

Aus dem Institut für Lungenforschung
- Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Bernd Schreck -
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchung des Einflusses antimikrobieller
Insektenpeptide auf die Bakterien
Streptococcus pneumoniae, *Moraxella catarrhalis*,
Enterococcus faecalis und *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nora Sophia Lindhauer
aus Hannover

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 21. Juli 2021

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Bernd Schmeck

1. Korreferent: Prof. Dr. Alexander Visekruna

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Summary	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Grampositive Erreger: <i>Streptococcus pneumoniae</i> und <i>Enterococcus faecalis</i>	1
1.2 Gramnegative Erreger: <i>Moraxella catarrhalis</i> und <i>Escherichia coli</i>	3
1.3 Antimikrobielle Peptide: Vorkommen und allgemeine Funktion	4
1.3.1 Physikalische Eigenschaften und Wirkmechanismus	6
1.4 Zytokine: Allgemeine Funktion und Dysregulation	7
1.4.1 Wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine	8
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	9
2 Ergebnisse	10
2.1 Effekt der antimikrobiellen Peptide auf grampositive Erreger	10
2.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Wirkung von Defensin 1.....	10
2.1.1.1 Inflammatorische Reaktion von mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten humanen Makrophagen nach Behandlung mit Defensin 1	11
2.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i> : Wirkung von Defensin 1 und Sarcotoxin 1C	14
2.2 Effekt der antimikrobiellen Peptide auf gramnegative Erreger	15
2.2.1 <i>Moraxella catarrhalis</i> : Wirkung der antimikrobiellen Peptide	15
2.2.1.1 Inflammatorische Reaktion von mit <i>Moraxella catarrhalis</i> infizierten humanen Makrophagen nach Behandlung mit Defensin 1	20
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> : Wirkung von Defensin 1 und Sarcotoxin 1C	22
2.3 Zytotoxizität.....	22
2.4 Hämolyse-Assay mit Defensin 1	24
3 Diskussion	25
4 Literaturverzeichnis	33
5 Anhang	42
5.1 Publikation 1: Antibacterial activity of <i>Tribolium castaneum</i> defensins in an <i>in vitro</i> infection model of <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
5.1.1 Ergänzende Abbildungen von Publikation 1:	50
5.2 Publikation 2: <i>Tribolium castaneum</i> defensin 1 kills <i>Moraxella catarrhalis</i> in an <i>in vitro</i> infection model but does not harm commensal bacteria.....	51
5.2.1 Ergänzende Abbildungen von Publikation 2:	59
5.3 Abbildungen	60

5.4	Angaben der eigenen Anteile an der für die Dissertation berücksichtigten Publikationen.....	63
5.4.1	Publikation 1:.....	63
5.4.2	Publikation 2:.....	63
5.5	Verzeichnis der akademischen Lehrer	64

Zusammenfassung

Zunehmende Antibiotikaresistenzen erschweren die Therapie und erhöhen die Morbidität und Mortalität von bakteriellen Infektionen. Aus diesem Grund besteht ein großer Bedarf an neuen, nicht von den Resistenzmechanismen der Keime beeinträchtigten antimikrobiellen Substanzen. Neben den Pathomechanismen der Bakterien verursacht auch die körpereigene Immunreaktion durch eine verlängerte Entzündungsreaktion eine Schädigung des Gewebes, und somit einen Teil der Morbidität und Mortalität. Die frühzeitige Eindämmung der überschießenden körpereigenen Immunantwort auf Bakterien ist daher Bestandteil einer suffizienten Therapie und Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Die vorliegende Studie untersuchte 23 aus Insekten stammende und als Analoga synthetisierte antimikrobielle Peptide auf ihre Wirksamkeit gegen pathogene *Streptococcus pneumoniae* (antibiotikasensibel und –resistent), *Moraxella catarrhalis* sowie die Kommensalen *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* in der Flüssigkultur und im Makrophagen-Infektionsmodell sowie ihren Einfluss auf die Freisetzung der Zytokine MCP1, MIP-1- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-23, LAP und TNF- α . Antibiotikasensible und –resistente *Streptococcus pneumoniae* wurden nur durch das Defensin 1 gehemmt, während elf der Insektenpeptide einen dosisabhängigen wachstumshemmenden Effekt auf *Moraxella catarrhalis* zeigten. Im besonderen Maße hemmte das Defensin 1 aus *Tribolium castaneum* und das Sarcotoxin 1C der aus *Lucilia sericata* signifikant das Bakterienwachstum. Die Testung der beiden Peptide auf die Kommensalen *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* ergaben eine Sensibilität von *Escherichia coli* gegenüber dem Sarcotoxin 1C, wohingegen das *Enterococcus faecalis*-Wachstum unbeeinträchtigt blieb. Defensin 1 hatte einen geringen wachstumsmindernden Effekt auf *Enterococcus faecalis*, jedoch keinen Effekt auf *Escherichia coli*. Zur Untersuchung der Zytokin-Antwort in einem *in vitro*-Modell wurden aus humanem Blut differenzierte Makrophagen mit verschiedenen Dosen von *Streptococcus* oder *Moraxella* infiziert. Als Simulation der klinischen Therapie wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten verschiedene Konzentrationen des Defensin 1 zu den infizierten Makrophagen gegeben. Die Untersuchung der Expression von IL1- β - und IL-8-*mRNA* mittels *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* ergab eine deutlich verminderte bakteriell induzierte Expression nach der Behandlung mit Defensin 1. Diese Ergebnisse wurden mittels eines Multiplex *Enzyme-linked Immunosorbent-Assay* bestätigt. Defensin 1 führte zu einer signifikant reduzierten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* sowie von IL-1 β , IL-10, IL-12p70 und IL-23 nach Infektion mit *Moraxella catarrhalis*. Untersuchungen von Defensin 1 zeigten eine geringe Zelltoxizität auf humanen Makrophagen

sowie eine geringe hämolytische Aktivität bei Schweine-Erythrozyten. Zusammenfassend unterstreichen die hier gezeigten Ergebnisse das Potential der Substanzgruppe der antimikrobiellen Peptide im Allgemeinen als alternative Therapieoption bakterieller Infektionen. Die in den *in vitro*-Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse können potenziell zur Entwicklung neuer spezifischer Medikamente im Kampf gegen Infektionskrankheiten und die weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzen dienen.

Summary

Increasing antibiotic resistance complicates therapy and increases the morbidity and mortality of bacterial infections. For this reason, there is a great need for new antimicrobial substances that are not affected by the resistance mechanisms of the germs. Therefore, antimicrobial peptides, which are part of the innate immunity of both prokaryotes and eukaryotes, have also become the focus of new investigations. In addition to the pathomechanisms of the bacteria, the body's own immune response also causes damage to the tissue through a prolonged inflammatory response. The present study investigated 23 insect-derived antimicrobial peptides synthesised as analogues for their efficacy against pathogenic *Streptococcus pneumoniae* (antibiotic-sensitive and -resistant), *Moraxella catarrhalis* and the commensals *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in liquid culture and in the macrophage infection model as well as their influence on the release of the cytokines MCP1, MIP-1- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-23, LAP and TNF- α . Antibiotic-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* were only inhibited by Defensin 1, while eleven of the insect peptides showed a dose-dependent growth-inhibiting effect on *Moraxella catarrhalis*. In particular, Defensin 1 of *Tribolium castaneum* and Sarcotoxin 1C of *Lucilia sericata* significantly inhibited bacterial growth. Testing of the two peptides on the commensals *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* revealed sensitivity of *Escherichia coli* to Sarcotoxin 1 C, whereas *Enterococcus faecalis* growth remained unaffected. Defensin 1 had a small growth-reducing effect on *Enterococcus faecalis* but no effect on *Escherichia coli*. To investigate the cytokine response in an *in vitro*-model, macrophages differentiated from human blood were infected with different doses of *Streptococcus* or *Moraxella*. As a simulation of clinical therapy, different concentrations of Defensin 1 were added to the infected macrophages after different incubation periods. The investigation of the expression of IL1- β - and IL-8-mRNA by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction revealed a significantly reduced bacterially induced expression after treatment with Defensin 1. These results were confirmed by a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay. Defensin 1 resulted in significantly reduced release of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α after infection with *Streptococcus pneumoniae*, and of IL-1 β , IL-10, IL-12p70 and IL-23 after infection with *Moraxella catarrhalis*. Investigations of Defensin 1 showed low cell toxicity to human macrophages and low haemolytic activity in porcine erythrocytes. In summary, the results shown here underline the potential of the substance group of antimicrobial peptides in general as an alternative therapy option of bacterial infections. The knowledge gained in the *in vitro* studies can potentially be used to develop new specific drugs in the fight against infectious diseases and the increasing antibiotic resistance worldwide.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
AMP	Antimikrobielle Peptide
ADP	<i>Antimicrobial Peptide Database</i>
AS	Aminosäure
BDM	<i>blood derived macrophages</i>
BHI	Brain Heart Infusion
bspw.	beispielsweise
CAMP	<i>Collection of Antimicrobial Peptides</i>
CCL	CC-Chemokinligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
h	Stunde
IL	Interleukin
INT	Iodonitrotetrazoliumchlorid
LAP	<i>Latency associated peptide</i>
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (<i>Lipoteichoic acid</i>)
M	Molar
mg	Milligramm
MIP-1- α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
M.c.	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MHC	Haupthistokompatibilität (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
mL	Milliliter
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
MRGN	Multiresistente-Gramnegative-Bakterien
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Molekulargewicht
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidative Form)
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NADP ⁺	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotid-Phosphate (oxidative form)
ng	Nanogramm
NLRP	<i>NOD-like-Rezeptor- Proteine</i>
nm	Nanometer

<i>NOD</i>	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	optische Dichte
<i>OMV</i>	<i>outer membrane vesicle</i>
PBP	Penicillin bindendes Protein
<i>PBS</i>	<i>phosphate-buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>p.i.</i>	<i>post infection</i>
<i>qRT-PCR</i>	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>THY</i>	<i>Todd Hewitt Yeast</i>
<i>TLR</i>	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
<i>two-way ANOVA</i>	<i>two-way analysis of variance</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>
μ	micro
μg	Microgramm

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
Abbildung 2: Enterokokken	2
Abbildung 3: Funktion der antimikrobiellen Peptide	5
Abbildung 4: Verschiedene Lebensstadien des rotbraunen Reismehlkäfers	10
Abbildung 5: <i>In vitro</i> –Makrophagen-Infektionsmodell.....	12
Abbildung 6: Die Goldfliege	15
Abbildung 7: Wachstumshemmung von <i>M.c.</i> durch Defensin 1 von <i>Tribolium castaneum</i>	16
Abbildung 8: Wachstumshemmung von <i>M.c.</i> durch Cecropin-like AMP von <i>Lucilia sericata</i>	18
Abbildung 9: Wachstumshemmung von <i>M.c.</i> durch Stomoxyn von <i>Stomoxys calcitrans</i>	19
Abbildung 10: Wachstumshemmung von <i>M.c.</i> durch Cecropin von <i>Eristalis tenax</i>	20
Tabelle 1: Charakterisierung der auf <i>Moraxella catarrhalis</i> getesteten antimikrobiellen Peptide	60

1 Einleitung

Der menschliche Körper ist ständig mit einer Vielzahl von Bakterien konfrontiert. Einige davon sind transient auf der äußeren oder mukosalen Oberfläche vorzufinden, andere residieren dort länger oder dauerhaft. Zu unterscheiden sind ebenfalls fakultativ von obligat pathogenen Bakterien. Zu den fakultativ pathogenen Bakterien zählen unter anderem Kommensalen, welche verschiedene Kompartimente des Körpers besiedeln und zum Teil wichtige Funktionen für den menschlichen Organismus erfüllen. Nur bei Fehlbesiedlung können diese in besonderen Fällen krankheitsauslösend sein. Diese Kommensalen sollten möglichst bei einer antimikrobiellen Therapie geschont werden, wohin gegen obligat pathogene Erreger Ziel einer solchen Therapie sind.

1.1 Grampositive Erreger: *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecalis*

Streptococcus pneumoniae (*S.p.*) (siehe Abbildung 1) ist eine fakultativ anaerobe grampositive Diplokokke der Familie der *Streptococcaceae*. Sie verfügt über eine Polysaccharidkapsel, welche ihre Virulenz begründet. Anhand der verschiedenen Polysaccharide lassen sich über 93 Serotypen unterscheiden. Davon sind 15 Serotypen Verursacher der meisten invasiven Pneumokokken-Erkrankungen (Cilloniz et al. 2016). Hauptübertragungsmechanismus sind Schmier- und Tröpfcheninfektionen. Die bloße Besiedlung des Nasopharynx führt nicht obligat zu Symptomen. Erst die Überwindung körpereigener Abwehrmechanismen resultiert, je nach Besiedlungsort, in unterschiedlichen Krankheitsbildern.



Abbildung 1: *Streptococcus pneumoniae*: Raster-Elektronenmikroskopie (Robert-Koch Institut)

In Europa sowie den USA ist *S.p.* die häufigste Ursache der ambulant erworbenen Pneumonie. Zusätzlich können Pneumokokken eine Meningitis, Otitis media, Sinusitis sowie Sepsis verursachen (Cherazard et al. 2017; Hämäläinen 2016). Bis zu drei Millionen Menschen sterben jedes Jahr weltweit an einer Infektion mit *S.p.*. 2019 wurden die Pneumonie und andere untere Atemwegsinfekte auf Platz vier der häufigsten Todesursachen weltweit gelistet (World Health Organisation). Besonders häufig sind Kinder (eine Million Todesfälle bei Kindern 2015 durch Pneumonie weltweit) und ältere Menschen betroffen (Cilloniz et al. 2016).

Nach der Entdeckung des Penicillins 1928 durch Alexander Fleming hat sich dieses zum Goldstandard in der Behandlung einer Streptokokkeninfektion entwickelt. Mit dem zunehmenden Gebrauch ging jedoch eine abnehmende Empfindlichkeit des Pathogens gegenüber verschiedenen Antibiotika einher (Cherazard et al. 2017). Resistenzraten von bis zu 25 % gegenüber Penicillinen und von bis zu 30 % gegenüber Makroliden wurden in den letzten Jahren in Europa detektiert (European Centre for Disease Prevention and Control 2019).

Alterationen der Penicillin-bindenden Proteine (PBP) in der zytoplasmatischen Membran wurden unter anderem als ursächlich für die Entstehung der Antibiotikaresistenz ausgemacht. Sechs strukturell veränderte PBPs wurden für *S.p.* beschrieben (Reinert 2009).

Als Ursache für die zunehmende Makrolidresistenz wurden verschiedene Gene ermittelt. Diese kodieren unter anderem für eine Efflux-Pumpe, welche das Antibiotikum aus dem Bakterium schleust und so einer suffizienten intrazellulären Konzentration entgegenwirkt (Reinert 2009).

Die seit 2007 eingeführte Säuglingsimpfung gegen Pneumokokken führte zu einem signifikanten Rückgang der im Impfstoff enthaltenen Serotypen bei allen Altersgruppen (Herdenschutzeffekt) (Robert Koch Institut 2020). Hinsichtlich einer Serotypenumverteilung hin zu nicht im Impfstoff enthaltenen Serotypen ergaben Studien aus verschiedenen Ländern unterschiedliche Resultate. Studien aus den USA und aus Deutschland zeigten eine Serotypenumverteilung mit einer Zunahme der antibiotikaresistenten Stämme seit Beginn der Impfung (Huang et al. 2009; Imöhl et al. 2015). Die beschriebene Entwicklung führte zur Aufnahme von *S.p.* in die *World Health Organisation (WHO)*-Liste der Bakterien, gegen die dringend neue Antibiotika entwickelt werden sollen (World Health Organisation 2017b).

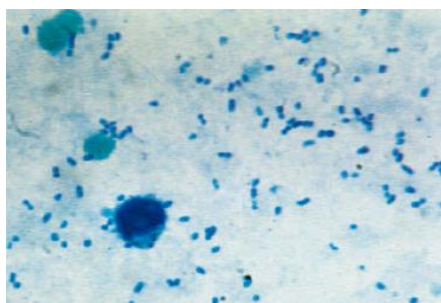


Abbildung 2: Enterokokken: Nachweis im Urinsediment (Methylenblaufärbung) (Hof et al. 2019)

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) ist ein grampositives kokkoides, in Ketten angeordnetes Bakterium der Familie der *Enterococcaceae* (siehe Abbildung 2). Zusammen mit *Enterococcus faecium* macht *E. faecalis* bis zu 50 % der aeroben Darmflora des Menschen aus. Die Störung des Äquilibriumms der Darmflora des Menschen durch bspw. eine Antibiotikatherapie kann zu schweren infektiösen Darmerkrankungen, aber auch anderen Krankheitsbildern bis hin zum Darmkrebs führen (Gagnière et al. 2016).

Bei Fehlbesiedlung können pathogene Stämme ursächlich für Lokalinfectionen und chronische Harnwegsinfekte sein (Hof et al. 2019).

Unter anderem aufgrund ihrer Zellwand sowie der Bildung von PBP besitzen alle Enterokokken eine natürliche Resistenz gegen Penicillin G, Cephalosporine und Cotrimoxazol. Aminoglykoside wirken nur in hoher Dosis (Hof et al. 2019). Mehr als 10 % der klinischen Isolate in Deutschland weisen zudem Resistenzen gegen Vancomycin auf (Sidler et al. 2014).

Gramnegative Erreger: *Moraxella catarrhalis* und *Escherichia coli*

Moraxella catarrhalis (*M.c.*) ist eine obligat aerobe, sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommende, human spezifische, gramnegative Kokke der Familie der *Moraxellaceae*. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Neisserien wurde das Bakterium lange Zeit fälschlicherweise mit dieser Familie verwechselt und in der Diagnostik übersehen.

Es lassen sich zwei Stämme, der Sero-resistente und der Sero-sensible Stamm und anhand struktureller Unterschiede der Lipopolysaccharide drei Serotypen voneinander abgrenzen. Zu den wichtigsten Virulenzstrategien von *M.c.* gehören neben ihrem intrazellulären Vorkommen, ihre Resistenz gegen Komplementfaktoren, die Bildung von schützenden Biofilmen mittels *outer membrane vesicles* (*OMV*), die Lokalisierung im lymphatischen Gewebe, um so die Immunabwehr zu umgehen und die polyklonale, nicht-spezifische B-Zell-Aktivierung zur Modulation der adaptiven Immunität (Augustyniak et al. 2018).

Als bei Kindern häufiges den Respirationstrakt besiedelndes Bakterium (50-100%ige Kolonisation innerhalb des ersten Lebensjahres) verursacht der Keim jährlich 20 % der Otitis media-Fälle sowie 20 % der Sinusitiden in dieser Altersgruppe (Murphy und Parameswaran 2009). Otitis media ist die häufigste bakterielle Erkrankung bei Kindern und der häufigste Grund einer Antibiotikatherapie in diesem Alter. Bei Erwachsenen wurden hingegen Trägerschaften von 1-5 % beobachtet (Murphy und Parameswaran 2009). Erste Ergebnisse wiesen auf eine Zunahme der Moraxellenbesiedlung bei Kindern nach erfolgter Pneumokokkenimpfung hin (Revai et al. 2006). Des Weiteren ist *M.c.* eine der Hauptursachen von Infektexazerbationen bei der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Durch *M.c.* hervorgerufene Pneumonien sind deutlich seltener als die durch *S.p.* bedingte und wurden bisher vor allem bei älteren Patienten mit kardiopulmonalen Vorerkrankungen beschrieben. Bakteriämien und invasive Erkrankungen durch *M.c.* bilden eine seltene Ausnahme (Murphy und Parameswaran 2009). Aufgrund der Produktion einer β -Lactamase sind nahezu 90 % der Moraxellenstämme resistent gegen Ampicillin (Murphy und Parameswaran 2009).

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein fakultativ anaerobes, gramnegatives, peritrich begeißeltes, bewegliches Stäbchenbakterium der Familie der *Enterobacteriaceae*. Es ist als Kommensale Teil der menschlichen Darmflora und bildet Vitamin K für den menschlichen Organismus. Die meisten Stämme sind nicht krankheitsauslösend, einzelne pathogene Stämme können jedoch intestinale wie auch extraintestinale Erkrankungen, wie die Diarrhoe oder Harnwegsinfekte, auslösen (Gomes et al. 2016; Kaper 2005; Hof et al. 2019). Des Weiteren findet man den Erreger häufig in sekundär infizierten Wunden. *E. coli* ist der häufigste Sepsiserreger bei alten Menschen. Ein möglicher Pathomechanismus sind unter anderem die P-Fimbrien, mit welchen sich einige *E. coli* Stämme am Epithel der harnableitenden Wege anhaften (Hof et al. 2019).

Vor allem bei häufig hospitalisierten Patienten muss mit dem Vorkommen von multiresistenten gramnegativen Stäbchen (MRGN) gerechnet werden. Diese Bakterien sind resistent gegen drei oder vier Antibiotikaklassen (MRGN3/MRGN4: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Chinolone) (Hof et al. 2019). Ursächlich hierfür sind unter anderem die Bildung einer β -Lactamase, Carbapenemase und andere Genomveränderungen (Poirel et al. 2018).

Antimikrobielle Peptide: Vorkommen und allgemeine Funktion

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind Bestandteil des Immunsystems von Prokaryoten wie auch von Eukaryoten. Diese Substanzklasse verfügt über ein weites Spektrum an antibakteriellen, antiviralen, antifungalen und anticancerogenen Eigenschaften.

AMPs spielen eine Rolle bei der Wundheilung, der Angiogenese, sind chemotaktisch aktiv und können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Fähigkeiten aufweisen (Lai und Gallo 2009). Sie sind an der Aktivierung von T-Zellen sowie von *Toll-like* Rezeptoren (*TLR*) beteiligt, steigern Phagozytose, können Dendritische Zellen aktivieren (Moravej et al. 2018) und Endotoxine (bspw. Lipopolysaccharide (LPS)) neutralisieren (Hu et al. 2016) (siehe Abbildung 3).

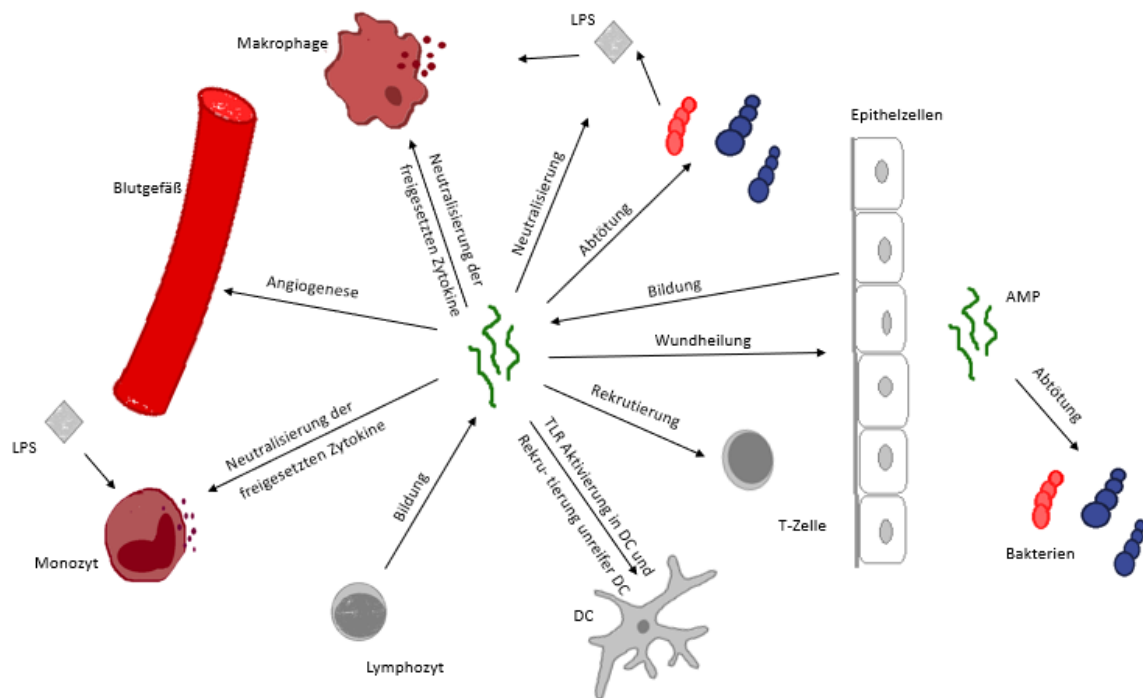


Abbildung 3: Funktion der antimikrobiellen Peptide:

AMPs können die Genexpression von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und Epithelzellen modulieren. Sie veranlassen die Zellen dazu Chemokine und Zytokine zu produzieren, welche dazu führen, dass Leukozyten an den Infektionsort gelangen, die Zelldifferenzierung induziert wird, Zellen aktiviert werden und die Signalkaskade der *Toll-like*-Rezeptoren blockiert oder aktiviert wird. Ihre Aktivität resultiert in der Abwehr von Infektionen, der Entzündungshemmung, der Wundheilung sowie der Aktivierung der adaptiven Immunabwehr. AMP = Antimikrobielles Peptid, DC = Dendritische Zelle, TLR = *Toll-like*-Rezeptor, LPS = Lipopolysaccharid (Moravej et al. 2018) modifiziert von Nora Lindhauer

Im menschlichen Organismus kommen AMPs unter anderem in Leukozyten, Eosinophilen, auf der Haut, im Speichel und im Bronchialsekret vor (Levy 2004; Hao et al. 2019; Fábíán et al. 2012; Phoenix et al. 2013; Campos et al. 2004). Erhöhte Spiegel an AMP konnten im Lungensekret bei bakterieller Pneumonie, Tuberkulose und Sepsis beobachtet werden und speziell humane β -Defensine, eine Gruppe der AMPs, spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem der Lunge, in dem es durch sie unter anderem zur Rekrutierung von Immunzellen in die Mukosa des Respirationstraktes kommt (Teclé et al. 2010).

Die Untersuchung eines der ersten, in den 1950er Jahren entdeckten (HIRSCH 1956), humanen AMPs, das Phagocytin, zeigte, dass der antibakterielle Wirkmechanismus des Peptids aus Neutrophilen unabhängig vom erworbenen Immunsystem ist (HIRSCH 1956; Zeya und Spitznagel 1966). In den darauffolgenden Jahren wurden weitere AMPs in den verschiedensten Organismen identifiziert. Dabei sind konstitutiv sezernierte von durch Inflammation oder Verletzung induzierte Peptide zu unterscheiden (Tonk und Vilcinskas 2017).

Die Entdeckung weiterer AMPs in der Gruppe der Invertebraten, die trotz Fehlens eines erworbenen Immunsystems wie das der Menschen als sehr umweltresistent gelten, weist auf das Potential der Peptide in der Pathogenabwehr hin. Die artenreichste Klasse der Tiere, die Insekten, verfügt nur über ein angeborenes Immunsystem. Gleichzeitig wurde bei ihnen bisher die größte Vielfalt an AMP entdeckt (Tonk und Vilcinskas 2017).

1.1.1 Physikalische Eigenschaften und Wirkmechanismus

AMPs sind kleine Moleküle und können anhand ihrer Länge in kleine (12-50 Aminosäuren) (Lai und Gallo 2009) und größere (über 100 Aminosäuren) (Moravej et al. 2018) AMP unterschieden werden. Auch wenn bisher nur bei einem kleinen Prozentsatz der entdeckten AMPs die dreidimensionale Struktur bekannt ist, lassen sich drei Gruppen unterscheiden: Lineare α -helikale Peptide ohne Cystein-Reste, β -Faltblatt-Peptide mit intramolekularen Disulfidbrücken und Prolin- oder Cystein-reiche Peptide (Mylonakis et al. 2016). Basierend auf der *Antimicrobial Peptide Database (ADP)* sind 13,8 % α -helikal, 4 % β -Faltblätter und 4 % gemischter Konformität. Laut der *Collection of Antimicrobial Peptides (CAMP) database* hingegen sind 18,7 % helikaler-, 18,9 % β -Faltblatt- und 60,1 % gemischter Struktur (Waghu et al. 2014).

Der Großteil der bisher untersuchten AMP ist positiv geladen, amphiphil und enthält bis zu 50 % hydrophobe Aminosäurereste (Lee et al. 2016). Anionische Peptide sind seltener und benötigen Zink als Cofaktor für ihre bakterizide Aktivität (Fales-Williams et al. 2002).

