

Aus dem
Institut für Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Professor Doktor Stefan Bauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Antibakterielle und antivirale Wirkung des *human
bactericidal permeability increasing protein* und hieraus
abgeleiteter Peptide

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

Dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Matthias Patrick Rosenthal aus Stuttgart

Marburg 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg

am: 20.12.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. M. Schnare

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Visekruna

Widmung

Meinen Eltern, meiner Liebe und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Verzeichnisse	
1.1 Abbildungsverzeichnis.....	
1.2 Tabellenverzeichnis.....	
1.3 Abkürzungsverzeichnis.....	
2 Einleitung	
2.1 Bakterien und bakterielle Schutzmechanismen.....	
2.2 Die Rolle antimikrobieller Peptide und Proteine im Immunsystem.....	
2.3 Das Bakterien-permeabilisierende Protein (BPI).....	
2.3.1 Familie, Lokalisation und Regulation von BPI.....	
2.3.2 Aufbau und Wirkung von BPI.....	
2.3.3 Entwicklungen von BPI Peptiden zu therapeutischen Zwecken.....	
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	
3 Material	
3.1 Geräte.....	
3.2 Glas und Plastikmaterialien.....	
3.3 Chemikalien und Reagenzien.....	
3.4 Kits und sonstige Materialien.....	
3.5 Puffer und Lösungen.....	
3.6 Nährmedien.....	
3.7 verwendete Proteine.....	
3.8 Antikörper.....	
3.9 Bakterien.....	
3.9.1 Grampositive Bakterien.....	
3.9.2 Gramnegative Bakterien.....	
3.10 Viren.....	
3.11 Zelllinien.....	
3.12 Software.....	
4 Methoden	
4.1 Zellkultur.....	
4.1.1 Insekten-Zellkultur.....	

4.1.2	MDCK-H Zellkultur.....
4.2	Aufreinigung und Analyse von rekombinantem huBPI-Protein.....
4.2.1	Aufreinigung von rekombinantem huBPI mittels Affinitäts- chromatographie.....
4.2.2	Ankonzentrierung und Umpufferung der Proteine.....
4.2.3	Proteinauftrennung durch SDS-PAGE.....
4.2.4	Western-Blot.....
4.2.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....
4.3	Bakterien.....
4.3.1	Kristallviolett-Adhäsionsassay.....
4.3.2	Antibakterielle Wirkung.....
4.4	Viren.....
4.4.1	Einzelzell-Infektions-Assay.....
4.4.2	Bestimmung des Virustiters.....
4.4.2.1	Antivirale Wirkung des huBPI-Protein bzw. -peptid.....
4.5	Ergebnisse der bakteriellen Versuche.....
4.5.1	Kristallviolett Adhäsionsassay.....
4.5.2	Inhibition von Bakterien.....
4.5.3	Inhibition bei grampositiven Bakterien.....
4.5.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i>
4.5.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse für <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> und <i>Streptococcus agalactiae</i>
4.5.4	Inhibition bei gramnegativen Bakterien.....
4.5.4.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4.5.4.2	<i>Escherichia coli</i>
4.5.4.3	<i>Enterobacter cloacae</i>
4.5.4.4	<i>Klebsiella</i> spp.....
4.5.4.5	<i>Proteus mirabilis</i>
4.5.4.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4.5.4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse für die Inhibition bei gramnegativen Bakterien.....
4.6	Ergebnisse der Versuche mit Influenzastämmen.....

5	Diskussion	
5.1	Die Herstellung von rekombinantem humanem BPI und nachfolgende Überprüfung der biologischen Aktivität.....	
5.2	Antibakterielle Wirkung bei Grampositiven Bakterien.....	
5.2.1	Ausblick zur therapeutischen Nutzung bei grampositiven Bakterien.....	
5.3	Antibakterielle Wirkung bei Gramnegativen Bakterien.....	
5.3.1	Resistenz bei Klebsiella spp. und Proteus mirabilis.....	
5.3.2	Sensibilität bei Acinetobacter spp., E. coli spp., Enterobacter cloacae und Pseudomonas aeruginosa.....	
5.3.3	Ausblick zur therapeutischen Nutzung bei gramnegativen Bakterien.....	
5.4	Inflenzaviren werden in ihrer Infektiosität durch huBPI-Peptid beeinflusst, wo rhuBPI keine Wirkung zeigt.....	
5.4.1	Therapeutische Perspektive bei Infektionen mit Viren.....	
6	Zusammenfassung	
7	Summary	
8	Literaturverzeichnis	
	Anhang	
8.1	Akademische Lehrer.....	
8.2	Danksagung.....	

1 Verzeichnisse

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau der bakteriellen Zellwand.....
Abbildung 2:	Funktion nach Domäne und Struktur des BPI.....
Abbildung 3:	huBPI induziert die Adhäsion von <i>S. Typhimurium</i> im Vergleich zum huBPI-Peptid.....
Abbildung 4:	huBPI Peptid und seine Verwandten haben nur geringe Wirkung auf das Wachstum von <i>Listeria monocytogenes</i>
Abbildung 5:	Rekombinantes huBPI Protein inhibiert das Wachstum von <i>Acinetobacter spp</i>
Abbildung 6:	Das huBPI-Protein hemmt das Wachstum von <i>E. coli</i> , während die Peptide keine antimikroibelle Wirkung zeigen.....
Abbildung 7:	Das huBPI-Protein hemmt das Wachstum von UPEC, ebenso trifft das auf die huBPI Peptid-Varianten 1 und 2 zu.....
Abbildung 8:	huBPI-Protein hemmt das Wachstum von <i>Enterobacter cloacae</i>
Abbildung 9:	huBPI und seine Verwandten Zeigen nur bei <i>Klebsiella oxytoca</i> eine leichte Inhibition.....
Abbildung 10:	huBPI Peptid und seine Verwandten inhibieren das Wachstum von <i>Proteus mirabilis</i> nicht.....
Abbildung 11:	huBPI-Peptid, huBPI-Protein und die Mutante 1 zeigen eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Abbildung 12:	huBPI-Peptid hemmt die Infektiosität von Inflenzaviren, das huBPI-Protein hemmt Inflenzaviren nicht.....
Abbildung 13:	Aminosäuresequenzen der huBPI-Peptide (Pinkenburg O et al, 2016).....
Abbildung 14:	Resistenztestung <i>Acinetobacter baumannii</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	
Tabelle 2: Glas- und Plastikmaterialien.....	
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	
Tabelle 4: Kits und sonstige Materialien.....	
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	
Tabelle 6: Nährmedien.....	
Tabelle 7: verwendete Proteine.....	
Tabelle 8: Antikörper.....	
Tabelle 9: grampositive Bakterien.....	
Tabelle 10: gramnegative Bakterien.....	
Tabelle 11: Viren.....	
Tabelle 12: Zelllinien.....	
Tabelle 13: Software.....	
Tabelle 14: Aufstellung der verwendeten Bakterien anhand des Färbeverhaltens bei der Gramfärbung und Einteilung nach der Bakterienfamilie.....	

1.3 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AMP	antimikrobielle Peptide/Proteine
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BPI	<i>bactericidal permeability increasing protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CuSO ₄	Kupfersulfat
<i>DH5α</i>	<i>E. coli</i> Stamm mit erhöhter Transformationseffizienz
D.Mel-2	<i>Drosophila melanogaster Schneider-2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrochlorid
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
huBPI	humanes BPI
<i>LB</i>	<i>lysogeny broth</i>
LBP	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mBPI	murines BPI
MDCK-2	<i>Madin Darby Canine Kidney Zellen</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rhuBPI	rekombinantes humanes BPI
SARS-CoV2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssp.	Spezies
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS-buffered saline</i> mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	<i>World Health Organization</i>

2 Einleitung

2.1 Bakterien und bakterielle Schutzmechanismen

Bakterien werden zur Domäne der Prokaryoten gezählt (Woese et al., 1990) und haben für den Menschen sowohl positive als auch negative Bedeutung.

Positive Eigenschaften nimmt die sogenannte residente Flora, zum Beispiel *Staphylococcus epidermidis*, wahr, die beispielsweise bei der Verdauung oder Besiedelung von Haut und Schleimhaut und daraus resultierender Verhinderung der Ansiedelung von Krankheitserregern entscheidende Rollen wahrnimmt (Davis, 1996).

