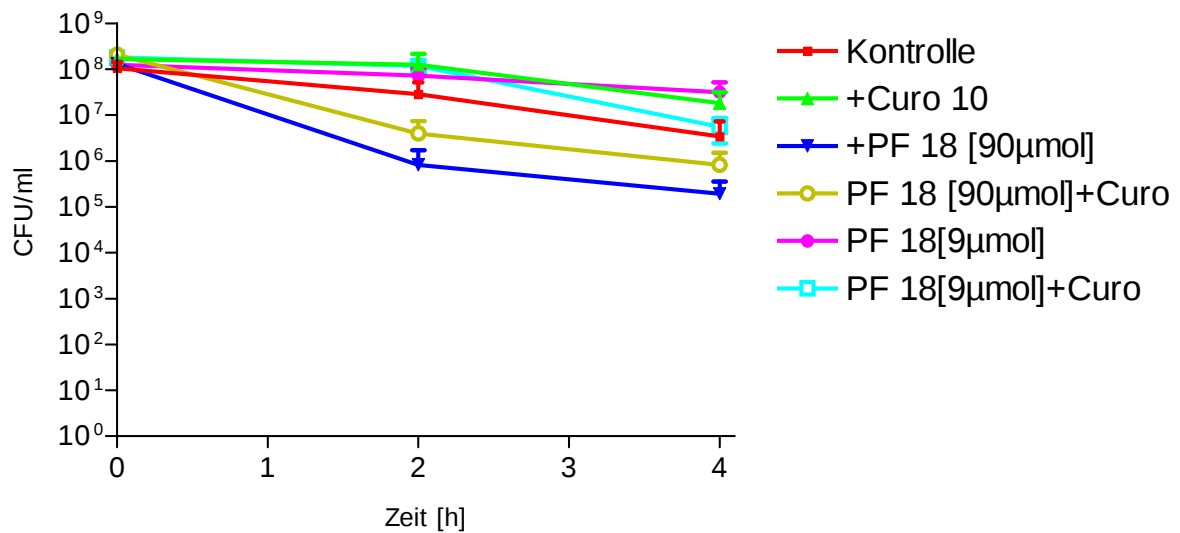


Abbildung 25: Wachstumsverhalten des Serotyp Ib in einer Konzentration von  $10^8$  CFU/ml mit den entsprechenden Versuchsansätzen (n=8).

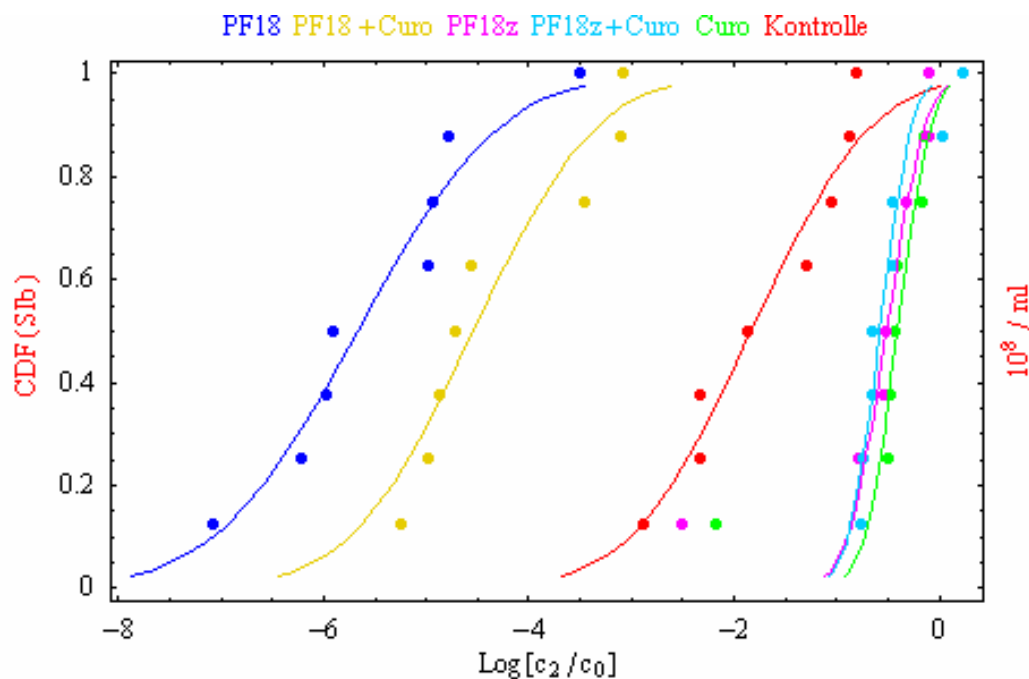


Abbildung 26: Verteilungsfunktion und Lognormalfit der transformierten Ergebnisse der Versuchsreihen für den Serotypen Ib und der Konzentration  $10^8$  CFU/ml.

Die Ansätze Kontrolle und Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,017$ ). Die Ansätze PF 18 [9 µmol] und PF 18 [9 µmol] + Curosurf zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,24$ ). Die Ansätze PF 18 [90µmol] und PF 18 [90µmol] + Curosurf zeigen einen signifikanten Wachstumsunterschied ( $p=0,017$ ).

## III.1.3. Einfluss von Prophenin auf die Oberflächenspannung von Curosurf®

Curosurf® 2,5 mg/ml wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen Prophenin in 1,5 mmolarer Kalziumchloridlösung (1,5 mmol  $\text{CaCl}_2$  in 0,9% NaCl) vermischt und die Oberflächenspannungen im PBS gemessen. Eingesetzt wurden Konzentrationen von 9  $\mu\text{mol}$ , 90  $\mu\text{mol}$  und 900  $\mu\text{mol}$ . Die Oberflächenspannung ist graphisch im Verhältnis zur Zeit dargestellt.

Erkennbar ist, dass sowohl im Versuch mit Curosurf® allein, als auch mit Prophenin in den drei Konzentrationen, mit zunehmender Zeit die Oberflächenspannung abnimmt (Abb. 27 und 28). Bei einer Oberflächenspannung unter  $\sim 12 \text{ mN/m}$  spricht man von aktiven Surfactant.