Die kationischen Domänen der Peptide begründen ihre elektrostatische Anziehung zur negativ geladenen Phospholipidmembran von Bakterien und anderen Mikroorganismen (Yeaman und Yount 2003). Eine Korrelation zwischen der positiven Ladung und der antimikrobiellen Aktivität wurde beobachtet. Dieser Effekt wies eine Limitierung bei einer bestimmten Zunahme der Kationizität der Peptide auf. Die Spezifität der biologischen Aktivität der Peptide wird durch das Zusammenspiel von Ladung, Sekundärstruktur, Hydrophobizität und Amphiphilie bestimmt. Die Veränderung eines dieser Parameter führt zur Veränderung eines der anderen Parameter und daraus folgend zur Veränderung der biologischen Aktivität (Dathe et al. 2001). Bei neutral geladenen Membranen wird die Hydrophilie zu einem bestimmenden Faktor der Membraninteraktion (Yeaman und Yount 2003).

Das Zusammenspiel der beschriebenen physikalischen Eigenschaften führt zur Zerstörung der Membran. Im ersten Schritt gelangen die AMPs durch die beschriebene elektrostatische Anziehung an die Zellmembran der Prokaryoten. Dabei nehmen die AMPs mit α -helikaler Struktur sowie Cystein-reiche Peptide ihre Sekundärstruktur ein. AMPs mit β -Faltblatt-Struktur nehmen bereits vor Kontakt zur Membran ihre Sekundärstruktur ein (Lee et al. 2016). Nach

Eindringen in die Lipiddoppelschicht der Bakterien können sie, entweder durch Peptid-Peptid- oder durch Peptid-Membran-Interaktionen, zur Auflösung der Membranintegrität bspw. in Form von Porenbildung führen. Bei diesem Schritt gewinnt die Amphiphilie der AMPs an Bedeutung. Letztendlich führt der Prozess zur Destabilisierung der Zellmembran und somit zum Zelltod (Lee et al. 2016). Des Weiteren wurden intrazelluläre Wirkmechanismen beobachtet. Durch einzelne AMP wird die Proteinbiosynthese blockiert, Desoxyribonukleinsäure (zu engl. *desoxyribonucleic acid (DNA)*) gebunden oder intrazelluläre Signalwege werden inhibiert (Boparai und Sharma 2020; Krizsan et al. 2014; Kang et al. 2017).

Bei der Untersuchung von aus Insekten synthetisch hergestellter Insekten-AMP-Analoga zeigte sich teils ein synergistischer Effekt der Peptide (Pöppel et al. 2015). Insbesondere Peptide der gleichen Gattung, welche auf einen inflammatorischen Reiz hin ausgeschüttet wurden, zeigten eine Potenzierung ihres Effekts (Rahnamaeian et al. 2015; Pöppel et al. 2015). Durch die Kombination mehrerer AMPs konnten in Experimenten niedrigere minimale inhibitorische Konzentrationen (*MIC*) erzielt werden (Rahnamaeian et al. 2016). Die erfolgreiche Kombination eines AMPs mit einem Antibiotikum bei multiresistenten Keimen wies auf synergistische Effekte der beiden Medikamentenklassen hin (Wu et al. 2017).

Zytokine: Allgemeine Funktion und Dysregulation

Zytokine sind wichtige Mediatoren und Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation des Immunsystems. Ihr Effekt kann sowohl verstärkend als auch inhibierend sein. Zu ihren unterschiedlichen Aufgaben zählen die Pathogenbekämpfung, die Stammzellendifferenzierung, die embryonale Entwicklung, ebenso wie der Einfluss auf Alterungsprozesse (Dinarello 2007).

Die Grenze zwischen einer adäquaten und einer inadäquaten Immunreaktion durch Zytokine ist fließend und der Begriff des Zytokinsturms bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung (Fajgenbaum und June 2020). Disseminierte bakterielle Infektionen sind die Hauptursache für die Entstehung eines Zytokinsturms. Die dysregulierte Immunreaktion führt letztendlich mehr zu Gewebsschäden als zu einer effizienten Pathogenbekämpfung. Aktuelle Studien untersuchen die Eingrenzung einer solchen überschießenden Immunantwort mittels bspw. Plasmafiltration oder spezifischer Interleukin-Inhibitoren (Fajgenbaum und June 2020). Die Entwicklung antiinflammatorisch wirksamer Medikamente ist Ziel aktueller Forschung.

1.1.2 Wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine

Zur Interleukin (IL)-1 Familie gehören 11 Mitglieder, darunter IL-1 β . Das proinflammatorische Zytokin nimmt Einfluss auf die Körpertemperatur, die hepatische Akute- Phase-Reaktion, die B- Zell-Stimulation sowie die T-Zell-Antwort (Dinarello 2007; Rose-John 2018).

Jede kernhaltige Zelle kann IL-8 produzieren. Der Großteil wird von Makrophagen nach Stimulation durch andere Zytokine, wie bspw. IL-1 β oder TNF- α , gebildet. Das Protein wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und spielt eine wichtige proinflammatorische Rolle während der akuten Entzündungsreaktion (Baggiolini und Clark-Lewis 1992).

Die vorherrschende Wirkung von IL-10 ist anti-inflammatorisch. Über die Suppression von Interferon- γ , TNF- α , IL-6 und andere Zytokine unterdrückt es unter anderem die T-Zell- Antwort (Dinarello 2007; Murphy et al. 2009).

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), oder auch CC-Chemokinligand 2 (CCL2) genannt, gehört zu der Gruppe der Chemokine und reguliert die Migration von Monozyten, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen zum Ort der akuten Entzündung (Deshmane et al. 2009). Es wird zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt.

Das *Latency associated peptide (LAP)* ist eine Form des *Transforming Growth Factor β 1* welches die T-Zell-Antwort hemmt. Das Protein ist bei starker Immunantwort gegen Pathogene für die Selbst-Toleranz erforderlich (Murphy et al. 2009; Boswell et al. 2011).

Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1- α), nach der neuen Nomenklatur CC-Chemokinligand 3 (CCL3) genannt, wird unter anderem von Makrophagen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten gebildet. Nach Bindung an seinen G- Protein- gekoppelten Rezeptor wird eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt, welche zu Chemotaxis, Degranulation, Phagozytose und der Synthese weiterer Mediatoren führt. Hauptursächlich für die proinflammatorische Wirkung ist die Chemotaxis (Maurer und Stebut 2004).

IL-23 wird von aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen gebildet und gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen. Studien zeigten, dass IL-23 in der Entstehung von Tumoren beteiligt ist (Yan et al. 2018).

IL-12 ist ein Heterodimer bestehend aus einer p35- und p40-Untereinheit (Murphy et al. 2009). Die biologisch aktive Form ist das IL-12p70. Es wird von aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen gebildet und entfaltet seine proinflammatorische Wirkung über die Differenzierung naiver CD4⁺- Zellen in T-Helferzellen. Das Zytokin gilt als Gegenspieler des IL-23 in der Tumorentstehung (Vignali und Kuchroo 2012; Yan et al. 2018).

Ein weiterer proinflammatorischer Mediator der akuten Entzündungsreaktion ist das IL-6. Während einer Entzündung steigt der IL-6-Spiegel um das Tausendfache und kann als prädiktiver Marker der Sepsis genutzt werden. Deutlich erhöhte IL-6-Spiegel sind ebenfalls bei

Autoimmunerkrankungen zu beobachten und dienen als therapeutischer Angriffspunkt einzelner Autoimmunerkrankungen (Tanaka et al. 2018).

Der *Tumornekrosefaktor α* (TNF- α) führt über die Induktion des NF- κ B-Signalwegs zur Expression multipler proinflammatorischer Gene. Zusätzlich zur Pathogenbekämpfung ist er an der Induktion der Apoptose beteiligt (Fajgenbaum und June 2020).

Ziel der vorliegenden Arbeit

Für einzelne aus Insekten isolierte AMP sind antibakterielle Eigenschaften beschrieben worden (Jayamani et al. 2015). Ziel dieser Arbeit war es, 23 Insekten-AMPs in Bezug auf ihre Wirksamkeit gegen die wichtigen humanen Pathogene *S.p.* und *M.c.* sowie die Kommensalen *E. coli* und *E. faecalis* zu charakterisieren. Da die Immunreaktion während einer Infektion entscheidend für das klinische Ergebnis sein kann, sollte die Wirkung einzelner AMPs auch in einem *in vitro*-Infektionsmodell primärer humaner Makrophagen in Bezug auf die Freisetzung verschiedener Zytokine und die Zytotoxizität untersucht werden.

2 Ergebnisse

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle beschriebenen Experimente von mir durchgeführt und ausgewertet.

2.1 Effekt der antimikrobiellen Peptide auf grampositive Erreger

2.1.1 *Streptococcus pneumoniae*: Wirkung von Defensin 1

Der Einfluss von 23 verschiedenen Insekten-AMPs auf das Wachstum von Serotyp 2 Pneumokokken von Stamm D39 wurde in Wachstumskurven untersucht. Zunächst wurden die *S.p.* nach Anzucht mit insgesamt zehn seriellen Verdünnungen absteigender Konzentrationen (von 25 μM bis 0,0487 μM) der 23 verschiedenen AMPs inkubiert. Nach einer zehnstündigen Inkubation in *Todd Hewitt Yeast (THY)*-Medium wurden mittels automatischer Messung der optischen Dichte (OD) Wachstumskurven erstellt. Das Antibiotikum Ciprofloxacin diente als Referenz für eine komplette Wachstumshemmung.

Die durchgeführten Wachstumskurven zeigten, dass Defensin 1 aus *Tribolium castaneum* (Abbildung 4) als einziges AMP einen wachstumshemmenden Effekt auf *S.p.* D39 hatte (siehe *Figure 1a* Publikation 1). Die MIC betrug 12,5 μM . Geringere Konzentrationen zeigten ebenfalls eine dosisabhängige wachstumshemmende Wirkung. Wie in *Figure 1b* der Publikation 1 abgebildet, zeigte sich ebenfalls eine Wachstumsreduktion von Defensin 1 (MIC von 6,25 μM) gegenüber dem multiresistenten *S.p.* Stamm 19A (resistent gegen Penicillin 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cefotaxim 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Clindamycin 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tetracyclin 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

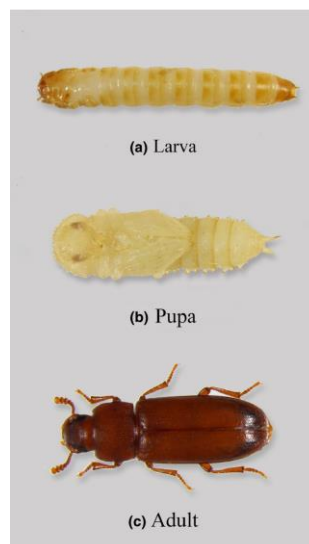


Abbildung 4: Verschiedene Lebensstadien des rotbraunen Reismehlkäfers: *Tribolium castaneum* (a) Larve, (b) Puppe, (c) Ausgewachsen. (Khan et al. 2016)

Sowohl zur Kontrolle der ersten Ergebnisse als auch um auf die vorhandenen Pneumokokkenzahl schließen zu können, wurde im Anschluss an eine 5,5-stündige

Wachstumskinetik ein *Colony-forming-unit (CFU)*-Assay durchgeführt. Als Kontrolle für die initial ins Flüssigmedium gegebene Pneumokokkenzahl (engl. *Input*) wurden mit *phosphate-buffered saline (PBS)* verdünnte Pneumokokken ($Input = 5,1 \times 10^6$ CFU/mL) ausgestrichen. Die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen an Defensin 1 (12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,125 μ M) inkubierten Bakterien wurden nach 5,5-stündiger Inkubation im Mikroplatten-Lesegerät (=Tecan-reader) mit *PBS* verdünnt, auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen und für weitere 15 Stunden (*h*) im CO₂-Inkubator kultiviert. Die Ergebnisse wurden als relative Änderung der koloniebildenden Einheit (engl. *CFU, Colony forming unit*) gegenüber der Positivkontrolle (engl. *Output*) in *Figure 2* der Publikation 1 dargestellt und im Folgenden in % angegeben. Der *Output* betrug $7,8 \times 10^7$ CFU/mL. Bei einer Behandlung mit der *MIC* (12,5 μ M) des Defensins 1 wurde kein *S.p.*-D29-Wachstum mehr nachgewiesen (100 %ige Wachstumsreduktion im Vergleich zum *Output*) (siehe *Figure 1c* Publikation 1). Die Behandlung mit 6,25 μ M führte zu einer 99,9 %igen Reduktion, die geringere Dosis von 3,125 μ M führte zu einer 99,8 %igen Reduktion. Auch im Vergleich zum *Input* konnte bei einer Inkubation mit 12,5 μ M kein Wachstum mehr detektiert werden (100 %ige Wachstumsreduktion), 6,25 μ M führte auch im Vergleich zum *Input* zu einer 99,9 %igen Wachstumsreduktion. Die Ergebnisse weisen auf die bakterizide Wirkung von Defensin 1 gegenüber *S.p.* D39 hin.

Das gleiche Vorgehen wurde mit dem multiresistenten *S.p.* Stamm 19A durchgeführt. Hier zeigte bereits die niedrigere Konzentration von 6,25 μ M Defensin 1 eine 100% ige Reduktion des Pneumokokken-Wachstums im Vergleich zum *Output* (siehe *Figure 1d* Publikation 1). Niedrigere Konzentrationen hatten einen geringeren wachstumshemmenden Effekt.

Die statistische Signifikanz wurde durch eine *two-way analysis of variance (Two-way-ANOVA)* ermittelt. Nachdem die bakterizide Wirkung von Defensin 1 gegen Pneumokokken (sensibel sowie resistent) nachgewiesen wurde, kam die Frage nach immunmodulatorischen Effekten des AMPs auf.

2.1.1.1 Inflammatorische Reaktion von mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten humanen Makrophagen nach Behandlung mit Defensin 1

Zur Untersuchung des Effekts von Defensin 1 auf die Boten-Ribonukleinsäure (*mRNA*)-Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-8 und IL-1 β) in mit Pneumokokken infizierten humanen Makrophagen wurde ein *in vitro*-Makrophagen-Infektionsmodell etabliert (siehe Abbildung 5).

Primäre aus menschlichem Blut differenzierte Makrophagen (engl. *blood derived macrophages (BDM)*) wurden mit unterschiedlichen Infektionsdosen (*MOI*, z. Dt. Multiplizität der Infektion,

engl. *Multiplicity of Infection*) (*MOI* 1 und *MOI* 10) an Pneumokokken infiziert. Zur Simulation verschiedener Behandlungszeitpunkte einer Pneumokokken-Infektion im klinischen Alltag wurden zwei unterschiedliche Zeitpunkte der AMP-Zugabe getestet. Der frühe Behandlungszeitpunkt von 1 h nach Infektion (*p.i.*) simulierte eine elektive Therapie, wie sie bspw. nach einem großen operativen Eingriff der Fall sein kann. Der spätere Zeitpunkt von 5 h *p.i.* simulierte eine Therapie bei erstem klinischem Verdacht auf eine Infektion.

Aus diesem Grund wurden entweder 1 h oder 5 h *p.i.* verschiedene Konzentrationen (12,5 µM, 6,25 µM, 1,25 µM) des Defensin 1 zu den Zellen gegeben. Kontrollzellen wurden ausschließlich mit der entsprechenden Konzentration des AMP-Lösungsmittels (2,5 % DMSO) behandelt.

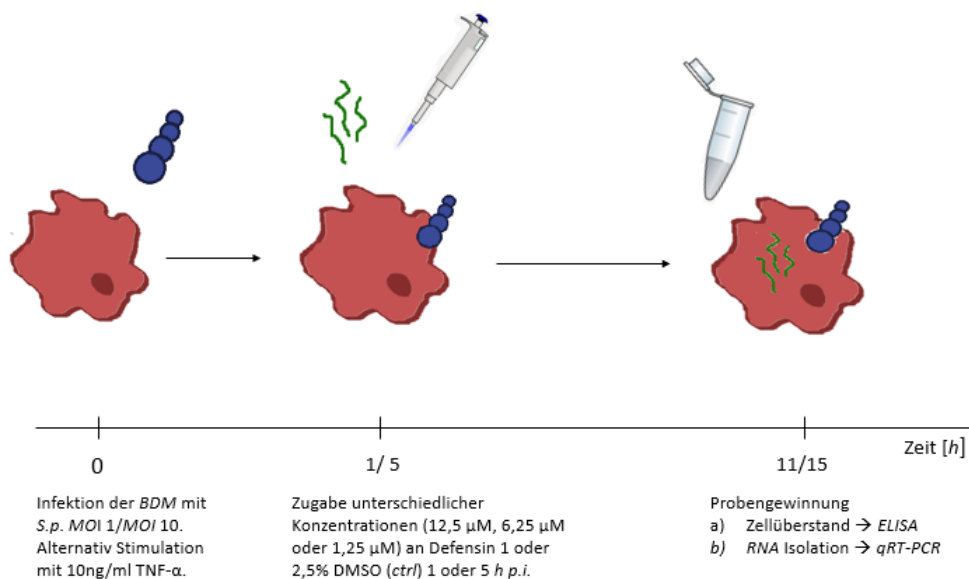


Abbildung 5: In vitro-Makrophagen-Infektionsmodell. Differenzierte BDM wurden mit *S.p.* (*MOI* 1 oder *MOI* 10) infiziert oder mit 10 ng/mL TNF- α stimuliert. 1 h oder 5 h nach Infektion (*p.i.*) wurde Defensin 1 (12,5µM oder 6,25 µM oder 1,25 µM) oder 2,5 % DMSO hinzugegeben (=Kontrolle (*ctrl*)). Den steril stimulierten BDM wurde 1 h nach Stimulation Defensin 1 zugefügt. Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 16 h erfolgte die Probengewinnung. a) Abnahme des Zellüberstands für ELISA. b) Lyse der Zellen zur RNA-Isolation für qRT-PCR.

Der mRNA-Spiegel nach 16- stündiger Infektion wurde mittels *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* (qRT-PCR) aus lysierten Zellen untersucht. Zur Darstellung der qRT-PCR-Ergebnisse wurde die log₂-fache Veränderung verwendet (siehe Figure 3 Publikation 1).

Im ersten Schritt wurde Defensin 1 hinsichtlich eines möglichen proinflammatorischen Effekts auf BDM analysiert. Die Zugabe von Defensin 1 zu nicht-infizierten BDMs führte in keiner der getesteten Konzentrationen zu einer gesteigerten IL-1 β - noch IL-8-mRNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Im zweiten Schritt wurde ein möglicher anti-inflammatorischer Effekt von Defensin 1 auf BDMs untersucht. Hierzu wurden BDMs unter sterilen Bedingungen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α (10 ng/mL) stimuliert. 1 h nach der Stimulation wurden die genannten drei

Konzentrationen (12,5 μM , 6,25 μM oder 1,25 μM) des Defensin 1 1 h nach Stimulation zu den *BDMs* gegeben. Unstimulierte Makrophagen dienten als Kontrollzellen. Die Zugabe des Defensin 1 1 h nach Stimulation führte zwar in der Tendenz zu einer verminderten *mRNA*-Expression von *TNF- α* , diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant (siehe Figure S3 Publikation 1).

Als Drittes wurde der Einfluss von Defensin 1 auf die *IL-1 β* - und *IL-8-mRNA*-Expression infizierter *BDMs* untersucht (siehe Figure 3 Publikation 1). Nach Zugabe der *MIC* (12,5 μM) und von 6,25 μM des Defensin 1 zu infizierten Zellen zeigte sich bei beiden Behandlungszeitpunkten und bei beiden Infektionsdosen eine signifikant verminderte *mRNA*-Expression im Vergleich zur AMP-freien, aber infizierten Kontrolle. Es zeigte sich keine Reduktion bei der Behandlung mit der niedrigsten getesteten Konzentration (1,25 μM) von Defensin 1. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls auf einen zeit- und dosisabhängigen Effekt von Defensin 1 im *in vitro*-Makrophagen-Modell schließen.

Zur weiteren Untersuchung verschiedener pro- wie auch anti-inflammatorischer Zytokine (*IL-1 β* , *IL-8*, *IL-10*, *MIP-1- α* , *MCP-1*, *LAP*, *IL-23*, *TNF- α* , *IL-6* und *IL-12p70*) wurde ein Multiplex-Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (*ELISA*) durchgeführt. Dazu wurde der Überstand der *BDM* hinsichtlich der Zytokin-Ausschüttung untersucht (siehe Figure 4 Publikation 1). Aufgrund der immer noch deutlichen Wachstumshemmung der niedrigeren Konzentration von 6,25 μM sowie nahezu gleicher Effekte auf die *mRNA*-Expression in der *qRT-PCR* wurden für die Untersuchung der Zytokin-Sekretion im *ELISA* nicht die *MIC* (12,5 μM), sondern alleinig die niedrigere Konzentration von 6,25 μM getestet.

Erneut wurde als erstes eine mögliche Zytokin-Induktion in *BDM* durch Defensin 1 untersucht. Dabei zeigte sich keine Induktion von *TNF- α* , *IL-6*, *IL12p70* oder *IL-23* durch die alleinige Zugabe von Defensin 1 zu nicht-infizierten *BDMs*. Es konnte jedoch eine leicht erhöhte Sekretion der Zytokine *IL-8*, *IL-10*, *MIP-1- α* und *MCP-1* nach Zugabe von Defensin 1 detektiert werden.

Im zweiten Schritt wurde die Zytokin-Ausschüttung von mit *S.p.*-infizierten (*MOI* 1 und *MOI* 10) und mit Defensin 1 behandelten (6,25 μM 1 h oder 5 h *p.i.*) Makrophagen mit der Ausschüttung infizierter Makrophagen ohne AMP-Behandlung verglichen. Kontrollzellen wurden ausschließlich mit der entsprechenden Konzentration des AMP-Lösungsmittels (2,5 % *DMSO*) behandelt. Es zeigte sich eine signifikant verminderte *IL-1 β* -Freisetzung nach Zugabe des Defensin 1 für beide Behandlungszeitpunkte bei der höheren Infektionsdosis (*MOI* 10) (siehe Figure 4b Publikation 1). Eine signifikant verminderte Ausschüttung des Interleukins ließ sich ebenfalls bei der niedrigeren Infektionsdosis (*MOI* 1) und beim späteren Behandlungszeitpunkt (5 h *p.i.*) ermitteln. Die frühzeitige Zugabe (1 h *p.i.*) des AMPs zur niedrigeren Infektionsdosis (*MOI* 1) führte zu keiner signifikant verminderten *IL-1 β* -Ausschüttung, eine Tendenz zur verminderten Zytokin-Ausschüttung konnte jedoch beobachtet werden.

Des Weiteren wurde die Sekretion von TNF- α , IL-6, IL12p70 und IL-23 untersucht (siehe *Figure 4 a, c, d, e* Publikation 1). Defensin 1 führte zu einer signifikant reduzierten Freisetzung dieser Zytokine bei einer *MOI* 10 für beide Behandlungszeitpunkte sowie bei einer *MOI* 1 mit späterem Behandlungszeitpunkt (5 h *p.i.*). Es wurde keine Induktion dieser Zytokine durch die alleinige Zugabe des Defensin 1 detektiert.

Die Zugabe von Defensin 1 zu nicht-infizierten Zellen führte, wie oben beschrieben, zur Induktion der Zytokine IL-10 und *MIP-1- α* . Gleichzeitig wurde nach Behandlung infizierter Zellen mit Defensin 1 eine reduzierte Ausschüttung dieser Zytokine beobachtet. Die frühzeitige Behandlung mit Defensin 1 (1 h *p.i.*) führte bei niedriger Infektionsdosis (*MOI* 1) bei beiden Zytokinen zu keiner signifikanten Verminderung, während die Ergebnisse bei einer hohen Infektionsdosis (*MOI* 10) für IL-10 signifikant erniedrigt waren. Bei der höheren Infektionsdosis (*MOI* 10) und spätem Behandlungszeitpunkt (5 h *p.i.*) konnte durch die Defensin 1 keine Reduktion der *MIP-1- α* -Sekretion erzielt werden.

Die Defensin 1 Behandlung führte zu keiner signifikanten Änderung der *MCP-1*-Sekretion in infizierten Makrophagen. Sämtliche Ergebnisse der *LAP*-Sekretion nach Behandlung mit Defensin 1 waren unterhalb der Nachweisgrenze. Aus diesem Grund konnten sie nicht in die weiteren Auswertungen aufgenommen werden.

Ein bedeutender Nachteil von Antibiotika ist die Eliminierung kommensaler Bakterien. Aus diesem Grund wurden die gegen *S.p* sowie *M.c.* (Defensin 1 und Sarcotoxin 1C) wirksamen AMPs hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen *E. faecalis* untersucht.

2.1.2 *Enterococcus faecalis*: Wirkung von Defensin 1 und Sarcotoxin 1C

Die folgenden Ergebnisse stammen von Frau Christin Rieke und Herrn Dr. Wilhelm Bertrams:

Der Effekt von Defensin 1 und Sarcotoxin 1C aus *Lucilia sericata* (siehe Abbildung 6) auf das Wachstum von *E. faecalis* wurde in Wachstumskurven untersucht. Der experimentelle Aufbau ähnelte dem in 2.1.1. beschriebenen Versuchsdesign. *Brain Heart Infusion (BHI)* diente hierbei als Nährmedium für die Bakterien. 12,5 μ M des Defensin 1 hatte einen geringen wachstumsverzögernden Effekt auf *E. faecalis*. Eine komplette Wachstumshemmung konnte nicht beobachtet werden. (siehe *Figure 4b* Publikation 2) Sarcotoxin 1C aus *Lucilia sericata* hatte keinen Effekt auf das Wachstum von *E. faecalis*. (siehe *Figure 4 d* Publikation 2)



Abbildung 6: Die Goldfliege: *Lucilia sericata* (Derraik et al. 2010)

Im Hinblick auf die Entwicklung von potentiell antimikrobiell wirksamen Medikamenten auf der Basis von Insekten-AMPs wurden die zur Verfügung stehenden 23 Insekten-AMPs im Folgenden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen gramnegative Erreger untersucht.

Effekt der antimikrobiellen Peptide auf gramnegative Erreger

2.1.3 *Moraxella catarrhalis*: Wirkung der antimikrobiellen Peptide

Der Einfluss der 23 verschiedenen Insekten-AMPs auf *M.c.* wurde ebenfalls in Wachstumskurven untersucht. Hierbei diente *BHI* als Nährmedium. Das Antibiotikum Colistin diente als Referenz für eine komplette Keimtötung. *M.c.* wurde mit insgesamt zehn 1:2 Verdünnungen (25 μM bis 0,04875 μM) der AMPs inkubiert wodurch die jeweilige *MIC* bestimmt werden konnte.

Es zeigte sich eine Sensibilität des Bakteriums gegenüber elf der untersuchten AMPs. Hierbei handelte es sich um Defensin 1 von *Tribolium castaneum*, Sarcotoxin 1C, Cecropin-like sowie Stomoxyn von *Lucilia sericata*, Cecropin A von *Hyalophora cecropia*, Sarcotoxin IA von *Sarcophaga peregrina*, Cecropin A von *Aedes aegypti*, Stomoxyn von *Stomoxys calcitrans*, Spinigerin von *Pseudacanthotermes spiniger*, Cecropin von *Galleria mellonella* und Cecropin von *Eristalis tenax*. (siehe Tabelle 1)

Für zehn dieser zuvor getesteten AMPs wurden im Anschluss an eine zehnstündige Wachstumskinetik *CFU-Assays* angefertigt. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit des Stomoxyns von *Lucilia sericata* wurde kein *CFU-Assay* mit diesem AMP angefertigt.

Im ersten Schritt wurden die Moraxellen mit der in den Wachstumskurven jeweilig individuell detektierten *MIC* sowie zwei niedrigeren Konzentrationen der AMPs inkubiert. Im zweiten Schritt wurde während der Phase des exponentiellen Wachstums (nach zehnstündiger Inkubation im Mikroplatten-Lesegerät) des Bakteriums *M.c.* in Verdünnungen auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen und nach einer 16-stündigen Inkubation im CO_2 -Inkubator manuell ausgezählt. Hierdurch konnte auf die vorhandene Moraxellenzahl zum Zeitpunkt des Ausstreichens geschlossen werden. Als Kontrolle für die initial ins Flüssigmedium gegebene Moraxellenzahl (engl. *Input*) wurden mit *PBS* verdünnte Moraxellen vor der Inkubation im

Mikroplatten-Lesegerät (=Tecan-reader) ausgetragen. Dabei wurde im Durchschnitt $1,5 \times 10^6$ CFU/mL bis 2×10^6 CFU/mL als *Input* verwendet. Als Positivkontrolle (engl. *Output*) dienten bis zur Phase des exponentiellen Wachstums (zehnstündige Inkubation im Tecan-reader) herangezogene, unbehandelte Moraxellen. Die Ergebnisse werden im Folgenden als relative Änderung der koloniebildenden Einheit (engl. CFU, *Colony forming unit*) gegenüber dem *Output* (Positivkontrolle) in % angegeben.