Negativ für den Menschen ist die kleinere Gruppe der pathogenen Bakterien. Hier ist aber zu beachten, dass es neben den obligat pathogenen, zum Beispiel *Salmonella spp.*, auch fakultativ pathogene Erreger gibt wie *Escherichia coli*, die zur residenten Flora gehören (Davis, 1996).

Bakterien lassen sich auf verschiedene Arten unterscheiden, durch die Form, das Verhalten (Sporenbildung, anaerob/aerob) oder, für diese Arbeit am relevantesten, die histologische Färbung. Am bekanntesten bei der mikrobiologisch-histologischen Untersuchung von Bakterien ist die Gramfärbung. Hier differenziert man zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien (Hof et al., 2014). Darüber hinaus gibt es auch sogenannte gramvariable Bakterien, zum Beispiel *Clostridium tetani* (Beveridge, 1990), die abhängig vom Wachstum in der Färbung grampositiv oder gramnegativ reagieren und gram-unbestimmte Bakterien wie Mykoplasmen, die keine Zellwand besitzen (Hof et al., 2014).

Grampositive Bakterien, als Beispiel *Staphylococcus aureus*, verfügen über eine dicke Mureinschicht in ihrer Zellwand (Peptidoglykan), die für eine blaue Färbung im Präparat sorgt. Hingegen verfügen gramnegative Bakterien, als Beispiel *Escherichia coli*, zusätzlich über eine äußere Schicht (äußere Membran) der Zellwand aus Proteinen und Lipopolysacchariden (LPS), die ihnen einen zusätzlichen Schutz gegen Antibiotika verleihen und im Falle des LPS auch einen Aktivierungsreiz für die Immunabwehr darstellen (Abb. 1) (Hof et al., 2014).

In der folgenden Abbildung 1 sehen wir die Unterschiede einer grampositiven Zellwand von Bakterien (links) im Vergleich zur Zellwand gramnegativer Bakterien (rechts) schematisch dargestellt.

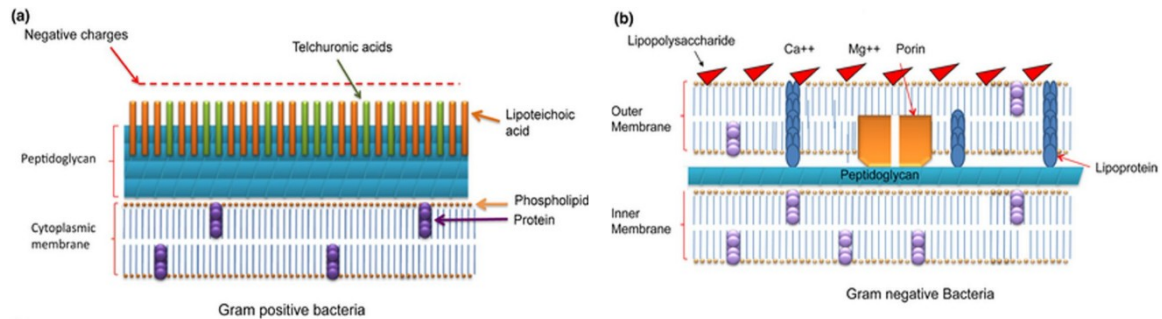


Abbildung 1: Aufbau der bakteriellen Zellwand

(modifiziert nach Vatansever et al., 2013)

Die unter Abbildung 1 a) dargestellte grampositive Zellwand besteht aus einer dicken Schicht aus Peptidoglykan (PGN) als Basis und beinhaltet neben Lipoteichon- und Teichonsäure noch diverse Proteine, aber kein LPS.

Unter Abbildung 1 b) zeigt sich die gramnegative Zellwand mit einer dünnen PGN-Schicht, dafür mit 2 Membranschichten, wobei die äußere von negativ geladenem, für die Stabilität relevantem, LPS besetzt ist. (Vatansever et al., 2013).

Bakterien verfügen über eine Reihe von Schutzmechanismen, hierunter ist auch die Zellwand zu betrachten, die ihnen helfen, sowohl dem Immunsystem als auch Antibiotika zu widerstehen. Dabei spielt unter anderem die enorme genetische Plastizität der Bakterien eine große Rolle. Diese genetische Plastizität ist entscheidend, dass Bakterien in der Umwelt neben Antibiotika-produzierenden Organismen existieren können. Die beiden Hauptstrategien hierfür sind die Mutagenese von Genen, die dann Resistenzen vermitteln können und der horizontale Gentransfer von Resistenzgenen, der auch über die Bakterien-speziesgrenzen hinweg erfolgen kann. Selten kommt es beim horizontalen Gentransfer zur Übertragung von reiner DNA. Dieses Phänomen wird als Transformation beschrieben, welches man sich in der Molekularbiologie zu Nutze macht. Die Weitergabe von bakterieller DNA neben der viralen DNA über Bakteriophagen (Transduktion) gehört ebenfalls mechanistisch zu den horizontalen Gentransfers. Auch hierbei können Resistenzgene übertragen

werden. Die im Gesundheitswesen relevanteste Form der Weitergabe über horizontalen Gentransfer stellt die Konjugation dar, bei der ganze Plasmide von einem auf das andere Bakterium übertragen werden kann. Daneben spielen Transposomen, mit denen bewegliche Gensegmente im Bakteriengenom an unterschiedliche Positionen gelangen und damit alternativ reguliert und exprimiert werden können, eine große Rolle. (Munita & Arias, 2016).

Die Schutzmechanismen lassen sich dabei in mehrere Untergruppen einteilen:

I) Veränderung des antibiotischen Moleküls

Die enzymatische Veränderung oder Zerstörung eines antibiotischen Moleküls ist ein klassischer Resistenzfaktor bei grampositiven und gramnegativen Bakterien. Es gibt eine sehr große Anzahl an Enzymen, die als Transferasen Acetyl-, Adenyl- oder Phosphorylgruppen anfügen können und so die Gruppe der Aminoglykoside, Chloramphenicol und die Lincosamide unwirksam machen können (Munita & Arias, 2016).

Bekannte Zerstörer von antibiotischen Molekülen sind Betalaktamasen, die bereits in den frühen 1940ern vor der Markteinführung von Penicillin beschrieben wurden. Hier kommt es zur Spaltung des Betalaktamringes von Penicillinen, Cephalosporinen und den neueren Carbapenemen (Munita & Arias, 2016). Aus diesem Grund wurden eine Reihe von Betalaktamasehemmern, zum Beispiel Clavulansäure, entwickelt.

II) Reduktion der intrazellulären Konzentration antibiotischer Moleküle

Bei gramnegativen Bakterien ist die, im Vergleich zu grampositiven, Zellwand noch durch eine äußere Schicht geschützt, die ein Eindringen von Fremdstoffen verhindert. Die Resistenz gegen das Glykopeptid Vancomycin ist hierfür das beste Beispiel. Das Molekül ist aufgrund seiner Größe nicht in der Lage, die äußere Membran zu durchdringen und ist daher bei allen gramnegativen Bakterien unwirksam. Bei hydrophilen Molekülen wie Betalaktamen, Tetracyclinen und Fluorchinolonen kann die Veränderung von Porinen, die im unveränderten Zustand ein Durchtreten der genannten Antibiotika durch die Zellwand ermöglichen, den gleichen Effekt verursachen (Munita & Arias, 2016).

Die Bildung von Biofilmen zählt zu den klinisch bedeutsamsten Schutzmechanismen der Bakterien. Gerne werden Endoprothesen und Urinkatheter mit

bakteriellen Biofilmen besiedelt, sie können aber auch zwischen benachbarten Bakterien entstehen. Biofilme bestehen neben Bakterien aus einer extrazellulären Matrix, die aus Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden aufgebaut wird. Ihre Aufgabe ist es, für Antibiotika aber auch für das Immunsystem eine Barriere darzustellen und die Bakterien im Biofilm dadurch vor deren Wirkung zu schützen (Roy et al., 2018).