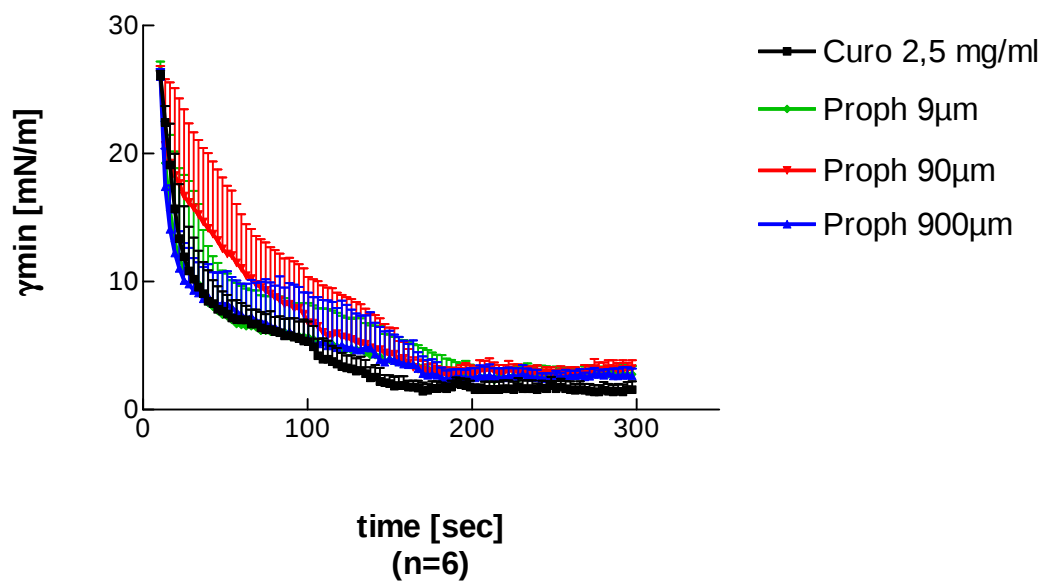


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Oberflächenspannungen von Curosurf® und Prophenin in den Konzentrationen 900  $\mu\text{mol}$ , 90  $\mu\text{mol}$  und 9  $\mu\text{mol}$  verdünnt in 2,5 mmol  $\text{CaCl}_2$ .

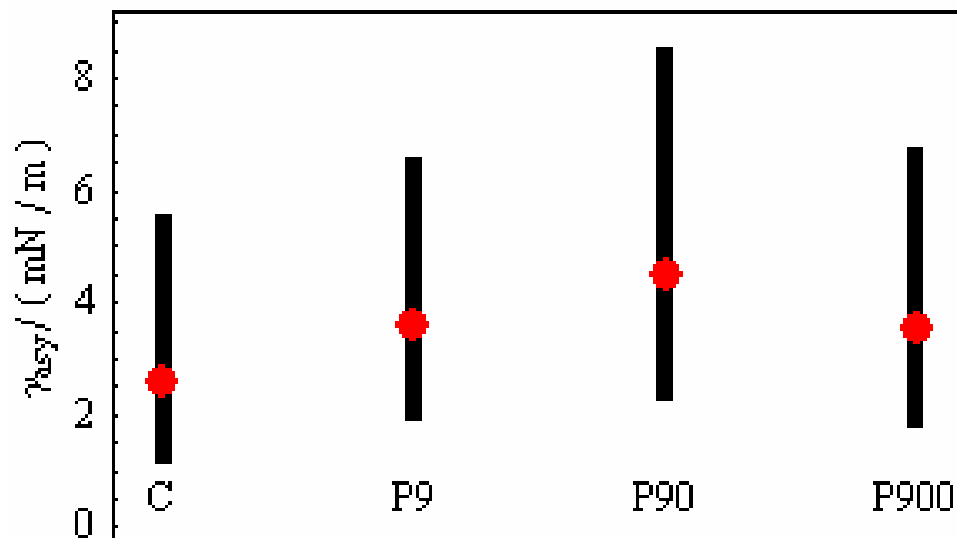


Abbildung 28: Oberflächenspannung der letzten 30 asymptotischen Werte. Die geometrischen Mittelwerte werden durch die roten Punkte graphisch wiedergegeben, die schwarzen Balken stellen die geometrischen Standardabweichungen dar. Da sich alle Balken überlappen, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten.

C = Curosurf, P9 = Prophenin [9 $\mu$ mol], P90 = Prophenin [90 $\mu$ mol], P900 = Prophenin [900 $\mu$ mol]

## IV. DISKUSSION

Der primäre und sekundäre Surfactantmangel wird durch Substitution von tierischem oder synthetisch hergestelltem Surfactant therapiert. Der primäre Surfactantmangel tritt bei Lungenunreife Frühgeborener auf und äussert sich als Atemnotsyndrom (RDS, respiratory distress syndrom). Dem sekundären Surfactantmangel liegt meist eine Infektionserkrankung zu Grunde und zeigt sich als akutes Atemnotsyndrom (ARDS, acute respiratory distress syndrom). Zu den häufigsten Erregern einer neonatalen Infektion und damit auch als Ursache für das ARDS gehören  $\beta$ -hämolysierende B-Streptokokken. Die Übertragung der Keime auf das Neugeborene erfolgt fast ausschliesslich über den Geburtskanal.

Seit einiger Zeit gibt es Richtlinien zur Prävention vor Infektion und Erkrankung durch B-Streptokokken. Die bislang einzige empfohlene Therapie ist eine Therapie mit Penicillin oder alternativen Antibiotika bei Unverträglichkeit. Penicillin ist das Antibiotikum der Wahl, da es ein geringes Wirkspektrum besitzt und das Risiko einer Resistenzentwicklung vermindert ist. Das „Center for Disease Control and Prevention“ brachte im August 2002 die überarbeiteten Richtlinien für die Prävention von perinatalen Erkrankungen durch Gruppe B-Streptokokken heraus (CDC 1996, CDC 2002). Hierin wird empfohlen, bei allen Schwangeren zwischen der 35.-37. Schwangerschaftswoche ein vaginales und rectales Screening auf B-Streptokokken durchzuführen. Weiterhin werden detaillierte Anweisungen für die Probenentnahme pränatal, die Art der Kultivierung der B-Streptokokken und der Empfindlichkeitstestung gegenüber Antibiotika gegeben. Schwangere, deren Testergebnisse auf B-Streptokokken unbekannt sind, sollten nach der Risikofaktoren basierenden Strategie behandelt werden. Die Risikofaktoren sind hierbei eine Geburt vor der 37. Schwangerschaftswoche, Blasensprung vor mehr als 18 Stunden und eine Temperatur von mehr als 38°C. Frauen mit negativen vaginalen und rektalen Testergebnissen innerhalb der letzten fünf Wochen vor der Geburt, benötigen keine antibiotische Prophylaxe unter der Geburt, auch wenn genannte Risikofaktoren im Verlauf der Entbindung auftreten sollten. Offen ist weiterhin, ob eine Prävention von B-Streptokokkenenerkrankungen auf der Basis