Es zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen auf die getesteten AMPs: Das bereits gegen *S.p.* wirksame Defensin 1 zeigte ebenfalls einen wachstumshemmenden Effekt auf *M.c.* in der Wachstumskinetik. (siehe *Figure 1a* Publikation 2) In allen drei getesteten Konzentrationen (12,5 μ M, 6,25 μ M und 3,125 μ M) führte Defensin 1 zu einer signifikanten Wachstumsreduktion verglichen zum *Output* ($9,94 \times 10^8$ CFU/mL) (siehe Abbildung 7). Die ermittelte MIC (12,5 μ M) führte zu einer 100 %igen Reduktion des *M.c.*-Wachstums (0 CFU/mL), 6,25 μ M führte zu einer 99,85 %igen Wachstumsreduktion, 3,125 μ M führte zu einer 98,72 %igen Reduktion im Vergleich zum *Output*. Verglichen zum *Input* führte keine der getesteten Konzentrationen zu einer signifikanten Wachstumsreduktion. Dies lässt vermuten, dass Defensin 1 auf *M.c.* wachstumsmindernd, nicht jedoch bakterizid wirkt.

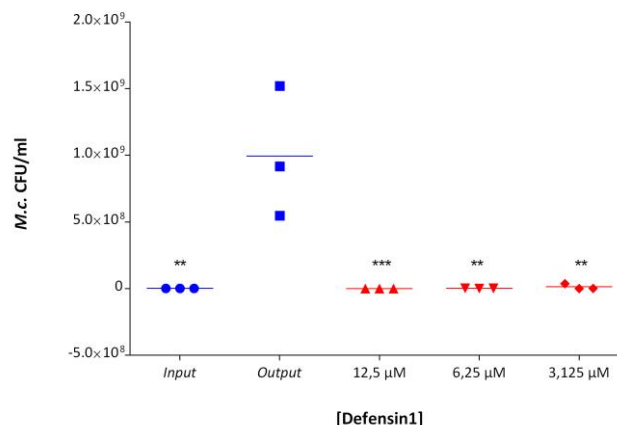


Abbildung 7: Wachstumshemmung von *M.c.* durch Defensin 1 von *Tribolium castaneum*: *M.c.* wurde bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,6 in *BHI*-Medium angezüchtet. Nach Verdünnung auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,011 wurden die *M.c.* mit abnehmenden Konzentrationen von Defensin 1 (12,5 μ M; 6,25 μ M; 3,125 μ M) bei 37°C inkubiert oder unbehandelt auf Schafblutagar-Platten ausgetragen (*Input*). *M.c.* wurden wie in *Figure 1a* der Publikation 1 beschrieben, angezüchtet und auf eine endgültige $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Die $OD_{600\text{ nm}}$ wurde in 30-Minuten-Intervallen gemessen. Nach zehnstündiger Wachstumskinetik wurde *M.c.* auf Schafblutagar-Platten ausgetragen und nach ca. 16-stündiger Inkubation im Brutschrank manuell gezählt Unbehandelte *M.c.* (*Output*) dienten als Referenz. Die statistische Signifikanz wurde durch eine *One-way-ANOVA* ermittelt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. vs. *Output*.

Die folgenden Daten wurden von Frau Christin Rieke und Herrn Dr. Wilhelm Bertrams erhoben:

Zusätzlich zu dem beschriebenen *CFU-Assay* wurden *CFU-Assays* mit Defensin 1 im Zusammenhang mit dem in 2.1.1.1 beschriebenen Makrophagen-Modell durchgeführt (siehe Abbildung 5). Hierfür wurden den infizierten (*MOI* 0,5 und *MOI* 1) *BDM* entweder 1 h oder

5 h *p.i.* Defensin 1 (12,5 µM) hinzugegeben. Nach einer 16-stündigen Inkubationszeit wurden die *BDMs* lysiert. Die enthaltenen Moraxellen wurden so freigesetzt und in Verdünnungen auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen, um auf die vorhandene Moraxellenzahl schließen zu können. Die Ergebnisse des in Abbildung 7 dargestellten *CFU-Assays* konnten bestätigt werden. Defensin 1 (12,5 µM) führte auch in der Zellkultur mit primären Makrophagen zu einer signifikanten Wachstumsreduktion von *M.c.* im Vergleich zur AMP-freien Kontrolle (*Output*). Dieser Effekt konnte bei beiden Zeitpunkten und bei beiden Infektionsdosen beobachtet werden. (siehe *Figure 1b* Publikation 2) Die statistische Signifikanz wurde jeweils durch eine *Two-way-ANOVA* ermittelt.

Die folgenden Daten stammen von mir:

Drei unterschiedliche AMP-Analoga aus *Lucilia sericata* wurden hinsichtlich ihres wachstumshemmenden Effekts untersucht. Das α -helikale Sarcotoxin 1C ergab eine *MIC* von 0,39 µM in der Wachstumskurve (siehe *Figure 3* Publikation 2). Dieser Effekt erwies sich ebenfalls als dosisabhängig.

Die folgenden Daten wurden von Frau Christin Rieke und Herrn Dr. Wilhelm Bertrams erhoben:

CFU-Assays mit Sarcotoxin 1C wurden im Zusammenhang mit dem in **2.1.1.1** beschriebenen Makrophagen-Modell durchgeführt. Hierfür wurden die infizierten (*MOI* 0,5 und *MOI* 1) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h oder 5 h *p.i.*) mit Sarcotoxin 1C (0,39 µM) inkubierten *BDMs* nach einer 16-stündigen Inkubationszeit lysiert. Die enthaltenen Moraxellen wurden so freigesetzt und in Verdünnungen auf Schafblutagar-Platten gegeben um auf die vorhandene Moraxellenzahl schließen zu können. Sarcotoxin 1C führte in der Tendenz zu einer Reduktion von *M.c.* zu beiden Behandlungszeitpunkten und bei beiden Infektionsdosen im Vergleich zur AMP-freien Kontrolle (*Output*). Eine signifikante Reduktion konnte nur bei niedriger Infektionsdosis (*MOI* 0,5) und früher Sarcotoxin 1C-Zugabe (1 h *p.i.*) beobachtet werden (siehe *Figure 4f* Publikation 2).

Die folgenden Daten stammen von mir:

Mittels der Wachstumskurven konnte für das zweite von *Lucilia sericata* stammende AMP, das Cecropin-like AMP, eine *MIC* von 25 µM festgelegt werden. Daraufhin wurde ein *CFU-Assay* durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als relative Änderung der koloniebildenden Einheit gegenüber dem *Output* ($6,39 \times 10^8$ *CFU/mL*) dargestellt (siehe Abbildung 8) und im Folgenden in % angegeben. Im *CFU-Assay* bewirkte die *MIC* (25 µM) eine 100 %ige Wachstumsreduktion (0 *CFU/mL*) von *M.c.*. Ein dosisabhängiger Effekt konnte auch hier beobachtet werden. 12,5 µM des Cecropin-like AMP führte zu einer 99,76 %igen Reduktion des Moraxellenwachstums, 6,25 µM führte zu einer 81 %igen Reduktion im Vergleich zum *Output*. Im Vergleich zum *Input* ergab sich keine signifikante Wachstumsminderung. Diese Ergebnisse lassen auf einen

bakteriostatischen, nicht jedoch auf einen bakteriziden Effekt des Cecropin-like AMP gegenüber *M.c.* schließen.

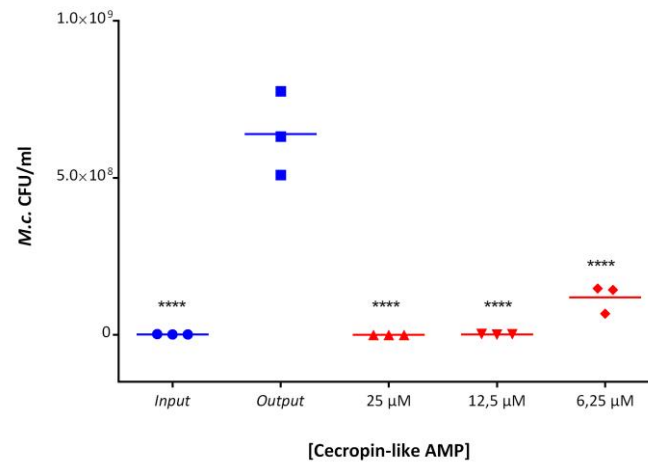


Abbildung 8: Wachstumshemmung von *M.c.* durch Cecropin-like AMP von *Lucilia sericata*: *M.c.* wurde bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,6 in BHI-Medium angezüchtet. Nach Verdünnung auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,011 wurden die *M.c.* mit abnehmenden Konzentrationen von Cecropin-like AMP (25 µM; 12,5 µM; 6,25 µM) bei 37°C inkubiert oder unbehandelt auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen (*Input*). *M.c.* wurden wie in Figure 1a der Publikation 1 beschrieben, angezüchtet und auf eine endgültige $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Die $OD_{600\text{ nm}}$ wurde in 30-Minuten-Intervallen gemessen. Nach zehnstündiger Wachstumskinetik wurde *M.c.* auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen und nach ca. 16-stündiger Inkubation im Brutschrank manuell gezählt. Unbehandelte *M.c.* (*Output*) dienten als Referenz. Die statistische Signifikanz wurde durch eine *One-way*-ANOVA ermittelt. **** $p < 0.0001$. vs. *Output*.

Das dritte von *Lucilia sericata* stammende AMP, das Stomoxyn, wies eine MIC von 12,5 µM in der Wachstumskurve auf. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit des Peptids wurde kein CFU-Assay durchgeführt.

Die MIC des α -helikalen Cecropin A von *Hyalophora cecropia* betrug 0,195 µM. In dem durchgeführten CFU-Assay führte diese Konzentration im Mittelwert zu einer 93,98%igen Reduktion des Bakterienwachstums im Vergleich zum *Output* ($9,62 \times 10^8$ CFU/mL). Geringere Konzentrationen (0,097 µM und 0,048 µM) führten im Gegensatz dazu zu einem gesteigerten Wachstum. Die Ergebnisse erwiesen sich als nicht signifikant nach *One-way*-ANOVA.

Beim Sarcotoxin IA von *Sarcophaga peregrina* konnten die in den Wachstumskurven gezeigten Effekte im CFU-Assay nicht bestätigt werden.

Das α -helikale Cecropin A von *Aedes aegypti*, der Gelbfiebermücke, zeigte in den Wachstumskurven ab einer Konzentration von 0,39 µM einen wachstumshemmenden Effekt. Im CFU-Assay führte diese Konzentration im Mittelwert zu einer 99,99%igen Reduktion des Wachstums von *M.c.* im Vergleich zum *Output*. 0,195 µM von Cecropin A führte zu einer 99,1%igen Wachstumsreduktion, niedrigere Konzentrationen zeigten keinen wachstumshemmenden Effekt. Diese Ergebnisse hatten keine statistische Signifikanz nach *One-way*-ANOVA.

Die MIC des AMP Stomoxyn von *Stomoxys calcitrans* (gemeine Stechfliege) betrug 25 μM und führte zu einer 100%igen Reduktion (0 CFU/mL) des Moraxellenwachstums verglichen zum *Output* ($1,3 \times 10^9$ CFU/mL). Die manuelle Auszählung der koloniebildenden Einheiten auf der Schafblutagarplatte zeigte, dass 12,5 μM des Stomoxyns zu einer 99,9%igen Moraxellen-Reduktion verglichen zum *Output* führte. Verglichen zum *Input* erzielte keine der getesteten Konzentrationen eine signifikante Wachstumsreduktion (siehe Abbildung 9). Somit ist zwar von einer bakteriostatischen, nicht jedoch von einer bakteriziden Wirkung von Stomoxyn gegen *M.c.* auszugehen.

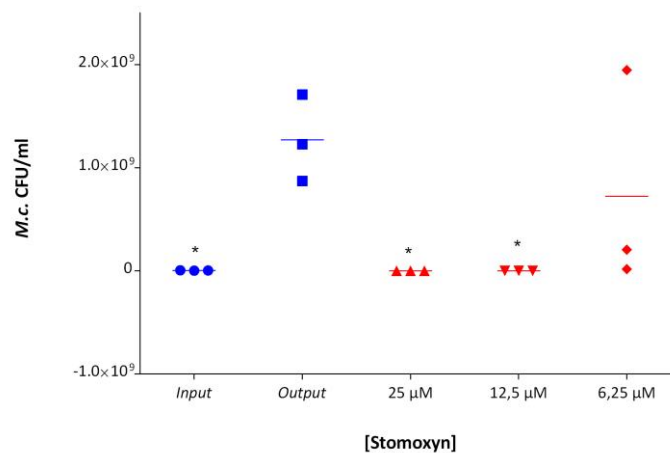


Abbildung 9: Wachstumshemmung von *M.c.* durch Stomoxyn von *Stomoxys calcitrans*: *M.c.* wurde bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600 \text{ nm}}$) von 0,6 in *BHI*-Medium angezüchtet. Nach Verdünnung auf eine $OD_{600 \text{ nm}}$ von 0,011 wurden die *M.c.* mit abnehmenden Konzentrationen von Stomoxyn (25 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM) bei 37°C inkubiert oder unbehandelt auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen (*Input*). *M.c.* wurden wie in *Figure 1a* der Publikation 1 beschrieben, angezüchtet und auf eine endgültige $OD_{600 \text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Die $OD_{600 \text{ nm}}$ wurde in 30-Minuten-Intervallen gemessen. Nach zehnstündiger Wachstumskinetik wurde *M.c.* auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen und nach ca. 16-stündiger Inkubation im Brutschrank manuell gezählt. Unbehandelte *M.c.* (*Output*) dienten als Referenz. Die statistische Signifikanz wurde durch eine *One-way*-ANOVA ermittelt. * $p < 0,05$, vs. *Output*.

Spinigerin von *Pseudacanthotermes spiniger* führte bei der MIC (25 μM) im Mittelwert zu einer 99,99%igen Reduktion des *M.c.*-Wachstums. Niedrigere Konzentrationen führten zu einem vermehrten Wachstum der Moraxellen im *CFU-Assay*. Die Ergebnisse hatten keine statistische Signifikanz. Das Cecropin von *Galleria mellonella*, der Großen Wachsmotte, hatte bei Inkubation mit der MIC (0,195 μM) eine 99,99%ige Reduktion des Moraxellenwachstums zur Folge. 0,097 μM führte zu einer 98,42%igen Reduktion, 0,048 μM führte zu einer 97,79%igen Reduktion des *M.c.*-Wachstums. Die Ergebnisse hatten keine statistische Signifikanz.

Die MIC des Cecropin von *Eristalis tenax*, der Mistbiene, wurde in der Wachstumskinetik als 1,56 μM festgesetzt. Die Ergebnisse des *CFU-Assays* werden in *Abb. 10* in CFU/mL dargestellt und im Folgenden in % verglichen zum *Output* ($1,1 \times 10^9$ CFU/mL) angegeben. Die MIC führte zu einer 99,99%igen, 0,79 μM zu einer 99,91%igen Reduktion, die niedrigste getestete

Konzentration von 0,39 μM führte zu keiner signifikanten Wachstumsreduktion von *M.c.* im *CFU-Assay*. Im Vergleich zum *Input* führte keine der getesteten Konzentrationen zu einem signifikant verminderten Wachstum. Cecropin von *Eristalis tenax* hat somit vermutlich eine bakteriostatische Wirkung auf *M.c.*.

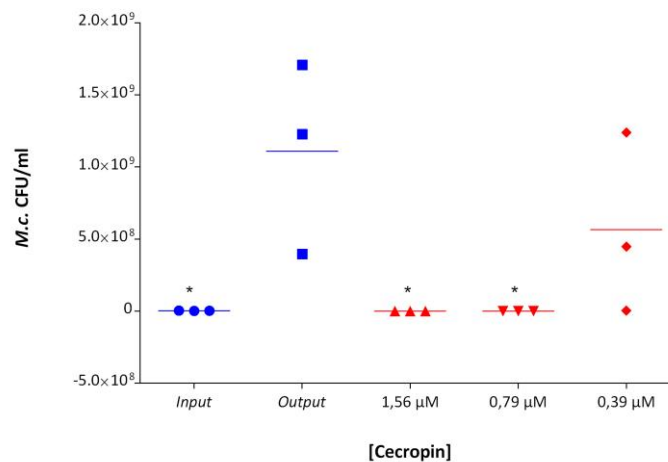


Abbildung 10: Wachstumshemmung von *M.c.* durch Cecropin von *Eristalis tenax*: *M.c.* wurde bis zu einer optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{ nm}}$) von 0,6 in *BHI*-Medium angezüchtet. Nach Verdünnung auf eine $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ von 0,011 wurden die *M.c.* mit abnehmenden Konzentrationen von Cecropin (1,56 μM ; 0,79 μM ; 0,39 μM) bei 37°C inkubiert oder unbehandelt auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen (*Input*). *M.c.* wurden wie in *Figure 1a* der Publikation 1 beschrieben, angezüchtet und auf eine endgültige $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Die $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ wurde in 30-Minuten-Intervallen gemessen. Nach zehnstündiger Wachstumskinetik wurde *M.c.* auf Schafblutagar-Platten ausgestrichen und nach ca. 16-stündiger Inkubation im Brutschrank manuell gezählt. Unbehandelte *M.c.* (*Output*) dienten als Referenz. Die statistische Signifikanz wurde durch eine *One-way-ANOVA* ermittelt. * $p < 0,05$ vs. *Output*.

Zusammenfassend zeigte keines der getesteten AMPs einen bakteriziden Effekt gegenüber *M.c.*. Defensin 1 wurde aufgrund seiner Wirksamkeit sowohl gegen *S.p.* (bakterizid) als auch *M.c.* (bakteriostatisch) für die Untersuchung gegen Kommensalen ausgewählt (siehe Abschnitt 2.1.1.1). Sarcotoxin 1C wurde aufgrund der hohen Wirksamkeit gegen *M.c.* ($\text{MIC}=0,39\ \mu\text{M}$) sowie der geringen Zytotoxizität (siehe Abschnitt 2.3) gegen humane Makrophagen für weitere Experimente ausgewählt. Nachdem die bakteriostatische Wirkung von Defensin 1 gegen *M.c.* nachgewiesen wurde, kam die Frage nach immunmodulatorischen Effekten des AMPs im Zusammenhang mit einer Moraxelleninfektion auf.

2.1.3.1 Inflammatorische Reaktion von mit *Moraxella catarrhalis* infizierten humanen Makrophagen nach Behandlung mit Defensin 1

Die folgenden Experimente wurden von Frau Christin Rieke und Herrn Dr. Wilhelm Bertram geplant und durchgeführt:

Nach dem unter 2.1.1.1 beschriebenen experimentellen Aufbau wurde der Effekt des Defensin 1 auf mit *M.c.* infizierten humane Makrophagen untersucht. Die Behandlungszeitpunkte und die

untersuchten Zytokine waren mit dem zuvor beschriebenen Experiment identisch. Die verwendete Infektionsdosis wurde angepasst (*MOI* 0,5 und *MOI* 1) und die *MIC* (12,5 µM) des Defensin 1 für *M.c.* wurde verwendet.

Zuerst wurde in der *qRT-PCR* ein möglicher Einfluss auf die IL-1 β - oder IL-8-*mRNA*-Expression von *BDMs* nach Zugabe mit dem AMP-Lösungsmittel (2,5 %DMSO) untersucht. Dabei wurden nicht-infizierten *BDMs* zum 1 *h*- oder 5 *h*-Zeitpunkt 2,5 % DMSO zugesetzt. Eine dadurch veränderte Zytokin-Expression im Vergleich zu unbehandelten *BDMs* konnte nicht beobachtet werden (siehe *Figure 2* Publikation 2). Als sterile Negativkontrolle dienten mit LPS stimulierte *BDM*. LPS ist Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und führt unter anderem über die Bindung an den CD14-Rezeptor humaner Makrophagen zur Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine (Guha und Mackman 2001). 1 *h* oder 5 *h* nach LPS-Stimulation wurde Defensin 1 (12,5 µM) zu den *BDMs* gegeben. Die Behandlung von mit *M.c.*-infizierten *BDMs* mit Defensin 1 (12,5 µM) hatte reduzierte *mRNA*-Spiegel von IL- 1 β und IL- 8 bei beiden Zeitpunkten (1 *h* oder 5 *h p.i.*) und beiden Infektionsdosen (*MOI* 0,5 oder *MOI* 1) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zur Folge (siehe *Figure 2* Publikation 2). Hinsichtlich der IL-8-*mRNA*-Expression zeigte sich, dass die frühe Defensin 1-Behandlung zu (1 *h p.i.*) zu einer signifikanten Reduktion der Expression bei beiden Infektionsdosen (*MOI* 0,5 und *MOI* 1) führte. Bei einer geringeren Infektionslast (*MOI* 0,5) konnte auch zu einem späteren Behandlungszeitpunkt eine signifikante Verminderung des IL-8-*mRNA*-Spiegels detektiert werden, wohingegen bei zu hoher Infektionslast (*MOI* 1) und später Behandlung (5 *h p.i.*) kein mindernder Effekt beobachtet werden konnte (siehe *Figure 2b* Publikation 2). Die Analyse der IL-1 β -*mRNA*-Expression zeigte, dass der beobachtete vermindernde Effekt am stärksten bei niedriger Infektionsdosis (*MOI* 0,5) und frühem Behandlungszeitpunkt (1 *h p.i.*) war (siehe *Figure 2a* Publikation 2).

Zur weiteren Untersuchung verschiedener pro- wie auch anti-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-8, IL-10, MIP-1- α , MCP-1, LAP, IL-23, TNF- α , IL-6 und IL-12p70) wurde ein *Multiplex-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* durchgeführt. Dazu wurde der Überstand der *BDM* hinsichtlich der Zytokin-Ausschüttung untersucht (siehe *Figure 3* Publikation 2). Der Effekt der Stimulation mit Defensin 1 auf nicht-infizierte *BDMs* wurde unter Abschnitt 2.1.1.1 beschrieben. Die Zugabe von 12,5 µM Defensin 1 1 *h* oder 5 *h* nach Moraxelleninfektion (*MOI* 0,5 oder *MOI* 1) zu den *BDMs* führte zur signifikanten Reduktion der bakterieninduzierten Freisetzung der Zytokine IL- 1 β , IL- 10, IL- 12p70 und IL- 23 im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen für beide Behandlungszeitpunkte und bei beiden Infektionsdosen.

Um mögliche Effekte der gegen *M.c.* wirksamen Peptide (Defensin 1 und Sarcotoxin 1C) auf Kommensalen genauer abschätzen zu können, wurden sie im Folgenden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen ein weiteres gramnegatives Bakterium, *E. coli*, analysiert.

2.1.4 *Escherichia coli*: Wirkung von Defensin 1 und Sarcotoxin 1C

Die folgenden Daten wurden von Frau Christin Rieke und Herrn Dr. Wilhelm Bertrams erhoben:

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in *lysogeny broth*-(LB)-Medium. Die Inkubation von *E. coli* mit Defensin 1 führte zu keinem verminderten Wachstum in der Wachstumskurve (siehe *Figure 4a* Publikation 2). Das Sarcotoxin 1C zeigte in der Wachstumskurve einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt. Die *MIC* konnte mit einer Dosis von 0,185 μ M ermittelt werden, da diese die niedrigste Konzentration war, bei der kein Wachstum mehr nachgewiesen werden konnte (siehe *Figure 4c* Publikation 2). Zur Abschätzung der Verträglichkeit der verschiedenen AMPs während einer eventuellen Behandlung wurden sie hinsichtlich einer möglichen Zytotoxizität bei humanen Makrophagen untersucht.

Zytotoxizität

Die Zytotoxizität von neun der genannten AMPs (Defensin 1 von *Tribolium castaneum*, Cecropin-like AMP von *Lucilia sericata*, Cecropin A von *Hyalophora cecropia*, Sarcotoxin IA von *Sarcophaga peregrina*, Cecropin A von *Aedes aegypti*, Stomoxyn von *Stomoxys calcitrans*, *Spinigerin* von *Pseudacanthotermes spiniger*, Cecropin von *Galleria mellonella* und Cecropin von *Eristalis tenax*) wurde in einem *in vitro*-Makrophagen-Modell mittels Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay quantifiziert. Sarcotoxin 1C von *Lucilia sericata* wurde aufgrund der, zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente, geringen Verfügbarkeit des Peptids nicht untersucht.

Für die Untersuchungen wurden humane Monozyten aus gepooltem Blut isoliert, differenziert und mit den unter Abschnitt 2.2.1 angegebenen Konzentrationen für entweder 24 h oder 48 h inkubiert. Die Lactatdehydrogenase ist ein in fast allen Zellen physiologisch vorkommendes Enzym, das Bestandteil der Glykolyse ist und das bei Zellschaden freigesetzt wird.

Dem zellfreien Überstand wurde Lactat, oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) zugegeben. Durch einen enzymatischen Prozess entstand das rote Formazan. Die fotochemische Aktivität des Formazans wurde mittels Photometer gemessen. Der Zellschaden korrelierte mit der Bildung des Formazans. Als Vergleich wurden zuvor unbehandelte, vitale *BDMs* mit 10 % Triton X-100 für zehn Minuten inkubiert. Die so entstandene Totallyse galt als 100 %, alle anderen behandelten *BDM* wurden dazu in Bezug

gesetzt. Eine 20 %ige Zytotoxizität galt als kritische Grenze. Im Mittelwert wurde bei allen getesteten AMP eine Zytotoxizität von unter 20 % ermittelt.

Nach 24-stündiger Inkubation mit der MIC von Defensin 1 (12,5 µM) wurde im Mittelwert eine Zytotoxizität von 12,5 % detektiert, wohingegen eine 48-stündige Inkubation zu einer durchschnittlich leicht höheren Zytotoxizität von 14,88 % führte. Sowohl die 24-stündige, als auch die 48-stündige Inkubation mit 6,25 µM Defensin 1 führte im Mittelwert zu einer 12 %igen Zytotoxizität im Vergleich zur Totallyse. Sowohl die 24-stündige, wie auch die 48-stündige Inkubation mit der niedrigsten Konzentration von 3,125 µM führte im Mittelwert zu einer 14 %igen Zytotoxizität. Die maximal beobachtete Zytotoxizität des Defensin 1 betrug 21,5 % nach 24-stündiger (*h*) Inkubation mit 12 µM des AMP, alle anderen Werte lagen unter 20 % (siehe *Figure 2* Publikation 1).

Die MIC (12,5 µM) des Cecropin-like AMP von *Lucilia sericata* führte im Durchschnitt nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer 15,6 %igen- und nach 48-stündiger Inkubation zu einer 17 %igen Zytotoxizität. 6,25 µM des Cecropin-like AMP führte nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls zu einer 15 %igen Zytotoxizität, wohingegen nach 48-stündiger Inkubation im Durchschnitt nur eine 13 %ige Zytotoxizität messbar war. Die Inkubation mit 3,125 µM des AMPs führte nach beiden Inkubationsperioden zu einer durchschnittlichen Zytotoxizität von 14,5 %.

Aufgrund einer zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente herrschenden mangelnden Verfügbarkeit der beiden anderen AMPs aus *Lucilia sericata* (Sarcotoxin 1C und Stomoxyn) wurden hierzu keine Zytotoxizitäts-Messungen durchgeführt.

Cecropin A von *Hyalophora cecropia* führte nach 24-stündiger Inkubation mit der MIC (0,195 µM) im Durchschnitt zu einer 14 %igen Zytotoxizität, eine 48-stündige Inkubation führte zu einer 15 %igen Zytotoxizität. Sämtliche getesteten Konzentrationen (0,195 µM, 0,0975 µM, 0,04875 µM) zeigten im Mittelwert sowohl nach der kurzen (24 *h*) als auch nach der längeren (48 *h*) Inkubationszeit eine Zytotoxizität von unterhalb 20 %. Insgesamt zeigte sich jedoch über alle Beobachtungszeitpunkte eine höhere Standardabweichung im Vergleich zu anderen getesteten AMPs.

Im Mittel betrug die gemessene Zytotoxizität Sarcotoxin IA von *Sarcophaga peregrina* ebenfalls eine Zytotoxizität <20 %. Jedoch konnte auch hier eine erhöhte Standardabweichung beobachtet werden. 0,0975 µM für 24 *h* führte zu einer maximalen 23,78 %igen, die MIC (0,39 µM) führte nach 48 *h* zu einer maximalen 23,83 %igen, 0,195 µM für 48 *h* führte zu einer maximalen 26 %igen Zytotoxizität

Gleiches galt für Cecropin A von *Aedes aegypti*, Cecropin von *Eristalis tenax*, Stomoxyn von *Stomoxys calcitrans* sowie Spinigerin von *Pseudacanthotermes spiniger*. Im Mittelwert lagen alle gemessenen Daten bei allen Konzentrationen (Cecropin A: 0,39 µM, 0,195 µM, 0,0975 µM,

0,048 μM ; Cecropin: 1,56 μM , 0,78 μM , 0,39 μM Stomoxyn und Spinigerin 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM) und bei beiden Inkubationsperioden unter einer 20 %igen Zytotoxizität Die Standardabweichung war insgesamt jedoch größer als bei bspw. dem Defensin 1.