Eine andere Methode antibiotisch wirksame Substanzen aus dem Zellinneren der Bakterien zu entfernen, stellen Effluxsysteme (Pumpen) dar, die Moleküle aktiv aus dem Bakterium hinausbefördern und sowohl bei grampositiven als auch gramnegativen Bakterien vorkommen. 1980 wurde die erste Familie an Pumpen bei *E. coli* gefunden, deren Aufgabe der Transport von Tetrazyklinen mittels Protonenaustausch ist (Ball et al., 1980). Im Bereich der grampositiven Bakterien ist die Resistenz der Bakterien gegen Makrolide bei *S. pyogenes* das am besten beschriebene Beispiel für hochwirksame Effluxsysteme (Munita & Arias, 2016).

III) Schutz und Veränderung der Angriffspunkte

Eines der bekanntesten Beispiele für den Schutz eines Angriffspunktes ist die Resistenz von Bakterien gegenüber Tetrazyklinen, deren Ziel das bakterielle Ribosom ist. Die am besten studierten Resistenzfaktoren Tet[M] und Tet[O] sind in der Lage, das Tetrazyklin vom Ribosom wieder zu lösen und die Bindungsstelle zu verändern oder zu blockieren, so dass Tetrazykline unwirksam werden (Connell et al., 2003).

Die Veränderung der Angriffspunkte ist im Vergleich zum Schutz der Angriffspunkte sowohl häufiger als auch vielseitiger. So kann die Mutation des entsprechenden Resistenzgens dazu führen, dass die Angriffspunkte der antibiotischen Therapie enzymatisch verändert werden oder dass diese Angriffspunkte von den Bakterien umgangen werden können oder die Proteine, die den Angriffspunkt der Therapie darstellen, durch alternative Proteine ersetzt werden, die nicht Ziel der Antibiose sind. In der Summe bewirken diese Mechanismen, dass die Wirkung der antibiotischen Moleküle herabgesetzt wird (Munita & Arias, 2016).

Zum Beispiel ist die Resistenz gegenüber Rifampicin über Punktmutationen, die zu Aminosäuresubstitutionen während der Translation der bakteriellen RNA-

Polymerase führen, vermittelt, was letztendlich die Affinität des Antibiotikums gegenüber der RNA-Polymerase herabsetzt (Munita & Arias, 2016).

Die enzymatische Veränderung beinhaltet häufig die Methylierung, beispielsweise von Ribosomen durch ein Mitglied der weit verbreiteten *erythromycin ribosomal methylation enzyme* (erm) Familie. Dieser Resistenzmechanismus verhindert die Wirksamkeit der Antibiotika auf der einen Seite, geht aber gleichzeitig mit einer stark eingeschränkten Translation durch das methylierte Ribosom einher. Deshalb findet die erm-Synthese nur in Anwesenheit der entsprechenden Antibiotika statt. Diesen Resistenzmechanismus findet man häufig unter der Therapie mit Makroliden und Lincosamiden (Leclerq, 2002).

Die Stabilisierung der bakteriellen Zellwand geschieht über Quervernetzungen der langen Ketten, bei denen das *peptidoglycan binding protein* (PBP), Zielstruktur von Betalaktamen und Glykopeptiden, eine entscheidende Rolle einnimmt. Die Resistenz gegen Betalaktame stützt sich hierbei auf die Expression eines alternativen PBP, nämlich des PBP2A, das eine weitaus geringere Affinität zu Betalaktamen hat (Chambers & Deleo, 2009). Die Resistenz gegenüber Glykopeptid-Antibiotika wird durch das *van gene cluster* vermittelt, hierbei wird die Interaktion von Vancomycin mit dem bakteriellen Peptidoglykan herabgesetzt und dadurch gestört. Diese beiden Resistenzsysteme sind nur bei Anwesenheit der entsprechenden Antibiotika in den Bakterien aktiv (Munita & Arias, 2016).

IV) Resistenz durch zelluläre Veränderung

Das Lipopeptid Daptomycin ist ein Verwandter der immuneigenen *cationic antimicrobial protein* (CAMP) Peptide. Es verursacht, nach Calcium-abhängigem Eindringen in die Zellmembran, durch die Ausbildung von transmembranen Poren bei grampositiven Bakterien die Depolarisation der Zellmembran mit resultierender Störung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese. Hierbei kommt es nicht zu einer Lyse der Bakterien (Müller et al., 2016).

Die Resistenz gegen Daptomycin wird über das dreiteilige LiaSFR System vermittelt, das aus einem Transmembranprotein LiaF, einer Kinase LiaS und dem Regulator LiaR besteht und die Stressreaktion der bakteriellen Membran steuert (Davlieva et al., 2018). Die unter Anwesenheit von Daptomycin verdickte Zellmembran und die deutlich reduzierte Fluidität der Zellmembran durch

gesteigerte Aktivität von LiaR scheint hier die Ursache der Resistenz zu sein und ist Gegenstand weiterer Forschungen (Bender et al., 2018).

Das Bakterien über Systeme verfügen, um antimikrobielle Proteine wie CAMP oder synthetische Verwandte zu überleben, ist ein evolutionsbedingter Resistenzfaktor. Bakterien haben es aber bisher nicht geschafft, Resistenzen gegen die gesamte Bandbreite antimikrobieller Proteine zu entwickeln, was hier natürlich weitere therapeutische Möglichkeiten eröffnet (Kraus & Peschel, 2006).

2.2 Die Rolle antimikrobieller Peptide und Proteine im Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in einen angeborenen und einen erworbenen Bereich einteilen, wobei der erworbene Bereich sich erst im Laufe des Lebens entwickelt und sich primär auf B- und T-Zellen stützt.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie unseres Körpers zur Bekämpfung von Krankheitserregern dar. Dabei spielen Zellen wie Granulozyten und Makrophagen aber auch das Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine und antimikrobielle Peptide und Proteine (AMP) eine wesentliche Rolle. Das angeborene Immunsystem wird hierdurch in die Lage versetzt, schneller auf eindringende Krankheitserreger zu reagieren, beziehungsweise diese bereits vorher zu zerstören, bevor die Erreger in den Körper vordringen können. AMP finden sich sowohl bei Tieren (Hancock et al., 2000) als auch bei Pflanzen (Garcia-Olmedo et al., 1998).

AMP werden unter anderem von Zellen der Haut und Schleimhaut gebildet, so dass sich hohe Konzentrationen beim Menschen im Bereich des Magen-Darm-Traktes, der Atemwege und der Tränenflüssigkeit zeigen.

Da neutrophile Granulozyten über Chemotaxie sehr schnell aus dem Blut an den Ort einer Infektion gelangen können und dort Mikroorganismen mit Hilfe von sezernierten AMP bekämpfen, ist bei diesem Immunzelltyp die Expression von AMP für ihre Funktion sehr wichtig (Gudmundsson et al., 1999).

Die freigesetzten AMP greifen Krankheitserreger auf verschiedene Weisen an. Bei Bakterien und Pilzen wird am häufigsten die Zellwand zerstört (Sharma et al., 2016; Buda De Cesare et al., 2020). Es gibt allerdings auch AMP, die intrazelluläre Ziele angreifen (Cardoso et al., 2019).

Im Bereich der Bekämpfung von Infektionen mit gramnegativen Bakterien spielt die Neutralisation von Lipopolysacchariden (LPS) aus der Zellwand der Bakterien eine wichtige Rolle. LPS ist ein sehr starker Induktor der Inflammation, der experimentell in der Lage ist, einen Endotoxinschock hervorzurufen. Dadurch führt die Neutralisation von LPS zur Kontrolle der Entzündungsreaktion während der Infektion (Sun et al., 2015).

Neben der antibakteriellen Wirksamkeit zeigen verschiedene AMP auch antivirale Wirkungen. Dabei können direkte Interaktionen der AMP mit der Virushülle auftreten, was zu einer Deformation der Virushülle führt und die Infektiosität der Viren reduziert. Darüber hinaus können AMP eingelagert in *neutrophil extracellular traps* (NET), die von neutrophilen Granulozyten ausgebildet werden, mit Viren im Extrazellularraum interagieren (u. a. Influenza A) und sie können die intrazelluläre Virussynthese stören (Ahmed et al., 2019).

