

MULTIPLE WIRKWEISEN DES KONSTITUTIV EXPRIMIERTEN
HUMANEN ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDS (HBD1)

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Judith Raschig
aus Nördlingen

Tübingen
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

30.01.2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jan Wehkamp

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Peschel

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN	IV
SUMMARY	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1. MIKROBIOTA IM HUMANEN ORGANISMUS.....	1
1.1.1. Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt	1
1.1.2. Intestinale Barriere	3
1.2. HUMANE ABWEHRSTRATEGIEN	4
1.2.1. Erworbenes Immunsystem	4
1.2.2. Angeborenes Immunsystem	5
1.3. ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE.....	6
1.3.1. Defensine	6
1.3.1.1. HBD1 und dessen Wirkspektrum	8
1.4. SPEZIELLE EIGENSCHAFTEN VON BAKTERIEN.....	9
1.4.1. Gram-positive Bakterien	10
1.4.2. Gram-negative Bakterien	11
1.4.2.1. Proteinfaltung in Gram-negativen Bakterien	12
1.4.2.2. Oxidativer Reaktionsweg mit Oxidoreduktasen DsbA und DsbB	14
1.4.2.3. Isomerisierungs- Weg mit DsbC und DsbD	15
1.5. ANTIBIOTIKA RESISTENZEN.....	15
1.6. ZIEL DER ARBEIT	17
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1. MATERIAL	18
2.1.1. Geräte	18
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3. Chemikalien, Antikörper und Kits	19
2.1.3.1. Chemikalien.....	19
2.1.3.2. Antikörper	19
2.1.4. Medien und Puffer	20
2.1.4.1. Zellanzucht	20
2.1.4.2. Sonstiges	20
2.1.5. Peptide	22
2.1.6. Verwendete Bakterien	22

2.1.7. Software	24
2.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.2.1. Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität	24
2.2.1.1. Radial Diffusions Assay	24
2.2.1.2. Luciferase Reporter Gen Assay	25
2.2.1.3. Trübungsassay	26
2.2.1.4. Inaktivierung von hBD1 durch bakterielle Proteasen	26
2.2.1.5. Durchflusszytometrie (FACS)	27
2.2.1.6. Membran Permeabilitäts Assay	27
2.2.1.7. Transmigrationsassay	27
2.3. PROTEIN METHODEN	28
2.3.1. Massenspektrometrische Analysen	28
2.3.1.1. <i>In vitro</i> Oxidation von hBD1	28
2.3.1.2. <i>In vitro</i> Reduktion von hBD1	28
2.3.2. Proteinnachweis mittels Westernblot	29
2.3.3. Elektronenmikroskopische Bildgebung	30
2.3.3.1. Rasterelektronenmikroskopie	30
2.3.3.2. Transmissionselektronenmikroskopie	30
2.3.3.3. Immunogold-Färbung	31
2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
3 ERGEBNISSE	32
3.1. ANALYSE DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON HBD1	32
3.1.1. Charakterisierung der bakteriellen Targets der hBD1 Redoxformen	34
3.2. WIRKMECHANISMUS VON HBD1OX AUF BAKTERIEN	38
3.2.1. Der Einfluss von bakteriellen Membran-assoziierten Proteinen auf die antimikrobielle Aktivität	40
3.2.2. Das Redoxsystem DsbA/DsbB beeinflusst die hBD1ox Aktivität	41
3.2.2.1. Einschränkungen in der Motilität und LPS-Struktur sind nicht für die Resistenz verantwortlich	45
3.2.2.2. Vergleich der Membranzusammensetzung von WT vs $\Delta dsbA\Delta dsbB$	47
3.2.3. Analyse der Morphologie mittels Elektronenmikroskopie	48
3.2.4. Lokalisierung von hBD1ox in bakteriellen Kompartimenten	50
3.3. WIRKMECHANISMUS VON HBD1RED AUF BAKTERIEN	52
3.3.1. TEM- Analyse von hBD1 behandelten Bakterien	52
3.3.2. Analyse der netzartigen Struktur von hBD1red	54
3.3.3. Strukturanalyse der netzartigen Struktur durch hBD1red	56
3.3.3.1. Eigenschaften von hBD1red_Abu	56
3.4. INAKTIVIERUNG VON HBD1RED DURCH BAKTERIELLE PROTEASEN	58
3.4.1. <i>In vivo</i> Nachweis von hBD1red Fragmenten	58
3.4.1.1. Antimikrobielle Eigenschaften von hBD1red_AS1-29	60
3.4.1.2. HBD1red_AS1-29 zeigt Netzbildung mit Bakterien	61
3.4.2. Einfluss der bakteriellen Proteasen auf hBD1	62

3.5. FUNKTIONELLER NACHWEIS DER NETZSTRUKTUR	64
3.5.1. Etablierung eines Transmigrationsassays	64
3.5.1.1. <i>K. pneumoniae</i> als resistentes Bakterium gegen hBD1.....	65
3.5.2. HBD1 Netze verhindern bakterielle Diffusion	66
4 DISKUSSION	67
4.1. ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE ALS ALTERNATIVE ANTIBIOTIKA.....	67
4.1.1. hBD1- ein unterschätztes Defensin	68
4.2. EIN ANTIMIKROBIELLES PEPTID MIT MULTIPLLEN WIRKMECHANISMEN...	69
4.2.1. Die antimikrobielle Strategie von hBD1ox	71
4.2.1.1. Das Redoxsystem ist essentiell für die Aktivität von hBD1ox	71
4.2.1.2. Lokalisierung von hBD1ox in <i>E. coli</i>	73
4.2.1.3. Ein möglicher Wirkmechanismus von hBD1ox.....	74
4.2.2. Aktivität von hBD1red	76
4.2.2.1. HBD1red attackiert die bakterielle Membran.....	76
4.3. ABWEHRMECHANISMUS VON BAKTERIEN AUF HBD1	78
4.4. FUNKTIONELLER NACHWEIS DER NETZE.....	79
4.5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	80
LITERATUR.....	82
DANKSAGUNG.....	93

Abkürzungen

AMP	Antimikrobielles Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CFU	<i>colony forming units</i>
DiBAC ₄ (3)	Bis-1,3-Dibutylbarbituric Acid-Trimethine-Oxonol
DTT	Dithiothreitol
FACS	Durchflusszytometrie
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunden
HBD	Humanes Beta Defensin
HD	Humanes Alpha Defensin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDA	Kilodalton
min	Minuten
MRGN	multiresistente Gram-negative
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
Q8	Decylubiquinone
RDA	Radial Diffusion Assay
REM	Rasterelektronenmikroskop
sek.	sekundär
SEM	<i>standard error of the mean</i>
ssp.	Subspezies
TEM	Transmembranelektronenmikroskopie
TRX	Thioredoxin
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
u. a.	unter anderem
vs	versus
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

Summary

The human body is continuously exposed to an enormous amount of microorganisms, such as bacteria, fungi and viruses. Besides an efficient layer of mucus, antimicrobial peptides (AMPs) are an essential part of the epithelial barrier. Human β -defensin 1 (hBD1) is one important antimicrobial peptide, which is continuously produced by human epithelia. After reduction of its three disulfide bridges, however, it becomes a potent antimicrobial agent against anaerobic and aerobic bacteria, while oxidized hBD1 (hBD1ox) shows a specific activity against Gram-negative bacteria. Due to increasing number of multi resistant microorganisms, here we studied the mechanism of both redox forms of hBD1 to find new strategies for antimicrobial molecules. We found that two redoxproteins, DsbA and DsbB, in the periplasmic space of Gram-negative bacteria are involved in the antimicrobial activity of hBD1ox. In contrast, other bacterial proteins in the outer membrane, cytosol or in the flagellum system did not impact the toxicity of hBD1ox. A complementation of the redoxsystem by expressing DsbA and DsbB in *trans* fully restored the sensitivity to oxidized hBD1. In contrast to the Wildtyp, bacteria without DsbA and DsbB show a lower stress reaction after a treatment with hBD1ox, which displayed a decreased amount of membrane vesicles at the bacterial surface. Using immunogold labeling and electron microscopy, we visually showed the localization of hBD1ox in the periplasmic space and partly in the outer membrane of *E. coli*. However, in mutants lacking DsbA and DsbB, hBD1ox was detected mainly in the cytosol of bacteria. In summary hBD1ox can interact with DsbA and DsbB and are indispensable for the antimicrobial activity of hBD1ox. This leads to hypothesis that hBD1ox can concentrate in the periplasmic space, which finally induce bacterial cell lysis. We identified the bacterial membrane as a target of hBD1red and that its act by disrupting the cell membrane. Surprisingly, using electron microscopy we detected a so far unknown net-like structure surrounding bacteria, which were treated with the reduced but not oxidized form of hBD1. A newly established transmigration assay demonstrated that hBD1-derived nets capture bacteria and inhibit bacterial transmigration in addition of bacterial killing. In contrast to other defensins, e.g. HD6, cysteins in the sequence of hBD1red are necessary for net formation, shown by a prevented net formation after exchange of amino acids. Additional we also identified a bacterial defense strategy. We showed that bacterial proteases are able to degrade hBD1red in an inactive fragment. Nonetheless we detected a stable net-formation and inhibition of bacterial diffusion by the fragmented hBD1red. While reduced and oxidized hBD1 have distinct antimicrobial profiles and functions, the reduced form provides an additional host protection by entrapping bacteria in extracellular net structures preventing bacterial invasion in reduced environments. A better understanding of the modes of action of endogenous host peptides will help to find new antimicrobial strategies against multi resistant bacteria.

Zusammenfassung

Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilze und Viren, besiedeln kontinuierlich den menschlichen Organismus. Neben einer effektiven Barriere durch die Epithelschichten und teilweise mit Mukusschichten spielen in der Verteidigung antimikrobielle Peptide (AMPs) eine zentrale Rolle. Ein wichtiges AMP ist das humane β -Defensin 1, welches im Gegensatz, zu einigen anderen Defensinen, ubiquitär von allen Epithelien produziert wird. Nach Reduktion der drei Disulfidbrücken erzielt das Peptid gegen viele anaeroben, aber auch gegen aerobe Bakterien eine toxische Wirkung. Die oxidierte Form (hBD1ox) zeigte eine spezifischere Aktivität auf Gram-negative Bakterien, darunter *Escherichia coli* (*E. coli*). Aufgrund der immer größer werdenden Anzahl an multiresistenten Keimen und dem daraus resultierendem Bedarf an neue Strategien für neue antimikrobiell aktive Substanzen, wurde hier der Wirkmechanismus beider Redoxformen genauer untersucht. In dieser Arbeit konnten zwei Redoxproteine DsbA und DsbB im bakteriellen Periplasma identifiziert werden, welche essentiell für die Aktivität von hBD1ox sind. Dagegen wurde der Einfluss weiterer Proteine in der Außenmembran, Cytosol, sowie im Flagellum für die hBD1ox Aktivität ausgeschlossen. Ein weiterer Nachweis der Abhängigkeit des Redoxkomplex zeigte die Verwendung einer „Rescue“-Mutante, welche beide Redoxproteine auf einem externen Plasmid enthält, wodurch die Sensitivität auf hBD1 hergestellt wurde. Dies bestätigt, dass das DsbA/DsbB System eine notwendige Komponente für die antimikrobielle Aktivität von hBD1ox darstellt. Zusätzlich zeigten Bakterien ohne DsbA/DsbB System, im Gegensatz zum Wildtyp, eine geringere Anzahl an Membranvesikeln auf der bakteriellen Oberfläche, was mit einer niedrigeren Stressreaktion assoziiert ist. Durch eine Immunogold Färbung wurde hBD1ox in *E. coli* WT spezifisch im Periplasma lokalisiert. Dagegen konnte hBD1ox in der Mutante auch im Cytosol diffundieren. Es konnte somit gezeigt werden, dass hBD1ox mit DsbA und DsbB interagieren kann. Dies lässt die Hypothese zu, dass sich hBD1ox im Periplasma ansammelt und zusammenlagert, was schließlich die Zellyse induziert.

Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass nur die reduzierte Form (hBD1red) Membranschäden an Bakterien verursacht. Überraschenderweise zeigte die Rasterelektronenmikroskopie nach der Behandlung mit hBD1red eine bisher noch unbekannte Netzstruktur, welche die Bakterien umgibt. Ein hier etablierter Transmigrationsassay zeigte, dass diese Netzstruktur die Diffusion und Verbreitung der Bakterien zusätzlich zu der antimikrobiellen Aktivität verhindern kann. Im Gegenteil zu anderen Defensinen, wie z .B HD6, ist die Aminosäure Cystein in der hBD1-Sequenz für die antimikrobielle Aktivität nötig und für die Netzbildung essentiell. Dies konnte durch einen Austausch mit einem Cystein-Analogon, welcher die Netzbildung verhindert, gezeigt werden. Zusätzlich wurde ein bakterieller Abwehrmechanismus von hBD1 identifiziert, bei diesem bakterielle Proteasen in der Lage sind das hBD1red zu fragmentieren.

Dadurch zeigt sich eine schwächere antimikrobielle Aktivität. Jedoch konnte die Netzbildung trotz des Proteaseverbaus nachgewiesen werden. Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein Peptid mehrere Strategien besitzen kann, um antimikrobiell aktiv sein zu können. Dies dient für ein besseres Verständnis über die Wirkmechanismen von AMPs und könnte bei der Entwicklung neuer Strategien im Kampf gegen multiresistente Keime helfen.

1 Einleitung

1.1. Mikrobiota im humanen Organismus

Der humane Organismus ist ständig großen Mengen an Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Viren ausgesetzt. Schätzungen zufolge findet man ca. 10^{13} Bakterien und eine gleiche Anzahl an humanen Zellen im gesamten Gastrointestinaltrakt (Sender *et al*, 2016). Während nur ein kleiner Anteil der Mikrobiota auf Körperoberflächen, wie etwa auf der Haut, beobachtet wurde, zeigt sich der größte Anteil der Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt (Savage, 1977; Garrett *et al*, 2010). Im Gegensatz zu den im Gastrointestinaltrakt angesiedelten Bakterien lässt sich die bakterielle Zusammensetzung der Haut nicht exakt bestimmen (Grice *et al*, 2008). Je nach Körperregion, pH-Wert und Temperatur weist die Haut eine spezielle, für jeden Menschen einzigartige Zusammensetzung von Mikroorganismen auf. Zusätzlich beeinflussen Feuchtigkeit auf der Haut und das Vorhandensein von Talgdrüsen in der Haut diese Zusammensetzung (Shuster, 1965; Kearney *et al*, 1984; Grice *et al*, 2008). Verschiedene humane Hautproben zeigten einen Hauptanteil von 49 % Proteobakterien, 28 % Actinobakterien, 9,7 % Bacteroidetes und 12 % Firmicutes (Grice *et al*, 2008). Auf der Haut kann eine veränderte Zusammensetzung der Mikroorganismen oder ein Überfluss an Pathogenen ein Auslöser für verschiedene Krankheiten sein (Grice *et al*, 2008). Einige Studien zeigten, dass die Zusammensetzung der Haut-Mikrobiota bei Psoriasis, Akne, Rosazea, aber auch bei verschiedenen Ekzemerkrankungen eine Rolle spielt (Holland *et al*, 1977; Thomsen *et al*, 1980; Till *et al*, 2000; Paulino *et al*, 2006; Grice *et al*, 2008).

Der humane Organismus ist vor der Geburt noch weitestgehend steril (Ley *et al*, 2006a). Erst während der pränatalen Phase und vor allem während der Geburt werden die Körperoberflächen und der Gastrointestinaltrakt durch maternale Mikroben besiedelt und die Zusammensetzung dadurch für jeden einzelnen Organismus spezifisch (Grice & Segre, 2011; Lozupone *et al*, 2012). Bei Neugeborenen sind hauptsächlich *Actinobacteria ssp.* und *Firmicutes ssp.* vorhanden, ab ca. drei Jahren beginnt bei Kindern die Besiedlung mit *Bacteroidetes ssp.* und *Firmicutes ssp.*, welche die *Actinobacteria ssp.* verdrängen (Voreades *et al*, 2014).

1.1.1. Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt

Für die Resorption von Nährstoffen und Flüssigkeiten, aber auch für die Abgabe unverdaulicher Bestandteile und von Stoffwechselprodukten ist der Gastrointestinaltrakt (GIT) zuständig. Da sich aus den verschiedenen Funktionen andere Anforderungen ergeben, unterscheidet sich jeder Abschnitt im GIT in der Struktur und Anforderungen an die Mikroorganismen. Als erstes wird

über die Speiseröhre die Nahrung aufgenommen, welche dann zum Magen transportiert wird und durch Enzyme teilweise schon vorverdaut wird. Durch den großen Anteil der Magensäure ($\text{pH} < 2$), die Aufnahme von Nahrung und die zunehmenden anaeroben Bedingungen wird einer Fehlbesiedelung oder einer bakteriellen Infektion im Gastrointestinaltrakt vorgebeugt. Dabei werden nur bis zu 10^3 Bakterienzellen je ml Magensaft nachgewiesen (Autenrieth, 2003; Bischoff, 2009). Nach dem Magen folgt der Dünndarm, dessen Hauptaufgabe die enzymatische Aufbereitung und Resorption der Nährstoffe ist. Die besondere Architektur des Dünndarms mit Zotten und Krypten erlaubt eine optimale Aufnahme der Nährstoffe. Der Dünndarm enthält eine große Anzahl an aeroben und anaeroben Bakterien wie z. B. Enterobakterien oder Lactobacillen. Die Zusammensetzung der Mikrobiota kann aber im Laufe des Lebens stark durch die Ernährung, Umweltfaktoren, aber auch durch Medikamenteneinnahme beeinflusst und verändert werden (Voreades *et al.*, 2014; David *et al.*, 2014; Goodrich *et al.*, 2014, Aidy *et al.*, 2015). Je nach Dünndarmabschnitt ändern sich der pH-Wert und die Sauerstoffverfügbarkeit. Der pH-Wert steigt von sehr sauren Bedingungen im Magen ($\text{pH} < 2$) zum Duodenum ($\text{pH} 5,7-6,4$) weiter auf $\text{pH} 7,3-7,7$ im Ileum (Wilson, 2005).

Zugleich reduziert sich der Sauerstoffgehalt über den gesamten Darmabschnitt. Dadurch können sich im Darm, vor allem im Kolon, nur anaerobe oder fakultativ anaerobe Mikroorganismen ansiedeln. Je näher man dem Dickdarm kommt, desto höher wird die Anzahl an Mikroorganismen. Dabei findet man vor allem im Kolon Bifidobakterien, Fusobakterien, Clostridien und Peptostreptokokken (Sekirov *et al.*, 2010; Lozupone *et al.*, 2012; Ostaff *et al.*, 2013). Generell findet sich im GIT eine große Vielzahl an Mikroorganismen, welche somit ein potentielles Risiko für Infektionen darstellen. Nicht nur pathogene Mikroorganismen können bei einer Störung im Immunsystem ein Problem für den Menschen darstellen, auch kommensale Bakterien können bei Verletzungen, wie beispielsweise der Darmwand, zu einer Infektion und Entzündung führen. Durch Veränderungen an der Darmwand kann das Gleichgewicht zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien gestört werden und es könnte dadurch zu einer starken Fehlbesiedelung von Mikroorganismen kommen. Deshalb muss die Homöostase zwischen dem Wirt und der Mikrobiota aufrechterhalten werden, ansonsten kann es zu verschiedenen Krankheiten kommen.

Möglicherweise spielt die Zusammensetzung der Mikrobiota eine Rolle bei der Entstehung von einigen Erkrankungen wie Krebs, Fettleibigkeit, Autismus oder bei chronischen entzündlichen Darmerkrankungen (Ley *et al.*, 2006b; Uronis *et al.*, 2009; Sekirov *et al.*, 2010).

Bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen beobachtete man zusätzlich einen Anstieg von Proteobakterien und einen gleichzeitigen Abfall von Firmicutes (Matsuoka & Kanai, 2015). Wissenschaftliche Untersuchungen zeigen, dass Veränderungen im Zusammenspiel zwischen Wirt und Mikrobiota ebenfalls eine große Rolle bei entzündlichen Darmerkrankungen spielen können, indem die bestehende Mikrobiota aus dem Gleichgewicht gerät (Gophna *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2007; Wehkamp & Stange, 2010; Walker *et al.*, 2011). Ein Gleichgewicht der Mikrobi-

ota für einen funktionierenden GIT wird von der sogenannten intestinalen Barriere aufgebaut und aufrechterhalten.

1.1.2. Intestinale Barriere

Die intestinale Barriere, welche als Abgrenzung vom Darmlumen zum inneren Körpergewebe dient, besteht aus mehreren Komponenten: die mechanische Barriere aus einer Epithelschicht mit der darauffolgenden Mukusschicht und der biologischen Barriere aus Komponenten des Immunsystems. Die Epithelschicht hat hierbei zwei Funktionen. Sie bildet zum einen die physische Barriere, welche durch „*tight junctions*“ zwischen den einzelnen Zellen verstärkt wird. Zum anderen werden von den unterschiedlichen Epithelzellen sowohl die Mukusschicht (von Becherzellen), als auch antimikrobielle Peptide (von Panethzellen) gebildet (Kim & Ho, 2010; Gallo & Hooper, 2012). Hauptbestandteile der Mukusschicht sind Glykoproteine, wie Muzin II, welche durch ihre hohe Viskosität schon eine erste wichtige Barriere darstellen (Rousseau *et al*, 2004; Kim & Ho, 2010). Zudem werden auch antimikrobielle Substanzen im Mukus gespeichert und abgesondert, was dazu führt, dass die zum Epithel gewandte Mukusschicht als nahezu steril angesehen wird (van der Waaij *et al*, 2005). Neben den antimikrobiellen Molekülen spielen auch weitere Bestandteile des Immunsystems wie Lymphozyten oder Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere. Trotz der hohen Vielzahl an Mikroorganismen kommt es durch das Zusammenspiel all dieser Komponenten nur in seltenen Fällen zu entzündlichen Reaktionen im Darm (Ostaff *et al*, 2013).

Bei chronischen Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sind einzelne Komponenten, welche an der Bildung der intestinalen Barriere beteiligt sind, gestört oder nicht voll funktionsfähig (Wehkamp & Stange, 2010). Bei Colitis ulcerosa handelt es sich um eine Darmentzündung, welche sich vom Rektum kontinuierlich ausbreitet und das gesamte Kolon befallen kann. Dabei treten oft Veränderungen der Mukosa, wie z. B. Abszesse auf (Khor *et al*, 2011). Dagegen kann bei Morbus Crohn der gesamte Gastrointestinaltrakt eine Entzündung mit Stenosen, Abszessen und Fisteln aufweisen. Zusätzlich werden oft Verdickungen der Mukosa und Organwand-durchdringende Entzündungen beobachtet (Khor *et al*, 2011). Nicht nur die Balance zwischen Wirt und Mikrobiota scheinen hier wichtig zu sein, auch beteiligte Komponenten, wie die Panethzelle, haben einen erheblichen Einfluss.

Die Panethzelle stellt durch die Bildung einiger antimikrobieller Peptide einen großen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere dar. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass eine Fehlregulation zu diesen genannten entzündlichen Darmerkrankungen führen kann (Wehkamp & Stange, 2010). Es wurde gezeigt, dass der *Wnt*-Signalweg eine große Rolle bei der Reifung der Panethzellen spielt und eine Korrelation zwischen fehlregulierten Bestandteilen des *Wnt*-Signalwegs und Morbus Chron vorliegt (van Es *et al*, 2005; Koslowski *et al*, 2009, 2012).

Neuste Erkenntnisse zeigen allerdings, dass bei Morbus Chron Patienten der Defekt nicht primär in der Epithelschicht sitzt und die Panethzelle eine normale Expression von Defensinen aufweisen können, sondern die peripheren Immunzellen zeigen einen Defekt in ihrer Funktion. Dadurch kann die antimikrobielle Barriere nicht richtig aufgebaut werden und eine bakterielle Infektion nicht mehr ausreichend verhindert werden (Courth *et al*, 2015).

1.2. Humane Abwehrstrategien

Das Immunsystem schützt den Organismus vor einer Fehlbesiedelung von Pilzen, Parasiten aber auch vor Bakterien. Als Schutz besitzt der Körper, neben den Eigenschaften wie einen sauren pH-Wert im Bereich des Magens oder die intestinale Barriere mit ihrer Epithel- und Mukusschicht im Darm, ein spezielles Immunsystem. Das Immunsystem des Säugers unterteilt sich in angeborenes (innate) und erworbenes (adaptives) Immunsystem (Medzhitov & Janeway, 1997), welche im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden.

1.2.1. Erworbenes Immunsystem

Die Abwehrreaktion des erworbenen Immunsystems ist sehr spezifisch und benötigt daher eine gewisse Anlaufzeit. Hinzu kommt die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei jeder Neuerkennung ausgebildet wird, sodass erneut auftretende Infektionen schneller und effektiver bekämpft werden können und es dadurch seltener zum Ausbruch einer Krankheit kommt (Bonilla & Oettgen, 2010).

Im erworbenen Immunsystem haben verschiedene Zelltypen unterschiedliche Aufgaben, um den humanen Organismus einen Schutz vor Mikroorganismen zu geben. Diese Immunantwort wird zum größten Teil von Lymphozyten (B- und T-Zellen) koordiniert. Die B-Zellen können Antikörper gegen spezifische Strukturen (Antigene) herstellen und sezernieren. Binden diese Antikörper ein Antigen, z. B. Oberflächenproteine von Bakterien oder weitere Membranbestandteile eines Mikroorganismus, wird die Zerstörung eingeleitet und weitere Komponenten des Immunsystems werden aktiviert (Janeway, 1989; Hoffmann *et al*, 1999).

Ebenfalls sind auch T-Zellen in der Lage von körpereigenen Zellen präsentierte Antigene zu erkennen, z. B. virale Bestandteile, um diese dann in einem weiteren Schritt zu zerstören (Oh & Lee, 2012).

1.2.2. Angeborenes Immunsystem

Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem wirkt das angeborene Immunsystem unspezifisch gegen Bakterien. Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen zellulären Bestandteilen wie Granulozyten, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen. Ebenso besitzt es eine humorale Komponente aus Proteinen oder Peptiden mit antimikrobieller Aktivität.

Zusätzlich gehört die Mukusschicht, welche vor allem im Darm eine Barriere darstellt, zum angeborenen Immunsystem (Kim & Ho, 2010). Generell werden Mikroorganismen an der Mukusschicht, aber auch in anderen körperlichen Regionen sofort erkannt und bekämpft. Spezielle Rezeptoren, wie z. B. „*pattern recognition receptors*“ (PRRs), können konservierte Strukturen von verschiedenen Mikroorganismen, sogenannten „*pathogen associated molecular patterns*“ (PAMPs) oder „*microbe associated molecular patterns*“ (MAMPs), erkennen (Didierlaurent *et al*, 2002). Nach der Erkennung dieser hochkonservierten Strukturen der Mikroorganismen kommt es zur Ausschüttung von antimikrobiellen Molekülen durch Granulozyten oder zur Phagozytose durch Makrophagen, bei der die Mikroorganismen aufgenommen und verdaut werden. Die PRRs sind vor allem in Immunzellen, aber auch in Epithelzellen zu finden und können intrazellulär, wie NOD-like Rezeptoren („*nucleotide binding oligomerization domain*“) oder membranständig, wie TLRs („*toll like receptors*“) vorliegen (Kawai & Akira, 2010). NODs findet man in den Immunzellen, aber auch in anderen Zelltypen wie z. B. Epithelzellen. NODs können Oberflächenmoleküle von Gram-positive und Gram-negative Bakterien erkennen, regulieren darauf die Synthese bzw. die Sekretion von Effektormolekülen, wie antimikrobielle Peptide HD5 und HD6 (Wehkamp, 2004; Lecat *et al*, 2010; Moreira & Zamboni, 2012). Neben der Erkennung von verschiedenen Rezeptoren und Oberflächenstrukturen stellen Schleimschichten, wie bei 1.1.2 erwähnt, eine weitere Barriere für Mikroorganismen dar. Diese Schleimschicht enthält sogenannte Muzine, welche zu der Familie der makromolekularen Glykoproteinen gehören. Bakterien werden meist nur in der äußersten Mukusschicht nachgewiesen, somit ist die angrenzende Schicht nahezu steril und bildet z. B. im Dickdarm eine intestinale Barriere (siehe 1.1.2.) (Kim & Ho, 2010). Veränderungen der verankerten Mukusschicht oder Störungen in der Muzinsynthese können schwerwiegende Folgen haben und zur Entstehung von Darmerkrankungen wie z. B. Colitis ulcerosa führen (Shirazi *et al*, 2000; Strugala *et al*, 2008; Becker *et al*, 2013).

Zusätzlich neben den beschriebenen Mechanismen werden von vielen Zelltypen kleine antibiotische Moleküle sekretiert, welche in der Lage sind Mikroorganismen im Wachstum einzuschränken oder sogar abzutöten. Im nächsten Kapitel werden diese kleinen Moleküle, welche eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem einnehmen, genauer beschrieben.

1.3. Antimikrobielle Peptide

Neben der Barriere durch das angeborene oder adaptive Immunsystem werden weitere Moleküle wie Peptide oder kleine Proteine (≥ 100 Aminosäuren) sekretiert, um das Wachstum von Bakterien, Viren oder Pilzen einzuschränken (Kübler *et al*, 2006).

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind kleine endogene Peptide, die auch oft als „natürlich vorkommende Antibiotika“ bezeichnet werden und einen essentiellen Bestandteil der humanen Verteidigung, im angeborenen Immunsystem, gegen Mikroorganismen sind. Diese kleinen Effektormoleküle sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und wirksam gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze und lipidumhüllte Viren (Bals, 2000). AMPs besitzen meist zwei wesentliche Charaktereigenschaften: eine amphipatische Struktur und eine positive Ladung (Zasloff, 2002; Cederlund *et al*, 2011). Aus verschiedenen Organismen konnten bis heute 800 unterschiedliche AMPs isoliert werden. Die antimikrobiellen Wirkmechanismen der verschiedenen Peptide sind dabei teils noch nicht vollständig aufgeklärt (Zasloff, 2002; Zaiou *et al*, 2003). Das bekannte „Shai-Matsuzaki-Huang Modell“ beschreibt, dass die kationischen AMPs an negativ geladene Phospholipid-Gruppen in der bakteriellen Membran binden können, wodurch es zu einer Depolarisierung der bakteriellen Membran oder zur Porenbildung kommen kann. Dies wurde bereits für das humane β -Defensin 3 (hBD3) gezeigt (Yount & Yeaman, 2013; Lee *et al*, 2016). Jedoch wurden auch Peptide entdeckt, welche die bakterielle Zellwand zerstören, was schließlich zu Lyse der Bakterien führte (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002). Dies konnte beispielsweise bereits schon für verschiedene antimikrobielle Peptide wie HNP1, HNP3 oder Typ-C-Lektin nachgewiesen werden (Kagan *et al*, 1990; Hill *et al*, 1991; Mukherjee *et al*, 2014).

Es gibt eine Vielzahl weiterer Strategien, die bereits genauer untersucht wurden. Das Insekten Defensin A verringert die Kaliumkonzentration in bakteriellem Cytoplasma des Gram-positiven Bakteriums *Micrococcus luteus* und depolarisiert dadurch teilweise die innere Membran. Dadurch folgt eine Reduzierung der ATP-Konzentration im Cytoplasma, die schlussendlich zu einer Inhibierung der bakteriellen Atmung führt (Cociancich *et al*, 1993). Ein anderes Peptid, Buforin II, lagert sich im Cytosol an, ohne eine Lyse der Zellmembran auszulösen. Dort interagiert es mit Nukleinsäuren, was zum Absterben der Bakterien führt (Park *et al*, 2000; Brogden, 2005; Xie *et al*, 2011).

1.3.1. Defensine

Eine der wichtigsten Gruppen der humanen antimikrobiellen Peptide sind die Defensine. Anhand ihrer Anordnung der drei Disulfidbrücken erfolgt eine strukturelle Einteilung in zwei Gruppen, α - und β -Defensine (White *et al*, 1995). Beide Formen weisen bakterizide Eigenschaften gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien auf.

Des Weiteren gehören teilweise auch Viren und Pilze zum Wirkspektrum (Zasloff, 2002; Bevins and Salzman, 2011). Viele humane Defensine sind bereits identifiziert und funktionell charakterisiert worden. Die „humanen neutrophilen Peptide 1-4“ (HNP1-4) werden als Propeptid durch neutrophile Granulozyten synthetisiert und dann intrazellulär in einem Phagolysosom aufbewahrt. Erst durch eine proteolytische Spaltung, meist durch neutrophile Elastasen, entstehen aktive Formen, welche den Granulozyten bei der Zerstörung von phagozytierten Mikroorganismen dienen (Ganz *et al*, 1985; Ganz, 2003). Neben der Produktion von antimikrobiell aktiven Peptiden sind neutrophile Granulozyten außerdem in der Lage ein extrazelluläres Netz als Immunabwehr zu bilden (Brinkmann *et al*, 2004).

Das humane alpha Defensin 5 (HD5) wird in großen Mengen und ausschließlich im Dünndarm von spezialisierten Zellen, den sogenannten Panethzellen, produziert. Diese speichern HD5 in sekretorische Vesikel und sekretieren es nach einem bakteriellen Stimulus in das Darmlumen. Dort wird es erst mittels proteolytischer Spaltung durch die humane Protease Trypsin in seine aktive Form überführt (Jones & Bevins, 1992). Durch eine transgene HD5 Maus, welche humanes alpha Defensin 5 exprimiert, konnte die antimikrobielle Aktivität dieses Peptids *in vivo* bestätigt werden. Die transgenen Mäuse zeigten eine Resistenz gegenüber oral verabreichte *S. typhimurium* (Salzman *et al*, 2003). Neben HD5 wird auch das humane alpha Defensin 6 (HD6) von Panethzellen sekretiert (Jones & Bevins, 1992, 1993; Harder *et al*, 2007). Die antimikrobielle Aktivität dieses Defensins war jedoch lange Zeit nicht nachweisbar und es blieb die Frage offen, welche Funktion dieses Defensin im Organismus hat. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid die Ausbreitung von *S. typhimurium* einschränkt, indem es eine netzartige Struktur ausbildet in der sich die Bakterien verfangen. Somit wird ein Anheften der Bakterien an Epithelzellen und eine Ausbreitung verhindert (Chu *et al*, 2012; Schroeder *et al*, 2014).

Deutlich mehr Informationen gibt es über humane β -Defensine. Das am meisten untersuchte Defensin ist das humane β -Defensin 3 (hBD3), welches - wie hBD2 - erst nach Stimulation durch Entzündungsfaktoren exprimiert wird. HBD2 zeigt eine starke bakterizide Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* und *P. aeruginosa*, aber auch Gram-positive Bakterien wie *S. aureus* gehören zu dem breiten Wirkspektrum von HBD2 (Harder *et al*, 1997). Wie hBD2 weist auch hBD3 ein breites, Salz-unempfindliches Wirkspektrum auf. Es wirkt ebenfalls gegen potentiell pathogene Mikroorganismen wie *S. aureus* und den Vancomycin-resistenten *E. faecium* stark bakterizid.

Aber auch gegen anaerobe Bakterien der humanen Darmmikrobiota wie *B. vulgatus* oder *L. johnsonii* wurde bereits eine antimikrobielle Aktivität beschrieben (Bals *et al*, 1998; Harder *et al*, 2001; Wehkamp *et al*, 2008; Nuding *et al*, 2009; Ostaff *et al*, 2013; Lee *et al*, 2016). Während hBD2 und hBD3 nur nach entzündlichen oder bakteriellem Stimulus exprimiert werden und die Expression von HD5 und HD6 auf die Panethzellen im Dünndarm beschränkt ist, wird das humane β -Defensin 1 (hBD1) kontinuierlich von allen Epithelschichten produziert, was auf eine

wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr hinweist (Zhao *et al*, 1996; McCray & Bentley, 1997; Tollin *et al*, 2003).

1.3.1.1. HBD1 und dessen Wirkspektrum

Das humane β -Defensin 1 (hBD1) wurde erstmals 1995 aus humanem Blutplasma isoliert und als eines der ersten humanen β -Defensine identifiziert (Bensch *et al*, 1995). HBD1 ist ein kleines kationisches Peptid aus 36 Aminosäuren mit einer Größe von ca. 3,5 kDA und besitzt sechs Cysteine, welche durch drei intramolekulare Disulfidbrücken verknüpft sein können (Abbildung 1a) (Bensch *et al*, 1995). Schon Valore *et al*, 1998 zeigte, dass hBD1 aus dem Urin mit mehreren Varianten des N-Terminus in nanomolaren Konzentrationen isoliert werden kann. Mittlerweile wurde hBD1 in vielen weiteren epithelialen Oberflächen, wie z. B. in der Niere, Pankreas, Haut, Gastrointestinaltrakt, aber auch in den Atemwegen nachgewiesen (Zhao *et al*, 1996; Valore *et al*, 1998; Tollin *et al*, 2003). Polymorphismen im *DEFB1*-Gen zeigten allerdings Korrelationen zu einem erhöhten Risiko für eine Infektion bei Cystischer Fibrose, Periodontitis, Hautekzemen,

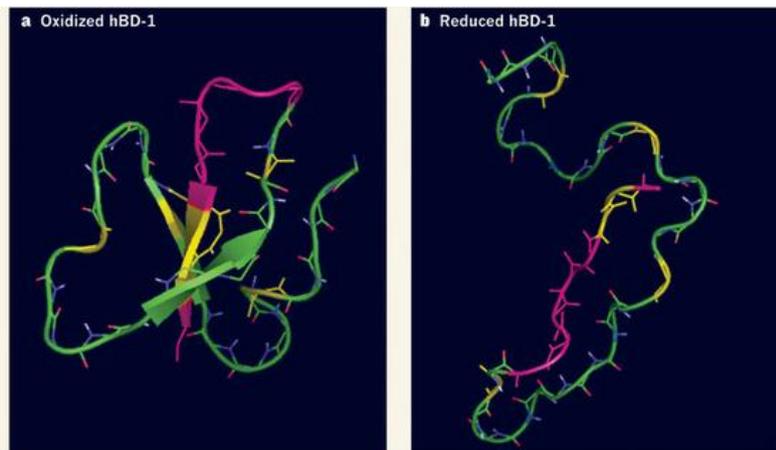


Abbildung 1: Computergenerierte Struktur von humanem β -Defensin 1. Lehrer, 2011, mit Genehmigung von *Nature*.

sowie bei entzündlichen Darmerkrankungen und Darmkrebs (Kocsis *et al*, 2008; Prado-Montes de Oca, 2010). Lange Zeit war die antimikrobielle Aktivität von hBD1 nicht nachweisbar. Funktionelle Studien zeigten nur eine geringe Wirkung, wie z. B. gegen den Laborstamm von *E. coli*. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Wirkung von hBD1

durch einen niedrigen pH-Wert nicht verändert werden kann, aber bei hohen Salzkonzentrationen die bakterizide Eigenschaft abnimmt (McCray & Bentley, 1997). Unklar war auch warum ein Organismus in vielen epithelialen Oberflächen ein solches, auf den ersten Moment, „unnützes“ Defensin mit geringem Wirkspektrum in hohen Mengen kontinuierlich und ohne eine Stimulation durch Entzündungsfaktoren produziert.

