

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Gastrointestinale
Onkologie, Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie)

**Antimikrobielle Wirkung des humanen β -Defensins 2
gegen *Escherichia coli***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Anhuef, Ole

2021

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Wehkamp

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. S. Peter

Tag der Disputation: 26.06.2020

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Bakterien im humanen Organismus	1
1.1.1 Intestinale Mikrobiota	1
1.1.1.1 <i>Escherichia Coli</i>	2
1.1.2 Aufbau und Eigenschaften von Bakterien	4
1.2 Antimikrobielle Abwehrstrategien des humanen Organismus	6
1.2.1 Spezifisches Immunsystem	6
1.2.2 Unspezifisches Immunsystem	7
1.2.2.1 Zelluläre Mechanismen	7
1.2.2.2 Physikalisch und biologische Mechanismen	7
1.2.3 Antimikrobielle Peptide	8
1.2.3.1 Defensine	9
1.2.3.2 Humanes β -Defensin 2	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Medien und Puffer	18
2.1.5 Wachsmottenlarven	19
2.1.6 Peptide	19
2.1.7 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	20
2.1.8 Software	21
2.2 Methoden	22

2.2.1	Bestimmen der <i>colony forming units</i> pro Milliliter für die verwendeten Bakterien	22
2.2.2	Trübungsassay	22
2.2.3	Durchflusszytometrie	23
2.2.4	Cytochrom-C-Assay	23
2.2.5	Resistenzinduktion	24
2.2.6	<i>Galleria mellonella</i>	26
2.2.6.1	Haltung der Wachsmottenlarven	26
2.2.6.2	Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 <i>in vivo</i>	26
2.2.6.3	Untersuchung der Wirkung von Hämolymphe auf die Aktivität von HBD2	27
2.2.7	Statistik	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Photometrische Quantifizierung von Bakterien	29
3.2	Antimikrobielle Wirkweise von HBD2 <i>in vitro</i>	30
3.2.1	Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 im Trübungsassay	31
3.2.2	Bestimmung der bakteriellen Zellmembranladung und Korrelation mit den Trübungsassaydaten	33
3.2.3	Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 mittels Durchflusszytometrie	35
3.2.3.1	Färbung von <i>E. coli</i> mit Propidiumiodid	35
3.2.3.2	Färbung von <i>E. coli</i> mit DiBAC4(3)	39
3.2.4	Resistenzlage bei <i>E. coli</i> EPEC nach Inkubation mit subletalen Dosen von HBD2	43
3.3	Antimikrobielle Aktivität von HBD2 <i>in vivo</i>	47
3.3.1	Überleben von <i>Galleria mellonella</i> nach systemischer Applikation von <i>E. coli</i> Bakterien und HBD2	48
3.3.2	Antimikrobielle Aktivität von HBD2 in Hämolymphe	51

3.3.3 Überleben von <i>Galleria mellonella</i> nach oraler Gabe von <i>E. coli</i> EPEC und HBD2	53
4 Diskussion	55
4.1 Antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegen <i>E. coli</i>	55
4.1.1 HBD2 zeigt schwächere antimikrobielle Aktivität gegen probiotische als gegen pathogene <i>E. coli</i>	56
4.1.2 Die Gabe von HBD2 bewirkt kein erhöhtes Überleben von <i>Galleria mellonella</i> nach Infektion mit <i>E. coli</i>	59
4.2 HBD2 wirkt ladungsabhängig an der bakteriellen Zellmembran	61
4.3 HBD2 und Ciprofloxacin induzierten jeweils keine Resistenzen in <i>E. coli</i> EPEC	64
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	67
6 Literaturverzeichnis	69
7 Anhang.....	81
7.1 Trübungsassay	81
7.2 Resistenzinduktion	83
8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	84
9 Danksagung.....	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

AMP *antimikrobielle Peptide*

C

CED *chronisch entzündliche
Darmerkrankungen*

CFU/ml *colony forming units/ml*

D

DAEC *diffus adherente E. coli*

E

E. coli *Escherichia coli*

EAEC *enteroaggregative E. coli*

EcN *E. coli* Nissle 1917

EHEC *enterohämorrhagische E. coli*

EIEC *enteroinvasive E. coli*

EPEC *enteropathogene E. coli*

ETEC *enterotoxische E. coli*

H

HBD *humanes beta Defensin*

HD *humane α -Defensine*

HNP *humanes neutrophiles Peptid*

L

LPS *Lipopolysaccharide*

M

MHK *minimale Hemmkonzentration*

O

OD_x *optische Dichte bei x Nanometern*

P

PAMP *pathogen associated molecular
pattern*

PI *Propidiumiodid*

PRRS *pattern recognition receptors*

PSC *primär sklerosierende Cholangitis*

R

RDA *radial diffusion assay*

T

TLR *toll-like Rezeptor*

TNF- α *Tumor Nekrose Faktor- α*

U

UPEC *uropathogene E. coli*

W

WHO *World Health Organization*

1 EINLEITUNG

1.1 BAKTERIEN IM HUMANEN ORGANISMUS

Nur etwa die Hälfte aller Zellen in unserem Körper sind menschliche Zellen. Die andere Hälfte stellen Mikroorganismen dar, zumeist Bakterien, welche auf inneren und äußeren Oberflächen zu finden sind. Sie besitzen einen vielschichtigen und noch nicht vollständig aufgeklärten Einfluss auf den humanen Organismus (Blaser und Falkow, 2009; Sender et al., 2016).

1.1.1 INTESTINALE MIKROBIOTA

Im Darm findet sich, noch vor der Haut, die größte Population an kommensalen Mikroorganismen im humanen Organismus (Garrett et al., 2010; Sender et al., 2016). Sie ist so groß, dass über 99% der aus Stuhlproben isolierten Gene von Bakterien stammen und somit die Anzahl mikrobieller Gene die des humanen Genoms um ein 150faches übertrifft (Qin et al., 2010). Ständig muss sich der humane Organismus mit dieser großen Anzahl an Bakterien auseinandersetzen. Dabei wehrt er sich zum einen gegen pathogene Erreger, profitiert andererseits jedoch auch von kommensalen und symbiontischen Bakterien. Diese ständig den Darm besiedelnden Mikroorganismen können pathogene Bakterienpopulation kontrollieren, angeborenes und erworbenes Immunsystem stimulieren, die Differenzierung der Schleimhäute nach der Geburt unterstützen, Wachstumsfaktoren bereitstellen und die Gewinnung von Energie aus Nahrung ermöglichen (Rosebury, 1962; Crowe et al., 1973; Mackowiak, 1982; Smith et al., 2007; Blaser und Falkow, 2009). Es ist daher nicht verwunderlich, dass es vielfältige Wechselwirkungen zwischen dem humanen Organismus und Bakterien gibt. Auch wenn sich eine endgültige Aussage über den Zeitpunkt der bakteriellen Besiedlung des Erstgenannten bisher nicht treffen lässt (Ley et al., 2006; Jiménez et al., 2008), wird doch die Theorie einer *in utero* Transmission auf den Fetus zunehmend diskutiert (Walker et al., 2017). Bekannt ist jedoch, dass es fakultativ anaerobe Bakterien (z.B. *E. coli*) sind, die sich unter den ersten

den Darm eines Neugeborenen besiedelnden, kommensalen Mikroorganismen befinden. Diese Bakterien sind an das im kindlichen Darm noch vorherrschende vergleichsweise hohe Redoxpotential angepasst. Erst durch die Stoffwechselaktivität dieser fakultativen Anaerobier sinkt die Sauerstoffkonzentration, wodurch ein passendes Milieu für Vertreter anaerober Spezies wie *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* und *Ruminococcus* entsteht. Im Alter von ungefähr drei Jahren hat sich die intestinale Mikrobiota des Kindes so weit entwickelt, dass sie der eines Erwachsenen gleicht (Matamoros et al., 2013). Die kommensalen Bakterienpopulationen werden vermutlich durch spezifische Kontrollmechanismen des Gastrointestinaltrakts in einem für den humanen Organismus gesundem Gleichgewicht gehalten (Bäckhed et al., 2005). Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle kann dies weitreichende Folgen haben. So werden Erkrankungen wie Fettleibigkeit, Krebs, Multiple Sklerose, Autismus und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) mit Störungen der bakteriellen Homöostase im Darm assoziiert (Ley et al., 2006; Manichanh et al., 2006; Frank et al., 2007; Uronis et al., 2009; Finegold et al., 2010; Cekanaviciute et al., 2017).

1.1.1.1 *ESCHERICHIA COLI*

Das fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterium *E. coli* kommt hauptsächlich im Darm von Wirbeltieren vor. Es kann sowohl pathogenes, kommensales als auch probiotisches Bakterium sein (Tenailon et al., 2010). Speziell pathogene *E. coli* Stämme verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen. Sie weisen spezifische Adhärenzfaktoren auf, welche ihnen die Kolonisierung an Orten ermöglicht, wo kommensale *E. coli* Bakterien nicht zu finden sind (z.B. Dünndarm und Harnröhre). Diese Bakterien können drei unterschiedliche Krankheitsbilder verursachen: Sepsis/Meningitis, Infektionen der ableitenden Harnwege und Darminfektionen (Nataro und Kaper, 1998). Uropathogene *E. coli* (UPEC) sind beispielsweise jährlich für 70–90% der weltweit 150 Millionen auftretenden Harnwegsentzündungen verantwortlich (Stamm und Norrby, 2001). Die intestinalen Infektionen verursachenden *E. coli* können in mindestens sechs Pathotypen eingeteilt werden: enterotoxische (ETEC), enteropathogene (EPEC),

enterohämorrhagische (EHEC), enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC) und diffus adherente (DAEC) *E. coli*. Diese Pathotypen des Gastrointestinaltrakts sind wahrscheinlich die wichtigsten Verursacher kindlicher Diarrhoe. Außerdem sind sie verantwortlich für Reisediarrhoe, das hämolytisch-urämisches Syndrom und chronische Diarrhoe. Dabei unterscheiden sie sich in ihrem Pathomechanismus leicht voneinander (Nataro und Kaper, 1998). ETEC sezerniert beispielsweise Enterotoxine, die den Wasserhaushalt im Darm stören (Rasko et al., 2008). EPEC zeichnet sich durch eine enge Anheftung an die Darmzellen und Zerstörung der Mikrovilli aus (Nataro und Kaper, 1998) und einige Stämme des Pathotypen EAEC bilden durch eigene Biofilmbildung und Stimulation von Darmepithelzellen eine dicke Mukusschicht auf dem Darmepithel (Wakimoto et al., 2004; Huang, 2006). Manchen *E. coli* Stämmen wird zudem eine Rolle in der Pathogenese von CED zugeschrieben (Schumann et al., 2014). Kommensale *E. coli* Stämme hingegen sind bereits innerhalb weniger Stunden nach der Geburt im kindlichen Gastrointestinaltrakt zu finden. Dort besiedeln sie fortan den Dickdarm zum gegenseitigen Nutzen von Wirt und Bakterium (Drasar und Hill, 1974). Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Symbiose bisher kaum beschrieben wurden (Kaper et al., 2004), wird kommensalen *E. coli* Stämmen aufgrund der Produktion antibakterieller Microcine eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle pathogener Bakterienpopulationen im Darm zugeschrieben (Janeway Jr und Medzhitov, 2002). Kommensale *E. coli* Stämme selbst sind innerhalb eines gesunden Darmes nicht pathogen, können jedoch opportunistische Infektionen in Wirtsorganismen verursachen, welche immunsupprimiert sind oder eine gestörte gastrointestinale Barriere aufweisen (Kaper et al., 2004). Obwohl es im Darm der vorherrschende aerobe Mikroorganismus ist, sind *E. coli* Bakterien jedes Jahr für den Tod von mehr als zwei Millionen Menschen verantwortlich, darunter 20-30% frühkindlicher Todesfälle weltweit (Kosek et al., 2003; Russo und Johnson, 2003; Tenailon et al., 2010). Aufgrund seiner Relevanz als humanpathogenes Bakterium hat die WHO deshalb der Entwicklung neuer Antibiotikaklassen gegen *E. coli* höchste Priorität eingeräumt (Alagumaruthanayagam et al., 2009; World Health Organization, 2017).

Die Eigenschaften pathogener *E. coli* Stämme stehen in starkem Kontrast zu denen ihrer probiotischen Verwandten. Probiotische *E. coli* Stämme sind in kommerziell erhältlichen Arzneimitteln wie Mutaflor® und Symbioflor® 2 enthalten (Wassenaar, 2016). Diese Probiotika können gegen Verstopfung, akute virale Diarrhoe bei Kleinkindern und zur Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa eingesetzt werden (Mollenbrink und Bruckschen, 1994; Kruis et al., 2004; Henker et al., 2007; Wassenaar, 2016). Der Gedanke, mit lebenden Bakterien Erkrankte zu behandeln, ist nicht neu. Alfred Nissle beschrieb bereits 1918 die Behandlung chronischer Darmstörungen mit lebenden Bakterien und vertrieb dafür fortan erwähntes Arzneimittel Mutaflor®, welches *E. coli* Nissle 1917 (EcN) enthält (Nissle, 1918; Wassenaar, 2016).

1.1.2 AUFBAU UND EIGENSCHAFTEN VON BAKTERIEN

Fast alle Bakterien lassen sich in grampositiv und -negativ unterscheiden. Diese Gruppen unterscheiden sich wesentlich im Aufbau ihrer Membran (Abbildung 1) (Silhavy et al., 2010). Gramnegative Bakterien besitzen, im Gegensatz zu grampositiven, eine Lipidaußenmembran. Ein wichtiger Bestandteil dieser Membran sind Lipopolysaccharide (LPS), welche mitunter für den durch gramnegative Bakterien verursachten septischen Schock verantwortlich sind und vom angeborenen Immunsystem als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) erkannt werden (Medzhitov und Janeway, 2002; Silhavy et al., 2010). Aufgrund dieses zusätzlichen Schutzes durch die Außenmembran sind gramnegative Bakterien, im Vergleich zu grampositiven Bakterien, generell resistenter gegenüber Antibiotika (Silhavy et al., 2010). Unterhalb der Außenmembran findet sich bei gramnegativen Bakterien eine dünne Schicht aus Peptidoglykan. Als äußerste Begrenzung ist diese Peptidoglykanschicht bei grampositiven Bakterien dicker ausgebildet. Die Peptidoglykanschicht ist essenziell für die Formgebung von Bakterien. Ihre Hauptaufgabe ist es, dem Turgordruck der Zelle standzuhalten. Durch Inhibition der Biosynthese oder den direkten Abbau dieser Peptidoglykanschicht wird die Zelle daher zerstört (Vollmer et al., 2008; Silhavy et al., 2010). Neben einer dünnen Peptidoglykanschicht findet sich bei gramnegativen Bakterien zwischen

äußerer und innerer Membran das sogenannte Periplasma. Dieser Raum ist voller Proteine und ermöglicht den Bakterien, für sie potenziell schädliche Substanzen abzusondern (Mullineaux et al., 2006; Silhavy et al., 2010). Die zytoplasmatische oder auch innere Membran von Bakterien weist schließlich eine Vielzahl von Proteinen für Stoffwechsellleistungen wie Energieproduktion, Lipid- und Proteinsynthese auf (Silhavy et al., 2010).

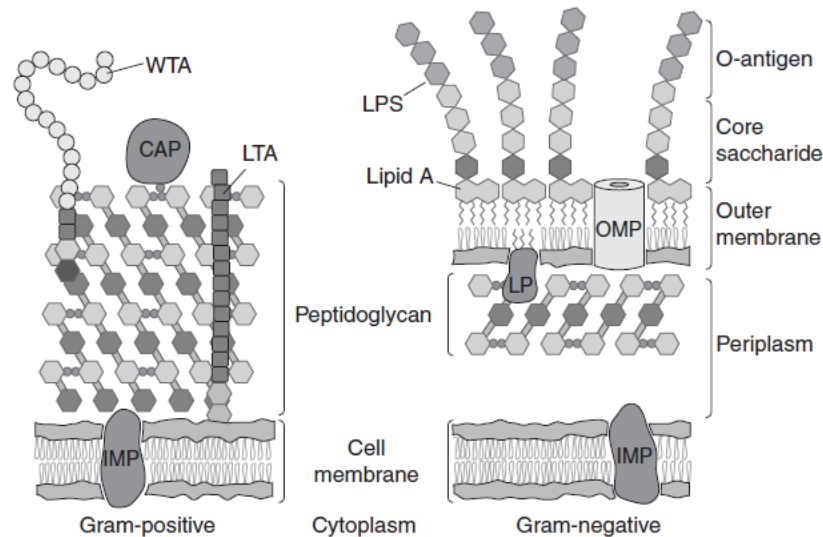


Abbildung 1: Aufbau der Zellmembran bei grampositiven und -negativen Bakterien

Aus Silhavy et al 2010. Mit Genehmigung von Perspectives in Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Andere Stoffwechsellvorgänge und Mechanismen ermöglichen es vielen Bakterien sich gegen heute gebräuchliche Anitbiotika zur Wehr zu setzen. Dazu gehören beispielsweise Effluxpumpen, die Produktion deaktivierender Proteine und die Bildung von Biofilmen (Stewart und William Costerton, 2001; Lin et al., 2015). Diese Mechanismen haben bei manchen Bakterienstämmen wie *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, u.a.) zu einer Resistenzlage geführt, die eine kritische Notwendigkeit für die Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika gegen diese Bakterien ergibt (World Health Organization, 2017).

1.2 ANTIMIKROBIELLE ABWEHRSTRATEGIEN DES HUMANEN ORGANISMUS

Lange bevor der humane Organismus auf die Wirksamkeit von Antibiotika angewiesen ist, setzt sich dessen Immunsystem mit potenziellen Krankheitserregern, wie zum Beispiel Bakterien, auseinander. Dabei steht das Immunsystem vor der schwierigen Aufgabe, nicht nur die Besiedlung des humanen Organismus mit pathogenen Mikroorganismen zu verhindern, sondern gleichzeitig die Stabilität der kommensalen Bakterienzusammensetzung aufrecht zu erhalten und zu fördern. Diese Aufgabe wird durch Mechanismen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems, sowie intakte Haut- und Schleimhautbarrieren bewerkstelligt.

1.2.1 SPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM

Ein wesentlicher Unterschied zwischen erworbenem und angeborenem Immunsystem ist die Art und Weise, wie potenzielle Erreger erkannt werden (Fearon und Locksley, 1996). Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch eine Vielzahl antigenspezifischer Rezeptoren an B- und T-Lymphozyten aus. Diese Vielfalt entsteht durch somatische Rekombination, also die Rekombination von Genen in Körperzellen. Auf diese Weise können Lymphozyten aus einer Vielzahl von Vorläuferzellen selektiert werden, die durch Kontakt mit spezifischen Antigenen (Proteinen, Carbohydraten, Lipiden oder Nukleinsäuren) aktiviert werden (Janeway Jr und Medzhitov, 2002; Bonilla und Oettgen, 2010). Weil dabei auch sogenannte Gedächtniszellen gebildet werden, die im humanen Organismus für das ganze Leben verbleiben können, findet die Immunantwort beim nächsten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen schneller und effektiver statt. Bei Aktivierung des spezifischen Immunsystems bilden und sezernieren B-Lymphozyten Antikörper, die an entsprechenden Pathogenen binden und sie dadurch unschädlich machen oder das angeborene Immunsystem zu diesem Zweck aktivieren. Die T-Lymphozyten hingegen sind durch unterschiedliche Subpopulationen mit verschiedenen Eigenschaften gekennzeichnet. Sie können

als T-Helferzellen unter anderem die Immunantwort regulieren oder als zytotoxische und natürliche Killer T-Zellen selbst Zellen abtöten (Bonilla und Oettgen, 2010).

1.2.2 UNSPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM

Das unspezifische Immunsystem ist das phylogenetisch ältere und kann in unterschiedlicher Ausprägung in jedem multizellulären Organismus gefunden werden (Fearon und Locksley, 1996). Im humanen Organismus lassen sich verschiedene Mechanismen des unspezifischen Immunsystems unterscheiden.

1.2.2.1 ZELLULÄRE MECHANISMEN

Auf zellulärer Ebene des unspezifischen Immunsystems erkennen „*Pattern recognition receptors*“ (PRRS) allgemeine, für Mikroorganismen spezifische Strukturen (PAMPs). Dies sind oftmals Makromoleküle wie das bakterielle LPS (Fearon und Locksley, 1996; Chen et al., 2009). PRRs können sowohl auf der Oberfläche von Immun- oder Epithelzellen (toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like Rezeptoren, u.a.) oder als im Plasma gelöste Moleküle (C-reaktives Protein, Mannose bindendes Lectin, u.a.) vorliegen (Janeway Jr und Medzhitov, 2002). Aktivieren PRRs das angeborene Immunsystem wird beispielsweise in Makrophagen die Produktion von Zytokinen wie Interleukinen oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) stimuliert. Dies verstärkt die Aktivität immunkompetenter Zellen (Makrophagen, Granulozyten, u.a.), welche Mikroorganismen phagozytieren und antimikrobielle Moleküle sezernieren können (Fearon und Locksley, 1996; Risso, 2000).

1.2.2.2 PHYSIKALISCH UND BIOLOGISCHE MECHANISMEN

Neben den zuvor beschriebenen zellulären antimikrobiellen Abwehrstrategien spielt eine intakte physikalische und biologische Barriere durch die den humanen Organismus bedeckenden Epithelien eine wichtige Rolle im unspezifischen Immunsystem. Auf einer oft nur wenige Zellschichten umfassenden, über 200 m² großen Oberfläche im Darm sowie 2 m² auf der Haut müssen die Homöostase

von kommensalen Bakterien reguliert und pathogene Erreger abgewehrt werden (Neish, 2002; Grice und Segre, 2011; Gallo und Hooper, 2012). Im Folgenden wird auf die Barrierefunktion des Darmes eingegangen.

Die intestinale Barriere

Die bakterielle Homöostase im Gastrointestinaltrakt wird von verschiedenen Faktoren reguliert. Durch „*tight junctions*“ eng miteinander verbundene Epithelzellen erschweren als physikalische Barriere den Übertritt von Darmbakterien in den humanen Organismus. Diese wird zusätzlich durch eine den Darm vollständig bedeckende Mukusschicht unterstützt. Die Mukusschicht besteht aus verschiedenen Mucinen, welche von Becherzellen gebildet und in den Darm sezerniert werden. Dadurch wird das Wandern der Bakterien vom Darmlumen an das darunterliegende Epithel und somit deren Translokation erschwert (Gallo und Hooper, 2012; Ostaff et al., 2013). In die andere Richtung wird die Diffusion von durch unterschiedliche Zelltypen gebildeten antimikrobiellen Peptiden (AMP) in das Darmlumen behindert, so dass eine örtlich sehr hohe Konzentration an AMPs erreicht wird und sie zu einer nahezu sterilen Umgebung in den intestinalen Krypten beitragen (Meyer-Hoffert et al., 2008). Defekte der intestinalen Barriere sind hingegen mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. Zum Beispiel ist die Mukusschicht bei Colitis ulcerosa durch eine Verringerung der Anzahl an Becherzellen ausgedünnt (Shirazi et al., 2000), während sich bei Morbus Crohn ein reduziertes Level an AMPs in der illealen Mukosa findet (Wehkamp et al., 2005, p. 2005). Zudem werden auch Krankheiten wie Zöliakie oder das Reizdarmsyndrom mit einer gestörten Barrierefunktion in Verbindung gebracht (Camilleri et al., 2012).

1.2.3 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE

Die bereits erwähnten AMPs sind Teil des angeborenen Immunsystems. Im humanen Organismus kommen unterschiedliche Klassen dieser Proteine vor, wie zum Beispiel Ribonukleasen, S100 Proteine, C-Typ Lektin, Cathelicidine und Defensine (Gallo und Hooper, 2012). Eine große Vielfalt unterschiedlicher, meist positiv geladener Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften lässt sich in nahezu

jedem lebenden Organismus finden. Über 2800 AMPs aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren sind heute bekannt, die sich anhand struktureller Merkmale in unterschiedliche Klassen aufteilen lassen (Méndez-Samperio, 2013; Wang et al., 2016). Viele dieser Moleküle besitzen eine amphipathische Struktur, sodass ihre hydrophoben Seitenketten von den kationischen räumlich getrennt voneinander vorliegen. Negativ geladene Peptide, wie das humane Dermcidin und AMPs mit anderen strukturellen Merkmalen finden sich seltener (Schittek et al., 2001; Zasloff, 2002).

1.2.3.1 DEFENSINE

Defensine gehören zu den wichtigsten antimikrobiellen Peptiden im humanen Organismus und anderen Säugetieren. Sie wirken gegen gramnegative und -positive Bakterien sowie Pilze, Protozoen und Viren (Schröder und Harder, 1999; Selsted und Ouellette, 2005; Wilson et al., 2013). Strukturell zeichnen sie sich durch drei konservierte Disulfidbrücken und charakteristische β -Faltblatt Strukturen aus. Anhand der unterschiedlichen Lokalisation der intramolekularen Disulfidbrücken lassen sich α - und β - sowie die zyklischen θ -Defensine unterscheiden. Letztere werden im humanen Organismus jedoch nicht exprimiert (Ganz, 2003). Als Prä-Pro-Proteine synthetisiert werden Defensine, abhängig von der Art des Defensins und dessen Ursprungszelle, entweder intra- oder extrazellulär prozessiert (Fruitwala et al., 2018).