Ein Vertreter der AMP mit sowohl antiviralen als antibakteriellen Eigenschaften ist das *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI).

2.3 Das Bakterien-permeabilisierende Protein (BPI)

2.3.1 Familie, Lokalisation und Regulation von BPI

BPI ist Teil einer Familie von lipidbindenden Glykoproteinen, die multiple Funktionen aufweisen können und aufgrund des röhrenförmigen, zum Transport von Lipiden genutzten, Hohlraumes auch als *tubular lipid-binding proteins* bezeichnet werden (TULIP; Abb.2) (Kopec et al., 2011)

Nicht immunologisch relevante Vertreter der BPI-Protein-Familie sind *cholesterol ester transfer protein* (CETP) und *phospholipid transfer protein* (PLTP), die im Bereich des Cholesterinstoffwechsels eine Rolle spielen (Chowaniec et al., 2018).

Immunologisch aktive Mitglieder der Proteinfamilie sind neben BPI und dem *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) auch die *palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein* (PLUNC)-Familie, die sich in *short* (s) PLUNC und *long* (l) PLUNC Proteine aufteilen und primär in den Atemwegen zu finden sind. Sie ähneln strukturell BPI und LBP. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit und der Ähnlichkeit in der genomischen Organisation geht man davon aus, dass die

Familie durch die Duplikation eines einzelnen Genes entstand (Bingle et al., 2004).

Charakteristisch für diese Proteine ist ihre Fähigkeit, verschiedene Lipidstrukturen zu binden, dabei wirkt BPI aufgrund seiner hohen Affinität zu LPS antiinflammatorisch und bakterizid während LBP proinflammatorisch wirkt. LBP ist ein in der Leber produziertes Akute-Phase-Protein, das LPS bindet. Dabei löst LBP LPS-Monomere aus einer Mizellenstruktur von komplexiertem LPS, welches in dieser Mizellenstruktur nicht vom Immunsystem wahrgenommen wird, heraus. Anschließend gibt LBP das monomere LPS an CD14 weiter, was zur Bildung des LPS-CD14 Komplexes und über den MD-2/TLR4 (*Toll-like receptor 4*) zur Aktivierung TLR4 positiver Zellen führt (Weiss, 2003).

BPI hingegen wird unter anderem in neutrophilen Granulozyten gebildet, ist aber auch in niedrigerer Konzentration in eosinophilen Granulozyten vorhanden, die ebenfalls Phagozytose betreiben können. Unter Anwesenheit von bestimmten Mediatoren können eosinophile Granulozyten sogar besser als Makrophagen und Neutrophile phagozytieren. (Beeken et al., 1987; Weiss & Olson, 1987; Yazdanbakhsh et al., 1986). Während BPI von Granulozyten freigesetzt wird, tragen humane Makrophagen BPI auf ihrer Zellmembran, was bei der Bindung von Bakterien an das zellmembranständige BPI die Phagozytose induziert (Balakrishnan et al., 2016).

Neben Immunzellen scheinen auch epitheliale Zellen im oralen, pulmonalen, gastrointestinalen und im weiblichen Genitalbereich in der Lage zu sein, BPI zu bilden und so zu einer effektiven Verteidigung beizutragen (Canny et al., 2002; Canny et al., 2006). BPI wurde auch in der Retina und im Kammerwasser des Auges gefunden, wobei hier BPI neben der antibakteriellen Funktion auch Aufgaben während der Angiogenese einnehmen könnte (Yamagata et al., 2006).

Für die Regulation der Expression von BPI gibt es mehrere Signalwege. Zum Beispiel führte die Anwesenheit von LPS bei humanen Makrophagen zu einem Anstieg von BPI-Protein, ohne aber die entsprechende mRNA zu induzieren. Die Induktion der mRNA von BPI in humanen Makrophagen konnte hingegen durch die Stimulation mit Flagellin oder *Salmonella Typhimurium* hervorgerufen werden (Balakrishnan et al., 2016). Bei Mäusen konnte die mRNA-Expression

besonders mit dem TLR4-Liganden LPS über den MyD88 unabhängigen Signalweg sowohl in neutrophilen Granulozyten als auch dendritischen Zellen induziert werden (Eckert et al. 2006).

2.3.2 Aufbau und Wirkung von BPI

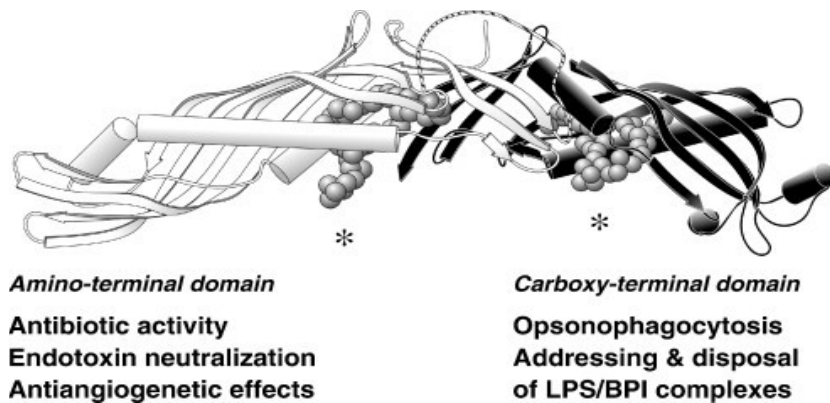


Abbildung 2: Funktion nach Domäne und Struktur des BPI

(Schultz & Weiss, 2007)

Das 55kDa große BPI besteht aus 456 Aminosäuren (AS) und stellt sich in der dreidimensionalen Ansicht als bumerangförmig dar (Abb. 2) (Beamer et al., 1997).

Der 230 AS große und 25kDa schwere N-terminale Anteil (AS 1-230) und der 226 AS große und 30 kDa schwere C-Terminale Anteil (AS 231-456) haben dabei unterschiedliche Aufgaben (Ooi & Weiss et al., 1991).

Der C-Terminale Anteil dient der Förderung der Phagozytose durch Opsonisierung von gebundenen Liganden. Im Falle von LPS dient dies der Beseitigung von BPI/LPS-Komplexen und bei intakten gramnegativen Bakterien resultiert die Markierung der Mikroorganismen mit BPI in einer gesteigerten Phagozytose (Bülow et al., 2018).

Nachgewiesen ist hier auch eine Zusammenarbeit des BPI mit dem Komplementsystem, was über die Fragmente C3b/C3i der Komponente C3 zu einer verstärkten Phagozytose durch neutrophile Granulozyten bei *E. coli* führt (Nishimura et al., 2001).

Der kleinere N-Terminale Anteil, dem in dieser Arbeit eine größere Rolle zukommt, beinhaltet neben der antibiotischen Wirkung auch die Fähigkeit, Endotoxine zu neutralisieren (Wittmann et al., 2008).

Diese antibiotische Wirkung lässt sich auch bei Biofilm-bildenden Bakterien beobachten. So zeigte eine Studie, bei der *Pseudomonas aeruginosa* von Patienten mit Mukoviszidose (CF) isoliert wurden und diese Bakterien in der Lage waren, eine Alginatekapsel (Biofilm) zu bilden, dass ein aus dem N-Terminus von BPI abgeleitetes Peptid in der Lage war, diese Bakterien abzutöten (Aichele et al., 2006).

Bei weitaus höheren Konzentrationen als für die erstgenannten Funktionen kann BPI Einfluss auf die Angiogenese nehmen und diese inhibieren (van der Schaft et al., 2002).

Im Bereich der grampositiven Bakterien scheint BPI nach Interaktion mit Bestandteilen der Zellwand zu einer Aktivierung des Immunsystems zu führen im Gegensatz zur Neutralisation von LPS von gramnegativen Bakterien und damit Inhibition des Immunsystems. Hierbei wechselwirkt BPI mit bakteriellen Lipoproteinen und Lipoteichonsäuren aus der Zellwand von grampositiven Bakterien (Bülow et al., 2018).