Durch die Arbeit von Björn Schroeder wurde bekannt, dass eine reduzierende Bedingung das Wirkspektrum von hBD1 gegen einige anaerobe Bakterien der Gattung Bifidobakterien oder Lactobacillen deutlich erhöht (Schroeder *et al*, 2011b).

Nach der Inkubation mit reduziertem hBD1 zeigt *B. adolescentis* deutliche Schäden im Cytosol. Im Gegensatz dazu zeigt die oxidierte Form (hBD1ox) gegen die meisten Mikroorganismen keinerlei antibiotische Wirkung. Auch keine Depolarisierung der Membran konnte in Schroeder,

Wu, *et al.*, 2011 festgestellt werden. Zusätzlich zeigte eine weitere Studie, dass das reduzierte hBD1 mit seinem Reduktionsmittel, der Thioredoxinreduktase, in der extrazellulären Mukusschicht im Gastrointestinaltrakt kolokalisiert vorliegt. Da der Mukus, der basalen epithelialen Seite, als steril beschrieben wird, könnte das reduzierte hBD1 den Mukus in seiner Funktion als intestinale Barriere unterstützen und vor einer bakteriellen Infektion *in vivo* schützen (Jaeger *et al.*, 2013). Der exakte antimikrobielle Wirkungsmechanismus von beiden Redoxformen ist jedoch noch völlig ungeklärt und soll in dieser Arbeit genauer charakterisiert werden.

1.4. Spezielle Eigenschaften von Bakterien

Es ist bekannt, dass viele antimikrobielle Peptide, unter anderem hBD3, die bakterielle Zellwand als Zieltarget verwenden. Dieses AMP kann sich in die Zellwand von *S. aureus* einlagern, was die Elektronentransportkette und die Lipidbiosynthese stört und schlussendlich zur Lyse der Bakterien führt (Sass *et al.*, 2010).

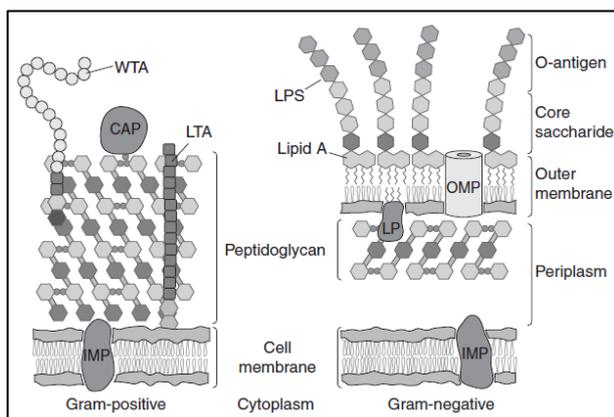


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Silhavy *et al.*, 2010, mit Genehmigung von *Perspectives in Biology*.

wand insgesamt dicker. Auch ein höherer Mureinanteil und das Vorhandensein der Teichonsäure in der Zellwand unterscheiden die Gram-positiven Bakterien von den Gram-negativen Bakterien. Allgemein enthält die Zellwand der Gram-negativen zusätzliche Transmembranproteine (Porine) und viele weitere verschiedene Moleküle mit den unterschiedlichsten Funktionen, welche im nächsten Kapitel genauer erläutert werden (Navarre & Schneewind, 1999; Silhavy *et al.*, 2010).

Die bakterielle Außenhülle dient dem Bakterium allgemein als Schutz gegen Toxine aus der Umgebung und sonstigen Umweltfaktoren. Auch die Aufnahme von Nährstoffen von außen und die Abgabe von Abfallprodukten aus dem Inneren wird über die Außenhülle geregelt (Silhavy *et al.*, 2010). Die Zellwand unterscheidet sich bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien im Aufbau (Abbildung 2). Bei Gram-positiven fehlt die Außenmembran, dafür ist die Zell-

1.4.1. Gram-positive Bakterien

Gram-positive Bakterien zählen zu den Zellen, welche einen einfachen Aufbau der Zellwand ohne Transmembranproteine besitzen. Meist sind es sporenbildende Zellen, wie *B. subtilis*, die ihre Tochterzellen durch eine asymmetrische Zellteilung produzieren (Losick & Stragier, 1992). Diese Bakterien bestehen meist aus Cytosol, welches durch die Cytoplasmamembran geschützt wird und aus einer darauffolgenden Schicht mit Peptidoglycanmolekülen, Teichonsäure und Phosphaten, welche die Zellwand bildet (Hancock, 1997). Im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien fehlt Gram-positiven Bakterien eine zweite Membranschicht, die Außenmembran. Die Außenmembran sorgt indirekt für die Stabilität der Innenmembran von Gram-negativen Bakterien, weswegen die Peptidoglycanschicht relativ dünn gebaut wird. Gram-positive Bakterien leben oft in Bereichen mit extremen und wechselnden Umgebungsbedingungen, wie z. B. die anaeroben Sauerstoffbedingungen im Darm. Deshalb ist die Peptidoglycanschicht Gram-positiver Bakterien im Aufbau um ein Vielfaches dicker, sodass ein ausreichender Schutz vor Toxinen aus der Umgebung besteht oder Umweltfaktoren wie Änderungen im osmotischen Druck überlebt werden können. Dadurch kommt es nicht zur Zelllyse (Silhavy *et al*, 2010). Durch diese Peptidoglycanschicht ziehen sich längere anionische Polymere, sogenannte Teichonsäuren, welche aus Glycerol-Phosphat-Polymeren und Ribitol-Phosphat-Polymeren zusammengesetzt sind und ca. 60 % der Zellwand ausmachen (Neuhaus & Baddiley, 2003). Die Zusammensetzung dieser Proteine kann von einigen Bakterien, je nach Umgebungsbedingung, angepasst werden, was wiederum dafür spricht, dass die Zellhülle für die Adaption an die Umgebung essentiell ist (Pollack & Neuhaus, 1994; Silhavy *et al*, 2010). Auf der Oberfläche der Außenmembran sitzen viele verschiedene Proteine, welche analog zu Proteinen aus dem Periplasma in Gram-negativen Bakterien sind (Dramsi *et al*, 2008). Es handelt sich dabei um modifizierte Lipidproteine. Diese dienen für andere Moleküle, wie z. B. für Kohlenhydrate, als Transportmoleküle und transportieren diese zu weiteren Proteinen innerhalb des Cytosols (Gilson *et al*, 1988; Navarre & Schneewind, 1999). Es konnten verschiedene Proteine in Gram-positiven Bakterien, analog zu den periplasmatischen Proteinen aus Gram-negativen Bakterien, identifiziert werden. Während die β -Lactamase, ein lösliches Enzym bei Gram-negativen, im Periplasma zu finden ist und die Resistenz gegenüber β -Lactamase-Antibiotika auf Gram-negative Bakterien überträgt, findet man das analoge Enzym ebenfalls bei *S. aureus* als ein Lipoprotein (Navarre & Schneewind, 1999; Tommasi *et al*, 2015). Nicht nur die Abwesenheit des Periplasmas unterscheidet die Gram-positiven Bakterien von den Gram-negativen, auch der komplette Aufbau der Außenmembran der Gram-negativen Bakterien ist anders zusammengesetzt, welcher im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird.

1.4.2. Gram-negative Bakterien

Gram-negative Bakterien haben im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien eine zusätzliche Außenzellwand. Wie auch Gram-positive Bakterien besitzen sie ein Cytosol, welches von einer Cytoplasmamembran umgeben ist (Liu *et al*, 2004). Diese ist von einer Peptidoglycancellwand umschlossen, welche wiederum von einer Außenmembran umgeben ist. Letztere kommt bei Gram-positiven Bakterien nicht vor (siehe Abbildung 2 und 1.4.1). Die Außenmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit verschiedenen Lipidpolysacchariden (LPS). Für Bakterien ist dieses LPS ein wichtiges Molekül auf der Oberfläche, welches im humanen Organismus oft für einen endotoxischen Schock verantwortlich ist und zudem mit einer Blutsepsis durch Gram-negative Bakterien assoziiert ist (Van Amersfoort *et al*, 2003). Das humane angeborene Immunsystem ist jedoch gerade auf die LPS Moleküle sensibilisiert, sodass diese ein wichtiges Signal für das Abwehrsystem darstellen (Raetz & Whitfield, 2002). Diese Außenmembranproteine können in zwei Klassen unterteilt werden: Zum einen findet man β -Barrel-Proteine, welche vor allem für die Diffusion von kleinen Molekülen wie Mono- Disacchariden und Aminosäuren durch die Außenmembran zuständig sind und Lipoproteine. Von diesen Lipoproteinen sind in *E. coli* ca. 100 verschiedene Proteine entdeckt worden, jedoch ist die Funktion der einzelnen Lipoproteine noch unbekannt (Miyadai *et al*, 2004; Silhavy *et al*, 2010). Im Gegensatz zu Gram-positiven Zellwandbestandteilen kommen jedoch in Gram-negativen Bakterien nur vereinzelt Phospholipide vor (Kamio & Nikaido, 1976; Silhavy *et al*, 2010). Die Außenmembran in Gram-negativen Bakterien wird durch den sogenannten periplasmatischen Raum komplett von der Innenmembran und dem Cytosol abgetrennt. Das Periplasma ist mit mehr Proteinen durchzogen, dadurch ist der periplasmatische Raum deutlich viskoser als das Cytoplasma, was auch ein typisches Merkmal für Gram-negative Bakterien wie z. B. *E. coli* ist (Mullineaux *et al*, 2006).

Einige Transportproteine Gram-negativer Bakterien, aber auch cytosolische Proteine sind in dem schematischen Modell (Abbildung 3) dargestellt. Diese wurden auf ihre Notwendigkeit hin bei der antimikrobiellen Aktivität von hBD1 näher untersucht. Im folgenden Abschnitt wird näher auf spezielle Redoxproteine aus dieser Grafik eingegangen und deren Funktion genauer erläutert.

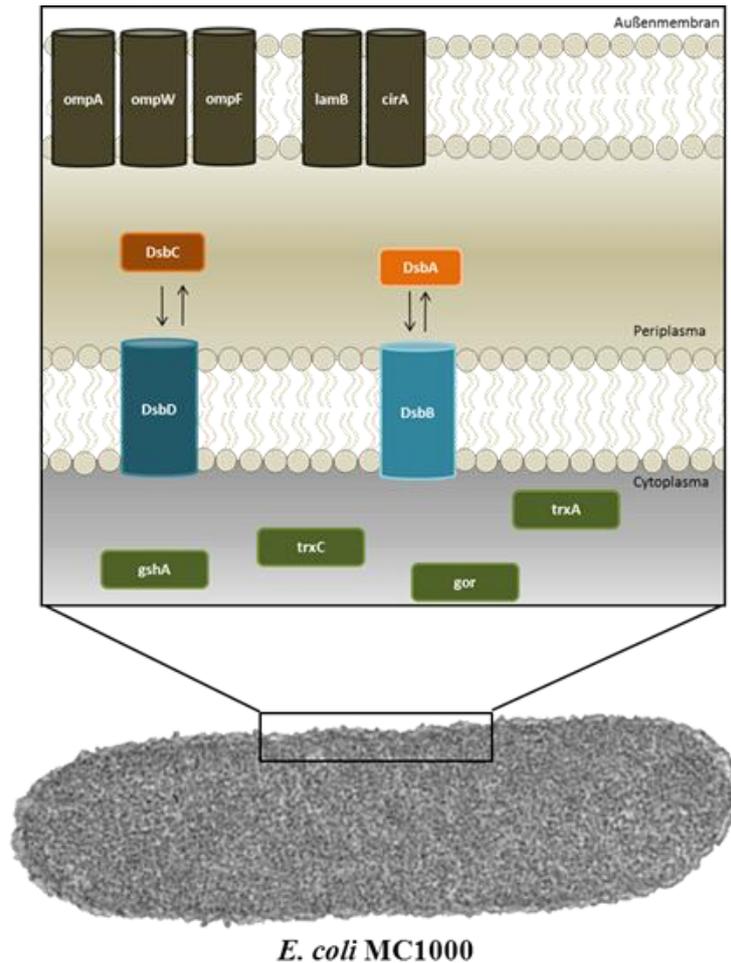


Abbildung 3: Essentielle Proteine in verschiedenen Membranschichten von Gram-negativen Bakterien

1.4.2.1. Proteinfaltung in Gram-negativen Bakterien

Die richtige Ausbildung von Disulfidbrücken durch die Aminosäure Cystein ist wichtig, um eine korrekte Proteinfaltung zu ermöglichen. Dies garantiert eine fehlerfreie Funktion und Stabilität der Proteine. Das Protein bildet dadurch eine Tertiärstruktur aus, welche vor Denaturierung oder Abbau durch Proteasen schützt. Da gerade im Periplasma von Gram-negativen Bakterien eine Protease-reiche-Umgebung vorliegt, müssen Proteine schnellstmöglich durch den Einbau von Disulfidbrücken richtig gefaltet werden, um einen Abbau durch Proteasen zu verhindern (Bardwell *et al*, 1991). Dennoch können sich Disulfidbrücken auch spontan durch Sauerstoffanwesenheit innerhalb bakterieller Kompartimente falten. Jedoch ist diese Oxidation alleine durch Sauerstoff extrem langsam und kann eine Dauer von mehreren Stunden bis Tagen aufweisen. Dagegen ist der Einbau von Disulfidbrücken über spezielle Oxidoreduktasen innerhalb eines Bakteriums ein schnellerer Prozess. Innerhalb weniger Sekunden bis Minuten können diese in native Proteine eingebaut werden. Die Disulfidbrücken entstehen mittels einer chemischen Oxi-

dation, bei dieser zwischen zwei Thiolgruppen eine kovalente Bindung (Schwefelbrücken/ Disulfidbrücken) ausgebildet wird und dabei Wasserstoffmoleküle und Elektronen frei werden (Abbildung 4).

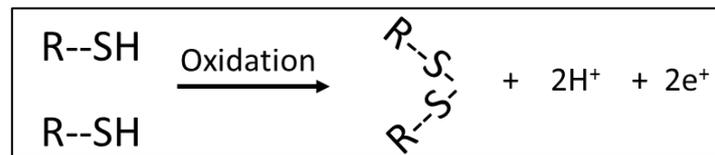


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ausbildung einer Disulfidbrücken durch Oxidation

In eukaryotischen Zellen übernimmt diese Aufgabe die Protein-Disulfidisomerase im endoplasmatischen Retikulum. In Prokaryoten findet man als Analogon zu den eukaryotischen Protein-disulfidisomerasen das Dsb-System (*Disulfide bond formation system*) mit seinen Oxidoreduktasen, welches bei Gram-negativen Bakterien in der Innenmembran und frei im Periplasma vorkommt (Messens & Collet, 2006).

Das Dsb-System kontrolliert die Disulfid-Ausbildung und Isomerisierung einzelner Proteine. Dennoch findet man häufig Proteine im bakteriellen Cytosol, welche reduziert und somit ohne Disulfidbrücken vorliegen. *E. coli* besitzt zusätzlich Thioredoxin/ Thioredoxin-Reduktasen und Glutaredoxin/ Glutarredoxin-Reduktasen, welche eine Reduktion von Proteinen im Cytosol ermöglicht (Carmel-Harel & Storz, 2000). Proteine im Periplasma sind aufgrund der hohen Menge an Proteasen meist im oxidierten Zustand vorzufinden (Messens & Collet, 2006; Heras *et al*, 2009). Die Oxidation wird von speziellen Proteinen in Gram-negativen Bakterien durch das Redoxsystem ausgeführt. Das Redoxsystem ist im bakteriellen Periplasma lokalisiert, welches in falsch- oder un-/gefalteten Proteinen Disulfidbrücken einbauen kann. Die Oxidation erfolgt in Gram-negativen Bakterien, wie z. B. in *E. coli* mittels den Oxidoreduktasen DsbA und DsbB (Messens & Collet, 2006).

Gram-positive Bakterien besitzen in deren Zellhülle oder im Cytosol alternative Systeme für den Einbau von Disulfidbrücken (Heras *et al*, 2009; Reardon-Robinson & Ton-That, 2016). Die Oxidation von Disulfidbrücken in Gram-positiven Bakterien ist, im Gegensatz zu der Oxidation in Gram-negativen Bakterien, noch nicht vollständig aufgeklärt und noch vieles nicht verstanden (Reardon-Robinson & Ton-That, 2016). Trotzdem wurde in verschiedenen Gram-positiven Bakterien Proteine mit mehreren Cysteinresten entdeckt, bei diesen aber die Disulfidbrücken nicht ausgebildet waren. Zusätzlich wurden in einigen *Firmicutes*, wie z. B. in *Bacillus subtilis*, Dsb-ähnliche Proteine identifiziert. Unter anderem besitzt *Bacillus subtilis* zwei Oxidoreduktasen, BdbA und BdbB, welche als Analoga zu der Oxidoreduktase DsbA aus *E. coli* identifiziert wurden und ebenfalls Disulfidbrücken in ungefalteten Proteinen einbauen können (Ishihara *et al*, 1995; Meima *et al*, 2002; Dorenbos *et al*, 2002). Auch in *S. aureus* konnten analoge Proteine zu DsbA gefunden werden. Hier wurde ein membrangebundenes Lipoprotein (SaDsbA) iden-

tifiziert, welches eine ähnliche Aktivität zu der Gram-negativen Oxidoreduktase DsbA aufweist (Dumoulin *et al*, 2005; Davey *et al*, 2013; Heras *et al*, 2008). Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien konnte die Oxidation der Thiolgruppen in Gram-negativen Bakterien schon beschrieben werden (Reardon-Robinson & Ton-That, 2016). Die Oxidoreduktasen DsbA und DsbB wurden vor allem in *E. coli* sehr detailliert beschrieben und deren Funktion genauer charakterisiert. Dabei existieren zwei unterschiedliche Reaktionswege in Gram-negativen Bakterien: der oxidative Reaktionsweg mit DsbA und DsbB und der Isomerisierungs-Weg (DsbC, DsbG, DsbD).

1.4.2.2. Oxidativer Reaktionsweg mit Oxidoreduktasen DsbA und DsbB

Wie oben erwähnt beinhaltet das Redoxsystem in *E. coli* sehr spezielle Oxidoreduktasen, welche in Gram-positiven Zellen nur im Cytosol als analoge Proteine gefunden wurden (Gilson *et al*, 1988; Reardon-Robinson & Ton-That, 2016). Das Redoxsystem enthält zwei zentrale Oxidoreduktasen, DsbA und DsbB. Diese bakteriellen Redoxproteine sind verantwortlich, dass in ungefalteten Proteinen Disulfidbrücken korrekt eingebaut werden damit diese an ihren Bestimmungsort weiter transportiert werden können. Die Hauptaufgabe hat hier das Periplasmaprotein DsbA mit ca. 21 kDa (Messens & Collet, 2006). Die meisten nativen Proteine aus *E. coli* dienen DsbA als Target und werden durch DsbA als Oxidoreduktase richtig gefaltet. Dabei sind ca. 40 % der Zieltargets Außenmembranproteine. Es gibt jedoch noch keinen Nachweis, dass auch kleine Peptide durch DsbA oxidiert werden (Vertommen *et al*, 2008; Dutton *et al*, 2008). DsbA ist nur in oxidiert Form aktiv. In diesem Redoxzustand ist DsbA jedoch sehr instabil, was dazu führt, dass es schnell mit ungefalteten Proteinen im Periplasma reagiert. Durch die Oxidation der Cysteine im Zieltarget wird DsbA reduziert (Collet & Bardwell, 2002; Messens & Collet, 2006). Für einen weiteren katalytischen Zyklus muss DsbA erst wieder re-oxidiert werden. Für diese Re-Oxidation ist ein weiteres Redoxprotein, DsbB, verantwortlich. Dieses ist ein Innenmembranprotein mit 21 kDa und fungiert als Elektronenakzeptor für DsbA (Jander *et al*, 1994; Messens & Collet, 2006). Im letzten Schritt der Re-Oxidation werden die Elektronen von DsbB zu einem Ubiquinon als Elektronenakzeptor transportiert und schließlich auf eine terminale Oxidase, wie z. B. Cytochrom-Oxidase, übertragen. Final werden dann die Elektronen auf Sauerstoffmoleküle übertragen. Der exakte Mechanismus sowie die Struktur von DsbB sind aber bisher noch nicht vollständig erforscht (Sevier *et al*, 2005). Bekannt ist hingegen, dass unter anaeroben Bedingungen die Elektronen von DsbA durch DsbB auf ein Menaquinon (Vitamin K₂) übertragen werden, welches unter Sauerstoffabwesenheit weniger effizient arbeitet (Collet & Bardwell, 2002).

1.4.2.3. Isomerisierungs- Weg mit DsbC und DsbD

Wie zuvor beschrieben ist DsbA ein sehr reaktives Protein, welches sehr schnell mit ungefalteten Proteinen reagiert. Jedoch ist DsbA sehr spezifisch und kann nur Disulfidbrücken in nicht-gefalteten Proteinen einbauen (Collet & Bardwell, 2002). Um Proteine mit inkorrekten Disulfidbrücken vor einem Abbau zu schützen, besitzt *E. coli* das Isomerisierungssystem mit der Disulfidisomerase DsbC und einem weiteren Membranprotein DsbD. DsbC besteht aus zwei Untereinheiten mit jeweils 23,3 kDA und vier Cysteinresten. Im Gegenteil zu DsbA, welches überwiegend oxidiert im Periplasma vorzufinden ist, liegt DsbC in einer reduzierten Form vor (Arredondo *et al*, 2009). Trotz der Isomeraseaktivität von DsbC zeigt es vergleichbare Aktivitäten eines Chaperons.

Es ist bekannt, dass Proteine wie Lysozym oder Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase im denaturierten Zustand über DsbC wieder zurück gefaltet werden können (Chen *et al*, 1999). Um DsbC in oxidierenden Umgebungsbedingungen, wie im Periplasma, reduziert zu halten wird ein weiteres Innenmembranprotein DsbD benötigt. DsbD überträgt dabei die Elektronen aus dem Cytosol von der Thioredoxinreduktase Thioredoxin 1 und von NADPH auf die Disulfidisomerase DsbC (Arredondo *et al*, 2009). Jedoch ist es ebenfalls noch völlig unklar, wie DsbD die Elektronen über die Membran auf DsbC transferieren kann (Messens & Collet, 2006).

In Gram-negativen Bakterien ist das Redoxsystem, bestehend aus dem oxidativen Reaktionsweg und dem Isomerisierungs Weg, einer der wichtigsten Bestandteile, um durch den Einbau von Disulfidbrücken die Stabilität, Aktivität und die Protease-Resistenz der Proteinen zu gewährleisten (Heras *et al*, 2009).

1.5. Antibiotika Resistenzen

Der Kampf gegen multiresistente Mikroben ist heutzutage eine der größten Herausforderungen der Medizin. Aufgrund des Missbrauchs von Antibiotika im Menschen und der Verwendung dieser antimikrobiellen Substanzen in der immer größer werdenden industriellen Viehzucht und Landwirtschaft, wird die Bildung von Resistenzen begünstigt und antimikrobielle Medikamente werden zunehmend ineffektiv (Kunin, 1993; Blair *et al*, 2015; WHO | Antimicrobial resistance). Studien zufolge erleiden zwei Millionen Menschen jedes Jahr in den USA eine Infektion mit resistenten Bakterien und ca. 23 000 Menschen sterben als direkte Folge von bakteriellen Infektionen mit Antibiotika-resistenten Keimen (Davies & Davies, 2010; Blair *et al*, 2015).

Viele der sogenannten pathogenen Bakterien werden mit Krankheiten in Verbindung gebracht und haben sich im Laufe der Jahre zu multiresistenten Keimen entwickelt. Eines der ältesten pathogenen Keime ist das *Mycobacterium tuberculosis*, welches für die gleichnamige Krankheit Tuberkulose verantwortlich ist (Davies & Davies, 2010). Nach einer Studie, welche

von der Weltgesundheitsorganisation (WHO), *Global tuberculosis Report*, veröffentlicht wurde, starben im Jahr 2014 ca. 1,5 Millionen Menschen auf der Welt an Tuberkulose durch das multi-resistente Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* (Zumla *et al*, 2015). Weitere multiresistente Keime wie u. a. *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* oder auch *Staphylococcus aureus*, kommen ebenfalls häufig vor. Die meist verbreiteten Gram-negativen Keime sind jedoch *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, und *Klebsiella pneumoniae*, welche heutzutage oft mit diesen Antibiotika-behandelten Krankheiten assoziiert werden (Davies & Davies, 2010).

Diese Bakterien haben sich eine Abwehrstrategie gegen die oft eingesetzten Penicillin-Abkömmlinge, β -Lactam-Antibiotika, angeeignet. Sie sind in der Lage diese β -Lactam-Antibiotika durch das Enzym β -Lactamase zu hydrolisieren und zu inaktivieren (Davies & Davies, 2010). Es zeigt sich oft ein starker Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Antibiotika bei Behandlungen und der Entstehung von Antibiotikaresistenzen. Gerade auch bei Patienten mit Cystischer Fibrose ist oftmals eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ein zusätzliches Problem. Cystische Fibrose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit mit einer Fehlfunktion von Chloridkanälen, wodurch die Zusammensetzung aller Sekrete verändert ist. Die Sekrete werden durch diese falsche Zusammensetzung zähflüssiger, sodass diese ein ideales Milieu für Bakterien darstellen und es leicht zu bakteriellen Infektionen kommt (de Koff *et al*, 2016). Der stark pathogene Keim, *Pseudomonas aeruginosa*, kann sich zusätzlich zu seiner hohen Antibiotikaresistenz stark persistierend in diesem Sekret verhalten und die humane Abwehrreaktion somit umgehen (Horrevorts *et al*, 1990). Einen Zusammenhang zu der Resistenzbildung von Seiten der Bakterien sieht man hier in der Anwendung von Langzeitantibiotika in der Behandlung bei diesen Patienten mit Cystischer Fibrose und der *Pseudomonas aeruginosa* Infektion (de Koff *et al*, 2016).

Der Gebrauch von Antibiotika führt immer zu einer leichten Resistenzentwicklung in Bakterien. Erythromycin wurde in den 50iger Jahren gegen *S. aureus* als Alternative zu Penicillin verwendet. Jedoch waren innerhalb eines Jahres mehr als 70 % der *S. aureus* Isolate gegen Erythromycin resistent. Das selbe Phänomen sah man mit Chlortetrazyklin, Chloramphenicol und vielen anderen Antibiotika (Finland, 1979). Internationale Gesundheitsgruppen wie die WHO, zeigen mögliche Ansätze auf, um das Resistenzproblem mit Bakterien zu verbessern oder zu verringern. Zum einen muss der Gebrauch von Antibiotika genauer und vor allem einen spezifischeren Einsatz durch Ärzte verordnet werden. Es sollte keine Verschreibung von Antibiotika bei viralen Infektionen oder viraler Grippe erfolgen. Dies setzt jedoch eine genauere Abklärung des Krankheitsbildes voraus, sowie der Kauf von Antibiotika nur durch ein ärztlich-ausgestelltes Rezept (Davies & Davies, 2010).

Die letzte Entdeckung einer neuen Antibiotikaklasse war im Jahre 1980 (Silver, 2011). Es ist dringend nötig neue Strategien für die Bekämpfung von Bakterien zu finden. Für mögliche neue Ansätze im Kampf gegen bakterielle Infektionen könnten die natürlichen Abwehrstrategien im

humanen Organismus dienen. Erst kürzlich entdeckte eine Arbeitsgruppe einen erstmaligen Vertreter der neuen Klasse von Peptid-Antibiotika. Das Peptid Lugdunin wurde erstmals in der menschlichen Nase gefunden. Produziert wird es von *Staphylococcus lugdunensis*, der bei wenigen Menschen auf natürliche Weise vorkommt. Bisherige Daten zeigen eine starke antimikrobielle Aktivität gegen den doch sehr aggressiven multiresistenten *Staphylococcus aureus* USA300 (Zipperer *et al.*, 2016). Trotz des hohen Evolutionsdruckes der antimikrobiellen Peptide, sind kaum Resistenzen gegen diese bisher bekannten Moleküle bekannt (Peschel & Sahl, 2006). Allerdings ist es hierfür wichtig den Wirkmechanismus verschiedener antimikrobieller Moleküle aus dem angeborenen Immunsystem zu verstehen.

1.6. Ziel der Arbeit

Die Aufklärung der antimikrobiellen Mechanismen körpereigener bakterizider Moleküle ist essentiell, um neue Antibiotikastrategien zu entwickeln. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Defensinen, welche eine prominente Gruppe humaner antimikrobieller Peptide darstellen.

Ähnlich zum reduzierten hBD1, zeigt auch das HD6 aus der Panethzelle eine starke antimikrobielle Aktivität nach der Reduktion der Disulfidbrücken (Schroeder *et al.*, 2014). Auch Psoriasisin, ein S100 Protein welches sehr häufig in der Haut auftritt, wird erst durch seine Reduktion stärker antimikrobiell aktiv und weist danach ein breiteres Wirkspektrum auf (Hein *et al.*, 2015). Die meisten veröffentlichten Studien haben jedoch den Mechanismus eines antimikrobiellen Peptids untersucht, ohne die *in vivo* Umgebungsbedingungen zu berücksichtigen. Die antimikrobielle Aktivität kann je nach Umgebungsfaktoren oder Veränderungen, wie z. B. pH Wert und Sauerstoffanwesenheit beeinflusst werden. HBD1 zeigt unterschiedliche Wirkspektren, abhängig von dessen Redoxstatus. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen im humanen Organismus fokussiert sich diese Arbeit auf den Mechanismus der verschiedenen Redoxformen von hBD1. Vorangegangene Daten aus der Arbeitsgruppe zeigen, dass es keinen Unterschied in der Aktivität von hBD1red und hBD1ox auf Gram-negative *E. coli* gibt (Schroeder, Wu, *et al.*, 2011). Während das reduzierte hBD1 gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien antimikrobiell aktiv ist, zeigt das oxidierte hBD1 nur ein geringeres Wirkspektrum. Deshalb soll im Rahmen dieser Dissertation der Mechanismus beider Redoxformen sowie das exakte molekulare Zieltarget aufgeklärt und die Unterschiede herausgearbeitet werden, um mehr Informationen über die Wirt-Mikroorganismus Interaktion zu erhalten. Des Weiteren sollen mögliche Abwehrmechanismen von Seiten der Bakterien gegenüber hBD1 untersucht und beteiligte Proteine identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1. Material

Alle Geräte, Verbrauchsmaterialien oder Chemikalien, welche nicht in den Tabellen aufgeführt wurden, gehören zur Standardausstattung von Laboren.

2.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments, Deutschland
Anaerobar	Oxoid Limited, UK
BioTek® Plate reader Synergy HT	Biotek, USA
Jenway 7300 Spectrophotometer	Jenway, USA
Imaging System Chemi-Doc MP	BioRad, USA
Intas Science Imaging	Intas Science Imaging, Deutschland
FACSCalibur™	BD Biosciences, Deutschland
Luciferase Gerät	Tecan Group, USA
6540 UHD Accurate-Mass QTOF LC/MS System	Agilent Technologies, USA
HPLC-System: 1200 Series	Agilent Technologies, USA

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Columbia Agar Platten mit 5 % Schafblut	Becton Dickinson, USA
Küvetten	Sarstedt, Deutschland
96 well Plate, pp, F-Boden	Greiner, Österreich
96 well Plate, pp, F-Boden, weiß	Greiner, Österreich
Anaero Gen, Oxoid Beutel	Thermo Scientific, USA
Membranfilter, PET Membran, 3 µm Porengröße	Corning, USA
Filterpapier	Whatman, UK
Transfermembran	VWR, USA

2.1.3. Chemikalien, Antikörper und Kits

2.1.3.1. Chemikalien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
Agarose low EEO	AppliChem, Deutschland
Bacto Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto™ Tryptic Soy Broth	Becton Dickinson, USA
BBL Schaedler Broth	Becton Dickinson, USA
DiBAC ₄ (3)	Invitrogen, USA
Difco™ Lactobacilli MRS Broth	Becton Dickinson, USA
Difco™ Luria Bertani Broth	Becton Dickinson, USA
Difco™ Reinforced Clostridial Medium	Becton Dickinson, USA
D-Luciferin	Iris Biotech, Deutschland
L- Arabinose	Carl Roth, Österreich
IPTG	Carl Roth, Österreich
BSA	Sigma-Aldrich, UK
Bacterial Protease Arrest™	Bioscience, USA
0,5 M EDTA	Bioscience, USA
NADPH	Bimol, Deutschland
Thioredoxin Reduktase	IMCO, Schweden
humanes Thioredoxin	Sigma Aldrich, UK
Decylubiquinone (Q8)	Sigma Aldrich, UK

2.1.3.2. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-hBD1ox	cell concepts, Deutschland
Anti-hBD1red	Uniklinikum Schleswig Holstein, Deutschland, bereitgestellt von Jens Schröder (Schroeder <i>et al</i> , 2011b)
Anti-dsbA	De Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brüssel, Belgien
Ziege anti Kaninchen	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Deutschland

2.1.4. Medien und Puffer

2.1.4.1. Zellanzucht

<u>TSB Medium (1x)</u>	
Bacto™ Tryptic Soy Broth	30 g
H ₂ O	ad 1 L

<u>TSB Medium (2x)</u>	
Bacto™ Tryptic Soy Broth	60 g
H ₂ O	ad 1 L

<u>LB Medium</u>	
Difco™ Luria Bertani Broth	25 g
H ₂ O	250 ml

2.1.4.2. Sonstiges

<u>Tris/Tricine Laufpuffer (10x) pH 8,3</u>	
Tris	1M
Tricin	1M
SDS	1%
H ₂ O	ad 1 L

<u>Elektrophoresepuffer (5x)</u>	
Tris	15 g
Glycin	72 g
10 % SDS	50 ml
H ₂ O	ad 1 L

<u>PBS (10x)</u>	
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	17,7 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O	ad 1 L

<u>Tricin-Probenpuffer</u>	
Tris-HCl	200 mM
SDS	2 %
Glycerol	40 %
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,04%
H ₂ O	ad 10 ml

<u>SDS-Puffer (2x)</u>	
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
Glycerol	2 ml
10 % (w/v) SDS	4 ml
0,1 % Bromphenol Blau	0,5 ml
H ₂ O	ad 10 ml

<u>100 mM Na-Phosphatbuffer (pH 7,4)</u>	
NaH ₂ PO ₄	47,5 ml
Na ₂ HPO ₄	202,5 ml
H ₂ O	250 ml

<u>200 mM NaH₂PO₄</u>	
NaH ₂ PO ₄	27,6 g
H ₂ O	ad 1 L

<u>200 mM Na₂HPO₄</u>	
Na ₂ HPO ₄	35,6 g
H ₂ O	ad 1 L

Karnovskylösung

Lösung A

Lösung B

AMA-Puffer

10 mM Na-Phosphatbuffer (pH 7,4)

1 % TSB

Lösung A

0,2 M Na-Cacodylat 30 ml

7,5 % Paraformaldehyd 40 ml

CaCl₂ 50 mgLösung B12 % Glutaraldehyd in H₂OTransferpuffer

Tris 29 g

Glycine 14,6 g

20 % SDS 9,25 ml

Methanol 1 L

H₂O ad 5 LTSE - Puffer

0,1 M Tris (pH 8,0) 60,5 mg

Saccharose 20 %

1 mM EDTA 14,61 mg

H₂O ad 50 mlTBS (10x) (pH 7,4)

NaCl 400 g

KCl 10 g

Tris 150 g

H₂O ad 5 LTBST

10 x TBST 500 ml

50 % Tween 10ml

H₂O ad 5 L1,5 M Tris- HCl (pH 8,8)

Tris 90,85 g

H₂O ad 500 ml0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

Tris 30 g

H₂O ad 500 ml

2.1.5. Peptide

Alle hier aufgeführten Peptide wurden von der Firma EMC microcollections (Tübingen, Deutschland) mit einer Reinheit $\geq 90\%$ synthetisch hergestellt. Peptide in oxidierter Form (ox) wurden über die Firma PeptaNova (Sandhausen, Deutschland) bezogen.