α -Defensine

Zu den humanen α -Defensinen gehören die humanen neutrophilen Peptide 1-4 (HNP) sowie die humanen α -Defensine 5 und 6. HNP1-4 werden typischerweise in humanen neutrophilen Granulozyten synthetisiert und dort innerhalb von Vesikeln in hohen Konzentrationen in ihrer aktiven Form gespeichert (>10 mg/ml) (Cunliffe, 2003; Ganz, 2003). Diese defensinbeladenen Vesikel können mit Phagosomen verschmelzen und dort ihren Inhalt freisetzen. Auf diese Weise werden die Peptide HNP1-4 kaum verdünnt bevor sie in Kontakt mit den Bakterien kommen (Ganz et al., 1985; Ganz, 1987, 2003). HD5 und HD6 kommen hauptsächlich im Dünndarm vor und bilden dort bei Morbus Crohn

Patienten und Patientinnen den größten Anteil an Defensinen (Kübler et al., 2009). Sie werden von Panethzellen exprimiert und liegen in den schmalen intestinalen Krypten ebenfalls in sehr hoher Konzentration vor (Ayabe et al., 2000; Ganz, 2003). Im Gegensatz zu HNP1-4 werden HD5 und HD6 in Vesikeln als Propeptide gespeichert und erst nach der Sekretion in das Darmlumen in ihre aktive Form gespalten (Ghosh et al., 2002).

β-Defensine

Von den humanen β-Defensinen wurden bis heute, analog zu den α-Defensinen, sechs verschiedene Moleküle charakterisiert, auch wenn durch genetische Untersuchungen 28 weitere β-Defensine identifiziert werden konnten (Schutte et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002; Yang et al., 2004; Pazgier et al., 2006; Fruitwala et al., 2018). Humanes β-Defensin 1-3 (HBD) wird zumeist von Epithelzellen exprimiert, kann aber auch in hämatopoetischen Zellen gefunden werden. HBD4-6 kommt nur in speziellen Geweben vor (Yamaguchi et al., 2002; Ganz, 2003; Fruitwala et al., 2018). Die Expression von HBD1-3 kann durch Zytokine, die Aktivierung von PRRs und durch Kontakt zu Viren induziert werden. Dabei überschneiden sich die zugrundeliegenden Signalwege teilweise und sind abhängig von Zelltyp und Stimulus. Die Expression von HBD2 und HBD3 in den Epithelien der Haut, der Lunge und des Gastrointestinaltrakts sowie in Keratinozyten wird beispielsweise durch PRRs wie TLR, oder NOD2 Rezeptoren induziert, die Bakterien erkennen können (Fruitwala et al., 2018). Im Falle von HBD3 können dies aber auch Wachstumsfaktoren sein, die wichtig für die Wundheilung nach Verletzung der Haut sind (Sørensen et al., 2006; Aberg et al., 2008; Gallo und Hooper, 2012). HBD1 wird hingegen meist konstitutiv exprimiert (Fruitwala et al., 2018). Neben der antibakteriellen Wirkung von β-Defensinen wurden auch antimikrobielle Eigenschaften gegenüber weiteren Mikroorganismen beschrieben. Darunter befinden sich HI-Viren, Pilze und Hefen (Quiñones-Mateu et al., 2003; Pazgier et al., 2006). Die variable Anordnung nichtkonservierter Aminosäuren der einzelnen Peptide sowie die vorherrschenden Umgebungsbedingungen scheinen dabei für die unterschiedliche antimikrobielle Aktivität der β-Defensine verantwortlich zu sein (Pazgier et al., 2006; Schroeder et al., 2011; Raschig et al., 2017). So können physiologische

Konzentrationen von Natriumchlorid und anderen Kationen die Wirksamkeit von HBD1 und HBD2 einschränken. Dies zeigt die Bedeutung elektrostatischer Interaktionen für die Aktivität von β -Defensinen und passt zu den Beobachtungen, dass diese AMPs vor allem an salzarmen Orten (z.B. Oberfläche von Epithelien, oder der Haut) aktiv sind (Singh et al., 1998; Pazgier et al., 2006).

Wirkmechanismen von Defensinen

Hinsichtlich ihres Wirkmechanismus ging man zu Beginn der Forschung an AMPs davon aus, dass allein die Zellmembran Zielstruktur dieser Moleküle sei. Heute weiß man, dass AMPs unterschiedliche Wirkmechanismen haben können und unterscheidet zwischen direkter antimikrobieller Aktivität und Modulation des Immunsystems (Abbildung 2). Die direkte antimikrobielle Aktivität kann sich dabei unspezifisch gegen die bakterielle Zellmembran richten. Ebenfalls möglich ist, dass sich die antimikrobielle Aktivität gegen spezifische Zielstrukturen wie z.B. Lipid II oder intrazelluläre Prozesse wie die Nukleinsäuresynthese richtet (Brogden, 2005; Kumar et al., 2018).

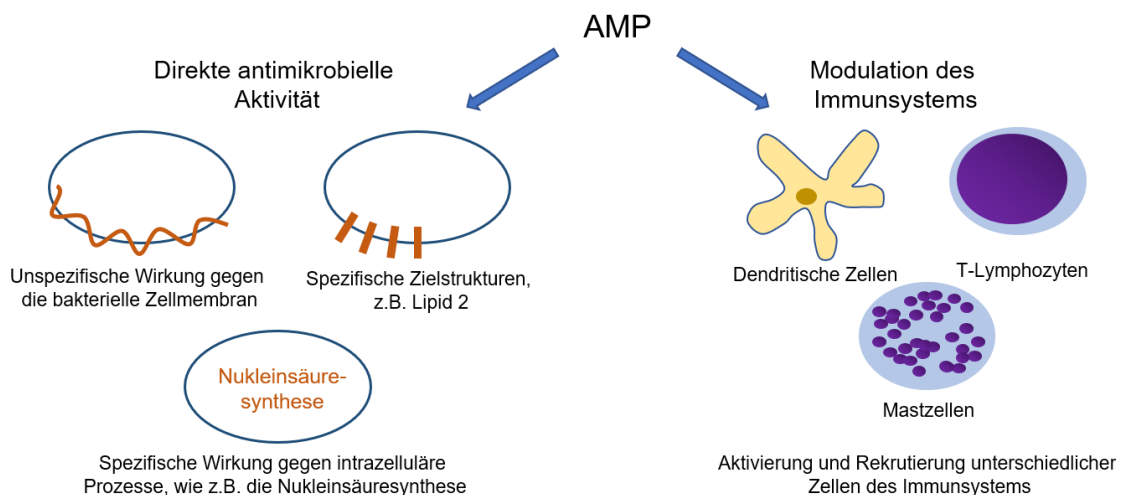


Abbildung 2: Unterschiedliche Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide
Angelehnt an Ulm et al., 2012.

Die meisten bekannten AMPs richten sich unspezifisch gegen die bakterielle Zellmembran (Kumar et al., 2018). Der antimikrobielle Mechanismus von AMPs

wie den Defensinen scheint dabei zumeist auf bereits erwähnter amphipathischer Struktur mit räumlich voneinander getrennten Clustern an hydrophoben und kationischen Aminosäuren sowie dem spezifischen Membranaufbau von Mikroorganismen zu basieren. Die Membran von Bakterien zeichnet sich durch eine Vielzahl nach außen gerichteter, negativ geladener Phospholipidgruppen aus. Dem Shai–Matsuzaki–Huang Modell zufolge interagiert das Peptid mit der Membran, verdrängt Lipide und verändert die Membranstruktur (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang et al., 2000; Zasloff, 2002). Dabei geht man davon aus, dass die hydrophoben Anteile der Defensine sich in die Lipidmembran einfügen und die kationischen Anteile elektrostatisch mit den anionischen Phospholipidgruppen interagieren. Auf diese Weise können Defensine die Zellmembran schädigen und das Membranpotential stören oder den Verlust von Metaboliten und Ionen verursachen, was schließlich zum Tod der Zelle führt (Brogden, 2005; Mukherjee und Hooper, 2015). Weil die Membran multizellulärer Organismen wie Pflanzen und Tieren zumeist aus ungeladenen Lipiden besteht, richtet sich dieser Mechanismus vor allem gegen Mikroorganismen (Zasloff, 2002).

Einen neuen antibakteriellen Wirkmechanismus für Defensine konnten erstmals de Leeuw et al., 2010 beschreiben. Die Autoren und Autorinnen zeigten, dass das α -Defensin HNP1 über eine spezifische Bindung zu dem Zellwandvorläufermolekül Lipid II antibakteriell wirkt. Kurz darauf gelang Sass et al., 2010 dieser Nachweis auch für HBD3 und Chileveru et al., 2015 fanden Hinweise, wonach das Defensin HD5 in *E. coli* und anderen gramnegativen Bakterien seine antibakterielle Wirkung durch Prozesse im bakteriellen Zytoplasma vermittelt. HD6 hingegen bildet bei Kontakt zu unspezifischen, proteinogenen Oberflächenstrukturen potentieller Pathogene Nanonetze aus. Auf diese Weise werden beispielsweise Bakterien aggregiert und deren Kontakt zum Epithel erschwert (Chu et al., 2012). Zudem konnten Schroeder et al., 2015 durch Nachahmung des intestinalen Milieus neben der weiterhin möglichen Netzbildung eine direkte antimikrobielle Aktivität der reduzierten Form von HD6 nachweisen. Die Arbeit von Zhao et al., 2018 deutet zudem darauf hin, dass humane β -Defensine Kaliumkanäle blockieren können. Neben direkter

antimikrobieller Aktivität weisen β -Defensine außerdem das Immunsystem stimulierende Eigenschaften auf. Interessanterweise können sie auch bei physiologischen Konzentrationen von Salz und Serumproteinen dendritische Zellen und T-Lymphozyten rekrutieren oder Mastzellen aktivieren und somit die Aktivität des angeborenen mit der des erworbenen Immunsystems verknüpfen (Yang et al., 1999; Pazgier et al., 2006). Auch ist die nötige Konzentration für die immunmodulierenden Eigenschaften von Defensinen sehr viel geringer als die für antimikrobielle Effekte (Yang et al., 2001).

Noch konnte nicht für jedes Peptid der antibakterielle Wirkmechanismus aufgeklärt werden. Doch ist bekannt, dass AMPs unterschiedliche antimikrobielle Mechanismen besitzen und ein einzelnes Peptid mehrere Mechanismen in sich vereinen kann. Nach Peschel und Sahl, 2006 ist es dieser Vielfalt unterschiedlicher Wirkmechanismen sowie der oftmals hohen Konzentration von AMPs an Infektionsherden zu verdanken, dass sich bisher wenige bakterielle Resistenzen gegenüber diesen Molekülen ausbilden konnten, obwohl unterschiedlichste Resistenzmechanismen bereits beschrieben wurden. So sind die von manchen Bakterien synthetisierten Proteasen in der Lage, antimikrobielle Peptide zu deaktivieren. Besonders anfällig dafür sind lineare Peptide wie LL-37. Intramolekulare Disulfidbrücken, wie sie bei Defensinen zu finden sind, sorgen hingegen für eine erhöhte Resistenz gegenüber einem proteolytischen Verdau (Peschel und Sahl, 2006). Neben den Proteasen gibt es außerdem noch weitere bakterielle Resistenzmechanismen gegenüber antimikrobiellen Substanzen wie zum Beispiel deaktivierende Proteine, Efflux Pumpen, die Veränderung der bakteriellen Membranladung und die Bildung von Biofilmen (Shafer et al., 1998; Peschel et al., 1999; Jin et al., 2004; Peschel und Sahl, 2006; Otto, 2006).

1.2.3.2 HUMANES β -DEFENSIN 2

HBD2 ist ein 41 Aminosäuren großes antimikrobielles Peptid mit einem molekularen Gewicht von 4328.2 Dalton, welches aufgrund seines hohen Anteils an den Aminosäuren Lysin und Arginin stark positiv geladen ist (Schröder und Harder, 1999; Schibli et al., 2002). Im humanen Organismus kommen diesem Peptid vielfältige Funktionen zu. So sind bei Patienten mit Psoriasis trotz

gestörter physikalischer Barriere relativ wenige Hautinfektionen zu beobachten. Dies lässt sich durch die erhöhte Expression von HBD2 in der Haut der Betroffenen erklären, wo das Peptid auch erstmals im humanen Organismus nachgewiesen wurde (Harder et al., 1997). Weitere Forschung konnte zeigen, dass HBD2 bei Atopischer Dermatitis, im Gegensatz zu Psoriasis, vermindert exprimiert wird. Dadurch lässt sich möglicherweise die im Vergleich erhöhte Rate an Hautinfektionen mit *S. aureus* bei Erkrankten mit Atopischer Dermatitis erklären (Ong et al., 2002). Zudem scheint HBD2 auch in der Pathophysiologie gastrointestinaler Erkrankungen wie primär sklerosierender Cholangitis (PSC) und CED eine Rolle zu spielen. Dabei ist die HBD2 Expression bei PSC auffällig hoch und auch bei CED erhöht. Gleichzeitig ist die HBD2 Expression bei Morbus Crohn jedoch niedriger, als bei Colitis ulcerosa (Wehkamp et al., 2002, p. 2002, 2004, p. 2004; Chang et al., 2017). Morbus Crohn ist zudem assoziiert mit einer NOD2 Mutation, die mit einer verminderten Aktivierung des NF κ B Signalwegs einhergeht. Dieser Signalweg wiederum kann die HBD2 Synthese stimulieren (Ogura et al., 2001; Wehkamp et al., 2004, 2004). Die Expression von HBD2 wird durch verschiedene Stimuli induziert. Zu diesen Stimuli gehören nicht nur bereits erwähnte PRRs oder Zytokine (TNF- α , verschiedene Interleukine u.a.), sondern auch bestimmte Bakterien (Wehkamp et al., 2004). Darunter sind probiotische Stämme von *Lactobacillus* und andere grampositive Bakterien (Schlee et al., 2008) sowie ein uropathogener und zwei probiotische *E. coli* Stämme aus den Arzneimitteln Mutaflor® und Symbioflor 2® (Wehkamp et al., 2004; Möndel et al., 2009). Bei 40 weiteren untersuchten *E. coli* Stämmen konnten Wehkamp et al., 2004 hingegen keinen Hinweis auf HBD2 Induktion finden. Die HBD2 Induktion durch EcN aus Mutaflor® wird dabei durch dessen Protein Flagellin vermittelt (Schlee et al., 2007) und konnte, genauso wie die HBD2 Induktion von Stämmen aus Symbioflor 2®, auch im humanen Organismus nachgewiesen werden (Möndel et al., 2009). Stebe-Frick et al., 2018 zeigten *ex vivo* auf mRNA Ebene außerdem eine basale HBD2 Expression in Colonbiopsien, die nach Inkubation mit EcN signifikant zunahm. Diesen Befunden nach könnte die Wirksamkeit probiotischer Arzneimittel auf ihrer Fähigkeit der HBD2 Induktion beruhen, welche die intestinale Barriere stärkt (Möndel et al., 2009). Deutlich wird die

Wirksamkeit probiotischer Arzneimittel vor allem bei der Verwendung von EcN in der Remissionserhaltung von Colitis ulcerosa (Kruis et al., 2004). Da die Defensinexpression in der Remissionsphase niedrig ist, könnte die Induktion derselben einen bakterieninduzierten Rückfall verhindern (Wehkamp et al., 2004).

Die Arbeiten von Wehkamp et al., 2004, p. 2004; Schlee et al., 2008 und Möndel et al., 2009 konnten erstmals einen mechanistischen Erklärungsansatz für die Wirksamkeit einiger probiotischer Arzneimittel aufzeigen. Ihre Daten unterstreichen die Bedeutung von HBD2 für eine intakte Barrierefunktion von Epithelien durch die Kontrolle pathogener Bakterienpopulationen und Förderung einer normalen bakteriellen Homöostase.

1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Vor dem Hintergrund einer therapeutischen Entwicklung von HBD2 als Antibiotikum ist das Ziel dieser Arbeit ein besseres Verständnis der antimikrobiellen Aktivität und Wirkungsweise von HBD2. Dafür wurde HBD2 *in vitro* sowie *in vivo* in einem zu etablierenden Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* untersucht. Dabei wurde zunächst die antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegenüber probiotischen und pathogenen *E. coli* Stämmen *in vitro* untersucht. Basierend auf möglichen Unterschieden in der Sensitivität der verschiedenen Bakterienstämme gegenüber HBD2 sollen durch weitere Experimente Rückschlüsse über dessen Wirkmechanismus getroffen werden. Außerdem soll die Resistenzbildung von *E. coli* gegenüber HBD2 beurteilt werden, um dessen antimikrobiellen Eigenschaften näher zu charakterisieren. Die Etablierung eines Infektionsmodells mit *Galleria mellonella* wird schließlich zeigen, ob sich die *in vitro* Aktivität von HBD2 gegenüber Bakterien auch *in vivo* beobachten lässt.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

Die folgenden Abschnitte listen alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte auf. Alles, was hier nicht aufgeführt wurde, gehört zur Standardausstattung von Laboren.

2.1.1 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5424	Eppendorf, Deutschland
FACSCanto II™	BD Biosciences, USA
Geno DI Water Systems	TripleRed, UK
Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, USA
Jenway 7300 Visible Spectrophotometer	Jenway, USA
Spark® 10M Multimode Microplate Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader	BioTek Instruments, USA
WiseCube® WIS-30	Witeg Labortechnik GmbH, Deutschland
DMP-Manual Microsyringe Pump with Digital Display	World Precision Instrument, USA

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Materialien	Hersteller
50 & 25 ml Tube	Sarstedt, Deutschland
Agarplatten mit LB Medium	Selbst hergestellt. Siehe 2.1.4.
BD Micro-Fine™ 0,3 ml Insulinspritzen	Becton Dickinson, USA
Cellstar™ 6 well cell culture plate	Greiner, Österreich
Cellstar™ 96 well cell culture plate, Flat bottom	Greiner, Österreich
Columbia Agar Platten mit 5% Schafblut	Becton Dickinson, USA

Corning™ Falcon™ Round Bottom Polystyrene Tubes	Thermo Fisher Scientific, USA
Eppendorf Cups	Eppendorf, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Deutschland
Roti® - Store - Cryoröhrchen	Carl Roth, Deutschland
Wachsmottenfutter (siehe 2.2.6.1)	Ostermühle Naturkost GmbH, Deutschland

2.1.3 CHEMIKALIEN

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Agarose Low EEO	AppliChem, Deutschland
Bacto™ Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB)	Becton Dickinson, USA
BSA	Sigma-Aldrich, USA
Ciprofloxacin	Fluka, Schweiz
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, USA
DiBAC ₄ (3)	Thermo Fisher Scientific, USA
Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	Becton Dickinson, USA
Difco™ Mueller Hinton Broth	Becton Dickinson, USA
Dulbecco´s Phosphate-Buffered Salines (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, USA
Essigsäure (HAc)	Carl Roth, Deutschland
MOPS Puffer	Carl Roth, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, USA

2.1.4 MEDIEN UND PUFFER

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien, Puffer, Lösungen und Verdünnungen wurden stets mit Wasser aus einer Geno DI Water Systems (TripleRed, UK) Wasseraufbereitungsanlage hergestellt.

Kulturmedien

<p>1x TSB Nährmedium (flüssig)</p> <p>Bacto™ Tryptic Soy Broth 30 g</p> <p>H₂O ad 1 L</p>	<p>1x MHB Nährmedium (flüssig)</p> <p>Difco™ Mueller Hinton Broth 21 g</p> <p>H₂O ad 1 L</p>
<p>2x TSB Nährmedium (flüssig)</p> <p>Bacto™ Tryptic Soy Broth 60 g</p> <p>H₂O ad 1 L</p>	<p>LB Nährmedium (flüssig)</p> <p>Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) 25 g</p> <p>H₂O ad 1 L</p>
<p>Underlaygel (nährstoffarm, fest)</p> <p>10 mM NaP Puffer (pH 7,4) 10 ml</p> <p>1x TSB (flüssig) 1 ml</p> <p>EEO Agarose 1 g</p> <p>H₂O 96 ml</p> <p>HCl pH 7,4 einstellen</p>	<p>Overlaygel (nährstoffreich, fest)</p> <p>10 mM NaP Puffer (pH 7,4) 10 ml</p> <p>TSB (Pulver) 6g</p> <p>EEO Agarose 1 g</p> <p>H₂O 96 ml</p>
<p>LB Nährmedium (fest)</p> <p>LB Medium (flüssig) 1 L</p> <p>Bacto™ Agar 15 g</p>	

Puffer

AMA Puffer	
10 mM Natrium Phosphatpuffer (pH 7,4)	99%
1x TSB (flüssig)	1%

MOPS Puffer (20mM, pH 7)	
C ₇ H ₁₅ NO ₄ S	4,1854 g
H ₂ O	1 L

200 mM Na₂HPO₄	
Na ₂ HPO ₄	35,6 g
H ₂ O	1 L

200 mM NaH₂PO₄	
NaH ₂ PO ₄	27,6 g
H ₂ O	1 L

100 mM NaP Puffer (pH 7,4)	
NaH ₂ PO ₄ 200mM	95 ml
Na ₂ HPO ₄ 200mM	405 ml
H ₂ O	Ad 1 L

2.1.5 WACHSMOTTENLARVEN

Wachsmottenlarven wurden von „fauna topics“ Zoobedarf, Zucht- und Handels GmbH, Deutschland (Zuchtansatz), beziehungsweise bei Biosystems Technology Ltd., UK (TruLarv™) bezogen und unter den in 2.2.6.1 beschriebenen Bedingungen gehalten.

2.1.6 PEPTIDE

Peptid	Sequenz	Hersteller
HBD2	GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	Defensin therapeutics, Dänemark
HBD3	GIINTLQKYCYCRVGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	PeptaNova GmbH, Deutschland
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	Peptide Institute Inc., Japan

2.1.7 VERWENDETE *E. COLI* STÄMME

<i>E. coli</i> Stamm	Eigenschaften	Serotyp	Herkunft	Abkürzung
UPEC (DSM 10729)	Patientenisolat Pathogen	O1:K1:H7	DSMZ	UPEC
EPEC (DSM 8695)	Pathogen	O26:H-	DSMZ	EPEC
ATCC 25922 (DSM 1103)	Klinisches Isolat	O1 Biotype 1	DSMZ	ATCC
EAEC R250 Type 42	Pathogen		MMH	Typ 42
EAEC R251 Type 172	Pathogen		MMH	Typ 172
ETEC R252 (E57)	Pathogen		MMH	E57
ETEC R253 (H484)	Pathogen		MMH	H484
ETEC R254 (H164)	Pathogen		MMH	H164
BW25113 WT	Laborstamm		UCL	BW25113
Nissle 1917	Probiotikum	O6:K5:H1	AP	EcN
CFT 073 (UPEC) (DSM 103538)	Pathogen	O6:K2:H1	MMH	CFT073
Symbioflor 2 Genotype 1/2 (DSM 16441)	Probiotikum		SP	G1
Symbioflor 2 Genotype 3/10 (DSM 16443)	Probiotikum		SP	G2
Symbioflor 2 Genotype 4/9 (DSM 16444)	Probiotikum		SP	G3

- DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH,
Deutschland
- MMH: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, Deutschland
- SP: SymbioPharm GmbH, Herborn, Deutschland
- AP: Ardeypharm GmbH, Herdecke, Deutschland
- UCL: De Duve Institute, Université catholique de Louvain (UCL), Brüssel, Belgien

2.1.8 SOFTWARE

Programm	Hersteller
Gen5 Version 2.00.18	BioTek, USA
GraphPad Prism Version 7.03	GraphPad Software Inc., USA
i-control Microplate Reader Software	Tecan Group, Schweiz
Intas GDS	Intas Science Imaging, Deutschland
BD FACSDiva™ Software	Becton Dickinson, USA
FlowJo®	FlowJo, LLC, USA
Sparkcontrol Ink. Microplate Reader Software	Tecan Group, Schweiz

2.2 METHODEN

2.2.1 BESTIMMEN DER COLONY FORMING UNITS PRO MILLILITER FÜR DIE VERWENDETEN BAKTERIEN

Für die Bestimmung der „*colony forming units*“/ml (CFU/ml) wurden Bakterien über Nacht in 1x TSB schüttelnd bei 37 °C kultiviert, am Folgetag auf eine OD₆₀₀ (optische Dichte) bei 600 nm von 0,01 in 1x TSB überimpft und bis zur LOG Phase des bakteriellen Wachstum unter genannten Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch zwei Zentrifugationsschritte (2500 RPM und 4 °C) mit anschließender Wiederaufnahme des Pellets in AMA Puffer gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in 1 ml eingestellt. Durch Erstellen einer Verdünnungsreihe aus dieser Probe wurde die Bakterienkonzentration um den Faktor 10⁴–10⁶ verringert. Verschiedene Verdünnungen wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien ausgezählt. Multipliziert man die Anzahl der gezählten Kolonien mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Probe, so lässt sich die CFU/ml bei einer OD₆₀₀= 0,1 für 1 ml berechnen.

2.2.2 TRÜBUNGSASSAY

Das Protokoll zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde nach (Wiegand et al., 2008) angepasst. Dafür wurden die zu untersuchenden Bakterien über Nacht in 1x TSB bei 37 °C schüttelnd inkubiert, am Folgetag zweimal auf eine OD₆₀₀ von 0,01 in 1x TSB überimpft und nach Erreichen der LOG Phase durch zweimalige Zentrifugation (2500 RPM und 4 °C) und Wiederaufnahme des Bakterienpellets in AMA Puffer gewaschen. Durch Messung der OD₆₀₀ wurden die Bakterien quantifiziert und 5 x 10⁵ CFU/ml in eine HBD2 Verdünnungsreihe (150–0,29 µM in AMA Puffer) in einem finalen Volumen von 100 µl auf einer 96 Well Platte zugegeben. Die 96 Well Platte wurde daraufhin 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl 2x TSB zu den 100 µl Bakterien-/Peptidsuspension hinzugefügt und das Wachstum der Bakterien für 18 h alle 30 min im Synergy™ HT Multi-Detection

Microplate Reader (BioTek Instruments, USA) unter leichtem Schütteln bei 37 °C mit einer OD₆₀₀ photometrisch gemessen. Über das relative Wachstum der behandelten zu den unbehandelten Bakterien wurde das antimikrobielle Potential von HBD2 bestimmt.