eines Screenings oder auf der Risikofaktoren basierenden Strategie erfolgen sollte. Bisher werden beide Präventionsverfahren als gleichwertig angesehen (ACOG 1996, CDC 1996, AAP 1997). Eine vom CDC durchgeführte Studie deutet allerdings daraufhin, dass das Screening eine 50% höhere Effektivität aufweist, als die auf Risikofaktoren basierende Strategie. Eine weitere Möglichkeit zur Prävention einer Infektion durch B- Streptokokken wäre mittels einer aktiven oder passiven Immunisierung zu erreichen. Ein zufrieden stellender Impfstoff ist bisher noch nicht auf dem Markt. Baker und Kasper (Baker et al. 1985) fanden heraus, dass Neugeborene besonders dann gefährdet sind eine early- bzw. late-onset Infektion zu entwickeln, wenn im Serum der Mutter niedrige Antikörpertiter gegen die Kapselpolysaccharide der Typ III B-Streptokokken nachweisbar sind. (Hyvarinen et al. 1973). Durch eine aktive Immunisierung der Schwangeren kann der Antikörpertiter im Serum erhöht werden. Für das Neugeborene würde eine passive Immunisierung durch Immun- bzw. Hyperimmunglobuline gegen Kapselpolysaccharide der B-Streptokokken eine Möglichkeit der Prävention darstellen. Die Anwendung von Hyperimmunglobulinen zeigte in Tierversuchen zufrieden stellende Ergebnisse (Schuchat et al. 1994). Für den Serotyp Ia, Ib, II und III existieren bereits Impfstoffe, die an Menschen getestet wurden. Die Impfstoffe wurden gut vertragen, allerdings war die Immunität nach Impfung noch nicht ausreichend (Kotloff et al 1996). Erfolgreicher in der Immunogenität scheint ein Impfstoff zu sein, bei dem die Kapselpolysaccharide an Tetanustoxoid gekoppelt sind (Schuchat, Wenger 1994). Als ein weiterer Weg zur Prävention wurden in einer schwedischen Studie vaginale Spülungen mit einer Chlorhexidinlösung durchgeführt. Es konnte eine Reduktion von B-Streptokokken im Geburtskanal erzielt werden. Allerdings konnte anhand dieser Studie nicht gezeigt werden, ob eine B-Streptokokkeninfektion verhindert werden kann (Burman et al. 1992).

Unsere In-vitro-Versuche sollten Möglichkeiten einer weiteren Therapie untersuchen. Der Hintergrund dieser Arbeit ist, das Proliferationsverhalten von B-Streptokokken unter Prophenin und Curosurf<sup>®</sup> zu untersuchen, sowie die Wechselwirkungen von Prophenin und Curosurf<sup>®</sup>. In den durchgeführten Versuchen kamen zwei Streptokokkenserotypen zum Einsatz. Es wurde der Serotyp Ib und III untersucht, da in Studien aus der Universitätsklinik Göttingen der Serotyp Ib (44%) und der Serotyp III (25%) am häufigsten isoliert werden

konnte (Weihofen 2004). Serotyp III spielt eine Rolle in der late-onset Infektion und ist dabei in 93% der Fälle nachweisbar (Baker und Edwards 2000, Ferrieri 1985). Serotyp Ib ist vermehrt bei early-onset Infektionen zu beobachten. In einer Arbeit von Wang et. al., wurde die antibakterielle Wirkung von Prophenin und LL-37 auf bekapselte und unbekapselte B-Streptokokken des Stammes 090 la Colonidale untersucht. Es wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau mit Surfactant 10 mg/ml gewählt und die Konzentrationen PF 18 [9µmol] und [90µmol] eingesetzt (Wang et al. 2004). Diese Arbeit sollte weiterführende Ergebnisse in einem umfangreicheren Versuchsaufbau zu diesem Thema zeigen. Es wurden bekapselte und unbekapselte B-Streptokokken als Mischkultur in den Versuchsansätzen eingesetzt.

Für die statistische Auswertung wurden nur Versuche verwendet, die weniger als 300 CFU/ Agarplatte aufwiesen. Diese Einschränkung wurde gewählt, um die Statistik nicht durch Artefakte zu verzerren. B-Streptokokken bilden auf Blutagarplatten eine Hämolysezone um die einzelnen Kolonien aus (Abbildung 1). Dadurch ist eine Abgrenzung einer Kolonie zur nächsten sehr gut möglich, und die Auszählung der einzelnen Kolonien sehr genau. Ab 300 CFU/ Agarplatte war eine genaue Abgrenzung zur nächsten Kolonie nicht mehr sichtbar.

In Möllers Arbeit wurde der Einfluss einzelner Arbeitsschritte auf B-Streptokokken untersucht. So zeigt das Zentrifugieren der Bakterien keinen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten (Möller 1998).

Jeder Versuch wurde achtmal durchgeführt, um genügend Datenmaterial für eine statistische Auswertung zu erhalten. Unter Berücksichtigung von physiologischen Schwankungen des bakteriellen Wachstums, zeigen die Versuche annähernd gleich bleibende Ergebnisse. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Mean Difference Tests. Zunächst wurden die Daten logarithmiert, um für die Berechnung eine Lognormalverteilung zu erhalten. Mit den Daten der Lognormalverteilung konnte ein parametrischer Test durchgeführt werden, der aussagekräftiger als ein verteilungsfreier Test ist.

Im Jahre 1984 beschrieben Coonrod et al. eine bakterizide Wirkung eines Rattensurfactant auf Pneumokokken. Sie führten die Wirkung auf freie Fettsäuren zurück und spekulierten, dass Fettsäuren in Bakterienmembranen eingebaut und damit Membranfunktionen verändert werden (Coonrod et al. 1984). In einer Studie von Sherman et al. wird eine proliferationsfördernde Wirkung von Surfactant auf Bakterien beschrieben (Sherman 1994). Im Gegensatz hierzu beschrieben Herting et al. eine Abnahme der Anzahl an teilungsfähigen Bakterien nach vierstündiger Inkubationszeit mit Curosurf<sup>®</sup>, bei einem Phospholipidgehalt von 20 mg/ml. Bei einem Phospholipidgehalt von 1 mg/ml und 10 mg/ml war eine signifikante Abnahme der Bakterien nicht feststellbar. Die Anzahl an teilungsfähigen Bakterien blieb in physiologischer Kochsalzlösung nahezu konstant (Herting et al. 1994). In den Versuchen dieser Arbeit wurde Curosurf<sup>®</sup> mit einem Phospholipidgehalt von 10 mg/ml eingesetzt. Eine Proliferationshemmung durch Curosurf<sup>®</sup> sollte ausgeschlossen werden. Beide Serotypen zeigten nach zwei Stunden Inkubationszeit mit Curosurf<sup>®</sup> keine Abnahme an teilungsfähigen Bakterien im Vergleich zur Kontrolle. Die Konzentrationen  $10^5$  und  $10^8$  CFU/ml des Serotypen Ib zeigten einen signifikanten Proliferationsunterschied, der auf mögliche physiologische Schwankungen zurückzuführen ist. Nach zweistündiger Inkubationszeit mit Curosurf<sup>®</sup> wiesen diese Konzentrationen eine höhere Endkonzentration an Bakterien auf als die Kontrolle.