Tabelle 1: Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide

Peptid	Sequenz	Abkürzung
Humanes β-Defensin (hBD)		
hBD1 (Volllängenpeptid)	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK	hBD1ox
hBD1 (Volllängenpeptid)	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK	hBD1red
hBD1 (AS 1-29)	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYR	hBD1red_AS1-29
hBD1 (AS 29-36)	GKAKCCK	Heptapeptid
hBD1 (AS 1-36)	DHYN-abu-VSSGGQ-abu-LYSA-abu-PIFTKIQGT-abu-YRGKAK-abu-abu-K	hBD1red_Abu
hBD3 (Volllängenpeptid)	GIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKKEEQIGKCTRGRKCCRKK	hBD3ox
Humanes α-Defensin (HD)		
HD6 (Volllängenpeptid)	AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRCCL	HD6ox

2.1.6. Verwendete Bakterien

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Serotyp	Charakteristik	Quelle
<i>Acinetobacter baumannii</i> (DSM 30007)		Referenzstamm	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i>	168 trpC2		IMIT
<i>Bacillus subtilis</i>	1S34 pS07		IMIT
<i>Escherichia coli</i> (EPEC) (DSM 8695)			DSMZ
<i>Escherichia coli</i> JM83		Referenzstamm	MMH
<i>Escherichia coli</i> MC1000		Referenzstamm	JFC
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	O6:K5:H1	Referenzstamm	IMIB
<i>Escherichia coli</i> O1:K1:H7 (UPEC) (DSM 10729)		Klinisches Isolat	DSMZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3-MRGN	Klinisches Isolat	RBK
<i>Salmonella enteritidis</i>		Klinisches Isolat	RBK
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Klinisches Isolat	RBK
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 30883)			DSMZ

ACS: Ardeypharm Collection of strains, Pharma-Zentrale GmbH, Deutschland
 DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Deutschland
 ATCC: American Type Culture Collection, USA
 MRGN: Multiresistente Gram-negative
 RBK: Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Deutschland
 UCL: De Duve Institute, Université catholique de Louvain (UCL), Brüssel, Belgien
 IMIT: Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Tübingen, Deutschland
 IMIB: Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg, Deutschland
 MMH: Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Bakterien-Knockout Stämme

Stamm	Deletion	Erläuterung der Proteine	Antibiotikaresistenz
<i>Escherichia coli</i>			
MC1000	$\Delta dsbA \Delta dsbB$	---	Kanamycin
	$\Delta dsbA$	Thioldisulfidoxidoreduktase	Kanamycin
	$\Delta dsbB$	Disulfidebondformationprotein	Kanamycin
	$\Delta ompA$	Außenmembranprotein	Kanamycin
	$\Delta lamB$	Maltoporin	Kanamycin
	$\Delta ompW$	Außenmembranprotein	Kanamycin
	$\Delta ompF$	Außenmembranprotein	Kanamycin
	$\Delta cirA$	Außenmembranrezeptor	Kanamycin
	$\Delta dsbC$	Proteindisulfidisomerase	Chloramphenicol
	$\Delta dsbD$	Disulfidoxidoreduktase	Kanamycin
	$\Delta dsbC \Delta dsbG$	---	
	$\Delta trxC$	Thioredoxin C	Kanamycin
	$\Delta gshA$	Glutamatcysteinyligase	Kanamycin
	Δgor	Glutathionreduktase	Kanamycin
	$\Delta trxA$	Thioredoxin A	Kanamycin
$\Delta dsbA \Delta dsbB$ + pBAD33::dsbA + pQE60::dsbB	---	Chloramphenicol Ampicillin Kanamycin	
Nissle 1917	$\Delta flgE$	Flagellar Hook Protein	Chloramphenicol
	\DeltafliA	RNA Polymerase Sigma Factor	Chloramphenicol
	\DeltafliC	Flagellin	Chloramphenicol
JM83	$\Delta htrB$	htrB Acyltransferase	Ampicillin
	$\Delta htrB + htrB(Pg)$	htrB Acyltransferase	Ampicillin

2.1.7. Software

Programm	Hersteller
Gen5 2.00	Biotek, USA
Image Lab 5.1	BioRad, USA
GraphPad Prism Version 6.04	GraphPad Software, Inc., USA
Intas GDS	Intas Science Imaging, Deutschland
Bioconfirm Software	Agilent Technologies, USA
i-control™ – Microplate Reader Software	Tecan Group, Schweiz
BD Cell Quest Software	BD, Deutschland

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

2.2.1.1. Radial Diffusions Assay

Die antimikrobielle Aktivität von verschiedenen Peptiden wurde mittels einer etablierten Methode (Lehrer *et al*, 1991), dem Radial Diffusions Assay (RDA) getestet. Für die Messung wurden Bakterien für 16 h in flüssigem TSB-Medium bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Für die Anzucht von anaeroben Bakterien wurde eine anaeroben Kammer mit *AnaerobGen*-Beutel verwendet. Am Tag 2 wurden die Log-Phase Bakterien zweimal in 10 mM Natriumphosphat Puffer (pH = 7,4) gewaschen und anschließend 4×10^6 CFU/ ml Bakterien für den Assay verwendet. Die Inkubation der Bakterien mit verschiedenen Peptiden erfolgte in einem Gel aus 10 ml Natriumphosphatpuffer (pH = 7,4), welcher 0,3 mg/ ml TSB-Pulver, sowie 1 % w/v von EEO-Agarose (Underlaygel) enthält. In die zuvor ausgestanzten Löcher wurden dann die synthetisierten Peptide (1-4 µg) gegeben und alles für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 10 ml eines nährstoffreichen Gels (Overlaygel) aufgetragen, welches als Zusätze 6 % TSB-Pulver, 1 % EEO-Agarose und 10 mM Natriumphosphatpuffer enthält. Nach weiteren 16 h bei 37 °C konnten dann die Hemmhöfe um die Ausstanzlöcher ausgemessen werden. Anhand der Größe kann die Stärke der antimikrobiellen Aktivität bestimmt werden. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Werte mit +/- SEM.

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika im RDA bei der Verwendung von Knockoutstämmen

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Chloramphenicol	25 mg/ ml	25 µg/ ml
Kanamycin	50 mg/ ml	50 µg/ml

Plasmid-Induktions Experiment mittels RDA

Der Bakterienstamm *E. coli* MC1000 Δ dsbA Δ dsbB pQE60::dsbB + pBAD33::dsbA, bei welchem die Proteine DsbA und DsbB im Genom deletiert, aber auf einem sekundären Plasmid mit einem Promotor enthalten sind, wurde im RDA mit speziellen Zusätzen (Arabinose, IPTG) getestet. Die Bakterien wurden wie gewohnt auf $OD_{600} = 0,01$ überimpft und 2,5 h bei 37 °C, schüttelnd inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde alle 30 min 0,4 % L-Arabinose für das Plasmid pBAD33 und 2 mM IPTG für das Plasmid pQE60 zur Promotoraktivierung hinzugefügt. Anschließend wurde der RDA wie im Standardprotokoll weiter ausgeführt und die Zusätze L-Arabinose und IPTG, sowie Antibiotika (Tabelle 5) zur Selektion in das Overlaygel pipettiert.

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika bei den Rescue-Mutanten

Antibiotika	Plasmid	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Chloramphenicol	(pBAD33)	25 mg/ ml	25 µg/ ml
Ampicillin	(pQE60)	50 mg/ ml	200 µg/ ml

2.2.1.2. Luciferase Reporter Gen Assay

Für diesen Luciferase Assay (Urban *et al*, 2007) wurde ein Reporter Stamm mit einem Hintergrund von *Bacillus subtilis* IS34, welcher einen Promotor mit *ypuA*-Gen enthält (*Bacillus subtilis* 1S34 pS107), verwendet. Der Promotor wird bei aufkommenden Schäden oder Einschränkungen der Zellwandsynthese und der Zellhülle induziert. Zusätzlich wurde das *ypuA*-Gen an ein Firefly Luciferase Reporter gen gekoppelt und ist durch die genannten bakteriellen Zellwandschäden induzierbar. Die Anzucht erfolgte in LB-Vollmedium, unter Antibiotikaselektion (Erythromycin) bis zu einer OD_{600} von 0,9 bei 37 °C. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Kultur mit LB-Medium auf eine $OD_{600} = 0,02$. In eine 96-Well Platte wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der Peptide in einem finalen Volumen von 60 µl LB-Medium pipettiert und 60 µl Bakterien suspension hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden 60 µl Luciferin-Puffer (2 mM Luciferin in 0,1 M Citratpuffer, pH = 5,0) per TECAN-Reader pro Well hinzugefügt und die Lumineszenz 5 min nach Injektion gemessen. Die Daten wurden im Anschluss analysiert. Als interne Kontrolle diente Vancomycin mit einer maximalen Konzentration von 25 µg/ ml.

Tabelle 6: Verwendete Antibiotika im Luciferase Reporter Gene Assay

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Vancomycin	10 mg/ ml	25 µg/ ml
Erythromycin	10 mg/ ml	5 µg/ ml

2.2.1.3. Trübungsassay

Zusätzlich wurde für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität ein weiterer Assay durchgeführt, welcher auf Wachstumshemmung basiert und mittels optischer Dichte die Flüssigkultur bestimmt wird (Wiegand *et al*, 2008). Die zu verwendeten Bakterien wurden über Nacht in 1 x TSB angezogen und am nächsten Tag auf $OD_{600} = 0,01$ überimpft. Die Log-Phase Bakterien wurden dann zweimal mit 10 mM Natriumphosphat Puffer (pH = 7,4) mit 1 % TSB (AMA-Puffer) gewaschen und die OD bestimmt. Für den Trübungsassay wurden 5×10^5 CFU/ ml Bakterien eingesetzt und mit einer Peptidmenge von 0,97 – 125 μmol in einem finalen Volumen von 100 μl AMA-Puffer vermischt. Nach einer Inkubation von 2 h, schüttelnd bei 37 °C wurden 6 % TSB dazugegeben und die OD_{600} gemessen. Das bakterielle Wachstum wurde 18 h, schüttelnd bei 37 °C beobachtet und grafisch dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Werte +/- SEM.

2.2.1.4. Inaktivierung von hBD1 durch bakterielle Proteasen

Für die Fragestellung, ob eine Inaktivierung von bakteriellen Proteasen das Volllängenpeptid hBD1 stabilisiert und somit die Aktivität verstärkt, wurde das Trübungsassay-Protokoll neu etabliert. Hierzu wurde eine Übernachtskultur *E. coli* MC1000 frisch in TSB überimpft und bis zur Log-Phase bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien zweimal mit AMA-Puffer gewaschen und eine Bakterienmenge von 6×10^6 CFU berechnet. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 156,8 μl AMA-Puffer resuspendiert. Es wurden 2 μl der jeweils vorverdünnten Proteinaseinhibitormenge (Tabelle 7) und 2 μl EDTA zugegeben und 10 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Auf den Bakterien – Proteaseinhibitor-Mix wurden nun 50,9 μM hBD1red oder 0,01 % Essigsäure, welche als Positivkontrolle dient, pipettiert. Es folgte wieder ein Inkubationsschritt für 30 min bei 37 °C. Danach wurde in eine 96-Well-Platte jeweils 10 μl Bakterien – Proteaseinhibitor-Mix zu 190 μl 1 x TSB gegeben und über Nacht das Wachstum bei OD_{600} verfolgt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der bakteriellen Proteinase-Inhibitormenge

Bakterien Protease Arrest™	
0,01 x	Die einzelnen Proteinaseinhibitormengen wurden mit H_2O verdünnt und in einem finalen Volumen von 10 μl eingesetzt. Als Positivkontrolle diente H_2O .
0,005 x	
0,0025 x	
0,00125 x	
0,0006125 x	

2.2.1.5. Durchflusszytometrie (FACS)

Um Hinweise auf Zellwandschäden an Bakterien zu untersuchen, wurde ein Assay, welcher auf Durchflusszytometrie basiert, verwendet (Nuding *et al*, 2006). Der zu verwendende Farbstoff DiBAC₄(3) ist ein membranpotentialsensitiver Farbstoff, welcher sich bei einer defekten Bakterienmembran einlagern kann. Somit können Bakterien mit Membranschäden oder mit depolarisierter Membran von lebenden Bakterien unterschieden werden. Hierzu wurden ca. $1,5 \times 10^8$ Bakterien mit AMA-Puffer verdünnt (1:10) und davon 95 µl Bakterienlösung für den Assay verwendet. Die Bakterienlösung wurde mit 10 µl Peptidlösung 1 h bei 37 °C, schüttelnd inkubiert, im Anschluss 2 µl DiBAC₄(3) (Gebrauchslösung: 1:20 mit H₂O) zugegeben und weitere 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 7000 rpm, 5 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in 300 µl 1 x PBS aufgenommen und per Durchflusszytometer (FACSCalibur™) pro Probe 10 000 Events gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

2.2.1.6. Membran Permeabilitäts Assay

Um die Durchlässigkeit von Peptiden in den Membranen zu testen, wurde ein Membran Permeabilitäts Assay in Kooperation mit Adam Strömstedt (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Der Versuch wurde, wie in Strömstedt *et al*, 2016 beschrieben, durchgeführt.

2.2.1.7. Transmigrationsassay

Für den Nachweis von Netzen und deren Funktion wurde ein Transwell Membran Assay etabliert. Hierfür wurden Bakterien in 1 x TSB bei 37 °C, über Nacht angeimpft. Am Tag 2 wurden die Log-Phase Bakterien zweimal in AMA-Puffer gewaschen und eine Bakterienmenge von 1×10^7 CFU berechnet. Die berechnete Bakteriensuspension wurde bei 7000 rpm, 5 min zentrifugiert und in 50 µl AMA-Puffer aufgenommen. Zuvor wurden die Filter mit PET Membran und einer Porengröße von 3 µm mit 62,5 µmol Peptid in einem finalen Volumen von 50 µl AMA-Puffer für 1 h bei 37 °C vorinkubiert, um die Netzbildung zu ermöglichen.

Im Anschluss wurden jeweils 50 µl Bakteriensuspension vorsichtig auf die Peptidlösung in den Filter gegeben und in eine 24-Well Platte mit vorgelegtem 400 µl 1 x TSB Medium für 1 h bei 37 °C, leicht schüttelnd gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde aus dem Filter und 1 x TSB Medium eine definierte Menge entnommen und ausplattiert. Zusätzlich wurde das Bakterienwachstum in dem restlichen 1 x TSB Medium über 12 h bei 37 °C und leichtem Schütteln beobachtet und grafisch dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Werte +/- SEM.

2.3. Protein Methoden

2.3.1. Massenspektrometrische Analysen

2.3.1.1. *In vitro* Oxidation von hBD1

HBD1red oder hBD1ox wurden zu 30 μM DsbA, 150 nM DsbB und 30 mM Coenzym Q8 in 0,1 M Kaliumphosphat (2 mM EDTA, pH 7,0) gegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 0,5 % (v/v) Ameisensäure und 10 % Acetonitril versetzt und mittels 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS analysiert. Zusätzlich wurde zur Chromatographie ein „1200 series HPLC System“ und „AdvanceBio Peptide Map Säule“ (2,1 x 150 mm, 2,7 μm) verwendet. Der Gradient startete mit 2 % Lösung B (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure) für 4 min, anschließend folgte eine Erhöhung auf 45 % Lösung A (H₂O + 0,1 % Ameisensäure) innerhalb 35 min bei 55 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min.

2.3.1.2. *In vitro* Reduktion von hBD1

Für die *in vitro* Reduktion wurden alle Substanzen, welche in Tabelle 8 aufgeführt sind, zusammengegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Thioredoxin-Mix (Tabelle 8) für weitere Versuche auf Bakterien in der Log-Phase gegeben.

Tabelle 8: Zusammensetzung für die *in vitro* Reduktion von hBD1

Zusammensetzung	Menge	Volumen
hBD1ox	50 μM	39,28 μl
NADPH	0,8 mM	16 μl
TRX Reduktase	200 nM	4 μl
Kaliumphosphatpuffer mit 2 mM EDTA, pH 7.0	100 mM	72,72 μl
5 min bei RT stehen lassen		
Humanes Thioredoxin	3 μM	60 μl

2.3.2. Proteinnachweis mittels Westernblot

E. coli MC1000 WT und MC1000 Δ dsbA Δ dsbB pQE60::dsbB + pBAD33::dsbA wurden in 10 ml TSB mit entsprechendem Antibiotika angezogen (Tabelle 3). Eine frische Log-phases Kultur wurde jeweils mit 0,4 % Arabinose und 2 mM IPTG über 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 7000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 ml TE-Puffer mit 15 mg/ ml Lysozym resuspendiert und bei RT 10 min inkubiert, bevor wieder bei 7000 rpm, 5min zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 1 ml 0,01 % Essigsäure resuspendiert und mit dem Überstand im Westernblot verwendet. Alle Westernblots wurden mit 14 %igen Acrylamidgelen (Tabelle 10) durchgeführt. Nach dem Gießen und Aushärten der Gele wurde diese in die Apparatur eingebaut und die Proben mit Probenpuffer versetzt und geladen. Nach dem Befüllen der Taschen wurde mit (1x) Elektrophoresepuffer aufgefüllt und eine Spannung von 150 V für 4 h angelegt. Nach dem Auftrennen der Proteine erfolgte das Semi-dry-Blotting, indem ein Stapel aus 3 Filterpapieren, Nitrocellulosemembran, Gel und 3 weiteren Filterpapieren erstellt wurde. Alle Bestandteile des Sandwiches wurden zuvor in Transferpuffer eingelegt. Der Blottvorgang wurde mit einem Fastblot System und einer Stromstärke von 350 mA für 17 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBST für 1 h geblockt. Nach mehrmaligen waschen mit TBST wurde der Antikörper (Tabelle 9) in 1 % (w/v) BSA in TBST zugegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Es folgte das Abnehmen der Antikörperlösung und mehrmaliges Waschen der Membran in frischem TBST. Anschließend wurde der Sekundärantikörper zugegeben und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h folgte. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran nochmals in TBST gewaschen und „Super Signal[®] West Dura Extend Duration Substrate“ von Thermo Scientific für die Detektion verwendet. Die beiden Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers gemischt und für 5 min auf die Membran gegeben. Für die Aufnahmen der Bilder wurde das „Imaging System Chemi-Doc MP“ von BioRad verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper im Westernblot

Antikörper	Stammkonzentration	Verdünnung
anti - DsbA	unbekannt	1:50
Goat-anti-rabbit Meerrettich IgG Peroxidase-konjugiert	0,8 mg/ ml	1:5000

Tabelle 10: Zusammensetzung der Acrylamidgele für Westernblot

Acrylamidgele		
	14 % Trenngel [3-100 kDa]	Sammelgel
Acrylamid	17,55 ml	2,7 ml
H ₂ O	9,9 ml	12,2 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	9,33 ml	---
0,5 M Tris (pH 6,8)	---	5 ml
10 % SDS	375 µl	200 µl
TEMED	37,5 µl	20 µl
10 % APS	375 µl	200 µl

2.3.3. Elektronenmikroskopische Bildgebung

2.3.3.1. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde das Protokoll von Björn Schröder (Schröder *et al*, 2014) verwendet. Hier wurden ca. 6×10^8 CFU *E. coli* oder 2×10^8 CFU *K. pneumoniae* mit 200 µg/ ml Peptid bei 37 °C für 2 h schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 7000 rpm für 5 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet in Karnovsky's Reagenz fixiert. Anschließend wurden die Bakterien in 1 x PBS gewaschen und ein weiteres Mal mit 1 % OsO₄ in Wasser fixiert. Es folgte die Zugabe von 100 % Ethanol und die Trocknung. Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit Jürgen Berger (Max-Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) und die finale Analyse der Bakterienoberflächen (n=10 Bakterien) von vier unabhängigen Experten.

2.3.3.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Für eine weitere Methode zur Strukturanalysen in Bakterien wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Hierzu wurden 6×10^8 CFU *E. coli* mit 200 µg/ ml Peptid 2 h bei 37 °C, schüttelnd inkubiert. Behandelte Bakterien wurden anschließend mit Karnovsky Lösung fixiert und in 3,5 % Agarose bei 37 °C eingebettet, bei Raumtemperatur ausgehärtet und danach wiederholt in Karnovsky Lösung fixiert. Eine Nachfixierung der Proben erfolgte in 1 % OsO₄ für 1 h. Zusätzliche Waschschrte wurden mit destilliertem Wasser durchgeführt, sowie eine weitere Probenbehandlung mit 1 % Uranylacetat (2 % in dH₂O). Vor der Anfer-

tigung von Semi-Dünnschnitten wurden die Proben noch einer Alkoholreihe (schrittweise von 30-96 %) und Polypropylenoxid, sowie der Einbettung in Glycidether unterzogen. Die Analyse erfolgte an der Hautklinik Tübingen am Zeiss LIBRA 120 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 120 kV.

2.3.3.3. Immunogold-Färbung

Um hBD1 in Bakterien zu lokalisieren wurde eine Immuno-Gold-Färbung etabliert. 6×10^8 CFU *E. coli* wurden mit 200 µg/ml Peptid 2 h bei 37 °C, schüttelnd inkubiert und anschließend in 3 % Paraformaldehyd und 0,01 % Glutaraldehyd fixiert. Es folgte eine Einbettung in 4 % Agarose bei 37 °C und eine weitere Einbettung in Lowicryl K4M (Polysciences, Deutschland). Die Blöcke wurden dann am Ultracromotom (Ultracut, Reichert, Wien, Österreich) in 30 nm Schnitte verarbeitet. Die Schnitte wurden anschließend mit rabbit-anti-hBD1ox (cell concepts, Deutschland) oder rabbit-anti-hBD1red (Schroeder *et al*, 2011b), behandelt.

Zuletzt wurden die Proben mit einem Sekundärantikörper goat-anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Deutschland), welcher mit einem 6 nm großen Goldkorn gekoppelt ist, inkubiert. Es erfolgte wieder eine Analyse der Bilder mit Zeiss LIBRA 120 Transmissions Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 120 kV.

Für die Lokalisierung und Bestimmung der Menge an hBD1 (n= 14 Bakterien) wurden drei unabhängige Experten zur Bestimmung herangezogen. 0 = keine Detektion, 1 = wenig Detektion, 3 starke Detektion.

2.4. Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen zwischen verschiedenen Gruppen wurden entsprechende Tests mittels der GraphPad Prism Software durchgeführt. Für die Evaluierung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen wurde ein nicht parametrischer Test verwendet, dagegen für Daten, welche nicht normal verteilt waren, der „Mann-Whitney-Test“. In den einzelnen Graphen werden die Signifikanzwerte durch Sterne gekennzeichnet: $p > 0.05$ = nicht signifikant (ns); $p \leq 0.05$ =*; $p \leq 0.01$ =**; $p \leq 0.001$ =***; $p < 0.0001$ =****.

3 Ergebnisse

3.1. Analyse der antimikrobiellen Aktivität von hBD1

Erst kürzlich wurde durch Bjoern O Schroeder, Wu, *et al.*, 2011 bekannt, dass hBD1 erst eine starke antimikrobielle Aktivität entwickelt, nachdem die Disulfidbrücken des Peptids reduziert werden. Die resultierende reduzierte Form von hBD1 (hBD1red) zeigt starke antimikrobielle Aktivität gegen eine große Anzahl an Bakterienspezies. In den bisher publizierten Versuchen wurde hBD1 mittels Reduktionsmittels wie z. B. 1,4-Dithiothreitol (DTT) reduziert (Schroeder *et al.*, 2011b). In dieser Arbeit wurde ein synthetisch produziertes hBD1red verwendet, weshalb zunächst die antimikrobielle Aktivität, mittels einem Radial Diffusion Assay (RDA), gegen verschiedene Bakterienstämme noch einmal getestet wurde. Dabei werden die Bakterien in einem nährstoffarmen Gel mit hBD1ox oder hBD1red 3 h inkubiert und dessen antimikrobielle Aktivität nach Zugabe eines nährstoffreichen Gels anhand der Größe der entstandenen Hemmhöfe gemessen und als Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 5).

In Übereinstimmung mit publizierten Daten, zeigte auch hier das synthetisch hergestellte hBD1red gegen alle getesteten Bakterienstämme eine antimikrobielle Aktivität (Abbildung 5) (Schroeder *et al.*, 2011b). Auffällig war, dass die oxidierte Redoxform von hBD1 (hBD1ox) nur gegen *E. coli* und *S. enteritidis*, welche Gram-negativ sind, antimikrobiell aktiv war. Dahingegen wurde keine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Stämme, wie *B. subtilis*, *S. epidermis* und *S. aureus* detektiert. Der RDA enthält immobilisierte Bakterien, daher ist es nicht möglich zwischen bakterizider und bakteriostatischer Wirkung zu unterscheiden. In dem nebenstehenden RDA-Ausschnitt (Abbildung 5) sind die Hemmhöfe, entstanden durch hBD1ox und hBD1red, abgebildet. Ein Probenloch von 2,5 mm für jedes verwendete Peptid entsteht immer durch die Verwendung der Stanze. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Hemmhof durch hBD1red sehr abgegrenzt und klar wirkt. Der durch hBD1ox induzierte Hemmhof erscheint dagegen sehr unregelmäßig und mit vielen einzelnen Kolonien bewachsen. Auch eine doppelte Konzentration von 4 µg ließ den Hemmhof nicht deutlich klarer werden. Stattdessen wirkte der Hemmhof noch diffuser und teils war er mit mehr Kolonien überwachsen.

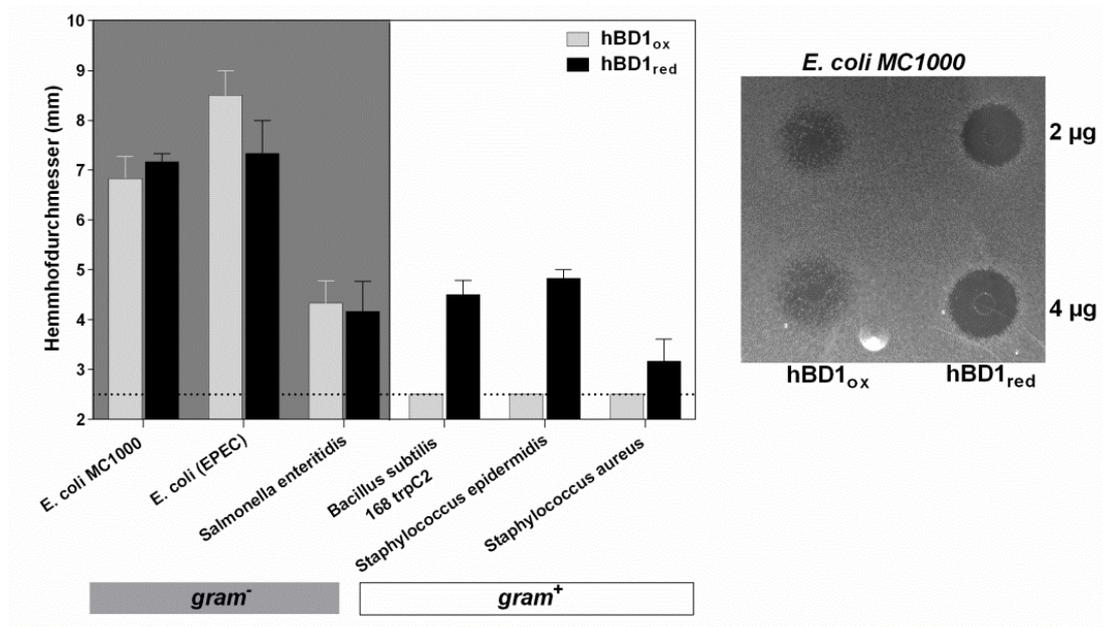


Abbildung 5: HBD1 Redoxformen zeigen unterschiedlich starke Aktivität gegen Bakterien

Bakterien wurden mit 2 µg hBD1ox oder hBD1red inkubiert und die antimikrobielle Aktivität mittels RDA durch Ausmessen der Hemmhöfe bestimmt. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie) und wird nicht als antimikrobielle Aktivität gewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse mit +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Nebenstehend ein repräsentativer Ausschnitt mit *E. coli* MC1000.

Da sich die Aktivität der zwei unterschiedlichen Redoxformen sehr stark unterscheidet wurde vermutet, dass es sich hier um zwei unterschiedliche Wirkmechanismen handelt. Für weitere Abklärung der antimikrobiellen Aktivität von hBD1ox und hBD1red wurde eine sensitivere Methode, ein Trübungsassay, gewählt.

Im Trübungsassay wurde *E. coli* MC1000 entweder mit 62,5 µmol (A) oder mit 125 µmol (B) Peptid inkubiert und das Wachstum nach Zugabe von 6 % TSB über 18 h bei einer optischen Dichte (OD) von 600 nm beobachtet und in Prozent zum Wachstum der Positivkontrolle (unbehandelte Bakterien) dargestellt (Abbildung 6). Über diesen Zeitraum ist es möglich eine antibakterielle Wirkung eines Peptids zu detektieren. Nach Inkubation mit hBD1red war kein bakterielles Wachstum mehr zu erkennen, was auf eine sehr starke bakterizide Wirkung hinweist (Abbildung 6A+B). In Abbildung 6A ist zudem das Wachstum von *E. coli* MC1000 mit einer Inkubation von 62,5 µmol hBD1ox gezeigt, was zu einem Wachstumsversatz von ca. 4 h im Vergleich zur Kontrolle führte. Nach 4,5 h wurde schon 10 % Wachstum detektiert. Ein 80 %iges Wachstum wurde nach mehr als 7 h erreicht. Auch eine Verdopplung der Konzentration auf 125 µmol führt zu keiner stärkeren bakteriziden Wirkung. Die höhere Konzentration zeigte lediglich eine Wachstumsverzögerung von 5,5 h, sowie ein 10 % iges Wachstum nach 6 h und 80 % Wachstum nach ca. 8 h in Relation zur Kontrolle. Zusammenfassend kann eine Verdopplung der Konzentration keinen großen Unterschied in der Wirkungsstärke von hBD1ox bewirken. Möglicherweise ist die antimikrobielle Aktivität schwächer bakterizid oder andere Mechanismen wie eine bakte-

riostatische Eigenschaft von hBD1ox können hier durch diesen Assay nicht ausgeschlossen werden.

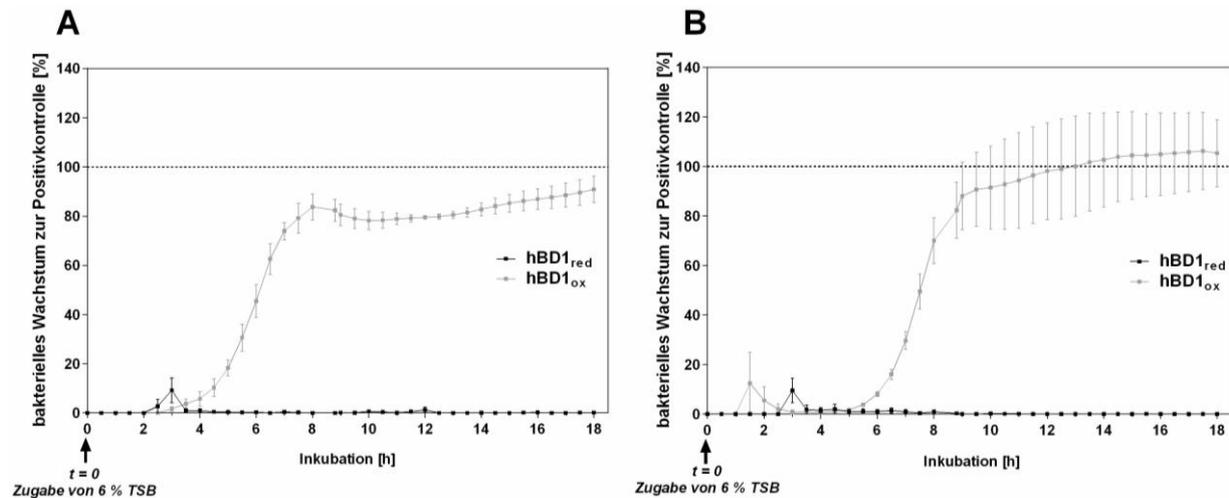


Abbildung 6: Redoxformen zeigen eine unterschiedlich starke Aktivität im sensitiveren Trübungsassay

Das Wachstum von *E. coli* MC1000 mit (A) 62,5 µmol und (B) 125 µmol Peptid wurde in einem Trübungsassay mittels optischer Dichte verfolgt und in % zur Positivkontrolle, nach Zugabe von 6 % TSB dargestellt. Dargestellt sind die Werte in % mit +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.1. Charakterisierung der bakteriellen Targets der hBD1 Redoxformen

Es ist bekannt, dass einige antimikrobielle Peptide die bakterielle Zellhülle als Target verwenden (Zaslhoff, 2002; Brogden, 2005). Häufig werden Membranen durchlöchert oder das Membranpotential verändert was zu einem Zusammenbruch des Potentials und schließlich zum Zelltod führt (Brogden, 2005). Um zu überprüfen, ob hBD1ox und hBD1red ebenfalls auf die Zellmembran einwirken können, wurde ein *Luciferase Reporter Assay* verwendet (Abbildung 7). Hierzu wurde ein *B. subtilis* Reporterstamm verwendet, welcher einen *ypuA*-Promotor mit fusionierterm Luciferasegen enthält. Es ist bekannt, dass dieser *ypuA*-Promotor sensitiv auf Membran-assoziierten und Zellhüllen-assoziierten Stress reagiert (Urban *et al*, 2007). In diesem Assay wurde nach Inkubation mit Peptiden die Luciferaseaktivität gemessen. Für die Anwendung mit Peptiden wurde das Protokoll von Wenzel *et al*, 2014 verwendet und für die Testung humaner Defensine modifiziert (siehe 2.2.1.2). Eine hohe Luciferaseaktivität entspricht somit einer starken *ypuA*-Promotor Aktivität und ist mit hoher Zellhüllenschädigung gleichzusetzen. *B. subtilis ypuA* wurde zunächst in LB-Vollmedium angezogen und mit verschiedenen Konzentrationen von hBD1red (Abbildung 7A) oder hBD1ox (Abbildung 7B) inkubiert. HBD3ox (Abbildung 7C) wurde in diesem Fall als Positivkontrolle in einer niedrigeren Konzentration verwendet, da die antimikrobielle Aktivität deutlich stärker ist als die von hBD1. In Abbildung 7 ist die Höhe der Aktivität von *ypuA* Promotor, normalisiert auf die Eigenlumineszenz der Bakterien, aufgetragen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass hBD1red, im Gegensatz zu hBD1ox, eine starke Erhöhung der Promotoraktivität auslöst (zweifach erhöht bei

80 μmol). Nach der Inkubation mit hBD1ox konnte nur eine sehr minimale bis keine Aktivität festgestellt werden. Als Kontrolle diente unter anderem Vancomycin (Abbildung 7D), welches standardgemäß für den *ypuA*-Promotor als Kontrolle verwendet wird (Urban *et al*, 2007). Für eine Kontrolle auf Defensinebene wurde die Verwendung von hBD3ox etabliert. Die interne Kontrolle Vancomycin zeigte einen fünffachen Anstieg der Promotoraktivität bei einer Konzentration von 16,8 μmol . Bei hBD3ox wurde eine ca. 1,5 – 2,5 fache Erhöhung der Promotoraktivität festgestellt. Vancomycin gehört zu den Antibiotika welche mit einer geringen Konzentration eine starke Aktivität aufweisen. Dennoch darf die Konzentration nicht zu hoch sein, denn bei einem toten Bakterium kann keine Promotoraktivität mehr gemessen werden (siehe hBD3; 1,25 μmol). Die darauffolgenden Konzentration von hBD3 mit 0,6250 μmol und 0,3125 μmol zeigten deutlich erhöhte Standardabweichungen. Je nachdem wieviel Bakterien sofort getötet werden, desto niedriger ist die Promotoraktivität, welche bei Null liegt, sobald die Bakterien getötet werden. Wird die Membran nur leicht zerstört und es kommt nicht zum Abtöten der Bakterien, ist eine Promotoraktivität messbar und es kommt zu diesen doch so unterschiedlichen Messwerten mit hohen Standardabweichungen.

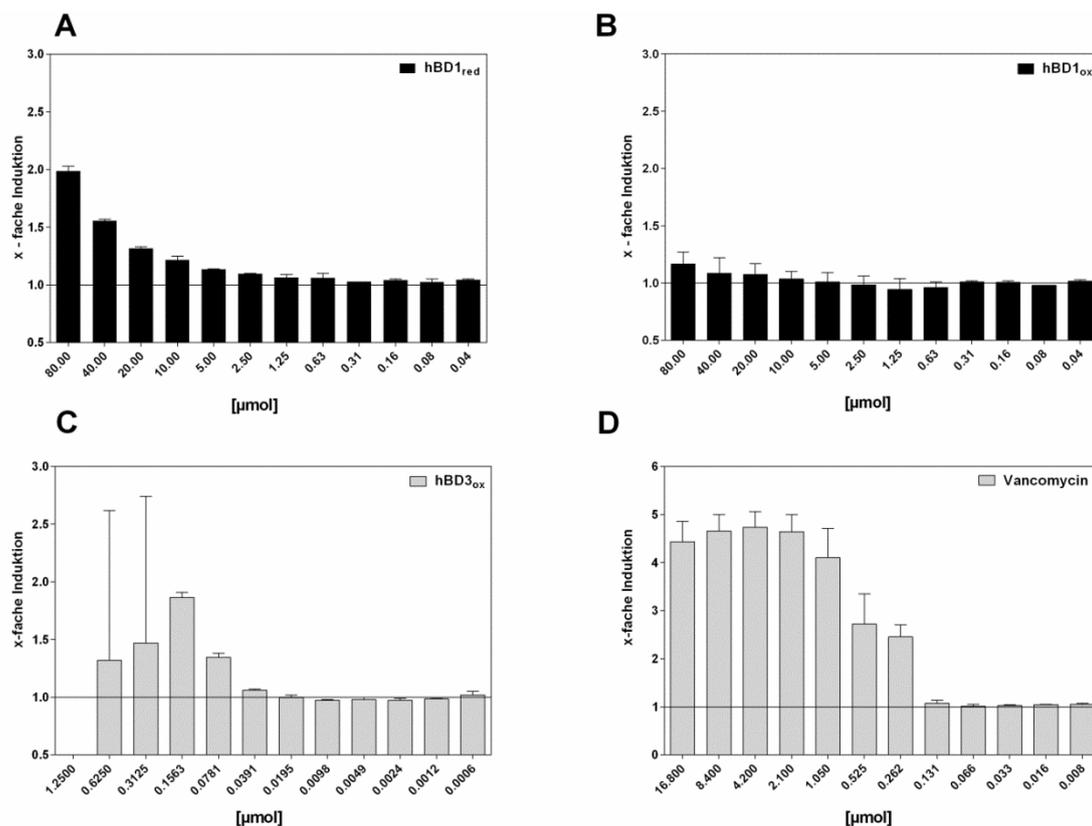


Abbildung 7: *ypuA* Promotoraktivität nach hBD1 Behandlung als Marker für Zellhüllenstress

B. subtilis ypuA wurde mit einer Konzentrationsreihe von 0,04 – 80 μmol hBD1red (A) oder hBD1ox (B) 1 h inkubiert und im Anschluss die Promotoraktivität von *ypuA*, gekoppelt an ein Luciferase Reportergen, gemessen. Als Positivkontrolle diente hier hBD3ox (C) in einer Konzentrationsreihe von 0,0006 - 1,25 μmol und Vancomycin (D) in einer Konzentration von 0,008 – 16,8 μmol . Die Darstellungen enthalten die Mittelwerte mit +/- SEM von zwei unabhängigen durchgeführten Experimenten.