2.2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Zur Untersuchung der Zellwand von Bakterien als potenzielle Zielstruktur von HBD2 wurde eine Durchflusszytometrie mit den Farbstoffen Propidiumiodid (PI), bzw. DiBAC₄(3) durchgeführt. Die Kultivierung der Bakterien fand dabei stets in 1:6 mit Wasser verdünntem 1x TSB statt. Darin wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C schüttelnd angezchtet, am Folgetag auf eine OD₆₀₀ von 0,05 überimpft und schließlich 1,425 x 10⁶ CFU/ml Bakterien in der LOG Phase ihres Wachstums verwendet. Diese Bakterien wurden eine Stunde mit ihrer jeweiligen vierfachen MHK von HBD2 (Tabelle 2) in einem Volumen von 105 µl bei 37 °C schüttelnd inkubiert. HBD3 (9,699 µM) wurde in diesem Schritt als Positivkontrolle und 0,01% BSA in PBS als Negativkontrolle verwendet. Daraufhin wurden die Ansätze mit 12,8 µg/ml PI (Sigma-Aldrich), oder 9,5 µg/ml DiBAC₄(3) (Thermo Fisher Scientific) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurde das Pellet der Proben durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, in 300 µl DPBS (Thermo Fisher Scientific) aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACSCanto™) bei 535 nm max. Exzitation und 617 nm max. Emission (Propidiumiodid), bzw. 490 nm max. Exzitation und 516 nm max. Emission (DiBAC₄(3)) gemessen.

2.2.4 CYTOCHROM-C-ASSAY

Bei diesem Versuchsansatz wurde die bakterielle Membranladung quantifiziert, indem die Wechselwirkungen derselben mit dem kationischen Cytochrom C (Sigma-Aldrich) untersucht wurden. Dafür wurde das Protokoll von (Peschel et al., 1999) angepasst. Entsprechend des Protokolls wurden die verwendeten Bakterien in Schikanekolben mit 1x TSB über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert und am Folgetag durch zweimalige Zentrifugation (3000 RPM

und 4 °C) und Wiederaufnahme des Bakterienpellets in MOPS Puffer (20 mM, pH 7) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Bakterien in MOPS Puffer auf 28×10^8 CFU/ml eingestellt, 0,5 mg/ml Cytochrom C hinzugegeben und für 10 min unter Ausschluss von Licht inkubiert. Durch Zentrifugation dieses Ansatzes bei 3000 RPM und 4° C konnte der Überstand vom Bakterienpellet getrennt und das Cytochrom C im Überstand photometrisch bei OD_{530} quantifiziert werden. Über das Verhältnis von Cytochrom C im Überstand zu Cytochrom C in der Positivkontrolle (MOPS Puffer und 0,5 mg/ml Cytochrom C) wurde eine Aussage über die bakterielle Membranladung getroffen.

2.2.5 RESISTENZINDUKTION

Die Versuche zur Resistenzinduktion fanden allesamt in Müller Hinton Bouillon statt, welche 1:3 mit Wasser verdünnt worden ist (1/3x MHB). Das untersuchte Bakterium ist *E. coli* EPEC DSM8695 (EPEC). Die Bakterien wurden stets bei 37 °C schüttelnd kultiviert.

Bestimmung der MHK von HBD2 und Ciprofloxacin HCl in 1/3x MHB

Die Bakterien wurden über Nacht in 1/3x MHB kultiviert. Am Folgetag wurden 5×10^5 CFU/ml in 1/3x MHB überimpft und für 12 h inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch zweimalige Zentrifugation (2500 RPM und 4 °C) und anschließende Wiederaufnahme in 1/3x MHB gewaschen und 5×10^5 CFU/ml in eine HBD2 (57,7–0,1128 µM) und Ciprofloxacin HCl (1,3594–0,005289 µM) Verdünnungsreihe auf einer 96 Well Platte in 1/3x MHB eingesetzt. Das Wachstum wurde 18 h alle 30 min im Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA) photometrisch unter leichtem Schütteln bei 37 °C und einer OD_{600} gemessen und schließlich die photometrische bestimmte MHK durch Ausplattieren bestätigt.

Resistenzinduktion von E. coli EPEC gegen HBD2 und Ciprofloxacin

EPEC wurde über Nacht in 1/3x MHB kultiviert. Ab dem Folgetag wurden jeweils 5×10^5 CFU/ml EPEC sowohl mit der im Schritt zuvor bestimmten halben MHK von HBD2 (1,805 μ M), oder Ciprofloxacin (0,0106 μ M), sowie ohne Antibiotikum für 30 Passagen á 12 h in einzelnen Versuchsreihen in 1/3x MHB kultiviert. Nach jeder Passage wurde die OD₆₀₀ bestimmt, dementsprechend 5×10^5 CFU/ml in die nächste Passage überimpft und das Restvolumen in Kryoröhrchen bei -20 °C konserviert.

Untersuchung des Wachstums unterschiedlicher Passagen bei Inkubation mit der vierfachen MHK von HBD2 und Ciprofloxacin

Im Anschluss an die 30 Passagen Inkubation mit HBD2, Ciprofloxacin oder ohne Antibiotikum wurden aus den Kryoröhrchen der Passagen 1, 10, 20 und 30 der einzelnen Versuchsreihen Bakterien über Nacht in 1/3x MHB angeimpft. Am Folgetag wurden 5×10^5 CFU/ml Bakterien aus der Übernachtskultur in 1/3x MHB überimpft und für 12 h kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien durch zweimalige Zentrifugation (2500 RPM und 4 °C) und anschließende Wiederaufnahme des Bakterienpellets in 1/3x MHB gewaschen und auf 5×10^5 CFU/ml eingestellt. Diese Bakterienanzahl wurde mit der vierfachen MHK von HBD2 (14,44 μ M) oder Ciprofloxacin (0,0849 μ M) sowie ohne Antibiotikum als Wachstumskontrolle in 1/3x MHB auf eine 96 Well Platte gebracht. Das Wachstumsverhalten der einzelnen Passagen wurde 12 h alle 30 min photometrisch im Spark® 10M Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG, Schweiz) unter leichtem Schütteln bei 37 °C und einer OD₆₀₀ gemessen.

2.2.6 GALLERIA MELLONELLA

Die Versuche mit *Galleria mellonella* Larven wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2.6.1 HALTUNG DER WACHSMOTTENLARVEN

Die Wachsmottenlarven wurden in Zuchtboxen bei 30 °C im Dunkeln gelagert und mit einer Mischung aus 220 g Maisgrieß, 220 g Vollkornweizenschrot, 175 g Bienenwachs, 110 g Magermilchpulver, 110 g Honig und 55 g Hefeflocken (Ostermühle Naturkost) gefüttert. Für die Versuche wurden Larven mit einem Gewicht von 150–300 mg ausgewählt. 24 h vor Versuchsdurchführung wurden die Larven ohne Futter gehalten.

2.2.6.2 UNTERSUCHUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON HBD2

IN VIVO

Systemische Injektion

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 *in vivo* wurde das Überleben von Wachsmottenlarven (faunatopics) nach Infektion mit *E. coli* EPEC DSM8695 (EPEC) und Applikation von HBD2 untersucht. Dafür wurde EPEC in 1x TSB über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert und am Folgetag auf eine OD₆₀₀ von 0,01 in 1x TSB überimpft und bis zum Erreichen der LOG Phase erneut bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen der LOG Phase wurden die Bakterien durch zweimalige Zentrifugation (2500 RPM und 4 °C) und Wiederaufnahme des Bakterienpellets in AMA Puffer gewaschen und darin auf $2,25 \times 10^7$ CFU/ml eingestellt. Mit Insulinspritzen (BD, USA) wurde den Larven 10 µl HBD2 (10 µg/µl) 15 min vor, sowie zum nahezu selben Zeitpunkt der Injektion von 10 µl Bakterienlösung ($2,25 \times 10^5$ CFU) in das hämolympathische System gespritzt. Die unteren Pseudopodien als Injektionsstelle wurden vorher mit 70% Isopropanol desinfiziert. Im Anschluss an die Injektion wurden die Larven für 120 h bei 37 °C im Dunkeln gelagert. Alle 24 h wurde das Überleben der Larven dokumentiert. Als tot galt eine Larve, sobald sie sich nach Berührung nicht mehr bewegte.

Orale Injektion mittels Force-Feeding

Zusätzlich zur systemischen wurde das Überleben von Wachsmottenlarven (TruLarv™) nach oraler Injektion mit EPEC und anschließender oraler Applikation von HBD2 untersucht. Dafür wurde EPEC in 1x TSB über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert und am Folgetag auf eine OD₆₀₀ von 0,01 in 1x TSB überimpft und bis zum Erreichen der LOG Phase erneut bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen der LOG Phase wurden die Bakterien durch zweimalige Zentrifugation (2500 RPM und 4 °C) und Wiederaufnahme des Bakterienpellets in PBS gewaschen und auf $2,5 \times 10^7$ CFU/ml eingestellt. Aus dieser Bakterienlösung wurde 44 Larven mit einer Manual Microsyringe Pump (World Precision Instruments, USA) und stumpfen Insulinspritzen (BD, USA) oral 10 µl appliziert. 1 h nach der Infektion mit Bakterien wurde 20 von den zuvor mit Bakterien infizierten Larven 10 µl HBD2 (1 µg/µl) oral appliziert, und den übrigen 24 Larven 10 µl PBS. Im Anschluss wurden die Larven für 120 h bei 37 °C im Dunkeln gelagert. Alle 24 h wurde das Überleben der Larven dokumentiert. Als tot galt eine Larve, sobald sie sich nach Berührung nicht mehr bewegte.

2.2.6.3 UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON HÄMOLYPMHE AUF DIE AKTIVITÄT VON HBD2

Die Wirkung der Hämolymphe von Wachsmottenlarven auf die antimikrobielle Aktivität von HBD2 wurde mittels eines Radial Diffusion Assay (RDA) untersucht. Die ist eine von (Lehrer et al., 1991) etablierte Methode zur Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität von Peptiden. Dafür wurde EPEC bei 37 °C schüttelnd in 1x TSB über Nacht kultiviert und am Folgetag auf eine OD₆₀₀ von 0,01 in 1x TSB überimpft und bis zum Erreichen der LOG Phase kultiviert. Nach Erreichen der LOG Phase wurden die Bakterien durch zweimalige Zentrifugation (2500 RPM und 4 °C) und anschließende Wiederaufnahme des Bakterienpellets in 10 mM Natriumphosphat Puffer (pH 7,4) gewaschen. Nach dem Waschen wurden 4×10^6 CFU/ml in 10 ml flüssiges, nährstoffarmes Underlay Gel (2.1.4) eingesetzt. Nach Erstarren des Gels (15-60 min) wurden Stanzlöcher für jeweils 4 µl Proben erstellt. In jeweils einzelne Stanzlöcher wurden 2 µl HBD2, LL37 (je

1 mg/ml) und 2 μ l Ciprofloxacin (20 μ g/ml) sowohl zusammen mit 2 μ l des jeweiligen Lösungsmittels (0,01% HAc für LL37, 0,01% BSA in PBS für HBD2, H₂O für Ciprofloxacin), als auch nach Vermischen mit 2 μ l Hämolymphe hinzugegeben. Die Hämolymphe ist unmittelbar zuvor durch Punktion einer Wachsmottenlarve mit einer Insulinspritze gewonnen worden. Die Punktionsstelle wurde zuvor mit 70% Isopropanol desinfiziert. Die Hämolymphe wurde direkt mit den zu untersuchenden Substanzen vermischt und in die Stanzlöcher pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 4 μ l der bereits erwähnten Lösungsmittel allein sowie 4 μ l der Hämolymphe in einzelne Stanzlöcher pipettiert. Die Gele wurden 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden 10 ml eines nährstoffreichen Overlaygels (2.1.4) auf das Underlaygel gegossen und anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Bis zum nächsten Tag konnten die Bakterien wachsen und, mit Ausnahme der Bereiche wo die antimikrobiellen Proben wirken, einen Bakterienrasen bilden. Die Größe der Hemmhofdurchmesser [mm] im gewachsenen Bakterienrasen wird gemessen, um so auf die antimikrobielle Aktivität der untersuchten Substanzen rückschließen zu können.

2.2.7 STATISTIK

Sämtliche graphischen und statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 7 durchgeführt. Für eine Korrelationsanalyse wurde der nichtparametrische Test nach Spearman verwendet.

3 ERGEBNISSE

Durch die Arbeiten von Wehkamp et al., 2004, Schlee et al., 2008 und Möndel et al., 2009 ist bekannt, dass einige probiotische *E. coli* Stämme HBD2 im humanen Organismus induzieren. Die Wirksamkeit dieser Stämme zur Anwendung bei unterschiedlichen Indikationen, wie zum Beispiel bei der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa, lässt sich womöglich durch die Induktion von HBD2 im Darm erklären (Wehkamp et al., 2004). Vor dem Hintergrund einer potenziellen therapeutischen Verwendung von HBD2 und dessen antimikrobieller Aktivität als Antibiotikum und bei anderen Indikationen sollen die im Folgenden geschilderten Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der antimikrobiellen Eigenschaften dieses Peptids beitragen.

3.1 PHOTOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON BAKTERIEN

In einem ersten Schritt wurde die CFU/ml der in dieser Arbeit untersuchten *E. coli* Stämme bei einer OD_{600} von 0,1 bestimmt. Dies geschah, um in allen weiteren Experimenten durch Messung der OD_{600} eine definierte Anzahl an Bakterien jedes Stammes einsetzen zu können. Die mittlere CFU/ml bei $OD_{600} = 0,1$ ist für die untersuchten Bakterienstämme in Tabelle 1 dargestellt. Dabei sind probiotische *E. coli* von pathogenen und anderen Stämmen getrennt aufgelistet. Die untersuchten *E. coli* Stämme zeigten dabei eine unterschiedliche Anzahl an CFU/ml. So besaß unter den probiotischen Stämmen EcN eine deutlich höhere Anzahl an lebenden Bakterien bei einer OD_{600} von 0,1 als die Stämme Symbioflor G1-G3. Der Referenzstamm für Suszeptibilitätsuntersuchungen antimikrobieller Substanzen, ATCC, sowie die pathogenen Stämme EPEC und UPEC bildeten die meisten Kolonien aller untersuchten Bakterienstämme aus. Die pathogenen Stämme E57, CFT073, sowie der probiotische Stamm Symbioflor G3 zeigten die geringsten CFU/ml.

Tabelle 1: Mittelwerte der CFU/ml bei OD₆₀₀ = 0,1 für verschiedene *E. coli* Stämme

Probiotische <i>E. coli</i> Stämme	Ø CFU/ml bei OD₆₀₀ = 0,1
EcN	33.500.000
Symbioflor G1	24.000.000
Symbioflor G2	24.000.000
Symbioflor G3	14.000.000

Pathogene und andere <i>E. coli</i> Stämme	Ø CFU/ml bei OD₆₀₀ = 0,1
Typ 42	29.000.000
ATCC	40.500.000
Typ 172	23.000.000
H164	24.000.000
H484	26.000.000
E57	11.000.000
UPEC	37.500.000
EPEC	35.500.000
CFT073	17.500.000
BW25113	33.500.000

Auf Basis dieser Ergebnisse konnte für die weiteren Experimente durch Bestimmung der OD₆₀₀ immer dieselbe Anzahl an Bakterien in Flüssigmedium verwendet werden. Dies ist für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich des Effektes von HBD2 auf die unterschiedlichen *E. coli* Stämme von entscheidender Bedeutung.

3.2 ANTIMIKROBIELLE WIRKWEISE VON HBD2 *IN VITRO*

Um in einem ersten Schritt die antimikrobielle Aktivität und Wirkweise von HBD2 *in vitro* zu untersuchen, wurde es zuerst in einem Flüssigassay gegen verschiedene *E. coli* Stämme getestet. Auf den Ergebnissen dieser Versuche bauten im Anschluss weitere Experimente auf, welche wirkmechanistische Rückschlüsse zu HBD2 erlauben. Zudem wurde die Resistenzlage von *E. coli* nach längerfristiger Exposition gegenüber subletalen HBD2 Dosierungen ermittelt, da dies einen wichtigen Aspekt vor der therapeutischen Verwendung dieses Peptids darstellt. Zum Schluss wurde zudem untersucht, ob sich antimikrobielle Aktivität von HBD2 auch *in vivo* in einem Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* zeigen lässt.

3.2.1 UNTERSUCHUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON HBD2 IM TRÜBUNGSASSAY

Die antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegen *E. coli* ist lange bekannt (Harder et al., 1997). Auch konnte bereits eine vergleichbare Aktivität von HBD2 gegenüber fünf verschiedenen *E. coli* Stämmen im RDA gezeigt werden (Möndel et al., 2009). Für einen Vergleich der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 auf unterschiedliche Bakterien ist jedoch ein Trübungsassay besser geeignet als ein RDA, da sowohl die eingesetzte Anzahl an Bakterien als auch die Peptidkonzentration genau definiert werden. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung von HBD2 auf 14 verschiedene pathogene, probiotische und andere *E. coli* Stämme mittels eines Trübungsassay untersucht. Auf Basis der in Tabelle 1 gezeigten Ergebnisse wurden stets 5×10^5 CFU/ml Bakterien mit unterschiedlichen Konzentrationen von HBD2 inkubiert, um das antimikrobielle Potential von HBD2 zu charakterisieren. Dabei wurde die Wirkung von HBD2 mittels der MHK ermittelt, welche als die mittlere HBD2-Konzentration aus mindestens drei Versuchen definiert wurde, bei welcher nach 18 h Inkubation kein bakterielles Wachstum beobachtet werden konnte (Abbildung 3 A und B). Das Bakterienwachstum der durchgeführten Versuche nach 18 h bei unterschiedlichen Konzentrationen von HBD2 normiert auf die Positivkontrolle ist in Abbildung 3 C und D dargestellt.

HBD2 zeigte im Trübungsassay unterschiedliche antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative *E. coli* Stämme (Abbildung 3). So konnte für die pathogenen Stämme H164 (1,76 μ M), CFT073 (0,78 μ M), Typ 172 (0,98 μ M), EPEC (0,58 μ M), UPEC (0,58 μ M), E57 (0,58 μ M) und H484 (0,88 μ M) eine sehr niedrige MHK detektiert werden, während diese bei den ebenfalls pathogenen Stämmen ATCC (2,34 μ M) und insbesondere Typ 42 (14,06 μ M) deutlich höher lag. Im Vergleich zu den meisten pathogenen Stämmen war die MHK der probiotischen Bakterien wie EcN (8,20 μ M), sowie Symbioflor G1 (2,2 μ M), G2 (5,27 μ M) und G3 (1,32 μ M) teilweise größer (Abbildung 3 B). Im Schnitt konnte für die probiotischen Bakterien eine MHK von 4,25 μ M nachgewiesen werden während diese bei den pathogenen *E. coli* nach Ausschluss von dem in Abb. 3 A

ERGEBNISSE

grau markierten Typ 42 als Ausreißer und BW25113 (2,64 μM) als Laborstamm bei 1,15 μM lag. Betrachtet man das auf die Positivkontrolle normierte Wachstum der einzelnen Stämme nach 18 h, so lässt sich besonders deutlich für Typ 42, BW25113, ATCC, EcN und Symbioflor G2 eine dosisabhängige Verminderung des Wachstums bei verschiedenen HBD2-Konzentrationen erkennen (Abbildung 3 C und D).

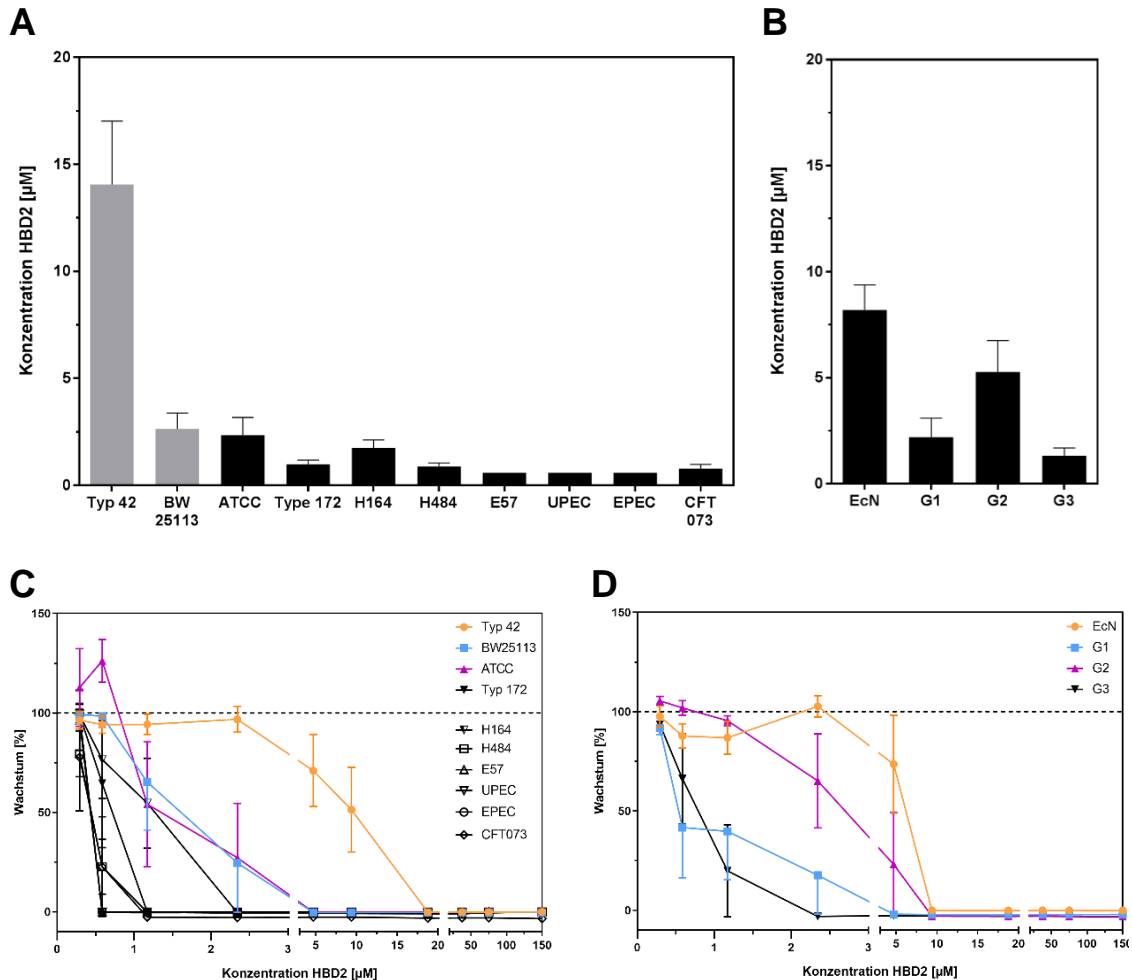


Abbildung 3: Im Trübungsassay gemessene antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegenüber unterschiedlichen *E. coli* Stämmen

Die Abbildung zeigt den mittleren Wert für die MHK [μM] von HBD2 gegen 5×10^5 CFU/ml von pathogenen und anderen (A), sowie probiotischen (B) *E. coli* Stämmen nach mindestens drei Versuchsdurchführungen. Dargestellt in (A) sind pathogene Stämme (schwarz, außer Typ 42) und der Laborstamm *E. coli* BW25113 (grau). Es zeigt sich, dass Typ 42 eine sehr hohe MHK aufweist, während die anderen Stämme über eine ähnlich niedrige MHK verfügen. (B) stellt die mittlere MHK von HBD2 gegen die untersuchten probiotischen *E. coli* Stämme dar. In (C) und (D) ist das Wachstum bei verschiedenen HBD2-Konzentrationen nach 18 h normiert auf die Wachstumskontrolle für die pathogenen Stämme und einen Laborstamm (BW25113) (C) und die probiotischen *E. coli* Stämme (D) dargestellt. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die unterschiedlichen *E. coli* Stämme individuell auf HBD2 reagieren. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass probiotische *E. coli* Stämme, insbesondere EcN, teilweise weniger sensitiv gegenüber HBD2 sind als pathogene. Daher sollen im Folgenden die möglichen Ursachen für die unterschiedliche Suszeptibilität der verschiedenen *E. coli* gegenüber HBD2 untersucht werden.

3.2.2 BESTIMMUNG DER BAKTERIELLEN ZELLMEMBRANLADUNG UND KORRELATION MIT DEN TRÜBUNGSASSAYDATEN

Peschel et al., 1999 konnten zeigen, dass eine veränderte bakterielle Zellmembranladung die Sensitivität von Bakterien gegenüber Defensinen wie HNP1-3 beeinflussen kann. Daher wurde an dieser Stelle die Membranladung der untersuchten *E. coli* Stämme experimentell mit Hilfe eines Cytochrom-C-Assays untersucht. In Verbindung mit den Trübungsassaydaten sollte auf diese Weise beurteilt werden, ob die unterschiedliche MHK für HBD2 gegenüber probiotischen und pathogenen Bakterien mit deren Zellmembranladung korreliert. Dazu wurden die Bakterien in einem ersten Schritt mit dem kationischen Cytochrom C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Anteil an Cytochrom C im Überstand wurde photometrisch bestimmt und auf die Positivkontrolle (Cytochrom C + MOPS Puffer) normiert. Dabei galt die Annahme: je mehr kationisches Cytochrom C im Überstand, desto kationischer die bakterielle Zellmembran. So waren Rückschlüsse zur bakteriellen Zellmembranladung möglich.