Die Zytotoxizität des Cecropin von *Galleria mellonella* lag bei *BDMs* im Mittelwert ebenfalls bei jeder gemessenen Konzentration (0,195 μM , 0,0975 μM , 0,048 μM) und nach beiden Inkubationsperioden unter 20 %, jedoch wurde auch hier eine erhöhte Standardabweichung gemessen.

Allgemein wiesen alle getesteten AMPs eine geringe Zytotoxizität gegenüber humanen Makrophagen auf. Die Zytotoxizität war sowohl dosis-, als auch zeitabhängig. Zur besseren Abschätzung der Verträglichkeit des sowohl gegen grampositive (*S.p.*) wie auch gramnegative (*M.c.*) Bakterien wirksamen Defensin 1 wurde dessen hämolytische Effekt nachfolgend untersucht.

Hämolyse-Assay mit Defensin 1

Durchführung und Auswertung von Frau Dr. Miray Tonk:

Zusätzlich zum durchgeführten LDH-Assay wurde, wie unter Abschnitt 5.2 beschrieben, ein direkter hämolytischer Effekt von Defensin 1 auf Erythrozyten untersucht. Hierfür wurden Schweine-Erythrozyten mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM) des Defensin 1 für 1 h inkubiert. Mit 10 % Triton X-100 behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle und galten als 100 %ige Lyse. In dH₂O verdünnte Erythrozyten dienten als Negativkontrolle. Selbst bei der höchsten Konzentration von 100 μM zeigte sich nur eine minimale Hämolyse der Erythrozyten (siehe *Figure S2* Publikation 1).

3 Diskussion

Pneumokokken sind weltweit eine der Hauptursachen der ambulant erworbenen Pneumonie, der Meningitis, der Sepsis sowie der Otitis media. Sie haben zunehmend Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen wie den β -Lactam-Antibiotika, den Makroliden, den Lincosamiden und dem Trimethoprim-Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol) entwickelt (Imöhl et al. 2015).

M.c. ist eine der Hauptursachen der Otitis media im Kindesalter sowie von Infektexazerbationen bei Erwachsenen mit COPD. Seltener ist *M.c.* ursächlich für Pneumonien oder Bakteriämien und weist in 90 % der Fälle eine Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika auf (Murphy und Parameswaran 2009).

Die zunehmende Entwicklung von Antibiotikaresistenzen aggraviert die Dringlichkeit der Suche nach alternativen antimikrobiell wirksamen Substanzen. Studien der letzten Jahrzehnte wiesen auf das Potential der AMPs in der Therapie bakterieller Infektionen hin. Arbeiten zu verschiedenen AMPs zeigten deren antimikrobiellen Effekt gegen sowohl grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *E. faecalis*, wie auch gramnegative Bakterien wie *E. coli* (Hirsch et al. 2019; Mensa et al. 2014).

In dieser Studie wurden 23 synthetisch hergestellte Insekten-AMP-Analoga aus drei unterschiedlichen Klassen, den Cystein-reichen Peptiden (bspw. Defensin 1), den α -helikalen Peptiden (bspw. Cecropin, Sarcotoxin, Stomoxyn) und den Prolin-reichen Peptiden (bspw. Apidaecin, Drosocin, Lebocin, Metchnikowin, Formaecin, Pyrrhocoricin, Metalnikowin) (siehe Tabelle 1) untersucht und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf das grampositive Bakterium *S.p.* und das gramnegative Bakterium *M.c.* analysiert. Diese Peptide wurden aufgrund ihrer Charakterisierung in vorangegangenen Studien sowie der Möglichkeit synthetisch hergestellt zu werden, ausgewählt (Pöppel et al. 2015; Tonk et al. 2015; Jayamani et al. 2015). Alle untersuchten Peptide gehörten zur Gruppe der kationischen AMP.

Die Mehrheit der bisher publizierten AMP-Studien zu *S.p.* nutzten Bakterienkulturen oder Maus-Modelle (Le et al. 2016). Ebenso untersuchten die Mehrheit der AMP-Studien zu *M.c.* AMPs in Bakterienkulturen. Daten über die Wirksamkeit von Insekten-AMPs gegenüber *M.c.* und *S.p.* wurden bislang noch nicht publiziert (Lee et al. 2004).

Defensin 1:

Nur das Defensin 1 von *Tribolium castaneum* zeigte sowohl einen Effekt auf das Wachstum von *S.p.* und ein multiresistentes klinisches Pneumokokkenisolat (resistent gegen Penicillin, Cefotaxim, Clindamycin und Tetracyclin), als auch auf das Wachstum von *M.c.*. Diese Wirkung erwies sich als dosisabhängig und gegenüber *S.p.* als bakterizid, wohingegen die Daten eine bakteriostatische Wirkung gegenüber *M.c.* nahelegen. Der Grund für die unterschiedliche Wirkung von Defensin 1 auf diese Bakterien bleibt Bestandteil weiterer Untersuchungen. Eine Ursache könnte die unterschiedliche Beschaffenheit der Bakterienmembran von grampositiven und gramnegativen Bakterien sein. Da grampositive Bakterien nur

über eine zytoplasmatische Membran verfügen, könnte es bereits durch die Zerstörung dieser zu einer Lyse der Keime kommen, wohingegen die zusätzliche Membran von gramnegativen Bakterien diesen Schutz bieten könnte.

Defensin 1 ist eines von drei im Genom des Rotbraunen Reismehlkäfers (*Tribolium castaneum*) identifizierten Defensinen. Es wird durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems induziert und in die Hämolymphe sezerniert (Altincicek et al. 2008). Defensine gehören zu den Cystein-reichen Peptiden und das hier genutzte Defensin zählt aufgrund der Position der Cystein-Verknüpfungen durch Disulfidbrücken zu den β -Defensinen (Ganz 2003). Untersuchungen zeigten, dass die meisten Invertebraten-Defensine grampositive (Tonk et al. 2015), einzelne auch gramnegative Bakterien (Wilmes und Sahl 2014) abtöten. Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine schwächere Wirksamkeit gegenüber den untersuchten gramnegativen Erregern (*M.c.* und *E. coli*). Die im Defensin 1 enthaltenen Disulfidbrücken erhöhen die Stabilität des AMPs und schützen es vor einem frühzeitigen Abbau. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die β -Faltblatt-Struktur des Defensins dessen Stabilität bei Kontakt mit der Bakterienwand erhöht und dessen porenbildende Wirkung erleichtert (Yeaman und Yount 2003).

Defensin 1 besitzt als einziges der hier getesteten Moleküle sowohl Disulfidbrücken wie auch eine β -Faltblatt-Struktur und verfügt somit über eine besondere Stabilität. Diese Tatsache könnte dessen antibakterielle Aktivität gegen *S.p.* und *M.c.* erklären.

Gefürchtete Nebeneffekte der Antibiotikatherapie sind, neben der Entstehung von multiresistenten Keimen, die Entstehung von Antibiotika-assoziierten Kolitiden. Diese Kolitiden sind unter anderem Folge der Abtötung von Kommensalen wie *E. coli* oder *E. faecalis* und somit Folge der Schädigung der natürlichen Darmflora. Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Wirksamkeit des Defensin 1 auf die Kommensalen *E. coli* und *E. faecalis* untersucht. Defensin 1 zeigte nur einen geringen wachstumshemmenden Effekt auf *E. faecalis* und keinen wachstumshemmenden Effekt auf *E. coli*.

Bereits publizierte Ergebnisse über die Wirksamkeit von Defensin 1 aus *Tribolium castaneum* gegen grampositive Bakterien (Tonk et al. 2015) können somit durch die Resultate dieser Arbeit auf einzelne gramnegative Erreger erweitert werden.

Da konventionelle Antibiotika häufig neben der Abtötung der Bakterien durch die Freisetzung von Zellwandbestandteilen (LPS bei gramnegativen Bakterien und Lipoteichonsäure (LTA) bei grampositiven Bakterien) (Hof et al. 2019) zu einer erhöhten Aktivierung des Immunsystems und in schweren Fällen zu einer Sepsis führen (Dickson und Lehmann 2019), ist es von Interesse ein Medikament zu entwickeln, welches sowohl antibakteriell, als auch antiinflammatorisch wirksam ist. Es sind bereits antibakterielle Therapien bekannt, die zusätzlich anti-inflammatorisch wirksam sind, wie bspw. die Makrolid-Therapie (Porter et al. 2016). Erste Studien zu Säugetier-AMPs in Sepsis-Maus-Modellen konnten für diese einen antibakteriellen sowie antiinflammatorischen Effekt aufzeigen (Hu et al. 2016). Jedoch können

antibakterielle Therapien ebenso zur Aktivierung des Immunsystems führen (bspw. bei der Auslösung der Jarisch-Herxheimer-Reaktion) (Butler 2017).

In der Zellkultur wurde beobachtet, dass einzelne Insekten-AMPs Einfluss auf die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplexe-II (engl. *major histocompatibility complex (MHC)*) von humanen Makrophagen und somit auf die Immunantwort dieser haben, ohne immunmodulatorisch auf Monozyten und dendritische Zellen zu wirken (Tavano et al. 2011). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Expression und Freisetzung von Zytokinen nach Defensin 1-Zugabe in einem *in vitro*-Makrophagen-Modell mittels *qRT-PCR* und Multiplex-*ELISA* untersucht.

Allgemein zeigte sich keine Zytokin-Induktion durch die alleinige Zugabe von Defensin 1 *BDM*. Eine Ausnahme bildeten die Zytokine IL-8, IL-10, *MIP-1- α* und *MCP-1*, welche im Makrophagen-Modell nach Zugabe von Defensin 1 eine leicht erhöhte Sekretion aufwiesen. Da es sich hierbei sowohl um pro- (IL-8, *MIP-1- α* , *MCP-1*), als auch um ein anti-inflammatorisches (IL-10) Zytokin handelt, lässt sich weder auf einen rein pro- noch auf einen anti-inflammatorischen Effekt des AMPs schließen. Des Weiteren führte die Behandlung mit Defensin 1 1 h nach steriler Stimulation (mit 10 ng/mL TNF- α) der *BDM* zwar in der Tendenz zu einer verminderten *mRNA*-Expression von TNF- α , diese Beobachtung erwies sich jedoch als nicht signifikant. Diese Testungen lassen vermuten, dass Defensin 1 keine allgemein anti-inflammatorische Wirkung zugesagt werden kann.

Zusätzlich wurde der Effekt von Defensin 1 auf durch *S.p.* infizierte *BDMs* untersucht. *S.p.* wird via zellmembranständiger (*TLR2*, *TLR4*) wie auch intrazellulärer (*NLRP3*, *TLR9*, *NOD2*) Rezeptoren erkannt und mit Hilfe der Induktion von IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-6, IL-12 und IL-23 durch das Immunsystem bekämpft (Koppe et al. 2012). Die Behandlung von mit *S.p.* infizierten Makrophagen mit Defensin 1 (*MIC* von 12,5 μ M und 6,25 μ M) führte zu einer signifikant verminderten IL-1 β - und IL-8-*mRNA*-Expression im Vergleich zur AMP-freien, aber infizierten Kontrolle.

Des Weiteren wurde die Zytokin-Sekretion der *BDM* via Multiplex-*ELISA* untersucht. Die Zugabe von Defensin 1 zu durch *S.p.* infizierte *BDMs* reduzierte signifikant die Sekretion der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70 und IL-23 im Vergleich zu den infizierten, AMP-freien *BDMs*. Dieser Effekt war zeit- und dosisabhängig. Dies ist am ehesten auf eine allgemein verminderte Zytokin-Induktion durch die geringere Pneumokokkenlast nach effizienterer Abtötung von *S.p.* durch Defensin 1 zurück zu führen, sodass es zu einer geringeren Stimulation der Makrophagen und somit zu einer allgemein verminderten Zytokin-Sekretion kommt.

Anders als bei der *qRT-PCR* konnte im Multiplex-*ELISA* keine verminderte Freisetzung von IL-8 aus infizierten *BDM* nach Behandlung mit Defensin 1 beobachtet werden. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass sich Änderungen auf *mRNA*-Ebene zeitlich früher detektieren lassen als Veränderungen der Zytokin-Sekretion. Des Weiteren ergab sich der Verdacht, dass es für einzelne Zytokine (bspw. *MIP-*

1- α) nur eine kleine Spannbreite für den Effekt von Defensin 1 gibt. Defensin 1 führte zu keiner reduzierten *MIP-1- α* -Freisetzung bei zu hoher Infektionsdosis (*MOI* 10) und zu langer Infektionsdauer (Behandlung 5 h *p.i.*). Zytokine, die untersucht wurden, bei denen es jedoch zu keiner signifikanten Verminderung der Sekretion durch Defensin 1 kam, waren *LAP*, *MCP-1* und *IL-8*.

Die Zytokin-*mRNA*-Expression und Zytokin-Sekretion aus *BDMs* nach *M.c.*-Infektion oder LPS-Stimulation und Therapie mit Defensin 1 im *in vitro*-Makrophagen-Modell wurde analysiert. Sowohl im Maus-Modell als auch in Zellkultur konnte bereits für Säugetier- (Hu et al. 2016) und Insekten-AMPs (Nam et al. 2012) gezeigt werden, dass einzelne Peptide unter anderem durch die Neutralisierung von LPS die Aktivierung und den Zelltod von Makrophagen und Epithelzellen verhindern. Aus diesem Grund untersuchten wir ebenfalls den Einfluss von Defensin 1 auf mit LPS-stimulierte *BDM*. Wie zuvor nach Infektion mit *S.p.*, konnte auch nach Therapie mit Defensin 1 von mit *M.c.*-infizierten Makrophagen eine reduzierte *IL-1 β* - und *IL-8-mRNA*-Expression im Vergleich zur infizierten, AMP-freien Kontrolle detektiert werden. Zusätzlich führte Defensin 1 zur Reduktion der bakterieninduzierten Freisetzung der Zytokine *IL-1 β* , *IL-10*, *IL-12p70* und *IL-23* im Multiplex-*ELISA* im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Makrophagen. Die Zytotoxizität von Defensin 1 bei Inkubation mit *BDMs* sowie dessen hämolytische Aktivität wurde ebenfalls untersucht. Dabei konnte keine relevante Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die ein AMP beschreibt, welches gegen *S.p.*, einen multiresistenten Pneumokokkensstamm und *M.c.* wachstumsmindernd (*S.p.* bakterizid; *M.c.* bakteriostatisch) wirksam ist, ohne einen nennenswerten zytotoxischen Effekt, noch eine proinflammatorische Wirkung zu zeigen. Die Ergebnisse zur LPS-Stimulation sowie der beschriebene größere Effekt bei hoher Infektionsdosis legen nahe, dass die reduzierte Zytokin-Bildung nach Defensin 1-Therapie aus der geringeren Bakterienlast nach AMP-Therapie resultiert. Diesen Eindruck stützend ist die Beobachtung, dass eine frühe Behandlung vorteilhaft für eine Unterbindung einer proinflammatorischen Reaktion ist. Unsere Daten legen nahe, dass durch *S.p.* oder *M.c.* ausgelöste Atemwegsinfekte, wie die Pneumonie oder Infektexazerbationen bei COPD, mit Defensin 1 therapiert werden könnten ohne die natürliche Darmflora zu schädigen. Somit könnte das Risiko für Antibiotika-assoziierte Kolitiden reduziert und eine unerwünschte Arzneimittelwirkung von Antibiotika-Therapien vermieden werden.

Sarcotoxin 1C:

Insgesamt wurde bei elf der getesteten AMPs ein wachstumshemmender Effekt gegen *M.c.* ermittelt. Aufgrund der besten Kombination aus antibakterieller Wirksamkeit und geringer Zytotoxizität wurde Sarcotoxin 1C aus *Lucilia sericata* für weitere Untersuchungen ausgewählt. Sarcotoxin 1C zeigte bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als Defensin 1 (*MIC* von 12,5 μ M) eine wachstumshemmende Wirkung auf *M.c.* (*MIC* von Sarcotoxin 1C=0,39 μ M).

Sarcotoxin 1C aus der Goldfliege (*Lucilia sericata*) hat eine lineare α -helikale Struktur, besitzt keine Disulfidbrücken und wird in die Speicheldrüse des Insekts sezerniert (Pöppel et al. 2015). Studien zu dieser AMP-Klasse legen nahe, dass es nach Penetration der zytoplasmatischen Membran durch die Störung des Protonengradienten bakterizid gegen gramnegative wie auch grampositive Bakterien wirksam ist (Okada und Natori 1985).

Der Nutzen von Maden in der Wundversorgung wurde bereits im 16. Jahrhundert durch den französischen Chirurgen Ambroise Paré publiziert. Beschreibungen hierzu reichen zurück bis in die Antike und der Einsatz von *Lucilia sericata* bei nekrotischen Wunden ist auch heute noch bekannt (Bazaliński et al. 2019). Zusätzlich zum Wunddébridement durch die Made zeigten Studien, dass die von *Lucilia sericata* in den Speichel abgesonderten Stoffe einen wachstumshemmenden Effekt auf verschiedene Bakterien, darunter *E. coli*, haben (Kaihanfar et al. 2018). Die genauere Spezifizierung der verschiedenen AMPs aus *Lucilia sericata* wies auf die wachstumshemmende Wirkung von Sarcotoxin 1C bei *E. coli* hin (Pöppel et al. 2015). Die Testung dieses AMPs auf die Erreger *S.p.* und *M.c* erfolgte erstmalig in der hier vorliegenden Arbeit. Zusätzlich wurde der Effekt auf die Kommensalen *E. coli* und *E. faecalis* untersucht. Dabei zeigte sich zusätzlich zur Wirkung auf *M.c.* ein dosisabhängiger Effekt auf *E. coli*, nicht jedoch auf *E. faecalis*. Dies weist auf eine insgesamt bessere Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Erregern hin.

Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnis aus der von Pöppel et al. publizierten Studie (Pöppel et al. 2015). In der Arbeit von Hirsch et al. (Hirsch et al. 2019) zeigte Sarcotoxin 1C sowohl gegen *Candida albicans* antifungale Aktivität, als auch eine 90 %ige Wachstumsreduktion klinischer multiresistenter Isolate von *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* und *Salmonella enterica*. Ebenfalls führte Sarcotoxin 1C im Maus-Modell bei einer Dosis von 10 mg/kg/KG zu keiner Zytotoxizität oder Kardiotoxizität. Die pharmakologische Testung mit humanem Plasma ergab eine Stabilität von 1 h.

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse weist auf die gute Verträglichkeit und Wirksamkeit von Sarcotoxin 1 C vornehmlich gegen gramnegative, dabei jedoch auch gegen multiresistente Keime hin. Die geringe Zytotoxizität von Sarcotoxin 1C *in vivo* wurde bereits beschrieben (Hirsch et al. 2019). Bei einer möglichen Applikation wäre ein eventueller schädlicher Einfluss auf die Darmflora zu berücksichtigen.

Resistenzentwicklung gegen AMPs:

Studien zeigen, dass, obwohl über lange Zeit keine Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber AMPs beobachtet wurde, einzelne Bakterien Resistenzen entwickeln (Habets und Brockhurst 2012). Beobachtete Mechanismen sind die Ausbildung einer Polysaccharidkapsel, die Bildung von AMP-bindenden Proteinen (Moravej et al. 2018) oder die Änderung anderer chemischer Zellwandkomponenten, wodurch es zur Reduktion der negativen Ladung der Membran und somit zur Reduktion der Affinität gegenüber den AMPs kommt (Campos et al. 2004; LaRock und Nizet 2015). Da

S.p. über eine Polysaccharidkapsel verfügt, in unserer Arbeit jedoch sensibel auf Defensin 1 reagiert hat, scheint dieser Schutzmechanismus keinen Effekt auf die Wirksamkeit von Defensin 1 zu haben. Andererseits könnte die Polysaccharidkapsel von *S.p.* Grund für die Wirkungslosigkeit der anderen getesteten AMPs, einschließlich Sarcotoxin 1 C, sein. Um diesen Verdacht zu bestätigen, sollten Untersuchungen mit Pneumokokken ohne Polysaccharidkapsel durchgeführt werden.

Untersuchungen ergaben, dass Enterokokken gegenüber einem weiten Spektrum an AMPs resistent sind (Yeaman und Yount 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch ein geringerer wachstumsmindernder Effekt durch Defensin 1. Somit könnte es sich hierbei um eines der wenigen AMPs handeln, welches gegen Enterokokken Anwendung finden könnte.

Oben genannten Studie (Habets und Brockhurst 2012) weist auf die Möglichkeit der Entstehung von Kreuzresistenzen gegenüber humanen AMPs hin, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu applizierten AMPs aufweisen. Dadurch könnten resistente Bakterien, zusätzlich zur Resistenz gegen das Therapeutikum, unempfindlich gegenüber Teilen des angeborenen humanen Immunsystems werden. Aus diesem Grund sind strukturelle Unterschiede zu humanen AMPs ein mögliches Kriterium bei der Entwicklung einer AMP-Therapie. Da bspw. die Cystein-Verknüpfungen in Insekten-Defensinen an anderen Stellen als bei Vertebraten-Defensinen bestehen (Moravej et al. 2018), könnten Insekten-AMPs, insbesondere Defensine wie das hier untersuchte Defensin 1, dafür eine mögliche Ressource bilden. Im Vergleich zu Colistin zeigte Sarcotoxin 1C *in vitro* bei *E. coli* keine Tendenz zur Resistenzentwicklung (Hirsch et al. 2019).

Limitationen:

Limitationen dieser Studie sind zum einen die Verwendung einer Zellkultur. Der Vorteil des Gebrauchs primärer Zellen gegenüber Tiermodellen liegt bei diesem humanrelevanten Modell in einer besseren Vergleichbarkeit der Mechanismen des Immunsystems. Es muss jedoch beachtet werden, dass ein Zellkultur-Modell ein künstliches System darstellt, welches *in vivo* Bedingungen nur annäherungsweise imitiert (Acosta Davila und Hernandez De Los Rios 2019), da verschiedene Einflussfaktoren (bspw. Zell-Zell-Interaktionen (Bissonnette et al. 2020)) fehlen. Die Verwendung von *BDMs* bietet zwar aufgrund der Varianz der Spender den Vorteil auf mögliche Effekte innerhalb der Population besser rückschließen zu können, andererseits erschwert es die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. *BDMs* weisen noch den weiteren Nachteil auf, dass das Spenderblut trotz aufwendiger Testungen kontagiös sein könnte und eine geringe Ausbeute nach Zellisolation erreicht werden kann. Zusätzlich ist zu bedenken, dass humane Makrophagen sich von Alveolarmakrophagen unterscheiden und nicht den primären Infektionsort bei pulmonaler Infektion widerspiegeln. Weitere Limitationen sind, dass Defensin 1 und Sarcotoxin 1C nur

hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen vier Bakterienarten untersucht wurden und für die weitere Entwicklung zu einem potentiellen Medikament Daten zu weiteren Bakterien fehlen.

Ausblick:

Für die Entwicklung eines antibakteriell wirksamen Medikaments müsste ein ideales AMP eine hohe antibakterielle Aktivität (niedrige *MIC*), eventuell verbunden mit einem immunmodulatorischen Effekt, keine Zelltoxizität, keine hämolytische Aktivität, keine Entwicklung von Resistenzen und eine Halbwertszeit von mehreren Stunden im Anwendungsgebiet aufweisen. Im Anschluss an die Entwicklung eines solchen idealen Peptids müssten mögliche Applikationsformen analysiert werden.

Der erste Punkt der antibakteriellen Wirkung wurde in dieser Arbeit bereits für Defensin 1 und Sarcotoxin 1C bezüglich *S.p.* (sensibel und resistent), *M.c.*, *E. coli* und *E. faecalis* thematisiert. Um eine genauere Aussage zum Wirkspektrum von Defensin 1 und Sarcotoxin 1C treffen zu können, fehlen Daten zu weiteren Erregern. Dabei sollte ebenfalls die Wirkung gegenüber weiteren multiresistenten Erregern untersucht werden. Da Vancomycin-resistente Enterokokken und Carbapenem-resistente Enterobakterien von der WHO auf der Liste zur „Priorisierung von Krankheitserregern zur Entdeckung neuer Antibiotika“ (World Health Organisation 2017a) aufgeführt wurden, bieten sich diese für weitere Experimente an. Ein signifikanter immunmodulatorischer Effekt von Defensin 1 auf *BDMs* konnte nicht beobachtet werden. Hinsichtlich Sarcotoxin 1C fehlen diesbezügliche Daten. Für weiterführende Untersuchungen bietet sich hierzu das bereits in dieser Arbeit etablierte Makrophagen-Modell an. Zusätzlich wäre von Interesse, ob eines der beiden hier näher beschriebenen AMPs LPS-bindende oder neutralisierende Effekte aufweist. Für weitere Untersuchungen hierzu bietet sich bspw. ein Limulus Amöbozyten-Lysat-Assay an.

Die zweite Anforderung, die Zelltoxizität und die hämolytische Aktivität, wurden hinsichtlich Defensin 1 ebenfalls *in vitro* untersucht und als gering festgelegt. Es bleibt jedoch die Frage nach den Auswirkungen von Defensin 1 *in vivo* bestehen. Aus diesem Grund könnte sich in folgenden Studien eine Untersuchung im Maus-Modell anschließen. *In vitro* wie auch *in vivo* zeigte sich für Sarcotoxin 1C keine Zytotoxizität noch Kardiotoxizität im Maus-Modell (Hirsch et al. 2019). Auch wenn die meisten AMPs ihre Wirkung durch die elektrostatische Interaktion mit der negativ-geladenen Zellwand prokaryotischer Zellen entfalten und somit nicht zytotoxisch auf humane Zellen wirken sollten (Hancock und Sahl 2006), bleibt die Frage nach einer etwaigen Toxizität bei systemischer Anwendung bestehen und erfordert ebenfalls weitergehende Studien. Die Resistenzentwicklung von AMPs wurde bereits unter „Resistenzentwicklung von AMPs“ diskutiert. Weitere Testungen hierzu bieten sich ebenfalls zukünftig an.

Der letzte zu erörternde Punkt ist die ausreichende Halbwertszeit der AMPs nach Applikation. Hindernisse hierbei sind ihre Anfälligkeit gegenüber Proteasen, ihre geringe Bioverfügbarkeit (Shen et al.

2018) sowie ihre verminderte antibakterielle Aktivität bei Kontakt mit humanem Serum (Maisetta et al. 2008). Mögliche Lösungsansätze könnten bspw. in Anlehnung an AMPs entwickelte kationische, amphiphile Polymere sein, welche eine höhere Stabilität gegenüber Proteasen aufweisen und leichter synthetisch herzustellen sind (Shen et al. 2018). Ein weiterer Lösungsansatz, welcher nicht nur die Verhinderung des frühzeitigen Abbaus durch Proteasen, sondern zusätzlich eine gezielte Freisetzung der AMPs am Zielort ermöglichen könnte, wäre die direkte Bindung eines Polyethylenglycol (PEG)-Moleküls an den Wirkstoff (sog. PEGylierung) wie es in einem Patentantrag von 2016 beschrieben wurde (Hoffmann R. et al. 2016). Eine Reihe von Studien beschrieben die Fähigkeit von im humanen Serum enthaltenen physiologischen Salzkonzentrationen (bspw. von Natriumchlorid), die Aktivität von AMPs herab zu setzen (Maisetta et al. 2008). Da in dieser Arbeit zur Verdünnung der AMPs im CFU-Assay PBS genutzt wurde, welches nahezu die physiologische Kochsalzmenge (0,8 % NaCl) enthält und trotzdem eine hohe antibakterielle Aktivität nachgewiesen wurde, kann von keinem relevanten wirkungsmindernden Effekt ausgegangen werden. Die Verbesserung der Serumstabilität von AMPs ist weiterhin Bestandteil aktueller Forschungen (Knappe et al. 2010).

Nach Klärung der genannten Punkte stellt sich die Frage nach einer möglichen Applikationsform der Peptide. Klinische Studien untersuchten unter anderem die topische Anwendung anderer AMPs (Giles et al. 2003). Für die Anwendung von Pexiganan-Creme bei infizierten diabetischen Fuß-Ulcera konnte eine mit einer systemischen Antibiotika-Therapie vergleichbare Wirksamkeit nachgewiesen werden (Dumville et al. 2017; Lipsky et al. 2008). Studien zur systemischen Anwendung anderer AMPs konnten bisher keinen Vorteil im Vergleich zum Placebo zeigen (Levin et al. 2000).