Die Fähigkeit, LPS zu neutralisieren, wird über die Bindung von BPI an den Lipid-A Teil des LPS vermittelt (Heumann et al., 1993). LPS ist Teil der äußeren Membran sowohl bei lebenden als auch toten Bakterien; zusätzlich findet man LPS auch in extrazellulären Vesikeln, die die Bakterien von der Membran/Zellwand abschnüren. LPS stellt einen zentralen Aktivator des Immunsystems während einer Infektion mit gramnegativen Bakterien dar. Möglicherweise nimmt LPS auch eine zentrale Rolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein (Tulkens et al., 2020). BPI blockiert die Verbindung von LPS-Komplexen mit CD14 und damit den LPS-Signalweg mit der darauffolgenden Freisetzung von TNF-alpha und anderen proinflammatorischen Zytokinen der aktivierten Zellen (Diks et al., 2001). Damit stellt BPI ein wichtiges Protein für die Kontrolle einer Inflammation während einer Infektion mit gramnegativen Bakterien dar. Denn eine überschießende Inflammation aufgrund einer unkontrollierten Aktivierung des Immunsystems durch LPS kann schwerste

Folgen für den Organismus haben und schwerste Schäden an inneren Organen hervorrufen (Opal, 2007).

Die antibiotische Wirkung des N-Terminus beruht auf seiner kationischen Ladung, mit der er in der Lage ist, zweiwertige Kationen in der Zellwand gramnegativer Bakterien zu verdrängen und so die Anordnung des LPS in der äußeren Membran aufzulösen. Diese Auflösung führt zu einem reversiblen Wachstumsstopp der Bakterien. Die letale Wirkung, am Beispiel von *E. coli* nachgewiesen, wird durch die irreparable Schädigung der zytoplasmatischen/inneren Membran (Mannion et al., 1990) und der dortigen Stoffwechselprozesse hervorgerufen und ist abhängig von der Expositionszeit (Wiese et al., 1997).

Für Peptide, die vom N-Terminus von BPI abgeleitet wurden, ist auch eine antivirale Wirkung beschrieben. Dabei reagierte das BPI-Peptid direkt mit der Virushülle von Influenzaviren und beschädigte diese. Dadurch wird die Infektiosität der Influenzaviren stark herabgesetzt. Allerdings ist diese anti-infektive Wirkung nicht auf alle Viren übertragbar, da das BPI-Peptid weder Masern- noch HI-Viren in ihrer Infektiosität beeinflusste (Pinkenburg et al., 2016).

2.3.3 Entwicklungen von BPI Peptiden zu therapeutischen Zwecken

Die Optionen für eine therapeutische Nutzung von BPI oder von ihm abgeleitete Peptide während Infektionserkrankungen scheinen wie oben beschrieben umfangreich. Durch die nachgewiesenen antibakteriellen, antiviralen, antiinflammatorischen und antiangiogenetischen Effekte könnte BPI bei einer Reihe von Erkrankungen als potentiell Therapeutikum interessant sein.

Die Firma XOMA entwickelte 1998 aus BPI ein rekombinantes Protein des N-Terminus mit 21 kDa Größe (rBPI-21), unter dem Namen Neuprex, das sich *in vitro* als antimikrobiell und antiangiogenetisch erwies (Mackin, 1998).

In klinischen Studien, die allerdings mehr auf der reinen Überlegenheit des Proteins gegenüber der Standardtherapie ausgerichtet waren, zeigte sich allerdings, dass die nachgewiesenen Effekte *in vivo* nicht signifikant gegenüber der Standardtherapie mit Antibiotika waren und dem Protein wurde deswegen die Zulassung verweigert. Dies wiederholte sich auch bei der Testung anderer AMP. Allerdings stellen sich aus heutiger Sicht, nachdem wir in der Klinik eine

erschreckende Zunahme an Resistenzen der Pathogene gegenüber Antibiotika beobachten, die Frage, ob die Verwendung von BPI oder von ihm abgeleitete Peptide als Adjuvans, um die Standardtherapie zu unterstützen oder im Falle panresistenter Stämme die Anwendung als Leitstruktur nicht doch eine Option darstellt (Dijksteel et al., 2021).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die antimikrobielle Wirkung von BPI und von BPI abgeleiteten Peptiden war in den letzten Jahrzehnten bereits Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Im Zuge dieser Forschungen wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von BPI gegenüber Bakterien und Viren häufig nachgewiesen. Allerdings erfolgte hierbei keine systematische *in vitro* Testung über verschiedene Bakterienfamilien, sondern es wurden häufig nur ein oder zwei Bakterienfamilien untersucht.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, eine systematische Testung der antimikrobiellen Aktivität von BPI und daraus abgeleiteten Peptiden in verschiedenen Bakterienfamilien aus dem grampositiven und gramnegativen Spektrum durchzuführen, um bereits vorhandene Ergebnisse zu erweitern und eine direkte Übersicht zu erstellen. Hierbei liegt vor allem ein Schwerpunkt der Analysen auf multiresistente gramnegative Bakterien, die in der klinischen Praxis eine besondere Herausforderung in der Therapie von Infektionserkrankungen darstellen.

Dabei kommen neben eigens hergestelltem rekombinantem humanem BPI verschiedene von BPI abgeleitete synthetische Peptide mit unterschiedlicher Nettoladung und ein homologes murines BPI-Peptid zur Anwendung.

Darüber hinaus wird das oben beschriebene rekombinante humane BPI-Protein auf seine inhibitorische Aktivität auf die Infektiosität des Influenzavirus untersucht. Für das von humanem BPI abgeleitete Peptid konnte dieser Effekt in bereits publizierten Vorbefunden dokumentiert werden (Pinkenburg, 2016).

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bakterieninkubator: Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, US
Brutschränke: Heraeus B 5050 E (Bakterien, 30 °C) Heraeus CO2-AUTO-ZERO (Insektenzellen, kein CO2) Heraeus Cytoperm 8080 (Bakterien, 37 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US Thermo Fisher Scientific, Waltham, US Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Gelkammersystem für SDS-PAGE	PEQLAB, Erlangen, DE
Heizblock: TS-100 Thermoshaker	PEQLAB, Erlangen, DE
Mehrkanalpipetten (50 µl, 300 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Mikroliterpipetten (Einkanal, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE PEQLAB, Erlangen, DE
Mikroskope: 471202-9901(invers) Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, DE Carl Zeiss, Jena, DE
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, DE
NanoDrop-1000	PEQLAB, Erlangen, DE
Peristaltikpumpe Pharmacia LKB P-1	GE Healthcare, München, DE
Photometer: BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, DE

Bezeichnung	Hersteller
Pipettierhilfe: PIPETBOY comfort	INTEGRA Biosciences, Fernwald, DE
Sterilwerkbänke: 2F 120-II GS (Bakterien) HERASafe KS (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Stromgeber: EC 105 Standard Power Pack P25	E-C Apparatus Corp., Madison, US Biometra, Gottingen, DE
Vortexer: REAX 2000	Heidolph, Schwabach, DE
Waagen: R160 P-*D1 Mettler P1000	Sartorius, Göttingen, DE Mettler-Toledo, Giesen, DE
Western Tank-Blot System (Novex)	Life Technologies, Darmstadt, DE
Zentrifugen: Heraeus Minifuge T Heraeus Multifuge 1S-R Spectrafuge Mini	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US Thermo Fisher Scientific, Waltham, US Labnet International, Inc., Edison,

3.2 Glas und Plastikmaterialien

Tabelle 2: Glas- und Plastikmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einfrierröhrchen (1,6 ml)	Sarstedt, Numbrecht, DE
Einwegspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen, DE
Erlenmeyerkolben, Plastik (100 ml)	VITLAB, Grossostheim, DE
Glaswaren (Flaschen, Bechergläser, Kolben)	Merck, Darmstadt, DE Schott, Mainz, DE
Impfösen	VWR International, Darmstadt, DE
Kulturröhrchen (14 ml, Rundboden, PP)	Corning, Corning, US
Neubauer-Zahlkammer	W. Schreck, Hofheim, DE
Petrischalen (94 x 16 mm, für Agarplatten)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen (10 µl, 10 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	PEQLAB, Erlangen, DE
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Numbrecht, DE
Reaktionsgefäße, silikonisiert (0,6 ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Semi-Micro-Küvetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Spatel, L-Form	VWR International, Darmstadt, DE
Zellkulturplatten, F-Boden (6 well)	Sarstedt, Numbrecht, DE
Zellkulturplatten, F-Boden (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zentrifugenröhrchen, Plastik (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bis (30 %)	SERVA, Heidelberg, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ethanol (≥ 95,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fetal Bovine Serum (FCS/FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
L-Glutamine (200 mM), für Zellkultur	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hygromycin B Lösung (50 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kupfer(II)-Sulfat (Cu ₂ SO ₄), wasserfrei	Merck, Darmstadt, DE
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Page Blue Protein Staining Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Bezeichnung	Hersteller
(Kolloidale Coomassie G-250 Färbelösung)	US
Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml), für Zellkultur	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Trypsin-EDTA (0,05 %)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TRIS-hydrochlorid (TRIS HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate	BioFX & Surmodics, Eden Prairie, US
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Wasser: vollentsalztes Wasser (VE-H ₂ O) Ultra-Pure Wasser	BMFZ, Universität Marburg, DE Biochrom, Berlin, DE