In Abbildung 4 A und B sind die Ergebnisse der photometrischen Messungen des Cytochrom-C-Assay dargestellt. Es zeigte sich, dass der Überstand aller pathogenen Stämme und eines Laborstamms im Mittel 73% des in der Positivkontrolle enthaltenen Cytochroms aufwies, wohingegen der Wert für die probiotischen Stämme mit 90% höher lag. Betrachtet man Typ 42, ATCC, BW25113, Nissle und G2, also die fünf Stämme mit der höchsten MHK (Abbildung 3), so fand sich ein Mittelwert von 99% für Cytochrom C im Überstand gegenüber 65% für alle anderen Stämme mit niedrigerer MHK. Die Daten des Cytochrom-C-Assays wurden daraufhin mit den Ergebnissen des Trübungsassay

ERGEBNISSE

korreliert. Die Korrelationsanalyse der Datensätze Cytochrom C [%] vs. MHK [μM] nach Spearman zeigte eine positive ($r=0,7219$) und signifikante ($p=0,0049$) Korrelation (95% KI=0,29-0,91) (Abbildung 4 C). Mehr kationisches Cytochrom C im Überstand [%], also eine stärker kationische bakterielle Membranladung, ging tendenziell mit einer erhöhten MHK [μM] einher. Umgekehrt fand sich unter den Bakterien mit relativ zur Gesamtstichprobe wenig Cytochrom C im Überstand [%] keine relativ erhöhte MHK [μM] (Abbildung 4).

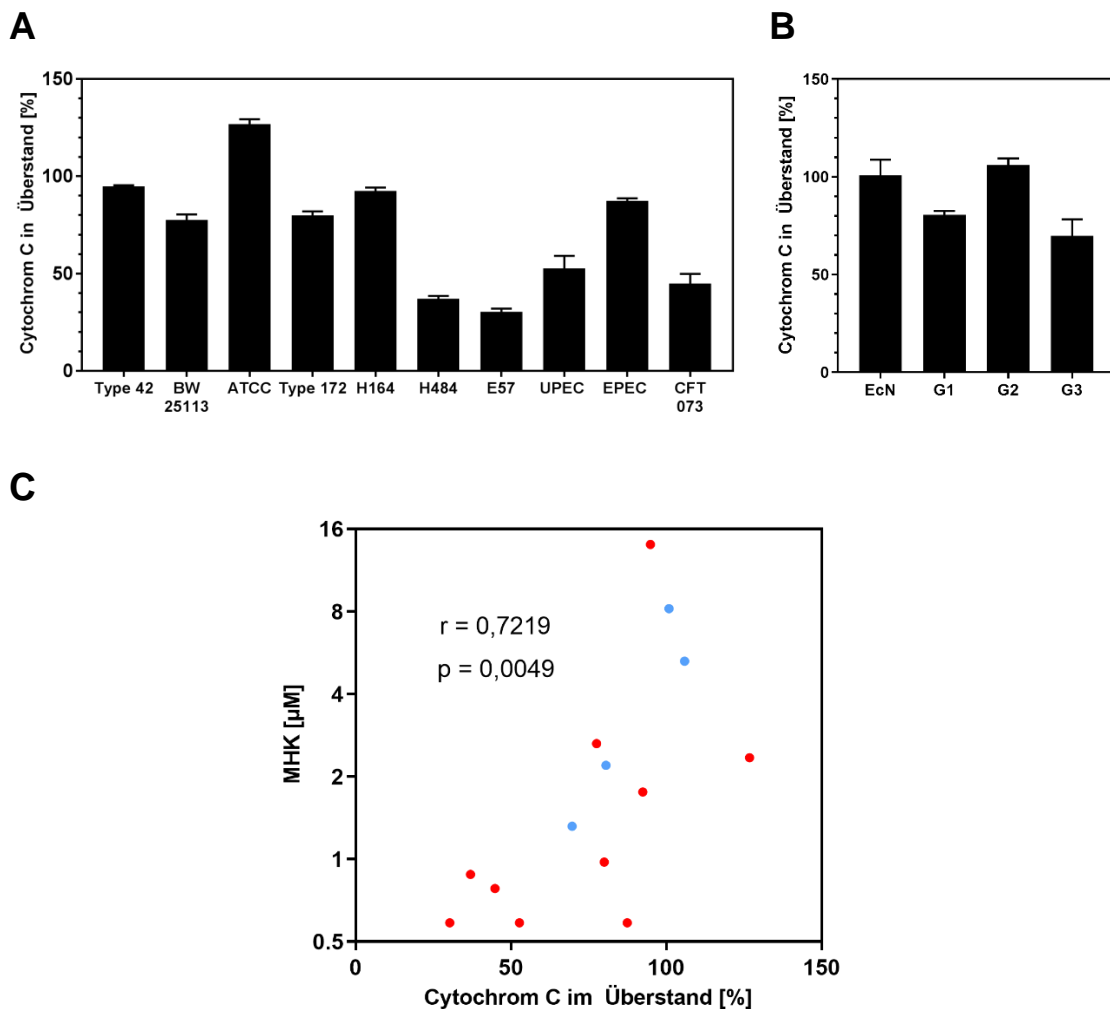


Abbildung 4: Bestimmung der bakteriellen Zellmembranladung und Korrelation mit der entsprechenden MHK

Dargestellt ist der Anteil von Cytochrom C im Überstand [%] normiert auf die Positivkontrolle für pathogene und einen Laborstamm (A), sowie probiotische Stämme von *E. coli* (B). (C) zeigt die in Abbildung 3 dargestellte MHK vs. Cytochrom C im Überstand [%]. Rot eingefärbt sind die pathogenen, sowie ein Laborstamm, blau sind die probiotischen *E. coli* Stämme. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergibt eine positive ($r=0,7219$) und signifikante ($p=0,0049$) Korrelation zwischen beiden Datensätzen (95% KI=0,29-0,91). Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM.

Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Membranladungen zwischen verschiedenen Stämmen von *E. coli*. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen der Membranladung und der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 gegenüber den getesteten Stämmen festgestellt werden. Somit scheint die bakterielle Membranladung ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit von HBD2 zu sein.

3.2.3 UNTERSUCHUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON HBD2 MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels deuten darauf hin, dass die elektrostatische Ladung der bakteriellen Zellmembran die antimikrobielle Aktivität von HBD2 beeinflusst. In der Durchflusszytometrie sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Zellmembran eine Zielstruktur von HBD2 ist. Dafür wurden die verschiedenen *E. coli* Stämme für eine Stunde mit HBD2 inkubiert, mit unterschiedlichen Farbstoffen gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Damit eine Wirkung von HBD2 auf die bakterielle Zellmembran, bzw. das Membranpotential, gezeigt werden kann, wurde die dreifache Menge der im Trübungsassay verwendeten Bakterienanzahl eingesetzt. Da die Versuche außerdem in verdünntem Medium stattfanden, und nicht in Pufferlösung, wurde auch die eingesetzte HBD2-Konzentration erhöht. Indem für jedes Bakterium auf Grundlage der Trübungsassaydaten dessen vierfache MHK verwendet wurde, also eine interindividuell vergleichbar starke Konzentration, sollten etwaige Unterschiede hinsichtlich der bakteriellen Zielstruktur von HBD2 innerhalb der gewählten Bakterienstrichprobe untersucht werden.

3.2.3.1 FÄRBUNG VON *E. COLI* MIT PROPIDIUMIODID

Zunächst wurde PI zur Färbung der Bakterien nach Inkubation mit ihrer spezifischen vierfachen MHK von HBD2 verwendet. PI ist ein häufig genutzter Farbstoff, um die Viabilität von Bakterien in der Durchflusszytometrie zu beurteilen, da er von lebenden Bakterien generell nicht aufgenommen wird. Erst bei einer gestörten Membranfunktion dringt PI in Bakterien ein, interkaliert

innerhalb der Zelle mit der DNA und führt zu einer 20-30fachen Fluoreszenzverstärkung (Waring, 1965; Stiefel et al., 2015). Shi et al., 2007 zeigten außerdem, dass nur 4% der PI positiven (PI+) *E. coli* noch auf LB-Platten kultivierbar waren. Somit eignet sich PI als Farbstoff, mit dem lebende von toten *E. coli* Bakterien unterschieden werden können und Rückschlüsse über die Integrität der bakteriellen Zellmembran als potenzielle Zielstruktur von HBD2 möglich sind.

Für die Untersuchung in der Durchflusszytometrie musste zunächst eine Gatingstrategie für *E. coli* Bakterien etabliert werden. Dafür war es in einem ersten Schritt nötig den im *forward scattered light* (FSC) gesetzten „*Threshold*“ am Durchflusszytometer von 5000 auf 200 Einheiten zu reduzieren, um die Bakterienpopulation in der Durchflusszytometrie zu erkennen. Außerdem wurde zur Darstellung der Ergebnisse eine logarithmische Skala verwendet, da sich die Bakterienpopulationen so besser darstellen lassen. Abbildung 5 zeigt beispielhaft für die vier weiteren untersuchten *E. coli* Stämme die Gatingstrategie von EcN in der Durchflusszytometrie nach Inkubation mit der vierfachen MHK von HBD2 und anschließender Färbung mit PI. Dabei wurde zunächst in einem SSC-A vs. FSC-A Plot zwischen Zelltrümmern und der für die weitere Analyse interessierenden Bakterienpopulation differenziert (Abbildung 5 A). Mittels des FSC-H vs. FSC-A Plot wurden Zelldoubletten von der zuvor ausgewählten Bakterienpopulation ausgeschlossen (Abbildung 5 B), um schließlich im PI-A vs. FSC-A Plot (Abbildung 5 C) beziehungsweise einem Histogramm (Abbildung 5 D) zwischen PI+ und PI- Bakterien unterscheiden zu können. Auf Grundlage der in Abbildung 5 D als Histogramm gezeigten Analyse wurden die in Abbildung 6 und Abbildung 7 gezeigten Diagramme erstellt.

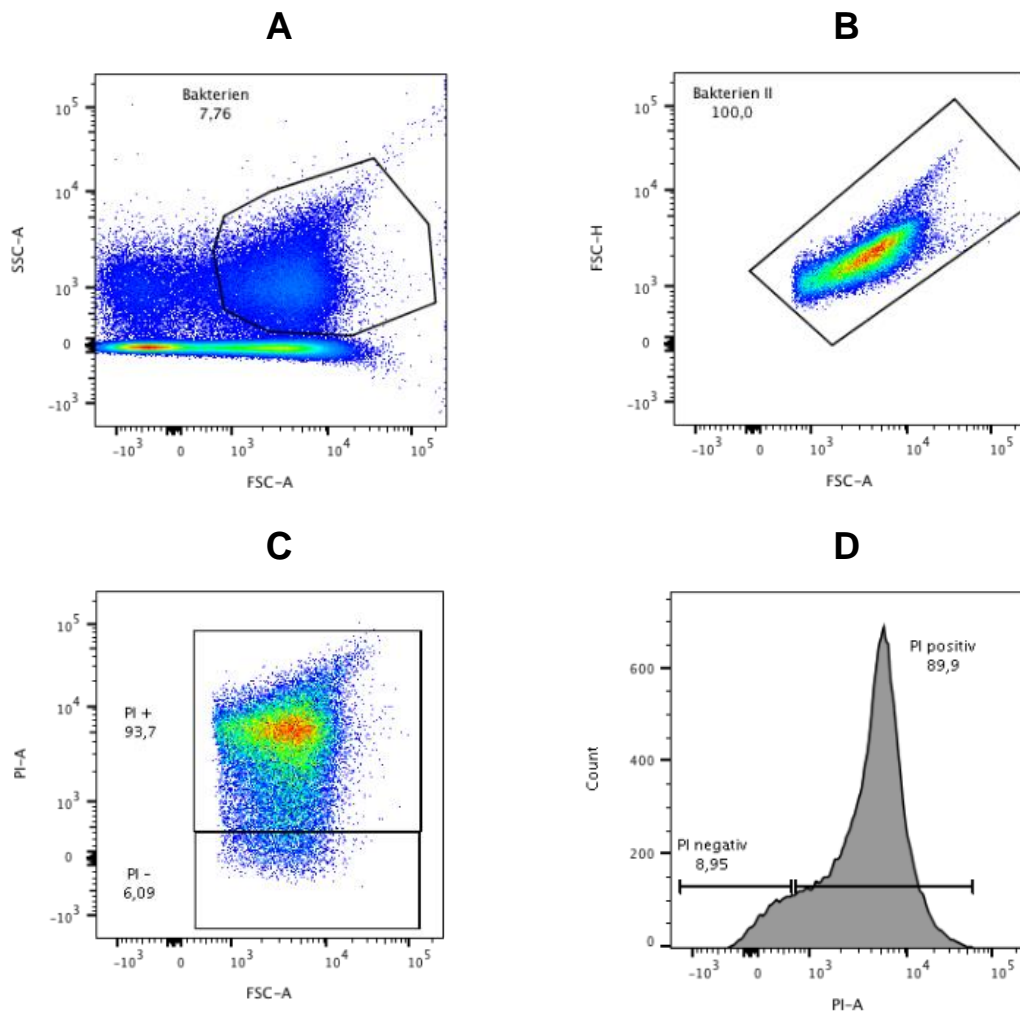


Abbildung 5: Gatingstrategie für *E. coli* Bakterien nach Färbung mit PI

Die Plots zeigen am Beispiel von EcN die Gatingstrategie, anhand der unterschiedliche *E. coli* Stämme in der Durchflusszytometrie nach Behandlung mit ihrer jeweiligen vierfachen MHK von HBD2 und anschließender Färbung mit PI definiert wurden. Im SSC-A vs. FSC-A Plot wurde die Bakterienpopulation gegenüber in der Probe enthaltenen Zelltrümmern abgegrenzt (A). Der FSC-H vs. FSC-A Plot diente dem Ausschluss von Zelldoubletten aus der weiteren Analyse (B). Der PI-A vs. FSC-A Plot (C), ebenso wie das Histogramm (D) differenzieren zwischen PI+/ PI- Bakterienzellen.

Da mit HBD3 bereits ein Defensin identifiziert werden konnte, welches die bakterielle Zellmembran schädigt, wurde es in diesem Experiment als Positivkontrolle verwendet (Sass et al., 2010). Nach einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml HBD3 konnten für alle untersuchten *E. coli* Stämme PI+ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 6). Der Anteil an der Gesamtpopulation normiert auf die Negativkontrolle schwankte dabei nur leicht. So wurden nach einstündiger Inkubation mit HBD3 35% der EcN, 42% der Symbioflor G2, 41%

der Typ 172, 45% der H164 und 48% der EPEC Bakterienpopulation mit PI angefärbt (Abbildung 6). Als Negativkontrolle wurden die untersuchten Bakterien stets eine Stunde mit 0,01% BSA inkubiert.

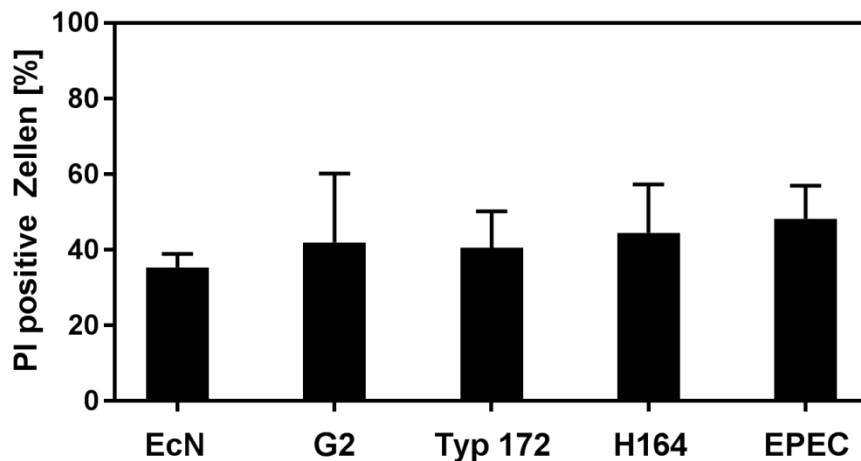


Abbildung 6: PI+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle nach Inkubation mit HBD3
 Dargestellt sind die PI+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle (0,01% BSA) nach einstündiger Inkubation der Bakterien mit 50 µg/ml HBD3. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit ± SEM.

Analog zu der mit HBD3 behandelten Kontrollgruppe ließen sich auch PI+ *E. coli* Bakterien nach einstündiger Inkubation mit der jeweiligen vierfachen MHK von HBD2 in der Durchflusszytometrie nachweisen (Abbildung 7). Der Anteil PI+ Zellen normiert auf die Negativkontrolle (0,01% BSA) ist für die fünf untersuchten *E. coli* Stämme unterschiedlich. So wurden 89% der untersuchten Bakterienpopulation von EcN (162 µg/ml HBD2) und Typ 172 (20 µg/ml HBD2) mit PI angefärbt. Für *E. coli* EPEC (10 µg/ml HBD2) waren noch 70%, für Symbioflor G2 (81 µg/ml HBD2) 54% und für H164 (41 µg/ml HBD2) noch 36% der untersuchten Bakterienpopulation PI+.

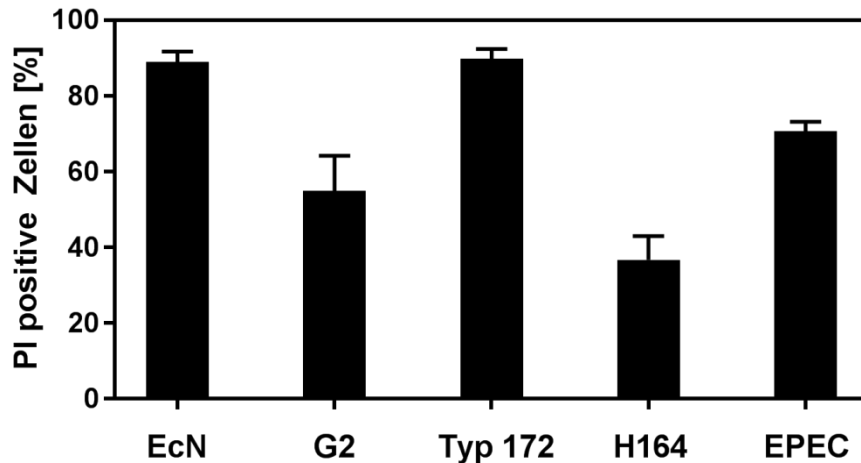


Abbildung 7: PI+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle nach Inkubation mit HBD2
 Dargestellt sind die PI+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle (0,01% BSA) nach einstündiger Inkubation der Bakterien mit ihrer vierfachen MHK von HBD2: EcN (162 µg/ml), G2 (81 µg/ml), Typ 172 (20 µg/ml), H164 (41 µg/ml), EPEC (10 µg/ml). Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit ± SEM.

Die Anfärbung von Bakterien mit PI und deren Nachweis in der Durchflusszytometrie gelang sowohl nach Inkubation mit HBD2 als auch mit HBD3. Dabei liegt der Anteil PI+ Zellen der untersuchten Bakterien nach Inkubation mit der vierfachen MHK von HBD2 zwischen 36-89% und nach Inkubation mit je 50 µg/ml HBD3 zwischen 35-48%. Dies deutet daraufhin, dass HBD2, genau wie HBD3, die Membranfunktion aller untersuchten Bakterien beeinträchtigt.

3.2.3.2 FÄRBUNG VON *E. COLI* MIT DiBAC₄(3)

Nachdem die Färbung mit PI in der Durchflusszytometrie auf eine Schädigung der bakteriellen Zellmembran durch HBD2 hindeutete, sollte dies durch Anfärbung mit DiBAC₄(3) bestätigt werden. DiBAC₄(3) ist ein membranpotentialsensitiver Fluoreszenzfarbstoff, welcher in depolarisierte Zellen eindringen und fluorometrisch angeregt werden kann, sobald er an lipidreiche Strukturen der Zelle bindet. Weil DiBAC₄(3) bei lebenden Bakterien nur an die äußere Membran binden kann und generell eine geringe Affinität zu intakten Membranen hat (Deere et al., 1995), kann auf diese Weise zwischen Bakterien mit und ohne depolarisierter Zellmembran, zwischen lebenden und toten Bakterien also, differenziert werden (Nuding et al., 2006). Der Färbung mit

PI entsprechend wurde dieselbe Konzentration an HBD3 (50 µg/ml) als Positivkontrolle, sowie dieselben HBD2-Konzentrationen für die einstündige Inkubation mit den Bakterien verwendet. Als Negativkontrolle wurden die untersuchten Bakterien stets eine Stunde mit 0,01% BSA inkubiert. Der Anteil DiBAC₄(3) positiver (DiBAC₄(3)+) Zellen wurde auf die Negativkontrolle normiert.

Abbildung 8 zeigt die Gatingstrategie von EcN in der Durchflusszytometrie nach Inkubation mit der vierfachen MHK von HBD2 und anschließender Färbung mit DiBAC₄(3) beispielhaft für die vier weiteren untersuchten *E. coli* Stämme. Die Gatingstrategie entspricht dem in Kapitel 4.2.2.1 beschriebenen Schema. Abbildung 9 und Abbildung 10 wurden auf Grundlage der in Abbildung 8 D als Histogramm gezeigten Analyse erstellt.

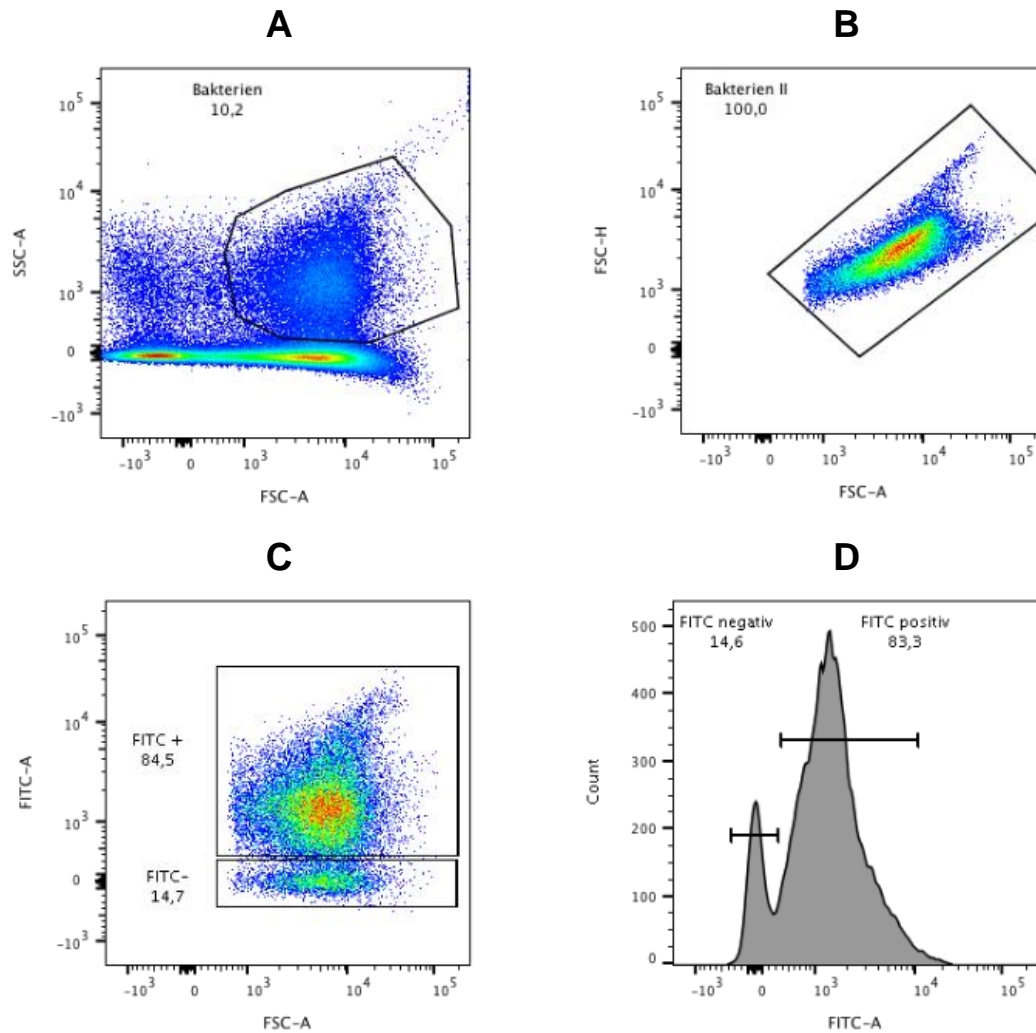


Abbildung 8: Gatingstrategie für *E. coli* Bakterien nach Färbung mit DiBAC₄(3)

Die Plots zeigen am Beispiel von EcN die Gatingstrategie, anhand der unterschiedliche *E. coli* Stämme in der Durchflusszytometrie nach Behandlung mit ihrer jeweiligen vierfachen MHK von HBD2 und anschließender Färbung mit DiBAC₄(3) definiert wurden. Im SSC-A vs. FSC-A Plot wurde die Bakterienpopulation gegenüber in der Probe enthaltenen Zelltrümmern abgegrenzt (A). Der FSC-H vs. FSC-A Plot diente dem Ausschluss von Zelldoubletten aus der weiteren Analyse (B). Der FITC-A vs. FSC-A Plot (C), ebenso wie das Histogramm (D) differenzieren zwischen DiBAC₄(3)+ und DiBAC₄(3)- Bakterienzellen.

Nach einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml HBD3 konnten für alle untersuchten *E. coli* Stämme DiBAC₄(3)+ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 9). Der DiBAC₄(3)+ Anteil an der Gesamtpopulation normiert auf die Negativkontrolle war für die Stämme EcN (83%), Symbioflor G2 (80%) und EPEC (82%) nahezu gleich. Etwas niedriger war der Anteil für die Stämme Typ 172 (64%) und H164 (62%). Als Negativkontrolle wurden die untersuchten Bakterien stets eine Stunde mit 0,01% BSA inkubiert (Abbildung 9).