Antibakterielle Peptide sind immer häufiger Gegenstand wissenschaftlichen Interesses. Durch zunehmend auftretende Resistenzen der Keime gegen Antibiotika wird es wichtiger auch alternative, antibiotisch wirksame Substanzen einsetzen zu können. Ultrastukturelle Analysen von *Staphylokokkus aureus* nach Behandlung mit einem Defensin, zeigten Zeichen von Zellwandperforationen, wie sie auch nach Behandlung von Penicillin auftreten. Vermutet wird als Wirkmechanismus eine Interaktion mit dem Autolyse-System (Wehkamp et al. 2007).

Nicht nur die Haut, sondern auch der Gastrointestinal- und der Respirationstrakt bilden eine zu schützende Grenzfläche zur Umwelt. Von diesen Grenzflächen konnten antibakterielle Peptide isoliert werden, die wirksam gegen einige grampositive und gramnegative Keime waren. Diese Peptide wirken nicht nur antibakteriell. Durch ihre chemotaktischen Eigenschaften haben sie einen regulierenden Einfluss auf das Immunsystem. Über Rezeptoren, an denen

bakterielle Komponenten binden, wird die Expression von antimikrobiellen Peptiden induziert und reguliert. So waren auf gesunder Haut kaum Defensine nachweisbar. Bei entzündlichen Prozessen der Haut, hervorgerufen durch bestimmte Bakterien, konnte die Defensinproduktion induziert werden (Harder et al 2001).

Um die antibakterielle Wirkung von Prophenin und Prophenin mit Curosurf<sup>®</sup> beurteilen zu können, wurde in dieser Arbeit Prophenin in den Konzentrationen 9  $\mu\text{mol}$  und 90  $\mu\text{mol}$  eingesetzt. Prophenin wurde ursprünglich in Schweineleukozyten nachgewiesen (Harwig et al. 1995). Wang et al. konnten Prophenin und das Fragment Prophenin-18 in homogenisiertem Lungengewebe von Schweinen, sowie in dem Surfactant Curosurf<sup>®</sup> nachweisen (Wang et al. 1999). Es könnte folglich angenommen werden, dass eine partiell antibakterielle Wirkung von Curosurf<sup>®</sup> mit hoher Phospholipidkonzentration teilweise auf das enthaltene Peptid Prophenin zurückgeführt werden kann. Die Versuchsansätze PF18 [9 $\mu\text{mol}$ ] und PF18 [9 $\mu\text{mol}$ ] + Curosurf<sup>®</sup> des Serotyp III zeigten bei den Konzentrationen  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  CFU/ml einen signifikanten Wachstumsunterschied. Durch die alleinige Zugabe von PF 18 [9 $\mu\text{mol}$ ] konnte meistens eine stärkere Proliferationshemmung erreicht werden, als durch Zugabe von PF18 [9 $\mu\text{mol}$ ] +Curosurf<sup>®</sup>. Die Konzentration  $10^8$  CFU/ml ergab keinen signifikanten Wachstumsunterschied. Auch die Konzentrationen  $10^5$  und  $10^6$  CFU/ml für den Serotypen Ib zeigten eine stärkere Proliferationshemmung durch die alleinige Zugabe von PF18 [9 $\mu\text{mol}$ ]. Für die Konzentration  $10^7$  und  $10^8$  CFU/ml konnte kein signifikanter Wachstumsunterschied gezeigt werden. PF18 [9 $\mu\text{mol}$ ] konnte das Bakterienwachstum beider Serotypen nach zwei- bzw. vierständiger Inkubationszeit nicht vollständig hemmen. Im Vergleich zur Kontrolle, konnte mit dem Versuchsansatz PF18 [9 $\mu\text{mol}$ ] + Curosurf<sup>®</sup> ein signifikanter Wachstumsunterschied erzielt werden. Curosurf<sup>®</sup> konnte die Wirkung von Prophenin [9 $\mu\text{mol}$ ] nicht vollständig hemmen. Wang beschreibt, dass die Aktivität von PF 18 [9 $\mu\text{mol}$ ] auf bekapselte und unbekapselte B-Streptokokken durch Curosurf<sup>®</sup> vollständig aufgehoben werden konnte (Wang et al.2004).

Bei höherer Konzentration von Prophenin konnte eine stärkere Proliferationshemmung erreicht werden. Beide Serotypen mit den Konzentrationen  $10^6$ ,  $10^7$  und  $10^8$  CFU/ml und den Versuchsansätzen PF18 [90 $\mu\text{mol}$ ] und PF18 [90 $\mu\text{mol}$ ]+Curosurf<sup>®</sup> wiesen einen signifikanten Wachstumsunterschied auf.

Hierbei fiel die Proliferationshemmung durch alleinige Zugabe von PF18 [90µmol] stärker aus, als durch PF18 [90µmol] + Curosurf. Wang beschreibt, dass bei Einsatz der höheren Konzentration an Prophenin, Curosurf® die antibakterielle Wirkung von Prophenin nicht beeinflussen konnte. Serotyp III reagiert empfindlicher auf Prophenin als Serotyp Ib, wie aus den steileren Verteilungen und den größeren Abständen zur Kontrolle ersichtlich ist. Aufgrund dieses Unterschiedes und der gegensätzlichen Ergebnissen von Wang, scheinen unterschiedliche B-Streptokokken nicht gleich gut auf Prophenin zu reagieren.

Der wachstumsinhibierende Einfluss von Prophenin auf GBS wurde durch den Einfluss von Curosurf® abgeschwächt. Dieser Einfluss war abhängig von der Bakterienkonzentration und dem Serotyp, sowie der Konzentration von Prophenin. Die Wirkung von Curosurf® auf Prophenin könnte dadurch erklärt werden, dass der hydrophobe Propheninanteil mit Lipidanteilen des Surfactant interagieren kann, und somit weniger Prophenin für die antibakterielle Wirkung zur Verfügung steht. Um eine möglichst hohe antibakterielle Aktivität zu erhalten, müsste eine hohe Konzentration an antibakteriellem Peptid eingesetzt werden.

Wang et al. nehmen an, dass Prophenin auch in vivo mit Surfactant assoziiert ist. Weiterhin muss angenommen werden, dass Prophenin nicht nur in Leukozyten vorhanden ist, da es auch dann noch in homogenisierten Lungengeweben nachgewiesen werden konnte, bei denen vor Homogenisation die zellulären Anteile entfernt wurden (Wang et al. 1999). Curosurf® enthält unter anderem auch Prophenin, so dass Curosurf® möglicherweise als Trägersubstanz für eine antibakterielle Therapie mit Prophenin eingesetzt werden kann.