3.4 Kits und sonstige Materialien

Tabelle 4: Kits und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
HiTrap Chelating HP-Säulen	GE Healthcare, München, DE
Uptima BCA Assay Protein Quantitation Kit	Interchim GmbH, Mannheim, DE

3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
5 mM EDTA-Puffer	5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 25 mM NaH ₂ PO ₄ , sterilfiltriert
30 mM Imidazol-Puffer	30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 25 mM NaH ₂ PO ₄ , sterilfiltriert
50 mM Imidazol-Puffer	50 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 25 mM NaH ₂ PO ₄ , sterilfiltriert
Kristallviolettlösung (1 %)	1 g Kristallviolett ad 100 ml H ₂ O
Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd 4% in PBS
PBS (steril)	DPBS ohne Kalzium & Magnesium (PAN Biotech, Aidenbach, DE)
SDS-PAGE Laufpuffer	3,03 g TRIS, 14,41 g Glycin ad 900 ml H ₂ O + 100 ml 10 % SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (6x Laemmli)	0,375 M TRIS HCl, 12 % SDS, 12,5 % Mercaptoethanol, 50 % Glycerol, 0,012 % Bromphenolblau
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	12 g TRIS ad 192 ml H ₂ O, pH 6,8 + 8 ml 10 % SDS
SDS-PAGE Trenngelpuffer	72,8 g TRIS ad 392 ml H ₂ O, pH 8,8 + 8 ml 10 % SDS
TBS, 10x	292,7 g NaCl, 4,24 g TRIS, 26 g TRIS HCl, pH 7,5
TBST	1x TBS + 0,05 % Tween 20
Western Blot Transferpuffer	3,786 g TRIS, 18,016 g Glycin ad 800 ml H ₂ O + 200 ml Methanol

3.6 Nährmedien

Tabelle 6: Nährmedien

Bezeichnung	Basismedium & Zusammensetzung	Verwendung
LB-Agar	LB-Agar (Carl Roth, Karlsruhe, DE) 35 g/l in H ₂ O, autoklaviert	Bakterien
LB-Medium	LB-Medium (Carl Roth, Karlsruhe, DE) 20 g/l in H ₂ O, autoklaviert	Bakterien
DMEM	DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, DE) 10%FCS, 1%Pen-Strep, 1% Glutamin	Zellkultur (MDCK II)
Spodopan	Spodopan (PAN Biotech, Aidenbach, DE) ohne Zusätze	Zellkultur (Insekten)

3.7 verwendete Proteine

Tabelle 7: verwendete Proteine

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
huBPI-Peptid	N-Terminus des human <i>bactericidal permeability increasing protein</i>	AG Schnare, Universität Marburg
huBPI-Protein Wildtyp	human <i>bactericidal permeability increasing protein</i> exprimiert in D.Mel 2-Zellen	AG Schnare, Universität Marburg
huBPI-Peptid Mutante 1	N-Terminus des human <i>bactericidal permeability increasing protein</i> mit veränderter Aminosäurese-	AG Schnare, Universität Marburg

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
	quenz s. Anhang	
huBPI-Peptid Mutante 2	N-Terminus des <i>human bactericidal permeability increasing protein</i> mit veränderter Aminosäuresequenz s. Anhang	AG Schnare, Universität Marburg
huBPI-Peptid Mutante 3	N-Terminus des <i>human bactericidal permeability increasing protein</i> mit veränderter Aminosäuresequenz s. Anhang	AG Schnare, Universität Marburg
huBPI-Peptid Mutante 4	N-Terminus des <i>human bactericidal permeability increasing protein</i> mit veränderter Aminosäuresequenz s. Anhang	AG Schnare, Universität Marburg
mBPI-Protein Wildtyp	Murines <i>bactericidal permeability increasing protein</i>	AG Schnare, Universität Marburg

3.8 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
α -HisTag mAk	100 ng/ml (Western Blot)	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Goat α -Mouse AK IgG HRP	800ng/ml (Western Blot)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove ,USA
HB65 α -Influenza Nucleoprotein	400ng/ml (Single Cycle Infection Assay)	AG Schnare, Universität Marburg
Goat α -Mouse AK IgG HRP	400ng/ml (Single Cycle Infection Assay)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove ,USA

3.9 Bakterien

3.9.1 Grampositive Bakterien

Tabelle 9: grampositive Bakterien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>Staphylococcus aureus</i>	STAU ATCC 25923	AG Schnare, Universität Marburg
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	NH 160-6920(Diagnos- tik)	AG Mutters, Universität Marburg
<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>Streptococcus Typ B</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg

3.9.2 Gramnegative Bakterien

Tabelle 10: gramnegative Bakterien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg
<i>DH5α</i>	Vom Biologen Douglas Hanahan entwickelter E.coli mit Transformations-effizienz	AG Schnare, Universität Marburg
<i>UPEC CFT09</i>	Uropathogener E.coli CFT09	AG Schnare, Universität Marburg
<i>Enterobacter cloacae</i> 9763	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg
<i>Enterococcus faecium</i>	VA 10493/2007	AG Schnare, Universität Marburg
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters, Universität Marburg
<i>Listeria monocytogenes</i>	Klinisches Isolat	AG Mutters,

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
		Universität Marburg
<i>Proteus mirabilis</i>	UR 279/2007	AG Schnare, Universität Marburg
<i>P. aeruginosa</i> Wildtyp (WT)	PSAE ATCC 27853	AG Schnare, Universität Marburg
<i>P. aeruginosa</i> Klinisches Isolat	KH 170-3181	AG Mutters, Universität Marburg
<i>S. Typhimurium</i> Wildtyp (WT)	NCTC 12023	AG Schnare, Universität Marburg

3.10 Viren

Tabelle 11: Viren

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
A/WSN/1933(H1N1)	<i>Influenza A-Virus</i> (ATCC VR-825)	Olaf Pinkenburg, Universität Marburg
A/Aichi/2/68 (H3N2)	<i>Influenza A-Virus</i> (ATCC VR-1680)	Olaf Pinkenburg, Universität Marburg

3.11 Zelllinien

Tabelle 12: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
D.Mel.2	<i>Drosophila melanogaster</i> Schneider-2 Zellen	AG Schnare, Universität Marburg
MDCK-2	<i>Madin Darby Canine</i> <i>Kidney Zellen</i>	Olaf Pinkenburg, Universität Marburg

3.12 Software

Tabelle 13: Software

Bezeichnung	Herkunft
Libre Office Version 7.5.	Apache Foundation Forest-Hill, US
Microsoft Office 2018	Microsoft Corporation, Seattle, US
Image Lab Version 4.0	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Omega Data Analysis	BMG LABTECH, Offenburg, DE
Unicorn Prime View Version 5.31	GE Healthcare Europe, Freiburg, DE
Graph Pad Prism Version 9.0	GraphPad Software, Boston, US
Citavi Version 6.14	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Insekten-Zellkultur

Kultivierung von D. Mel-2-Zellen

1972 wurde aus Embryonen der Fruchtfliege, *Drosophila Melanogaster*, eine Zelllinie isoliert, die in dieser Arbeit Verwendung fand (Schneider,1972). Die genaue Bezeichnung lautet *Drosophila Melanogaster* Schneider 2 Zellen (D. Mel-2). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind stabil mit einem Expressionsplasmid, welches für humanes BPI (huBPI) codiert, transfiziert. Das Expressionsplasmid trägt eine Hygromycin B-Resistenzkassette und die codierende Sequenz von huBPI wurde für die Expression in D. Mel-2 Zellen Codon-optimiert, um die Menge des sezernierten rekombinanten Proteins zu erhöhen. Mittels Hygromycin B (250µg/mL) wurden die Zellen unter Dauerselektion in einem CO₂-freien 28°C Brutschrank in Zellkulturflaschen gehalten. Das hier verwendete Medium (SPODOPAN) war proteinfrei. Die Zellen sind für das Wachstum in diesem Medium angepasst.