Da die beiden in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Erreger (*S.p.* und *M.c.*) primär Atemwegsinfekte hervorrufen, wäre als mögliche Applikationsform die Inhalation der Peptide von besonderem Interesse. Durch die so erreichte primär lokale Anwendung könnten mögliche systemische Nebenwirkungen minimiert werden. Erste Studien analysierten bereits die Inhalation von AMPs gegen *Mycobacterium tuberculosis* (Kwok et al. 2015) sowie die Kopplung von AMPs an Nanopartikel in einem Maus-Modell zur Inhalation gegen *Pseudomonas aeruginosa* (Falciani et al. 2020). Eine weitere Anwendungsform könnte die Beschichtung von Implantaten mit AMPs sein.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein aus Insekten stammendes AMP (Defensin 1 aus *Tribolium castaneum*) beschrieben werden, welches sowohl gegen ein *S.p.* (sensibel und resistent) und *M.c.* wirksam war, ohne einen schädlichen Einfluss auf die Kommensalen *E. faecalis* und *E. coli* zu haben. Verbunden mit einer hier nachgewiesenen geringen Toxizität könnte Defensin 1 als Grundlage für die Entwicklung neuer spezifischer Medikamente dienen. Ebenso können die *in vitro* gewonnen Erkenntnisse zu Sarcotoxin 1 genutzt werden, um die Ausbreitung von Bakterien im menschlichen Körper zu verhindern.

4 Literaturverzeichnis

- Acosta Davila, John Alejandro; Hernandez De Los Rios, Alejandro (2019): An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of *Toxoplasma gondii* and Other Apicomplexan Parasites. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9, S. 24. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00024.
- Altincicek, Boran; Knorr, Eileen; Vilcinskas, Andreas (2008): Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. In: *Developmental and comparative immunology* 32 (5), S. 585–595. DOI: 10.1016/j.dci.2007.09.005.
- Augustyniak, Daria; Sereďyński, Rafał; McClean, Siobhán; Roszkowiak, Justyna; Roszniowski, Bartosz; Smith, Darren L. et al. (2018): Virulence factors of *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles are major targets for cross-reactive antibodies and have adapted during evolution. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 4955. DOI: 10.1038/s41598-018-23029-7.
- Baggiolini, Marco; Clark-Lewis, Ian (1992): Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. In: *FEBS Letters* 307 (1), S. 97–101. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80909-z.
- Bazaliński, Dariusz; Kózka, Maria; Karnas, Magdalena; Więch, Paweł (2019): Effectiveness of Chronic Wound Debridement with the Use of Larvae of *Lucilia Sericata*. In: *Journal of clinical medicine* 8 (11). DOI: 10.3390/jcm8111845.
- Bissonnette, Elyse Y.; Lauzon-Joset, Jean-François; Debley, Jason S.; Ziegler, Steven F. (2020): Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 583042. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583042.
- Boparai, Jaspreet Kaur; Sharma, Pushpender Kumar (2020): Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. In: *Protein and peptide letters* 27 (1), S. 4–16. DOI: 10.2174/0929866526666190822165812.
- Boswell, Sandra; Sharif, Shayan; Alisa, Akeel; Pereira, Stephen P.; Williams, Roger; Behboudi, Shahriar (2011): Induction of latency-associated peptide (transforming growth factor- β (1)) expression on CD4+ T cells reduces Toll-like receptor 4 ligand-induced tumour necrosis factor- α production in a transforming growth factor- β -dependent manner. In: *Immunology*, S. 278–287. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03425.x.
- Butler, Thomas (2017): The Jarisch-Herxheimer Reaction After Antibiotic Treatment of Spirochetal Infections: A Review of Recent Cases and Our Understanding of Pathogenesis. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96 (1), S. 46–52. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0434.
- Campos, Miguel A.; Vargas, Miguel A.; Regueiro, Verónica; Llompert, Catalina M.; Albertí, Sebastián; Bengoechea, José A. (2004): Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. In: *Infection and immunity* 72 (12), S. 7107–7114. DOI: 10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004.
- Cherazard, Regine; Epstein, Marcia; Doan, Thien-Ly; Salim, Tanzila; Bharti, Sheena; Smith, Miriam A. (2017): Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. In: *American journal of therapeutics* 24 (3), e361-e369. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000551.

- Cilloniz, Catia; Martin-Loeches, Ignacio; Garcia-Vidal, Carolina; San Jose, Alicia; Torres, Antoni (2016): Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. In: *International journal of molecular sciences* 17 (12). DOI: 10.3390/ijms17122120.
- Dathe, Margitta; Nikolenko, Heike; Meyer, Jana; Beyermann, Michael; Bienert, Michael (2001): Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. In: *FEBS Letters* 501 (2-3), S. 146–150. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02648-5.
- Derraik, Jose G. B.; Heath, Allen C. G.; Rademaker, Marius (2010): Human myiasis in New Zealand: imported and indigenously-acquired cases: the species of concern and clinical aspects. In: *The New Zealand medical journal* 123 (1322), S. 21–38.
- Deshmane, Satish L.; Kremlev, Sergey; Amini, Shohreh; Sawaya, Bassel E. (2009): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29 (6), S. 313–326. DOI: 10.1089/jir.2008.0027.
- Dickson, Kayle; Lehmann, Christian (2019): Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. In: *International journal of molecular sciences* 20 (18). DOI: 10.3390/ijms20184341.
- Dinarelli, Charles A. (2007): Historical insights into cytokines. In: *European journal of immunology* 37 Suppl 1, S34-45. DOI: 10.1002/eji.200737772.
- Dumville, Jo C.; Lipsky, Benjamin A.; Hoey, Christopher; Cruciani, Mario; Fison, Marta; Xia, Jun (2017): Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 6, CD011038. DOI: 10.1002/14651858.CD011038.pub2.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2019): Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. Country summaries-AER-EARS-Net 202019. Hg. v. European Centre for Disease Prevention and Control.
- Fábián, Tibor Károly; Hermann, Péter; Beck, Anita; Fejérdy, Pál; Fábián, Gábor (2012): Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. In: *International journal of molecular sciences* 13 (4), S. 4295–4320. DOI: 10.3390/ijms13044295.
- Fajgenbaum, David C.; June, Carl H. (2020): Cytokine Storm. In: *The New England journal of medicine* 383 (23), S. 2255–2273. DOI: 10.1056/NEJMra2026131.
- Falciani, Chiara; Zevoloni, Fabrizia; Brunetti, Jlenia; Riolo, Giulia; Gracia, Raquel; Marradi, Marco et al. (2020): Antimicrobial Peptide-Loaded Nanoparticles as Inhalation Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. In: *International journal of nanomedicine* 15, S. 1117–1128. DOI: 10.2147/IJN.S218966.
- Fales-Williams, A. J.; Brogden, K. A.; Huffman, E.; Gallup, J. M.; Ackermann, M. R. (2002): Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. In: *Veterinary pathology* 39 (6), S. 706–711. DOI: 10.1354/vp.39-6-706.
- Gagnière, Johan; Raisch, Jennifer; Veziat, Julie; Barnich, Nicolas; Bonnet, Richard; Buc, Emmanuel et al. (2016): Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. In: *World journal of gastroenterology* 22 (2), S. 501–518. DOI: 10.3748/wjg.v22.i2.501.
- Ganz, Tomas (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (9), S. 710–720. DOI: 10.1038/nri1180.

Giles, Francis J.; Miller, Carole B.; Hurd, David D.; Wingard, John R.; Fleming, Thomas R.; Sonis, Stephen T. et al. (2003): A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational trial of iseganan for the prevention of oral mucositis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy (PROMPT-CT trial). In: *Leukemia & lymphoma* 44 (7), S. 1165–1172. DOI: 10.1080/1042819031000079159.

Gomes, Tânia A. T.; Elias, Waldir P.; Scaletsky, Isabel C. A.; Guth, Beatriz E. C.; Rodrigues, Juliana F.; Piazza, Roxane M. F. et al. (2016): Diarrheagenic Escherichia coli. In: *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, S. 3–30. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.015.

Guha, Mausumee; Mackman, Nigel (2001): LPS induction of gene expression in human monocytes. In: *Cellular Signalling* 13 (2), S. 85–94. DOI: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2.

Habets, Michelle G. J. L.; Brockhurst, Michael A. (2012): Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. In: *Biology letters* 8 (3), S. 416–418. DOI: 10.1098/rsbl.2011.1203.

Hämäläinen, N. (2016): S3-Leitlinie Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention – Update 2016 Leitlinie. Hg. v. r Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Paul Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie, des.

Hancock, Robert E. W.; Sahl, Hans-Georg (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. In: *Nature biotechnology* 24 (12), S. 1551–1557. DOI: 10.1038/nbt1267.

Hao, Liyuan; Shan, Qiang; Wei, Jingya; Ma, Fengtao; Sun, Peng (2019): Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications. In: *Current protein & peptide science* 20 (2), S. 139–144. DOI: 10.2174/1389203719666180514150921.

Hirsch, Rolf; Wiesner, Jochen; Marker, Alexander; Pfeifer, Yvonne; Bauer, Armin; Hammann, Peter E.; Vilcinskas, Andreas (2019): Profiling antimicrobial peptides from the medical maggot *Lucilia sericata* as potential antibiotics for MDR Gram-negative bacteria. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 74 (1), S. 96–107. DOI: 10.1093/jac/dky386.

HIRSCH, J. G. (1956): Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 103 (5), S. 589–611. DOI: 10.1084/jem.103.5.589.

Hof, Herbert; Schlüter, Dirk; Dörries, Rüdiger (2019): *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Hoffmann R. et al. (2016): Modified antibiotic peptides having variable systemic release. Patent-No: US 9,387,255 B2. Unter Mitarbeit von Friederike Nollmann Nicole Berthold. Hg. v. United States Patent. Universitaet Leipzig. Online verfügbar unter <https://patentimages.storage.googleapis.com/87/08/8c/7e7c0ba8063e71/US9387255.pdf>, zuletzt geprüft am 22.02.2021.

Hu, Zhongshuang; Murakami, Taisuke; Suzuki, Kaori; Tamura, Hiroshi; Reich, Johannes; Kuwahara-Arai, Kyoko et al. (2016): Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. In: *International immunology* 28 (5), S. 245–253. DOI: 10.1093/intimm/dxv113.

- Huang, Susan S.; Hinrichsen, Virginia L.; Stevenson, Abbie E.; Rifas-Shiman, Sheryl L.; Kleinman, Ken; Pelton, Stephen I. et al. (2009): Continued impact of pneumococcal conjugate vaccine on carriage in young children. In: *Pediatrics* 124 (1), e1-11. DOI: 10.1542/peds.2008-3099.
- Imöhl, Matthias; Reinert, Ralf René; van der Linden, Mark (2015): Antibiotic susceptibility rates of invasive pneumococci before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccination in Germany. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 305 (7), S. 776–783. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.08.031.
- Jayamani, Elamparithi; Rajamuthiah, Rajmohan; Larkins-Ford, Jonah; Fuchs, Beth Burgwyn; Conery, Annie L.; Vilcinskis, Andreas et al. (2015): Insect-derived cecropins display activity against *Acinetobacter baumannii* in a whole-animal high-throughput *Caenorhabditis elegans* model. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (3), S. 1728–1737. DOI: 10.1128/AAC.04198-14.
- Kaihanfar, Maryam; Momeni-Moghaddam, Madjid; Moghaddam, Mohammad Javad Mehdipour; Hajar, Toktam; Pak, Vahab Dast; Bidi, Jalal Omrani (2018): Investigation of antimicrobial effects of treated *Lucilia sericata* larvae extract on bacteria. In: *Iranian Journal of Microbiology* 10 (6), S. 409–416.
- Kang, Hee-Kyoung; Kim, Cheolmin; Seo, Chang Ho; Park, Yoonkyung (2017): The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 55 (1), S. 1–12. DOI: 10.1007/s12275-017-6452-1.
- Kaper, James B. (2005): Pathogenic *Escherichia coli*. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 295 (6-7), S. 355–356. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.008.
- Khan, Imroze; Prakash, Arun; Agashe, Deepa (2016): Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. In: *Ecology and evolution* 6 (21), S. 7847–7855. DOI: 10.1002/ece3.2532.
- Knappe, Daniel; Henklein, Petra; Hoffmann, Ralf; Hilpert, Kai (2010): Easy strategy to protect antimicrobial peptides from fast degradation in serum. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (9), S. 4003–4005. DOI: 10.1128/AAC.00300-10.
- Koppe, Uwe; Suttorp, Norbert; Opitz, Bastian (2012): Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. In: *Cellular microbiology* 14 (4), S. 460–466. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x.
- Krizsan, Andor; Volke, Daniela; Weinert, Stefanie; Sträter, Norbert; Knappe, Daniel; Hoffmann, Ralf (2014): Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, S. 12236–12239. DOI: 10.1002/anie.201407145.
- Kwok, Philip Chi Lip; Grabarek, Adam; Chow, Michael Y. T.; Lan, Yun; Li, Johnny C. W.; Casettari, Luca et al. (2015): Inhalable spray-dried formulation of D-LAK antimicrobial peptides targeting tuberculosis. In: *International journal of pharmaceutics* 491 (1-2), S. 367–374. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.001.
- Lai, Yuping; Gallo, Richard L. (2009): AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. In: *Trends in immunology* 30 (3), S. 131–141. DOI: 10.1016/j.it.2008.12.003.
- LaRock, Christopher N.; Nizet, Victor (2015): Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens. In: *Biochimica et biophysica acta* 1848 (11 Pt B), S. 3047–3054. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.02.010.

- Le, Cheng-Foh; Gudimella, Ranganath; Razali, Rozaimi; Manikam, Rishya; Sekaran, Shamala Devi (2016): Transcriptome analysis of *Streptococcus pneumoniae* treated with the designed antimicrobial peptides, DM3. In: *Scientific reports* 6, S. 26828. DOI: 10.1038/srep26828.
- Lee, Haa-Yung; Andalibi, Ali; Webster, Paul; Moon, Sung-Kyun; Teufert, Karen; Kang, Sung-Ho et al. (2004): Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. In: *BMC infectious diseases* 4, S. 12. DOI: 10.1186/1471-2334-4-12.
- Lee, Tzong-Hsien; Hall, Kristopher N.; Aguilar, Marie-Isabel (2016): Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. In: *Current topics in medicinal chemistry* 16 (1), S. 25–39. DOI: 10.2174/1568026615666150703121700.
- Levin, Michael; Quint, Peter A.; Goldstein, Brahm; Barton, Phil; Bradley, John S.; Shemie, S. D. et al. (2000): Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. In: *The Lancet* 356 (9234), S. 961–967. DOI: 10.1016/s0140-6736(00)02712-4.
- Levy, Ofer (2004): Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. In: *Journal of leukocyte biology* 76 (5), S. 909–925. DOI: 10.1189/jlb.0604320.
- Lindhauer, Nora S.; Bertrams, Wilhelm; Pöppel, Anne; Herkt, Christina E.; Wesener, Andre; Hoffmann, Kerstin et al. (2019): Antibacterial activity of a *Tribolium castaneum* defensin in an in vitro infection model of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Virulence* 10 (1), S. 902–909. DOI: 10.1080/21505594.2019.1685150.
- Lipsky, Benjamin A.; Holroyd, Kenneth J.; Zasloff, Michael (2008): Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47 (12), S. 1537–1545. DOI: 10.1086/593185.
- Maisetta, Giuseppantonio; Di Luca, Mariagrazia; Esin, Semih; Florio, Walter; Brancatisano, Franca Lisa; Bottai, Daria et al. (2008): Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3. In: *Peptides* 29 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.10.013.
- Maurer, M.; Stebut, E. von (2004): Macrophage inflammatory protein-1. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (10), S. 1882–1886. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.10.019.
- Mensa, Bruk; Howell, Gabriella L.; Scott, Richard; DeGrado, William F. (2014): Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (9), S. 5136–5145. DOI: 10.1128/AAC.02955-14.
- Moravej, Hoda; Moravej, Zahra; Yazdanparast, Maryam; Heiat, Mohammad; Mirhosseini, Ali; Moosazadeh Moghaddam, Mehrdad; Mirnejad, Reza (2018): Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. In: *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 24 (6), S. 747–767. DOI: 10.1089/mdr.2017.0392.
- Murphy, Kenneth M.; Travers, Paul; Walport, Mark (2009): *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Murphy, Timothy F.; Parameswaran, G. Iyer (2009): *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49 (1), S. 124–131. DOI: 10.1086/599375.
- Mylonakis, Eleftherios; Podsiadlowski, Lars; Muhammed, Maged; Vilcinskas, Andreas (2016): Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 371 (1695). DOI: 10.1098/rstb.2015.0290.
- Nam, Hyo Jung; Oh, Ah Reum; Nam, Seung Taek; Kang, Jin Ku; Chang, Jong Soo; Kim, Dae Hong et al. (2012): The insect peptide CopA3 inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation. In: *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 18 (10), S. 650–656. DOI: 10.1002/psc.2437.
- Nguyen, Leonard T.; Haney, Evan F.; Vogel, Hans J. (2011): The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. In: *Trends in biotechnology* 29 (9), S. 464–472. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- Okada, M.; Natori, S. (1985): Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. In: *Journal of Biological Chemistry* 260 (12), S. 7174–7177. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)39590-X.
- Phoenix, David A.; Dennison, Sarah R.; Harris, Frederick (Hg.) (2013): *Antimicrobial Peptides*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Poirel, Laurent; Madec, Jean-Yves; Lupo, Agnese; Schink, Anne-Kathrin; Kieffer, Nicolas; Nordmann, Patrice; Schwarz, Stefan (2018): Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In: *Microbiology spectrum* 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.
- Pöppel, Anne-Kathrin; Vogel, Heiko; Wiesner, Jochen; Vilcinskas, Andreas (2015): Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (5), S. 2508–2514. DOI: 10.1128/AAC.05180-14.
- Porter, James D.; Watson, Jennifer; Roberts, Lee R.; Gill, Simren K.; Groves, Helen; Dhariwal, Jaideep et al. (2016): Identification of novel macrolides with antibacterial, anti-inflammatory and type I and III IFN-augmenting activity in airway epithelium. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 71 (10), S. 2767–2781. DOI: 10.1093/jac/dkw222.
- Rahnamaeian, Mohammad; Cytryńska, Małgorzata; Zdybicka-Barabas, Agnieszka; Dobslaff, Kristin; Wiesner, Jochen; Twyman, Richard M. et al. (2015): Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. In: *Proceedings. Biological sciences* 282 (1806), S. 20150293. DOI: 10.1098/rspb.2015.0293.
- Rahnamaeian, Mohammad; Cytryńska, Małgorzata; Zdybicka-Barabas, Agnieszka; Vilcinskas, Andreas (2016): The functional interaction between abaecin and pore-forming peptides indicates a general mechanism of antibacterial potentiation. In: *Peptides*, S. 17–23. DOI: 10.1016/j.peptides.2016.01.016.
- Reinert, R. R. (2009): The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 3, S. 7–11. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x.

- Revai, Krystal; McCormick, David P.; Patel, Janak; Grady, James J.; Saeed, Kokab; Chonmaitree, Tasnee (2006): Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization during acute otitis media. In: *Pediatrics* 117 (5), S. 1823–1829. DOI: 10.1542/peds.2005-1983.
- Robert Koch Institut (2020): PneumoWeb RKI. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Sentinel/Pneumoweb/Pneumoweb_node.html.
- Robert-Koch Institut: Elektronenmikroskop: Streptococcus pneumoniae. Hg. v. www.rki.de. Online verfügbar unter <https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/P/Pneumokokkeninfektionen/Pneumokokken.html>.
- Rose-John, Stefan (2018): Interleukin-6 Family Cytokines. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a028415.
- Shen, Wei; He, Pan; Xiao, Chunsheng; Chen, Xuesi (2018): From Antimicrobial Peptides to Antimicrobial Poly(α -amino acid)s. In: *Advanced healthcare materials* 7 (20), e1800354. DOI: 10.1002/adhm.201800354.
- Sidler, Jan A.; Battegay, Manuel; Tschudin-Sutter, Sarah; Widmer, Andreas F.; Weisser, Maja (2014): Enterococci, Clostridium difficile and ESBL-producing bacteria: epidemiology, clinical impact and prevention in ICU patients. In: *Swiss medical weekly* 144, w14009. DOI: 10.4414/smw.2014.14009.
- Tanaka, Toshio; Narazaki, Masashi; Kishimoto, Tadimitsu (2018): Interleukin (IL-6) Immunotherapy. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a028456.
- Tavano, Regina; Segat, Daniela; Gobbo, Marina; Papini, Emanuele (2011): The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells. In: *Journal of innate immunity* 3 (6), S. 614–622. DOI: 10.1159/000327839.
- Teclé, Tesfaldet; Tripathi, Shweta; Hartshorn, Kevan L. (2010): Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. In: *Innate immunity* 16 (3), S. 151–159. DOI: 10.1177/1753425910365734.
- Tonk, Miray; Knorr, Eileen; Cabezas-Cruz, Alejandro; Valdés, James J.; Kollwe, Christian; Vilcinskas, Andreas (2015): Tribolium castaneum defensins are primarily active against Gram-positive bacteria. In: *Journal of invertebrate pathology* 132, S. 208–215. DOI: 10.1016/j.jip.2015.10.009.
- Tonk, Miray; Vilcinskas, Andreas (2017): The Medical Potential of Antimicrobial Peptides from Insects. In: *Current topics in medicinal chemistry* 17 (5), S. 554–575. DOI: 10.2174/15680266166666160713123654.
- Vignali, Dario A. A.; Kuchroo, Vijay K. (2012): IL-12 family cytokines: immunological playmakers. In: *Nature immunology*, S. 722–728. DOI: 10.1038/ni.2366.
- Waghu, Faiza Hanif; Gopi, Lijin; Barai, Ram Shankar; Ramteke, Pranay; Nizami, Bilal; Idicula-Thomas, Susan (2014): CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D1154-8. DOI: 10.1093/nar/gkt1157.
- Wilmes, Miriam; Sahl, Hans-Georg (2014): Defensin-based anti-infective strategies. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 304 (1), S. 93–99. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.08.007.
- World Health Organisation: The top 10 causes of death, zuletzt geprüft am 09.12.2020.

World Health Organisation (2017a): Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis, zuletzt geprüft am 22.02.2021.

World Health Organisation (2017b): WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Hg. v. WHO. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

Wu, Xiaozhe; Li, Zhan; Li, Xiaolu; Tian, Yaomei; Fan, Yingzi; Yu, Chaocheng et al. (2017): Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria. In: *Drug design, development and therapy*, S. 939–946. DOI: 10.2147/DDDT.S107195.

Yan, Juming; Smyth, Mark J.; Teng, Michele W. L. (2018): Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a028530.

Yeaman, Michael R.; Yount, Nannette Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. In: *Pharmacological reviews* 55 (1), S. 27–55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2.

Zeya, H. I.; Spitznagel, J. K. (1966): Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. In: *Journal of bacteriology* 91 (2), S. 755–762. DOI: 10.1128/JB.91.2.755-762.1966.

5 Anhang

5.1 Publikation 1: Antibacterial activity of *Tribolium castaneum* defensins in an *in vitro* infection model of *Streptococcus pneumoniae*

VIRULENCE

2019, VOL. 10, NO. 1, 902–909

<https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1685150>

RESEARCH PAPER



Antibacterial activity of a *Tribolium castaneum* defensin in an *in vitro* infection model of *Streptococcus pneumoniae*

Nora S. Lindhauer^a, Wilhelm Bertrams^a, Anne Pöppel^b, Christina E. Herkt^a, Andre Wesener^a, Kerstin Hoffmann^a, Brandon Greene^c, Mark Van Der Linden^d, Andreas Vilcinskas^{b,e}, Kerstin Seidel^{a,*†}, and Bernd Schmeck^{a,f,*}

^aInstitute for Lung Research, Universities of Giessen and Marburg Lung Center, Philipps-University Marburg, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Marburg, Germany; ^bDepartment of Bioresources, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Giessen, Germany; ^cInstitute of Medical Bioinformatics and Biostatistics, Universities of Giessen and Marburg, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany; ^dGerman National Reference Center for Streptococci, Department of Medical Microbiology, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany; ^eInstitute for Insect Biotechnology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ^fDepartment of Medicine, Pulmonary and Critical Care Medicine, University Medical Center Giessen and Marburg, Philipps-University, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Marburg, Germany

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) is the most common bacterial cause of community-acquired pneumonia. Increasing rates of antibiotic-resistant *S. pneumoniae* strains impair therapy and necessitate alternative treatment options. In this study, we analysed insect-derived antimicrobial peptides (AMPs) for antibacterial effects on *S. pneumoniae* in a human *in vitro* infection model.

AMP effects on bacterial growth were examined by colony forming unit (CFU)-assays, and growth curve measurements. Furthermore, cytotoxicity to primary human macrophages was detected by measuring lactate-dehydrogenase release to the supernatant. One AMP (Defensin 1) was tested in a model of primary human monocyte-derived macrophages infected with *S. pneumoniae* strain D39 and a multi-resistant clinical isolate. Inflammatory reactions were characterised by qPCR and multiplex-ELISA.

In total, the antibacterial effects of 23 AMPs were characterized. Only *Tribolium castaneum* Defensin 1 showed significant antibacterial effects against *S. pneumoniae* strain D39 and a multi-resistant clinical isolate. During *in vitro* infection of primary human macrophages with *S. pneumoniae* D39, Defensin 1 displayed strong antibacterial effects, and consequently reduced bacteria-induced cytokine expression and release.

In summary, *Tribolium castaneum* Defensin 1 showed profound antibacterial effectivity against *Streptococcus pneumoniae* D39 and a multi-resistant clinical isolate without unwanted cytotoxic or inflammatory side effects on human blood-derived macrophages.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2019

Revised 12 August 2019

Accepted 25 August 2019

KEYWORDS

Antimicrobial peptides;
Streptococcus pneumoniae;
macrophages;
inflammation; insect;
antibiotic resistance;
defensin

Introduction

Approximately three million people die of pneumococcal infections worldwide every year [1], representing a high socio-economic burden of pneumococcal infection on society. *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) is the most common cause of community-acquired pneumonia, affecting especially the young and the elderly [2]. Besides, it causes meningitis, otitis media, and other respiratory diseases. Penicillin resistance rates of pneumococci have increased up to 25% in Europe and hinder effective antibiotic treatment [3]. Worldwide, 20–30% of pneumococcal infections are caused by multidrug-

resistant bacteria (i.e. bacteria resistant to more than three classes of antibiotics), mandating the development of alternative antibiotics [4]. Antimicrobial peptides (AMPs) are ancient effector molecules produced by the innate immune system of eukaryotic organisms to counteract viruses, bacteria, fungi, and parasites. The highest diversity of AMPs has been reported from insects [5]. Insect-derived AMPs can be classified according to their activities or their structural characteristics. In a structural context, three major classes are established: 1) AMPs that contain unusually high numbers of specific amino acid residues like proline or glycine (e.g. Apidaecin, Drosocin, Lebocin, Metchnikowin,

CONTACT Bernd Schmeck bernd.schmeck@uni-marburg.de

*KS and BS contributed equally to this work

†Present address: Pulmonary Centre, Department of Medicine, Boston University School of Medicine, National Emerging Infectious Diseases Laboratories (NEIDL), Boston University, Boston, MA, 02118, USA Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Formaecin, Pyrrhocoricin, Metalnikowin); 2) linear α -helical AMPs peptides without cysteine residues such as cecropins, sarcotoxins, and stomoxyns; and 3) AMPs with a β -sheet globular structure stabilized by intramolecular disulphide bridges such as insect defensins [6]. Cationic AMPs are a subcategory of AMPs that are rich in cationic and hydrophobic residues, giving them an overall net positive charge [7]. In contrast, bacterial membranes are negatively charged and contain hydrophilic head groups in the outer leaflet, making them a suitable attack vector for AMPs [8]. This electrostatic interaction is one reason, amongst others, for AMP-driven pore formation in the bacterial envelope [9]. Additionally, some AMPs interact with intracellular targets [6], induce host immune cell chemotaxis [10], stimulate angiogenesis or promote wound healing [11]. In this study, we selected 23 AMPs based on their origin from different insects and their classification into different functional and structural classes (Table S1), and analyzed them for bactericidal activity against *S. pneumoniae* D39 and a multi-resistant clinical isolate. Only Defensin 1 from the model beetle *Tribolium castaneum* (Defensin 1 Genbank accession number: XM_968482[12]) was efficient against pneumococci. In addition, it reduced D39 survival and, consequently, bacteria-induced cytokine release in an infection model of primary human macrophages, but did not cause increased host cell cytotoxicity, hemolysis, inflammation or immunosuppression.