Da hBD1ox im RDA keine Aktivität gegen *B. subtilis* 168 (*trpC2*) gezeigt hat (Abbildung 5) und somit der verwendete Luciferase Reporter Gen Assay mit dem *Bacillus*-Promotorstamm für hBD1ox nur eine limitierte Aussagekraft hat, wurden weitere Methoden mit Gram-negativen Bakterien etabliert und verwendet. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, sind beide Redoxformen im RDA gegen *E. coli* MC1000 antimikrobiell aktiv. Um das Zieltarget von hBD1ox genauer zu lokalisieren, wurde ein *Membran Permeabilitäts Assay* mit künstlich hergestellten Liposomen und einem humanen Liposomenmodell (Popc) mit Cholesterol (Popc:cho) verwendet. Für den Versuch wurden Liposomen hergestellt, welche aus *E. coli* Lipidextrakten gewonnen wurden oder ein Membranmodell, was die humane Cytoplasmamembran imitiert. Die Permeabilisation der hergestellten Membranmodelle wurde durch den Austritt von Carboxyfluorescein nach hBD1red oder hBD1ox Inkubation gemessen.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse des humanen Liposomenmembranmodells (gestrichelte Linie) und der *E. coli* Membran (durchgezogene Linie) dargestellt. Durch hBD1ox konnte nach 45 min bei der höchsten Konzentration von 10 μM nur ein Ausfluss von ca. 8 % aus den bakteriellen Liposomen festgestellt werden. Dagegen konnte kein Austritt aus den humanen Liposomen detektiert werden. Nach hBD1red Zugabe konnte ein Austritt von 8 % Carboxyfluorescein schon bei einer Konzentration von 0,6 μM und ein EC_{50} bei 10 μM in den Liposomen mit bakteriellem Ursprung nach bereits 10 min detektiert werden. EC_{50} steht für die mittlere effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird. Auf das humane Membranmodell Popc/cho verursachte hBD1red eine Durchlässigkeit von nur 6 % bei einer Konzentration von 10 μM nach 45 min Inkubation, was somit eine toxische Reaktion von hBD1red auf humane Membranschichten ausschließen lässt. Gegen das *E. coli* Lipidmembranmodell zeigte sich jedoch nach 45 min Inkubation, bei der höchsten eingesetzten Menge an hBD1red, eine Durchlässigkeit von 50 %. Dieses Ergebnis bestätigt nochmals die Daten des Reporter Gen Assays mit *B. subtilis*. Es wird deutlich, dass hBD1 abhängig vom Redoxstatus unterschiedliche Wirkmechanismen aufweist und die reduzierte Form von hBD1red stark auf die bakterielle Zellmembran wirken kann. Im Gegensatz dazu, zeigt hBD1ox nur sehr geringen Einfluss auf Liposomen und auf die bakterielle Zellmembran.

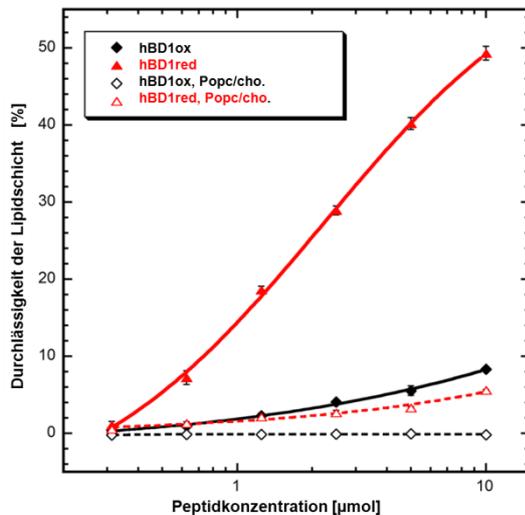


Abbildung 8: Effekt von hBD1 Redoxformen auf die Lipidmembran

Für die Messung der Durchlässigkeit von Lipidschichten wurde ein humanes Membranmodell Popc/cho (molares Verhältnis 3:2) oder ein polares Lipidextrakt aus *E. coli* verwendet und der Austritt von Carboxyfluorescein aus den hergestellten Liposomen nach Inkubation mit hBD1ox oder hBD1red gemessen. Dargestellt ist die Durchlässigkeit in % nach 45 min Inkubation mit einer Standardabweichung (+/- SEM) aus drei Triplikaten. Produziert durch Adam Strömstedt (2.2.1.6).

Um den Wirkmechanismus noch detaillierter zu verstehen, wurde ein dritter Assay etabliert. Dieser Assay detektiert eine Depolarisierung des bakteriellen Membranpotentials durch Durchflusszytometrie (FACS) und es ist somit möglich Effekte von hBD1red und hBD1ox auf die cytoplasmatische Membran zu untersuchen. Im Gegensatz zu dem *Membran Permeabilitäts Assay* wird hier, sowie in den nachfolgenden Experimenten, kein bakterielles Membranmodell verwendet, sondern *E. coli* MC1000. Als Vorlage diente hier das Protokoll aus Nuding *et al*, 2006, welches an die hBD1 Anwendung hier angepasst wurde (siehe Kapitel 2.2.1.5). Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) zu den mit hBD1 inkubierten Bakterien gegeben. Dieser Farbstoff kann dann in depolarisierte Zellen eindringen und an intrazelluläre Proteine oder an die cytosolische Membran binden. Das Fluoreszenzsignal im FACS entspricht somit dem Anteil an depolarisierten Bakterien.

E. coli MC1000 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an hBD1ox und hBD1red für 1 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente in diesem Assay 50 µg/ml hBD3ox, da dieses Peptid nachweislich Membranschäden verursacht (Böhling *et al*, 2006; Sass *et al*, 2010). Bei einer Inkubation mit hBD1red wurde festgestellt, dass 80 % der behandelten Bakterien eine Depolarisierung aufweisen. Nach Zugabe von hBD1ox waren jedoch nur ca. 25 % der Bakterien depolarisiert. Zugabe von 0,01 % Essigsäure diente als Negativkontrolle, wobei hier 7 % der Bakterien eine depolarisierte Membran zeigten (Abbildung 9).

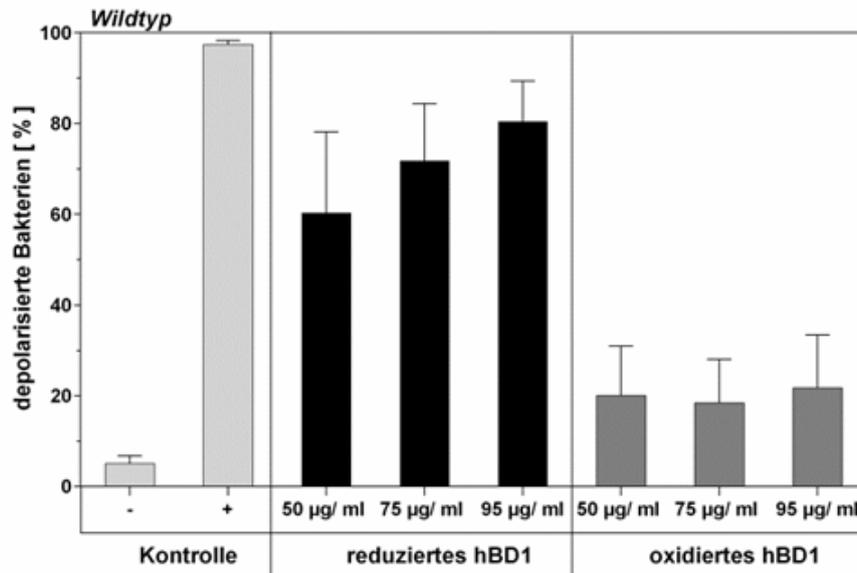


Abbildung 9: hBD1red beeinflusst bakterielles Membranpotential

E. coli MC1000 wurde mit hBD1ox oder hBD1red in unterschiedlichen Konzentrationen 1 h inkubiert und ein membranpotential-sensitiver Farbstoff (DiBAC₄(3)) hinzugegeben und anschließend die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie (FACs) gemessen. Als Kontrollen wurden Bakterien mit 50 µg/ml hBD3ox (+) oder mit 0,01 % Essigsäure (-) inkubiert. Die Anzahl an depolarisierten Bakterien wurde in Prozent mit +/- SEM aus drei unabhängigen Messungen angegeben.

Zusammenfassend zeigten drei unabhängige Methoden mit zum Teil unterschiedlichen Bakterien, dass hBD1red die bakterielle Membran als Target nutzt. Dagegen konnte bei hBD1ox nur eine Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden. Diese antimikrobielle Aktivität ist jedoch nicht mit Schäden an der Zellhülle oder der Membran assoziiert. Somit lässt sich schlussfolgern, dass hBD1 je nach Umgebungsbedingungen verschiedene Strategien für die antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien besitzt.

3.2. Wirkmechanismus von hBD1ox auf Bakterien

In diesem Abschnitt wurde der Wirkmechanismus der oxidierten Form von hBD1 genauer untersucht. Anhand der antimikrobiellen Aktivitätstests, wie in 3.1 (Abbildung 5) beschrieben, wurden schon erste Anhaltspunkte für die Aktivität von hBD1ox beobachtet. Es stellte sich heraus, dass gerade Gram-negative Bakterien sehr sensitiv auf hBD1ox reagieren. Hierzu wurde dieser Effekt nun systematisch untersucht. Die Bakterien wurden entweder aerob oder anaerob (*E. coli* und *S. enteritidis*, Abbildung 10C) angezogen und der RDA unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen durchgeführt. *E. coli* MC1000 und *S. enteritidis* waren als einzige Bakterien auch in der Lage unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, sodass die Aktivität von hBD1ox unter diesen Bedingungen getestet werden konnte.

Es zeigte sich nochmals sehr deutlich, dass das reduzierte Peptid gegen alle getesteten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien antimikrobiell wirksam war (siehe Abbildung 10, vgl. Abbildung 5). Interessanterweise zeigten die getesteten Umgebungsbedingungen keinen Einfluss auf hBD1_{red}.

Dahingegen ist die antimikrobielle Aktivität von hBD1_{ox} sehr spezifisch. Wie oben erwähnt, ist hBD1_{ox} nur gegen Gram-negative Bakterien antimikrobiell aktiv. Zudem zeigt sich, dass *E. coli* MC1000 und *S. enteritidis* unter anaeroben Bedingungen gegen hBD1_{ox} völlig resistent sind (Abbildung 10C). hBD1_{ox} ist somit spezifisch gegen Gram-negative Bakterien und nur unter aeroben Bedingungen aktiv.

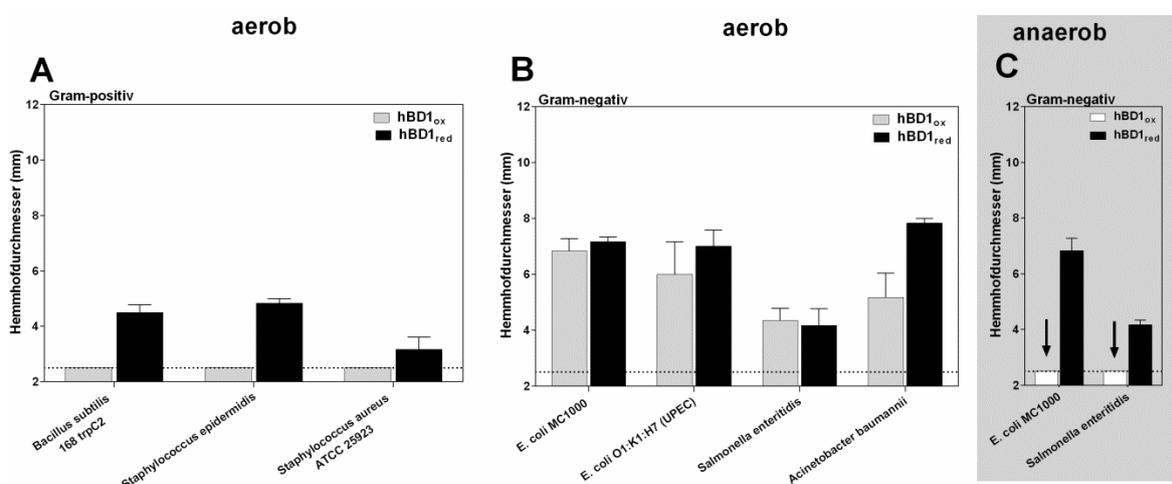


Abbildung 10: Antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive vs. Gram-negative Bakterien

HBD1_{ox} und hBD1_{red} wurden gegen Gram-positive(A) und Gram-negative Bakterien(B) mittels RDA getestet. In (A) und (B) wurden Bakterien unter aeroben Bedingungen getestet und in (C) wurde der RDA mit *E. coli* MC1000 und *S. enteritidis* unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die antimikrobielle Aktivität von 4 µg hBD1_{ox} und hBD1_{red} wurde durch Ausmessen der Hemmhöfe bestimmt. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie) und wird nicht als antimikrobielle Aktivität gewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit +/- SEM.

Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der Zellwand und der Membran. Das Redoxsystem ist eine weitere spezielle Komponente, welche vor allem in Gram-negativen Bakterien vorkommt. *E. coli* besitzt ein spezielles Redoxsystem mit vielen beteiligten Proteinen in der cytosolischen Membran und dem angrenzenden periplasmatischen Raum. Aufgrund der Tatsache das hBD1_{ox} gerade in Gram-negativen Bakterien, im Speziellen in *E. coli*, aktiv ist wurden in folgenden Experimenten *E. coli* Stämme mit Protein-knockouts in verschiedenen bakteriellen Kompartimenten verwendet.

3.2.1. Der Einfluss von bakteriellen Membran-assoziierten Proteinen auf die antimikrobielle Aktivität

Um den Einfluss bestimmter Gram-negativ-spezifischer Proteine auf die antimikrobielle Aktivität von hBD1 zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Prof. Jean-Francois Collet (Brüssel) verschiedene bakterielle Knockoutstämme hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Knockout-Stämme weisen Deletionen in Porinen oder Kanalproteinen in der Außenmembran auf, welche eine mögliche Relevanz für den Eintritt von hBD1ox darstellen könnten. In weiteren Stämmen wurden noch Redoxproteine im Periplasma oder im Cytosol ausgeschaltet, da diese eine mögliche Veränderung des Redoxstatus von hBD1 bewirken könnten. Genauere Angaben zu diesen einzelnen Proteinen befinden sich im Material und Methodenteil (2.1.6).

Für die Untersuchung der Relevanz dieser Proteine (siehe Abbildung 3, schematisches Modell) wurden alle Proteinknockoutstämme mit hBD1ox oder mit hBD1red inkubiert und mittels RDA die antimikrobielle Aktivität der zwei hBD1 Redoxformen bestimmt. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse aufgetrennt nach Lokalisation der Knockouts im Bakterium (A= Außenmembran, B = Cytosol, C= Periplasma) dargestellt. Auffällig war, dass die Aktivität von hBD1red in allen Knockoutstämmen keinen großen Unterschied zum Wildtyp zeigte. Auch durch hBD1ox waren keine starken Veränderungen der Aktivität bei Proteinknockouts in der Außenmembran und im Cytosol zu erkennen. Dennoch zeigte sich eine geringere Aktivität gegen *E. coli* mit Proteinknockouts im Periplasma. Auffällig war das Ergebnis bei *E. coli* ohne DsbA, welches ein Hauptbestandteil des bakteriellen Redoxsystems ist. Bakterien ohne DsbA scheinen fast komplett resistent gegen hBD1ox zu sein. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass Bakterien ohne DsbB deutlich weniger sensitiv auf hBD1ox reagierten, als der *E. coli* Wildtyp. Jedoch war es keine vergleichbare Resistenz wie bei Bakterien ohne DsbA. Um diesen Mechanismus im Detail zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt zusätzlich mit Doppelknockout Stämme gearbeitet (Abbildung 12).

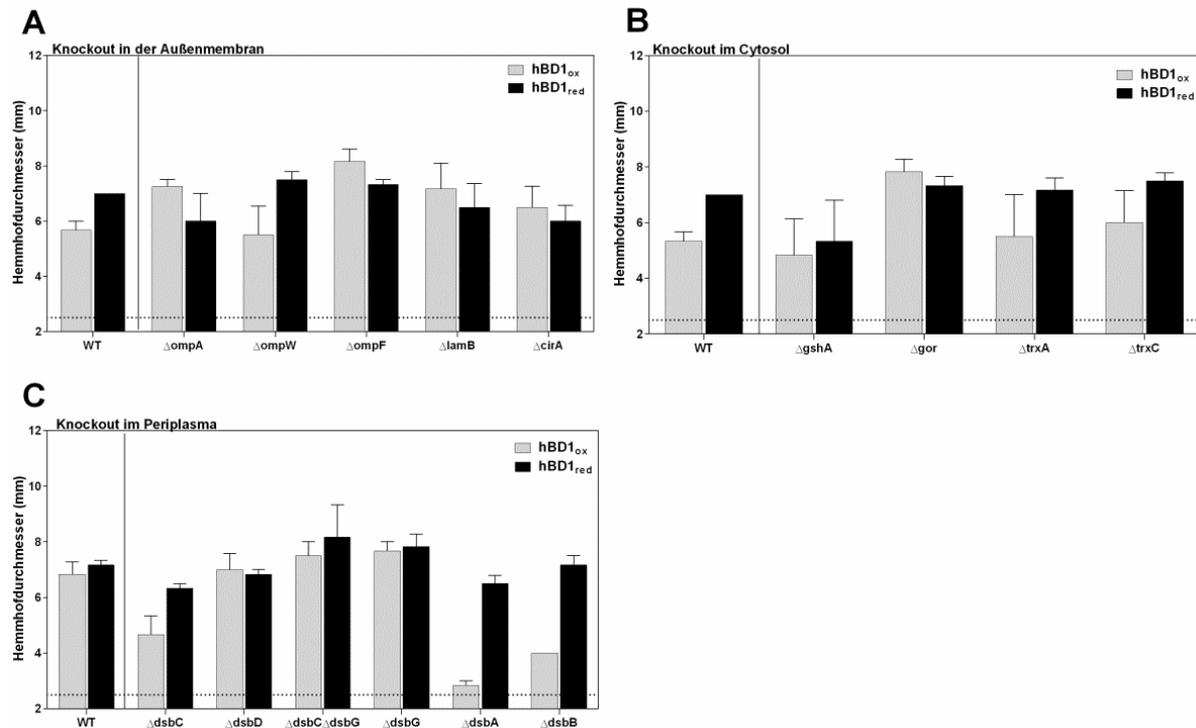


Abbildung 11: Einfluss von Membran-assoziierten Proteinen auf die antimikrobielle Aktivität von hBD1ox
E. coli MC1000 mit Proteinknockouts in der Außenmembran (A), Cytoplasma (B) oder Periplasma (C) wurden mit 2 µg hBD1ox oder hBD1red inkubiert und die antimikrobielle Aktivität durch Ausmessen der Hemmhöfe mittels RDA bestimmt. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie) und wird nicht als antimikrobielle Aktivität gewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängige Experimenten mit +/- SEM.

3.2.2. Das Redoxsystem DsbA/DsbB beeinflusst die hBD1ox Aktivität

Um den Mechanismus von oxidiertem hBD1 noch genauer zu untersuchen wurde *E. coli* MC1000 mit Doppelknockout verwendet. Die ausgeschalteten Proteine sind Bestandteile im Redoxsystem und bauen Disulfidbrücken in ungefaltete (durch DsbA, DsbB) oder in falsch gefaltete (durch DsbC, DsbG) Proteine ein.

Im nachfolgenden RDA wurden die neuen Doppelknockoutstämme auf Sensitivität gegen hBD1ox getestet. Die deletierten Proteine haben keinen Einfluss auf die hBD1red Wirkweise, da die antimikrobielle Aktivität zwischen Mutante und Wildtyp keinen Unterschied aufwies. Bei Fehlen von DsbC und DsbG zeigt hBD1ox jedoch immer noch antimikrobielle Aktivität und es gab keinen Unterschied zu der Kontrolle (WT) (Abbildung 11). Es zeigte sich, dass DsbA und DsbB einen deutlichen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von hBD1ox haben. Interessanterweise zeigte sich, dass Bakterien ohne DsbA und DsbB eine komplette Resistenz gegen hBD1ox aufweisen (roter Balken) und nicht mehr sensitiv auf hBD1ox reagieren. Im RDA konnte kein Hemmhof bei einer Inkubation mit hBD1ox mehr festgestellt werden, sodass nur noch das Stanzloch von 2,5 mm ausgemessen werden konnte.

Dazu ist ein repräsentativer Ausschnitt aus dem durchgeführten Experiment abgebildet. Dieser Ausschnitt zeigt deutlich den Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta dsbA\Delta dsbB$. Zusätzlich sind die Hemmhöfe nach der hBD1red Inkubation zu sehen, dessen Wirkung unabhängig von DsbA/B ist.

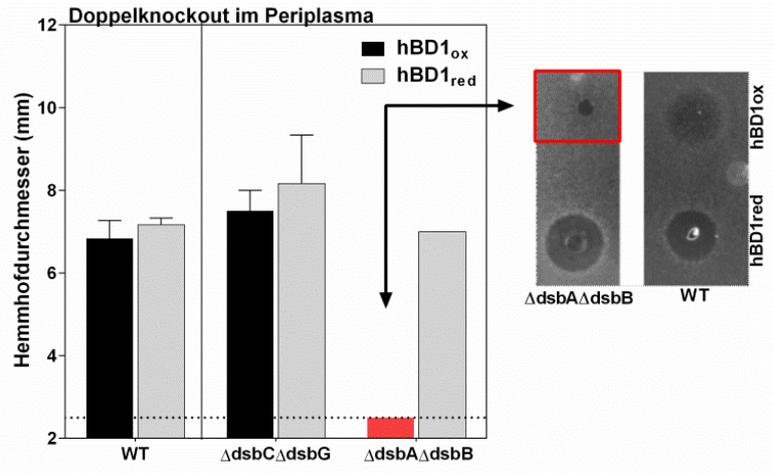


Abbildung 12: Redoxproteine beeinflussen antimikrobielle Aktivität von hBD1ox

Es wurden 2 μ g hBD1ox oder hBD1red gegen *E. coli* MC1000 WT, $\Delta dsbC\Delta dsbD$ und $\Delta dsbA\Delta dsbB$ eingesetzt und die Aktivität im RDA ermittelt. Dargestellt sind die Durchmesser der Hemmhöfe mit \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie) und wird nicht als antimikrobielle Aktivität gewertet. Ein repräsentativer RDA-Ausschnitt ist abgebildet.

Um sicher zu stellen, dass die Resistenz durch die Abwesenheit von DsbA/DsbB ausgelöst wird, wurden zwei Plasmide (pQE60::dsbB, pBAD22::dsbA), welche die Gene für DsbA und DsbB enthalten, in den Doppelknockoutstamm $\Delta dsbA\Delta dsbB$ transformiert. Beide Plasmide können getrennt voneinander angeschaltet werden, da *dsbA* oder *dsbB* entweder unter der Kontrolle eines IPTG- oder Arabinose-abhängigen Promotors stehen. Die Doppelmutante wurde in TSB-Medium angezogen. Am nächsten Tag wurde ein neues TSB-Medium beimpft und die Plasmide pQE60::dsbB und pBAD22::dsbA durch mehrmalige Zugabe von 0,4 % Arabinose und 2 mM IPTG induziert. Nach Etablierung der Induktionsparameter für die Plasmide wurden im nächsten Schritt der Wildtyp und die Doppelmutante, welche die Plasmiden enthält, lysiert und die Anwesenheit von DsbA mittels Antikörper im Westernblot detektiert. Es wurde der Überstand vom Zellextrakt (Pellet) getrennt, wobei DsbA nur im Überstand erwartet wurde (Abbildung 13).

In Spalte 1 ist sichtbar, dass aus dem Überstand von *E. coli* MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ ein großer Anteil eines Proteins mit ca. 23 kDa isoliert wurde. Aus dem Pellet von *E. coli* MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ pQE60::dsbB und pBAD33::dsbA wurde nach der Plasmidinduktion kein DsbA detektiert, was auf eine saubere Trennung von Überstand und Pellet schließen lässt (Spalte 2). In Spalte 3 ist eine leichte Detektion von DsbA zu erkennen. Diese Probe beinhaltet den Überstand

aus dem Wildtyp, welcher natürlicherweise eine geringere Expression von DsbA aufweist. Die Kontrolle in Spalte 4, reines DsbA-Protein zeigte ebenfalls eine Größe von 23 kDa.

Ein Nachweis von DsbB konnte aufgrund nicht vorhandener Antikörper und der niedrigen nativen Expression nicht erbracht werden.



Abbildung 13: Nachweis von DsbA in bakteriellen Zellüberständen nach Plasmidinduktion

Westernblotanalyse mit 14 %igen Acrylamidgel von dem gesamten Zellextrakt aus *E. coli* MC1000 Δ dsbA Δ dsbB pQE60::dsbB und pBAD33::dsbA (Spalte 1 = Überstand, Spalte 2 = Pellet) nach Plasmidinduktion mit 0,4 % Arabinose und 2 mM IPTG und dem Überstand aus *E. coli* MC1000 WT (Spalte 3). Als Positivkontrolle wurde das aufgereinigte Protein DsbA in Spalte 4 aufgetragen.

Es wurde gezeigt, dass es durch die Zugabe von IPTG und Arabinose unter den zuvor genannten Bedingungen zur Plasmidinduktion von DsbA in der Doppelmutante kommt und DsbA in großen Mengen exprimiert wird. Um den funktionellen Unterschied zwischen Knockoutmutante und Mutante plus Plasmid festzustellen, wurde ein weiterer RDA durchgeführt. Die Induktionsbedingungen wurden dafür nochmals angepasst und die Aktivität zwischen Mutante und Mutante plus Plasmid verglichen. Wenn die beobachtete Resistenz der DsbA/DsbB Mutante durch diese Proteine bedingt ist, so sollte nach Induktion des Plasmids die Resistenz wieder aufgehoben sein und einen mit dem WT vergleichbaren Phänotyp zeigen. Dies wäre ein weiterer Nachweis, dass DsbA und DsbB essentiell für die Aktivität von hBD1ox in *E. coli* ist.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, wurde die Aktivität von hBD1ox gegen die Doppelmutante Δ dsbA Δ dsbB (-) und gegen die Doppelmutante mit den Plasmiden pQE60::dsbB und pBAD33::dsbA (+) nach Induktion durch 0,4 % Arabinose und 2 mM IPTG getestet. Ohne Plasmid (-) wurde keine Aktivität mit hBD1ox festgestellt. Der repräsentative Ausschnitt zeigt deutlich, dass kein Hemmhof zu sehen ist, was die Ergebnisse aus Abbildung 12 bestätigt. Nach Induktion der Plasmide wurde wieder ein Hemmhof beobachtet und somit die bakterielle Sensitivität gegen hBD1ox durch die DsbA/DsbB Proteine wiederhergestellt (Hemmhof im nebenstehenden RDA-Ausschnitt). Hier wurde somit nochmals gezeigt, dass der DsbA/DsbB Komplex für die Aktivität von hBD1ox essentiell ist.

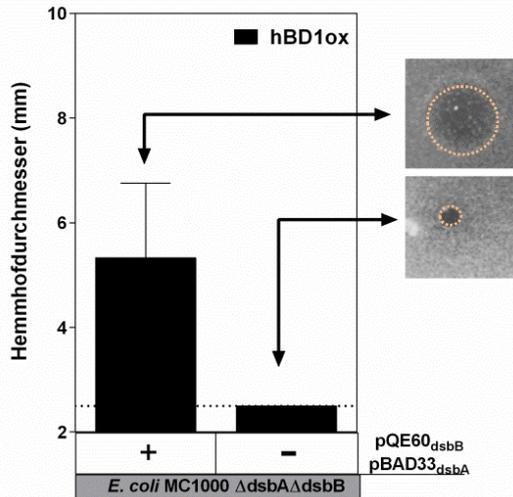


Abbildung 14: Antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ nach Plasmidinduktion

E. coli MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ (-) und *E. coli* MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ (+) mit den Plasmiden pQE60::dsbB und pBAD33::dsbA wurden nach Behandlung für 2,5 h mit 0,4 % L-Arabinose und 2 mM IPTG mit jeweils 4 μ g hBD1ox inkubiert. Im Anschluss wurde der RDA gestartet. Die Darstellung enthält die Hemmhofdurchmesser, abzüglich des 2,5 mm großen Ausstanzloches (gestrichelte Linie) mit +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Ein repräsentativer RDA-Ausschnitt ist abgebildet.

Um zu überprüfen, ob der DsbA/DsbB Komplex hBD1 *in vitro* als Substrat erkennt, wurde hBD1red mit den beiden Oxidoreduktasen DsbA und DsbB in Anwesenheit von Coenzym Q8 inkubiert und mittels Massenspektrometrie die oxidierte Redoxform von hBD1 versucht zu detektiert.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurde nach ca. 22 min das reduzierte hBD1 (10 μ M) im verwendeten Kaliumphosphatpuffer detektiert. Die Zugabe von DsbA und Coenzym Q8 (Abbildung 15B) bewirkte eine Konversion zu der oxidierten Redoxform von hBD1, womit gezeigt wird, dass hBD1red ein Substrat von DsbA ist. DsbA führt zum Einbau von Disulfidbrücken in die reduzierte Redoxform von hBD1 und die resultierende oxidierte Version wurde über das QTOF detektiert. HBD1red konnte aber nicht vollständig umgesetzt werden, wodurch ebenfalls noch die oxidierte Form mit hoher Intensität detektiert wurde. Eine nahezu 100 %ige Umsetzung von reduziertem zu oxidiertem hBD1 erfolgte durch Zugabe von 150 nM DsbB. DsbB führt zu einer Re-Oxidation von DsbA und weitere Zyklen von Disulfidbrückeneinbau können durchgeführt werden. Die Intensität von reduziertem hBD1 war nur noch sehr gering (a.u. = $1,25 \times 10^7$). Dieser Versuch zeigt, dass hBD1 über den DsbA und DsbB oxidiert werden kann und somit kann dieser Komplex das humane Defensin als Substrat verwendet.

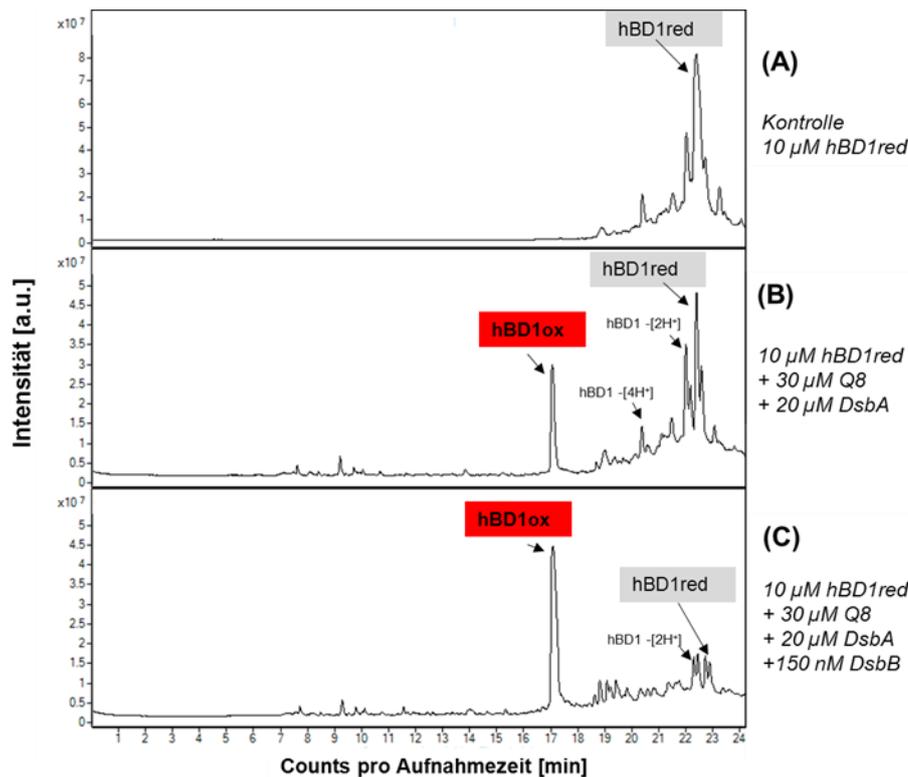


Abbildung 15: *In vitro* Oxidation von hBD1red durch bakterielle Periplasmaproteine

Reduziertes hBD1 (A) wurde mit Oxidoreduktasen DsbA (B) und zusätzlich mit DsbB (C) unter Anwesenheit von Coenzymen (Q8) inkubiert und die entstehenden Peptide mittels Massenspektrometer "Quadrupole time-of-flight mass spectrometer" (QTOF) analysiert. Ein repräsentativer Ausschnitt ist abgebildet.

3.2.2.1. Einschränkungen in der Motilität und LPS-Struktur sind nicht für die Resistenz verantwortlich

Die DsbA/DsbB Mutante weist zusätzlich eine deutlich reduzierte Beweglichkeit auf (Bardwell *et al*, 1991; Vertommen *et al*, 2008). Um mögliche Nebeneffekte auszuschließen, welche durch eine verringerte Motilität, aufgrund des Proteinknockouts von DsbA und DsbB, in den Bakterien entstehen könnten, wurden Bakterien mit defekten Flagellen Komponenten (Seo *et al*, 2012; Troge *et al*, 2012), sowie Bakterien mit einer veränderten LPS Struktur (Bainbridge *et al*, 2006; Gronbach *et al*, 2014) im RDA getestet.

Hierzu wurden *E. coli* Nissle Bakterien, welche durch Proteinknockouts in verschiedenen Abschnitten oder im Promotor des Flagellums (siehe Abbildung 16A) ein vermindertes Schwarmverhalten aufweisen, verwendet. Jedoch zeigte hBD1ox und hBD1red gegen diese Mutanten eine ähnliche starke antimikrobielle Aktivität und es ergaben sich keine Unterschiede zum Wildtyp (Abbildung 16B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die eingeschränkte Motilität der Mutante und die Aktivität des Flagellums nicht ausschlaggebend für die Aktivität von hBD1 sind. Bakterien mit DsbA-Knockout weisen zudem eine Hypersensitivität gegenüber einigen Antibiotika und einigen Farbstoffen auf, welche womöglich mit einer veränderten Zellohülle zusammenhängen könnte (Bardwell *et al*, 1991).

Um einen möglichen Zusammenhang von DsbA mit dem Aufbau von Lipidmembranen und somit eine veränderten Zellhülle auszuschließen, wurden Bakterien verwendet, die eine Veränderung in der Lipid A Struktur aufweisen. In Abbildung 16C sind die Unterschiede der Fettsäuren und der daraus resultierenden Struktur des LPS dargestellt. *E. coli*s mit einer Veränderung der *htrB* Expression besitzen ein chimäres LPS mit einer modifizierten Lipid A Struktur. Im Vergleich zur Lipid A Struktur aus dem *E. coli* Wildtyp enthält die Mutante JM83 (*htrB*- *htrB*_{PG+}) ein Palmitat aus 16 Kohlenstoff, dagegen fehlt dieses Palmitat vollständig bei JM83 *htrB*-. In Abbildung 16B und D sind die Ergebnisse aus dem RDA aufgezeigt. Jedoch wurde kein Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität von hBD1ox und hBD1red zwischen Wildtyp und den einzelnen Mutanten entdeckt, wodurch auf einen LPS- unabhängigen Wirkmechanismus geschlossen werden kann. Eine eingeschränkte Beweglichkeit oder eine Veränderung der Außenmembran durch LPS Varianten beeinflussen die antibiotische Wirksamkeit von hBD1ox und hBD1red nicht, sodass hier detailliert gezeigt werden konnte, dass der DsbA/DsbB Komplex eine essentielle Notwendigkeit für die Wirksamkeit von hBD1ox darstellt.