Um die Zellen zur passagieren, wurden die Zellen in den Kulturflaschen resuspendiert und 0.5 mL der Zellsuspension in 6.5 mL frischem SPODOPAN + 250 µg/mL Hygromycin B in einer neuen Kulturflasche kultiviert.

Induktion der Produktion von huBPI und Gewinnung des Zellkulturüberstandes

Um die Zellen für die Induktion der Proteinexpression zu amplifizieren, wurde der Inhalt der dichtbewachsenen Zellkulturflaschen bei 100 x g für 7 min. zentrifugiert, damit die Zellen pelletiert wurden. Währenddessen wurden neue Kulturflaschen mit je 45 mL Medium + 250 µg/mL Hygromycin B beschickt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets in je 25 mL Medium + 250 µg/mL Hygromycin B aufgenommen und jeweils 5 mL der Suspension in die vorbereiteten Zellkulturflaschen eingebracht.

Von diesen Flaschen ausgehend wurden die Zellen in einer Dichte von 3×10^6 Zellen/mL in Zellkulturschalen (50 mL) in SPODOPAN ohne Hygromycin B

ausgesät. Am darauffolgenden Tag (0) wurden die Zellen mit 5 µL 100 mM Kupfersulfat (CuSO_4) pro 1 mL Zellsuspension (0,5 mM CuSO_4) induziert: Die Zugabe von CuSO_4 aktiviert den Metallothionin-Promotor des Expressionsplasmids, welcher die Produktion von huBPI kontrolliert.

Die Ernte der Zellkulturüberstände fand am Tag 5 nach Induktion statt. Hierbei wurde der Inhalt der Schalen zweimal bei 100 x g für 7 min. zentrifugiert, um den zellfreien Überstand zu gewinnen.

Nach der Zentrifugation wurde zur Stabilisierung des rekombinanten Proteins eine Mischung von 300 mM NaCl (0,1753g/10mL) und 2,5% Glycerol (0,25mL/10mL) zum zellfreien Überstand hinzugefügt.

Dieser so behandelte Überstand wurde dann steril filtriert (0,2 µm), bei 4°C eingelagert und mit Western-Blot und Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE auf die Expression des Proteins überprüft.

4.1.2 MDCK-H Zellkultur

Kultivierung von MDCK-H Zellen

MDCK Zellen wurden 1958 von S. Madin und N.B. Darby aus dem Epithel der Niere eines Cockerspaniels isoliert. In dieser Arbeit wurde eine Linie dieser Zellen für Versuche mit Viren verwendet. Die vorliegende Zelllinie ist defizient für Proteasen, die das Hämagglutinin (HA)-Protein von Influenzaviren spalten (Matrosovich et al., 2003). Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C mit 5% CO_2 aufbewahrt. Als Wachstumsmedium diente DMEM-komplett.

Um die adhärent wachsenden Zellen zu passagieren, wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 mL PBS pH 7,4 gewaschen und danach durch eine Behandlung mit 3 mL Trypsin-EDTA für ca. 30 min bei 37°C vom Boden abgelöst. Die resuspendierten Zellen wurden dann in 9 mL frischem DMEM-komplett Medium aufgenommen, um die Trypsinwirkung zu neutralisieren. Nach einem Zentrifugationsschritt (600 x g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 10 mL DMEM-komplett gelöst und 1 mL von dieser Suspension zur weiteren Passage der Zellen mit 11 mL frischen DMEM-komplett in einer neuen Zellkulturflasche kultiviert.

4.2 Aufreinigung und Analyse von rekombinantem huBPI-Protein

4.2.1 Aufreinigung von rekombinantem huBPI mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des rekombinanten huBPI aus dem D.mel-2-Kulturüberstand erfolgte mittels HiTrap™ Chelating HP-Säule. Die Säulenmatrix besteht aus stark vernetzter Agarose und enthält den Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA), die zweiwertige Kationen und somit das zur Induktion eingesetzte Cu^{2+} bindet. Diese bilden mit dem His-Tag des rekombinanten Proteins einen Chelatkomplex, durch den das Protein an der Säule festgehalten wird. Das Beladen der Säule mit dem generierten Überstand erfolgte über eine Peristaltikpumpe bei 4°C. Das gebundene Protein konnte anschließend mit Imidazol von der Säulenmatrix eluiert werden. Durch einen kontinuierlichen Imidazol-Gradienten (10 – 500 mM) mit Hilfe der FPLC-Anlage (Äkta-FPLC) konnte das rekombinante Protein im Einschrittverfahren relativ sauber dargestellt werden. Bei der Aufreinigung wurde das eluierte Protein in 1 mL Fraktionen mit Hilfe des Probensammlers aufgefangen und bei 4°C gelagert. Abschließend wurde die Säule mit 5 mM EDTA gewaschen, um die Kupferionen von der Säulenmatrix zu lösen. Eingelagert wurde die Säule, nachdem sie mit 20% Ethanol äquilibriert worden war.

4.2.2 Ankonzentrierung und Umpufferung der Proteine

Die vielversprechendsten Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden anhand der Aufzeichnung der OD_{280} (Optische Dichte-Messung bei 280 nm) identifiziert und anschließend mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie Bau-Färbung und Western-Blot auf die Präsenz von huBPI geprüft. Die ausgewählten Fraktionen wurden anschließend für die Ankonzentrierung und Umpufferung in einen „Amicon® Ultra Centrifugal Filter“ überführt und mit PBS/ 300 mM NaCl/ 2,5 % Glycerol auf 14 mL aufgefüllt. Diese Filtrationseinheit wurde solange bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, bis noch ≤ 1 mL Restflüssigkeit im Filter vorhanden war. Danach wurde das Filtersystem 6 weitere Male mit PBS/ 300 mM NaCl/ 2,5 % Glycerol gewaschen, wobei beim finalen Schritt so lange zentrifugiert wurde, bis noch 250-500 μL Flüssigkeit verblieben. Das ankonzentrierte Protein wurde abschließend in ein silikonisiertes „Clear-view™ Snap-Cap microtube“ überführt und bei -20°C gelagert.

4.2.3 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE

Zur Untersuchung der Expression und der Reinheit von aufgereinigtem, rekombinantem huBPI wurde eine Proteinauftrennung nach Größe mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. In dieser Arbeit wurde ein eindimensionales diskontinuierliches SDS-PAGE mit einem Sammelgel und einem 12% Trenngel verwendet. Die Proteine sammeln sich nach Anlegen der elektrischen Spannung im Sammelgel und wandern danach durch das Trenngel, wobei kleinere Proteine schneller durch das Trenngel wandern als größere Proteine (Laemmli U.,1970).

Die Zusammensetzung für die Gele lautete wie folgt:

Sammelgel:

1400µL H₂O
270µL SDS-Sammelgelpuffer
330µL 30% Acrylamid/Bis
10µL 20% APS
3µL TEMED

12% Trenngel:

1600µL H₂O
1350µL SDS-Trenngelpuffer
2000µL 30% Acrylamid/Bis
25µL 20% APS
3µL TEMED

Zur Vorbereitung wurde zuerst das Trenngel gegossen und zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um eine klare Trenngelkante zu erzielen. Nach dem Abwarten der Polymerisation erfolgte, nach Entfernung des Isopropanols, das Gießen des Sammelgels, in das der Probenkamm platziert wurde und nach Polymerisation die Probenfächer entstehen.

Zur Darstellung der primären Proteinstruktur, wurden die Proben mit einem Probenpuffer (6 x Lämmli-Probenpuffer) versetzt und bei 95°C im Heizblock für 5 min denaturiert.