Seit Anfang der 90er Jahre hat sich die Surfactantbehandlung des neonatalen Atemnotsyndroms etabliert. Es zeigten sich ebenfalls Erfolge in der Behandlung der neonatalen Pneumonie und des Mekoniumaspirationssyndroms (Findlay et al. 1996, Herting et al. 2001). In entwickelten Ländern liegt die Inzidenz termingeborener Kinder an einer Pneumonie zu erkranken bei weniger als einem Prozent. Die Erkrankungsrate steigt auf etwa 10% bei Kindern mit geschwächter Immunabwehr durch Vorerkrankungen oder geringem Geburtsgewicht (Dennehy 1987). Bei Autopsien lebendgeborener Kinder konnte bei ca. 20-32% eine Pneumonie festgestellt werden, bei Totgeborenen ca. 15-38% (Barnett et al. 2006). In einer Studie von Barton et al. war in 56 von 111 Fällen eine Infektion die häufigste Todesursache bei sehr untergewichtigen Lebendgeborenen. Von diesen

56 Fällen konnte in 30 Fällen eine kongenitale Pneumonie als Ursache gefunden werden (Barton et al. 1999). Der Grad der  $\beta$ -Hämolysin-Expression einer B-Streptokokken Pneumonie scheint direkt mit der Fähigkeit der Bakterien das Lungenepithel zu zerstören zu korrelieren. Es wird vermutet, dass Hämolysin wie ein Cytolysin wirkt und der Epithelschaden zu einem alveolaren Ödem und Hämorrhagie führt. Surfactantphospholipide können den Epithelschaden, der durch  $\beta$ -Hämolysin verursacht ist hemmen, deshalb scheinen Frühgeborenen mit einem Surfactantmangel häufiger an B-Streptokokken Pneumonien zu erkranken als Neugeborene mit ausgereiftem Surfactantsystem (Nizet et. al. 1997, Gibson et al. 1999).

Zu therapeutischen Zwecken könnte ein Surfactant mit antibakteriellen Peptiden angereichert werden. Von Interesse wäre, ob auch weitere, bereits untersuchte antimikrobielle Peptide, eine ähnliche oder sogar bessere Wirkung hätten. Häufig treten Infektionen nicht in Reinkulturen auf, deshalb wäre eine Untersuchung mit kombinierten antibakteriellen Peptiden interessant. Analog zur Antibiotikatherapie könnten verschiedene Keime unterschiedlich auf eine derartige Therapie reagieren. Da antimikrobielle Peptide auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, wäre es sinnvoll, in chemotaktischen In-vitro-Versuchen ihre Wirkung auf entsprechende Zelllinien zu untersuchen.

Weiterhin ist zu bedenken, dass Serumproteine die Wirkung von Surfactant vermindern oder inaktivieren können (Seeger et al. 1992, 1993). Die Versuchsergebnisse zu den Oberflächenspannungen von Curosurf® und Curosurf® mit unterschiedlichen Konzentrationen an Prophenin zeigen, dass das Peptid Prophenin, auch wenn es in der Konzentration [900 $\mu$ mol] eingesetzt wird, keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenspannung von Curosurf® hat. Ob auch für andere, zur Therapie eingesetzte Surfactants, keine Beeinflussung der Aktivität durch Prophenin nachzuweisen ist, müsste in weiteren In-vitro-Untersuchungen geprüft werden. Welche Nebenwirkungen bei einer Kombinationstherapie mit Curosurf® und Prophenin auftreten können, müsste in einem Tiermodell geprüft werden. Weitere Versuche könnten mit den Serotypen Ia, II, IV und V durchgeführt werden, um deren Ansprechen auf Prophenin zu untersuchen.

Ob die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch in vivo zu erreichen sind, müsste in einem Tiermodell untersucht werden.

## **V. ZUSAMMENFASSUNG**

Frühgeborene haben ein Risiko, an einer Infektion durch  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken zu erkranken. Liegt das Gestationsalter des Neugeborenen vor der 27. SSW, ist häufig eine Intubation mit Surfactantgabe über den Tubus notwendig. Mit der Surfactantgabe kann der primäre und sekundäre Surfactantmangel therapiert werden.

Nachdem in den 60er und 70er Jahren die Anzahl an Infektionen, hervorgerufen durch  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken anstieg, wurden Therapieverfahren und Präventionsmaßnahmen entwickelt, um Infektionen zu verhindern und zu behandeln.

Die Behandlung dieser Infektionen beinhaltet unter anderem eine antibiotische Therapie. Da immer häufiger Resistenzen auftreten können, wird es immer wichtiger auch andere antimikrobiell wirksame Substanzen in der Therapie einsetzen zu können. Hierbei sind häufig antibakterielle Peptide, die auch im menschlichen Körper nachgewiesen werden konnten, Gegenstand der Wissenschaft. Prophenin ist ein antibakterielles Peptid, das aus Lungengewebe vom Schwein isoliert werden und synthetisch hergestellt werden konnte. Auch in Surfactants, die aus Schweinelungen extrahiert werden, kann Prophenin nachgewiesen werden. Eine Anreicherung dieser Surfactants mit Prophenin ist eine denkbare Therapiemöglichkeit.

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss Prophenin auf Curosurf® hinsichtlich des in-vitro Proliferationsverhaltens von GBS hat. Eingesetzt wurden zwei humanpathogene Serotypen von streptococcus agalactiae. Die Serotypen wurden jeweils in vier verschiedenen Konzentrationen in den Versuchen verwendet. Prophenin kam in zwei unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz. Jeder Versuchsansatz beinhaltete einen Kontrollansatz für jede Konzentration beider Serotypen, jeweils ein Ansatz mit Curosurf®, ein Ansatz mit der höheren Konzentration an Prophenin allein und ein Ansatz mit dieser Konzentration an Prophenin und Curosurf®, sowie jeweils ein Ansatz mit der geringeren Konzentration an Prophenin allein und zusätzlich mit Curosurf®. So erhielt man für jede Konzentration eines Serotypen sechs Versuchsansätze.

Die statistische Auswertung ergab, dass Prophenin in hohen Konzentrationen einen proliferationshemmenden Einfluss auf GBS hatte und teilweise das Wachstum vollständig hemmen konnte. Dieser Einfluss war abhängig vom Serotypen und von der Anzahl an CFU/ml in den Versuchsansätzen.