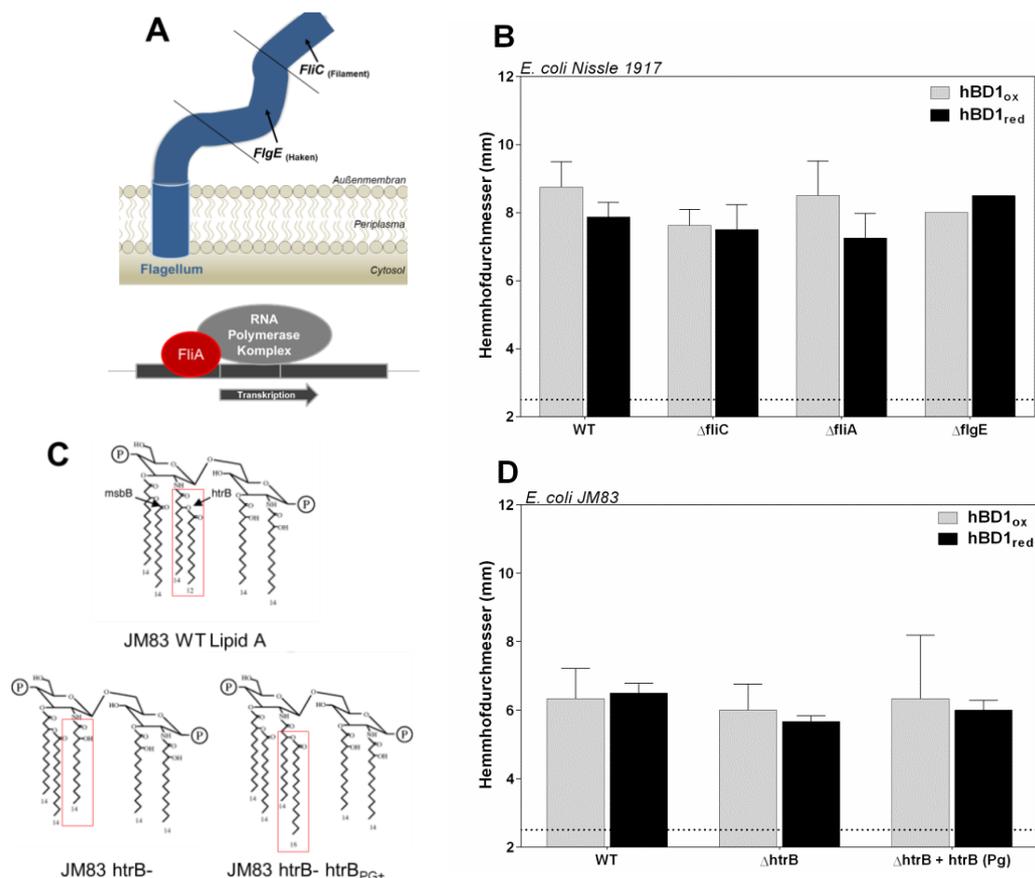


Abbildung 16: Kein Einfluss der Aktivität von hBD1 auf weitere Bakterien mit Proteinknockouts

Verschiedene Flagellum- oder Lipid A Proteinknockout Stämme von *E. coli* Nissle (B) und *E. coli* JM83 (D) wurde mit 2 μ g hBD1ox und 2 μ g hBD1red inkubiert und die antimikrobielle Aktivität mittels RDA bestimmt. Das Stanzloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie). Abgebildet sind drei unabhängige Experimente mit +/- SEM. Schematische Darstellung der deletierten Proteine im Flagellum (A) und der verwendeten Lipid A Strukturen (B), aus Bainbridge *et al*, 2006, mit Genehmigung von *Cellular Microbiology*.

3.2.2.2. Vergleich der Membranzusammensetzung von WT vs $\Delta dsbA\Delta dsbB$

Im vorherigen Abschnitt wurde mit *E. coli* Nissle oder *E. coli* JM83 gearbeitet, um Nebeneffekte durch Motilität oder LPS-Komposition bei der Aktivität von hBD1ox auszuschließen.

Die Doppelknockoutmutante besitzt jedoch den gleichen Hintergrund MC1000 wie der WT. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von hBD1 auf die Membran untersucht, um sicherzugehen, dass durch die Deletion auch bei gleichem genetischem Hintergrund keine Änderung in der Membranzusammensetzung entstanden ist. Um einen Unterschied in der Membranzusammensetzung auszuschließen, wurde mit der Doppelknockoutmutante *E. coli* MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ gearbeitet und als Vergleich der *E. coli* MC1000 Wildtypstamm (WT) aus Abbildung 9 nochmals aufgezeigt. Dafür wurde das Membranpotential nach Zugabe von Peptid analysiert und mit den Ergebnissen von *E. coli* MC1000 WT verglichen (Abbildung 9, Abbildung 17B). Erwartet wurde, dass das Membranpotential nach Zugabe von hBD1ox im Wildtyp ähnlich oder gleich ist wie in der Doppelknockoutmutante.

Die Doppelknockoutmutante wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an hBD1ox und hBD1red inkubiert und nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes DiBAC₄(3) die Depolarisierung der Membran bestimmt. Als Positivkontrolle dienten 50 µg/ml hBD3ox. Die Ergebnisse zeigen hier deutlich, dass hBD1ox nur eine leichte Depolarisierung der cytosolischen Membran auslösen kann und etwa ca. 25 % der Bakterien dadurch depolarisiert sind (Abbildung 17A). Es wurde auch kein Unterschied der Depolarisation bei ansteigender hBD1ox Konzentration beobachtet. Die Negativkontrolle (behandelt mit 0,01% Essigsäure) zeigte eine ca. 20 %ige Depolarisierung. Jedoch zeigte hBD1red, wie auch im Wildtyp, eine stärkere Depolarisation von ca. 80 % abgetöteten Bakterien, somit konnte eine Änderung der Membranzusammensetzung bei genetischen Veränderungen ausgeschlossen werden.

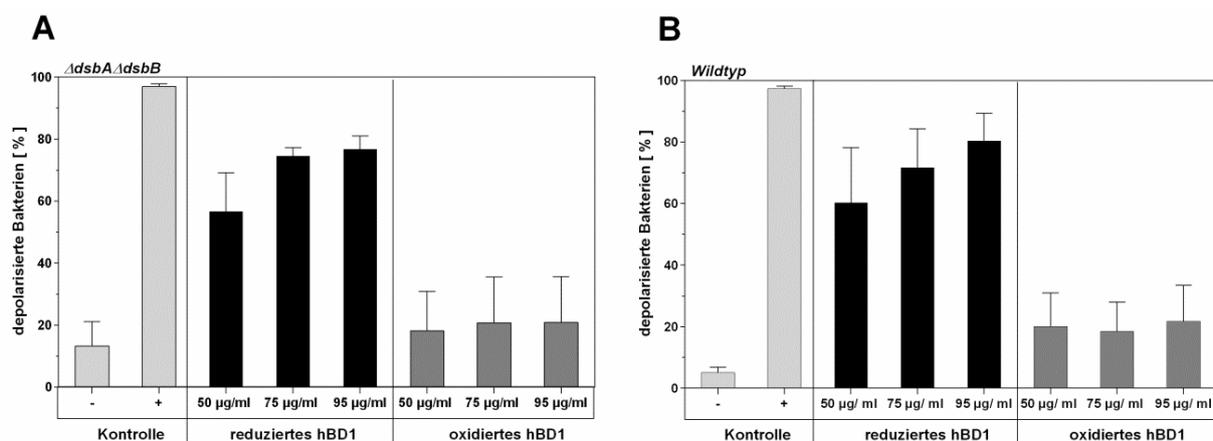


Abbildung 17: Detektion von Zellmembranschäden durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes

E. coli MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ wurde mit hBD1ox oder hBD1red in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und ein membranpotential-sensitiver Farbstoff (DiBAC₄(3)) hinzugegeben und die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Positivkontrolle diente 50 µg/ml hBD3ox. Die Höhe an depolarisierten Bakterien wurde in Prozent mit +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

HBD1ox hat somit keinen Einfluss auf das Membranpotential in der Doppelknockoutmutante und im Wildtyp. Es konnten durch diesen Assay keine Änderungen und keine Unterschiede in der Außenmembran von WT und Mutante detektiert werden. Deshalb wurde im nächsten Abschnitt mittels Elektronenmikroskop die Außenmembran der beiden *E. coli* Stämme analysiert, um mögliche Unterschiede nach der Inkubation mit hBD1ox festzustellen.

3.2.3. Analyse der Morphologie mittels Elektronenmikroskopie

Nach einer hBD1ox Inkubation zeigten sich keine Unterschiede im Membranpotential der Innenmembran zwischen Wildtyp und der resistenten Doppelmutante. Aus den hier generierten Daten wurde dennoch das DsbA/DsbB System als essentiell für die antimikrobielle Aktivität von hBD1ox erkannt (Abbildung 12). Deshalb wurde die Morphologie im Wildtyp und in der Doppelmutante mittels Elektronenmikroskop untersucht. Es ist bekannt, dass einige antimikrobiellen Peptide eine Bildung von Membranvesikeln in Bakterien auslösen können, welche ein Zeichen für Zellstress und Zellyse darstellen (Brogden, 2005; Chileveru *et al*, 2015).

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Bakterien für 2 h mit hBD1ox inkubiert, anschließend in Karnovsky-Lösung fixiert und die Strukturen an der Bakterienoberfläche mittels REM analysiert. Nach der Behandlung mit hBD1ox konnten Membranvesikel auf der Oberfläche der Bakterien detektiert werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Mutante optisch weniger Vesikel als der Wildtyp (Abbildung 18).

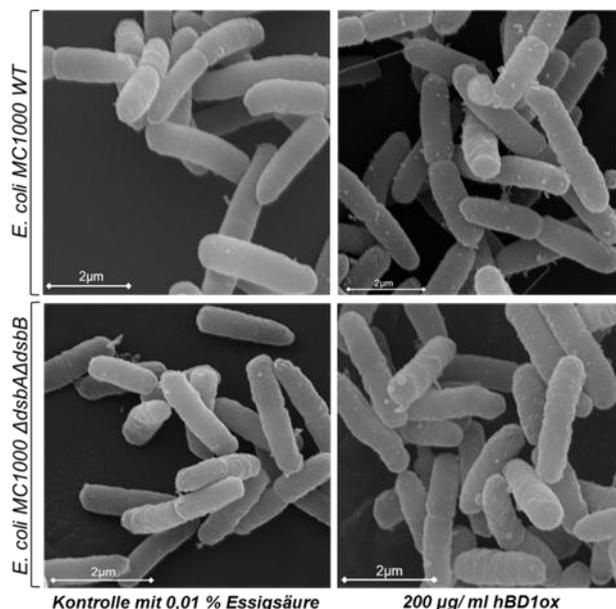


Abbildung 18: Analyse mittels REM nach hBD1ox Inkubation

E. coli MC1000 WT und *E. coli* MC1000 $\Delta dsbA\Delta dsbB$ wurde mit hBD1ox oder 0,01 % Essigsäure als Kontrolle für 2 h inkubiert. Im Anschluss folgte die Fixierung der Proben mit Karnovsky Reagenz und die Analyse der Oberflächenstruktur durch REM. Repräsentative Ausschnitte sind abgebildet.

Um eine genauere Auswertung der Anzahl der Membranvesikel auf der bakteriellen Oberfläche zu bekommen, wurde die Anzahl der Vesikel durch vier unabhängige Experten visuell ausgezählt und statistisch bestimmt (Abbildung 19). Nach der Auszählung zeigte sich, dass die Mutante im

Vergleich zum Wildtyp eine signifikant niedrigere Anzahl an Membranvesikeln hat, was auch mit einer niedrigeren Stressreaktion durch hBD1ox übereinstimmt. Durch die verringerte Anzahl an Membranvesikeln bei der Mutante kann eine niedrigere Stressreaktion durch hBD1ox angenommen werden, welche auch durch die Resistenz gegenüber hBD1ox deutlich wird.

Durch die Resistenz gegen hBD1ox könnte in der Mutante die Stressreaktion erniedrigt sein, was sich in einer verringerten Anzahl an Membranvesikeln widerspiegelt. Als Kontrolle wurden die Bakterienstämme mit 0,01 % Essigsäure behandelt, wodurch die Vesikelbildung minimal war (Abbildung 18).

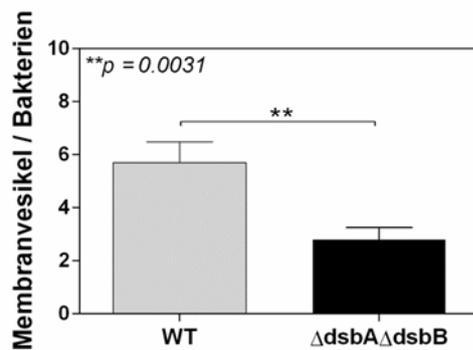


Abbildung 19: Visuelle Auswertung der Membranvesikel

Die Anzahl an Membranvesikeln durch hBD1ox wurde bei zehn Bakterien durch vier verschiedene Experten visuell bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde ein „Student's t-test“ verwendet, $** p = 0,0031$.

3.2.4. Lokalisierung von hBD1ox in bakteriellen Kompartimenten

Aufgrund der veränderten Membranvesikelanzahl wurde die Lokalisation von hBD1ox im Wildtyp und der Doppelmutante untersucht, um mögliche Unterschiede zwischen den Bakterien zu identifizieren.

Dafür wurden der Wildtyp und die Doppelmutante mit hBD1ox für 2 h bei 37 °C inkubiert und die Proben anschließend fixiert. Diese Proben wurden zunächst mit einem spezifischen Antikörper gegen hBD1ox inkubiert und danach mit einem sekundären Antikörper, welcher an einen 6 nm großen Goldpartikel gekoppelt ist, inkubiert. HBD1ox konnte somit in den bakteriellen Kompartimenten mittels Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Das oxidierte hBD1 wurde in allen Proben nachgewiesen und durch schwarze Punkte und Pfeile in Abbildung 20 markiert. Beim Wildtyp ist hBD1ox nur an der Außenmembran und im Periplasma in geringen Mengen detektiert worden. Im Cytosol konnte hingegen kein hBD1ox durch Antikörper detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigt die Doppelmutante einen intakteren Phänotyp und die Lokalisation von hBD1ox unterscheidet sich deutlich zum Wildtyp. In der Mutante wurde ebenfalls hBD1ox an der Außenmembran und im Periplasma detektiert, aber zusätzlich wurde eine große Menge des antimikrobiellen Peptids auch im Cytosol lokalisiert.

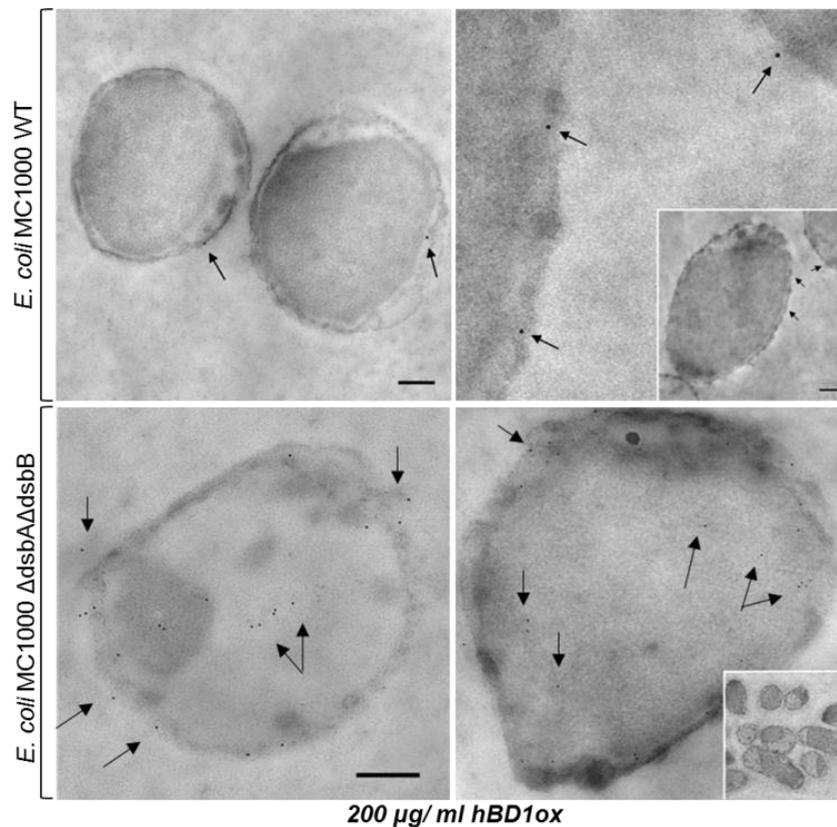


Abbildung 20: Immunogoldlabeling von hBD1ox zur Lokalisation in bakteriellen Kompartimenten

Bakterien wurden mit hBD1ox für 2 h inkubiert und anschließend fixiert (3 % Paraformaldehyd und 0,01 % Glutaraldehyd) und mit spezifischen Antikörpern gegen hBD1ox inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden mit Goldpartikeln (6 nm) gekoppelt (schwarze Punkte) und die Bilder über Elektronenmikroskopie ausgewertet. Repräsentative Ausschnitte sind abgebildet. Vergrößerungsmaßstab = 2 μ m.

Zusätzlich zu den objektiven Bildern aus der Immunogoldfärbung wurde insgesamt in 14 Bakterien visuell die Lokalisation von hBD1ox durch unabhängige Experten und nach Kriterien, welche im Material & Methodenteil beschrieben wurde, bestimmt (Abbildung 21). In der Mutante konnte eine hohe Anzahl an hBD1ox im Cytosol bestimmt werden. Zwischen Mutante und Wildtyp wurde im Periplasma kein großer Unterschied beobachtet.

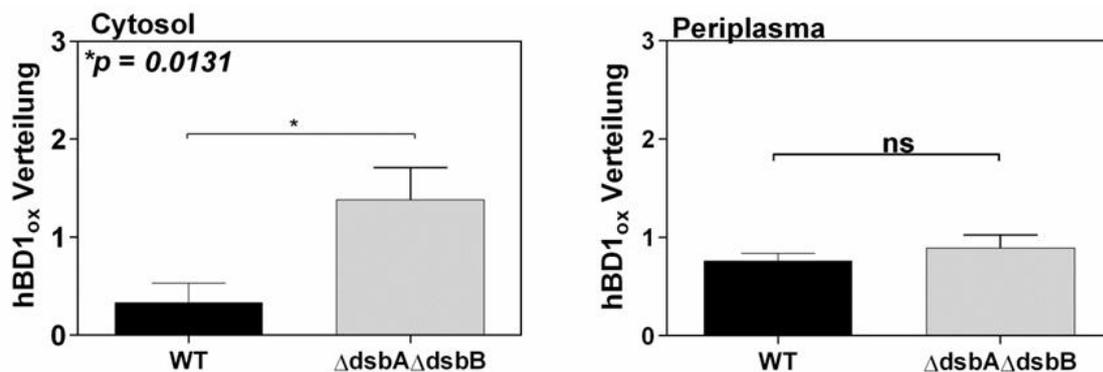


Abbildung 21: Visuelle Auswertung der hBD1ox Lokalisation in Cytosol und Periplasma

Die Lokalisation und Menge des detektierten hBD1ox, durch spezifische Antikörper, welche mit Goldpartikel gekoppelt sind, wurde visuell von 14 Bakterien und durch drei unterschiedliche Experten bestimmt. Gezeigt wird hier eine statistische Auswertung mit Verwendung des „Student's t-test“. * $p < 0,05$.

Aufgrund der Daten wird vermutet, dass hBD1ox sich länger im Periplasmaraum aufhalten kann wenn ein funktionsfähiges DsbA/DsbB System vorhanden ist und der Eintritt dadurch in das Cytosol blockiert wird. Da hBD1ox nur bei vorhandenem DsbA/DsbB System antimikrobiell aktiv ist, ist die Aktivität womöglich an eine hohe lokale Konzentration des Peptids im Periplasma gekoppelt.

3.3. Wirkmechanismus von hBD1red auf Bakterien

Detailliert wurde in Abschnitt 3.2 beschrieben, dass die Redoxformen von hBD1 nicht den gleichen Wirkmechanismus aufweisen und hBD1ox bestimmte periplasmatische Redoxproteine benötigt, um in Gram-negativen Bakterien antimikrobiell aktiv sein zu können. Um die unterschiedlichen Wirkmechanismen von hBD1ox und hBD1red noch genauer zu untersuchen, wurde in diesem Abschnitt der Fokus auf die reduzierte Form von hBD1 gelegt.

Die dargestellten Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 zeigen, dass hBD1 die Zellmembran zerstört und die Bakterien ein stark depolarisiertes Membranpotential aufweisen. Daher wurde hier zunächst durch Elektronenmikroskopie die Morphologie der Bakterien nach hBD1 Inkubation untersucht.

3.3.1. TEM- Analyse von hBD1 behandelten Bakterien

Für die Analyse der Morphologie wurde *E. coli* MC1000 WT mit hBD1ox (Abbildung 22) oder hBD1red (Abbildung 23) für 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend fixiert und mittels Elektronenmikroskop die Morphologie der einzelnen Bakterien analysiert. Übereinstimmend mit den vorherigen Versuchen (Kapitel 3.2) zeigte hBD1ox weder sichtbare Schäden auf die Zellwand oder Zellmembran, noch auf das Cytosol im Wildtyp (Abbildung 22). Auch mittels der Transmissionselektronenmikroskopie sind im Wildtyp Membranvesikel unterschiedlicher Größe zu erkennen (schwarze Pfeile), welche auch in Abbildung 18 schon visuell bestimmt und analysiert wurden.

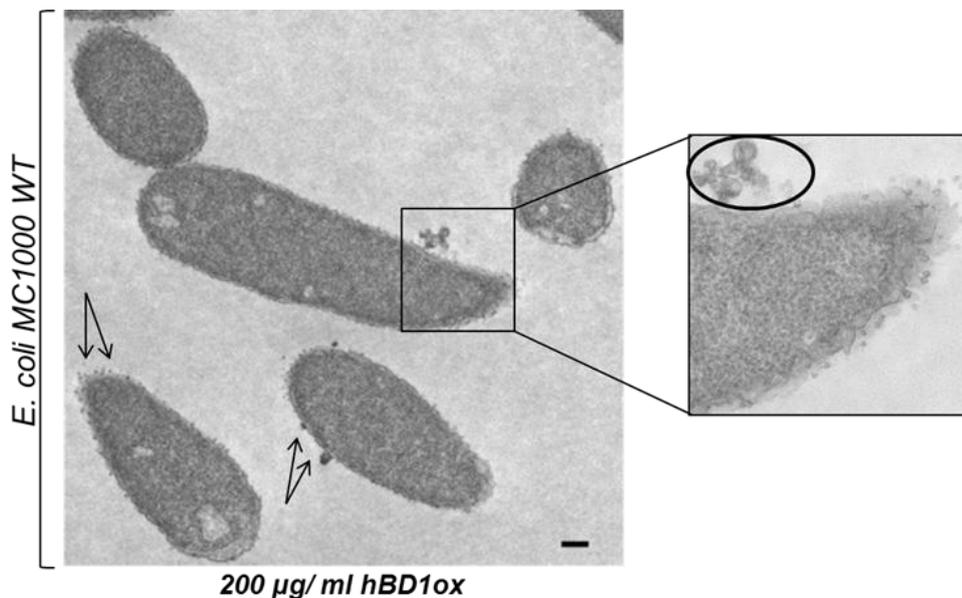


Abbildung 22: Analyse der Morphologie nach hBD1ox Inkubation

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Morphologie von *E. coli* MC1000 WT analysiert. Die Bakterien wurden für 2 h mit hBD1ox inkubiert und anschließend mit Karnovsky – Lösung fixiert. Ein repräsentativer Ausschnitt ist mit einem Vergrößerungsmaßstab von 2 µm abgebildet. Detektierte Membranvesikel wurden mit Pfeilen und in der Vergrößerung (rechts stehend) mit einem Kreis markiert.

Deutlichere Schäden wurden nach einer Behandlung mit hBD1red an der Außenmembran sichtbar (Abbildung 23). Es scheint, als würde sich zuerst die Außenmembran von der restlichen Zellwand ablösen, bevor es dann zu weiteren Ablösungen der Innenmembran kommt (siehe Vergrößerung und Pfeile, Abbildung 23A). Die Wirkung von hBD1red scheint viel stärker mit einer deutlicheren Membranschädigung, was sich im RDA durch den klar abgegrenzten Hemmhof bei hBD1red zeigte. Im Vergleich zu hBD1ox, welches hauptsächlich im Periplasma lokalisiert ist, induziert hBD1red keine Bildung von Membranvesikel. Dies ist ein weiterer Hinweis auf unterschiedliche Mechanismen eines Peptids. Interessanterweise wurde um die Bakterien herum eine kompakte Struktur entdeckt (Abbildung 23, markiert durch Pfeile). Diese netzartige Struktur wurde jeweils in der Nähe der Außenmembran detektiert, wobei Teile der Außenmembran auch in die Struktur verwickelt sind (Abbildung 23C+D, markiert durch Pfeile).

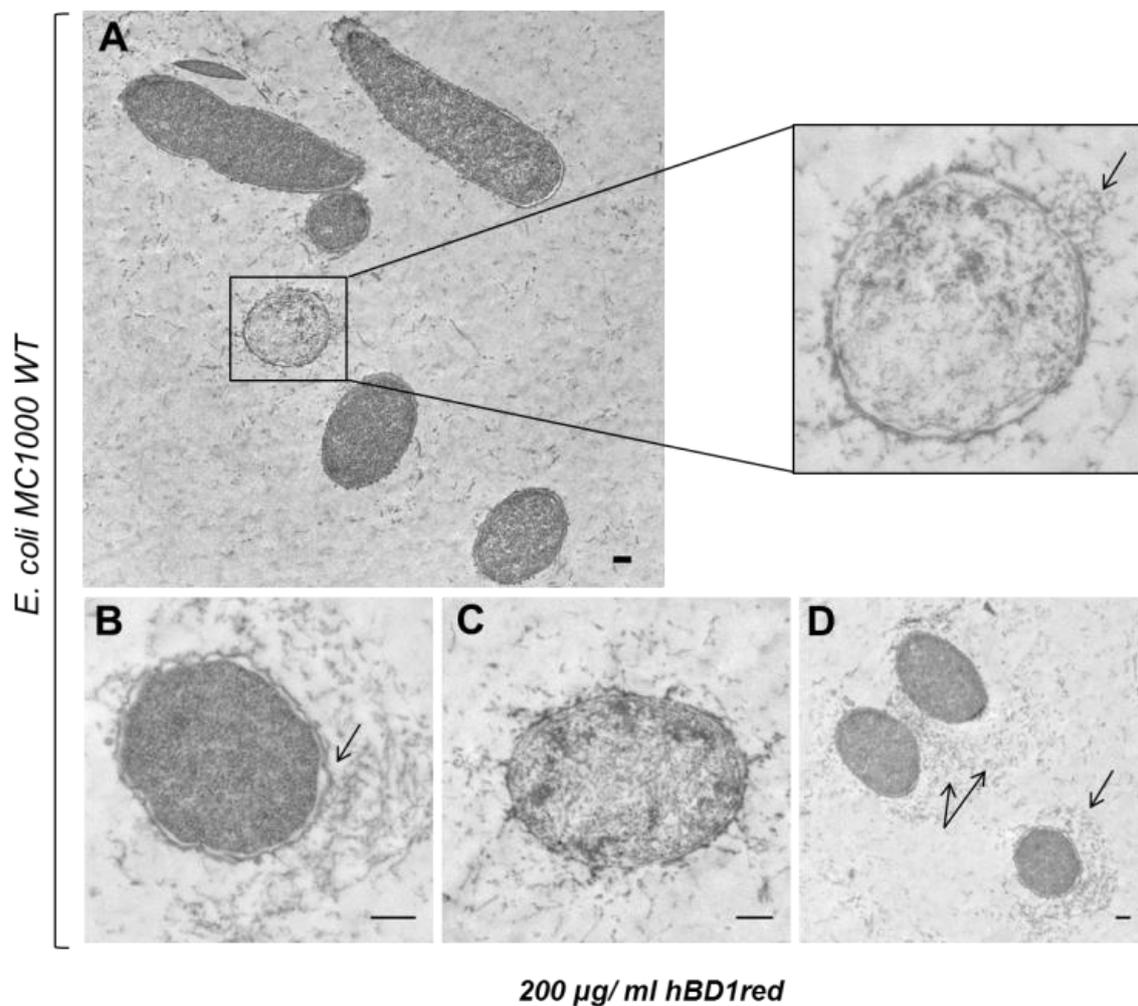


Abbildung 23: Analyse der Morphologie nach hBD1red Inkubation

Nach einer Inkubation mit hBD1red für 2 h wurden die Bakterien mit Karnovsky-Reagenz fixiert und die Zellhüllenschäden mittels TEM analysiert. Vergrößerungsmaßstab = 2 µm.

3.3.2. Analyse der netzartigen Struktur von hBD1red

Um weitere Hinweise über die unbekannte Struktur durch hBD1red zu erhalten, welche die Bakterien umgibt, wurde eine mögliche Ko-Lokalisation mit hBD1red durch spezifische Antikörper mittels Immunogoldfärbung nachgewiesen. Nach Inkubation mit hBD1red und spezifischen Primärantikörpern konnte durch zusätzliche Sekundärantikörper, gekoppelt mit 6 nm Goldpartikeln, die genaue Lokalisation von hBD1red bestimmt werden (Abbildung 24).

Es wurde eine hohe Menge an hBD1red außerhalb der Bakterien, sowie einen geringeren Anteil im Cytosol detektiert (rote Punkte). Die externe Struktur, welche die Bakterien umgibt, scheint mit der Lokalisation von hBD1red zu korrelieren, was vermuten lässt, dass hBD1red selbst diese Struktur bilden kann.

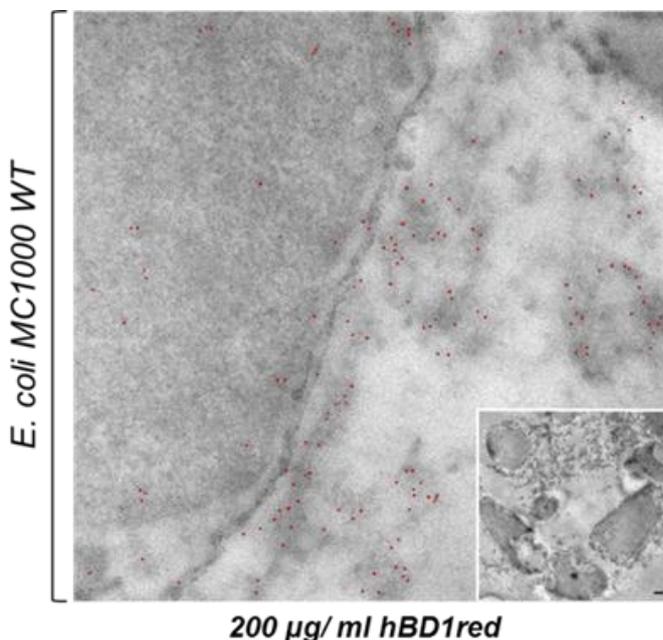


Abbildung 24: Lokalisation von hBD1red mittels Immunogoldlabeling

Bakterien wurden mit hBD1red für 2 h inkubiert und anschließend fixiert (3 % Paraformaldehyd und 0,01 % Glutaraldehyd) und mit spezifischen Antikörpern gegen hBD1red inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden mit Goldpartikeln (6 nm) gekoppelt (rote Punkte) und die Bilder über ein Elektronenmikroskop ausgewertet. Ein repräsentativer Ausschnitt mit Vergrößerungsmaßstab von 2 µm ist abgebildet.

Um die Struktur außerhalb der Bakterien genauer zu analysieren, wurde durch ein REM die Oberfläche der Bakterien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei dieser Struktur um ein extrazelluläres Netzwerk handelt, welches die Bakterien einschließt (Abbildung 25A). Die Proben in Abbildung 25A, C, D wurden jeweils in Karnovsky Lösung fixiert. Um ein Artefakt durch diesen Fixierschritt auszuschließen, wurden die Proben ohne Fixierlösung einer Trockenfixierung unterzogen (Abbildung 25B). Jedoch konnte auch durch die Trockenfixierung das Netzwerk gut dargestellt und ein Nebeneffekt der Fixierung somit ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass auch andere antimikrobielle Peptide netzartige Strukturen ausbilden. Von HD6 weiß man jedoch, dass bakterielle Flagellen benötigt werden, um ein Netzwerk ausbilden zu können (Chu *et al*, 2012). Um abzuklären, ob die Netzstruktur von hBD1red alleine produziert wird oder ebenfalls bakterielle Komponenten benötigt werden, wurden Experimente ohne Bakterien durchgeführt (Abbildung 25C + D).

Hierfür wurden Proteine A gekoppelte Beads mit hBD1red (Abbildung 25C) oder hBD1red alleine in TSB Medium (Abbildung 25D) inkubiert und auf Netzbildung untersucht. Es ist deutlich sichtbar, dass hBD1red sowohl mit Protein A gekoppelte Beads, aber auch ohne jegliche bakteriellen Komponenten ein Netzwerk bilden kann. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, ist die oxidierte Form von hBD1 nicht in der Lage Netze zu bilden.

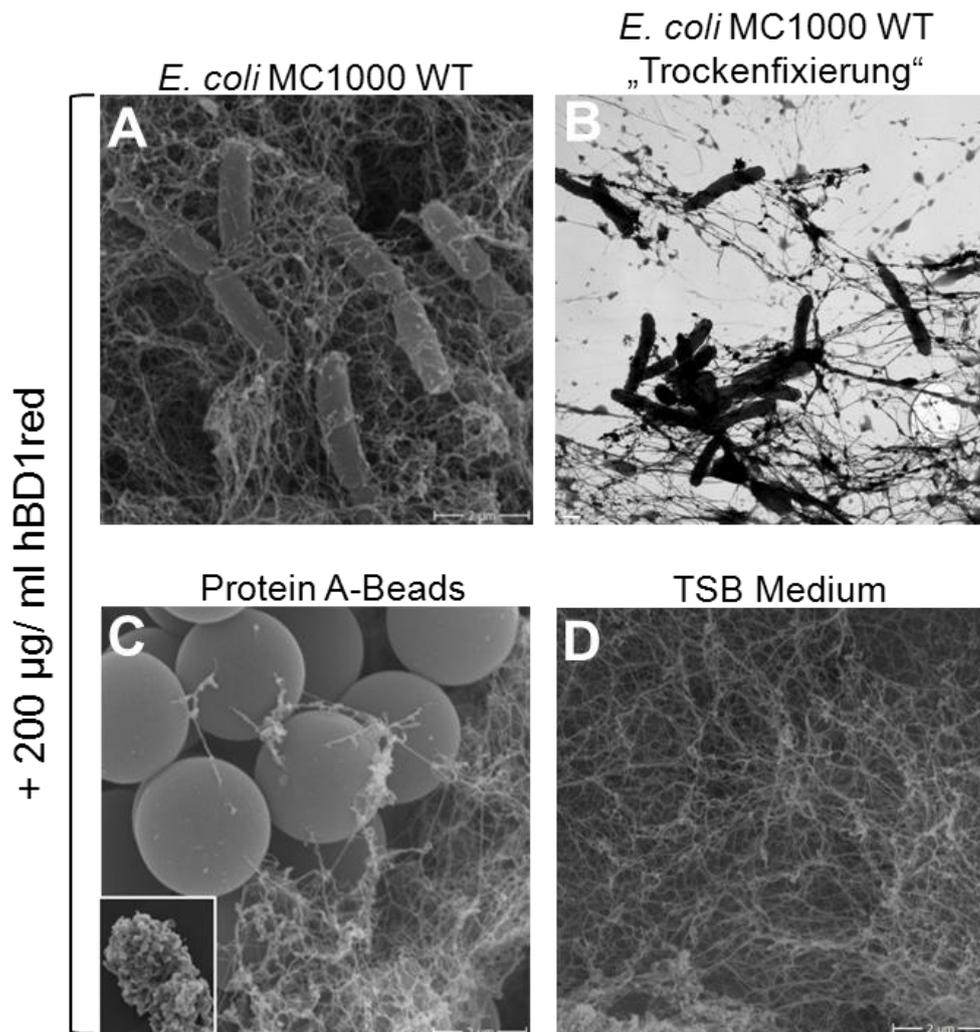


Abbildung 25. Aufklärung der unbekannt Struktur durch REM

E. coli MC1000 WT (A, B) oder Protein A – gebundene Beads (C) wurden mit hBD1red für 2 h inkubiert. Als Kontrolle diente hBD1red in TSB-Medium (D). Im Anschluss folgte die Fixierung der Proben mit dem Karnovsky Reagenz. Probe (B) wurde ohne Karnovsky Fixierlösung „trockenfixiert“. Es ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt abgebildet.

Der zusätzliche Mechanismus der Netzbildung durch die reduzierte Form von hBD1 zeigt ein äußerst vielfältiges Strategiespektrum. HBD1 besitzt hierdurch unterschiedliche und voneinander unabhängige Mechanismen gegen Bakterien. Im nächsten Schritt wurde die Netzstruktur noch detaillierter charakterisiert.

3.3.3. Strukturanalyse der netzartigen Struktur durch hBD1red

Es ist von einigen antimikrobiellen Peptiden bekannt, dass die Aktivität unabhängig von einzelnen Aminosäuren ist (Schroeder *et al*, 2014). Bei HD6red wurde Histidin durch Tryptophan und Cystein durch α -Aminobuttersäure (Abu) ersetzt und somit gezeigt, dass Histidine und Cysteine keinen Einfluss auf die Aktivität haben. Auch die Netzbildung von reduziertem HD6 wird nach diesem Aminosäureaustausch nicht beeinflusst (Schroeder *et al*, 2014).

Um zu überprüfen, ob in hBD1red ebenfalls ein Austausch an Aminosäuren die Netzbildung oder die antimikrobielle Aktivität verändert oder beeinflusst werden kann, wurde in folgenden Experimenten ebenfalls ein Aminosäureaustausch vorgenommen.