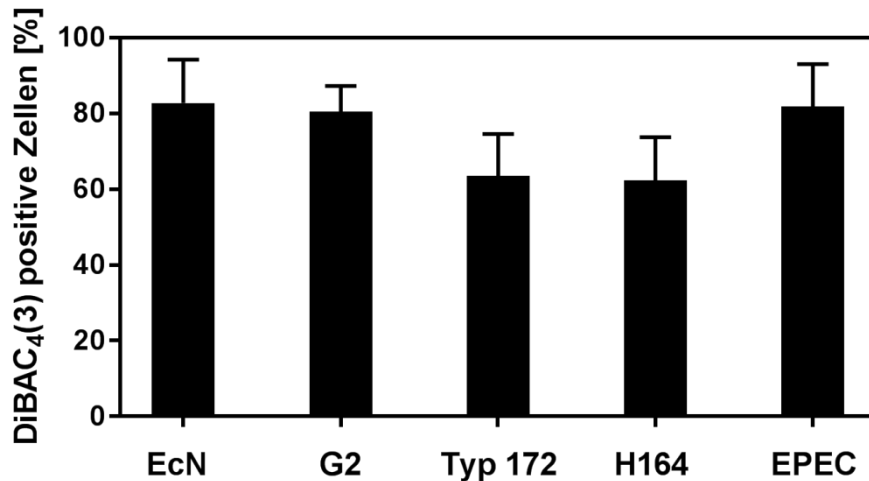


Abbildung 9: DiBAC₄(3)+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle nach Behandlung mit HBD3

Dargestellt sind die DiBAC₄(3)+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle (0,01% BSA) nach einstündiger Inkubation der Bakterien mit 50 µg/ml HBD3. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit ± SEM.

Nach einstündiger Inkubation mit der jeweiligen vierfachen MHK von HBD2 ließen sich in der Durchflusszytometrie, ebenso wie für HBD3, DiBAC₄(3)+ *E. coli* Bakterien nachweisen (Abbildung 10). Die fünf untersuchten *E. coli* Stämme unterschieden sich in ihrem Anteil DiBAC₄(3)+ Zellen normiert auf die Negativkontrolle (0,01% BSA). Mit 92%, beziehungsweise 83% DiBAC₄(3)+ Bakterien wiesen der pathogene Stamm Typ 172 (20 µg/ml HBD2) und der probiotische Stamm EcN (162 µg/ml HBD2) den höchsten Anteil DiBAC₄(3)+ Zellen nach Inkubation mit HBD2 auf. Darauf folgten der probiotische Stamm Symbioflor G2 (81 µg/ml HBD2) mit 63% und die zwei pathogenen Stämme EPEC (10 µg/ml HBD2) und H164 (41 µg/ml HBD2) mit 45%, beziehungsweise 44% DiBAC₄(3)+ Zellen (Abbildung 10).

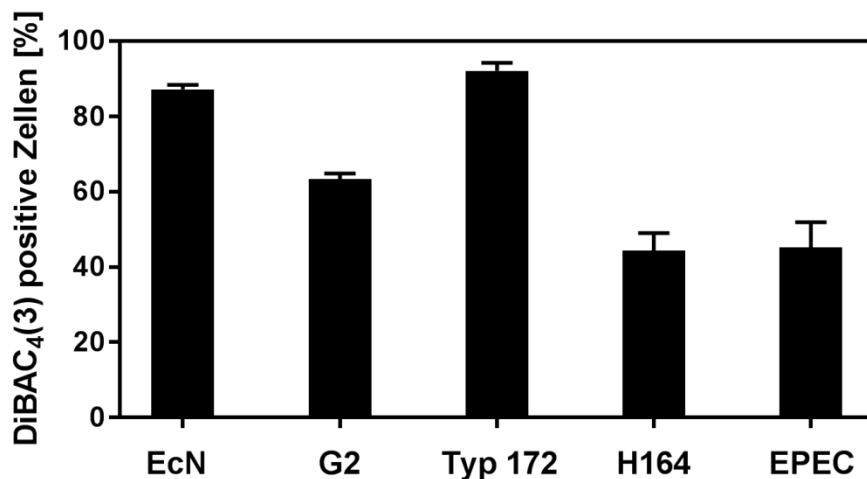


Abbildung 10: DiBAC₄(3)+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle nach Behandlung mit HBD2

Dargestellt sind die DiBAC₄(3)+ Zellen [%] normiert auf die Negativkontrolle (0,01% BSA) nach einstündiger Inkubation der Bakterien mit ihrer vierfachen MHK von HBD2: EcN (162 µg/ml), G2 (81 µg/ml), Typ 172 (20 µg/ml), H164 (41 µg/ml), EPEC (10 µg/ml). Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit ± SEM.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Versuch mit PI ließen sich ebenfalls DiBAC₄(3)+ Bakterien nach Inkubation mit HBD2 und HBD3 nachweisen. Nach Inkubation mit der vierfachen MHK von HBD2 liegt der Anteil DiBAC₄(3)+ Zellen für die untersuchten *E. coli* Stämme zwischen 44-92%. Die Inkubation mit stets gleicher Konzentration an HBD3 resultierte in 62-83% DiBAC₄(3)+ Bakterienzellen. Diese Befunde scheinen die Ergebnisse der Anfärbung mit PI zu bestätigen und sprechen dafür, dass sich die antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegen die bakterielle Zellmembran richtet und diese depolarisiert.

3.2.4 RESISTENZLAGE BEI *E. COLI* EPEC NACH INKUBATION MIT SUBLETALEN DOSEN VON HBD2

In Bezug auf die antibakterielle Wirkweise von HBD2 wurde *in vitro* zuletzt die Resistenzlage von *E. coli* nach längerfristiger Inkubation mit subletalen Dosierungen von HBD2 untersucht. Die Frage nach bakteriellen Resistenzen gegenüber AMPs ist seit Beginn der Forschung an diesen relevant, stellen sie doch eine wichtige Instanz des Immunsystems im humanen Organismus dar (Zasloff, 2002). Vor dem Hintergrund einer potenziell therapeutischen

Verwendung von HBD2 als Antibiotikum ist es daher interessant, die potenzielle Induktion bakterieller Resistenzen zu untersuchen, die eine defiziente Wirksamkeit von HBD2 im humanen Organismus zur Folge hätte. Zur Untersuchung der potenziellen Resistenzentwicklung bei *E. coli* EPEC nach Exposition gegenüber HBD2 wurden die Bakterien 30 Passagen á 12 h mit subletalen Dosierungen ($\frac{1}{2}$ MHK) von HBD2 inkubiert. Diese Passagen wurden konserviert und in einem zweiten Schritt die Passagen 1, 10, 20 und 30 mit der vierfachen MHK von HBD2 inkubiert, um potenziell entstandene Resistenzen zu erkennen. Zum Vergleich wurde derselbe Versuchsablauf zudem mit Ciprofloxacin durchgeführt. Für diese Versuche musste der verwendete Trübungsassay modifiziert werden, da die Bakterien für die Resistenzinduktion dauerhaft in Nährlösung sein müssen. In Müller-Hinton Medium wuchsen die Bakterien zwar gleichmäßig, doch zeigte HBD2 keine antibakterielle Wirkung. Erst nachdem das Medium mit Wasser verdünnt worden war (Faktor 1:3), zeigte sich sowohl Bakterienwachstum als auch antibakterielle Aktivität seitens HBD2.

Passage 1, 10, 20 und 30, die zuvor mit der halben MHK von Ciprofloxacin (0,0106 μ M) inkubiert worden waren, wurden 12 h mit der vierfachen MHK von Ciprofloxacin (0,0848 μ M), beziehungsweise ohne Antibiotikum inkubiert. Dabei zeigte sich photometrisch für die mit der vierfachen MHK untersuchten Passagen nach 12 h kein bakterielles Wachstum (Abbildung 11 A). Für die ohne Antibiotikum wachsenden Kontrollen wurden nach 12 h für Passage 1 durchschnittlich eine OD₆₀₀ von 0,45 gemessen, die bis Passage 20 auf eine OD₆₀₀ von 0,63 anstieg, um dann wieder auf 0,53 abzufallen (Passage 30). Nach 30 Passagen Inkubation mit subletalen Dosen von Ciprofloxacin (0,0106 μ M) verhinderte die vierfache Dosis (0,0848 μ M) der zuvor bestimmten MHK das Wachstum von *E. coli* EPEC folglich wirkungsvoll (Abbildung 11 A). Analog zu den Ergebnissen mit Ciprofloxacin konnte auch bei den für 30 Passagen mit subletalen HBD2 Dosierungen (1,805 μ M) inkubierten Bakterien nach 12 h Inkubation mit der vierfachen MHK von HBD2 (14,44 μ M) photometrisch kein Wachstum gemessen werden. Wurden dieselben Proben jedoch für 12 h ohne das entsprechende Antibiotikum inkubiert, konnte bei Passage 1 durchschnittlich eine OD₆₀₀ von 0,57 gemessen werden und für Passage 30 eine OD₆₀₀ von 0,77.

Die vierfache Dosis der zuvor bestimmten MHK von HBD2 verhinderte also bei allen untersuchten Passagen das Wachstum der *E. coli* Bakterien zuverlässig (Abbildung 11 B). Im Anhang (Abbildung 18) ist das Wachstum der Proben 1–30 dargestellt, welche ohne HBD2, bzw. Ciprofloxacin in 1:3 MHB kultiviert, konserviert und daraufhin mit/ohne Antibiotikum für 12 h inkubiert wurden.

In dem gewählten Versuchsaufbau ließ sich weder durch die langfristige Inkubation mit subletalen Dosierungen von Ciprofloxacin noch von HBD2 die Bildung einer erhöhten MHK in *E. coli* EPEC induzieren.

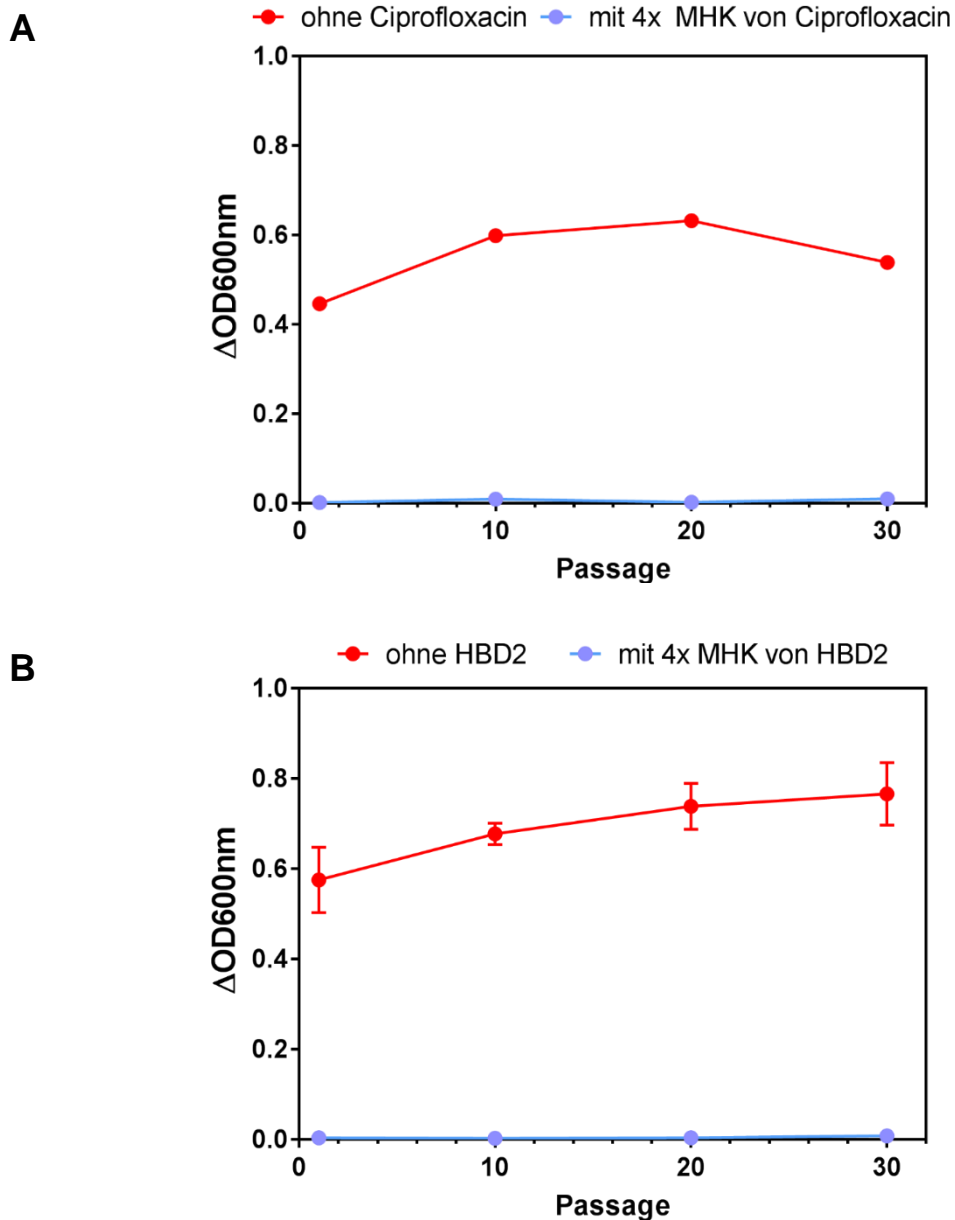


Abbildung 11: Inkubation von *E. coli* EPEC mit subletalen Antibiotikadosierungen bewirkt keine Resistenzbildung

Die untersuchten Passagen sind in einem ersten Schritt für 1–30 Passagen mit der halben MHK von Ciprofloxacin (0,0106 μM) oder HBD2 (1,805 μM) inkubiert worden. Diese Proben wurden konserviert und in einem zweiten Schritt erneut für 12 h in Medium ohne (rot eingefärbt), sowie mit der vierfachen MHK von Ciprofloxacin (0,0848 μM) inkubiert (siehe (A)). Derselbe Versuchsablauf wird für HBD2 und dessen vierfache MHK (14,44 μM) in (B) gezeigt. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben ist der Mittelwert mit \pm SEM.

3.3 ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON HBD2 *IN VIVO*

Nachdem die vorrangegangenen *in vitro* Untersuchungen Hinweise zur antimikrobiellen Aktivität von HBD2, dessen bakterieller Zielstruktur und der Resistenzinduktion bei *E. coli* liefern konnte, wurde nun untersucht, ob sich die antibakterielle Aktivität von HBD2 auch *in vivo* zeigen lassen würde. Dafür wurde ein Infektionsmodell mit Larven von *Galleria mellonella* etabliert und deren Überleben nach Infektion mit *E. coli* EPEC und anschließender Injektion von HBD2 oder einer Kontrollsubstanz analysiert. Vor dem Hintergrund einer potenziellen therapeutischen Verwendung von HBD2 als Antibiotikum erlaubt *Galleria mellonella* als wirbelloses Tier eine schnellere und unkompliziertere *in vivo* Testung antimikrobieller Substanzen, als dies beispielweise mit Mäusen der Fall ist. Die Larven reagieren während einer Infektion mit der Einlagerung von Melanin, sodass sie sich ihrem Gesundheitszustand entsprechend immer stärker schwarz färben (Abbildung 12). Idealerweise kann dadurch eine Vorauswahl vielversprechender antibiotischer Substanzen getroffen werden, um die Anzahl an Tierversuchen mit Säugetieren zu reduzieren (Tsai et al., 2016). Blower et al., 2017 konnten beispielsweise die Wirksamkeit des kationischen AMPs LL-37 in *Galleria mellonella* gegen *B. anthracis* zeigen.

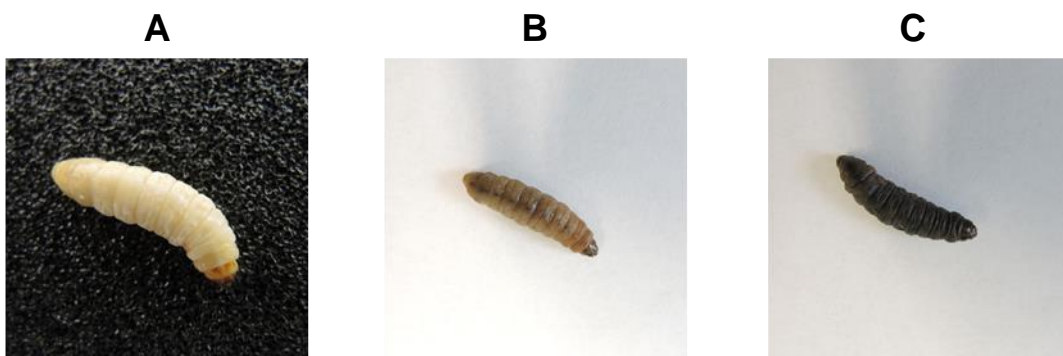


Abbildung 12: Verschiedene Gesundheitsstadien von *Galleria mellonella*

(A) Gesunde, cremeweiße Larve, (B) Larve nach Infektion mit pathogenen Bakterien und beginnender Melanisierung. (C) Tote Larve mit kompletter Melanisierung nach Infektion mit pathogenen Bakterien.

3.3.1 ÜBERLEBEN VON *GALLERIA MELLONELLA* NACH SYSTEMISCHER APPLIKATION VON *E. COLI* BAKTERIEN UND HBD2

Die Systemische HBD2 Applikation 30 min nach Infektion von *Galleria mellonella* Larven mit pathogenen *E. coli* zeigte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe kein verbessertes Überleben der Tiere. Um zu untersuchen, ob dieser Befund unabhängig vom Zeitpunkt der HBD2 Applikation ist, wurden verschiedene Zeitpunkte (15 min vor der Infektion, zeitgleich mit der Infektion) für die Applikation von HBD2 getestet. Dafür wurden die Tiere systemisch mit $2,25 \times 10^7$ CFU/ml Bakterien infiziert und zu den genannten Zeitpunkten mit 100 µg HBD2 (10 mg/ml) behandelt. Anschließend wurde das Überleben der Tiere alle 24 h über 120 h dokumentiert. Ein Vergleich der Überlebensrate der Larven in PBS (HBD2 Lösungsmittel) + EPEC und HBD2 + EPEC Gruppe soll Rückschlüsse über die antibakterielle Aktivität von HBD2 *in vivo* zulassen.

In dem durchgeführten Versuchsansatz zeigte sich, dass die systemische Applikation von HBD2 das Überleben von *Galleria mellonella* nicht verbessern konnte, nachdem diese mit *E. coli* EPEC infiziert worden waren. Bei der gleichzeitigen Applikation von HBD2 mit den Bakterien (Abbildung 13) verstarben mit 83,3% (10/12 Tiere) in der HBD2 + EPEC Gruppe sogar mehr Tiere, als in der PBS + EPEC Gruppe (50%, 6/12 Tiere). In der Gruppe HBD2 + PBS verstarb bis zum vierten Tag kein einziges Tier. Nach 120 h waren jedoch 60% der Tiere tot (3/5).

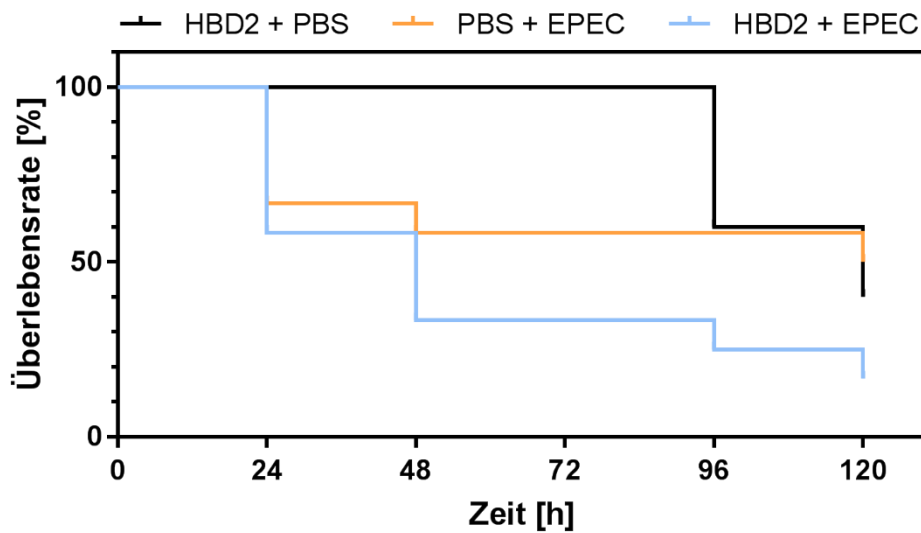


Abbildung 13: Überleben von *Galleria mellonella* nach nahezu gleichzeitiger systemischer Applikation von HBD2 und EPEC

Dargestellt ist das Ergebnis aus einer Versuchsdurchführung zum Überleben von *Galleria mellonella* Larven über 120 h nach nahezu gleichzeitiger systemischer Applikation von HBD2 (10 mg/ml) und *E. coli* EPEC ($2,25 \times 10^7$ CFU/ml), sowie des für HBD2 verwendeten Lösungsmittel PBS als Kontrolle. In die HBD2 + EPEC und PBS + EPEC Gruppe wurden 12, in die HBD2 + PBS 5 Tiere eingeschlossen.

Ähnlich sind die Ergebnisse in dem Versuchsansatz, bei welchem HBD2 15 min vor Infektion mit *E. coli* EPEC systemisch appliziert wurde (Abbildung 14). Hier starben 41,6% (5/12 Tiere) in der HBD2 + EPEC Gruppe gegenüber 33,3% (4/12 Tiere) in der PBS + EPEC Gruppe. In der HBD2 + PBS Gruppe starben 16,6% (1/6 Tiere).

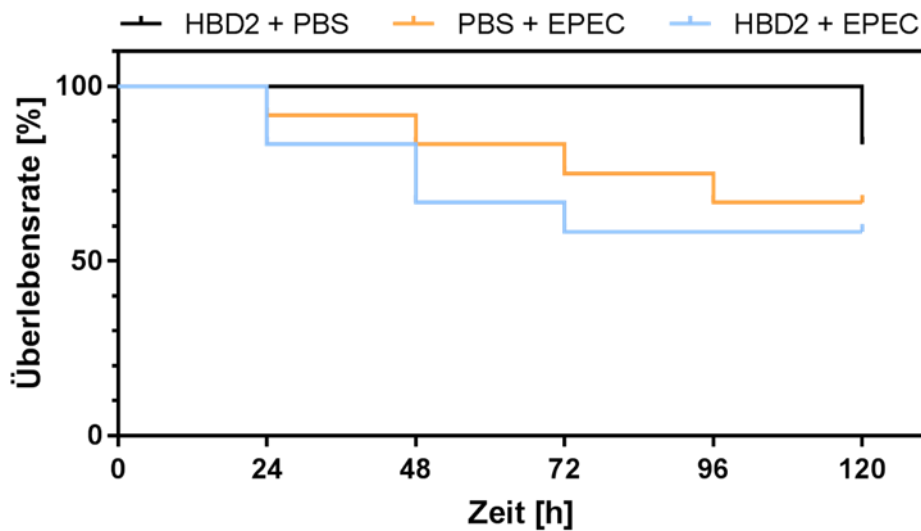


Abbildung 14: Überleben von *Galleria mellonella* nach systemischer Applikation von HBD2 15 min vor Infektion mit EPEC

Dargestellt ist das Ergebnis aus einer Versuchsdurchführung zum Überleben von *Galleria mellonella* Larven über 120 h nach systemischer Applikation von HBD2 (10 mg/ml) 15 min vor systemischer Infektion mit *E. coli* EPEC ($2,25 \times 10^7$ CFU/ml), sowie des für HBD2 verwendeten Lösungsmittel PBS ebenfalls 15 min vor der Infektion mit Bakterien als Kontrolle. In die HBD2 + EPEC und PBS + EPEC Gruppe wurden 12, in die HBD2 + PBS 6 Tiere eingeschlossen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Überleben der HBD2 + EPEC Gruppe sowohl nach nahezu gleichzeitiger Applikation von HBD2 (10/12 Tieren tot) als auch nach Applikation 15 min vor der Infektion mit Bakterien (5/12 Tieren tot) schlechter war als das der PBS + EPEC Gruppe in den zwei beschriebenen Versuchsdurchführungen (6/12 Tieren, bzw. 4/12 Tieren tot). In der HBD2 + PBS Gruppe starb in beiden Versuchsansätzen bis zum vierten Tag kein einziges Tier. Zum Schluss waren jedoch 3/5, bzw. 1/6 Tieren tot. Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, warum die systemische Gabe von LL-37, wie von Blower et al., 2017 gezeigt, nicht jedoch von HBD2, das Überleben von *Galleria mellonella* nach Infektion mit Bakterien verbessern kann.

3.3.2 ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON HBD2 IN HÄMOLYMPHE

Blower et al., 2017 konnten zeigen, dass die systemische Applikation des Peptids LL37 das Überleben von *Galleria mellonella* nach Infektion mit *Bacillus anthracis* verbessern kann. Mit HBD2 konnten bisher keine vergleichbaren Effekte gezeigt werden. Da jedoch bekannt ist, dass die antimikrobielle Aktivität von HBD2 von Umgebungsbedingungen wie zum Beispiel der Anwesenheit bestimmter Elektrolyte abhängig ist (Pazgier et al., 2006), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Hämolymphe von *Galleria mellonella* HBD2 inaktiviert. Hierfür wurde die Aktivität von HBD2, im Vergleich zu LL37, in einem RDA mit und ohne Hämolymphe verglichen. Dafür wurden Bakterien in einem nährstoffarmen Gel 3 h mit den zu untersuchenden antimikrobiellen Substanzen in An-/Abwesenheit von Hämolymphe inkubiert und die antimikrobielle Aktivität mithilfe der nach Zugabe eines nährstoffreichen Gels entstehenden Hemmhöfe auf dem Bakterienrasen bestimmt.