Weiterhin wurde der Einfluss von Prophenin auf die biophysikalischen Eigenschaften von Curosurf® überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass Prophenin auch in hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung von Curosurf® hat. Ziel war es zu zeigen, dass Prophenin, in der Therapie von B-Streptokokken-Pneumonien mit Surfactant, als antibakterielles Peptid anstatt oder unterstützend zur empfohlenen Antibiotikatherapie eingesetzt werden könnte. Surfactant könnte als Trägersubstanz für ein antibakterielles Peptid genutzt werden. Curosurf® könnte zu weiterreichenden Therapiezielen z.B. mit Prophenin angereichert werden. Die durchgeführten in-vitro Versuche müssten durch ein in-vivo Versuchs-Modell verifiziert werden.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

AAP American Academy of Pediatrics: Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn (1997): Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection. *Pediatrics* 99, 489-496

ACOG = The American College of Obstetricians and Gynecologists (1996): Committee on Obstetric Practice Prevention of early onset group B streptococcal disease in newborns (Opinion 173). Washington, D.C.: American College of Obstetricians and Gynecologist 1996

Abbasi IA, Hemming VG, Eglinton GS, et al. (1987): Proliferation of group B streptococci in human amniotic fluid in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 156, 95-99

Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH (1995): FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 195-199

Auten RL, Notter RH, Kendig JW, Davis JM, Shapiro DL (1991): Surfactant treatment of full-term newborns with respiratory failure. *Pediatrics* 87, 101-107

Avery ME, Mead J (1959): Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child* 97, 517-523

Baker CJ, Barrett FF (1973): Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *Pediatr* 83, 919-925

Baker CJ, Kasper DL (1976): Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 294, 753-756

Baker CJ (1977): Summary of the workshop on perinatal infections due to group B streptococcus. J Infect Dis 136, 137-142

Baker CJ, Edwards MS (2000): Group B streptococcal infections; in: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, hrsg. Remington JS, Klein JO, 5<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1091-1155

Bambang Oetomo S, Bos AF, de Lei L, Okken A, van Dondren L, Halliday HL, Walti H (1993): Immune response after surfactant treatment of newborn infants with respiratory distress Syndrome. Biol Neonate 64, 341-345

Barnett ED, Klein JO (2006): Bacterial Infections of the Respiratory Tract. In: Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn, 6<sup>th</sup> ed, Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ, Elsevier Saunders, Philadelphia 2006, Seite 297

Barton L, Hodgman JE, Pavlova Z (1999): Causes of death in the extremely low birth weight infant. Pediatrics 103, 446-451

Boman HG (2000): Innate immunity and the normal microflora. Immunol Rev 173, 5-16

Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, et al. (1983): Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. J Infect Dis 148, 802-809

Burmann LG, Christensen P, Christensen K, Fryklund B, Helgesson A, Svenningsen NW, Tullus K (1992): Prevention of excess neonatal morbidity associated with group B streptococci by vaginal chlorhexidine disinfection during labor. Lancet 340, 65-69

Butter NMW, de Moor CE (1967): Streptococcus agalactiae as a cause of meningitis in the newborn, and of bacteraemia in adults. Antonie van Leeuwenhoek 33, 439-450, 1967

CDC = Centers for Disease Control and Prevention (1996): Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. MMWR Morb Mort Wkly Rep Recomm Rep 45 (RR-7), 1-24

CDC = Centers for Disease Control and Prevention (2002): Prevention of perinatal group B streptococcal disease. MMWR Morb Mort Wkly Rep Recomm Rep 51 (RR-11), 1-26

Christensen K, Ripa T, Agrup G, et al. (1976): Group B streptococci in human urethral and cervical specimens. Scand J Infect Dis 8, 75-78

CIDCFN = Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn (1992): Guidelines for prevention of group B streptococcal infection by chemoprophylaxis. Pediatrics 90, 775-778

Coonrod JD, Lester RL, Hsu LC (1984): Characterization of the extracellular bactericidal factors of rat alveolar lining material. J Clin Invest, 74(4), 1269-1279

de Mello DE, Heyman S, Phelps DS, Floros J (1993): Immunogold localization of SP-A in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome. Am J Pathol 142, 1631-1640

de Mello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Norgue L, Cole S, Colten HR (1994): Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. Am J Respir Cell Mol Biol 11, 230-239

Dennehy PH (1987): Respiratory infections in the newborn. Clin Perinatol 14, 667-682

Dietl P, Haller T, Schneider SW (2001): Wie die Lunge Luft holt. Spektrum Wiss, November, 46-52

Edwards MS, Jackson CV, Baker CJ (1981): Increased risk of group B streptococcal disease in twins. JAMA 245, 2044-2046

Edwards MS, Rench MA, Haffar AA, Murphy MA, Desmond MM, Baker CJ. (1985): Long term sequelae of group B streptococcal meningitis in infants. J Pediatr 106, 717-722

Eickhoff TC, Klein JO, Daly AK, Ingall D, Finland M (1964): Neonatal sepsis and other infections due to group beta-hemolytic streptococci. N Engl J Med 271, 1221-1228, 1964

Enhörning G, Robertson B (1972): Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. Pediatrics 50, 58-66

Enhörning G (1977): Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. J Appl Physiol, 43(2), 198-203

Farley MM, Harvey RC, Stull T, Smith JD, Schuchat A, Wenger JD, Stephens DS (1993): A population-based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in nonpregnant adults. N Engl J Med 328, 1897-1811

Faro S (1981): Group B beta-hemolytic streptococci and puerperal infections. Am J Obstet Gynecol 121, 205-212

Ferrieri P, Wannamaker LW, Nelson J. (1973): Localization and characterization of the hippuricase activity of group B streptococci. Infect Immun 7, 747-752, 1973

Ferrieri P 1985: GBS enzymes, hemolysin, toxins and other products. Antibiot Chemother 35, 57-70

Findlay RD, Taeusch HW, Walther FJ (1996): Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. Pediatrics 97, 48-52

Franciosi RA, Knostmann JD, Zimmermann RA. (1973): Group B streptococcal neonatal and infant infections. J Pediatr 82, 707-718

Frey RM (1938): Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. Lancet 1, 199-201

Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T (1980): Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. Lancet 12 1, 55-59

Ganz T (2001): Defensins in the urinary tract and other tissues. J Infect Dis 183, 41-42

Gibson RL, Soderland C, Henderson WR Jr, Chi EY, Rubens CE (1995): Group B streptococci injure lung endothelium in vitro: GBS invasion and GBS-induced eicosanoid production is greater with microvascular than with pulmonary artery cells. Infect Immun 63, 271-279

Gibson RL, Nizet V, Rubens CE (1999): Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. Pediatr Res 45, 626-634

Gluck L, Motoyama EK, Smits HL, Kulovich MV (1967): The biochemical development of surface activity in mammalian lung. I. The surface-active phospholipids; the separation and distribution of surface-active lecithin in the lung of the developing rabbit fetus. Pediatr. Res 1, 237-246

Gluck L, Kulovich MV, Borer RC, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN (1971): Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. Am J Obstet Gynecol 109, 440-445

Gross: Respiratory distress syndrome; in Principles and Practice of Pediatrics, hrsg. v. Oski MD, Frank A, 2<sup>nd</sup> edition, J. B. Lippincott Company, Philadelphia 1994, 369-374.