3.3.3.1. Eigenschaften von hBD1red_Abu

Um den Einfluss von Cysteinen in der Funktion von hBD1red zu überprüfen wurden alle Cysteine durch das sterische Analogon α -Aminobuttersäure ausgetauscht und das neu modifizierte hBD1red (hBD1red_Abu) auf Aktivität und Netzbildung überprüft. In Abbildung 26 ist die ursprüngliche Sequenz, sowie die modifizierte Version gezeigt. In dieser Arbeit wird die modifizierte Version als hBD1red_Abu deklariert. Durch das Analogon α -Aminobuttersäure ist hBD1 nicht mehr in der Lage Disulfidbrücken auszubilden.

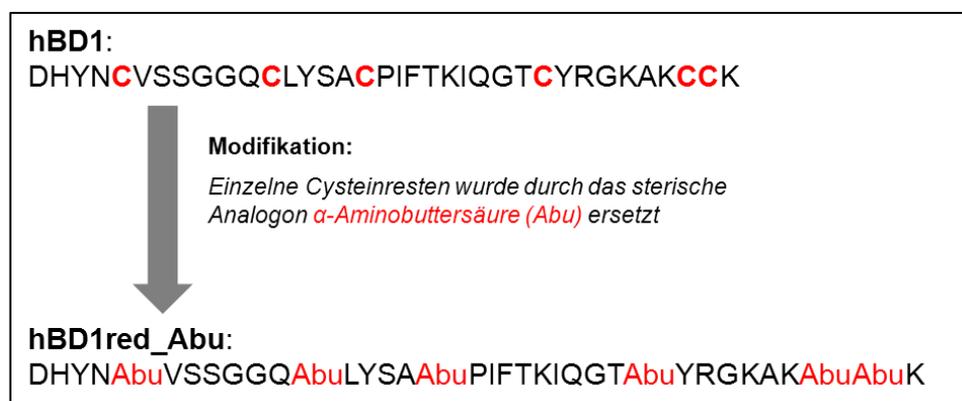


Abbildung 26: Schematische Darstellung der modifizierten Sequenz von hBD1red_Abu

Mit Hilfe der modifizierten Version, hBD1red_Abu, wurde zuerst überprüft, ob Cysteine in hBD1red eine Rolle bei der antimikrobiellen Aktivität gegen *E. coli* MC1000 spielen. Dazu wurde *E. coli* MC1000 mit hBD1red oder mit hBD1red_Abu inkubiert und mittels RDA die antimikrobielle Aktivität getestet. Nach der Auswertung zeigte sich deutlich, dass hBD1red ohne Cysteine eine verringerte Aktivität besitzt (Abbildung 27).

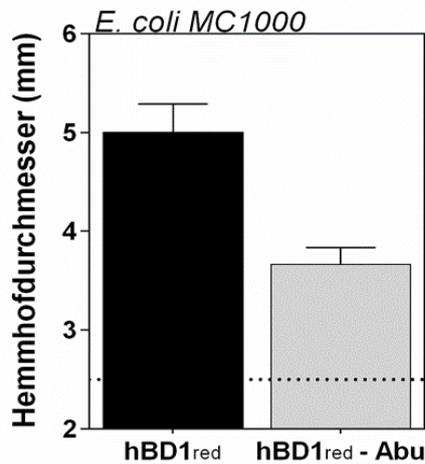


Abbildung 27: Antimikrobielle Aktivität von hBD1red_Abu

E. coli MC1000 WT wurde mit 2 µg hBD1red oder mit hBD1red_Abu inkubiert und die antimikrobielle Aktivität mittels RDA bestimmt. Das Stanzloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie). Abgebildet ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit +/- SEM.

Für die Aktivität scheint es wichtig zu sein, dass Cysteine sich in der Sequenz befinden, um mögliche Disulfidbrücken zu knüpfen. Im nächsten Schritt wurde deshalb die Netzbildung überprüft. Dafür wurde *E. coli* MC1000 und Protein A gebundene Beads mit hBD1red_Abu inkubiert und im Rasterelektronenmikroskop auf Netzbildung untersucht.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, sind nach Behandlung mit hBD1red_Abu Bakterien nur einzeln zu finden und es ist keine Netzbildung zu erkennen. Auch nach der Inkubation mit Beads wurde keine Netzbildung durch hBD1red_Abu beobachtet. Diese Versuche beweisen, dass Cysteine essentiell für die Aktivität und für die Netzbildung von hBD1red sind.

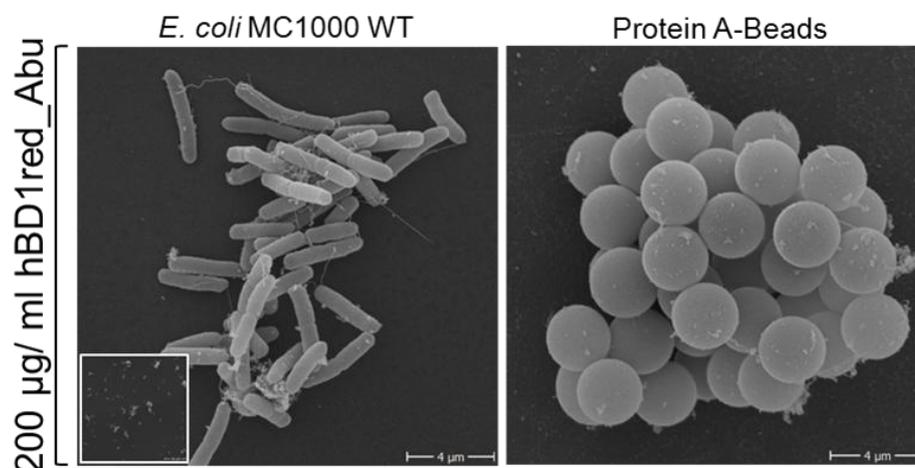


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopie von *E. coli* nach Behandlung mit hBD1red_Abu

E. coli MC1000 WT oder Protein A - Beads wurden mit hBD1red_Abu für 2 h inkubiert. Im Anschluss folgte die Fixierung der Proben mit Karnovsky Reagenz. Es ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt abgebildet.

3.4. Inaktivierung von hBD1red durch bakterielle Proteasen

3.4.1. *In vivo* Nachweis von hBD1red Fragmenten

Proteasen können durch Spaltung von Peptiden deren Aktivität stark beeinflussen. Auch von antimikrobiellen Peptiden ist bekannt, dass diese durch körpereigene oder bakterielle Proteasen prozessiert und somit in- oder aktiviert werden können (Schmidtchen *et al*, 2002; Gutner *et al*, 2009). Für hBD1 wurde gezeigt, dass Trypsin hBD1red *in vitro* in einzelne Fragmente spalten kann und ein Fragment mit 29 Aminosäuren entsteht. Bei dieser verkürzten Version von hBD1red fehlen am C-Terminus sieben Aminosäuren. Zusätzlich konnte keine Aktivität von diesem verkürzten Fragments gegen *B. adolescentis* mehr nachgewiesen werden (Schroeder *et al*, 2011b, 2011a). In diesem Abschnitt sollen die Eigenschaften und das eventuell natürliche Vorkommen der verkürzten Version hBD1red_AS1-29 und den restlichen sieben Aminosäuren (Heptapeptid) geklärt werden.

Da die bisherigen Versuche *in vitro* durchgeführt wurden, wurde hier mittels Massenspektrometrie (QTOF) überprüft, ob diese hBD1- Fragmente auch in bakteriellen Überständen und somit *in vivo* entstehen könnten und ob bakterielle Proteasen in der Lage sind die gleichen Fragmente wie humanes Trypsin zu bilden.

Zunächst wurde *E. coli* MC1000 mit dem Vollängen Peptid hBD1red für 2 h inkubiert und der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt mittels Massenspektrometrie auf hBD1 Fragmente untersucht (Abbildung 29A). Um mögliche Artefakte mit dem synthetischen hBD1red auszuschließen, wurde eine *in vitro* Reduktion durch das Thioredoxinsystem (200 nM Thioredoxinreduktase und 3 μ M Thioredoxin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer) durchgeführt, anschließend mit Bakterien inkubiert und der gewonnene Überstand im QTOF auf hBD1- Fragmente überprüft (Abbildung 29B). Es wurde jeweils aus den Überständen in (A) und (B) ein Peak mit einer hohen Intensität detektiert. Dieser stellte sich in beiden Fällen als das verkürzte Fragment hBD1red_AS1-29 heraus, welches potentiell *in vivo* durch bakterielle Proteasen entstehen könnte.

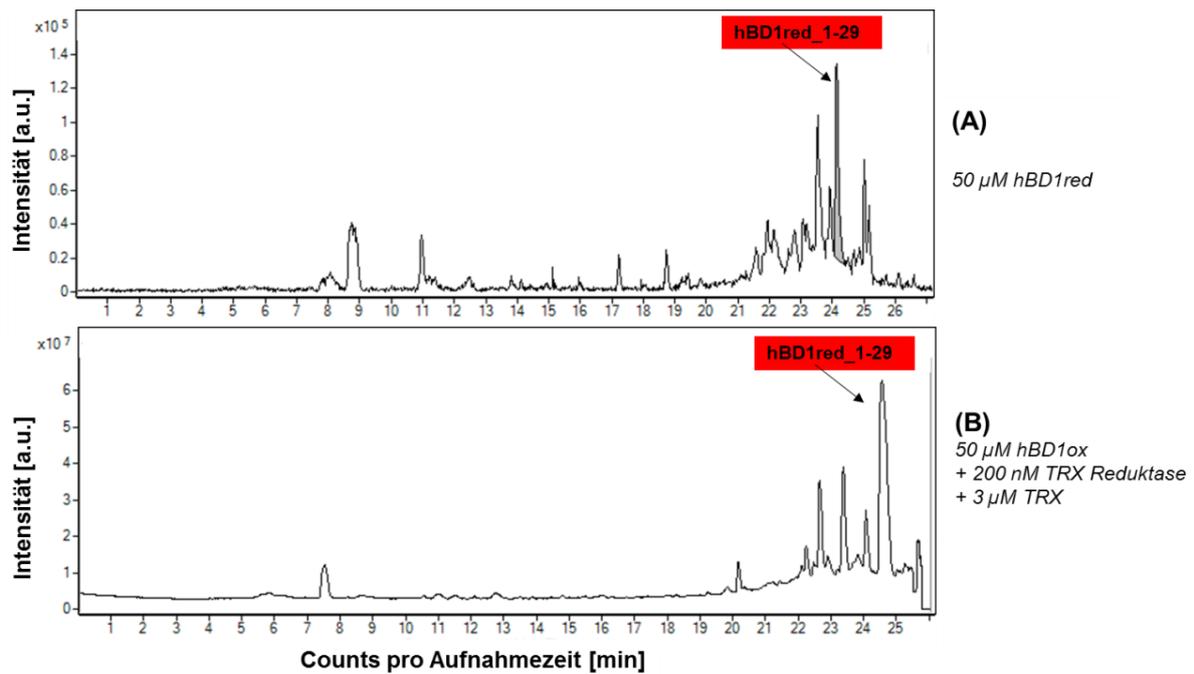


Abbildung 29: Detektion von verkürztem hBD1red – Fragment

Im Überstand von *E. coli* wurde nach 2 h Inkubation mit hBD1red (A) und mit in 100 mM Kaliumphosphatpuffer *in vitro* reduziertem hBD1 und Thioredoxin-Mix (B) das verkürzte Fragment hBD1red_AS1-29 detektiert. Hierfür wurde in (B) 50,9 μM hBD1ox mit 200 nM Thioredoxinreduktase und 3 μM Thioredoxin reduziert und anschließend mit Bakterien inkubiert.

3.4.1.1. Antimikrobielle Eigenschaften von hBD1red_AS1-29

Bekannt wurde schon aus Bjoern O Schroeder, Wu, *et al.*, 2011, dass das hBD1red_AS1-29 keine Aktivität gegen anaerobe Bakterien zeigt. Hier wurde nun die Aktivität von hBD1red_AS1-29 und von dessen restlichen Fragment, dem sogenannten Heptapeptid, auf verschiedenen Bakterien-spezies, unter anderem gegen *E. coli* MC1000 im RDA getestet (Abbildung 30). Überraschenderweise zeigte sich, dass hBD1red_AS1-29 und das Heptapeptid gegen alle hier getesteten Bakterien keinerlei antimikrobielle Aktivität aufwies.

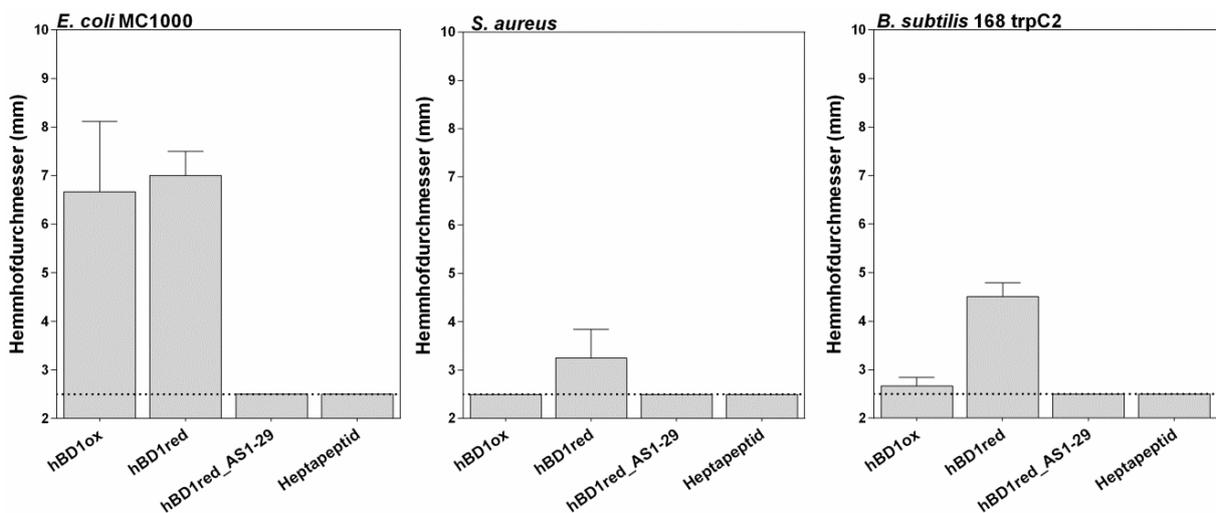


Abbildung 30: Aktivitätsmessung von hBD1 und dessen Fragmente auf Bakterien

E. coli MC1000 WT, *S. aureus* und *B. subtilis* 168 trpC2 wurden mit 127,05 μM ($\sim 2 \mu\text{g}$ hBD1red) hBD1red Fragmenten inkubiert und die antimikrobielle Aktivität mittels RDA bestimmt. Das Stanzloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm (gestrichelte Linie). Abgebildet ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimente mit +/- SEM.

Da keine Aktivität von hBD1red_AS1-29 und Heptapeptid gegen die drei getesteten Stämme zu erkennen war, wurde nochmals mittels des sensitiveren Luciferase Assay ein möglicher Einfluss auf die Zellwand durch die inaktiven Fragmente überprüft (Abbildung 31). Jedoch wurde auch hier keine Aktivität in Form von Zellhüllenstress durch verschiedene Konzentrationen (0,04 – 80 μM) an hBD1red_AS1-29 (A) und dem dazugehörigen Heptapeptid (B) ausgelöst. Lediglich eine minimale Aktivität des Promotors konnte durch hBD1red_AS1-29 festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen aus dem RDA überein und zeigen, dass die getesteten Fragmente von hBD1 keine antibiotische Wirkung, auf die hier getesteten Bakterien, aufweisen.

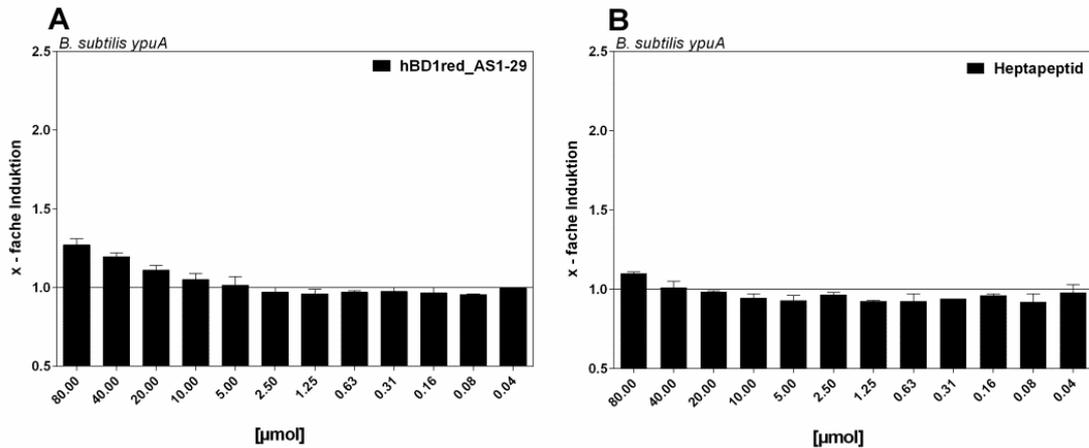


Abbildung 31: *YpuA* Promotoraktivität als Marker von Zellhüllenstress durch hBD1 Fragmente

B. subtilis ypuA wurde mit einer Konzentrationsreihe von 0,04 – 80 μM hBD1red_AS1-29 (A) oder mit dem Heptapeptid (B) inkubiert und im Anschluss die Promotoraktivität von *ypuA*, gekoppelt mit Luciferase Reporter gen, gemessen. Die Darstellungen enthalten die Mittelwerte mit +/- SEM von zwei unabhängigen durchgeführten Experimenten.

3.4.1.2. HBD1red_AS1-29 zeigt Netzbildung mit Bakterien

Aus den zuvor dargestellten Versuchen zeigte sich, dass die im Überstand detektierten Fragmente hBD1red_AS1-29 und dessen restliches Heptapeptid vollständig inaktiv sind und keinerlei antibiotische Wirkung mehr aufweisen. Um weitere Details über den Wirkmechanismus von hBD1red zu erfahren, wurde überprüft, ob eine Spaltung zu hBD1red_AS1-29 und dem Heptapeptid auch die Netzbildung beeinträchtigt oder sogar die Netzbildung vollständig inhibiert werden kann. Bakterien wurden dafür mit hBD1red_AS1-29 oder mit Heptapeptid inkubiert und nach der Fixierung mittels REM auf Netzbildung analysiert (Abbildung 32). Erstaunlicherweise zeigte sich eine deutliche Netzbildung bei hBD1red_AS1-29, wohingegen der restliche Teil, das Heptapeptid, keine Netzstrukturen ausgebildet hat.

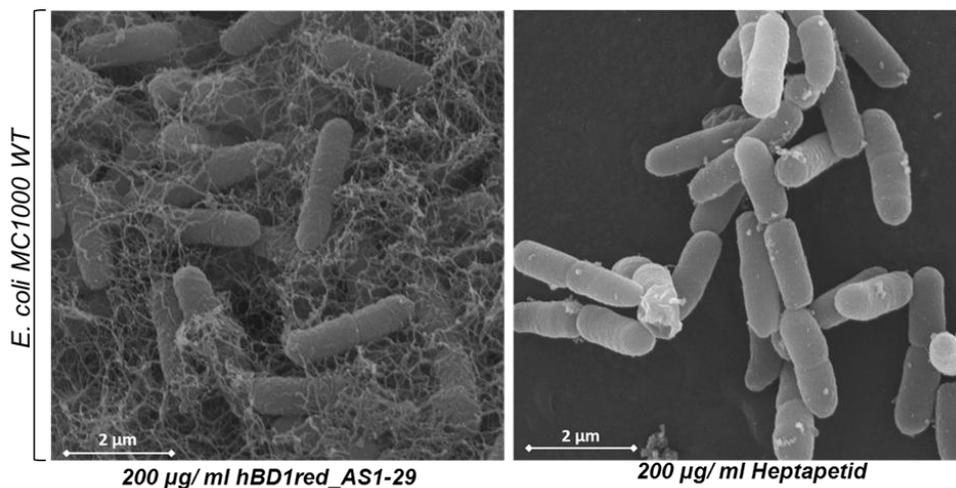


Abbildung 32: Nachweis von Netzstrukturen von hBD1 Fragmenten mittels REM

E. coli MC1000 wurde mit hBD1red_AS1-29 oder mit dem kurzen Fragment Heptapeptid für 2 h inkubiert. Im Anschluss folgte die Fixierung der Proben mit dem Karnovsky Reagenz. Es ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt abgebildet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Volllängenpeptid hBD1red zur Bildung von netzartigen Strukturen in der Lage ist. Darüber hinaus besitzt dieses Peptid auch antimikrobielle Eigenschaften. Interessanterweise benötigt hBD1 seine Cysteine, sowohl für die antibiotische Aktivität, als auch für die Netzbildung. Des Weiteren konnte im Überstand von, mit hBD1red behandelten, *E. coli* MC1000 das vollständige Peptid nicht mehr detektiert werden. Stattdessen wurde nur eine, um sieben C-terminale Aminosäuren verkürzte Version (hBD1red_AS1-29) gefunden.

3.4.2. Einfluss der bakteriellen Proteasen auf hBD1

Um einen Nachweis zu erhalten, ob bakterielle Proteasen an der Fragmentierung von hBD1red beteiligt sind (Abbildung 33), wurden im nächsten Versuch die bakteriellen Proteasen durch einen Inhibitormix geblockt und anschließend die Bildung von Fragmenten untersucht.

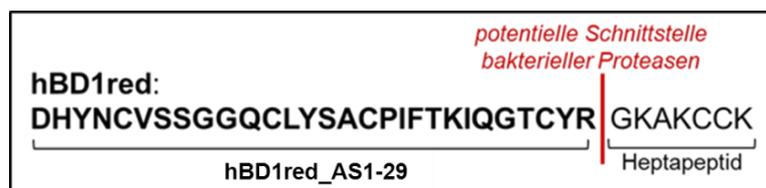


Abbildung 33: Schematische Darstellung der möglichen hBD1 Fragmentierung durch bakterielle Proteasen

Der Inhibitormix enthält verschiedene reversible und irreversible Proteaseinhibitoren für Serin- und Cysteinproteasen, sowie spezifische Inhibitoren für Aspartatproteasen und Aminopeptidasen. Der Einsatz von 1 x konzentriertem Inhibitormix inhibiert laut Protokoll über 90 % Proteasenaktivität in Bakterien. Ein Zusatz von EDTA führt zu einer zusätzlichen Inhibierung der Metalloproteasen.

E. coli MC1000 wurde mit verschiedenen Verdünnungen des Proteaseinhibitormixes vorinkubiert und anschließend hBD1red dazu gegeben (Abbildung 34). Als Kontrolle wurde anstelle von hBD1red 0,01 % Essigsäure zu den Bakterien gegeben, um eine potentiell toxische Wirkung des eingesetzten Proteaseinhibitors auszuschließen. Nach einer Inkubation von 30 min wurde das bakterielle Wachstum nach 6 h bei OD₆₀₀ gemessen und in Abbildung 34 dargestellt. Es war zu erwarten, dass die bakteriellen Proteasen durch den Inhibitormix gehemmt werden. Hierdurch sollte eine Spaltung des aktiven hBD1red in die inaktiven Fragmente, hBD1red_AS1-29 und Heptapeptid, verhindert werden. Nach dieser Hypothese sollte daher hBD1red länger in seiner aktiven Form vorliegen und das bakterielle Wachstum über einen größeren Zeitraum inhibieren. Die Kontrolle zeigt ein konstantes Wachstum bei allen eingesetzten Inhibitormengen, sodass eine toxische Wirkung alleine durch den Proteaseinhibitormix ausgeschlossen werden kann. Dies lässt darauf schließen, dass bakterielle Proteasen hBD1red in die Fragmente

hBD1red_AS1-29 zerteilen können und das antimikrobielle Peptid somit inaktiviert werden kann. Durch die Inhibierung dieser Proteasen und den somit verhinderten Abbau von hBD1 ist die toxische Wirkung auf die Bakterien länger und stärker.

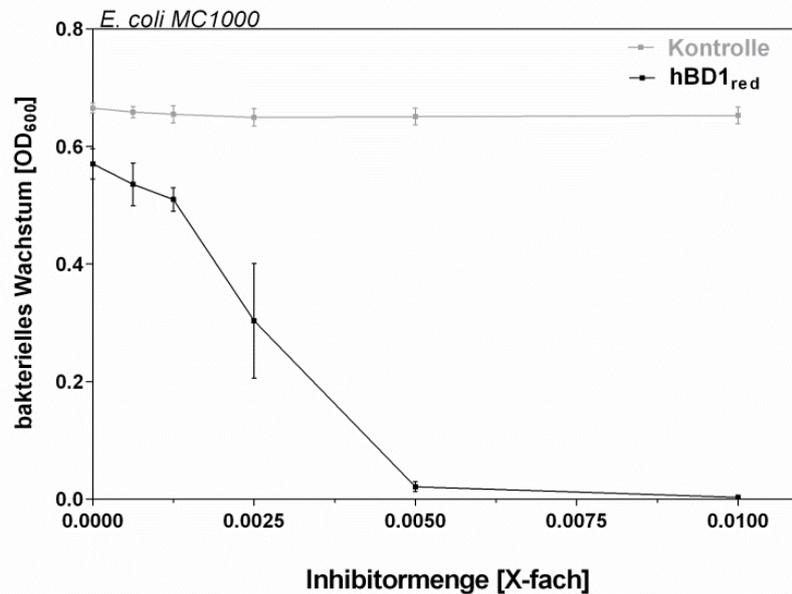


Abbildung 34: Einfluss von Protease-inhibitoren auf die hBD1red Aktivität

E. coli wurde mit unterschiedlichen Mengen an bakteriellen Proteaseinhibitoren-Mix inkubiert und anschließend hBD1red (schwarz) oder 0,01 % Essigsäure als Kontrolle (grau) zugegeben. Mittels OD₆₀₀ wurde eine Wachstumsgerade nach 6 h erstellt. Mit Zunahme der Inhibitormenge wird das bakterielle Wachstum weniger. Zu sehen ist der Mittelwert von drei voneinander unabhängige Experimente mit +/- SEM.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bakterien einen Abwehrmechanismus entwickelt haben, indem sie durch die Produktion von Proteasen hBD1 zerteilen können (Abbildung 34). Die entstehenden Fragmente verfügen über keine antibiotische Wirkung mehr. Dennoch ist das Hauptfragment (Aminosäure 1-29) in der Lage die Bakterien in einer Netzstruktur einzuschließen.

Im nächsten Kapitel wurde die Funktionalität der Netze überprüft und analysiert, inwiefern diese Netze Bakterien lokalisiert festhalten können und somit eine mögliche Verbreitung von Bakterien *in vivo* verhindert werden kann.

3.5. Funktioneller Nachweis der Netzstruktur

Um die Funktion der hBD1- Netze zu untersuchen, wurde überprüft, ob diese Netze die Translokation von Bakterien verhindern können. Dafür wurde ein Transmigrationsassay etabliert, bei diesem die Migration der Bakterien über ein Filter-Transwell System gemessen wurde.

3.5.1. Etablierung eines Transmigrationsassays

Für die Etablierung dieses Assays wurden Transwellfilter mit einem Porendurchmesser von $3\ \mu\text{m}$ verwendet. Diese Porengröße ermöglicht die Diffusion der Bakterien. Der Assay wurde mit *Klebsiella pneumoniae* durchgeführt. Dieses Bakterium weist eine Größe von $2\ \mu\text{m}$ auf und kann somit ohne Schwierigkeiten durch den Transwellfilter hindurch diffundieren. Auf den Filter wird zunächst das zu untersuchende Peptid pipettiert. Auf diesem nach kurzer Inkubationszeit die Bakteriensuspension zugegeben wird. Anschließend wird der Filter in ein Well mit vorgewärmten $400\ \mu\text{l}$ TSB-Medium gestellt. Während der Etablierungsphase wurden Inkubationszeit und weitere Parameter, welche im Material & Methodenteil (2.2.1.7) genauer beschrieben sind, festgelegt. Nach 1 h wurde der Filter aus dem Well entfernt und das Wachstum im verbliebenen TSB-Medium beobachtet. Es stellte sich heraus, dass nach weiteren 2 h Inkubation bei $37\ ^\circ\text{C}$ das optimalste Wachstum erzielt wird. Sind Peptide in der Lage ein Netz auszubilden, so wird ein geringes oder gar kein Bakterienwachstum im verbliebenen TSB-Medium detektiert. Dahingegen können Peptide ohne Netzbildung die bakterielle Diffusion durch die Membran nicht verhindern, was durch ein sehr hohes Bakterienwachstum im TSB-Medium angezeigt wird. Als Negativkontrolle wurde der Filter mit 0,01 % Essigsäure vorbehandelt, was nachweislich zu keinem Schaden der Bakterien führt, aber auch keine Netzbildung hervorruft. In Abbildung 35 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt.

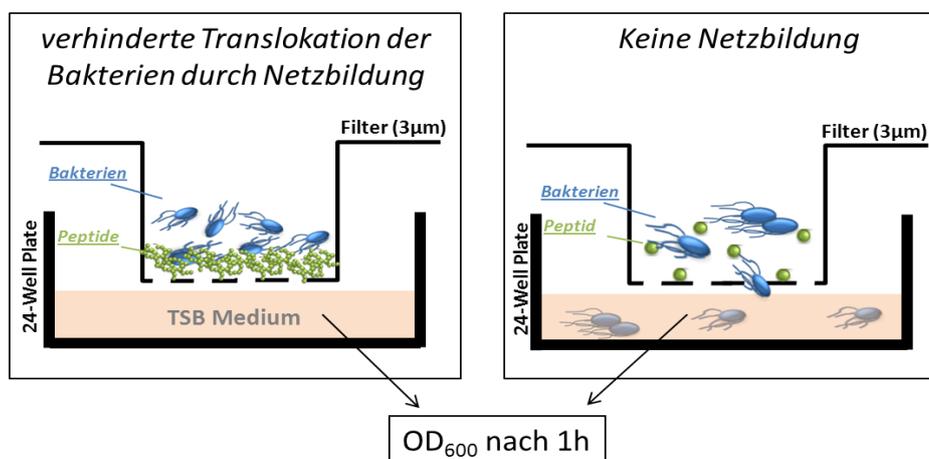


Abbildung 35: Schematisches Modell des Transwell Membran Assays

Bakterien welche durch das Netz gefangen wurden sind nicht mehr in der Lage durch die Membran in das TSB Medium zu diffundieren. Sobald keine Netzbildung zustande kommt können die Bakterien die Membran durchqueren und im unteren Abschnitt kann die optische Dichte nach 1 h gemessen werden.

3.5.1.1. *K. pneumoniae* als resistentes Bakterium gegen hBD1

Um falsch-positive Ergebnisse durch eine antibiotische Wirkung von hBD1_{red} auszuschließen, musste ein resistentes Bakterium gegen die zu testenden Peptide eingesetzt werden. Durch Vorwissen wurde bekannt, dass *K. pneumoniae* eine komplette Resistenz gegen hBD1_{ox} und hBD1_{red} im RDA aufweist. Um dies zu bestätigen, wurde ein Trübungsassay durchgeführt, um durch die sensitivere Methode genauere Erkenntnisse über die Aktivität der zu testenden Substanzen gegen *K. pneumoniae* zu gewinnen.

In Abbildung 36 wurde das Wachstum in % zur Positivkontrolle (inkubiert mit 0,01 % Essigsäure) nach 12 h bei unterschiedlichen Peptidmengen dargestellt. Die maximale Konzentration an Peptid waren 62,5 µmol. Jedoch wurde keine Wachstumshemmung oder Inhibierung des Wachstums bei allen getesteten Peptiden festgestellt. *K. pneumoniae* konnte deshalb als resistentes Bakterium für den Transmigrationsassay verwendet werden, da eine antimikrobielle Aktivität und somit eine geringere Anzahl an Bakterien im Assay ausgeschlossen werden konnte.

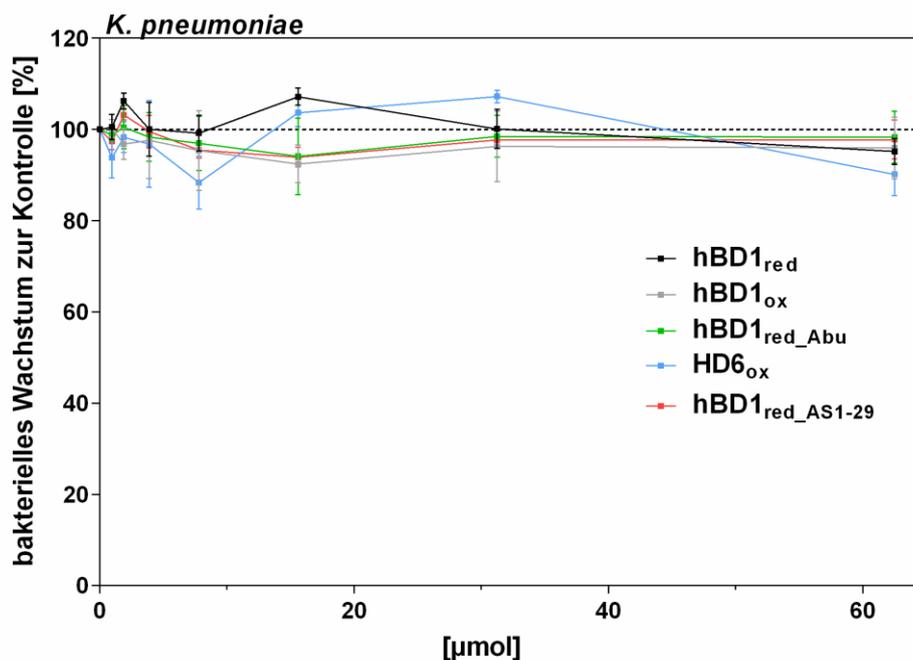


Abbildung 36: Aktivitätsmessung gegen *K. pneumoniae* mittels Trübungsassay

Die Wachstumshemmung nach 12 h wurde in einem Trübungsassay verfolgt und das Wachstum nach verschiedener Zugaben von Peptiden in % zur Positivkontrolle mit +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Positivkontrolle wurde mit 0,01 % Essigsäure behandelt.

3.5.2. HBD1 Netze verhindern bakterielle Diffusion

Für den funktionellen Nachweis von hBD1red und der damit verbundenen Diffusionsbarriere von Bakterien wurde das resistente Bakterium *K. pneumoniae* verwendet. Aus den vorherigen Daten zeigte sich, dass hBD1ox und hBD1red_Abu sich als Negativkontrolle eignen, da diese Peptide keine Netzstruktur ausbilden. Dagegen sollte hBD1red, sowie hBD1red_AS1-29 eine Diffusionsbarriere darstellen. Chu *et al*, 2012; Schroeder *et al*, 2014 zeigten, dass HD6ox und HD6red ebenfalls in der Lage sind Netze auszubilden. In diesem Versuch konnten diese Peptide somit als Positivkontrolle dienen. Nachdem die Membran mit dem jeweiligen Peptid vorinkubiert wurde und die Suspension aus *K. pneumoniae* dazugegeben wurde, konnte nach 2 h das bakterielle Wachstum detektiert werden. Dargestellt wurde das bakterielle Wachstum in % zur Positivkontrolle (Abbildung 37). Bei einer Inkubation mit hBD1ox und hBD1red_Abu konnte eine hohe Menge an bakteriellem Wachstum im unteren Well detektiert werden. Dies zeigt, dass Bakterien nicht zurückgehalten werden und durch den Filter und dessen Membran diffundieren können. Diese Daten gleichen sich zu den Ergebnissen aus dem REM, welche keine Netzbildung der Peptide mit Bakterien zeigen. Jedoch, wenn der Filter mit hBD1red, HD6ox, oder hBD1red_AS1-29 inkubiert wurde, konnte kein bakterielles Wachstum im TSB Medium detektiert werden. Aus diesem Assay lässt sich schlussfolgern, dass hBD1red funktionelle Netze ausbilden kann, welche die Bakterien einfängt und zurückhält und somit eine bakterielle Verbreitung stoppt ohne das eine zwingende antimikrobielle Wirkung vorhanden sein muss.

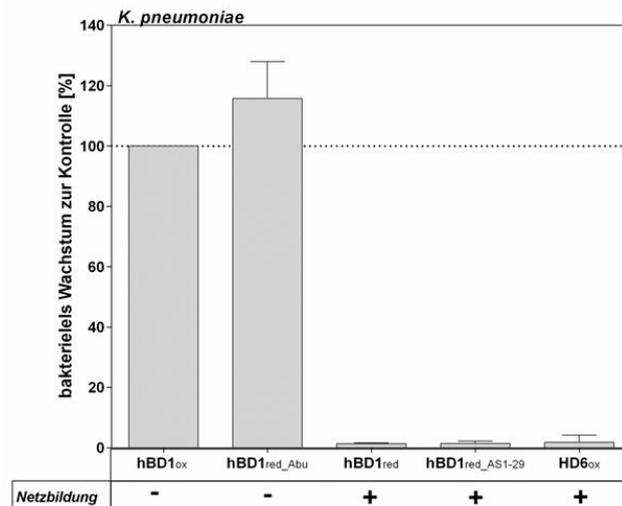


Abbildung 37: Transmigrationsassay mit *K. pneumoniae*

Nach zwei Stunden wurde das bakterielle Wachstums von *K. pneumoniae* im unteren Well gemessen und % zur Kontrolle (behandelt mit hBD1ox) aufgetragen. Keine signifikante Anzahl an Bakterien wurde bei Peptiden mit Netzbildung detektiert (hBD1red, hBD1red_AS1-29, HD6ox). Ohne Netzbildung wurde eine hohe Anzahl an Bakterien gemessen (hBD1ox, hBD1red_Abu). Dargestellt sind drei unabhängigen Experimenten mit +/- SEM.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Daten zu der antimikrobiellen Aktivität von verschiedenen Redoxformen von hBD1 erhoben werden. Neben der Analyse des Aktivitätsspektrums wurde das Zieltarget von hBD1 untersucht. Es konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein antimikrobielles Peptid mehrere Strategien aufweisen und Bakterien auf unterschiedliche Weise im Wachstum hemmen oder zerstören kann. Hierbei spielen die Umgebungsbedingungen eine entscheidende Rolle, da diese verantwortlich für die unterschiedlichen Wirkungsvarianten von hBD1 sind. Im letzten Kapitel wurden die Strategien der Bakterien untersucht, die es ihnen ermöglichen sich vor dem Angriff von hBD1 zu schützen. Dabei zeigte sich, dass bakterielle Proteasen in der Lage sind hBD1red zu spalten und somit dessen Wirkung abzuschwächen. Im Folgenden werden einige verwendete Methoden und erzielte Ergebnisse diskutiert und eine resultierende Hypothese über den *in vivo* Wirkmechanismus von den unterschiedlichen hBD1 Redoxformen ausgearbeitet.