Materials and methods

Antimicrobial peptides

The tested insect-derived AMPs (Table S1) were produced by solid-phase synthesis as previously described (commissioned work by Panatecs GmbH, Tübingen Germany) [13]. Confirmation of correct formation of disulfide linkages in synthetic *Tribolium* Defensin 1 was done by mass spectrometric analysis of the fragment spectra of disulfide like tryptic peptides (data not shown). The insect AMPs were extracted to 80% purity by reverse-phase chromatography by GenScript (NJ, USA). Synthetic *Tribolium* Defensin 1 was resynthesized and processed to more than 95% purity.

S. pneumoniae culture and growth kinetics

S. pneumoniae D39—serotype 2 and a multi-resistant clinical isolate serotype 19A (AMR, resistant against Penicillin 8 μ g/ml, Cefotaxim 4 μ g/ml, Erythromycin 256 μ g/ml, Clindamycin 256 μ g/ml, Tetracycline 32 μ g/ml) were cultured as described before [14]. They were grown on sheep blood agar plates for 10 h and then transferred to Todd Hewitt Yeast (THY) medium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) at a density of 4×10^7 bacteria/ml

(Ultraspec 10 Cell Densitometer, Amersham Biosciences). Upon reaching a density of 2×10^8 bacteria/ml, the bacterial suspension was diluted to 5×10^6 bacteria/ml. To establish the optimal concentration ranges of AMP activity, 23 AMPs were diluted to 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.125 μ M, and 1.56 μ M and were added to the bacterial culture for further 10 h, or bacteria were left untreated. Additionally, Defensin 1 was incubated with bacteria for 24 h. The optical density of the culture was then measured automatically at 30-min intervals at OD_{600nm} with a TECAN Infinite M200 Pro plate reader for the indicated period.

CFU

The absolute bacterial number of *S.p.* after treatment with Defensin 1 was quantified by colony forming unit count (CFU). Therefore, *S.p.* were grown as described above to 5×10^6 bacteria/ml. After subsequent incubation for 5 h and 30 min in THY medium, AMPs were added at 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.125 μ M or bacteria were left untreated. These AMP concentrations had been established by growth kinetic analyzes to have mild (3.125 μ M), intermediate (6.25 μ M) and strong (12.5 μ M) inhibitory impact on bacterial replication. The treated bacteria were then cultivated for an additional 15 h at 37°C with 5% CO₂ on sheep blood agar plates. Colonies were counted manually.

Cell culture

Human monocytes were isolated from healthy donors by CD14 positive selection (CD14 Microbeads, Miltenyi Biotec). All donors gave informed written consent (Ethics approval number: 161/17). Monocytes were differentiated into blood-derived macrophages (BDMs) in the presence of 1% human AB-Serum. At day 6, differentiated cells were detached and seeded at the desired density in the presence of AB-Serum. After 24 h, cells were used for experiments.

S. pneumoniae infection of BDMs

Infection of BDMs with *S. pneumoniae* strain D39 was carried out as described before [14]. Briefly, BDMs were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1 or 10. Control cells were left untreated. Either 1 or 5 h after infection, the pre-determined concentrations of Defensin 1 were added. 16 h after infection, RNA and supernatant were taken.

LDH assay

Decreasing amounts of Defensin 1 (12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM) were added to BDMs. After 24 h and 48 h, the supernatant was taken and lactate-dehydrogenase (LDH) release was measured as described before [14] with a TECAN Infinite M200 Pro plate reader to assess the cytotoxic impact of the AMP on BDMs.

Hemolytic assay

Hemolytic assays were carried out using pig erythrocytes. Pig blood was obtained from a butcher and was mechanically treated to remove coagulants. Erythrocytes were harvested by centrifugation at room temperature for 5 min at 1500 g and were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS). A suspension of the erythrocytes was prepared with a dilution factor of 1:5 in PBS. Serial dilutions of Defensin 1 (0.1, 1, 10, and 100 μM) were prepared and incubated with the erythrocyte suspension for 1 h at 37°C in a 96-well plate. Ensuing steps were carried out as previously described [15].

RNA preparation and real time – PCR

For analysis of gene expression, total RNA isolation was carried out by phenol-chloroform extraction and RNA was reverse-transcribed to cDNA (High-Capacity RNA-to-cDNA kit, Thermo Fisher Scientific). Quantitative real-time PCR was performed with the following specific primer pairs:

IL-1 β sense: 5'-AGCTCGCCAGTGAAATGATGG-3'; antisense: 5'-CAGGTCCTGGAAGGAGCACTTC-3'
 IL-8 sense: 5'-ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3';
 antisense: 5'-AACCTCTGCACCCAGTTTTTC-3'
 RPS18 sense: 5'-GCGGCGGAAAATAGCCTTTG-3';
 antisense: 5'-GATCACACGTCCACCTCATC-3'

Multiplex ELISA

The presence of cytokines in the BDM supernatant after infection and AMP treatment (6.25 μM) was assessed by Luminex Magpix Multiplex ELISA. BDM supernatants were prepared according to the manufacturer's recommendations. The chosen cytokine panel included MIP1-a, MCP1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-23, LAP, and TNF- α .

Statistics

Statistical interpretation of the multiplex ELISA required incorporation of data points below the detection limit and adjustment for the effect of multiple measurements made

from the same replicates. We used the nonparametric-aligned ranks test (ART) of Hodges and Lehmann to compare cytokine secretion in treated and untreated samples within groups as well as in untreated samples between groups at 1 h and 5 h, respectively. In additional analyses, the same comparisons were made with pooled data across both time points. In these cases, data were stratified in the ART by replicates as well as time. All statistical analyses were performed using the R program for statistical computing. All other statistical tests were performed as indicated in the figure legends. p-Values < 0.05 were considered significant.

Results

The AMP defensin 1 is effective against S. pneumoniae D39 and a multi-resistant clinical isolate

In search for antibacterial effectivity against *S. pneumoniae*, we selected 23 antimicrobial peptides from different insects (Table S1) and analyzed their bactericidal potential by monitoring growth kinetics. Only *Tribolium castaneum* Defensin 1 induced a significant reduction of *S. pneumoniae* growth at a minimal inhibitory concentration (MIC) of 12.5 μM (Figure 1(a) and S1). Of note, lower concentrations of Defensin 1 seemed to delay bacterial growth in THY medium, whereas higher concentrations prevented bacterial growth during the maximal time span of 24 h. To validate this observation, colony forming units (CFU) were counted after growth on sheep blood agar plates (Figure 1(c)). No bacteria could be detected after incubation with Defensin 1 with the MIC (12.5 μM). Upon treatment with lower concentrations (6.25 μM and 3.125 μM), significantly less bacteria survived compared to untreated pneumococci. The same approach was applied to a multi-resistant strain of *S. pneumoniae* (AMR). Here, 6.25 μM Defensin 1 considerably reduced bacterial growth (Figure 1(b)) and CFU count (Figure 1(d)). Lower concentrations (3.125 μM and 1.56 μM) still reduced bacterial growth in the CFU-Assay but showed less impact on the growth kinetics in liquid culture.

Defensin 1 reduces S. pneumoniae survival and thereby inflammatory activation of macrophages

To elucidate the effect of Defensin 1 in an infection model, we determined AMP-induced cytotoxicity and inflammation in an *in vitro* model with BDMs. In preparation, hemolytic activity of Defensin 1 was determined to be minimal up to a concentration of 100 μM

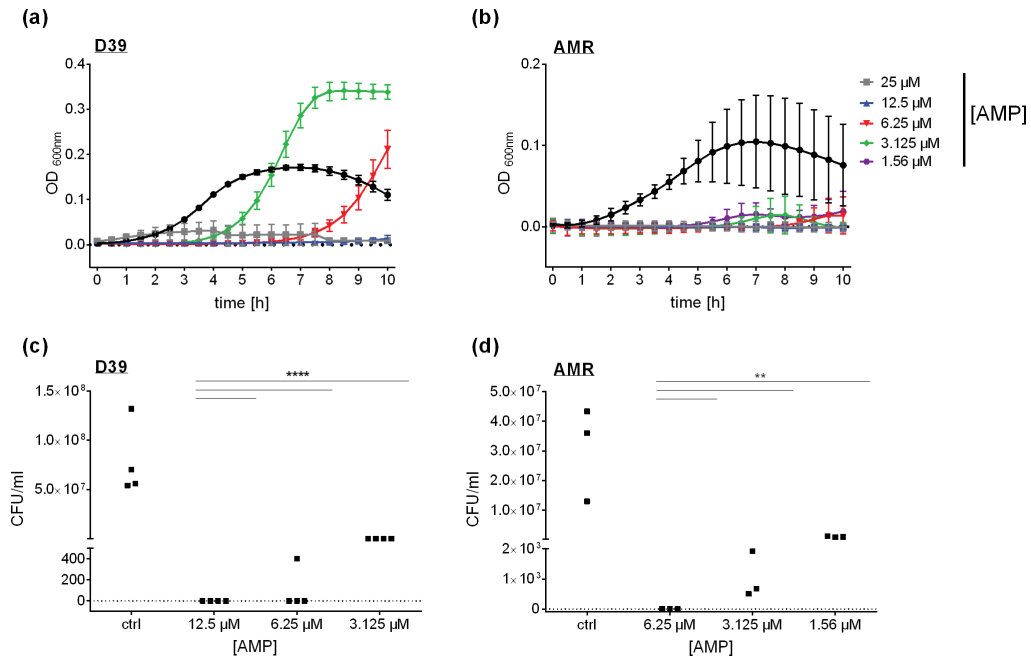


Figure 1. Defensin 1 significantly delays the growth of *S. pneumoniae* D39 and of multi-resistant *S. pneumoniae* as a function of concentration. *S.p.* were grown to an Optical Density (OD) 600nm of 0.4 in Todd Hewitt Yeast Medium. Upon dilution to OD_{600nm} = 0.01, *S.p.* D39 were incubated with declining amounts of Defensin 1 (25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.125 μM) at 37°C with 5% CO₂. OD_{600nm} was measured at 30 min intervals (a). The multi-resistant *S.p.* (AMR) were incubated with declining amounts of Defensin 1 (25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.125 μM) under the same conditions (b). OD_{600nm} was measured at 30 min intervals. Bacterial growth of D39 (c) and the AMR strain (d) was monitored by colony forming unit assay. *S.p.* were grown and diluted as in (a) and (b). Statistical significance was assessed by two-way Anova, compared to corresponding control. **p < 0.01, ****p < 0.0001.

(Figure S2). The cytotoxic effect of Defensin 1 on BDMs was determined by LDH release which remained constant across the AMP concentration range and over time (Figure 2). AMP treatment was started 1 or 5 h after infection of BDM with *S. pneumoniae*. Defensin 1 concentrations of 6.25 μM and 12.5 μM had similar effects on mRNA expression of IL-1β and

IL-8 after infection (MOI 1 and 10) for both time-points, measured by qPCR, whereas 1.25 μM had no effect in any condition (Figure 3). Therefore, we chose 6.25 μM Defensin 1 for the following experiment, since this dose also markedly delayed *S. pneumoniae* growth and only showed mild cytotoxicity. Defensin 1 administration to macrophages 1 h and 5 h after infection

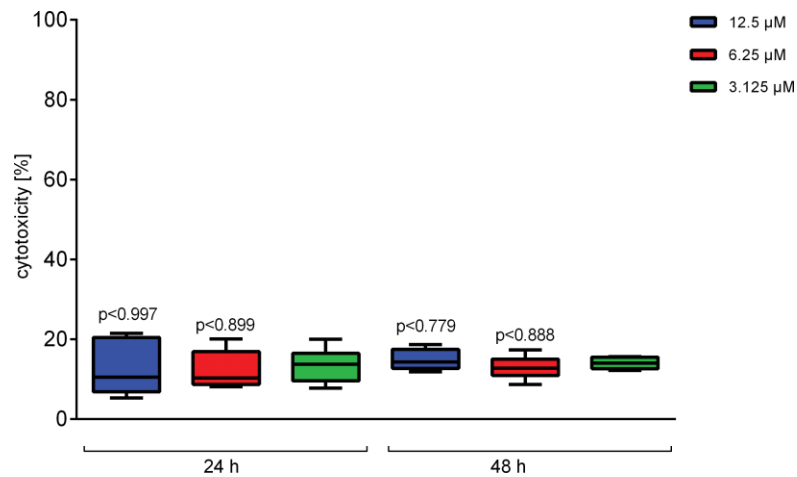


Figure 2. Defensin 1 has low cytotoxic impact on blood derived macrophages. After incubation of BDM with specified concentrations of Defensin 1 for either 24 or 48 hours, cytotoxicity was measured by LDH-Assay. Values were calculated based on 100% total lysis. Statistical significance was assessed by one-way Anova vs. lowest dose of AMP.

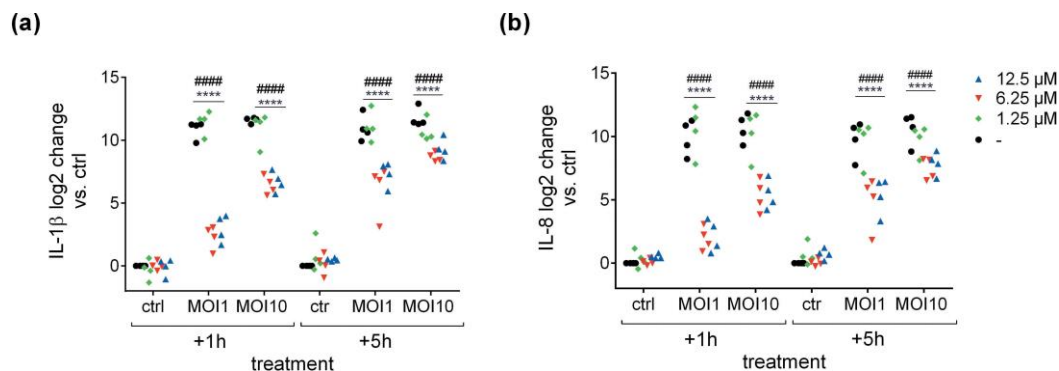


Figure 3. Defensin 1 leads to reduced cytokine mRNA expression in *S.p.* infected BDMs. 12.5 μM (MIC) and 6.25 μM of Defensin 1 lead to significantly less IL-1 β mRNA (a) and IL-8 mRNA (b) expression for all MOIs and timepoints. 1.25 μM AMP showed no differences in interleukin expression compared to control (-). Log2 transformed data are shown. Statistical significance was assessed by two-way Anova, #### $p < 0.0001$ (12.5 μM vs. corresponding control), **** $p < 0.0001$ (6.25 μM vs. corresponding control.)

with D39 (MOI10) led to a reduction of bacteria-induced release of key inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Figure 4). Sterile activation of BDMs by TNF- α was not altered significantly by Defensin 1 administration as shown by transcript levels of IL-8 and IL-1 β (Fig S3).

Discussion

S. pneumoniae is a major cause of pneumonia, meningitis, sepsis, bacteremia, and otitis media, and has developed increased resistance against multiple classes of antibiotics, including β -lactams, macrolides, lincosamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole [16]. This development mandates a global effort to search for natural compounds that could be used as new antimicrobials. Insect AMPs have recently emerged as a potential new treatment option for bacterial infection. Prior work documents the antibacterial effect of AMPs against the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* [17], as well as multidrug-resistant Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* [18]. In this study, we selected 23 insect AMPs from three different classes, namely cysteine-rich peptides (e.g. Defensin 1), α -helical peptides (e.g. Cecropin, Sarcotoxin, Stomoxyn) and proline-rich peptides (e.g. Apidaecin, Drosocin, Lebocin, Metchnikowin, Formaecin, Pyrrhocoricin, Metalnikowin) and analyzed them for antibacterial activity against *S. pneumoniae* D39 and a multi-resistant clinical isolate. These particular peptides were chosen due to their ability to be synthetically produced and their characterization in previous studies [19–21].

Only Defensin 1 turned out to be effective against both strains. While a high dose of Defensin 1 completely abolished bacterial growth, lower concentrations led to a delay of growth which was recovered after

induced and released within the hemolymph upon activation of innate immune responses [12]. The structural and functional analysis of *Tribolium* defensins revealed that they are primarily active against Gram-positive bacteria [5]. Supporting our findings, Defensin 1 also displays activity against Gram-positive multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [13]. Defensins can incapacitate or kill Gram-positive and Gram-negative bacteria [22] and have been described to attach to bacterial membranes, following proposed models such as barrel-stave, carpet, toroidal-pore and distorted toroidal pore [23,24], leading to loss of bacterial structural integrity. Defensin 1 possesses multiple disulfide bonds, which confer protection against degradation. This might also explain why Defensin 1 was the only effective AMP in our panel of 23 candidates. Another feature of Defensin 1 is the organization in β -sheets. Alpha-helical peptides, such as cecropins, have been described to undergo conformational changes upon contact with membranes [8], while Defensin 1 does not. This might also be a determining factor for the antibacterial activity of Defensin 1. Until now, the majority of AMP studies against *Streptococcus pneumoniae* has focused on mouse models or bacterial cultures [25]. We choose an *in vitro* infection model with human macrophages to maintain species concordance, and selected two treatment schedules: In a clinical environment, antimicrobial intervention is in most scenarios initiated after infection. We therefore investigated Defensin 1 activity in an early (1 h) and delayed (5 h) pneumococcal infection setting with human blood-derived macrophages to approximate the onset of an antimicrobial therapy in the clinic. Treatment starts 1 h after infection simulated

10 h of incubation. Defensin 1 represents one of three defensins identified in the genome of the model beetle *Tribolium castaneum* which are

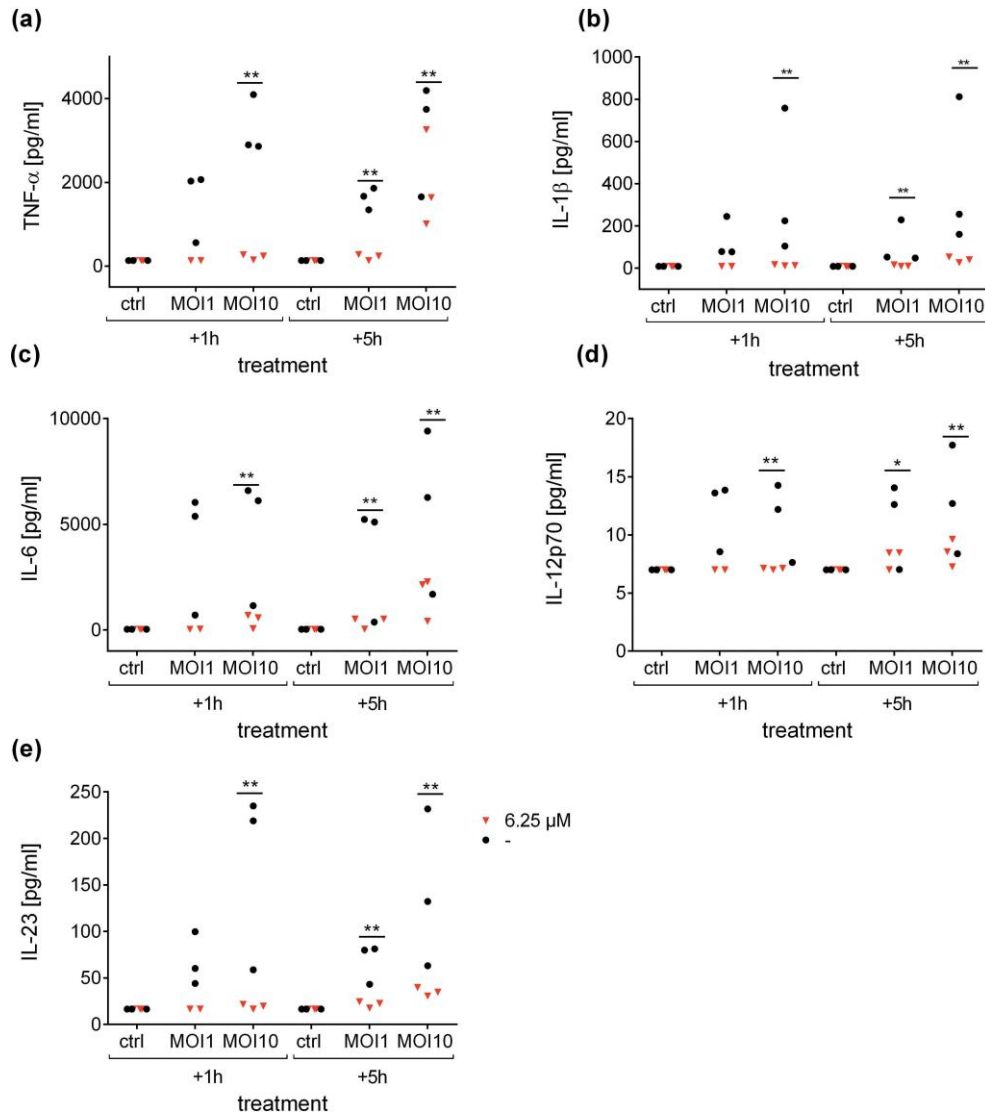


Figure 4. Defensin 1 reduces cytokine release from infected human macrophages. Supernatants from samples in Figure 3 were analyzed by Multiplex ELISA for different cytokines. Secretion levels of TNF- α (a), IL-1 β (b), IL-6 (c), IL-12p70 (d) and IL-23 (e) after treatment with 6.25 μ M Defensin 1 for 1 h or 5 h post infection, or left untreated for control (-) are shown. Statistical significance was assessed as described in the methods section, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. corresponding control.

a selective therapy, commonly used as a post-operative prevention of bacterial infections. The 5 h' time point simulated post-infection therapy, as it is common in primary care. Some antibacterial treatments have been described to act intrinsically immune-modulatory (e.g., macrolides [26]), others have been found to activate the immune system in a deleterious way by destroying the bacteria (e.g. the Jarisch-Herxheimer Reaction [27]). Therefore, we analyzed the effects of Defensin 1 on the immune response. *S. pneumoniae* is sensed by the innate immune systems via various extracellular (TLR2, TLR4) and intracellular (NLRP3 inflammasome, TLR9, NOD2) receptors, leading to proteolytic cleavage of pro-IL-1 β and to NF κ B-mediated expression of other pro-inflammatory cytokines like, IL-8, TNF- α , IL-6, IL-12, and IL-23 [28,29]. Transcript

expression of IL-1 β and IL-8 were reduced upon Defensin 1 administration and concomitant infection. Therefore, we tested secretion of cytokines in response to infection with and without AMP treatment. The administration of Defensin 1 to *S. pneumoniae* infected BDMs significantly reduced secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and IL-23 in a time- and dose- dependent manner. As Defensin 1 was able to limit *S. pneumoniae* growth, and as it had no direct influence on cytokine secretion by itself, we hypothesize that Defensin 1 limits the pro-inflammatory activation of macrophages by efficient bacterial killing. Macrophages that were exposed to *S. pneumoniae* D39 for 5 h before Defensin 1 treatment also benefit from the treatment with Defensin 1. At MOI 1, there is only a trend to reduced cytokine release by Defensin 1, presumably

because of the lower initial cytokine induction. Therefore, we attribute the reduced cytokine secretion to the lower bacterial load upon AMP treatment. Cytokines that were also measured but which showed no significant change in secretion upon AMP treatment included IL-10, Latency-Associated-Peptide (LAP, a TGF- β precursor), MIP-1 α , MCP1, and IL-8. While IL-10 and LAP are predominantly of anti-inflammatory capacity, MIP-1 α , MCP1, and IL-8 are pro-inflammatory chemokines. It has been documented that AMPs can enhance chemokine production, e.g. MCP1, while inhibiting production of other cytokines [30]. We rule out such a pro- or anti-inflammatory effect of Defensin 1, since induction of IL-8 and IL-1 β are not affected by AMP administration in the context of sterile TNF- α stimulation. Of note, there are substances that combine immunomodulation and bactericidal properties, such as peptide 1018, which has also been shown to be efficient against bacteria in biofilms [30].

It would be interesting to combine Defensin 1 with other factors, as previous work has documented cases of a cooperative effect of AMPs [31]. The combination of AMPs with different mechanisms [32] of action can potentiate their antibacterial effect, as it has been shown for the AMPs Abaecin plus Hymenoptaecin [31]. Additionally, the first findings indicate potentiating effects to be a general mechanism and not being restricted to peptides that are co-expressed in the same species. Of note, boosting the effects of AMPs in combination with conventional antibiotics is also conceivable [13,32] and could be used to reduce the required antibiotic dose or to sensitize resistant strains against traditional antibiotics. This also applies to putative synergistic effects of Defensin 1 and other AMPs. Additionally, investigation of the effect of Defensin 1 on infected lung epithelium is of further interest to gain a broader overview of the reaction of the human body to this particular molecule.

In summary, we found that Defensin 1 significantly reduced the growth of *Streptococcus pneumoniae* D39 and of a multi-resistant clinical isolate, showed low cytotoxic impact on human blood-derived macrophages and significantly reduced the cytokine secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and IL-23 while not displaying any immune-modulatory effects. Therefore, Defensin 1 represents a promising lead for the development of therapeutic compounds against *Streptococcus*-mediated pneumonia.

Acknowledgments

We thank Christin Rieke for excellent technical support and Dr. Miray Tonk for the erythrocyte lysis assay.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

Parts of this work have been funded by the Kempkes Foundation (04/2016) to WB, the Bundesministerium für Bildung und Forschung (e:Med CAPSYS - FKZ 01ZX1604E; JPI-AMR - FKZ 01KI1702; ERACoSysMed2 - SysMed-

COPD - FKZ 031L0140, <http://www.bmbf.de/>) to BS, Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) to NSL, Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB/TR-84 TP C01; <http://www.sfb-tr84.de/>) to BS, Hessisches Ministerium für Wissenschaft und Kunst (LOEWE Medical RNomics - FKZ 519/03/00.001-(0003); <http://www.proloewe.de/medicalrnomics>) to BS.

ORCID

Wilhelm Bertrams  <http://orcid.org/0000-0002-0180-2529>

Kerstin Seidel  <http://orcid.org/0000-0002-9166-7032>

Bernd Schmeck  <http://orcid.org/0000-0002-2767-3606>

References

- [1] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Växjö, Sweden. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance: version 2.0. 2017. http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/
- [2] Dion CF, Ashurst JV. StatPearls: pneumonia, streptococcus pneumoniae. StatPearls, Treasure Island (FL); 2019.
- [3] European Centre for Disease Prevention and Control (2017). Data from the ECDC surveillance Atlas - antimicrobial resistance. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>; accessed October 2018
- [4] Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, et al. Microbial etiology of pneumonia: epidemiology, diagnosis and resistance patterns. *Int J Mol Sci.* 2016;17:2120.
- [5] Tonk M, Vilcinskis A. The medical potential of antimicrobial peptides from insects. *CTMC.* 2016;17:554-575.
- [6] Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, et al. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 2016;371:20150290.
- [7] Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet.* 2001;1:156-164.
- [8] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55:27-55.
- [9] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011;29:464-472.