In Abbildung 15 A sind repräsentative Bilder der entstandenen Hemmhöfe dargestellt. Abbildung 15 C zeigt, dass die Lösungsmittel PBS (HBD2), 0,01% HAc (LL37) und H₂O (Ciprofloxacin) keinen Hemmhof ausbildeten, wohingegen Hämolymphe allein einen Hemmhofdurchmesser von 3,4 mm verursachte. Ciprofloxacin (0,04 µg) bewirkte den größten Hemmhofdurchmesser (19,3 mm) und die Hemmhöfe von HBD2 (10,16 mm) und LL37 (7 mm) (je 2 µg) sind ein wenig kleiner. Durch das Vermischen der antimikrobiellen Substanzen mit 2 µl Hämolymphe verringerte sich der Hemmhofdurchmesser für Ciprofloxacin um 5,4 mm (28%), für HBD2 um 2,8 mm (27%) und für LL37 um 2,9 mm (41%) (Abbildung 15: RDA mit Hämolymphe B). In absoluten Zahlen beträgt der Unterschied in der Verkleinerung des Hemmhofes von HBD2 und LL37 nach Beimengung von Hämolymphe also 0,1 mm, relativ zur ursprünglichen Größe des Hemmhofes (ohne Hämolymphe) betrachtet verringert sich der Hemmhof von HBD2 jedoch weniger (27%) als der von LL37 (41%).

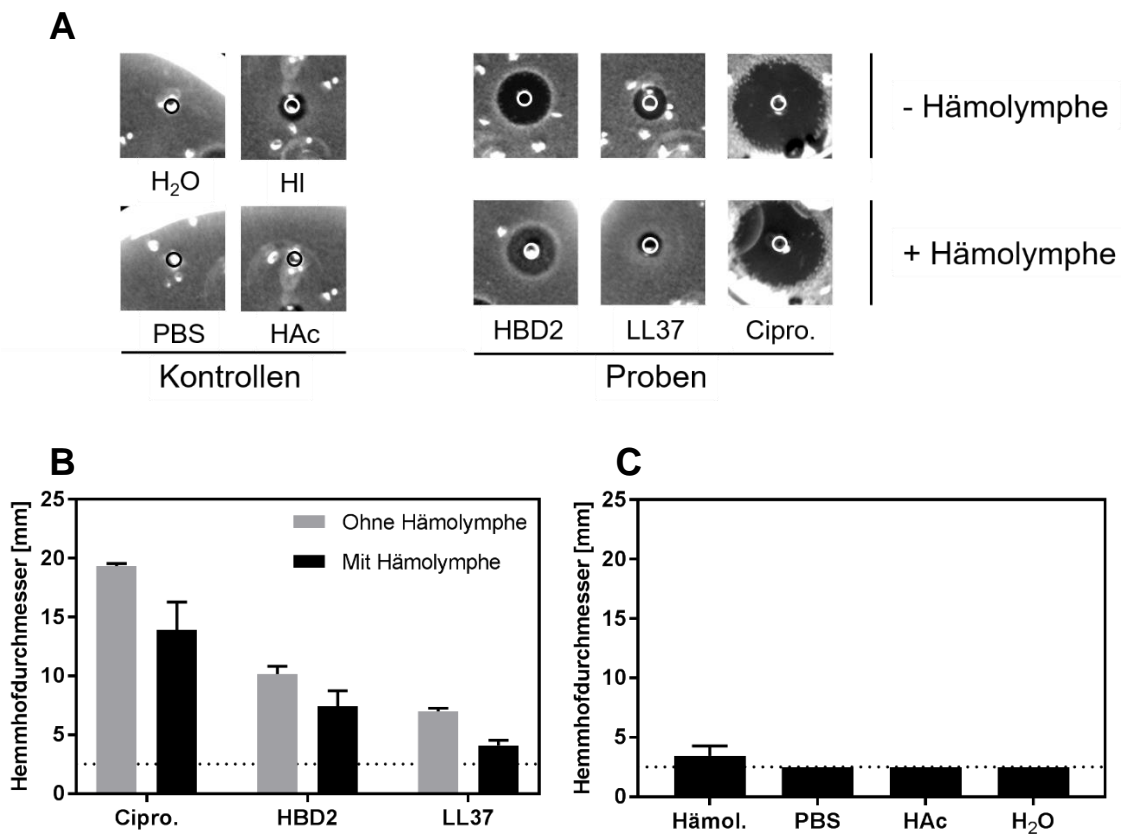


Abbildung 15: RDA mit Hämolymphe

Im RDA wurde die antimikrobielle Aktivität von je 2 µg HBD2 und LL37, sowie 0,04 µg Ciprofloxacin gegenüber *E. coli* EPEC getestet. Die antimikrobielle Aktivität wurde durch Ausmessen der Hemmhöfe in einem RDA bestimmt. In (A) sind die Hemmhöfe eines RDA für Kontrollen und Proben von einer Versuchsdurchführung beispielhaft dargestellt. In der Mitte der Hemmhöfe ist das 2,5 mm große Stanzloch für die Proben zu erkennen. Die gestrichelte Linie von (B) und (C) stellt den Durchmesser des Stanzlochs (2,5 mm) dar. Werte oberhalb dieser Linie werden als antimikrobielle Aktivität gewertet. In (B) ist die Aktivität von Ciprofloxacin, HBD2 und LL37 mit (schwarz) und ohne (grau) Beimengung von 2 µl Hämolymphe in das Probenloch dargestellt. (C) zeigt die Kontrollen: Hämolymphe allein, sowie die Lösungsmittel PBS (HBD2), HAc (LL37) und H₂O (Ciprofloxacin) (je 4 µl). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ± SEM aus mindestens drei unabhängigen Versuchsdurchführungen.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass die Vermengung von HBD2 mit Hämolymphe im RDA dessen Hemmhof weniger stark verkleinerte (27%) als dies für LL37 der Fall war (41%), obwohl die systemische Wirksamkeit von LL37 in *Galleria mellonella* besser zu sein scheint. Dies deutet auf andere Gründe für die Wirksamkeit von LL37 im Vergleich zu HBD2 in diesem Modell hin.

3.3.3 ÜBERLEBEN VON *GALLERIA MELLONELLA* NACH ORALER GABE VON *E. COLI* EPEC UND HBD2

Weil die systemische Applikation von HBD2 in einem Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* möglicherweise aufgrund der verringerten Aktivität von HBD2 in der Hämolymphe nicht in einem verbesserten Überleben der Tiere resultierte, wurde derselbe Versuchsansatz für die orale Applikation von HBD2 übernommen. Dafür wurden 20 Wachsmottenlarven 10 µl Bakteriensuspension ($2,5 \times 10^7$ CFU/ml) oral verabreicht und 60 min später 10 µl HBD2 (1 mg/ml) gegeben. Als Kontrollgruppe wurden Tiere verwendet, die PBS anstelle von HBD2 erhielten. Dabei überlebten nach 120 h in der EPEC + HBD2 Gruppe 17/20 (85%) und in der EPEC + PBS Gruppe 22/24 (91%) der Tiere (Abbildung 16).

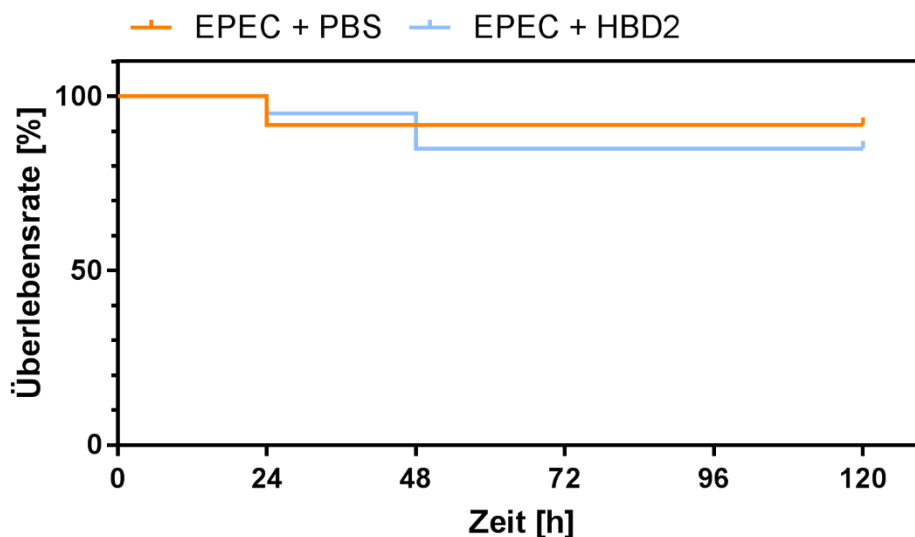


Abbildung 16: Überleben von *Galleria mellonella* über 120 h nach oraler Infektion mit *E. coli* EPEC und oraler Applikation von HBD2 60 min später

Dargestellt ist das Ergebnis einer Versuchsdurchführung zum Überleben von *Galleria mellonella* Larven über 120 h nach oraler Infektion mit 10 µl Bakteriensuspension ($2,5 \times 10^7$ CFU/ml *E. coli* EPEC), sowie oraler Applikation von 10 µl HBD2 (1 mg/ml), beziehungsweise 10 µl des für HBD2 verwendeten Lösungsmittel PBS 60 min später. In die EPEC + PBS Gruppe wurden 24, in die EPEC + HBD2 Gruppe 20 Tiere eingeschlossen.

Wie auch bei der systemischen Applikation konnte HBD2 in dieser Untersuchung das Überleben von *Galleria mellonella* nach Infektion mit *E. coli* EPEC nicht verbessern. Insgesamt zeigte die Gruppe an Tieren, die mit HBD2 zu verschiedenen Zeitpunkten und über unterschiedliche Applikationswege nach Infektion mit *E. coli* behandelt wurde, kein verbessertes Überleben im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe.

4 DISKUSSION

Vor dem Hintergrund einer therapeutischen Entwicklung von HBD2 als Antibiotikum wurde im Rahmen dieser Arbeit dessen antimikrobielle Aktivität untersucht. Dabei war das Ziel die antimikrobielle Aktivität und Wirkweise *in vitro* zu beurteilen und schließlich zu untersuchen, ob sich auch *in vivo* in einem zu etablierenden Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* antimikrobielle Aktivität von HBD2 zeigen lässt. Dazu wurde HBD2 erstmals gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Stämme eines Bakteriums mit einem Trübungsassay analysiert, um im Zusammenhang mit weiterführenden Untersuchungen zum antimikrobiellen Wirkmechanismus besser verstehen zu können, wie HBD2 gegenüber Bakterien wirkt. Auch zur Wirksamkeit von HBD2 *in vivo* in einem Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* sowie zur Resistenzinduktion bei Bakterien lassen sich in der Literatur bisher kaum Angaben finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen daher einen Beitrag leisten, um relevante Aspekte der antimikrobiellen Eigenschaften von HBD2 im Hinblick auf eine potenzielle therapeutische Verwendung besser zu verstehen.

4.1 ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT VON HBD2 GEGEN

E. COLI

Die antimikrobielle Aktivität von Defensinen wie HBD2 ist ihre prominenteste Eigenschaft, die im Falle von HBD2 überhaupt erst zu dessen Entdeckung geführt hat (Harder et al., 1997). Seitdem ist diese mit unterschiedlichen Methoden gegenüber vielen verschiedenen Mikroorganismen gezeigt worden. In dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegenüber unterschiedlichen Stämmen von *E. coli* *in vitro* mit einem Trübungsassay sowie *in vivo* mit einem *Galleria mellonella* Infektionsmodell getestet.

4.1.1 HBD2 ZEIGT SCHWÄCHERE ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT GEGEN PROBIOTISCHE ALS GEGEN PATHOGENE *E. COLI*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine unterschiedliche antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegenüber probiotischen und pathogenen *E. coli* Stämmen im Trübungsassay. Abhängig vom Bakterienstamm lag die bestimmte MHK von HBD2 gegen die gewählte Stichprobe an *E. coli* zwischen 0,6-14 μM (2,5-61 $\mu\text{g/ml}$). Die pathogenen Stämme, außer *E. coli* EAEC Typ 42 mit 14 μM (61 $\mu\text{g/ml}$) und der Laborstamm BW25113 mit 2,6 μM (11,4 $\mu\text{g/ml}$), wiesen im Mittel eine niedrigere MHK von 0,6-2,3 μM auf (3-10 $\mu\text{g/ml}$) als die vier probiotischen Stämme mit 1,3-8,2 μM (6-36 $\mu\text{g/ml}$). Die in der Literatur angegebene Werte zur antibakteriellen Aktivität von HBD2 gegen *E. coli* sind diesen Ergebnissen ähnlich. Harder et al., 1997 berichteten über eine LD90 von 10 $\mu\text{g/ml}$ für HBD2 gegenüber *E. coli*, ohne jedoch Bakterienstamm und Methode genauer zu spezifizieren. Corrales-Garcia et al., 2013 gaben eine mit einem modifizierten RDA gemessene MHK von 22 $\mu\text{g/ml}$ HBD2 gegen *E. coli* ATCC25922 an. Dies ist ungefähr die doppelte der in dieser Arbeit mit einem Trübungsassay bestimmten MHK von HBD2 (10 $\mu\text{g/ml}$) gegen diesen Bakterienstamm. Diese Abweichung ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Methodik zu erklären. Außerdem scheint die Wirkung von HBD2 gegen *E. coli* ATCC 25922 mit der von Antibiotika wie Temocillin vergleichbar, dessen mit unterschiedlichen Methoden und durch eine Vielzahl von Experimenten bestimmte MHK gegen dieses Bakterium mit 4-16 $\mu\text{g/ml}$ angeführt wird. Außerdem wird die MHK unterschiedlicher Antibiotika wie z.B. Tetracyclin (0,54 $\mu\text{g/ml}$), Ciprofloxacin (0,004-0,064 $\mu\text{g/ml}$) und Ampicillin (1-8 $\mu\text{g/ml}$) gegen *E. coli* angegeben, ohne den untersuchten Stamm jedoch genauer zu spezifizieren ("EUCAST," 2018). Welche physiologische Bedeutung die gemessene MHK von HBD2 gegenüber den verschiedenen *E. coli* im humanen Organismus hat, ist schwierig zu beurteilen. In der Literatur finden sich nur wenige Angaben zur HBD2-Konzentration für den vermutlichen Hauptwirkungsort antimikrobieller Defensine, dem enteralen Mukus (Meyer-Hoffert et al., 2008). In Mäusen schätzten Ayabe et al., 2000 die Defensinkonzentration innerhalb von Darmkrypten auf 10 mg/ml und Möndel et

al., 2009 maßen die Konzentrationen von HBD2 pro ml humanen Fäzes. Dies spiegelt jedoch eher luminale HBD2-Konzentrationen im Darm wider. Die HBD2-Konzentrationen in Speichel von gesunden Probanden (0,0095 µg/ml), oralen Plattenepithelkarzinomproben (3,85 µg/mg) und bronchoalveolärer Flüssigkeit unter anderem von Patienten mit zystischer Fibrose (0,1-10 ng/ml) sind ebenfalls nur bedingt vergleichbar (Singh et al., 1998; Sawaki et al., 2002; Ghosh et al., 2007). Zudem hängt die Wirksamkeit von HBD2 *in vivo* auch von anderen Faktoren als allein seiner Konzentration ab. So konnten Cobo et al., 2015 zeigen, dass eine gesunde MUC2 Mucinbarriere im Colon nicht nur wichtig für die Induktion von HBD2 unter inflammatorischen Bedingungen ist, sondern MUC2 enterale Bakterien wie EPEC und nichtpathogene *E. coli* vor der antibakteriellen Wirkung von HBD2 schützen kann. Dieser Befund stimmt mit Studien überein, die stark reduzierte *Enterobacteriaceae* Populationen, kommensale *E. coli* hauptsächlich, bei an Morbus Crohn Erkrankten mit ausgedünnter Mukusschicht fanden (Ott et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dieser Arbeit eine starke antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegen pathogene und probiotische *E. coli* zeigte, die zumindest *in vitro* vergleichbar mit der antimikrobiellen Aktivität einiger kommerzieller Antibiotika ist. Da die genaue Konzentration von HBD2 *in vivo* unbekannt ist und auch andere, externe Faktoren wie die MUC2 Mucinbarriere im Colon die Aktivität von HBD2 beeinflussen, ist es schwierig zu beurteilen, ob antimikrobiell aktive Konzentrationen von HBD2 in der intestinalen Barriere erreicht werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt der antimikrobiellen Aktivität von HBD2 *in vitro* ist dessen Wirkung auf probiotische *E. coli* Bakterien. Für EcN (36 µg/ml) und Symbioflor G2 (23 µg/ml) konnte, von einem pathogenen Stamm abgesehen, die höchste MHK im Vergleich zur untersuchten Gesamtstichprobe gemessen werden. Sie liegt um ein Vielfaches höher als die von pathogenen Stämmen wie UPEC und EPEC (2,5 µg/ml) oder den probiotischen Symbioflor G1 (9,5 µg/ml) und G3 (5,7 µg/ml). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den probiotischen Stämmen ist, dass EcN und Symbioflor G2 die Expression von HBD2 in der Zellkultur induzieren können, im Gegensatz zu Symbioflor G1 und G3 (Möndel et al., 2009). Der Befund unterschiedlicher antimikrobieller Aktivität von HBD2

gegenüber diesen vier probiotischen Stämmen steht in Kontrast zu der Arbeit von Möndel et al., 2009, die in einem RDA eine übereinstimmende Aktivität von HBD2 gegenüber diesen Stämmen fanden. Diese übereinstimmende Aktivität von HBD2 könnte allerdings weniger durch die antimikrobiellen Eigenschaften des Peptids bedingt sein, als durch die extrem hohen lokalen Peptidkonzentrationen im RDA, welche nicht genau definierbar sind, die das Ergebnis von Möndel et al., 2009 aber möglicherweise beeinflusst haben. Eine weitere interessante Beobachtung der Arbeit von Möndel et al., 2009 ist, dass nach beendeter Einnahme probiotischer Bakterien teilweise eine erhöhte Ausscheidung von HBD2 weitere 9 Wochen in humanen Fäzes gemessen werden konnte. Vor diesem Hintergrund lässt die in dieser Arbeit beschriebene relativ erhöhte MHK von EcN und Symbioflor G2 eine längerfristige Kolonisierung des Darms durch dieses Bakterienstämme bei gleichzeitiger HBD2 Induktion vermuten. Dies lässt sich in der Literatur durch verschiedene *in vivo* Studien nicht bestätigen. Vielmehr konnte in gesunden Probanden nach einwöchiger Einnahme von EcN nur bei 57% (4/7) der Studienteilnehmer EcN in Fäzes nachgewiesen werden (Prilassnig et al., 2007). Bei älteren Menschen, die „*multidrug-resistant*“ (MDR) *E. coli* ausschieden, ließen sich nach täglicher Einnahme von EcN über fünf Wochen sogar nur noch bei 17% (2/12) das probiotische Bakterium im Stuhl nachweisen (Tannock et al., 2011). Des Weiteren identifizierten Wassenaar et al., 2014 den Stamm Symbioflor G1 (nicht G2) als Langzeitkolonisierer unter den in Symbioflor 2 enthaltenen Bakterienstämmen. Möglicherweise reicht für EcN und Symbioflor G2 die Konstellation aus HBD2 Induktion bei gleichzeitig erhöhter MHK nicht für die längerfristige Besetzung einer ökologischen Nische im humanen Gastrointestinaltrakt aus. Die probiotische Wirkung dieser zwei Bakterienstämme kommt also vermutlich weniger durch längerfristige Besetzung einer ökologischen Nische im Gastrointestinaltrakt denn durch andere Faktoren zustande. Die für EcN und Symbioflor G2 gezeigte Synthese antimikrobieller Peptide, sogenannte Microcine, sowie die HBD2 Induktion im humanen Gastrointestinaltrakt könnten eine mögliche Erklärung darstellen (Patzner et al., 2003; Möndel et al., 2009; Zschüttig et al., 2012).

4.1.2 DIE GABE VON HBD2 BEWIRKT KEIN ERHÖHTES ÜBERLEBEN VON *GALLERIA MELLONELLA* NACH INFEKTION MIT *E. COLI*

Nachdem HBD2 *in vitro* im Trübungsassay eine starke antimikrobielle Aktivität gegenüber unterschiedlichen *E. coli* Bakterien zeigte, sollte ein Infektionsmodell mit Larven von *Galleria mellonella* zeigen, ob sich diese Ergebnisse auch *in vivo* demonstrieren lassen. Vor dem Hintergrund einer potenziell therapeutischen Verwendung von HBD2 als Antibiotikum bietet *Galleria mellonella* als wirbelloses Tier mit kurzen Reproduktionszeiten für ein Screening auf die Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen eine schnellere und einfachere Alternative als ein Mausmodell (Tsai et al., 2016), wie es beispielsweise von Salzman et al., 2003 zum *in vivo* Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit von HD5 bei Infektion mit *Salmonella typhimurium* verwendet wurde. Erst 2012 publizierten Leuko und Raivio eine Arbeit, in der *E. coli* EPEC erstmals in einem *Galleria mellonella* Infektionsmodell verwendet wurde. Als LD50 48 h nach systemischer Infektion der Larven gaben die Autoren eine Bakterienkonzentration von 2.57×10^3 CFU an. Die in dieser Arbeit verwendete Infektionsdosis war mit $2,25 \times 10^5$ CFU *E. coli* EPEC höher, weil sie als LD90 über 120 h etabliert worden ist. Behandelt wurden die Larven von *Galleria mellonella* mit 100 µg HBD2 (10 mg/ml). Dies ist ein Vielfaches der für dieses Bakterium im Trübungsassay festgestellten MHK von 2,5 µg/ml gegen 5×10^4 CFU in einem Volumen von 100 µl. Trotzdem starben unabhängig vom Zeitpunkt systemischer HBD2 Applikation mehr Tiere in der Gruppe, die HBD2 und das Bakterium appliziert bekamen, als in der mit PBS und HBD2 behandelten Kontrollgruppe (Abbildung 13 und Abbildung 14). Dass AMPs in einem bakteriellen Infektionsmodell mit *Galleria mellonella* funktionieren können, zeigten jedoch Blower et al., 2017. Sie untersuchten die systemische Wirksamkeit unterschiedlicher AMPs nach Infektion der Wachsmottenlarven mit *B. anthracis* und fanden ein signifikant besseres Überleben der Tiere durch Behandlung mit dem humanen Cathelicidin LL-37. Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Wirksamkeit von HBD2 und LL-37 in *Galleria mellonella* möglicherweise durch die Hämolymphe der Wachsmottenlarven verursacht wird, wurde ein RDA durchgeführt. Die Erwartung, dass HBD2 in Gegenwart von

Hämolymphe keine antimikrobielle Aktivität mehr gegen *E. coli* zeigt, LL-37 hingegen schon, erfüllte sich jedoch nicht (Abbildung 15). Die Hemmhöfe waren in Anwesenheit von Hämolymphe sowohl für LL-37, als auch HBD2 um ungefähr 2,8 mm und für Ciprofloxacin 5,4 mm kleiner als zuvor. Relativ zum Hemmhofdurchmesser ohne Hämolymphe ist dies für HBD2 (27%) und Ciprofloxacin (28%) jedoch weniger, als für LL37 (41%). Möglicherweise liegt dies daran, dass die Diffusion der Proben durch die Hämolymphe blockiert wurde oder HBD2 aufgrund seiner intramolekularen Disulphidbrücken resistenter gegenüber proteolytischer Verdauung ist als das lineare Peptid LL-37 (Peschel und Sahl, 2006). Dieser Befund kann allerdings nicht die unterschiedliche Wirksamkeit der beiden Moleküle in *Galleria mellonella* gegen *E. coli* erklären. Diese ist möglicherweise eher durch die Applikationsart oder applizierte Peptidkonzentration zu begründen. Bekannt ist jedoch, dass verschiedenste Umweltfaktoren wie zum Beispiel die Anwesenheit von Kationen die Wirksamkeit von AMPs beeinflussen können (Johansson et al., 1998; Pazgier et al., 2006). Daher ist es denkbar, dass Bestandteile der Hämolymphe einen hemmenden Effekt auf die Aktivität von HBD2 besitzen. Außerdem hat die Hämolymphe möglicherweise für alle drei untersuchten antibiotischen Substanzen die Diffusionsrate herabgesetzt, wodurch der Hemmhofdurchmesser verkleinert wurde.

Im Versuchsansatz mit oraler Infektion (*E. coli* EPEC) von *Galleria mellonella* ließ sich auch durch die veränderten Umgebungsbedingungen kein verbessertes Überleben der Tiere durch Behandlung mit HBD2 erreichen (Abbildung 16). Die orale Infektion stellt für den darmpathogenen *E. coli* Stamm einen natürlicheren Infektionsweg dar als die direkte Applikation in Hämolymphe. Schon bei der Etablierung dieses Versuchsansatzes war jedoch die Determinierung einer LD90 über 120 h für *E. coli* EPEC schwierig, weil die Resultate sehr variabel waren (Daten nicht gezeigt). Obwohl in dieser Arbeit die antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegen *E. coli* in *Galleria mellonella* nicht gezeigt werden konnte, scheint dies für andere AMPs und Bakterien möglich zu sein (Blower et al., 2017). Der Schritt von *in vitro* Versuchen hin zur klinischen Anwendung ist jedoch besonders

für AMPs schwierig. Das zeigte sich nicht zuletzt in der vorliegenden Arbeit (Seo et al., 2012).