4.1. Antimikrobielle Peptide als alternative Antibiotika

Werden Bakterien durch Verabreichung eines Antibiotikums über längeren Zeitraum dem gleichen Selektionsdruck ausgesetzt, so können diese Bakterien rasch eine Resistenz ausbilden. Daraus folgend gehören mittlerweile immer mehr Keime zu den multiresistenten Mikroorganismen (Davies & Davies, 2010; WHO | Antimicrobial resistance). Eine Behandlung von infektiösen Krankheiten, welche durch solche multiresistente Keime ausgelöst werden, stellt sich mittlerweile als große Herausforderung dar, da konventionelle Antibiotika oftmals keinen Behandlungserfolg mehr zeigen. Das Problem der konventionellen antibiotischen Medikamente ist oft, dass diese nur eine geringe Anzahl an spezifischen Zieltargets in den einzelnen Bakterien besitzen (Peschel & Sahl, 2006). Aufgrund des hohen Selektionsdruckes verändern sich Bakterien. Sie können unterschiedliche Strategien, wie eine Neuzusammensetzung ihrer Lipidschicht und Struktur gegen die einzelnen Wirkmechanismen der Antibiotika entwickeln und so eine Resistenz dagegen ausbilden (Lee *et al*, 2016). Deshalb werden neue Strategien benötigt, welche das immer größer werdende Resistenzproblem von Seiten der Bakterien bekämpft. Antimikrobielle Peptide stellen hier eine mögliche Alternative dar, da Mikroorganismen bis heute eine sehr geringe bis nicht nachweisbare Resistenzentwicklung zeigen (Peschel & Sahl, 2006). Humane antimikrobielle Peptide gehören zum angeborenen Immunsystem und zeigen ein sehr breites Wirkspektrum gegen Mikroorganismen und Viren.

Dennoch wird immer wieder diskutiert, warum seit der Entstehung dieser antimikrobiellen Moleküle kaum eine Resistenz bei Bakterien gebildet wurde.

Obwohl diese Peptide im humanen Organismus ständig exprimiert werden und Bakterien ständig diesen Selektionsdruck ausgesetzt sind, gibt es kaum nachweisliche Resistenzen gegenüber humanen Peptiden (Peschel & Sahl, 2006). Mögliche Erklärungen sind, dass verschiedene Peptide gleichzeitig exprimiert werden, welche wiederum unterschiedliche Mechanismen anwenden, um die Bakterien abzutöten. Dies erschwert die Bildung von Resistenzen. Zusätzlich sind die Zieltargets nicht sehr spezifisch, sodass z. B. das Membranpotential verändern wird oder das osmotische Gleichgewicht durch Peptide unspezifisch beeinflusst werden kann (Peschel & Sahl, 2006). Viele Mechanismen dieser antibiotischen Moleküle sind noch völlig unerforscht. Vereinzelt konnte schon der Wirkmechanismus von antimikrobiell aktiven Peptiden herausgefunden werden. Wie Anfangs erwähnt, führt ein Defensin aus der Hämolymphe eines Insekts, Insect-Defensin-A, zur Reduzierung der Kaliumkonzentration im bakteriellen Cytoplasma. Dagegen zerstört ein weiteres antimikrobielles Peptid, Buforin II aus der asiatischen Riesenkröte, keine Membranschichten, sondern diffundiert durch die Cytoplasmamembran und lagert sich dort mit Nukleinsäuren zusammen, was zum Absterben der Bakterien führt (Cociancich *et al*, 1993; Park *et al*, 1998; Brogden, 2005; Xie *et al*, 2011). Ein sehr häufiger Wirkmechanismus ist die Bildung von Poren in der bakteriellen Membran, was unter anderem für das humane β -Defensin 3 und das Cathelicidin LL-37 beschrieben wurde (Zaiou *et al*, 2003; Böhling *et al*, 2006; Lee *et al*, 2016). Dennoch ist der Wirkmechanismus von vielen humanen antimikrobiellen Peptiden noch nicht ganz verstanden und eine Aufklärung dieser evolutionsstabilen Mechanismen dringend nötig um weitere Strategien gegen die multiresistenten Keime zu finden.

4.1.1. hBD1- ein unterschätztes Defensin

Das humane β -Defensin 1 (hBD1) wurde 1995 zum ersten Mal aus dem Blutplasma isoliert (Bensch *et al*, 1995). Trotzdem war lange Zeit nach der Entdeckung die funktionelle Bedeutung von hBD1 im humanen Organismus unklar. Fraglich war, warum dieses Peptid, welches im Gegensatz zu anderen Peptiden konstant exprimiert wird, eine so geringe antibiotische Wirkung hervorruft. Erst kürzlich zeigten Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass hBD1 nach Reduktion der Disulfidbrücken zu einem sehr potenten antimikrobiellen Peptid wird (Schroeder *et al*, 2011b). HBD1 gehört zu der Klasse der Defensine. Es wird von vielen epithelialen Oberflächen, wie z.B. innerhalb des Gastrointestinal-/ Reproduktionstraktes, Niere, Mundhöhle, aber auch vom urogenitalen Epithels exprimiert (O'Neil *et al*, 1999; Schroeder *et al*, 2011b, 2012). Es besteht eine Assoziation zwischen DEFB1-Promotor-Polymorphismen und einer erhöhten *S. aureus* Kolonisierung (Nurjadi *et al*, 2013). Weitere Krankheiten wie Periodontitis, Psoriasis und chronischen entzündlichen Darmerkrankungen werden ebenfalls mit einer veränderten hBD1

Expression assoziiert (Hollox, 2008; Kocsis *et al*, 2008; Prado-Montes de Oca, 2010; Schaefer *et al*, 2010). Eine verringerte Menge an hBD1 wurde auch in Spermien von infertilen Männern festgestellt, die entweder eine erhöhte Anzahl von Leukozyten im Sperma (Leukozytospermie) oder eine verlangsamte Spermienbewegung (Asthenozoospermie) aufweisen (Diao *et al*, 2014). Weitere Daten zeigen, dass die Reduzierung von hBD1 *in vivo* über das vorhandene Thioredoxin-System, welches im Darm mit dem reduzierten hBD1 co-lokalisiert ist, gesteuert werden kann. Dies führt dazu, dass im humanen Organismus, abhängig von den Umgebungsbedingungen, verschiedene Redoxformen von hBD1 vorkommen können (Jaeger *et al*, 2013).

Erste Daten mit den unterschiedlichen Redoxformen zeigten, dass das Wirkspektrum sich deutlich von hBD1red zu hBD1ox unterscheidet (Abbildung 5). HBD1ox zeigte nur eine antimikrobielle Aktivität gegen die getesteten Gram-negativen Bakterien, dagegen war die reduzierte Form deutlich toxischer und zeigte keine Spezifität auf einen Gramstatus. HBD1red zeigte in Gram-negativen, aber auch in Gram-positiven Bakterien eine starke bakterizide Wirkung (Abbildung 5). Aufgrund der deutlichen Unterschiede in den einzelnen Wirkspektren wurden die Wirkmechanismen der einzelnen Redoxformen von hBD1 genauer untersucht.

4.2. Ein antimikrobielles Peptid mit multiplen Wirkmechanismen

In dieser Arbeit wurden die Unterschiede der beiden Redoxformen von hBD1 herausgearbeitet und deren Zieltargets charakterisiert und lokalisiert.

Im RDA wies hBD1ox antimikrobielle Aktivität ausschließlich gegen Gram-negative Bakterien auf, während hBD1red starke bakterizide Eigenschaften sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien in den RDAs zeigte. Die Durchmesser der Hemmhöfe bei *E. coli* waren von HBD1ox und hBD1red nahezu identisch. Die unterschiedlichen Redoxformen von hBD1 führen zu verschiedenen Tertiärstrukturen, welche sich in ihrer Diffusionsfähigkeit unterscheiden können. Daher ist der Durchmesser der Hemmhöfe nur ein Anhaltspunkt auf die antimikrobielle Wirksamkeit der beiden Varianten. Deshalb kann daraus keine Stärke der Aktivität ermittelt werden. Um die bakterizide Eigenschaft beider Formen zu vergleichen, wurde ein Trübungsassay durchgeführt. Anders als erwartet, konnte nur hBD1red die bakterielle Kultur von *E. coli* im Trübungsassay sterilisieren. Der sensitivere Trübungsassay zeigte, im Gegensatz zu der ähnlichen Aktivität beider Redoxformen im RDA, eine verringerte Aktivität von hBD1ox gegen *E. coli*. Dies kann entweder auf eine schwache bakterizide Wirkung von hBD1ox hinweisen, da nach einiger Zeit hBD1ox behandelte Bakterien nahezu die gleiche Wachstumskurve zeigten wie die Kontrolle. Möglicherweise ist auch ein indirekter Mechanismus von hBD1ox, wie das Auslösen von Autolyse im Inneren der Bakterien denkbar. Spätere Aufnahmen mittels REM zeig-

ten zudem deutliche Membranvesikel auf der Zelloberfläche. Die Bildung von Membranvesikel korreliert oft mit erhöhtem Zellstress und induzierter Zelllyse (Brogden, 2005; Chileveru *et al*, 2015). Diese generierten Daten zeigten, dass ein humanes Peptid je nach Umgebungsbedingung unterschiedliche Strategien für die antimikrobielle Aktivität besitzen kann.

Darüber hinaus ist es für ein konventionelles Antibiotikum nicht bekannt, dass es mehrere Wirkmechanismen aufweist, welche sich je nach Umgebungsbedingung unterscheiden. In weiteren Experimenten wurden die möglichen Zieltargets der einzelnen Redoxformen näher charakterisiert. Die bakterielle Zellhülle ist ein häufiges Zieltarget vieler antimikrobieller Peptide, welche durch unterschiedlichste Methoden die Bakterien im Wachstum einschränken oder sogar die Zelllyse auslösen können (Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Yount & Yeaman, 2013). Die ersten Hinweise für das mögliche Zieltarget von hBD1red konnten über einen Luciferase Assay generiert werden.

Hier löste das reduzierte hBD1 Zellhüllenstress bei den verwendeten *B. subtilis* Reporterstämmen aus. Allerdings konnte nach einer Inkubation mit oxidiertem hBD1 keine Stressreaktion der Zellhülle bei den Bakterien detektiert werden. Der angewendete Luciferase-Assay ist in diesem Kontext in seiner Aussage sehr limitierend, da hBD1ox gegen *B. subtilis* im RDA ohnehin kaum bis gar keine antimikrobielle Aktivität zeigte. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Membranaktivitätsassays durchgeführt, um genauere Aussagen über die möglichen unterschiedlichen Strategien der einzelnen Redoxformen von hBD1 zu bekommen. In zwei weiteren Assays (FACS, Membranpermeabilitätsassay) wurde wiederum die Zellhülle als Target von hBD1red nachgewiesen (Abbildung 8, Abbildung 9). In den einzelnen Versuchen wurde meist hBD3 als Positivkontrolle verwendet, da dieses ebenfalls Zellstress auslösen kann, indem es die Membran durch Porenbildung schädigt (Böhling *et al*, 2006; Yount & Yeaman, 2013). Beide Methoden zeigten den Verlust von Membranstabilität (Abbildung 7, Abbildung 8) und sogar einen kompletten Zusammenbruch des bakteriellen Membranpotentials (Abbildung 9). HBD1ox zeigte in diesen neuen Setups mit *E. coli* MC1000 ebenfalls keine Auswirkungen auf die Zellmembran, obwohl im RDA eine gleichstarke antimikrobielle Aktivität im Vergleich zu hBD1red detektiert werden konnte. Diese Daten zeigen, dass hBD1red eine Membranzerstörung als direkten antimikrobiellen Mechanismus aufweist. Dies waren die ersten Hinweise, dass hBD1ox und hBD1red definitiv unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen. Zudem weisen die Daten darauf hin, dass dieselbe Aminosäureabfolge mehrere Strategien gegen Mikroorganismen besitzen kann, wobei die Struktur des Peptids direkt von seiner Umgebung *in vivo* abhängig ist. Diese Tatsache wurde bisher noch nicht beschrieben. Die meisten Peptide zeigen keine unterschiedlichen Mechanismen innerhalb ihrer Redoxformen (Chu *et al*, 2012; Schroeder *et al*, 2014). Die Auswirkungen von hBD1red auf die Membran wurden in Kapitel 0 genauer diskutiert. Jedoch resultiert daraus die Frage, welche Angriffspunkte hBD1ox verwendet, um die Bakterien in ihrem Wachstum zu beeinträchtigen. Die Daten aus dem Trübungsassays zeigten ein deutlich verzögertes Wachstum.

Zusätzlich waren die Hemmhöfe in den RDAs relativ groß, was auf eine bakterizide Wirkung des Peptids hinweist. Um die einzelnen Strategien für den Wirkmechanismus genauer zu charakterisieren, wurde im Folgenden jede Redoxform separat untersucht. Hierbei wurden die Lokalisation und die bakterielle Morphologie betrachtet, um Rückschlüsse auf mögliche Zieltargets zu finden. Anschließend wurde mit entsprechenden Assays der mögliche Mechanismus genauer überprüft. Es wurde nach möglichen Interaktionspartnern von hBD1ox in den einzelnen bakteriellen Membranschichten in Gram-negativen Bakterien gesucht.

4.2.1. Die antimikrobielle Strategie von hBD1ox

Die antimikrobielle Aktivität von oxidiertem hBD1 zeigte hier deutlich eine Spezifität gegen Gram-negative Bakterien unter aeroben Bedingungen. Zudem ist die bakterizide Wirkung von hBD1ox in Versuchen mit Flüssigmedium deutlich schwächer als die reduzierende Redoxform von hBD1. Das natürliche Vorkommen von hBD1ox ist eher in Körperregionen mit Sauerstoffanwesenheit, wo infolgedessen Bakterien vorkommen, welche eine aerobe Lebensweise bevorzugen.

Einige Gram-negative Bakterien wie *A. baumannii* konnten in dem anaeroben Setup der hier durchgeführten Versuche nicht überleben, sodass nur *E. coli* und *S. enteritidis* unter anaeroben Bedingungen getestet wurde. Gerade Gram-negative Bakterien unterscheiden sich zu anderen Bakterien im Aufbau der Zellhülle, sowie dem Vorhandensein eines speziellen Redoxsystems im Periplasma, welches vor allem in aeroben Bedingungen aktiv ist (Messens & Collet, 2006; Heras *et al*, 2009; Paxman *et al*, 2009). Das Redoxsystem wurde in *E. coli* schon sehr detailliert untersucht, sodass es mit den Mechanismen von anderen Gram-negativen Bakterien verglichen werden kann (Heras *et al*, 2009). Die Hauptbestandteile dieses Redoxsystems sind zwei Oxidoreduktasen DsbA und DsbB, deren Bedeutung im nächsten Abschnitt ausführlicher diskutiert wird. Durch einen Vergleich des Gens von DsbA aus *E. coli*, mit verschiedenen anderen Bakterien, konnte z. B. eine 85,6 %ige Übereinstimmung mit einem Gen aus Gram-negativen *S. enteritidis* entdeckt werden (Heras *et al*, 2009). Da hBD1ox nur eine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien zeigt, wird möglicherweise das Redoxsystem indirekt oder direkt von hBD1ox zur Ausübung der antimikrobiellen Aktivität verwendet.

4.2.1.1. Das Redoxsystem ist essentiell für die Aktivität von hBD1ox

Die Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von hBD1ox auf verschiedene Bakterienmutanten mit Proteinknockout in bakteriellen Kompartimenten wie Außenmembran, Cytosol oder in dem oben genannten Redoxsystem (Abbildung 11) zeigt deutlich, dass die Oxidoreduktasen DsbA und DsbB eine essentielle Rolle bei der Aktivität von hBD1ox darstellen. Die Bakterien, welche kein DsbA oder DsbB mehr enthalten, weisen eine erhöhte Resistenz gegen hBD1ox auf.

Bakterien mit einem Doppelknockout von DsbA und DsbB werden komplett resistent gegen die oxidierte Form des Defensins. HBD1red hat trotz der Proteinknockouts eine unveränderte antimikrobielle Wirkung gegen die getesteten Mutanten. Dies verdeutlicht nochmals, dass diese Redoxform des Peptids einen anderen Wirkmechanismus besitzt, als die oxidierte Form.

Bakterien ohne DsbA zeigen eine stärkere Resistenz gegen hBD1ox im Vergleich zu Bakterien ohne DsbB. Der Grund hierfür könnte sein, dass das Protein DsbA Disulfidbrücken in ungefaltete Proteine einbaut und damit eine wichtigere Rolle in Bakterien spielt als DsbB. Diese Hypothese wurde durch eine Studie von Hiniker & Bardwell, 2004 belegt, welche zeigt, dass DsbA nicht durch andere Proteine ersetzt werden kann und somit ein Knockout im *dsbA*-Gen deutlich mehr Folgen und Auswirkungen haben kann, wie ein Fehlen von DsbB (Hiniker & Bardwell, 2004). DsbB ist für die Re-Oxidation zuständig, sodass DsbA in seinen Ausgangszustand überführt wird und weitere Disulfidbrücken in neue Proteine einbauen kann (Collet & Bardwell, 2002). Weitere Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass alle Gram-positiven Bakterien eine komplette Resistenz gegen hBD1ox aufweisen (Abbildung 10). Diese Bakterien besitzen aufgrund ihres Zellwandaufbaus kein mit DsbA und DsbB, aus Gram-negativen Bakterien, vergleichbares Redoxsystem (Heras *et al*, 2009). Diese Ergebnisse bestärken die generierte Hypothese, dass in Gram-negativen Bakterien die Anwesenheit von DsbA und DsbB notwendig für die antimikrobielle Aktivität von hBD1ox ist.

Aufgrund der fehlenden Periplasmaschicht und der verdickten Peptidoglykanschicht in Gram-positiven Bakterien müssen Peptide diese Membran erst überwinden oder zu einer Porenbildung fähig sein, um Bakterien angreifen oder schädigen zu können. Die durchgeführten Assays bestätigten, dass hBD1ox keine Membranschäden oder Depolarisierung der Membran verursacht (Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9).

Zusätzlich zeigen die bisherigen generierten Daten aber, dass hBD1ox durch die Außenmembran diffundiert und sich im Periplasma Gram-negativer Bakterien ansammelt. In diesem Kompartiment könnte hBD1ox mit dem dort lokalisierten Redoxsystem Gram-negativer Bakterien interagieren. Um die Vermutung zu bekräftigen, wurde im nächsten Schritt DsbA und DsbB auf zwei unterschiedlichen Plasmiden in den Doppelknockoutstamm konditionell exprimiert. Nach erfolgreicher Plasmidexpression, welche zuvor mittels Westernblot überprüft wurde, konnte die Sensitivität gegenüber hBD1ox wieder hergestellt werden. Diese Ergebnisse beweisen, dass eben diese Proteine, DsbA und DsbB, eine entscheidende Rolle bei der Aktivität von hBD1ox spielen. Dennoch ist immer noch nicht genau bekannt, an welcher Stelle des antimikrobiellen Prozesses DsbA und DsbB beteiligt sind und wie diese Proteine mit hBD1ox interagieren.

Es können ca. 300 Proteine, darunter 40 % Zellhüllenproteine und Proteine aus dem Fortbewegungsapparat als Substrat von DsbA zugeordnet werden (Bardwell *et al*, 1991; Vertommen *et al*, 2008; Dutton *et al*, 2008). Die beschriebenen Substrate von DsbA sind fast ausschließlich größere Proteine, weshalb hier überprüft wurde, ob kleine Peptide, wie das reduzierte hBD1,

auch über diesen Komplex oxidiert werden und somit als Substrat von DsbA dienen kann (Abbildung 15). Mittels Massenspektrometrie konnte die Oxidation von reduziertem hBD1 durch DsbA und DsbB nachgewiesen werden. In dem angewendeten Setup mittels Massenspektrometrie war eine Reduktion von oxidiertem hBD1 nicht nachweisbar. Jedoch ist es möglich, dass durch Anwesenheit weiterer Enzyme es *in vivo* zu einer Reduktion von hBD1 kommen kann. Trotzdem zeigten die hier generierten Daten, dass DsbA direkt mit einem Peptid interagieren kann und hBD1red direkt als Substrat dient.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass DsbA und DsbB eine Schlüsselrolle in der antimikrobiellen Aktivität von hBD1ox in *E. coli* spielen. Dies ist eine bisher unbeschriebene Strategie, was neue Einblicke in die Mechanismen der noch teils unerforschten Defensine bringt. Es konnte jedoch mittels massenspektrometrischer Methode, sowie weiteren Versuchen mit bakteriellen Knockoutmutanten nicht ausgeschlossen werden, dass das Redoxsystem mit DsbA und DsbB nur als ein sekundärer Faktor in der Aktivität von hBD1ox dient. Auf der Basis, dass die Doppelmutante eine unerwartete Resistenz gegen hBD1ox zeigte, wurde in den nächsten Versuchen diese Mutante im Vergleich zu *E. coli* Wildtyp untersucht, um die Ursachen der Resistenz zu untersuchen.

4.2.1.2. Lokalisierung von hBD1ox in *E. coli*

Um kleine Peptide, wie Defensine, in Bakterien nachweisen zu können und deren bakterielles Zieltarget zu identifizieren wurde hier eine spezielle Technik verwendet. Oft werden kleine Peptide von weniger als 6 kDa mit einem Fluoreszenzmarker versehen, um die Lokalisation untersuchen zu können (Sochacki *et al.*, 2011; Chileveru *et al.*, 2015). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch diese Fluoreszenzmarkierung die Struktur der Peptide und damit ihre Eigenschaften verändert werden. So wird möglicherweise das natürliche Ziel im Bakterium nicht erreicht, da das Fluorophor meist deutlich größer ist als das Peptid selbst. Zudem ist die Aktivität dieser antimikrobiellen Moleküle oft von ihrer Konformation abhängig (Schroeder *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2012; Schroeder *et al.*, 2014). Wie schon erwähnt führt eine Konformationsänderung von hBD1 zu seiner reduzierten Form zu einem starken Anstieg der antimikrobiellen Aktivität. Zusätzlich wird das Wirkspektrum von hBD1 mit offenen Disulfidbrücken deutlich erhöht, sodass auch Gram-positive Bakterien sensitiv auf hBD1red reagieren (Abbildung 10). Aus den genannten Gründen wurde für die Untersuchung der Lokalisation von hBD1 keine Fluoreszenzmarkierung verwendet. Anstelle einer Veränderung des nativen Peptides wurde hier eine Immunogoldfärbung angewendet.

Dafür wurden Bakterien erst jeweils mit den unterschiedlichen hBD1 Redoxformen inkubiert, anschließend fixiert und im Anschluss daran mit Hilfe von hBD1 spezifischen Antikörpern und Gold-gekoppelten Sekundärantikörpern die Lokalisation von hBD1 in den bakteriellen

Kompartimenten bestimmt. So kann die *in vivo* Lokalisation ohne Veränderung des Peptids und ohne potentielle Änderung auf dessen Eigenschaften spezifisch untersucht werden.

Die Aufnahmen zeigten deutlich, dass hBD1ox durch die Außenmembran diffundiert und in das Periplasma gelangt. Die Menge an hBD1ox war jedoch im Wildtyp deutlich geringer als in der Doppelknockoutmutante. Aufgrund der niedrigen Detektion von Goldpartikeln im Wildtyp bei gleicher Konzentration in der Doppelknockoutmutante wird von einer Zusammenlagerung von hBD1ox im Periplasma ausgegangen. Eine quantitative Aussage über die Menge an hBD1 in den einzelnen Bakterien ist somit noch nicht möglich, da nicht immer ein Goldpartikel ein Peptidmolekül repräsentiert. Es ist auch möglich, dass ein Goldpartikel eine undefinierte Menge an zusammen gelagerten Molekülen binden kann. Diese Technik gehört zu einer sehr spezifischen Nachweismethode ohne die Peptide in ihrer antimikrobiellen Aktivität einzuschränken oder zu verändern, die noch nicht oft eine Anwendung in der Wissenschaft gefunden hat (Brogden, 2005). Hierfür werden spezifische Antikörper für das Peptid benötigt, was oft eine große Herausforderung ist, da zu diesen kleinen Peptiden selten Antikörper zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper verwendet. Möglicherweise könnten monoklonale Antikörper ein noch exakteres Ergebnis liefern. Jedoch kann mittels dieser Methode keine Aussage über die Menge an Peptid in den unterschiedlichen Kompartimenten gemacht werden. Es bedarf hierfür weitere Techniken und Analysen mittels sensitiveren Methoden wie z. B. Elisa, HPLC oder Massenspektrometrie (QTOF), um die exakte Menge an hBD1ox in verschiedenen bakteriellen Komponenten nachzuweisen und zu bestimmen.

4.2.1.3. Ein möglicher Wirkmechanismus von hBD1ox

Bilder aus dieser Arbeit mittels REM zeigten, dass die Behandlung mit oxidiertem hBD1 zu einer großen Anzahl von Membranvesikeln auf der bakteriellen Oberfläche führt. Die Entstehung solcher Vesikel an der bakteriellen Oberfläche als Nebeneffekt der Anlagerung von antimikrobiellen Peptiden im Periplasma ist in der Literatur beschrieben und wird zusätzlich mit Zellstress assoziiert (Brogden, 2005; Chileveru *et al*, 2015). Eine visuelle Auswertung der Vesikel zeigte, dass eine Behandlung mit 0,01 % Essigsäure (Kontrolle) oder eine Behandlung der resistenten Doppelknockoutmutante mit hBD1ox eine geringere Vesikelanzahl hervorruft, als die Behandlung des Wildtyps mit hBD1ox. Dabei zeigt die resistente Doppelmutante im Vergleich signifikant weniger Membranvesikel. Die erhobenen Daten über die Lokalisation von hBD1ox zeigten anschaulich, dass hBD1ox sich in Gram-negativen Bakterien vor allem im Periplasma befindet, aber zugleich fand man in der resistenten Doppelmutante einen höheren Anteil von hBD1ox im Cytosol. Es wurde in einer schematischen Skizze ein hypothetischer Wirkmechanismus von hBD1ox aufgestellt (Abbildung 38).

Durch eine mögliche Peptidzusammenlagerung von hBD1ox könnte im Wildtyp die antimikrobielle Aktivität ausgelöst werden. Diese Hypothese der Peptidzusammenlagerung wird aufgrund der geringeren Anzahl an Goldpartikeln im Periplasma des Wildtyps bestärkt

(Abbildung 20). In der Mutante könnte zudem die hohe Anzahl an Goldpartikel durch vereinzelt vorliegende hBD1ox Moleküle zustande kommen. Mögliche Umgebungsbedingungen, wie das vorliegende Redoxpotential und aufgrund des DsbA/DsbB Systems im Periplasma könnte eine Ansammlung und eine daraus entstehende Dimerbildung oder Oligomerbildung von hBD1ox begünstigen. Durch die Zusammenlagerung könnte es zu den zuvor genannten Membranvesikeln (Abbildung 18) und schlussendlich zur Zellyse in Gram-negativen Bakterien kommen.

Ein nicht vorhandenes Redoxsystem mit DsbA und DsbB in Bakterien könnte eine Diffusion von einzelnen hBD1ox Molekülen in das Cytoplasma der resistenten Bakterien veranlassen, wo es dann vermutlich aufgrund der Verteilung von hBD1ox nicht zur Autolyse der Bakterien und zum Abbau von hBD1ox kommt. Eine hohe Konzentration an hBD1ox im Periplasma ist möglicherweise im Gegensatz zu hBD1red für dessen antimikrobielle Aktivität notwendig. Weitere Experimente sind jedoch noch nötig, um den genauen Transfer in das Cytoplasma zu verstehen. Zusätzlich muss die Frage, ob DsbA und DsbB direkt oder indirekt mit hBD1ox Molekülen agieren kann, vollständig geklärt werden.

Dennoch wurden DsbA und DsbB als notwendige Komponenten erstmalig in dieser Arbeit identifiziert, wodurch neue Erkenntnisse über die verschiedenen Strategien der Defensine und neue Anhaltspunkte für neue antimikrobielle Substanzen aufgezeigt wurden.

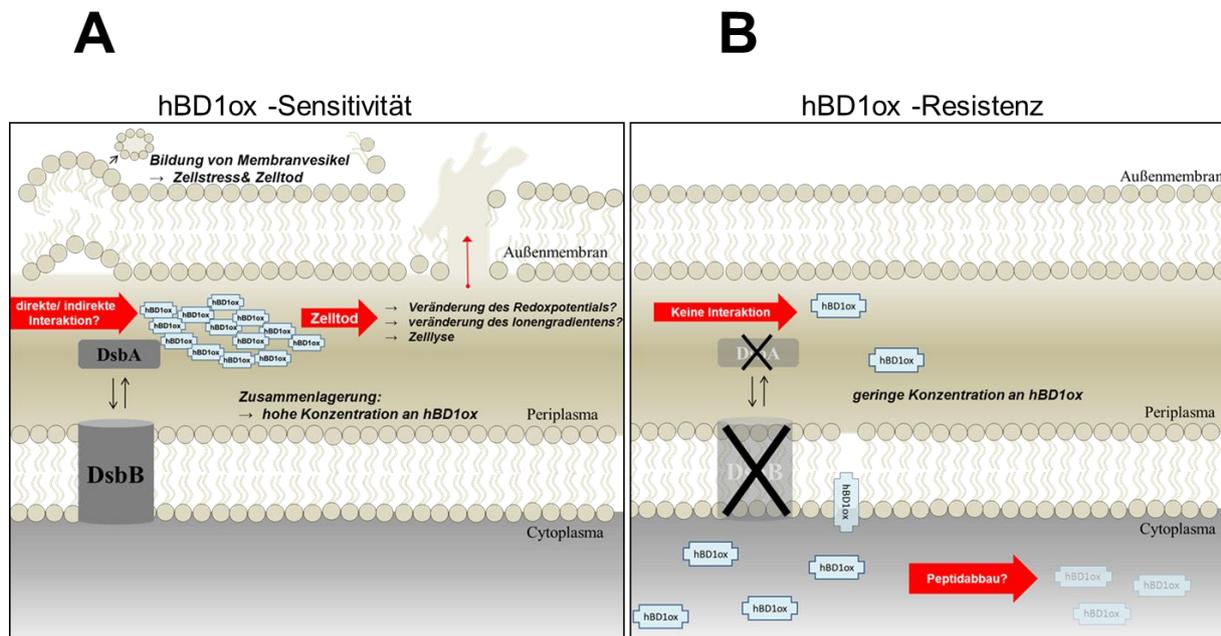


Abbildung 38: Hypothetisches Modell für den Wirkmechanismus von hBD1ox

(A) HBD1ox kann in das Periplasma diffundieren, wo es mit DsbA und DsbB interagiert. Daraufhin kommt es zu einer Ansammlung und Zusammenlagerung von hBD1ox im Periplasma, wodurch es zum einen zur Bildung von Membranvesikeln kommt und anschließend zur Induktion der bakteriellen Zellyse. (B) In resistenten Bakterien ohne das DsbA/DsbB Redoxsystem kann das hBD1ox bis in das Cytoplasma diffundieren. Aufgrund der Verteilung an hBD1ox im Cytoplasma kommt es zu keiner Zusammenlagerung, sodass keine bakterizide Wirkung gegen das Bakterium erzielt werden kann.

4.2.2. Aktivität von hBD1red

Im Gegensatz zu hBD1ox, welches nur strikt gegen Gram-negative Bakterien aktiv ist und abhängig von der Anwesenheit der beiden Redoxproteinen DsbA und DsbB ist, zeigt hBD1red starke bakterizide Eigenschaften gegen Gram-negative als auch gegen Gram-positive Bakterien. Zusammenfassend ist das Wirkspektrum von hBD1red um ein Vielfaches größer. Hinzu kommt, dass hBD1red deutlich toxischer ist als seine oxidierte Form (hBD1ox) (Abbildung 6). HBD1ox benötigt jedoch eine starke reduzierende Umgebung oder eine enzymatische Umwandlung um in hBD1red konvertiert werden zu können. *In vivo* ist es abhängig von der Körperregion, ob reduzierende oder oxidierende Bedingungen vorherrschen. Daten aus der Arbeitsgruppe zeigen, dass in der Mukusschicht des Dickdarms, parallel zum Thio-redoxin-System, reduziertes hBD1 vorkommt (Jaeger *et al*, 2013). Es stellte sich die Frage, welche Eigenschaften hBD1red besitzt, um ein breiteres Wirkspektrum und eine stärkere antimikrobielle Aktivität, im Gegensatz zu hBD1ox, zu erzielen. Die Aktivität von hBD1ox ist, wie zuvor erwähnt, abhängig von bestimmten bakteriellen Komponenten in Gram-negativen Bakterien. Deshalb wurde eine Aktivität von hBD1ox auf Gram-positive Bakterien noch nicht beobachtet.

Doch welche veränderten antimikrobiellen Mechanismen besitzt hBD1red, die ein solches, auf Gram-positive Bakterien ausgedehntes Spektrum seiner bakteriziden Wirkung möglich machen?

4.2.2.1. HBD1red attackiert die bakterielle Membran

Aufnahmen der bakteriellen Morphologie mittels Transmissionselektronenmikroskop zeigten nochmals deutlich, dass hBD1ox eine Membranvesikelbildung in Bakterien auslösen kann ohne messbare und sichtbare Membranschäden an den Außenmembranen oder im Cytosol zu verursachen. Änderungen in der Morphologie, wie Elongation, Zusammenklumpen der Bakterien oder Teilungsschwierigkeiten, wurden bei beiden Redoxformen von hBD1 nicht beobachtet. Andere Arbeiten, z. B. mit HD5, zeigten allerdings morphologische Änderungen, wie Elongation als Wirkmechanismus des Defensins auf Bakterien. Bakterien, welche mit HD5 inkubiert wurden, zeigten meist eine große Membranausstülpung in der Region um das Septum auf. Zusätzlich war eine Teilung der Bakterien nicht mehr zu erkennen (Chileveru *et al*, 2015).

HBD1 führt wiederum zu anderen Schäden in den Bakterien. Wie in dieser Arbeit gezeigt, weisen Bakterien nach einer hBD1red Inkubation deutliche Membranverletzungen auf. Dies veranschaulicht nochmals die unterschiedlichen Wirkmechanismen von hBD1ox und hBD1red. Nur nach hBD1red Inkubation lösten sich ganze Membranstücke der Außenmembran komplett von der Innenmembran ab, was zu einem Absterben der Bakterien führte (Abbildung 23). Diese Aufnahmen bestätigen noch einmal die starke bakterizide Wirkung von hBD1red aus dem RDA, sowie den detektierten Membranschäden aus den Luciferase Assays, Membran-

permeabilitätsassays und der FACs-Analyse. Erst kürzlich wurde bekannt, dass ein weiteres Defensin in seiner reduzierten Form stärker antimikrobiell aktiv sein kann. Schroeder *et al*, 2014 zeigte Daten zur antimikrobiellen Aktivität von reduziertem HD6. Die mit HD6 behandelten Bifidobakterien wiesen deutliche Membranschäden auf, zusätzlich löste sich die Außenhülle vom Cytosol ab. Es konnte aber kein unterschiedlicher Wirkmechanismus zwischen der oxidierten und reduzierten Form von HD6 festgestellt werden. Die genaue Lokalisation dieses antimikrobiellen Peptids innerhalb der Bakterien wurde deshalb auch nicht untersucht. Dennoch ist bekannt, dass HD6ox und HD6red eine Netzstruktur um die Bakterien ausbilden können (Chu *et al*, 2012; Schroeder *et al*, 2014).

Um genauere Angaben über die Lokalisation und die Eigenschaften von hBD1red zu erfahren, wurde die gleiche Technik wie bei der hBD1ox Lokalisation verwendet. HBD1red konnte in großen Mengen entlang der bakteriellen Außenmembran und teilweise an einzelnen abgelösten Membranstücken detektiert werden (Abbildung 24). Eine Analyse der Oberflächenstruktur mittels Rasterelektronenmikroskop zeigte überraschenderweise eine deutliche netzartige Struktur, welche die Bakterien umhüllt. Um diese Netzstruktur genauer zu untersuchen, wurde diese zunächst auf die Eigenschaften des HD6-Netzes untersucht. Die Netzbildung dieses α -Defensins ist aber stark abhängig von der Anwesenheit bakterieller Komponenten wie z. B. Flagellen der Salmonellen. Allerdings zeigte die Analyse mit Protein A- gebundenen Beads, sowie mit hBD1red alleine, dass hBD1red keine weiteren externen Faktoren benötigt, um eine netzartige Struktur auszubilden. Erstaunlicherweise zeigte hBD1ox keine Netzbildung, was die unterschiedlichen Eigenschaften der Redoxformen nochmals unterstreicht. Eine weitere Charakterisierung zeigte auch, dass die Cysteine wichtige Bestandteile in der Netzbildung darstellen. Ein Aminosäureaustausch durch ein Cysteinanalogon verhinderte die Netzbildung von HD6 nicht (Schroeder *et al*, 2014). HBD1 besitzt sechs Cysteine, welche sich in der oxidierten Redoxform zu drei Disulfidbrücken verzweigen können. In der reduzierten Form sind alle Disulfidbrücken geöffnet, sodass freie Schwefelbrücken für eine tertiäre intramolekulare Verknüpfung frei sind. Damit könnte ein Netzwerk aus den einzelnen Molekülen gebildet werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden alle Cysteine durch ein Aminosäureanalogon, α -Aminobuttersäure (hBD1red_Abu) ersetzt. Im REM zeigte sich deutlich, dass hBD1red_Abu nicht mehr in der Lage war diese Netzstruktur auszubilden. Somit wurde deutlich, dass Cysteine essentiell sind und diese Netzbildung verursachen indem sich womöglich zwischen den Cysteinen der einzelnen Molekülen Wechselwirkungen ergeben und eine mögliche Verbindung über diese Aminosäuren entsteht. Dies wird auch an der verminderten Aktivität von hBD1red_Abu deutlich. Die starke bakterizide Wirkung von hBD1red lässt sich nur durch den zusätzlichen Mechanismus, das Einfangen von Bakterien mittels eines Netzes, erklären. Diese Beobachtungen zeigen nochmals deutlich, dass es sich hier um ein Peptid mit unterschiedlichen Strategien für die antimikrobielle Aktivität handelt und das Wirkspektrum durch diese multiplen Eigenschaften deutlich erweitert.