- [10] Hamoen LW, Wenzel M. Editorial: antimicrobial peptides-interaction with membrane lipids and proteins. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:4.
- [11] Muñoz M, Craske M, Severino P, et al. Antimicrobial peptide LL-37 participates in the transcriptional regulation of melanoma cells. *J Cancer.* 2016;7:2341–2345.
- [12] Altincicek B, Knorr E, Vilcinskis A. Beetle immunity: identification of immune-inducible genes from the model insect *tribolium castaneum*. *Dev Comp Immunol.* 2008;32:585–595.
- [13] Rajamuthiah R, Jayaman E, Conery AL, et al. A defensin from the model beetle *tribolium castaneum* acts synergistically with telavancin and daptomycin against multidrug resistant *staphylococcus aureus*. *PLoS ONE.* 2015;10:e0128576.
- [14] Griss K, Bertrams W, Sittka-Stark A, et al. MicroRNAs constitute a negative feedback loop in *streptococcus pneumoniae*-induced macrophage activation. *J Infect Dis.* 2016;214:288–299.
- [15] Tonk M, Pierrot C, Cabezas-Cruz A, et al. The *drosophila melanogaster* antimicrobial peptides Mtk-1 and Mtk-2 are active against the malarial parasite *plasma- dium falciparum*. *Parasitol Res.* 2019;118:1993–1998.
- [16] Imöhl M, Reinert RR, van der Linden M. Antibiotic susceptibility rates of invasive pneumococci before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccination in Germany. *Int J Med Microbiol.* 2015;305:776–783.
- [17] Mensa B, Howell GL, Scott R, et al. Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:5136–5145.
- [18] Hirsch R, Wiesner J, Marker A, et al. Profiling antimicrobial peptides from the medical maggot *lucilia sericata* as potential antibiotics for MDR Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:96–107.
- [19] Jayamani E, Rajamuthiah R, Larkins-Ford J, et al. Insect-derived cecropins display activity against *acinetobacter baumannii* in a whole-animal high-throughput *caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:1728–1737.
- [20] Tonk M, Knorr E, Cabezas-Cruz A, et al. *Tribolium castaneum* defensins are primarily active against gram-positive bacteria. *J Invertebr Pathol.* 2015;132:208–215.
- [21] Pöppel A-K, Vogel H, Wiesner J, et al. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2508–2514.
- [22] Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *Febs J.* 2011;278:3942–3951.
- [23] Shen W, He P, Xiao C, et al. From antimicrobial peptides to antimicrobial poly (α -amino acid)s. *Adv Healthc Mater.* 2018;7:e1800354.
- [24] Józefiak A, Engberg R. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *J Anim Feed Sci.* 2017;26:87–99.
- [25] Le C-F, Gudimella R, Razali R, et al. Transcriptome analysis of *streptococcus pneumoniae* treated with the designed antimicrobial peptides, DM3. *Sci Rep.* 2016;6:26828.
- [26] Porter JD, Watson J, Roberts LR, et al. Identification of novel macrolides with antibacterial, anti-inflammatory and type I and III IFN-augmenting activity in airway epithelium. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2767–2781.
- [27] Butler T. The Jarisch-Herxheimer reaction after antibiotic treatment of spirochetal infections: a review of recent cases and our understanding of pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96:46–52.
- [28] Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol.* 2012;14:460–466.
- [29] Liu T, Zhang L, Joo D, et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- [30] de La Fuente-Núñez C, Mansour SC, Wang Z, et al. Anti-biofilm and immunomodulatory activities of peptides that inhibit biofilms formed by pathogens isolated from cystic fibrosis patients. *Antibiotics (Basel).* 2014;3:509–526.
- [31] Rahnamaeian M, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, et al. The functional interaction between abaecin and pore-forming peptides indicates a general mechanism of antibacterial potentiation. *Peptides.* 2016;78:17–23.
- [32] Zheng Z, Tharmalingam N, Liu Q, et al. Synergistic efficacy of *aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e00686–00617.
- [33]

5.1.1 Ergänzende Abbildungen von Publikation 1:

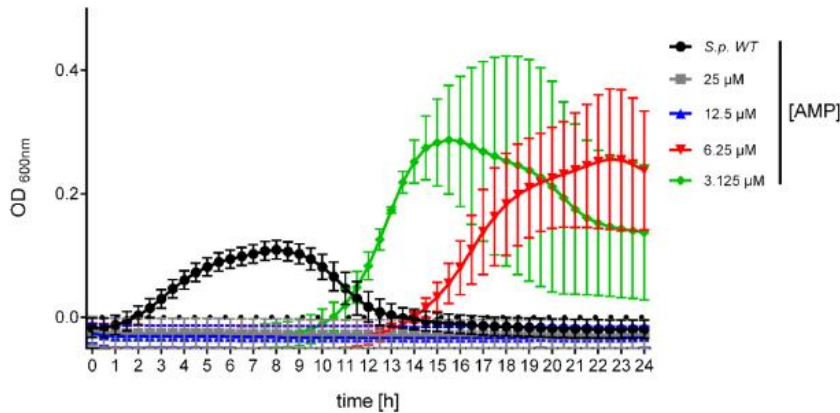


Figure S1. Defensin 1 delays the growth of *S. pneumoniae* D39 at lower concentrations and fully inhibits it at the MIC concentration (12.5 μM). *S.p.* were grown to an Optical Density (OD) 600nm of 0.4 in Todd Hewitt Yeast Medium. Upon dilution to OD_{600nm}=0.01, *S.p.* D39 were incubated with declining amounts of Defensin 1 (25 μM, 12.5 μM, 6.25 μM, 3.125 μM) at 37° C with 5 % CO₂. OD_{600nm} was measured at 30 min intervals up to a total assay duration of 24 h.

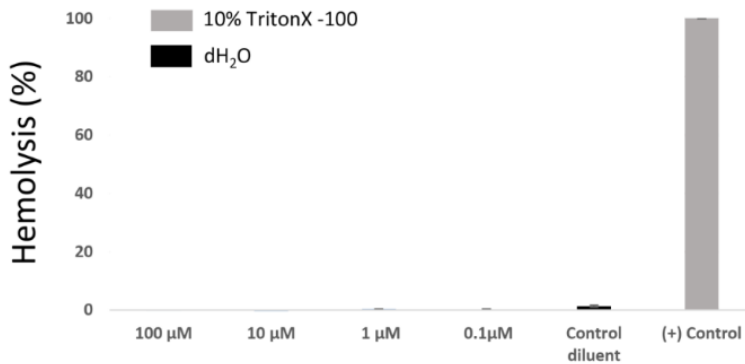


Figure S2: Serial dilutions of Defensin 1 (0.1, 1, 10 and 100 μM) do not lead to hemolysis in pig erythrocytes. dH₂O was used as control diluent. 10% Triton X-100 served as positive control and was set to 100% hemolysis which served as a reference. Absorption was measured on an Eon Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT USA).

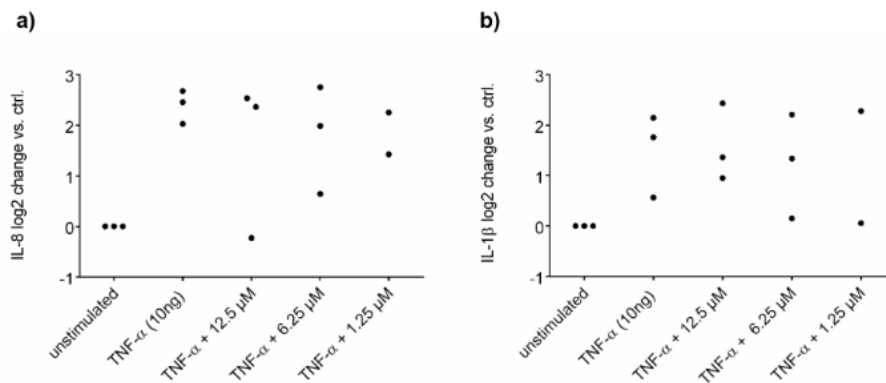


Figure S3: Defensin 1 does not lead to reduced cytokine mRNA expression in BDMs. Cells were administered 10 ng of TNF-α. 1 h later 12.5 μM, 6.25 μM or 1.25 μM of Defensin 1 were added at indicated concentrations, or cells were left untreated. The addition of Defensin 1 caused no differences in IL-8 mRNA (a) and IL-1β mRNA (b) expression compared to untreated cells. Log₂ transformed data are shown of three independent biological replicates.

5.2 Publikation 2: *Tribolium castaneum* defensin 1 kills *Moraxella catarrhalis* in an *in vitro* infection model but does not harm commensal bacteria

RESEARCH PAPER

Tribolium castaneum defensin 1 kills Moraxella catarrhalis in an in vitro infection model but does not harm commensal bacteria

Wilhelm Bertrams^a, Nora S. Lindhauer^a, Marie Christin Rieke^a, Anne Paas^b, Kerstin Hoffmann^a, Brandon Greene^c, Alexander Visekruna^d, Andreas Vilcinskas^{b,e}, Kerstin Seidel^a, and Bernd Schmeck^{a,f,g,h}

^aInstitute for Lung Research, Universities of Giessen and Marburg Lung Center, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany; ^bDepartment

of Bioresources, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Giessen, Germany; ^cInstitute of Medical Bioinformatics and Biostatistics, Universities of Giessen and Marburg, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany; ^dInstitute for Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Philipps University of Marburg, Germany; ^eInstitute for Insect Biotechnology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany; ^fDepartment of Medicine, Pulmonary and Critical Care Medicine, University Medical Center Giessen and Marburg, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany; ^gMember for Infectious Diseases (DZIF), and the SYNMIKRO Center for Synthetic Microbiology, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany; ^hInstitute for Lung Health (ILH), Giessen, Germany

ABSTRACT

Moraxella catarrhalis is a bacterial pathogen that causes respiratory tract infections in humans. The increasing prevalence of antibiotic-resistant *M. catarrhalis* strains has created a demand for alternative treatment options. We therefore tested 23 insect antimicrobial peptides (AMPs) for their activity against *M. catarrhalis* in a human *in vitro* infection model with primary macrophages, and against commensal bacteria. Effects on bacterial growth were determined by colony counting and growth curve analysis. The inflammatory macrophage response was characterized by qPCR and multiplex ELISA. Eleven of the AMPs were active against *M. catarrhalis*. Defensin 1 from the red flour beetle *Tribolium castaneum* significantly inhibited bacterial growth and reduced the number of colony forming units. This AMP also showed antibacterial activity in the *in vitro* infection model, reducing cytokine expression and release by macrophages. Defensin 1 had no effect on the commensal bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. However, sarcotoxin 1 C from the green bottle fly *Lucilia sericata* was active against *M. catarrhalis* and *E. coli*, but not against *E. faecalis*. The ability of *T. castaneum* defensin 1 to inhibit *M. catarrhalis* but not selected commensal bacteria, and the absence of cytotoxic or inflammatory effects against human blood-derived macrophages, suggests this AMP may be suitable for development as a new therapeutic lead against antibiotic-resistant *M. catarrhalis*.

ARTICLE HISTORY

Received 15 December 2020

Revised 5 March 2021

Accepted 23 March 2021

KEYWORDS

Antimicrobial peptides; *Moraxella catarrhalis*; macrophages; inflammation; insect; antibiotic resistance; defensin; commensals

Introduction

Moraxella catarrhalis is a Gram-negative, aerobic, diplococcus pathogen that colonizes the human respiratory tract. It produces non-hemolytic, round and opaque colonies on blood agar. The major virulence strategies of *M. catarrhalis* include complement resistance, the formation of protective biofilms, localization within lymphoid tissues to avoid immunosurveillance, and polyclonal non-specific B-cell activation to modulate adaptive immunity [1]. Respiratory tract colonization does not always lead to symptomatic disease, which is highly dependent on the patient's age [2]. In the upper respiratory tract, *M. catarrhalis* can cause acute otitis media (OM). Approximately 80% of children have already experienced OM by the age of 3, and 15–20% of these cases are caused by *M. catarrhalis*.

The prevalence of *M. catarrhalis* is $\leq 75\%$ in children but only 1–3% in adults, a distribution that has been stable since the 1970s [3]. Infections with *M. catarrhalis* can be treated with antibiotics, but strains resistant to penicillin, ampicillin, and amoxicillin are now common [4]. Antibiotic-resistant Gram-negative bacteria are increasingly seen as threats to global healthcare systems, causing more than 670,000 infections and 33,000 deaths per year in Europe [5] with associated healthcare costs of more than €1 billion [6]. Alternative treatments for bacterial infections are therefore urgently needed.

Antimicrobial peptides (AMPs) offer one potential source of new drug leads against infectious diseases. They are short peptides (typically 12–50 amino acids)

CONTACT Bernd Schmeck  bernd.schmeck@uni-marburg.de

[§]present address: Vascular Biology Section, Evans Department of Medicine, Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA Supplemental data for this article can be accessed [here](#)

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

that function as part of the innate immune system in all eukaryotic organisms. Their spectrum of activity includes viruses, bacteria, fungi and parasites. Insects provide a source of particularly diverse AMPs, which can be classified on the basis of their chemical attributes [7]. AMPs demonstrate a broad range of cellular mechanisms, from the promotion of angiogenesis to host cell chemotaxis, but electrostatic interaction with bacterial membranes and subsequent pore formation is the most important mechanism of direct bactericidal action [8]. In this regard, we previously described the effect of defensin 1 from the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) against *Streptococcus pneumoniae* [7]. In this study, we tested 23 insect AMPs for their activity against *M. catarrhalis* and selected two with the most promising activity for further analysis in an *in vitro* infection model based on primary human macrophages. We selected *T. castaneum* defensin 1, a β -sheet globular AMP stabilized by intramolecular disulfide bridges, and sarcotoxin 1 C from the green bottle fly *Lucilia sericata* [9], a linear α -helical AMP without cysteine residues. We investigated the ability of these AMPs to trigger cytokine release, host cell cytotoxicity, hemolysis, inflammation and immunosuppression. Our results may facilitate the development of AMP-based drug leads against antibiotic-resistant Gram-negative bacteria including *M. catarrhalis*.

Materials and methods

Antimicrobial peptides

The 23 insect-derived AMPs tested in this study were produced by solid-phase synthesis and purified by Coring System Diagnostix (Gernsheim, Germany), GenScript (Piscataway, NJ, USA) and Pepmic (Suzhou, China). The integrity of the AMPs was confirmed by liquid chromatography-mass spectrometry. The properties of the AMPs are summarized in Table S1, chromatograms for each peptide are provided in Table S2.

Culture and growth kinetics of *M. catarrhalis*

Colonies of *M. catarrhalis* were grown on sheep blood agar plates for 12 h at 37°C and 5% CO₂ before transfer to brain heart infusion (BHI) medium (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at an initial concentration of 1.6×10^7 cells/ml (OD₆₀₀ = 0.08) as determined using an Ultraspec 10 cell densitometer (Amersham BioSciences, Little Chalfont, UK). Bacteria were cultivated in a shaking incubator at 37°C until the

concentration reached 1.2×10^8 cells/ml (OD₆₀₀ = 0.6) and then diluted to 2×10^6 cells/ml (OD₆₀₀ = 0.011). To establish the optimal concentration ranges for AMP activity, defensin 1 was prepared as a two-fold dilution series from 12.5 μ M to 1.56 μ M and was added to the bacterial cultures, which were incubated as above for a further 16 h. Untreated cultures were used as controls. The OD₆₀₀ was measured automatically at 30-min intervals using an Infinite M200 Pro plate reader (Tecan Life Sciences, Männedorf, Switzerland). For AMP inhibitory testing without macrophages, *M. catarrhalis* was grown to the mid-exponential phase ($\sim 5 \times 10^8$ cells/ml) in BHI medium in the presence of defensin 1 (12.5 μ M) or sarcotoxin 1 C (0.39 μ M) before dilution in PBS containing 0.15% gelatin, and directly plated on sheep blood agar. They were cultivated for a further 15 h at 37°C and 5% CO₂ in serial dilution before manual counting of the colonies on each plate.

Culture and growth kinetics of *E. faecalis* and *E. coli*

For the analysis of commensal bacteria, *E. faecalis* was grown on Columbia agar plates or in liquid BHI medium, and *E. coli* was grown on McConkey agar or in liquid LB medium. After overnight culture on agar plates at 37°C and 5% CO₂, both species were transferred to liquid medium at an initial OD₆₀₀ of 0.005. The cultures were maintained a shaking incubator at 37°C, and the OD₆₀₀ was measured automatically at 30 min intervals as above.

Colony forming unit assay

The absolute number of bacterial cells after treatment with defensin 1 or sarcotoxin 1 C was determined by counting the colony forming units (CFUs). *M. catarrhalis* overnight cultures prepared as described above were grown to the mid-exponential phase ($\sim 5 \times 10^8$ cells/ml) in BHI medium before dilution to 2×10^7 cells/ml in PBS containing 0.15% gelatin, and blood-derived macrophages (BDMs) were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 or 1. After incubation with bacteria for 1 or 5 h, we added 12.5 μ M defensin 1 or 0.39 μ M sarcotoxin 1 C to the cell cultures representing each incubation time point, based on the concentrations previously shown to inhibit bacterial replication. Cells were then incubated for an additional 16 h at 37°C and 5% CO₂ and then lysed with 1% saponin. Lysates were plated on sheep blood agar and cultivated for a further 15 h at 37°C and 5% CO₂ before manual counting of the colonies on each plate.

BDM cultivation and differentiation

All donors gave informed written consent (Ethics approval number: 161/17). Human BDMs were cultured as previously described [7]. Briefly, primary human monocytes were isolated from donor buffy coats by selection for CD14⁺ cells using CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes were grown in RPMI1640 medium with 1% human AB serum at 37°C and 5% CO₂ on ultra-low attachment plates (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). After 6 days, differentiated macrophages were detached, seeded at the desired density and incubated for 24 h before further

Isolation of RNA from infected BDMs and real-time PCR analysis

BDMs were infected with *M. catarrhalis* as described above and the cells and supernatant were collected 16 h post-infection. Total RNA was isolated by phenol-chloroform extraction followed by reverse transcription using the High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with the following specific primer pairs to measure the expression of IL-1 β (forward primer 5'-AGC TCG CCA GTG AAA TGA TGG-3' and reverse primer 5'-CAG GTC CTG GAA GGA GCA CTT C-3'), IL-8 (forward primer 5'-ACT GAG AGT GAT TGA GAG TGG AC-3' and reverse primer 5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC-3'), and RPS18 (forward primer 5'-GCG GCG GAA AAT AGC CTT TG-3' and reverse primer 5'-GAT CAC ACG TCC ACC TCA TC-3').

Multiplex ELISA

The presence of cytokines in the BDM supernatant after infection and treatment with 12.5 μ M defensin 1 was assessed using the MAGPIX Multiplex ELISA (Luminex, Austin, TX, USA). BDM supernatants were prepared as recommended for the MAGPIX system. The cytokine panel comprised MIP1- α , MCP1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-23, LAP and TNF- α .

Statistical analysis

Statistical interpretation of the multiplex ELISA data required the incorporation of data points outside the detection range and adjustments for the effect of parallel technical measurements from the same biological samples. We therefore used the Hodges and Lehmann nonparametric aligned ranks test [10] to compare

cytokine secretion by treatment time within treatment groups and between the following control and treatment groups:

- MOI = 0.5 without defensin 1 (control)
- MOI = 0.5 with defensin 1 given 1 h post-infection
- MOI = 0.5 with defensin 1 given 5 h post-infection
- MOI = 1 without defensin 1 (control)
- MOI = 1 with defensin 1 given 1 h post-infection
- MOI = 1 with defensin 1 given 5 h post-infection
- LPS without defensin 1
- LPS plus defensin 1 (added 1 h after LPS)

Statistical analysis was carried out using the R suite. All other statistical tests were carried out as indicated in the figure legends, with a significance threshold of $p < 0.05$.

Results

Defensin 1 and sarcotoxin 1 C show efficacy against *M. catarrhalis*

We screened a panel of 23 AMPs, 11 of which were effective against *M. catarrhalis* (Table S1). Among those, we selected defensin 1 and sarcotoxin 1 C for further analysis because they differ in structure and hence in their potential mechanism of action. Defensin 1 completely abolished the growth of *M. catarrhalis* when present at a concentration of 12.5 μ M, but only delayed growth at a concentration of 6.25 μ M (Figure 1a). Defensin 1 also reduced the bacterial burden in an infection assay of primary BDMs, as reflected by the lower *M. catarrhalis* CFU count compared to assays without the peptide (Figure 1b). Sarcotoxin 1 C completely inhibited the growth of *M. catarrhalis* at a concentration of 0.39 μ M and caused a growth delay at 0.195 μ M (Figure 1c). Sarcotoxin 1 C also reduced the bacterial load in an infection assay of primary BDMs when presented at a concentration of 0.39 μ M (Figure 1d). While defensin 1 efficiently killed the bacteria, the effect of sarcotoxin 1 C on bacterial growth was partly reversible upon dilution of the AMP by plating (Figure S1).

Defensin 1 reduces the survival of *M. catarrhalis* and the inflammatory activation of macrophages

Defensin 1 showed efficacy in the CFU and infection assays, but for therapeutic development it must also demonstrate minimal toxicity toward human cells. We therefore tested the ability of defensin 1 to induce inflammation in an *in vitro* infection assay with BDMs. Previous work has shown that defensin 1 has minimal hemolytic activity up to a concentration of

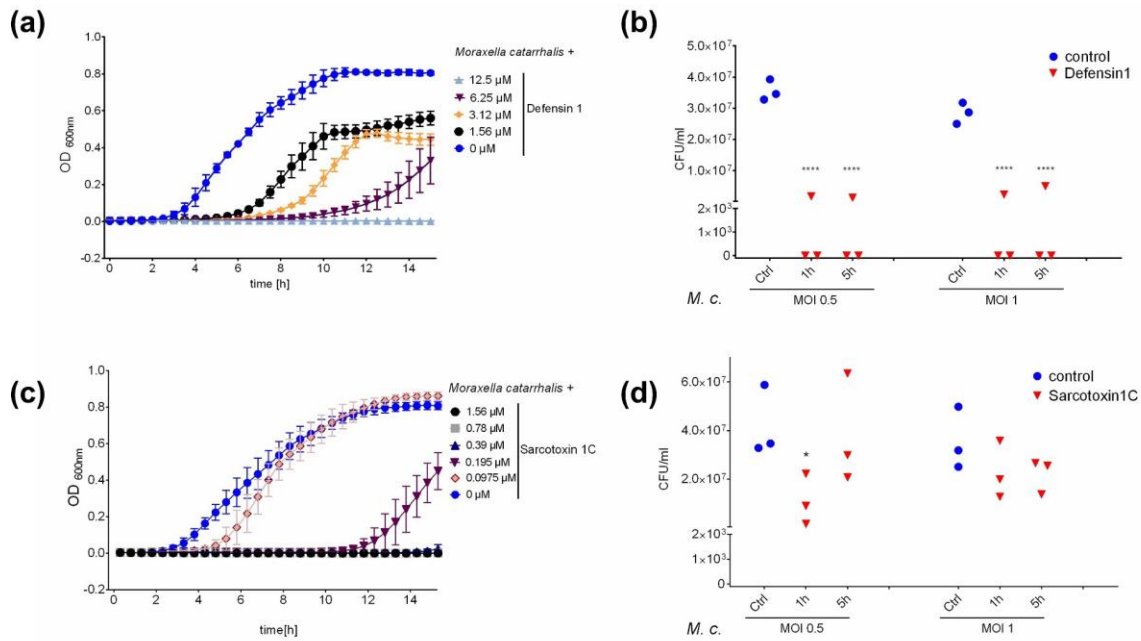


Figure 1. Defensin 1 and sarcotoxin 1 C inhibit the growth of *M. catarrhalis*. Bacteria were grown to OD₆₀₀ = 0.6 in BHI medium, diluted to OD₆₀₀ = 0.011 and incubated with two-fold serial dilutions of defensin 1 (between 25 μM and 0 μM) or sarcotoxin 1 (between 1.56 μM and 0 μM) at 37°C. The OD_{600 nm} was measured at 30-min intervals (a and c). Bacterial growth was also monitored following the infection of BDMs at the indicated MOIs, with AMP treatment beginning 1 or 5 h post-infection (defensin 1 = 12.5 μM, sarcotoxin 1 C = 0.39 μM, with uninfected cells as controls) (b and d). Statistical significance was assessed by two-way ANOVA (****p < 0.0001 vs. control).

100 μM and is nontoxic toward macrophages [7]. We exposed BDMs to defensin 1 at a concentration of 12.5 μM 1 or 5 h after infection with *M. catarrhalis* at MOI = 0.5 or MOI = 1 to mimic a clinical setting. Defensin 1 limited the expression of IL-1β and IL-8 at both post-infection time points and both MOI

as determined by qRT-PCR (Figure 2). Defensin 1 also inhibited the bacteria-induced secretion of key cytokines IL-1β, IL-10, IL-12p70 and IL-23 at both post-infection time points and both MOI values, as determined by multiplex ELISA (Figure 3). The sterile activation of BDMs by LPS was not significantly affected by

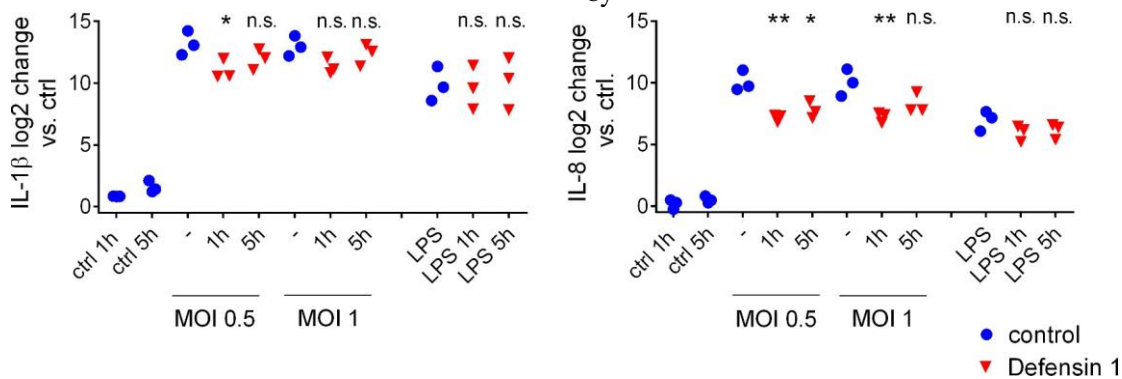


Figure 2. Defensin 1 reduces the abundance of cytokine mRNAs in BDMs infected with *M. catarrhalis*. Treatment with 12.5 μM defensin 1 (minimal inhibitory concentration) significantly reduced the amount of *IL-1β* mRNA (a) and *IL-8* mRNA (b) expression for all MOIs and time points. LPS was used as a sterile positive control. Log₂ transformed data are shown. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA (**p < 0.01, *p < 0.05).

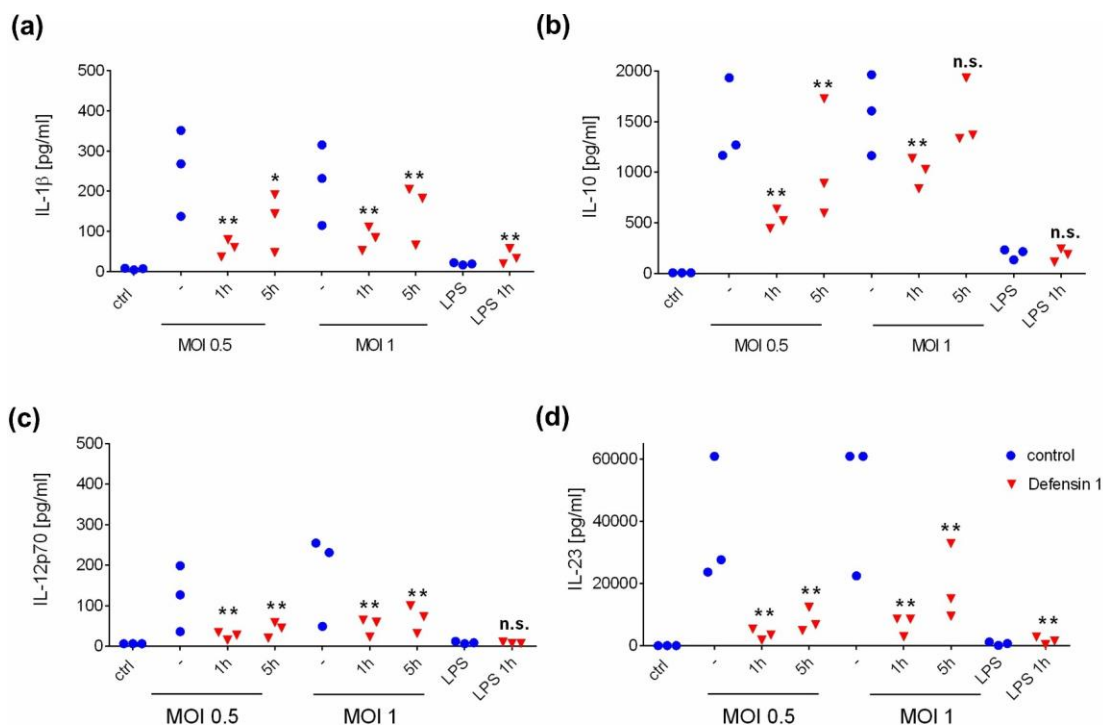


Figure 3. Defensin 1 inhibits the secretion of selected cytokines from human macrophages infected with *M. catarrhalis*. Supernatants were analyzed by multiplex ELISA. The quantity of secreted IL-1 β (a), IL-10 (b), IL-12p70 (c) and IL-23 (d) was measured following treatment with defensin 1 (12.5 μ M) 1 or 5 h post-infection. LPS was used as a sterile positive control and uninfected cells as a negative control. Statistical significance was determined as stated in the methods section (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. corresponding sample without AMP).

the presence of defensin 1, as previously also reported for TNF- α [7].

Commensal *E. faecalis* and *E. coli* are unaffected by defensin 1 and only partly affected by sarcotoxin 1 C

Antibiotics often cause severe clinical side effects by disrupting the commensal flora [11]. We therefore investigated the impact of defensin 1 on the commensal bacteria *E. faecalis* and *E. coli*. Whereas 12.5 μ M defensin 1 was sufficient to completely inhibit the growth of *M. catarrhalis*, the same concentration only caused a minor growth delay in both commensal species (Figure 4a and b). Interestingly, 0.39 μ M sarcotoxin 1 C was able to inhibit the growth of *E. coli* but not *E. faecalis* (Figure 4c and d).