4.2 HBD2 WIRKT LADUNGSABHÄNGIG AN DER BAKTERIELLEN ZELLMEMBRAN

Neben den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von HBD2, konnten in dieser Arbeit *in vitro* weitere Erkenntnisse zum Wirkmechanismus von HBD2 gewonnen werden. Hinsichtlich des Wirkmechanismus lassen sich für HBD2, im Gegensatz zu anderen AMPs wie Nisin, in der Literatur bisher wenige Hinweise finden. Yount et al., 2009 führten eine der wenigen beschriebenen Untersuchungen zu diesem Thema durch und fanden mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen mit dem Farbstoff PI Hinweise darauf, dass HBD2 Bakterienzellen permeabilisiert. Diese Ergebnisse ließen sich in dieser Arbeit für probiotische und pathogene *E. coli* Stämme reproduzieren. Sowohl für HBD3, dessen Wirkmechanismus an der Zellmembran bereits bekannt ist und durch elektronenmikroskopische Bilder gezeigt werden konnte (Sass et al., 2010), als auch für HBD2 konnten PI+ Zellen nach Inkubation mit dem jeweiligen Peptid nachgewiesen werden. Für HBD2 wurde dabei die vierfache Menge der zuvor im Trübungsassay bestimmten MHK verwendet, weil Bakterien und Peptid in einem Medium kultiviert wurden, in dem HBD2 schwächere antimikrobielle Aktivität zeigt, und weil im Vergleich zum Trübungsassay die dreifache Menge an Bakterien eingesetzt wurde. Durch Inkubation mit einer bakterienspezifischen HBD2-Konzentration sollte außerdem untersucht werden, ob das Peptid pathogene Bakterien möglicherweise stärker permeabilisiert als probiotische Bakterien oder umgekehrt. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. EcN (probiotisch) und Typ 172 (pathogen) wiesen, obwohl sie mit einer unterschiedlichen Menge an HBD2 inkubiert wurden (162 µg/ml und 20 µg/ml), einen ähnlich hohen Anteil an PI+ Bakterien auf (89% und 90%). Auch der Farbstoff DiBAC₄(3) kann die antimikrobielle Aktivität von Defensinen anzeigen, in dem er depolarisierte Zellen anfärbt. Dies gelang in dieser Arbeit ebenfalls für HBD3 und HBD2. Der Anteil depolarisierter und mit DiBAC₄(3)

angefärbten Bakterienzellen ist für die untersuchten Bakterienstämme nach Inkubation mit HBD2 ähnlich wie für die Färbung mit PI. Einzig der Anteil DiBAC₄(3) positiver Zellen für EPEC liegt 26 Prozentpunkte unter dessen Wert in der Versuchsdurchführung mit PI. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der Arbeit von Nuding, 2013, die in der Durchflusszytometrie mit DiBAC₄(3) ebenfalls feststellen konnte, dass HBD2 die Zellmembran von *E. coli* Bakterien depolarisiert.

In Übereinstimmung mit den Veröffentlichungen von Nuding, 2013 und Yount et al., 2009 zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine permeabilisierende und depolarisierende Wirkung von HBD2 auf die bakterielle Zellmembran. Die elektronenmikroskopischen Bilder von Cobo et al., 2015 unterstreichen diesen Befund eindrücklich. Die Bilder letztgenannter Arbeit zeigen nach 2 h Inkubation von *E. coli* EPEC mit HBD2 sowohl Verformungen der bakteriellen Membran als auch Zelltrümmer. Damit scheint sich zu bestätigen, was Hoover et al. aufgrund von röntgenographischen Strukturanalysen von HBD2 bereits im Jahr 2000 hinsichtlich dessen Wirkmechanismus vermutet hatten: eine Permeabilisierung der Zellmembran, die zudem noch von elektrostatischen Wechselwirkungen abhängig ist. Solche elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Defensinen und bakterieller Zellmembran sind bekannt und gut untersucht (Peschel et al., 1999). Peschel und Kollegen konnten zeigen, dass *S. aureus* Mutanten mit einer stärker negativ geladenen Zellmembran eine niedrigere MHK gegenüber kationischen AMPs wie HNP1-3 aufweisen als ein Wildtyp. Der Einfluss von Ladung auf die antimikrobielle Aktivität ließ sich außerdem für Magainin und andere AMPs zeigen (Dathe et al., 2001; Hong et al., 2001; Jiang et al., 2008). Eine Korrelation zwischen der MHK von HBD2 gegenüber verschiedenen Stämmen eines Bakteriums und deren Zellmembranladung ist bisher in der Literatur jedoch nicht beschrieben. So konnte in dieser Arbeit erstmals eine positive Korrelation zwischen diesen zwei Parametern für HBD2 und *E. coli* gezeigt werden. Dies ist jedoch eine statistische Korrelation und kann letztlich nicht erklären, warum gerade die MHK für die HBD2 induzierenden Stämme EcN und G2 so hoch ist, die für *E. coli* ATCC 25922 beispielsweise jedoch nicht. Letztgenannter Stamm wies im Cytochrom-C-Assay die stärkste kationische

Zellmembranladung auf (Abbildung 4) und gleichzeitig eine niedrige MHK im Trübungsassay. Dies deutet auf sehr starke kationische Zellmembranladung des Bakteriums hin. Im Hinblick auf dessen niedrige MHK zeigt dies jedoch auch, dass zusätzliche Faktoren wie beispielsweise die Dicke der bakteriellen Zellmembran eine Rolle für die antibakterielle Wirksamkeit kationischer AMPs spielen könnten (Gagnon et al., 2017). Im umgekehrten Falle einer zu starken elektrostatischen Interaktion zwischen Bakterium und AMP kann es außerdem sein, dass dies nicht automatisch in verbesserter Wirksamkeit des AMPs resultiert. Eine zu starke Interaktion verhindert möglicherweise die Translokation des Peptids in das Zellinnere (Cobo und Chadee, 2013). Die bakterielle Zellmembranladung erklärt ebenfalls nicht die höchste gemessene MHK von 61 µg/ml bei *E. coli* EAEC Typ 42. Dies ist jedoch ein Pathotyp, der häufig Biofilme ausbildet (Huang, 2006). Abhängig von der Biofilmstruktur, können *E. coli* Bakterien die Wirksamkeit beispielsweise von amphipathischen Polypeptidantibiotika wie Colistin beeinflussen (Folkesson et al., 2008). Möglicherweise weist EAEC Typ 42 deshalb aufgrund von Biofilmbildung eine solch hohe MHK auf während EAEC Typ 172 diese Eigenschaft nicht besitzt und eine niedrige MHK zeigt (4,2 µg/ml). Ebenfalls interessant ist, dass *E. coli* H164 trotz einer stark kationischen Membranladung (92% Cytochrom C im Überstand) eine relativ niedrige MHK aufweist (1,8 µM). Eine Erklärung dafür bieten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, in der sich der geringste Anteil PI⁺ und DiBAC₄(3)⁺ Zellen für diesen Stamm zeigen ließen, obwohl alle untersuchten Bakterien mit ihrer jeweiligen vierfachen MHK inkubiert wurden. Dies könnte dafürsprechen, dass HBD2 insbesondere bei diesem Bakterium seine antibakterielle Aktivität nicht nur über die bakterielle Zellmembran vermittelt, sondern sich möglicherweise auch gegen andere Zielstrukturen richtet.

Die Untersuchungen zum antibakteriellen Wirkmechanismus von HBD2 haben gezeigt, dass die Aktivität von HBD2 durch die bakterielle Zellmembranladung beeinflusst wird. Dies passt zu den Befunden, dass bereits physiologische Konzentrationen von Elektrolyten wie Natriumchlorid die Aktivität von HBD2 vermindern (Pazgier et al., 2006). Außerdem bietet es eine Erklärung dafür, warum HBD2 im Infektionsmodell *Galleria mellonella* nicht in einem verbesserten

Überleben der Tiere resultierte, denn möglicherweise hat die Elektrolytkonzentration der Hämolymphe die Wirksamkeit von HBD2 eingeschränkt. Die durchflusszytometrischen Experimente deuten jedoch ebenfalls daraufhin, dass die bakterielle Zellmembran nicht für jedes Bakterium im gleichen Maße die Zielstruktur für HBD2 zu sein scheint, sondern es möglicherweise weitere Angriffspunkte gibt. Außerdem könnten neben der bakteriellen Membranladung Faktoren wie Biofilmbildung und die bakterielle Zellmembrandicke die antibakterielle Aktivität von HBD2 beeinflussen.

4.3 HBD2 UND CIPROFLOXACIN INDUZIERTEN KEINE RESISTENZEN IN *E. COLI*/EPEC

Vor dem Hintergrund einer potenziellen therapeutischen Entwicklung von HBD2 als Antibiotikum ist die Untersuchung bakterieller Resistenzen gegenüber diesen AMPs ein wichtiger Aspekt. Die Mechanismen, mit denen Bakterien Resistenzen gegenüber kommerziellen Antibiotika oder AMPs ausbilden, ähneln sich. Proteasen, extrazelluläre Deaktivierung antibiotischer Substanzen, „*multidrug resistance-related proteins*“, Modifikation der bakteriellen Zellmembran und die Bildung von Biofilmen können die Wirkung sowohl von AMPs als auch kommerzieller Antibiotika gegenüber Bakterien einschränken. Nichtsdestotrotz sind AMPs noch immer integraler Bestandteil des Immunsystems multizellulärer Organismen, während kommerzielle Antibiotika aufgrund bakterieller Resistenzen häufig und schnell an Wirksamkeit verlieren. Vermutlich liegt dies daran, dass AMPs am Infektionsherd in hohen Konzentrationen verfügbar sind und ein Molekül sich mit niedriger Affinität und mehreren Mechanismen gegen nicht-proteinogene bakterielle Strukturen richtet. Kommerzielle Antibiotika hingegen richten sich häufig bei niedrigen Konzentrationen mit hoher Affinität gegen eine spezifische mikrobielle Zielstruktur, wodurch die Entwicklung bakterieller Resistenzen erleichtert wird (Peschel und Sahl, 2006). Ob in einem therapeutischen Ansatz ähnlich hohe Konzentrationen von AMPs in unmittelbarer Nähe der Bakterien zu erreichen sind, ist fraglich. Daher ist es sinnvoll zu untersuchen, ob Bakterien nach

Exposition gegenüber subletalen Dosierungen von AMPs innerhalb kurzer Zeit auch gegen diese Resistenzen ausbilden so wie es für kommerzielle Antibiotika vielfach beschrieben wurde (Cantas et al., 2013). Für HBD2 lassen sich dazu in der Literatur bisher keine Angaben finden. De Breij et al., 2018 untersuchten jedoch die Entwicklung von Resistenzen bei *E. coli* und anderen Bakterien nach Inkubation mit subletalen Dosierungen eines synthetischen Peptids auf Basis von humanem LL-37. Dabei fanden sie nach 20 Passagen keine bakteriellen Resistenzen, wohingegen sich die MHK gegenüber den kommerziell erhältlichen Antibiotika Rifampicin und Ciprofloxacin um ein 4000faches erhöht hatte. Habets und Brockhurst, 2012 fanden im Gegensatz dazu mit derselben Methodik bei verschiedenen *S. aureus* Populationen nach 14 Passagen eine 1050fach erhöhte MHK gegenüber dem AMP Pexiganan sowie Hinweise auf Kreuzresistenzen gegenüber HNP-1. Perron et al., 2006 konnten die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Pexiganan ebenfalls mit *E. coli* zeigen.

In dieser Arbeit wurde *E. coli* EPEC für 30 Passagen mit subletalen Dosierungen von Ciprofloxacin und HBD2 inkubiert. Dabei war nach 30 Passagen keine Resistenz gegenüber den getesteten antibiotischen Substanzen festzustellen. Dies ist besonders für Ciprofloxacin verwunderlich, denn de Breij et al., 2018 konnten eine erhöhte MHK von Ciprofloxacin nach 20 Passagen für zwei *E. coli* Stämme zeigen und gegenüber Fluorchinolonen resistente *E. coli* sind schon lange Gegenstand intensiver Forschung (Everett et al., 1996). Möglicherweise waren der Selektionsdruck durch das Antibiotikum im Laufe des Experiments sowie die Bakterienpopulation nicht groß genug, um die Bildung von Resistenzen zu induzieren. Oder der für die Versuche genutzte *E. coli* EPEC ist ein Stamm, der kaum Resistenzen gegen Fluorchinolone ausbildet. Ein weiterer Grund könnte das stark verdünnte Medium und dessen entsprechend geringer Nährstoffgehalt sein, wodurch der Stoffwechsel der Bakterien verlangsamt und die Bildung bakterieller Resistenzen erschwert sein könnte.

Die fehlende Resistenzbildung gegen Ciprofloxacin in dieser Arbeit sowie die widersprüchlichen Literaturangaben zur Induktion von Resistenzen in Bakterien durch subletale Dosierungen von AMPs erschweren die Interpretation der Versuchsergebnisse. So ist die fehlende Resistenzinduktion in *E. coli* EPEC

durch HBD2 nach 30 Passagen Inkubation mit subletalen Dosierungen gut möglich, könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass die Methode weiter modifiziert werden muss. Für weitere Versuche zur bakteriellen Resistenzinduktion durch HBD2 ist es daher empfehlenswert, eine Methodik zu wählen, bei der die Konzentration der antibiotischen Substanzen im Verlauf kontinuierlich gesteigert wird, um den Selektionsdruck auf die Bakterien zu erhöhen. Weil die Populationsgröße von Bakterien, die an mikrobiellen Infekten beteiligt sind, häufig mit der in einem Versuchsvolumen von 5 ml vergleichbar ist, ist es außerdem ratsam, die Versuche in diesem Volumen durchzuführen (Lorian, 2005; Perron et al., 2006). Darauf wurde in dieser Arbeit verzichtet, weil dies bedeutend größere Mengen an HBD2 erfordert hätte. Des Weiteren sollten als Positivkontrolle mehrere kommerzielle Antibiotika gegen das entsprechende Bakterium getestet werden, um eine aussagekräftige Positivkontrolle zu erhalten. Die Ergebnisse dieses Versuchs können jedoch als Hinweis auf die starke antimikrobielle Aktivität von HBD2 und Ciprofloxacin gegen den pathogenen *E. coli* EPEC gedeutet werden. Die fehlende Resistenzentwicklung gegenüber HBD2 passt sowohl zu den Ergebnissen von de Breij et al., 2018 als auch der Annahme, dass Resistenzen gegenüber AMPs aufgrund ihres Wirkmechanismus selten sind (Zaslouff, 2002). Resistenzen gegenüber dem Lantibiotikum Nisin, welches seit Jahrzehnten zur Haltbarmachung von Lebensmitteln eingesetzt wird, sind beispielsweise selten und scheinen kein generelles Problem zu sein. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass dieses Peptid mindestens fünf unterschiedliche antimikrobielle Mechanismen besitzt (Peschel und Sahl, 2006). Andererseits sind auch gegen dieses Peptid bereits schon eine Vielzahl von Resistenzmechanismen beschrieben (Zhou et al., 2014). Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber AMPs muss daher kritisch hinterfragt werden. Auch das Ergebnis dieser Arbeit sollte aufgrund des uneindeutigen Ergebnisses mit Ciprofloxacin und der Arbeiten von Habets und Brockhurst, 2012 und Perron et al., 2006 skeptisch betrachtet und in Zukunft genauer untersucht werden. Denn die Entwicklung bakterieller Resistenzen gegenüber einem integralen Bestandteil des humanen Immunsystems ist nicht zuletzt nach Hinweisen auf Kreuzresistenzen zwischen AMPs verschiedener Strukturklassen (Habets und

Brockhurst, 2012) von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung dieser vielversprechenden Substanzen hin zu einem therapeutischen Nutzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Daten zur antibakteriellen Aktivität von HBD2 machen es zu einem vielversprechenden AMP in der therapeutischen Entwicklung als Antibiotikum oder Mikrobiommodulator. Vor dem Hintergrund einer potenziellen Entwicklung als Antibiotikum ließ sich in dieser Arbeit jedoch erstmals zeigen, dass sich die zuvor *in vitro* nachgewiesene antimikrobielle Aktivität von HBD2 gegen unterschiedliche Pathotypen von *E. coli* in einem systemischen sowie oralen Infektionsmodell mit Larven von *Galleria mellonella in vivo* nicht bestätigen lässt. *In vitro* hingegen zeigte HBD2 eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber fast allen pathogenen *E. coli* Stämmen, die vergleichbar ist mit der antimikrobiellen Wirkung von Antibiotika wie Temocillin. Auffällig war dabei die relativ erhöhte MHK von HBD2 gegenüber probiotischen *E. coli* Stämmen, welche die Expression dieses Peptids im humanen Organismus induzieren können. Dies scheint mit der bakteriellen Zellmembranladung zusammen zu hängen. Denn im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine positive und signifikante Korrelation zwischen der MHK von HBD2 und der Membranladung von *E. coli* gezeigt werden. Die antimikrobielle Aktivität von HBD2 scheint sich außerdem in unterschiedlichem Ausmaß gegen die bakterielle Zellmembran von *E. coli* zu richten, wo es porenbildend und membran-depolarisierend wirken kann. Neben der bakteriellen Membranladung gibt es vermutlich noch weitere Einflussgrößen auf die antibakterielle Aktivität von HBD2, wie zum Beispiel die bakterielle Zellmembrandicke oder Biofilmbildung. Dies zeigte sich auch bei der Etablierung des Infektionsmodells mit *Galleria mellonella*, bei der die *in vitro* zuvor gezeigte antimikrobielle Aktivität *in vivo* nicht demonstriert werden konnte. Dies unterstreicht die Schwierigkeiten der Entwicklung von AMPs als Therapeutika, die sich in den letzten Jahren immer wieder gezeigt haben. Vor dem Hintergrund einer potenziellen therapeutischen Verwendung als Antibiotikum wurde außerdem die Resistenzinduktion in *E. coli* durch HBD2 untersucht. Dabei ließen

sich sowohl für HBD2 als auch Ciprofloxacin keine erhöhte MHK finden. Dieses Ergebnis erschwert die Interpretation des Versuchsergebnisses. Auf den Ergebnissen dieser Arbeit können weitergehende Untersuchungen zur bakteriellen Zielstruktur von HBD2 aufbauen. Ein vielversprechendes Untersuchungsobjekt ist beispielsweise Lipid II, welches auch die Zielstruktur von HBD3 darstellt. Zusammen mit Erkenntnissen über den antibakteriellen Wirkmechanismus könnten auf dieser Grundlage andere wirksame antibiotische Substanzen entwickelt werden, um der weltweiten Zunahme bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika zu begegnen. Diese Arbeit belegt des Weiteren auch, wie schwierig es sein kann die milieuabhängige antimikrobielle Aktivität mancher AMPs *in vivo* zu zeigen. Daher sollten neben der starken antimikrobiellen Aktivität von HBD2 in Zukunft auch andere Eigenschaften untersucht werden, die einen vielversprechenden therapeutischen Nutzen haben könnten, wie zum Beispiel die Modulation des Mikrobioms.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aberg, K.M., Man, M.-Q., Gallo, R.L., Ganz, T., Crumrine, D., Brown, B.E., Choi, E.-H., Kim, D.-K., Schröder, J.M., Feingold, K.R., Elias, P.M., 2008. Co-regulation and interdependence of the mammalian epidermal permeability and antimicrobial barriers. *J. Invest. Dermatol.* 128, 917–925. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701099>
- Alagumarathanayagam, A., Pavankumar, A.R., Vasanthamallika, T.K., Sankaran, K., 2009. Evaluation of solid (disc diffusion)- and liquid (turbidity)-phase antibiogram methods for clinical isolates of diarrheagenic *E. coli* and correlation with efflux. *J. Antibiot. (Tokyo)* 62, 377. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.45>
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2000. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* 1, 113–118. <https://doi.org/10.1038/77783>
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Blaser, M.J., Falkow, S., 2009. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 887.
- Blower, R.J., Popov, S.G., Hoek, M.L. van, 2017. Cathelicidin peptide rescues *G. mellonella* infected with *B. anthracis*. *Virulence* 0, 1–7. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1293227>
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B.G., Verne, G.N., 2012. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease: Intestinal barrier function. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>
- Cantas, L., Shah, S.Q.A., Cavaco, L.M., Manaia, C., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., Sørum, H., 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00096>
- Cekanaviciute, E., Yoo, B.B., Runia, T.F., Debelius, J.W., Singh, S., Nelson, C.A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y.K., Hauser, S.L., Crabtree-Hartman, E., Katz Sand, I., Gacias, M., Zhu, Y., Casaccia, P., Cree, B.A.C., Knight, R., Mazmanian, S.K., Baranzini, S.E., 2017. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114>
- Chang, C., Lleo, A., Kananurak, A., Grizzi, F., Tsuneyama, K., Invernizzi, P., Bevins, C.L., Bowlus, C.L., 2017. Human β -Defensin 2 in Primary

- Sclerosing Cholangitis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 8, e80. <https://doi.org/10.1038/ctg.2017.8>
- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.-G., Nuñez, G., 2009. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4, 365–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239>
- Chileveru, H.R., Lim, S.A., Chairatana, P., Wommack, A.J., Chiang, I.-L., Nolan, E.M., 2015. Visualizing Attack of *Escherichia coli* by the Antimicrobial Peptide Human Defensin 5 [WWW Document]. <https://doi.org/10.1021/bi501483q>
- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P.A., de Jong, M.F., Winter, M.G., Winter, S.E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N.H., Underwood, M.A., Tsois, R.M., Young, G.M., Lu, W., Lehrer, R.I., Baumler, A.J., Bevins, C.L., 2012. Human α -Defensin 6 Promotes Mucosal Innate Immunity Through Self-Assembled Peptide Nanonets. *Science* 337, 477–481. <https://doi.org/10.1126/science.1218831>
- Cobo, E., Chadee, K., 2013. Antimicrobial Human β -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens* 2, 177–192. <https://doi.org/10.3390/pathogens2010177>
- Cobo, E.R., Kisson-Singh, V., Moreau, F., Chadee, K., 2015. Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of β -defensin 2. *Mucosal Immunol.* 8, 1360–1372. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.27>
- Corrales-Garcia, L., Ortiz, E., Castañeda-Delgado, J., Rivas-Santiago, B., Corzo, G., 2013. Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 89, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.007>
- Crowe, C.C., Sanders, W.E., Longley, S., 1973. Bacterial interference. II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization by group A *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.* 128, 527–532.
- Cunliffe, R.N., 2003. α -Defensins in the gastrointestinal tract. *Mol. Immunol., Innate Mechanisms of Epithelial Host Defence. Spotlight on Antimicrobial Peptides.* 40, 463–467. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(03\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00157-3)
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., Bienert, M., 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 501, 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02648-5)
- de Breij, A., Riool, M., Cordfunke, R.A., Malanovic, N., de Boer, L., Koning, R.I., Ravensbergen, E., Franken, M., van der Heijde, T., Boekema, B.K., Kwakman, P.H.S., Kamp, N., El Ghalbzouri, A., Lohner, K., Zaat, S.A.J., Drijfhout, J.W., Nibbering, P.H., 2018. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. *Sci. Transl. Med.* 10, eaan4044. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4044>
- de Leeuw, E., Li, Changqing, Zeng, P., Li, Chong, Buin, M.D., Lu, W.-Y., Breukink, E., Lu, W., 2010. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett.* 584, 1543–1548. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004>
- Deere, D., Porter, J., Edwards, C., Pickup, R., 1995. Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, (diBA-C4(3) -), for the

- flow cytometric assessment of bacterial viability. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 165–169. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00199-F](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00199-F)
- Drasar, B.S., Hill, M.J., 1974. *Human intestinal flora*. Academic Press (London) Ltd., 24/28 Oval Road, London, NW1.
- EUCAST [WWW Document], 2018. . *Eur. Comm. Antimicrob. Susceptibility Test*. URL <http://www.eucast.org/> (accessed 6.10.18).
- Everett, M.J., Jin, Y.F., Ricci, V., Piddock, L.J., 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2380–2386.
- Fearon, D.T., Locksley, R.M., 1996. The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. *Science* 272, 50–54. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.50>
- Finegold, S.M., Dowd, S.E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K.E., Wolcott, R.D., Youn, E., Summanen, P.H., Granpeesheh, D., Dixon, D., Liu, M., Molitoris, D.R., Green, J.A., 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
- Folkesson, A., Haagensen, J.A.J., Zampaloni, C., Sternberg, C., Molin, S., 2008. Biofilm Induced Tolerance towards Antimicrobial Peptides. *PLOS ONE* 3, e1891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001891>
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Fruitwala, S., El-Naccache, D.W., Chang, T.L., 2018. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.023>
- Gagnon, M.-C., Strandberg, E., Grau-Campistany, A., Wadhvani, P., Reichert, J., Bürck, J., Rabanal, F., Auger, M., Paquin, J.-F., Ulrich, A.S., 2017. Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry* 56, 1680–1695. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01071>
- Gallo, R.L., Hooper, L.V., 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516. <https://doi.org/10.1038/nri3228>
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Ganz, T., 1987. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 55, 568–571.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I., 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76, 1427–1435. <https://doi.org/10.1172/JCI112120>
- Garrett, W., Gordon, J., Glimcher, L., 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140, 859–929. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.023>
- Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S.K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S.P., Crabb, J.W., Ganz, T., Bevins, C.L., 2002. Paneth cell trypsin is the

- processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* 3, 583–590. <https://doi.org/10.1038/ni797>
- Ghosh, S.K., Gerken, T.A., Schneider, K.M., Feng, Z., McCormick, T.S., Weinberg, A., 2007. Quantification of Human β -Defensin-2 and -3 in Body Fluids: Application for Studies of Innate Immunity. *Clin. Chem.* 53, 757–765. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.081430>
- Grice, E.A., Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Habets, M.G.J.L., Brockhurst, M.A., 2012. Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. *Biol. Lett.* rsbl20111203. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.1203>
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J.-M., 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B.M., Bolbot, Y.K., Maydannik, V.G., Elze, M., Wolff, C., Schulze, J., 2007. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur. J. Pediatr.* 166, 311–318. <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0419-x>
- Hong, S.Y., Park, T.G., Lee, K.-H., 2001. The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides, Bacterial and anti bacterial peptides* 22, 1669–1674. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00502-2](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00502-2)
- Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J.J., Chertov, O., Lubkowski, J., 2000. The Structure of Human β -Defensin-2 Shows Evidence of Higher Order Oligomerization. *J. Biol. Chem.* 275, 32911–32918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006098200>
- Huang, D.B., 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 55, 1303–1311. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46674-0>
- Janeway Jr, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Jiang, Z., Vasil, A.I., Hale, J.D., Hancock, R.E.W., Vasil, M.L., Hodges, R.S., 2008. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Pept. Sci.* 90, 369–383. <https://doi.org/10.1002/bip.20911>
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., Tarkowski, A., 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 1169–1176.
- Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D., Agerberth, B., 1998. Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273, 3718–3724. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3718>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

- Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R.L., 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ.* 81, 197–204.
- Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J., 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617–1623. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037747>
- Kübler, I., Koslowski, M.J., Gerseman, M., Fellermann, K., Beisner, J., Becker, S., Rothfuss, K., Herrlinger, K.R., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Influence of standard treatment on ileal and colonic antimicrobial defensin expression in active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 30, 621–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04070.x>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., Straus, S., 2018. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* 8, 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S.S.L., Jackson, R., Eisenhauer, P., 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* 137, 167–173. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90021-7)
- Leuko, S., Raivio, T.L., 2012. Mutations That Impact the Enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx Envelope Stress Response Attenuate Virulence in *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* 80, 3077–3085. <https://doi.org/10.1128/IAI.00081-12>
- Ley, R.E., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M.C., Tolmasky, M., Aminov, R.I., Zhang, L., 2015. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034>
- Lorian, V., 2005. *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mackowiak, P.A., 1982. The normal microbial flora. *N. Engl. J. Med.* 307, 83–93. <https://doi.org/10.1056/NEJM198207083070203>
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., Dore, J., 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., de La Cochetiere, M.-F., 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* 21, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.12.001>
- 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.

- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* 296, 298–300. <https://doi.org/10.1126/science.1068883>
- Méndez-Samperio, P., 2013. Recent advances in the field of antimicrobial peptides in inflammatory diseases. *Adv. Biomed. Res.* 2. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.114192>
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.-G., Midtvedt, T., Putsep, K., Andersson, M., 2008. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57, 764–771. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.141481>
- Mollenbrink, M., Bruckschen, E., 1994. [Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor)]. *Med. Klin. Munich Ger.* 1983 89, 587–593.
- Möndel, M., Schroeder, B.O., Zimmermann, K., Huber, H., Nuding, S., Beisner, J., Fellermann, K., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2009. Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human β -defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol.* 2, 166–172. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.77>
- Mukherjee, S., Hooper, L.V., 2015. Antimicrobial Defense of the Intestine. *Immunity* 42, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.028>
- Mullineaux, C.W., Nenninger, A., Ray, N., Robinson, C., 2006. Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 3442–3448.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Neish, A.S., 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect.* 4, 309–317. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01543-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01543-5)
- Nissle, A., 1918. Die antagonistische behandlung chronischer darmstörungen mit colibakterien. *Med Klin* 2, 29–30.
- Nuding, S., 2013. Detection, Identification, and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry. *J. Bacteriol. Parasitol.* 01. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.S5-005>
- Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., Mueller, H.A.G., Stange, E.F., 2006. A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *J. Microbiol. Methods* 65, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.08.004>
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.-P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606. <https://doi.org/10.1038/35079114>
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L., Leung, D.Y.M., 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1151–1160. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021481>

- Ostaff, M.J., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med.* 5, 1465–1483. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201773>
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., Schreiber, S., 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685–693. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.025403>
- Otto, M., 2006. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 306, 251–258.
- Patzer, S.I., Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F., Hantke, K., 2003. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* 149, 2557–2570. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26396-0>
- Pazgier, M., Hoover, D.M., Yang, D., Lu, W., Lubkowski, J., 2006. Human β -defensins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1294–1313. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5540-2>
- Perron, G.G., Zasloff, M., Bell, G., 2006. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 251–256. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3301>
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., Götz, F., 1999. Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 8405–8410.
- Peschel, A., Sahl, H.-G., 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 529–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
- Prilassnig, M., Wenisch, C., Daxboeck, F., Feierl, G., 2007. Are probiotics detectable in human feces after oral uptake by healthy volunteers? *Wien. Klin. Wochenschr.* 119, 456–462. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0808-1>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, Shaochuan, Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Paslier, D.L., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, Shengting, Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Songgang, Qin, N., Yang, H., Wang, Jian, Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Consortium, M., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H., Borruel, N., Bruls, T., Casellas, F., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Forte, M., Friss, C., Guchte, M. van de, Guedon, E., Haimet, F., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Kleerebezem, M., Knol, J., Kristensen, M., Layec, S., Roux, K.L., Leclerc, M., Maguin, E., Minardi, R.M., Oozeer, R., Rescigno, M., Sanchez, N., Tims, S., Torrejon, T., Varela, E., Vos, W. de, Winogradsky, Y., Zoetendal, E., Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, Jun, 2010. A human gut microbial gene catalogue established

- by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quiñones-Mateu, M.E., Lederman, M.M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H.R., Marotta, M.L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P., Medvik, K., Sieg, S.F., Weinberg, A., 2003. Human epithelial β -defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 17, F39.
- Raschig, J., Mailänder-Sánchez, D., Berscheid, A., Berger, J., Strömstedt, A.A., Courth, L.F., Malek, N.P., Brötz-Oesterhelt, H., Wehkamp, J., 2017. Ubiquitously expressed Human Beta Defensin 1 (hBD1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action. *PLOS Pathog.* 13, e1006261. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006261>
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., Ravel, J., 2008. The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *J. Bacteriol.* 190, 6881–6893. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>
- Risso, A., 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 68, 785–792. <https://doi.org/10.1189/jlb.68.6.785>
- Rosebury, T., 1962. Microorganisms Indigenous to Man. *Microorg. Indig. Man.*
- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5, 449–456. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00049-2)
- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., Bevins, C.L., 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522–526. <https://doi.org/10.1038/nature01520>
- Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O., Sahl, H.-G., 2010. Human β -Defensin 3 Inhibits Cell Wall Biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect. Immun.* 78, 2793–2800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00688-09>
- Sawaki, K., Mizukawa, N., Yamaai, T., Yoshimoto, T., Nakano, M., Sugahara, T., 2002. High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 22, 2103–2107.
- Schibli, D.J., Hunter, H.N., Aseyev, V., Starner, T.D., Wiencek, J.M., McCray, P.B., Tack, B.F., Vogel, H.J., 2002. The Solution Structures of the Human β -Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 277, 8279–8289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108830200>
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., Garbe, C., 2001. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2, 1133–1137. <https://doi.org/10.1038/ni732>
- Schlee, M., Harder, J., Köten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., Fellermann, K., 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2.

- Clin. Exp. Immunol. 151, 528–535. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03587.x>
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., Fellermann, K., 2007. Induction of Human α -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect. Immun.* 75, 2399–2407. <https://doi.org/10.1128/IAI.01563-06>
- Schröder, J.-M., Harder, J., 1999. Human beta-defensin-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 645–651. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00013-8)
- Schroeder, B.O., Ehmann, D., Precht, J.C., Castillo, P.A., Kuchler, R., Berger, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2015. Paneth cell α -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol.* 8, 661–671. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.100>
- Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 469, 419–23. <https://doi.org/10.1038/nature09674>
- Schumann, S., Alpert, C., Engst, W., Klopffleisch, R., Loh, G., Bleich, A., Blaut, M., 2014. Mild gut inflammation modulates the proteome of intestinal *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* 16, 2966–2979. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12192>
- Schutte, B., Mitros, J., Bartlett, J., Walters, J., Jia, H., Welsh, M., Casavant, T., McCray, P., 2002. Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy (vol 99, pg 2129, 2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14611–14611.
- Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6, 551–557. <https://doi.org/10.1038/ni1206>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T., Lee, B.-J., 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Mol. Basel Switz.* 17, 12276–12286. <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>
- Shafer, W.M., Qu, X., Waring, A.J., Lehrer, R.I., 1998. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1829–1833.
- Shai, Y., 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Pept. Sci.* 66, 236–248. <https://doi.org/10.1002/bip.10260>
- Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 55–70.
- Shi, L., Günther, S., Hübschmann, T., Wick, L.Y., Harms, H., Müller, S., 2007. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A* 71A, 592–598. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20402>

- Shirazi, T., Longman, R.J., Corfield, A.P., Probert, C.S.J., 2000. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad. Med. J.* 76, 473–478. <https://doi.org/10.1136/pmj.76.898.473>
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Singh, P.K., Jia, H.P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B.-A.D., Greenberg, E.P., Valore, E.V., Welsh, M.J., Ganz, T., Tack, B.F., McCray, P.B., 1998. Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 14961–14966.
- Smith, K., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., 2007. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.10.002>
- Sørensen, O.E., Thapa, D.R., Roupé, K.M., Valore, E.V., Sjöbring, U., Roberts, A.A., Schmidtchen, A., Ganz, T., 2006. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Invest.* 116, 1878–1885. <https://doi.org/10.1172/JCI28422>
- Stamm, W.E., Norrby, S.R., 2001. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J. Infect. Dis.* 183 Suppl 1, S1-4. <https://doi.org/10.1086/318850>
- Stebe-Frick, S., Ostaff, M.J., Stange, E.F., Malek, N.P., Wehkamp, J., 2018. Histone deacetylase-mediated regulation of the antimicrobial peptide hBD2 differs in intestinal cell lines and cultured tissue. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31125-x>
- Stewart, P.S., William Costerton, J., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., Ren, Q., 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol.* 15, 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>
- Tannock, G.W., Tiong, I.S., Priest, P., Munro, K., Taylor, C., Richardson, A., Schultz, M., 2011. Testing probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor) for its ability to reduce carriage of multidrug-resistant *E. coli* by elderly residents in long-term care facilities. *J. Med. Microbiol.* 60, 366–370. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.025874-0>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 207. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Tsai, C.J.-Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7, 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- Uronis, J.M., Mühlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., Jobin, C., 2009. Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility. *PLoS ONE* 4, e6026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006026>

- Vollmer, W., Blanot, D., Pedro, D., A, M., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J.P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M., Kawano, Y., 2004. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 687–690.
- Walker, R.W., Clemente, J.C., Peter, I., Loos, R.J.F., 2017. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria *in utero*? Colonization of the gut microbiome *in utero*. *Pediatr. Obes.* 12, 3–17. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12217>
- Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 44, D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Waring, M.J., 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269–282. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80096-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80096-1)
- Wassenaar, T.M., 2016. Insights from 100 Years of Research with Probiotic *E. Coli*. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 6, 147–161. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00029>
- Wassenaar, T.M., Beimfohr, C., Geske, T., Zimmermann, K., 2014. Voluntarily exposure to a single, high dose of probiotic *Escherichia coli* results in prolonged colonisation. *Benef. Microbes* 5, 367–375. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0087>
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., Stange, E.F., 2002. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 745–752.
- Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Meissner, B.W. -v., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schroder, J.M., Stange, E.F., 2004. NF- B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium. *Infect. Immun.* 72, 5750–5758. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004>
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., 2005. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18129–18134.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wilson, S.S., Wiens, M.E., Smith, J.G., 2013. Antiviral Mechanisms of Human Defensins. *J. Mol. Biol., Antiviral Innate Immunity (Part I)* 425, 4965–4980. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038>

- World Health Organization, 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva World Health Organ.
- Yamaguchi, Y., Nagase, T., Makita, R., Fukuhara, S., Tomita, T., Tominaga, T., Kurihara, H., Ouchi, Y., 2002. Identification of multiple novel epididymis-specific β -defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunol.* 169, 2516–2523.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D.M., Lubkowski, J., Oppenheim, J.J., 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 22, 181–215.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S., Chen, Q., Buffo, M., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J., Wang, J., Howard, O., 1999. β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525–528.
- Yang, D., Chertov, O., Oppenheim, J.J., 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 978–989. <https://doi.org/10.1007/PL00000914>
- Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I., Huang, H.W., 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79, 2002–2009. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76448-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76448-4)
- Yount, N.Y., Kupferwasser, D., Spisni, A., Dutz, S.M., Ramjan, Z.H., Sharma, S., Waring, A.J., Yeaman, M.R., 2009. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 14972–14977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904465106>
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhao, Y., Xie, Z., Feng, J., Li, W., Cao, Z., Wu, Y., 2018. Pharmacological characterization of human beta-defensins 3 and 4 on potassium channels: Evidence of diversity in beta-defensin-potassium channel interactions. *Peptides* 108, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.005>
- Zhou, H., Fang, J., Tian, Y., Lu, X.Y., 2014. Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Ann. Microbiol.* 64, 413–420. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0679-9>
- Zschüttig, A., Zimmermann, K., Blom, J., Goesmann, A., Pöhlmann, C., Gunzer, F., 2012. Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLOS ONE* 7, e33351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033351>

7 ANHANG

7.1 TRÜBUNGSASSAY

Tabelle 2: Im Trübungsassay festgestellte MHK für die untersuchte Stichprobe an *E. coli* Bakterien

Bakterium	HBD2 [μM] für MHK	Konzentration $\mu\text{g/ml}$
UPEC	0,59 (\pm 0,0 SEM)	2,54
EPEC	0,59 (\pm 0,0 SEM)	2,54
ATCC 25922	2,34 (\pm 0,83 SEM)	10,14
BW25113	2,64 (\pm 0,74 SEM)	11,41
EcN	8,2 (\pm 1,17 SEM)	35,51
Type 42	14,06 (\pm 2,97 SEM)	60,87
Type 172	0,98 (\pm 0,2 SEM)	4,23
E57	0,59 (\pm 0,0 SEM)	2,54
H484	0,88 (\pm 0,17 SEM)	3,80
H164	1,76 (\pm 0,37 SEM)	7,61
G1	2,2 (\pm 0,9 SEM)	9,51
G2	5,27 (\pm 1,48 SEM)	22,82
G3	1,32 (\pm 0,37 SEM)	5,71
CFT073	0,78 (\pm 0,19 SEM)	3,38

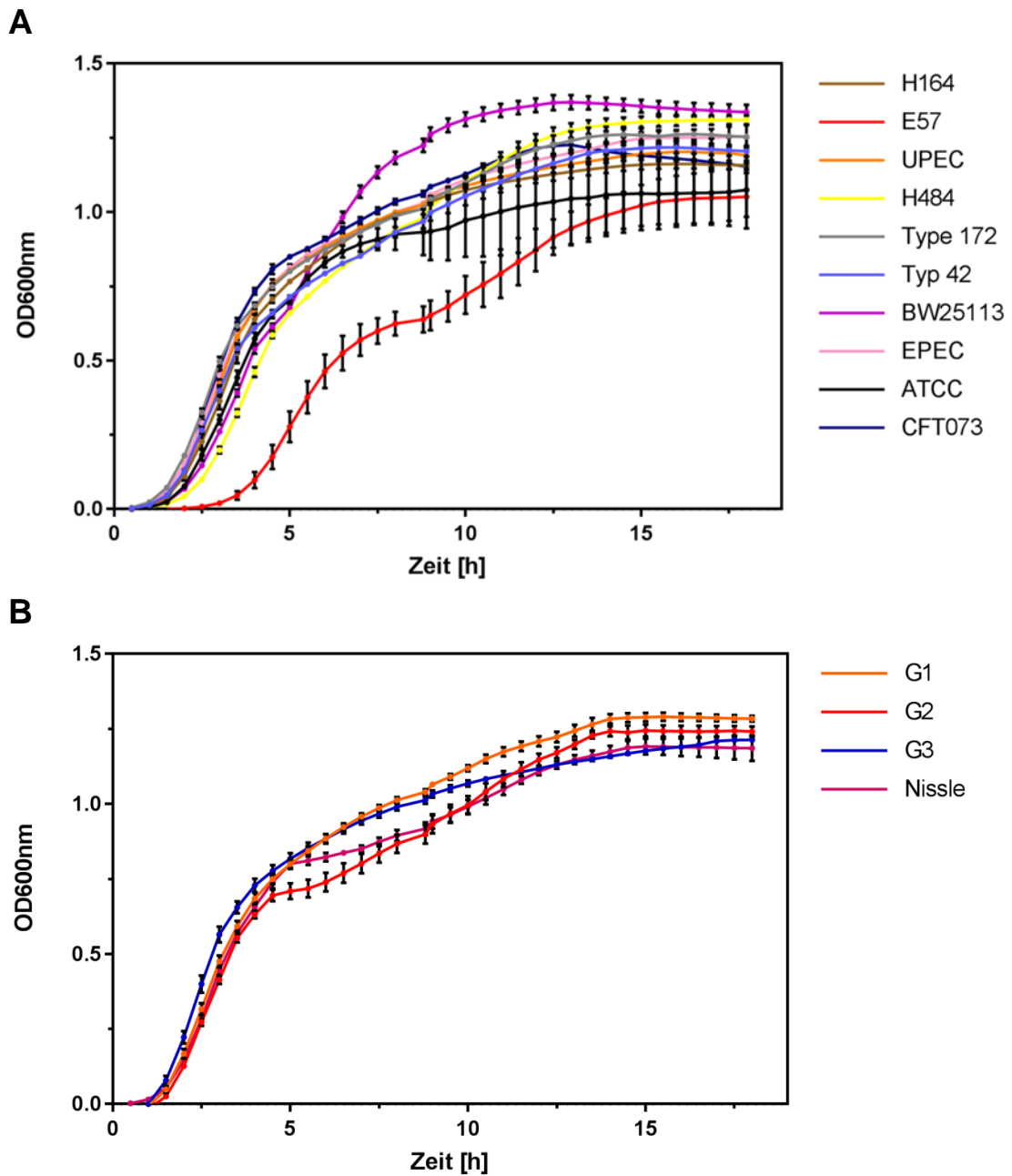


Abbildung 17: Wachstum der Positivkontrollen im Trübungsassay

Dargestellt ist das Wachstum der pathogenen *E. coli* Stämme und eines Laborstamms (*E. coli* BW25113) (A), sowie probiotischer Stämme (B) mittels der optischen Dichte (OD_{600}) über 18h. Die Bakterien wurden ohne HBD2 in 1x TSB inkubiert. Gegen das Wachstum dieser Positivkontrollen wurde das in Abbildung 3 A gezeigte Wachstum normiert. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM.

7.2 RESISTENZINDUKTION

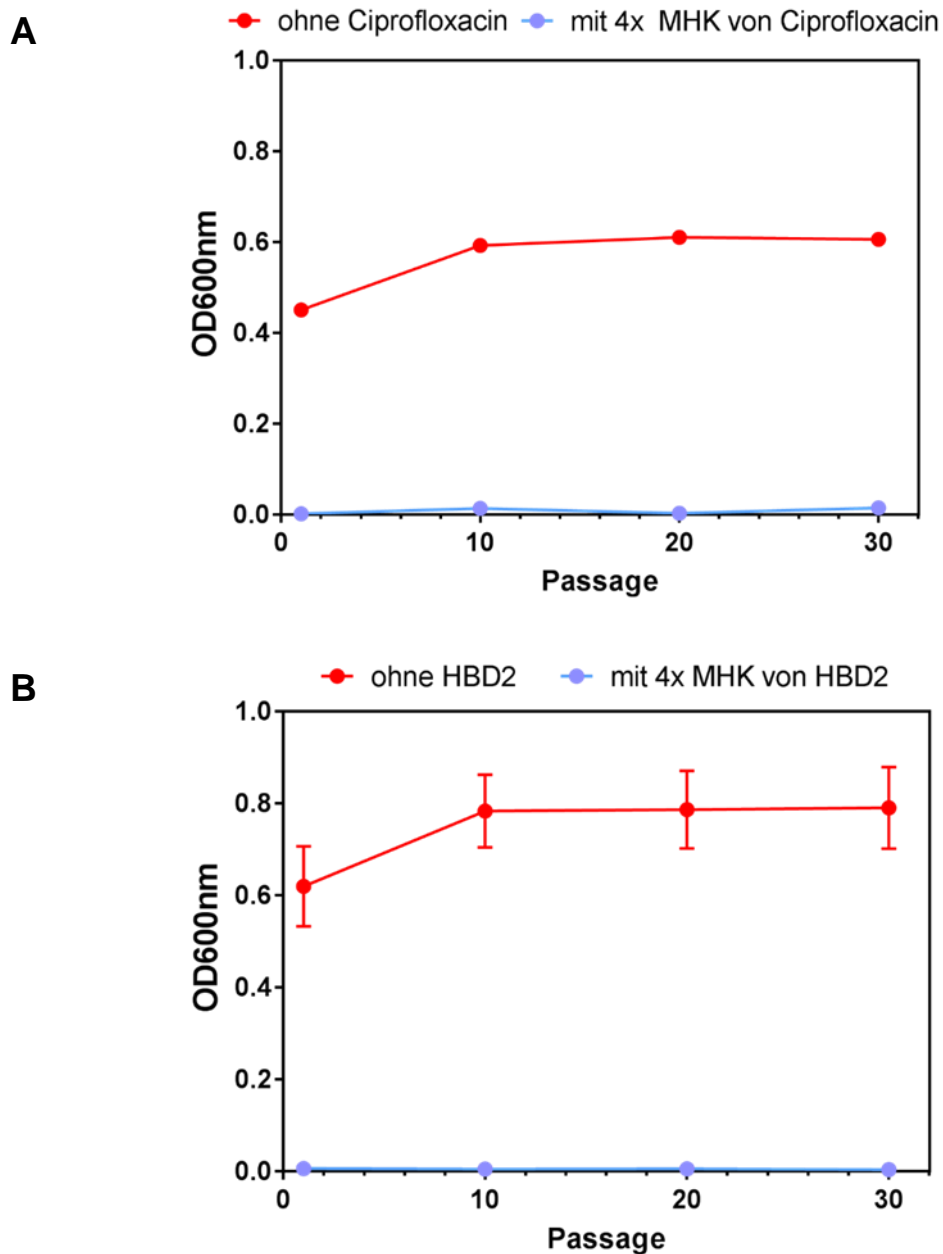


Abbildung 18: Wachstum von *E. coli* EPEC in An-/Abwesenheit von Ciprofloxacin oder HBD2 nach 30 Passagen in Medium ohne diese Antibiotika

Die untersuchten Passagen sind in einem ersten Schritt für 1–30 Passagen ohne Ciprofloxacin/HBD2 inkubiert worden. Diese Proben wurden konserviert und in einem zweiten Schritt für 12 h in Medium ohne (rot eingefärbt), sowie mit der vierfachen MHK von Ciprofloxacin (0,0848 μM), bzw. HBD2 (14,44 μM) inkubiert (blau eingefärbt), um zu untersuchen, ob *E. coli* EPEC die Versuchsdurchführung, sowie die Konservierung unbeschadet übersteht. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit \pm SEM.

8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Die Arbeit wurde am Universitätsklinikum Tübingen / Innere Medizin 1 / AG Wehkamp unter Betreuung von Prof. Dr. Jan Wehkamp (Doktorvater) durchgeführt.

Die Konzeption der Laborversuche erfolgte durch/in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med Jan Wehkamp, Dr. Judith Wendler (Betreuerin), Dr. Dirk Ehmman (Betreuer), sowie Dr. Nicole Armbruster und M. Sc. Louis Königer.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Judith Wendler, Dr. Dirk Ehmman und M. Sc. Louis Königer von mir eigenständig/in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Ehmman, Dr. Nicole Armbruster und M. Sc. Louis Königer durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Diskussion der Daten im Data Club des IZKF Studienkollegs, sowie nach persönlicher Rücksprache mit Dr. Judith Wendler, Dr. Dirk Ehmman und Prof. Dr. Jan Wehkamp.

Abbildung 1 wurden nach Erhalt der Urheberrechte durch die angeführte Quelle in das Manuskript miteinbezogen. Alle weiteren Abbildungen wurden durch mich erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig und nach Anleitung durch Dr. Judith Wendler und Dr. Dirk Ehmman verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ort und Datum

Unterschrift

9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jan Wehkamp, in dessen Labor ich das wissenschaftliche Arbeit lernen durfte, der diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte und mir neue Perspektiven und Wege aufzeigte.

Vielen Dank an Dr. Dirk Ehmann und Dr. Judith Wendler für die exzellente Betreuung. Nicht nur habt ihr mir im Labor mit Rat und Tat weitergeholfen, sondern auch viel Arbeit in die Korrektur meiner Arbeit gesteckt. Dafür bin ich euch sehr dankbar. Dank euch hört sich meine Arbeit nun (hoffentlich) nicht mehr wie ein Galileo Beitrag an.

Danke auch an Dr. Nicole Armbruster und M. Sc. Louis Königer für die ausgiebige praktische Hilfe bei unterschiedlichen Versuchen, für eure Ideen und Anregungen.

Bei Jutta Baader und Marion Strauß möchte ich mich bedanken für die gute Stimmung im Labor, Beistand bei den kleinen und großen Problemen des Laboralltags, sowie einer guten Zeit im Stubaital 2018.

M. Sc. Raphael Schäfer und Andrea Schäfer von der AG Frick möchte ich danken für die Unterstützung bei meinen Wachsmottenversuchen. Von eurer Einarbeitung und Erfahrung habe ich sehr profitiert.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung bedanken, mit der ihr mich schon immer und in allen Dingen begleitet. Ich habe es euch zu verdanken, dass ich nun diese Zeilen schreiben kann. Außerdem danke ich dir, Laura, dass du bei mir bist.