Günther A, Kalinowski M, Elssner A, Seeger W (1994): Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity. Am J Physiol 267, L618-L624

Haagsman HP (1992): Toxicological aspects of the surfactant system: pulmonary surfactant. In : Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ (eds) Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 705-734

Hall SB, Bermel MS, Ko YT, Palmer HJ, Enhorning G, Notter RH (1993): Approximations in the measurement of surface tension on the oscillating bubble surfactometer. J Appl Physiol 75, 468-477

Hallman M, Feldman B, Gluck L (1975): The absence of phosphatidylglycerol in surfactant. Pediatr Res 9, 396

Harder J, Bartels J, Christophers E et al (2001): Isolation and characterization of human-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem, 276, 5707-5713.

Harwig SS, Kokryakov VN, Swiderek KM, Aleshina GM, Zhao C, Lehrer RI (1995): Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. FEBS Letters 362, 65-69

Hemming VG, Nagarajan K, Hess LW, et al. (1985): Rapid in vitro replication of group B Streptococcus in term human amniotic fluid. Gynecol Obstet Invest 19, 124-129

Herting E, Jarstrand C, Rasool O, Curstedt T, Sun B, Robertson B (1994): Experimental neonatal group B streptococcal pneumonia: effect of a modified porcine surfactant on bacterial proliferation in ventilated near-term rabbits. Pediatr Res 36, 784-791

Herting E: Surfactanttherapie bei neonataler Pneumonie und beim Mekoniumaspirationssyndrom; in: Surfactanttherapie, Grundlagen, Diagnostik, Therapie; hrsg. von Wauer RW u.a.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997, 124-132

Herting E, Gefeller O, Land M, van Sondren L, Harms K, Robertson B (2001): Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. Members of the Collaborative European Multicenter Study Group. *Pediatrics* 106, 957-964

Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S (2002): Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3(11),1033-1040

Hyvarinen M, Zeltzer P, Oh W (1973): Influence of gestational age on serum levels of alpha-1-fetoprotein, IgG globulin, and albumin in newborn infants. *J Pediatr* 82, 430-437

Janeway C. A., Travers P, Walport M, Capra JD (1999): Immunobiology: the immune system in health and disease, 4th Edition, Vol 21, Issue 4, 1 April 2000, Page 201. Auflage, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York.

Johansson J, Curstedt T, Robertson B (1994): The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 7, 372-391

Khammash H, Perlman M, Wojtulewicz J, Dunn M (1993): Surfactant treatment in full-term neonates with severe respiratory failure. *Pediatrics* 92, 135-139

Klaus MH, Clements JA, Havel RJ (1961): Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 47, 1858-1859

Kotiw M, Zhang GW, Daggard G, Reiss-Levy E, Tapsall JW, Numa A (2003): Late-onset and recurrent neonatal group B streptococcal disease associated with breast-milk transmission. *Pediatr Dev* 6, 251-256

Kotloff KL, Fattom A, Basham L, Hawwari A (1996): Safety and immunogenicity of a tetravalent group B streptococcal polysaccharide vaccine in healthy adults. *Vaccine* 14, 446-450

Lin F-FY, Weisman LE, Troendle J, Adams K (2003): Prematurity is the major risk factor for late-onset group B streptococcus disease. J Infect Dis 188, 267-271

Mauskopf JA, Backhouse ME, Jones D, Wold DE, Mammel MC, Mullet M, Guthrie R, Long WA (1995): Synthetic surfactant for rescue treatment of respiratory distress syndrome in premature infants weighing from 700 to 1350 grams: impact on hospital resource use and charges. J Pediatr 126, 94-101

McReynolds EW, Roy S 3rd. (1974): Case report Diabetes insipidus secondary to group B beta streptococcal meningitis. J Tenn Med Assoc 67, 117-120

Meyerholz DK, Ackermann MR (2005): Antimicrobial peptides and surfactant proteins in ruminant respiratory tract disease. Vet Immunol Immunopathol 108 (1-2), 91-6

Milligan TW, Mattingly SJ, Straus DC (1980): Purification and partial characterization of neuraminidase from type III group B streptococci. J Bacteriol 144, 164-171

Møller M, Thomsen AC, Borch K, et al. (1984): Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. Lancet 2, 69-70

Möller OG (1998): In-Vitro-Untersuchungen zur Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von B-Streptokokken durch Surfactant. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Molliex S, Crestani B, Dureuil B, Bastin J, Rolland C, Aubier M, Desmonts JM (1994): Effects of halothane on surfactant biosynthesis by rat alveolar type II cells in primary culture. Anesthesiology 81, 668-676

Moya FR, Montes HF, Thomas VL, Mouzinho AM, Smith JF, Rosenfeld CR (1994): Surfactant protein A and saturated phosphatidylcholin in respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 150, 1672-1677

Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, et al. (1989): Identification of a high-virulence clone of type III Streptococcus agalactiae ( group B streptococcus) causing invasive neonatal disease. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 4731-4735,

Neegard von (1929): Neue Auffassung über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Z Gesamte Exp Med 66, 373-394

Nizet V, Gibson RL, Rubsen CE (1997): The role of group B streptococci beta-hemolysin expression in newborn lung injury. Adv Exp Med Biol 418, 627

Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR (1993): Brief report: Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis, N Engl J Med 328, 406-410

Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, de Mello DE, Colten HR (1994): A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. J Clin Invest 93, 1860-1863

Oosterlaken Dijksterhuis MA, Haagsman HP, van Golde LMG, Demel RA (1991): Characterization of lipid insertion into monomolecular mediated layers by lung surfactant proteins SP-B or SP-C. Biochemistry 30; 10965-10971

Oosterlaken Dijksterhuis MA, van Eijk M, van Buel BLM, van Golde LMG, Haagsman HP (1991): Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung. Biochem J 274, 115-119

Oulton MR, Janigan DT, MacDonalds JMR, Faulkner GT, Scott JE (1994): Effects of smoke inhalation on alveolar surfactant subtypes in mice. Am J Pathol 145, 941-950

Palta M, Weinstein MR, McGuinness G, Gabbert D, Brady W, Peters E (1994): A population study: mortality and morbidity after availability of surfactant therapy. Arch pediatr Adolesc Med 148, 1295-1301

Pass MA, Gray BM, Khare S, et al (1979): Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. J Pediatr 95, 437-443

Pattle RE (1955): Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Nature 175, 1125-1126