Discussion

Insects produce a broad repertoire of AMPs offering a rich source of potential new drug leads for the treatment of infections caused by antibiotic-resistant bacteria. We therefore screened a panel of 23 previously-

described insect AMPs [7] against *M. catarrhalis*, a pathogen that causes respiratory infections in humans and is considered an emerging threat due to the increasing prevalence of antibiotic-resistant strains [4]. The most effective AMP in the panel was *T. castaneum* defensin 1, which was previously found to show low toxicity toward human BDMs [7]. Here we found that defensin 1 reduced the CFU counts of *M. catarrhalis* without harming BDMs in our *in vitro* infection model. It also limited the induction of the *IL-8* and *IL-1 β* genes compared to untreated BDMs, and inhibited the secretion of cytokines such as IL-23, IL-12p70, IL-1 β and IL-10. Despite its potent activity against *M. catarrhalis*, defensin 1 had a negligible impact on the growth of the commensal bacteria *E. faecalis* and *E. coli*. Another AMP in our panel with activity against *M. catarrhalis* was *L. sericata* sarcotoxin 1 C. This AMP was also effective against *E. coli*, but not against *E. faecalis*. AMPs exert their function by targeting the bacterial cell wall, and are usually specialized for either Gram-negative or Gram-positive bacteria. Many AMPs are amphipathic with a positive net charge, so they bind to the negatively charged components of the bacterial cell wall and outer membrane. Some AMPs form pores

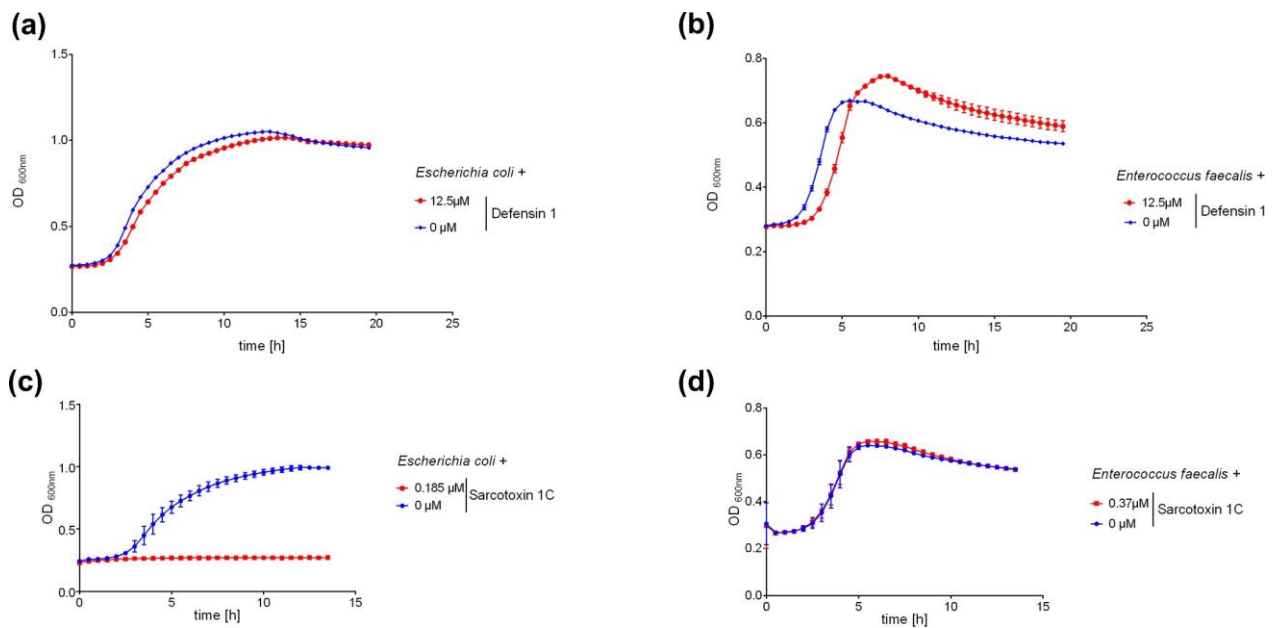


Figure 4. Defensin 1 and sarcotoxin 1 C differ in their effect against two commensal bacteria.

E. faecalis was grown on Columbia blood agar plates and *E. coli* was grown on McConkey agar plates overnight. The bacteria were then transferred to liquid medium ($OD_{600} = 0.005$) and incubated with defensin 1 (a and b) or sarcotoxin 1 C (c and d) at 37°C. The OD_{600} was measured at 30-min intervals. Three biological replicates are shown with mean values \pm standard deviations. Defensin 1 (12.5 μM) showed negligible activity against both species, whereas sarcotoxin 1 C (0.39 μM) selectively inhibited the growth of *E. coli*.

in the bacterial cell membrane by direct binding and integration, leading to lysis and cell death [12]. Because AMPs target the structural integrity of bacteria, it is more difficult for them to evolve resistance mechanisms. The unique potency of defensin 1 against *M. catarrhalis* may reflect the presence of multiple disulfide bonds that help to stabilize the peptide and prevent degradation [13]. The β -sheet secondary structure may also increase stability by preventing the conformational changes that occur in α -helical AMPs. The enhanced stability of defensin 1 may explain its ability to inhibit the growth of *M. catarrhalis* in the BDM infection model, thus reducing the inflammatory host response triggered by bacterial cells. The timing of defensin 1 administration 1 or 5 h post-infection was chosen to mimic the clinical environment, where anti-microbial treatment tends to be initiated shortly after infection. We found that defensin 1 treatment 1 h post-infection was slightly more effective than the treatment after 5 h, which we attribute to a more comprehensive establishment of infection and more robust bacterial growth at the 5 h time point. The approval of AMPs for the treatment of severe infections is pending [14], but it is important to note that AMPs not only act as potent direct antimicrobial agents but also as immunomodulators, thus helping to marshal the immune system against invading pathogens [15]. For example, AMPs can influence immune

cell differentiation, the stimulation of chemotaxis, anti-endotoxin activity, initiation of adaptive immunity, and suppression of the TLR-mediated production of cytokines [16–18].

Among the 23 AMPs we tested, only defensin 1 was previously found to be effective against the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae* [7]. It is unclear whether the efficacy of defensin 1 indeed lies in the structure of the peptide and whether other AMPs with different structures would also show activity against *M. catarrhalis*. We therefore also investigated *L. sericata* sarcotoxin 1 C, which has a linear α -helical structure without disulfide bridges. This AMP was efficient at a concentration of 0.39 μM , making it considerably more potent than defensin 1 in stopping bacterial growth in solution. Given their different chemical structures and the different efficacies of defensin 1 and sarcotoxin 1 against *M. catarrhalis*, we tested whether their capacity to inhibit growth was bactericidal or bacteriostatic. While defensin 1 completely prevented bacterial growth also after its dilution, *M. catarrhalis* resumed growth after treatment with sarcotoxin 1 C. This suggests that defensin 1 has bactericidal capacity, while the effect of sarcotoxin 1 C is primarily bacteriostatic, as has been described before for the respective molecule class [19,20].

We furthermore tested the effect of defensin 1 and sarcotoxin 1 C on the commensals *E. faecalis* and

E. coli. Selectivity of AMPs may provide an important therapeutic advantage over broad-spectrum antibiotics because AMPs targeting pathogens but not commensals would avoid the common side effects of antibiotic therapy. Intriguingly, whereas sarcotoxin 1 C efficiently inhibited the growth of Gram-negative *E. coli* as previously reported [21], it showed no activity against Gram-positive *E. faecalis*. Sarcotoxin 1 C was previously shown to inhibit 90% of clinical multidrug-resistant isolates of *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* and *Salmonella enterica*, and pharmacological profiling revealed a good *in vitro* therapeutic index, no cytotoxicity or cardiotoxicity, an inconspicuous broad-panel off-target profile, and no acute toxicity in mice at a dose of 10 mg/kg [21]. Defensin 1 had had no effect against either commensal species in a previous study [20]. Cationic murine α -defensins, which have a predominantly β -sheet secondary structure and contain disulfide bonds, have been shown to kill *E. coli* [22]. Sarcotoxin 1 C and defensin 1 are cationic AMPs, allowing them to bind the outer membrane of Gram-negative bacteria and the cell wall of Gram-positive bacteria [23]. More mechanistic data are required to shed light on the selective action of the AMPs we describe and their association with different bacterial membrane and cell wall structures.

In summary, we have characterized the activity of defensin 1 against *M. catarrhalis* and confirmed its negligible activity against the commensals *E. faecalis* and *E. coli*. In contrast, we found that sarcotoxin 1 C was active against *M. catarrhalis* and *E. coli*, but ineffective against *E. faecalis*. We conclude that both sarcotoxin 1 C and defensin 1 are promising leads for the development of new antibiotics against *M. catarrhalis* infections, and that defensin 1 is particularly suitable due to its negligible effect against selected commensal flora. While the effects of defensin 1 and sarcotoxin have partly been described before, the strength of our study lies in the direct comparison of their action against commensal and pathogenic bacteria. With *M. catarrhalis*, we chose an important pathogen with potentially chronic disease manifestation, which we show for the first time to be sensitive to defensin 1 and sarcotoxin 1 C. The clinical implications of AMPs against pathogens of the airways necessitates development of topical application of AMPs to the lung epithelium, which requires the large-scale production of AMPs as aerosol formulations [24]. Recently, successful attempts have been made to neutralize *Pseudomonas aeruginosa* with AMPs coupled to nanoparticles in a mouse model [25], and also to render AMPs inhalable by spray-drying [26]. In the advent of

spreading antibiotic resistance, AMPs hold great potential as successors or support of classical antibiotic treatment.

Acknowledgments

The authors thank Richard M. Twyman for manuscript editing.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

Funding

Parts of this work were funded by the Kempkes Foundation (04/2016) to WB, the Bundesministerium für Bildung und Forschung (e:Med CAPSYS - FKZ 01ZX1604E; JPI-AMR – FKZ 01KI1702; ERACoSysMed2 – SysMed-COPD – FKZ

031L0140, <http://www.bmbf.de/>) to BS, German Center for Infectious Disease Research (DZIF) to NSL, Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB/TR-84 TP C01; <http://www.sfb-tr84.de/>) to BS, Hessisches Ministerium für Wissenschaft und Kunst (LOEWE Medical RNomics - FKZ 519/03/00.001-0003); <http://www.proloewe.de/medicalrnomics>) to BS.

ORCID

Wilhelm Bertrams <http://orcid.org/0000-0002-0180->

Bernd Schmeck  <http://orcid.org/0000-0002-2767->

References

- [1] Augustyniak D, Seredyński R, McClean S, et al. Virulence factors of *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles are major targets for cross-reactive antibodies and have adapted during evolution. *Sci Rep*. 2018;8(1):4955.
- [2] Murphy TF, Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):124–131.
- [3] Verduin CM, Hol C, Fleer A, et al. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):125–144.
- [4] Ioannidis JP, Worthington M, Griffiths JK, et al. Spectrum and significance of bacteremia due to *Moraxella catarrhalis*. *Clin Infect Dis*. 1995;21(2):390–397.
- [5] Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):56–66.
- [6] O'Neill J (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- [7] Lindhauer NS, Bertrams W, Pöppel A, et al. Antibacterial activity of a *Tribolium castaneum*

- defensin in an in vitro infection model of *Streptococcus pneumoniae*. *Virulence*. 2019;10 (1):902–909.
- [8] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*. 2011;29(9):464–472.
- [9] Poppel AK, Vogel H, Wiesner J, et al. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59 (5):2508–2514.
- [10] Hodges JL, Lehmann EC. Rank methods for combination of independent experiments in the analysis of variance. *Ann Math Stat*. 1962;33:482–497.
- [11] Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol Med*. 2016;22(6):458–478.
- [12] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389–395.
- [13] Rajamuthiah R, Jayamani E, Conery AL, et al. A defensin from the model beetle *Tribolium castaneum* acts synergistically with telavancin and daptomycin against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS One*. 2015;10(6):e0128576.
- [14] Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006;24(12):1551–1557.
- [15] Kosikowska P, Lesner A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(6):689–702.
- [16] Davidson DJ, Currie AJ, Reid GSD, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*. 2004;172(2):1146–1156.
- [17] Van Der Does AM, Bogaards SJP, Ravensbergen B, et al. Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-driven monocyte differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):811–816.
- [18] Mahlapuu M, Hakansson J, Ringstad L, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:194.
- [19] Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med Entomol*. 1998;35(4):458–464.
- [20] Tonk M, Knorr E, Cabezas-Cruz A, et al. *Tribolium castaneum* defensins are primarily active against Gram-positive bacteria. *J Invertebr Pathol*. 2015;13 2:208–215.
- [21] Hirsch R, Wiesner J, Marker A, et al. Profiling antimicrobial peptides from the medical maggot *Lucilia sericata* as potential antibiotics for MDR Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74 (1):96–107.
- [22] Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 1999;286(5437):113–117.
- [23] Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *J Dent Res*. 2017;96(3):254–260.
- [24] Tonk M, Vilcinskas A. The medical potential of antimicrobial peptides from insects. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(5):554–575.
- [25] Falciani C, Zevolini F, Brunetti J, et al. Antimicrobial peptide-loaded nanoparticles as inhalation therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:1117–1128.
- [26] Kwok PC, Grabarek A, Chow MYT, et al. Inhalable spray-dried formulation of D-LAK antimicrobial peptides targeting tuberculosis. *Int J Pharm*. 2015;491 (1–2):367–374.

5.2.1 Ergänzende Abbildungen von Publikation 2:

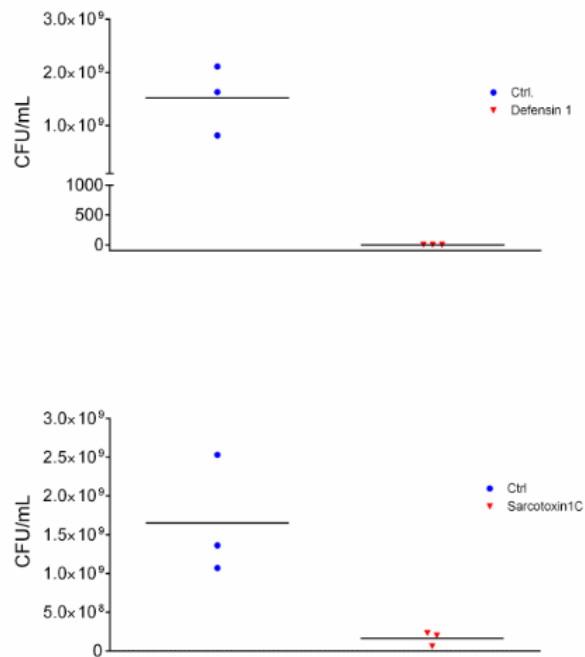


Figure S1:

M. catarrhalis was grown to the mid-exponential phase ($\sim 5 \times 10^8$ cells/ml) in BHI medium in the presence of defensin 1 (12.5 μ M) or sarcotoxin 1C (0.39 μ M) before dilution in PBS containing 0.15% gelatin, and directly plated on sheep blood agar. They were cultivated for a further 15 h at 37 °C and 5% CO₂ in serial dilution before manual counting of the colonies on each plate.

Abbildungen

Tabelle1: Charakterisierung der auf *Moraxella catarrhalis* getesteten Antimikrobiellen Peptide (AMP) mit der minimal inhibitorischen Konzentration (MIC).
S.p. = *Streptococcus pneumoniae*, *M.c.* = *Moraxella catarrhalis*. *E. faecalis* = *Enterococcus faecalis*. *E. coli* = *Escherichia coli*. AMP= Antimikrobielles Peptid.
 AS = Aminosäure. pI = Isoelektrischer Punkt. MW = Molekulargewicht in kiloDalton. (Publikation 2 modifiziert von Nora Lindhauer)

MIC <i>S.p.</i>	MIC <i>M.c.</i>	MIC <i>E. faecalis</i>	MIC <i>E. coli</i>	AMP Name	AMP Klasse	Insekt	AS- Sequenz	pI	MW (kDa)	Modifikation
>25 µM	0,195 µM	n.t.	n.t.	Cecropin A	α- helikal	<i>Hyalophora cecropia</i>	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQA TQIAK	10,39	4,00	N-term. Amidierung
>25 µM	0,39 µM	n.t.	n.t.	Sarcotoxin IA	α- helikal	<i>Sarcophaga peregrina</i>	GWLKKGKKIERVGGHTRDATIQGLGIAQQA ANVAATAR	11,07	4,16	N-term. Amidierung
>25 µM	1,56 µM	n.t.	n.t.	Cecropin A	α- helikal	<i>Aedes aegypti</i>	GGLKKGKLEGAGKRVFNAAEKALPVGAG AKALRK	10,79	3,68	keine
>25 µM	>25µM	n.t.	n.t.	Ceratotoxin		<i>Ceratitis capitata</i>	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALP	10,70	2,87	keine
>25 µM	> 25 µM	n.t.	n.t.	Stomoxyn	α-helikale	<i>Stomoxys calcitrans</i>	RGFRKHFNKLKVKHTISETAHVAKDTAVIA GSGAAVVAAT	10,66	4,42	N-tem. Amidierung
>25 µM	> 25 µM	n.t.	n.t.	Spinigerin	linear	<i>Pseudacanth o-terms spiniger</i>	HVDKQVADKVLKLLKQLRIMRLLTRL	11,07	3,00	keine

>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Apidaecin Ia	Prolinreich	<i>Apis mellifera</i>	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	11,71	2,11	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Apidaecin	Prolinreich	<i>Bombus pascuorum</i>	GNRPVYIPPPRPPHPRL	11,71	1,96	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Formaecin-1	Prolinreich	<i>Myrmecia gulosa</i>	GRPNPVNNKPTPHPRL	12,01	1,80	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Drosocin	Prolinreich	<i>Drosophila melanogaster</i>	GKPRPYSPRPTSHRPIRV	12,01	2,20	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Pyrrhocoricin	Prolinreich	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	10,27	2,34	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Metalnikowin-1	Prolinreich	<i>Palomena prasina</i>	VDKPDYRPRRPPNM	9,98	1,84	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Metalnikowin-2A	Prolinreich	<i>Palomena prasina</i>	VDKPDYRPRPWPRPN	9,98	1,84	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Lebocin-1	Prolinreich	<i>Bombyx mori</i>	DLRFLYPRGKLPVPTPPPFNPKPIYIDMGNRY	9,82	3,77	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Abaecin	Prolinreich	<i>Bombus pascuorum</i>	FVPYNPPRPGQSKPFPSFPGHGFNPKIQW PYLPPNPGH	10,00	4,39	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Metchnikowin-1	Prolinreich	<i>Drosophila melanogaster</i>	HRHQGFIFDTRPSPFNPNQPRPGPIY	10,74	3,03	keine
>25 µM	>25 µM	n.t.	n.t.	Metchnikowin-2	Prolinreich	<i>Drosophila melanogaster</i>	HRRQGFIFDTRPSPFNPNQPRPGPIY	11,54	3,04	keine

12,5 µM	12,5 µM	- 12,5 µM	> 25 µM	Defensin 1	Disulfidbrücke	<i>Tribolium castaneum</i>	VTCDLLSAEAKGVKNHAACAAHCLLKRKR GGYCNKRRICVCRN	9,70	4,83	keine
>25 µM	- 25 µM	n.t.	n.t.	Cecropin-like	α-helikal	<i>Lucilia sericata</i>	HHLFGKVGREIERSAHKVGHKLEHVRHEVSK TAKKVDKVVGHIKTAKKVVAAGAIAGVVAA A	10,35	6,66	Keine
>25 µM	0,195 µM	n.t.	n.t.	Cecropin	α-helikal	<i>Galleria mellonella</i>	KWKIFKKIEKAGRNIRDGIIKAGPAVSVVGEA ATIYKTG	10,21	4,21	N-term. Amidierung
n.t.	0,37 µM	>25 µM	0,185 µM	Cecropin (Sarcotoxin 1C)	α-helikal	<i>Lucilia sericata</i>	GWLKKGKKIERVQHQTRDATIQTIGVAQQA ANVAATLKG	10,56	4,26	N.-term. Amidierung
n.t.	12,5 µM	n.t.	n.t.	Stomoxyn start G	α-helikal	<i>Lucilia sericata</i>	GFRKRFNKLVKVKHTIKETANVSKDVAIVAG SGVAVGAAMG	10,73	4,38	N-term. Amidierung
n.t.	1,56 µM	n.t.	n.t.	Cecropin (Sarcotoxin)	α-helikal	<i>Eristalis tenax</i>	GFLKKGKKLEGAVQRTRDATIQTIAVAQAAA NVAATAKQ	10,56	4,14	N-term. Amidierung

Angaben der eigenen Anteile an der für die Dissertation berücksichtigten Publikationen

5.2.2 Publikation 1:

Lindhauer, Nora S.; Bertrams, Wilhelm; Pöppel, Anne; Herkt, Christina E.; Wesener, Andre; Hoffmann, Kerstin et al. (2019): Antibacterial activity of a *Tribolium castaneum* defensin in an *in vitro* infection model of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Virulence* 10 (1), S. 902–909. DOI: 10.1080/21505594.2019.1685150.

Der Eigenanteil zur Erstellung dieser Publikation umfasst den Versuchsaufbau zum Makrophagen-Infektions-Modell, die Versuchsdurchführung aller Versuche mit Ausnahme des Multiplex-*ELISA*, und des Hämolyse-Assays. Die Datenanalyse und Statistik zu den Abb. 1,2 und 3 wurde von mir angefertigt und von Herrn Dr. Wilhelm Bertrams überarbeitet. Die Statistik zu Abb. 4 wurde von Dr. Brandon Greene aus dem Institut für Medizinische Bioinformatik und Biostatistik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Der Versuch zu Abb. 4 (Multiplex *ELISA*) wurde mit Hilfe von Frau Kerstin Hoffmann durchgeführt. Frau Dr. Miray Tonk aus dem Institut für Insektenbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen erstellte den Versuchsaufbau, führte den Versuch durch und wertete die Daten zum Hämolyse-Assay mit Defensin 1 aus. Das Manuskript habe ich mit Unterstützung von Herrn Dr. Wilhelm Bertrams und Herrn Prof. Dr. Bernd Schmeck geschrieben und die präsentierten Abbildungen erstellt.

5.2.3 Publikation 2:

Wilhelm Bertrams, **Nora S Lindhauer**, Marie Christin Rieke, Anne Paas, Kerstin Hoffmann, Brandon Greene, Alexander Visekruna, Andreas Vilcinskis, Kerstin Seidel, Bernd Schmeck (2021): *Tribolium castaneum* defensin 1 kills *Moraxella catarrhalis* in an *in vitro* infection model but does not harm commensal bacteria. In *Virulence* 12:1, S. 1003-1010 PMID: 33843461 DOI: 10.1080/21505594.2021.1908741

Der Eigenanteil zur Erstellung dieser Publikation umfasst den Versuchsaufbau, die Versuchsdurchführung und die Datenanalyse zur Testung der 23 AMPs auf *M.c.* durch Wachstumskinetiken und *CFU-Assays* (Abb. 1a und 4e). Der Versuchsaufbau, die Versuchsdurchführung, die Datenanalyse und Statistik zu den Abb. 1b, 2,3 und 4 a-d,f wurden von Frau Christin Rieke, Frau Kerstin Hoffmann und Herrn Dr. Wilhelm Bertrams geplant und durchgeführt. Die Statistik zu Abb. 3 wurde von Dr. Brandon Green aus dem Institut für Medizinische Bioinformatik und Biostatistik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Das Manuskript wurde von Herrn Dr. Wilhelm Bertrams und Herrn Prof. Dr. Bernd Schmeck geschrieben, die präsentierten Abbildungen wurden von Herrn Dr. Wilhelm Bertrams und Frau Christin Rieke erstellt.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer im Rahmen meines vorklinischen und klinischen Studienabschnitts waren folgende Damen und Herren:

in Marburg:

Prof. Dr. Detlef K. Bartsch	Prof. Dr. Erika Baum
Prof. Dr. Stefan Bauer	Prof. Dr. Katja Becker
Prof. Dr. Stephan Becker	Prof. Dr. Roswitha Berger
Prof. Dr. Michael Bette	Prof. Dr. Siegfried Bien
Prof. Dr. Stefan Bösner	Prof. Dr. Alexander Brehm
Prof. Dr. Andreas Burchert	Prof. Dr. Yalcin Cetin
Herr Jens Cordes	Prof. Dr. Frank Czubayko
Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut	Prof. Dr. Niels Decher
Prof. Dr. Norbert Donner-Banzhoff	Prof. Dr. Carsten Eggers
Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic	Prof. Dr. Volker Fendrich
Dr. Beate Feuser	PD Dr. Barbara Fritz
Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann	Dr. Sven Fuest
Dr. Anja Gerstner	Prof. Dr. Christian Görg
Prof. Dr. Thomas Gress	Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik
Prof. Dr. Michael Hertl	Prof. Dr. Thomas Heyse
Prof. Dr. Rainer Hofmann	Dr. Fritz Holst
Prof. Dr. Katharina Holzer	Prof. Dr. Joachim Hoyer
Dr. Andreas Jerrentrup	Prof. Dr. Dr. Peter H. Kann
Prof. Dr. Clemens Kill	Prof. Dr. Ralf Kinscherf
Prof. Dr. Tilo Kircher	Prof. Dr. Klaus-Jochen Klose
Prof. Dr. Susanne Knake	PD Dr. Michael Knipper
Prof. Dr. Arne König	Dr. Barbara Leinweber
Prof. Dr. Roland Lill	Prof. Dr. Georg Lüers
Prof. Dr. Michael Lohoff	Prof. Dr. Andreas Mahnken
Prof. Dr. Andrea Maisner	Dr. Christoph Mann
PD Dr. Katja Menzler	Dr. Stephan Metzelder
Prof. Dr. Roland Moll	Dr. Leona Möller
Prof. Dr. Rainer Moosdorf	Prof. Dr. Rolf Müller
Prof. Dr. Dr. Andreas Neff	Prof. Dr. Igor Nenadić
Prof. Dr. Andreas Neubauer	Prof. Dr. Bernhard Neumüller
Prof. Dr. Christopher Nimsky	Prof. Dr. Johannes Oberwinkler
Prof. Dr. Dr. Wolfgang H. Oertel	Prof. Dr. Dominik Oliver
Prof. Dr. Axel Pagenstecher	Dr. David Pedrosa
Prof. Dr. Tim D. Plant	PD Dr. Regina Preisig-Müller
Dr. Annette Ramaswamy	Prof. Dr. Harald Renz
Prof. Dr. Gerd Richter	Dr. Jorge Riera-Knorrenschild

PD Dr. Anja Rinke
Prof. Dr. Volker Roelcke
Prof. Dr. Steffen Ruchholtz
Prof. Dr. Helmut Schäfer
Prof. Dr. Bernhard Schieffer
Prof. Dr. Bernd T. Schmeck
Prof. Dr. Rainer Schwarting
Prof. Dr. Guido Seitz
Prof. Dr. Walter Sekundo
Prof. Dr. Birte Steiniger
Prof. Dr. Afshin Teymoortash
Prof. Dr. Lars Timmermann
Prof. Dr. Sebastian Vogt
Prof. Dr. Eberhard Weihe
PD Dr. Reiner Westermann
Prof. Dr. Hinnerk Wulf

Prof. Dr. Manfred Riße
Dr. Birgit Rost
Prof. Dr. Irmtraut Sahmland
Prof. Dr. Jürgen Schäfer
Prof. Dr. Joachim Schneider
Prof. Dr. Stephan Schmidt
PD Dr. Carola Seifart
Dr. Maria Seipelt
Dr. Ole Simon
Dr. Tina Stibane
Prof. Dr. Kati Thieme
Prof. Dr. Claus Franz Vogelmeier
Prof. Dr. Uwe Wagner
Prof. Dr. Jochen A. Werner
Dr. Christian Wrocklage

in Fulda:

Dr. Michael Buhl
PD Dr. A. Hellinge
Dr. I. Hofman
Prof. Dr. Reinald Repp
Dr. Johannes Weber

Prof. Dr. H. Dörge
Prof. Dr. M. Hessmann
Dr. Gunter Isselstein
Dr. Christian Weber

in Sierre/Sion:

Dr. Carlos Alejandro Apestegui
Dr. Ian Fournier
Dr. Edouard Mas
Dr. Christine Maurus

Dr. Michel Christodoulou
Dr. Boumediene Guendil
Dr. Ioannis Rotas