4.3. Abwehrmechanismus von Bakterien auf hBD1

Um den Wirkmechanismus von hBD1 komplett zu verstehen, muss auch die Reaktion von Bakterien auf hBD1 genauer untersucht werden. Nach einer Behandlung mit synthetisch reduziertem hBD1, aber auch mit *ex vivo* reduziertem hBD1 mittels Thiothionin, wurde im Überstand von *E. coli* nicht das Volllängenpeptid mit 36 Aminosäuren festgestellt, sondern eine verkürzte Version mit 29 Aminosäuren. Aus der Arbeitsgruppe war schon bekannt, dass möglicherweise auch humane Proteasen diese verkürzte Version *ex vivo* produzieren können (Schroeder *et al*, 2011b, 2011a). Andere Arbeiten zeigen, dass einige Peptide durch Proteolyse von größeren Proteinen *in vivo* abgeschnitten werden, z. B. Buforin II oder Lactoferricin (Kim *et al*, 2000; Ulvatne & Vorland, 2001; Zasloff, 2002). *Porphyromonas gingivalis* sekretiert ebenfalls eine Protease welche Peptide, darunter LL-37, inaktivieren und zerstören kann (Gutner *et al*, 2009). Es wurde jedoch bisher nicht beschrieben, dass auch Bakterien in der Lage sind, hBD1red auf diese 29 Aminosäuren zu verkürzen.

Das aus dem bakteriellen Überstand gefundene, verkürzte Fragment von hBD1red (hBD1red_AS1-29) wurde auf seine antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*, *B. subtilis* und *S. aureus* getestet (Abbildung 30). Erstaunlicherweise zeigte dieses Peptid und seine 7 restlichen Aminosäuren keinerlei Wirkung auf die getesteten Bakterien, unabhängig von ihrem Gramstatus. Allerdings zeigte hBD1red_AS1-29 gegen *B. subtilis* einen leichten Zellhüllenstress, weshalb auch hier die bakterielle Oberfläche überprüft wurde. Interessanterweise zeigt das verkürzte Fragment, hBD1red_AS1-29, trotz der fehlenden antimikrobiellen Aktivität die identische Eigenschaft der Netzbildung wie das Volllängenpeptid. Die Fähigkeit zur Netzbildung des verkürzten Defensins verhindert damit im humanen Organismus trotzdem eine Verbreitung von Bakterien. Wie bereits erwähnt, sind humane Proteasen *ex vivo* in der Lage hBD1 zu fragmentieren. Um herauszufinden, ob auch bakterielle Proteasen für die Herstellung dieser verkürzten Version von hBD1red verantwortlich sind, wurden bakterielle Proteaseinhibitoren verwendet.

Die erhobenen Daten zeigen deutlich, dass durch Zugabe des bakteriellen Proteaseinhibitormixes zu den Bakterien, die Aktivität von hBD1red deutlich länger nachweisbar ist. Dies sind erste Hinweise, dass die bakteriellen Proteasen für die verkürzte Version von hBD1red zuständig sind. Eine Blockierung der Enzyme verhindert somit die Bildung der verkürzten Version von hBD1red und die bakterizide Wirkung der Volllängen-Version des hBD1 bleibt erhalten. Die verantwortliche Protease wurde noch nicht identifiziert, da Bakterien verschiedene Proteasen verwenden, um sich gegen antimikrobielle Peptide zu wehren (Guina *et al*, 2000). *S. aureus* produziert unter anderem eine Metalloprotease Aureolysin und eine Serin-endopeptidase V8. Beide sind in der Lage LL-37 zu zerschneiden und dieses somit zu inaktivieren (Sieprawska-Lupa *et al*, 2004). Die Abwehrstrategien gegen hBD1 von Seiten der Bakterien wurden bisher noch nicht ausreichend untersucht.

Diese Arbeit zeigt erste Anhaltspunkte, dass auch Bakterien in der Lage sind die toxischen Strategien dieser antimikrobiellen Moleküle zu umgehen, indem durch bakterielle Proteasen eine verkürzte ineffektive Version von hBD1red entsteht. Diese Proteasen können hBD1 jedoch nicht komplett inaktivieren und so die Netzbildung nicht unterdrücken. Die Verbreitung der Bakterien wird durch die Ausbildung des Netzes somit verhindert. Um die verantwortlichen Proteasen zu identifizieren müssten in weiteren Assays unterschiedliche Inhibitorencocktails getestet werden. Da Serinproteasen häufig eine Peptidinhibierung auslösen können, wie unter anderem bei LL-37, wäre eine Inhibierung von Serinproteasen ein nächster Versuchsansatz, um mehr Details über die hBD1red Fragmentierung zu erhalten (Sørensen *et al*, 2001; Schmidtchen *et al*, 2002). Weitere Hinweise, um welche Protease es sich hierbei handelt, könnte die Verwendung von Bakterien mit spezifischen Knockouts in verschiedenen Proteasegenen ergeben.

Da es im Körper immer eine Expression von verschiedenen antimikrobiellen Peptiden gibt, ist es für die Bakterien erschwert Resistenzen gegen diese evolutionsstabilen Peptide auszubilden (Zasloff, 2002). Die Tatsache, dass es in Bakterien dennoch Abwehrsysteme gibt, welche die Peptide inaktivieren und so den bakteriziden Wirkungsmechanismus blockieren, zeigten nochmals deutlich, dass die bakteriellen Mechanismen verstanden werden müssen, damit in Zukunft effektive antibakterielle Strategien entwickelt werden können.

4.4. Funktioneller Nachweis der Netze

Um die mögliche Funktion der Netze *in vivo* zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein spezieller Assay entwickelt. Mit Hilfe dieses funktionellen Nachweises sollte ermittelt werden, ob die Netze Bakterien tatsächlich an einer Translokation hindern können. Dazu wurde ein Assay etabliert, bei diesem hBD1 auf einem Membranfilter gegeben und die Menge an diffundierenden Bakterien gemessen wurde. Für diesen Versuch musste ein gegen hBD1 resistenter Keim gefunden werden, damit die Anzahl an diffundierten Bakterien nicht durch die antimikrobielle Aktivität verfälscht wird.

Für den Membranassay wurde *K. pneumoniae* verwendet, welcher sich als resistent gegen alle hBD1 Redoxformen herausstellte. Aufgrund dieser Eigenschaften ist *K. pneumoniae* optimal für diesen Versuch geeignet. Dieser Membranassay zeigt, dass die Netzbildung von reduziertem hBD1 die Migration von *K. pneumoniae* deutlich reduziert und nur wenige bis keine Bakterien das untere Well durch die mit hBD1 inkubierte Filtermembran erreichen konnten. Auch die verkürzte Version von hBD1 (hBD1red_AS1-29), welche antimikrobiell inaktiv, aber zur Netzbildung fähig ist, führt zu einer verminderten Migration der Bakterien. Dasselbe Ergebnis war mit HD6 zu erkennen, welches in diesem Fall als positive Kontrolle diente, da dessen Mechanismus schon aufgeklärt wurde (Chu *et al*, 2012; Schroeder *et al*, 2014). Die Beobachtungen

mit hBD1red sind in Übereinstimmung mit Chu et al., 2012, deren Arbeit die Relevanz von HD6 Netzen *in vivo* mittels transgenen HD6 Mäusen zeigte. In diesem Modell können HD6 Netze Salmonellen im Darmgewebe lokalisiert halten und vor einer weiteren Verbreitung und einer stärkeren Infektion in der Maus schützen. Dennoch ist das Expressionsmuster von hBD1 viel breiter, denn mehrere Epithelzellen sind in der Lage an verschiedenen Stellen im humanen Organismus hBD1 unterschiedlich stark zu exprimieren. Somit könnte hiermit behauptet werden, dass durch dieses große Expressionsmuster die Abwehrreaktion noch stärker ist und damit ein viel breiteres Wirkungsspektrum erreicht wird.

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein Peptid mehrere Strategien besitzen kann um gegen Bakterien antimikrobiell wirksam zu sein. In dieser Arbeit wurden die speziellen Eigenschaften von den einzelnen Redoxformen von hBD1 untersucht, sowie dessen Wirkmechanismen genauer charakterisiert. Die reduzierte Form ist in der Lage die Bakterien in eine Netzstruktur einzuwickeln. Damit ist die Translokation durch das Epithel erschwert, was eine weitere Verbreitung der Bakterien verhindert (schematisches Modell, siehe Abbildung 39).

Zusätzlich ist dieser Mechanismus unabhängig von der Ausprägung der antimikrobiellen Aktivität und der Anwesenheit von Bakterien, weshalb das Netz auch resistente Keime einschränken kann (z. B. *K. pneumoniae*). Im Gegensatz zu den bekannten Mechanismen wie HD6, zeigt HBD1 mit seinen zwei unterschiedlichen Strategien einen völlig anderen und bisher noch unbekanntem Mechanismus. Nur die reduzierte Form von hBD1 kann Bakterien zusätzlich zu der starken bakteriziden Wirkung durch ein Netz vor einer weiteren Verbreitung hindern. Diese Netzbildung zeigte sich unabhängig von bakteriellen Faktoren. Dies ist im Gegensatz zu HD6, welches nur eine Netzstruktur in Anwesenheit von bestimmten bakteriellen Komponenten ausbilden kann. Dennoch wird auch in oxidierenden Körperregionen ein Schutz gegen Pathogene erreicht, welcher unabhängig von einer sekundären Enzymreaktion (Thioredoxin System) oder Sauerstoffabwesenheit ist. Oxidiertes hBD1 zeigt im Gegensatz zu reduziertem hBD1 eine spezifische antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien.

Die Arbeit zeigte wesentliche bakterielle Proteine, welche für die Aktivität von hBD1ox notwendig sind. Es konnten zwei Oxidoreduktasen, DsbA und DsbB, als essentielle Faktoren für diese Wirksamkeit identifiziert werden. Die Mechanismen der einzelnen Redoxvarianten sind noch nicht vollständig aufgeklärt, dennoch könnten diese Ansätze wichtig sein, um neue therapeutische Strategien gegen Bakterien zu entwickeln. Die Vielfältigen Strategien der einzelnen Peptide zeigen deutlich, warum es seit Millionen Jahren den Mikroorganismen nicht möglich war, die Abwehrreaktionen des Immunsystems zu überwinden oder Resistenzen gegen diese

antimikrobiell aktiven Moleküle zu erlangen (Peschel & Sahl, 2006). Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass es ebenso wichtig ist zu den einzelnen Peptiden auch die vorkommenden Umgebungsbedingungen individuell zu beachten, anstatt einen generellen Mechanismus für die Peptide zu suchen.

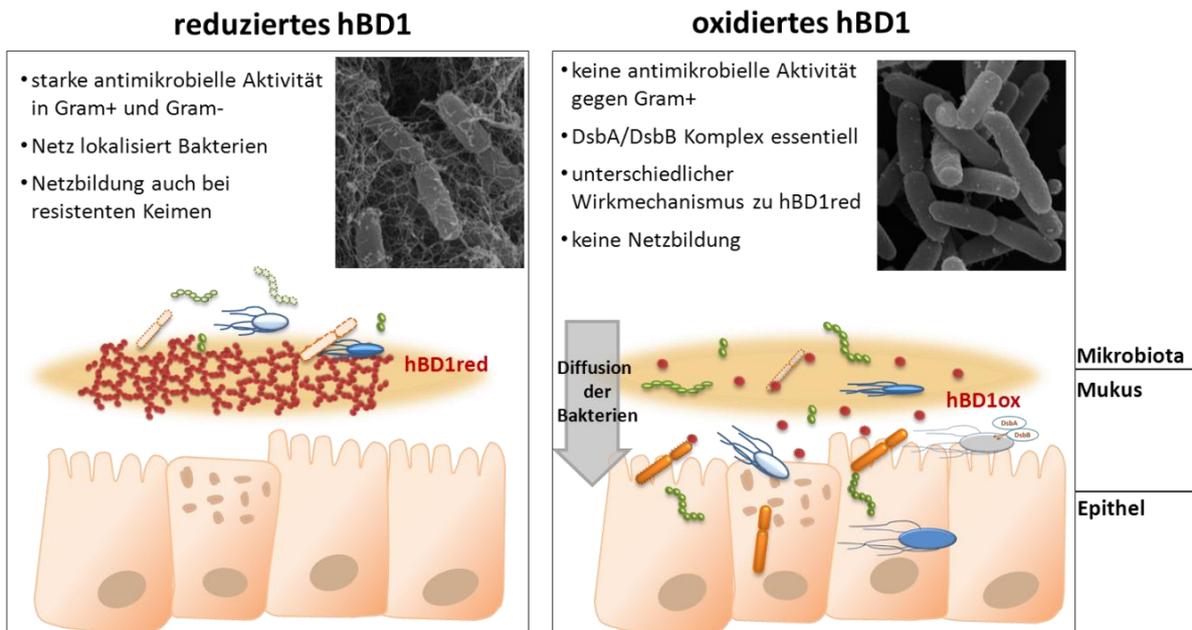


Abbildung 39: Grafische Darstellung der unterschiedlichen Strategien von hBD1

Reduziertes hBD1 verhindert durch seine Netzbildung die Diffusion von Bakterien, unabhängig von dessen Gram-status. Auch resistente Keime können durch dieses Netz vor einer Translokation abgehalten werden. Das oxidierte hBD1 benötigt dagegen spezifische Komponenten, wie das DsbA/DsbB-System, um antimikrobiell aktiv sein zu können. Zum Wirkspektrum gehören hier nur Gram-negative Bakterien. Das Vorkommen von beiden Redoxformen von hBD1 erweitert die antimikrobiellen Strategien eines humanen Organismus enorm und erschwert eine Resistenzbildung von Seiten der Bakterien.

Literatur

- Van Amersfoort ES, Van Berkel TJC & Kuiper J (2003) Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 379–414
- Arredondo SA, Chen TF, Riggs AF, Gilbert HF & Georgiou G (2009) Role of dimerization in the catalytic properties of the Escherichia coli disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **284**: 23972–23979
- Autenrieth I (2003) Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *J. Für Gastroenterol. Hepatol. Erkrank.* **1**: 14–17
- Bainbridge BW, Coats SR, Pham T-TT, Reife RA & Darveau RP (2006) Expression of a Porphyromonas gingivalis lipid A palmitoyltransferase in Escherichia coli yields a chimeric lipid A with altered ability to stimulate interleukin-8 secretion. *Cell. Microbiol.* **8**: 120–129
- Bals R (2000) Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Med. Klin.* **95**: 496–502
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M & Wilson JM (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* **102**: 874–880
- Bardwell JC, McGovern K & Beckwith J (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**: 581–589
- Becker S, Oelschlaeger TA, Wullaert A, Vlantis K, Pasparakis M, Wehkamp J, Stange EF & Gersmann M (2013) Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**: e55620
- Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P & Forssmann WG (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**: 331–335
- Bevins C & Salzman N (2011) The potter's wheel: the host's role in sculpting its microbiota. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**: 3675–3760
- Bischoff SC (2009) Probiotika, Präbiotika und Synbiotika 1st ed. Thieme, Stuttgart
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO & Piddock LJV (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 42–51
- Böhling A, Hagge SO, Roes S, Podschun R, Sahly H, Harder J, Schröder J-M, Grötzinger J, Seydel U & Gutschmann T (2006) Lipid-Specific Membrane Activity of Human β -Defensin-3. *Biochemistry (Mosc.)* **45**: 5663–5670
- Bonilla FA & Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**: S33–40
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**: 1532–1535
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 238–250

- Carmel-Harel O & Storz G (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 439–461
- Cederlund A, Gudmundsson G & Agerberth B (2011) Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* **278**: 3942–3993
- Chen J, Song JL, Zhang S, Wang Y, Cui DF & Wang CC (1999) Chaperone activity of DsbC. *J. Biol. Chem.* **274**: 19601–19605
- Chileveru HR, Lim SA, Chairatana P, Wommack AM, Chiang I-L & Nolan EM (2015) Visualizing Attack of *Escherichia coli* by the Antimicrobial Peptide Human Defensin 5. *Biochemistry (Mosc.)* Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/bi501483q> [Accessed February 16, 2015]
- Chu H, Pazgier M, Jung G, Nuccio S-P, Castillo PA, de Jong MF, Winter MG, Winter SE, Wehkamp J, Shen B, Salzman NH, Underwood MA, Tsohis RM, Young GM, Lu W, Lehrer RI, Bäumlner AJ & Bevins CL (2012) Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* **337**: 477–481
- Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA & Letellier L (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19239–19245
- Collet J-F & Bardwell JCA (2002) Oxidative protein folding in bacteria. *Mol. Microbiol.* **44**: 1–8
- Courth LF, Ostaff MJ, Mailänder-Sánchez D, Malek NP, Stange EF & Wehkamp J (2015) Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 14000–14005
- Davey L, Ng CKW, Halperin SA & Lee SF (2013) Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Streptococcus gordonii*. *J. Biol. Chem.* **288**: 16416–16429
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ & Turnbaugh PJ (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**: 559–563
- Davies J & Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **74**: 417–433
- Diao R, Fok KL, Chen H, Yu MK, Duan Y, Chung CM, Li Z, Wu H, Li Z, Zhang H, Ji Z, Zhen W, Ng CF, Gui Y, Cai Z & Chan HC (2014) Deficient human β -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Sci. Transl. Med.* **6**: 249ra108
- Didierlaurent A, Sirard J-C, Kraehenbuhl J-P & Neutra MR (2002) How the gut senses its content. *Cell. Microbiol.* **4**: 61–72
- Dorenbos R, Stein T, Kabel J, Bruand C, Bolhuis A, Bron S, Quax WJ & Van Dijk JM (2002) Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. *J. Biol. Chem.* **277**: 16682–16688
- Dramsı S, Magnet S, Davison S & Arthur M (2008) Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 307–320

- Dumoulin A, Grauschopf U, Bischoff M, Thöny-Meyer L & Berger-Bächi B (2005) Staphylococcus aureus DsbA is a membrane-bound lipoprotein with thiol-disulfide oxidoreductase activity. *Arch. Microbiol.* **184**: 117–128
- Dutton RJ, Boyd D, Berkmen M & Beckwith J (2008) Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11933–11938
- van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo MM & Clevers H (2005) Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* **7**: 381–386
- Finland M (1979) Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. *Rev. Infect. Dis.* **1**: 4–22
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N & Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 13780–13785
- Gallo RL & Hooper LV (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* **12**: 503–516
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 710–720
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF & Lehrer RI (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**: 1427–1435
- Garrett W, Gordon J & Glimcher L (2010) Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* **140**: 859–929
- Gilson E, Alloing G, Schmidt T, Claverys JP, Dudler R & Hofnung M (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in Mycoplasma. *EMBO J.* **7**: 3971–3974
- Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG & Ley RE (2014) Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* **159**: 789–799
- Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF & Veldhuyzen van Zanten SJO (2006) Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4136–4141
- Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Wolfsberg TG, Turner ML & Segre JA (2008) A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* **18**: 1043–1050
- Grice E & Segre J (2011) The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 244–297
- Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M & Miller SI (2000) A PhoP-Regulated Outer Membrane Protease of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Promotes Resistance to Alpha-Helical Antimicrobial Peptides. *J. Bacteriol.* **182**: 4077–4086
- Gutner M, Chaushu S, Balter D & Bachrach G (2009) Saliva enables the antimicrobial activity of LL-37 in the presence of proteases of Porphyromonas gingivalis. *Infect. Immun.* **77**: 5558–5563

- Hancock IC (1997) Bacterial cell surface carbohydrates: structure and assembly. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 183–187
- Harder J, Bartels J, Christophers E & Schröder JM (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**: 861
- Harder J, Bartels J, Christophers E & Schröder J-M (2001) Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**: 5707–5713
- Harder J, Gläser R & Schröder J-M (2007) Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin Res.* **13**: 317–338
- Heras B, Kurz M, Jarrott R, Shouldice SR, Frei P, Robin G, Cemazar M, Thöny-Meyer L, Glockshuber R & Martin JL (2008) Staphylococcus aureus DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding. *J. Biol. Chem.* **283**: 4261–4271
- Heras B, Shouldice SR, Totsika M, Scanlon MJ, Schembri MA & Martin JL (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 215–225
- Hill CP, Yee J, Selsted ME & Eisenberg D (1991) Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science* **251**: 1481–1485
- Hiniker A & Bardwell J (2004) In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **279**: 12967–13040
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA & Ezekowitz R a. B (1999) Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **284**: 1313–1318
- Holland KT, Cunliffe WJ & Roberts CD (1977) Acne vulgaris: an investigation into the number of anaerobic diphtheroids and members of the Micrococcaceae in normal and acne skin. *Br. J. Dermatol.* **96**: 623–626
- Hollox EJ (2008) Copy number variation of beta-defensins and relevance to disease. *Cytogenet. Genome Res.* **123**: 148–155
- Horrevorts AM, Borst J, Puyk RJ, De Ridder R, Dzoljicdanilovic G, Degener JE, Kerrebijn KF & Michel MF (1990) Ecology of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* **31**: 119–124
- Ishihara T, Tomita H, Hasegawa Y, Tsukagoshi N, Yamagata H & Udaka S (1995) Cloning and characterization of the gene for a protein thiol-disulfide oxidoreductase in Bacillus brevis. *J. Bacteriol.* **177**: 745–749
- Jaeger SU, Schroeder BO, Meyer-Hoffert U, Courth L, Fehr SN, Gersemann M, Stange EF & Wehkamp J (2013) Cell-mediated reduction of human β -defensin 1: a major role for mucosal thioredoxin. *Mucosal Immunol.* **6**: 1179–1190
- Jander G, Martin NL & Beckwith J (1994) Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *EMBOJ.* **13**: 5121–5127
- Janeway CA (1989) Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**: 1–13

- Jones DE & Bevins CL (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 23216–23225
- Jones DE & Bevins CL (1993) Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett.* **315**: 187–192
- Kagan BL, Selsted ME, Ganz T & Lehrer RI (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 210–214
- Kamio Y & Nikaido H (1976) Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry (Mosc.)* **15**: 2561–2570
- Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**: 373–384
- Kearney JN, Harnby D, Gowland G & Holland KT (1984) The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 797–801
- Khor B, Gardet A & Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**: 307–317
- Kim HS, Yoon H, Minn I, Park CB, Lee WT, Zasloff M & Kim SC (2000) Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**: 3268–3274
- Kim YS & Ho SB (2010) Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **12**: 319–330
- Kocsis AK, Lakatos PL, Somogyvári F, Fuszek P, Papp J, Fischer S, Szamosi T, Lakatos L, Kovacs A, Hofner P & Mándi Y (2008) Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **43**: 299–307
- de Koff EM, Groot KM de W & Bogaert D (2016) Development of the respiratory tract microbiota in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **22**: 623–628
- Koslowski MJ, Kübler I, Chamailard M, Schaeffeler E, Reinisch W, Wang G, Beisner J, Teml A, Peyrin-Biroulet L, Winter S, Herrlinger KR, Rutgeerts P, Vermeire S, Cooney R, Fellermann K, Jewell D, Bevins CL, Schwab M, Stange EF & Wehkamp J (2009) Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One* **4**: e4496
- Koslowski MJ, Teltschik Z, Beisner J, Schaeffeler E, Wang G, Kübler I, Gersemann M, Cooney R, Jewell D, Reinisch W, Vermeire S, Rutgeerts P, Schwab M, Stange EF & Wehkamp J (2012) Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet.* **8**: e1002523
- Kübler I, Stange E, Fellermann K & Wehkamp J (2006) Defensine: körpereigene Antibiotika als zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* **131**: 1960–1964
- Kunin CM (1993) Resistance to antimicrobial drugs--a worldwide calamity. *Ann. Intern. Med.* **118**: 557–561

- Lecat A, Piette J & Legrand-Poels S (2010) The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem. Pharmacol.* **80**: 2021–2031
- Lee J, Jung SW & Cho AE (2016) Molecular Insights into the Adsorption Mechanism of Human β -Defensin-3 on Bacterial Membranes. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **32**: 1782–1790
- Lehrer RI (2011) Immunology: Peptide gets in shape for self-defence. *Nature* **469**: 309–310
- Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R & Eisenhauer P (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**: 167–173
- Ley RE, Peterson DA & Gordon JI (2006a) Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* **124**: 837–848
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S & Gordon JI (2006b) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022–1023
- Liu Y, Fu X, Shen J, Zhang H, Hong W & Chang Z (2004) Periplasmic proteins of *Escherichia coli* are highly resistant to aggregation: reappraisal for roles of molecular chaperones in periplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 795–801
- Losick R & Stragier P (1992) Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* **355**: 601–604
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK & Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**: 220–230
- Matsuoka K & Kanai T (2015) The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin. Immunopathol.* **37**: 47–55
- Matsuzaki K (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 1–10
- McCray PB & Bentley L (1997) Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**: 343–349
- Medzhitov R & Janeway CA Jr (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 4–9
- Meima R, Eschevins C, Fillinger S, Bolhuis A, Hamoen LW, Dorenbos R, Quax WJ, van Dijk JM, Provvedi R, Chen I, Dubnau D & Bron S (2002) The bdbDC operon of *Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development. *J. Biol. Chem.* **277**: 6994–7001
- Messens J & Collet J-F (2006) Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**: 1050–1062
- Miyadai H, Tanaka-Masuda K, Matsuyama S & Tokuda H (2004) Effects of lipoprotein overproduction on the induction of DegP (HtrA) involved in quality control in the *Escherichia coli* periplasm. *J. Biol. Chem.* **279**: 39807–39813
- Moreira LO & Zamboni DS (2012) NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front. Immunol.* **3**: 328

- Mukherjee S, Zheng H, Derebe MG, Callenberg KM, Partch CL, Rollins D, Propheter DC, Rizo J, Grabe M, Jiang Q-X & Hooper LV (2014) Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* **505**: 103–107
- Mullineaux CW, Nenninger A, Ray N & Robinson C (2006) Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 3442–3448
- Navarre WW & Schneewind O (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **63**: 174–229
- Neuhaus FC & Baddiley J (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **67**: 686–723
- Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Mueller HAG & Stange EF (2006) A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *J. Microbiol. Methods* **65**: 335–345
- Nuding S, Zabel LT, Enders C, Porter E, Fellermann K, Wehkamp J, Mueller HAG & Stange EF (2009) Antibacterial activity of human defensins on anaerobic intestinal bacterial species: a major role of HBD-3. *Microbes Infect.* **11**: 384–393
- Nurjadi D, Herrmann E, Hinderberger I & Zanger P (2013) Impaired β -Defensin Expression in Human Skin Links DEFB1 Promoter Polymorphisms With Persistent *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *J. Infect. Dis.* **207**: 666–674
- Oh JE & Lee HK (2012) Autophagy in Innate Recognition of Pathogens and Adaptive Immunity. *Yonsei Med. J.* **53**: 241
- O'Neil D, Porter E, Elewaut D, Anderson G, Eckmann L, Ganz T & Kagnoff M (1999) Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**: 6718–6742
- Ostaff MJ, Stange EF & Wehkamp J (2013) Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med* **5**: 1–19
- Park CB, Kim HS & Kim SC (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 253–257
- Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS & Kim SC (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8245–8250
- Paulino LC, Tseng C-H, Strober BE & Blaser MJ (2006) Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2933–2941
- Paxman JJ, Borg NA, Horne J, Thompson PE, Chin Y, Sharma P, Simpson JS, Wielens J, Piek S, Kahler CM, Sakellaris H, Pearce M, Bottomley SP, Rossjohn J & Scanlon MJ (2009) The Structure of the Bacterial Oxidoreductase Enzyme DsbA in Complex with a Peptide Reveals a Basis for Substrate Specificity in the Catalytic Cycle of DsbA Enzymes. *J. Biol. Chem.* **284**: 17835–17845
- Peschel A & Sahl H-G (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 529–536

- Pollack JH & Neuhaus FC (1994) Changes in wall teichoic acid during the rod-sphere transition of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **176**: 7252–7259
- Prado-Montes de Oca E (2010) Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**: 800–804
- Raetz CRH & Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635–700
- Reardon-Robinson ME & Ton-That H (2016) Disulfide-Bond-Forming Pathways in Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* **198**: 746–754
- Rousseau K, Byrne C, Kim YS, Gum JR, Swallow DM & Toribara NW (2004) The complete genomic organization of the human MUC6 and MUC2 mucin genes. *Genomics* **83**: 936–939
- Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y & Bevins CL (2003) Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **422**: 522–526
- Sass V, Schneider T, Wilmes M, Körner C, Tossi A, Novikova N, Shamova O & Sahl H-G (2010) Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect. Immun.* **78**: 2793–2800
- Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 107–133
- Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Laine ML, Rühling A, Schäfer C, Cordes N, Noack B, Folwaczny M, Glas J, Dörfer C, Dommisch H, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG & Schreiber S (2010) A 3' UTR transition within DEFB1 is associated with chronic and aggressive periodontitis. *Genes Immun.* **11**: 45–54
- Schmidtchen A, Frick I-M, Andersson E, Tapper H & Björck L (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* **46**: 157–168
- Schroeder BO, Ehmann D, Precht JC, Castillo PA, Küchler R, Berger J, Schaller M, Stange EF & Wehkamp J (2014) Paneth cell α -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.*
- Schroeder BO, Stange EF & Wehkamp J (2011a) Waking the wimp: redox-modulation activates human beta-defensin 1. *Gut Microbes* **2**: 262–266
- Schroeder BO, Stange EF & Wehkamp J (2012) [Human beta-Defensin 1: From Defence to Offence.]. *Z. Gastroenterol.* **50**: 1171–1175
- Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J, Buchner J, Schaller M, Stange EF & Wehkamp J (2011b) Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature* **469**: 419–423
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM & Finlay BB (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **90**: 859–904
- Sender R, Fuchs S & Milo R (2016) Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **164**: 337–340

- Seo E, Weibel S, Wehkamp J & Oelschlaeger TA (2012) Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **302**: 276–287
- Sevier CS, Kadokura H, Tam VC, Beckwith J, Fass D & Kaiser CA (2005) The prokaryotic enzyme DsbB may share key structural features with eukaryotic disulfide bond forming oxidoreductases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **14**: 1630–1642
- Shirazi T, Longman R, Corfield A & Probert C (2000) Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad. Med. J.* **76**: 473–478
- Shuster S (1965) The Ecology of the Human Skin. *Proc. R. Soc. Med.* **58**: 653
- Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J & Potempa J (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4673–4679
- Silhavy TJ, Kahne D & Walker S (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: a000414
- Silver LL (2011) Challenges of antibacterial discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 71–109
- Sochacki KA, Barns KJ, Bucki R & Weisshaar JC (2011) Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: E77–E81
- Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS & Borregaard N (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**: 3951–3959
- Strömstedt AA, Kristiansen PE, Gunasekera S, Grob N, Skjeldal L & Göransson U (2016) Selective membrane disruption by the cyclotide kalata B7: complex ions and essential functional groups in the phosphatidylethanolamine binding pocket. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**: 1317–1327
- Strugala V, Dettmar PW & Pearson JP (2008) Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* **62**: 762–769
- Thomsen RJ, Stranieri A, Knutson D & Strauss JS (1980) Topical clindamycin treatment of acne. Clinical, surface lipid composition, and quantitative surface microbiology response. *Arch. Dermatol.* **116**: 1031–1034
- Till AE, Goulden V, Cunliffe WJ & Holland KT (2000) The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ. *Br. J. Dermatol.* **142**: 885–892
- Tollin M, Bergman P, Svenberg T, Jörnvall H, Gudmundsson G & Agerberth B (2003) Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides* **24**: 523–553
- Tommasi R, Brown DG, Walkup GK, Manchester JI & Miller AA (2015) ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**: 529–542
- Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, Rund SA, Heuner K, Wehkamp J, Stange EF & Oelschlaeger TA (2012) More than a marine propeller--the flagellum of the probiotic *Escherichia coli*

- strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **302**: 304–314
- Ulvatne H & Vorland LH (2001) Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**: 507–511
- Urban A, Eckermann S, Fast B, Metzger S, Gehling M, Ziegelbauer K, Rübsamen-Waigmann H & Freiberg C (2007) Novel Whole-Cell Antibiotic Biosensors for Compound Discovery. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6436–6443
- Uronis JM, Mühlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS & Jobin C (2009) Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS ONE* **4**: e6026
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr & Ganz T (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* **101**: 1633–1642
- Vertommen D, Depuydt M, Pan J, Leverrier P, Knoop L, Szikora J-P, Messens J, Bardwell JCA & Collet J-F (2008) The disulfide isomerase DsbC cooperates with the oxidase DsbA in a DsbD-independent manner. *Mol. Microbiol.* **67**: 336–349
- Voreades N, Kozil A & Weir TL (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* **5**: 494
- van der Waaij LA, Harmsen HJM, Madjipour M, Kroese FGM, Zwiers M, van Dullemen HM, de Boer NK, Welling GW & Jansen PLM (2005) Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflamm. Bowel Dis.* **11**: 865–871
- Walker F, Zhang H-H, Odorizzi A & Burgess AW (2011) LGR5 Is a Negative Regulator of Tumourigenicity, Antagonizes Wnt Signalling and Regulates Cell Adhesion in Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS ONE* **6**: e22733
- Wehkamp J (2004) Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 460–465
- Wehkamp J, Koslowski M, Wang G & Stange EF (2008) Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol.* **1**: S67–S74
- Wehkamp J & Stange EF (2010) Paneth's disease. *J. Crohns Colitis* **4**: 523–531
- Wenzel M, Chiriac AI, Otto A, Zweytick D, May C, Schumacher C, Gust R, Albada HB, Penkova M, Krämer U, Erdmann R, Metzler-Nolte N, Straus SK, Bremer E, Becher D, Brötz-Oesterhelt H, Sahl H-G & Bandow JE (2014) Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: E1409–1418
- White SH, Wimley WC & Selsted ME (1995) Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**: 521–527
- WHO | Antimicrobial resistance WHO Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> [Accessed September 3, 2013]

- Wiegand I, Hilpert K & Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**: 163–175
- Wilson M (2005) *Microbial Inhabitants of Humans - Their Ecology and Role in Health and Disease* University College London: Cambridge University Press
- Xie Y, Fleming E, Chen JL & Elmore DE (2011) Effect of proline position on the antimicrobial mechanism of buforin II. *Peptides* **32**: 677–682
- Yount NY & Yeaman MR (2013) Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**: 127–138
- Zaiou M, Nizet V & Gallo RL (2003) Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 810–816
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395
- Zhao C, Wang I & Lehrer RI (1996) Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* **396**: 319–322
- Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, Burian M, Schilling NA, Slavetinsky C, Marschal M, Willmann M, Kalbacher H, Schitteck B, Brötz-Oesterhelt H, Grond S, Peschel A & Krismer B (2016) Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535**: 511–516
- Zumla A, George A, Sharma V, Herbert RHN, Baroness Masham of Ilton, Oxley A & Oliver M (2015) The WHO 2014 global tuberculosis report--further to go. *Lancet Glob. Health* **3**: e10–12

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Jan Wehkamp für die Betreuung der Arbeit und die gute PhD-Zeit bedanken. Seine optimistische Art hat mich oft motiviert mein Projekt fokussiert zu verfolgen und sein Vertrauen ermöglichte es mir unabhängig und selbständig zu arbeiten. Sein gutes Auge für die Darstellung der Daten hat mich zusätzlich unterstützt, um den roten Faden der Arbeit zu behalten und diese erfolgreich abzuschließen.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Dr. Lioba Courth. Sie hat mir immer mit Rat und Tat bei allen meinen Fragen zur Seite gestanden. Vor allem für die gute fachliche Betreuung meiner Dissertation, die vielen Anregungen und Hilfestellungen und ein großes Lob für das Korrekturlesen meiner Veröffentlichungen. Du warst mir wirklich eine sehr große Hilfe.

Bei Marion Strauß und Jutta Bader möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die kompetente Hilfe im Laboralltag und die aufmunternden Worte im Labor bedanken. Sowie für die Verpflegung durch Schokolade, die sehr zum Wohlbefinden beigetragen hat.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Kollegen Dirk Ehmann, der mir bei allen Fragen zur Seite stand- von Datenauswertung bis hin zu grundsätzlichen methodischen und wissenschaftlichen Fragen. Es war mir immer eine Freude mit dir auf Kongresse zu gehen und das L2-Labor zu rocken.

Ich bedanke mich auch bei Louis Königer und allen anderen Arbeitsgruppenmitgliedern der AG Wehkamp für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre, die guten Tipps und Diskussionen. Alle Ideen und Vorschläge haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dank euch war es eine sehr schöne Zeit.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für den Rückhalt über all die Jahre, das Vertrauen in mich und für die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit. Manuel, dir danke ich vor allem für die tägliche Unterstützung während der PhD-Zeit, aber besonders in der Abschlussphase. Vielen Dank, dass du mich bei allem unterstützt hast und für mich immer da bist.