Pungercar J, Strukelj B, Kopitar G Renko M, Lenarcic B, Gubensek F Turk Vet (1993): Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine bone marrow. FFBS Lett 336, 284-288

Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP, et al. (1996): Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. Am J Obstet Gynecol 174, 1354-1360

Robillard E, Alarie Y, Dagenais-Perusse P, Baril E, Guibeault A (1964) : Microaerosol administration of synthetic beta-gamma-dipalmitoyl-L-alpha-lecithin in the respiratory distress syndrome: a preliminary report. Cand Med Assoc J 90, 55-57

Rüfer R 1967: Der Einfluß der oberflächenaktiven Substanzen auf Entfaltung und Retraktion isolierter Lungen. Pflugers Arch 298, 170-84

Schuchat A, Oxtoby M, Cochi S, et al. (1990): Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: Results of a cohort study in metropolitan Atlanta. J Infect Dis 177, 31-36

Schuchat A, Wenger JD (1994): Epidemiology of group B streptococcal disease. Risk factors, prevention strategies, and vaccine development. Epidemiol Rev 16, 374-402

Seeger W, Günther A, Thede C (1992): Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C-vs SP-B-based surfactants. Am J Physiol 261, 286-291

Seeger W, Grube C, Günther A (1993) Ia : Proteolytic cleavage of fibrinogen: amplification of its inhibitory capacity. Am J Respir Cell Mol Biol 9, 239-247

Seeger W, Elssner A, Günther A, Krämer HJ, Kalinowski HO (1993) Ib: Lung surfactant phospholipids associated with polymerizing fibrin: loss of surface activity. Am J Respir Cell Mol Biol 9, 213-220

Sherman MP, Campbell LA, Merritt TA, Long WA, Gunkel JH, Curstedt, Robertson B (1994): Effect of different surfactants on pulmonary group B streptococcal infection in premature rabbits. J Pediatr, 125, 939-947

Strayer DS, Hallman M, Merritt TA (1991): Immunogenicity of surfactant. Clin Exp Immunol 83, 41-46

Stevens PA, Schadow B (1997): Molekulare Diagnostik der Surfactantstörungen; in: Surfactanttherapie; Grundlagen, Diagnostik, Therapie; hrsg. v Wauer RR u.a.: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997, 21-33

Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, et al. (1996): Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. J Pediatr 129, 72-82

Thannhauser SJ, Benotti J, Bencoddo NF (1946): Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmityllecithin) from lung: its occurrence in the sphingomyelin fraction of animal tissues. J Biol Chem 166, 669-675

<http://www.uptodateonline.com>. Baron M, Madoff LC: Group B streptococcal infections in nonpregnant adults. (24.04.2008)

Wald ER, Bergmann I, Taylor HG, et al (1986): Long-term outcome of group B streptococcal meningitis. Pediatrics 77, 217-221

Wagner B, Wagner M, Kubin V, et al. (1980): Immunoelectron microscopic study of the location of group-specific and protein type-specific antigens of group B streptococci. J Gen Microbiol 118,95-105

Walters DV (2002): Lung lining liquid-the hidden depths. The 5<sup>th</sup> Nils W. Svenningsen memorial lecture. Biol Neonate 81, 2-5

Wang Y, Griffiths WJ, Curstedt T, Johansson J (1999): Porcine pulmonary surfactant preparations contain the antibacterial peptide prophenin and a C-terminal 18-residue fragment thereof. FEBS Lett. 460, 257-262

Wang Y, Wang G, Herting E, Agerberth B, Johansson J (2004): Antibacterial activities of the cathelicidins prophenin (residues 62-79) and LL-37 in the presence of a lung surfactant preparation. Antimicrob Agents Chemother 48(6), 2097-100

Wauer RR: Das Atemnotsyndrom (ANS); in: Surfactanttherapie; Grundlagen, Diagnostik, Therapie; hrsg. v Wauer RR u.a.: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997, 2-20

Wehkamp J, Salzmann NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL (2005): Reduced Paneth cell alpha-defensin in ileal Crohn`s disease. Proc Natl Acad Sci USA, 102 (50), 18129-18134

Wehkamp J, Bals R, Kreft B, Schröder JM, Stange EF (2007): Angeborene Immunabwehr: Klinische Relevanz der endogenen antimikrobiellen Peptide in Innerer Medizin und Dermatologie. Deutsches Ärzteblatt 104 (5), 275-263

Weihofen U (2004): Proliferationsverhalten von B-Streptokokken und Phagozytose durch neutrophile Granulozyten in Beziehung zum klinischen Verlauf bei neonatalen Infektionen. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Zhang P, Summer W, Bagby GJ, Nelson S (2000): Innate immunity and pulmonary host defense. Immunol Rev 173, 39-51

## **VII. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. E. Herting für die Vergabe des Themas und die Betreuung der vorliegenden Dissertation bedanken. Seine stete Unterstützung und Förderung sowie seine Gesprächsbereitschaft waren essentiell für die Entstehung dieser Arbeit.

Für die geduldige Beratung und zuverlässigen Unterstützung bei der experimentellen Durchführung danke ich Frau Gabriele Walter.

Herrn PD Dr. rer. nat. Werner Holländer und Herrn Alexander von Freyhold-Hünecken danke ich für die hilfreiche Beratung bei der statistischen Auswertung.

## VIII. LEBENS LAUF



|                  |                                                                                                                                       |              |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Geburtsdaten:    | 12.09.1976 in Berlin-Charlottenburg                                                                                                   |              |
| Ausbildung:      | Staatsexamen                                                                                                                          | 10/2006      |
|                  | Medizinstudium an der Georg-August-Universität, Göttingen                                                                             | 2000-2006    |
|                  | Ausbildung zur biologisch technischen Assistentin<br>an der Sabine Blindow Schule, Hannover                                           | 1998-2000    |
|                  | Abitur, Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium, Celle                                                                                    | 1997         |
|                  | Fichtenberg-Gymnasium, Berlin                                                                                                         | 1989-1991    |
| Praktika:        | PJ Dermatologie, Prof. Dummer, Universitätsspital Zürich                                                                              | 2006         |
|                  | PJ Kinderchirurgie, Dr. Griffiths, Southampton, England                                                                               | 2006         |
|                  | PJ Allgemeinchirurgie, Prof. Meyer, Klinikum Wolfsburg                                                                                | 2006         |
|                  | PJ Innere Medizin, Prof. Engberding, Klinikum Wolfsburg                                                                               | 05/06        |
| Berufserfahrung: | Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin,<br>Prof. Clausen, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf             | seit 05/2007 |
| Dissertation:    | Einfluss von Prophenin und Surfactant auf das<br>Proliferationsverhalten von Streptococcus agalactiae.<br>Experimentelle Durchführung | 2002-2005    |