Die Proben wurden im Anschluss im SDS-Gel durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 80V im Sammelgel für 30 Minuten und 120V im Trenngel für mindestens 1 Stunde aufgetrennt. Ein mitgeführter Größenmarker diente der Abschätzung der Proteingröße. Anschließend wurde das Gel entweder für den Western-Blot vorbereitet oder die Proteine wurden unspezifisch mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Für die Färbung über Nacht bei Raumtemperatur wurde ein kolloidales Färbemittel verwendet (G250, Thermo Scientific). Am nächsten Tag wurde mit destilliertem Wasser entfärbt und danach das gefärbte Gel mit Hilfe des ChemiDoc™ Geldokumentationsgerätes digitalisiert dokumentiert (siehe 2.1 Geräte).

4.2.4 Western-Blot

Das Western-Blot-Verfahren dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen in einem Probengemisch. Dabei werden die Proteine, nach der Auftrennung in der Gelelektrophorese, auf eine PVDF-Membran zur weiteren Proteindetektion mittels Antikörpern transferiert. Die Übertragung erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung, die eine Wanderung der durch SDS negativ geladenen Proteinbanden Richtung der Anode auf die PVDF-Membran auslöst.

Für alle Western Blots wurde ein Semi-Dry-Blotsystem verwendet. Zur Vorbereitung wurde eine PVDF-Membran 1 min lang in Methanol äquillibriert. Die aktivierte PVDF-Membran und Whatmann-Filterpapiere wurden in einer Mischung aus Transferpuffer und 20% Methanol eingelegt. Der Blot wurde als nächstes, wie folgt, zusammengebaut: (Anode)- 3 x 1Filterpapier- PVDF-Membran- Trenngel- 3 x Filterpapier- (Kathode). Der zusammengebaute Blot wurde mit Transferpuffer befeuchtet. Mit einer Stromstärke von 48 mA ($0,7 \text{ mA/cm}^2$) wurde dann für 1 Stunde geblottet. Direkt danach wurde die PVDF-Membran für 1h in 5% Magermilchpulver in TBST inkubiert. Dies diente dem Blocken verbliebener freier Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran.

Danach wurde die Membran mit dem Erstantikörper (Maus α -his 1:2000 in 1% Magermilchpulver/TBST verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde der Erstantikörper entfernt, die Membran 3 x mit TBST gewaschen (je 10 min) und der Zweitantikörper (Ziege α -Maus IgG mit Peroxidase gekoppelt 1:10 000 in 1% Magermilchpulver/TBST verdünnt) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 1h bei Raumtemperatur wurde der

Antikörper verworfen und die Membran 2 x mit TBST und 1 x mit TBS (je 10 min) gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper-Reste zu entfernen.

Der Proteinnachweis erfolgte durch die Zugabe des „Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate“ der Firma Millipore und anschließender Dokumentation der Substratumsetzung mit Hilfe des ChemiDoc™ Geldokumentationsgerätes (siehe 2.1 Geräte).

4.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die nach der Affinitätschromatographie aufgereinigte, umgepufferte und ankonzentrierte huBPI-Fraktion mittels Bicinchoninsäure-Protein-Test (BCA-Test) untersucht. Zur Durchführung wurde das BCA Assay Kit der Firma Uptima (UP40840A) verwendet. Unter Ausnutzung der Biuret-Reaktion lässt sich ein gelöstes Protein quantifizieren. Hierbei werden die zur Induktion verwendeten Cu^{2+} durch Bicinchoninsäure zu Cu^+ reduziert und es entsteht ein messbarer Farbkomplex, welcher proportional zur Menge des Proteins in der Lösung ist. Zur Verdünnung der Proben und des Standards (bovines Serum-Albumin Standard 1000-31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Verdünnungen 1:2) wurde PBS/ 300 mM NaCl/ 2,5 % Glycerol verwendet. Das Nachweisreagenz wurde im Verhältnis 50:1 aus den Reagenzien A und B hergestellt. Der Standard wurde in 2-fach und Proben in 3-fach Bestimmung in einer 96-well ELISA Platte angesetzt. Als Blank diente PBS/ 300 mM NaCl/ 2,5 % Glycerol.

Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurde die Absorption am Photometer gemessen (Wellenlänge 570 nm). Mit Hilfe der gemessenen Extinktion und einer ermittelten Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen berechnet

4.3 Bakterien

4.3.1 Kristallviolett-Adhäsionsassay

Um die biologische Aktivität des rekombinant hergestellten huBPI zu überprüfen, wurde ein Bakterienadhäsionstest durchgeführt. Aus vorherigen Arbeiten der AG Schnare war bereits bekannt, dass huBPI bei *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella*) die Adhäsion an Plastikoberflächen induziert (Meyer T, 2011).

Für den Versuch wurden Salmonellen nach Inokulation von 4 mL LB-Medium unter Schütteln in einer Übernachtskultur (37°C) herangezogen. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}). Die Bakterien wurden auf eine OD_{600} von 1,2 (dies entspricht anhand detaillierter, von der AG Schnare erstellter Wachstumskurven 8×10^8 Salmonellen/mL) eingestellt. HuBPI-Peptid und Protein wurden in doppelter Konzentration in LB Medium angesetzt. Von allen Proben wurden je Vertiefung 100 μ L in 3-fach Bestimmung aufgetragen. Nach Zugabe von 100 μ L Bakterienlösung wurde die OD_{600} im Plattenphotometer bestimmt und somit für identische bakterielle Beladung kontrolliert. Anschließend wurde die Platte für 3h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde wieder die OD_{600} bestimmt. Diese Bestimmung diente als Wachstumskontrolle. Im Anschluss wurden die Überstände mittels Vakuumpumpe entfernt und die Vertiefungen, die Proben enthielten, 3 x mit je 300 μ L PBS gewaschen. Bei Raumtemperatur wurde die Platte dann über Nacht getrocknet. Im vollkommen trockenen Zustand wurden die Vertiefungen zur Färbung der adhärennten Bakterien mit je 200 μ L 1% Kristallviolett-Lösung beladen. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurde die Färbelösung abgesaugt, die Vertiefungen 5 x mit jeweils 300 μ L/Vertiefung mit VE-H₂O gewaschen und darauf mit 200 μ L Ethanol beschickt, um den gebundenen Farbstoff zu extrahieren. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde die Absorption bei 590nm im Plattenphotometer bestimmt.

4.3.2 Antibakterielle Wirkung

Die antibakterielle Wirkung des huBPI ist einer der Kernpunkte der vorliegenden Arbeit. Hierbei sollte analysiert werden, welches mögliche antibakterielle Spektrum rekombinantes huBPI und daraus abgeleitete Peptide besitzen. Dabei sollten sich die Bakterien in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Für den Nachweis wurden Bakterieneinzelkolonien von Agarplatten in Kulturröhrchen, beschickt mit je 5 mL LB-Medium, überimpft und über Tag bei 37°C im Brutschrank als Schüttelkultur inkubiert. Von diesen Kulturen wurden 100 μ L in ein neues Kulturröhrchen mit 6 mL LB-Medium überführt und als Übernachtskultur bei 37°C geschüttelt.

Um die Bakterien in die exponentielle Wachstumsphase zu überführen, wurde am nächsten Morgen ein neues Kulturröhrchen wiederum mit 100 μL aus der Übernachtskultur und 5 mL LB Medium beschickt und je nach Bakterienstamm für 4-6 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Absorption bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Je nach Wert der OD-Messung und Bakterienstamm erfolgte dann die Verdünnung auf die Zielbakterienzahl von 10^4 Bakterien/mL in PBS pH 7,4.

Zuerst wurde für jeden Bakterienstamm über eine Dosis-Wirkungsbeziehung die Konzentration der zu testenden Proteine und Peptide ermittelt, bei der das Wachstum der Bakterien am deutlichsten gehemmt wurde. Das huBPI-Peptid wurde hierfür in Konzentrationen von 20-100 $\mu\text{g/mL}$ in Verdünnungen von 1:10 eingesetzt.

Im zweiten Schritt erfolgte dann der Vergleich zwischen huBPI-Peptid und dessen Mutanten, bzw. dem m1BPI-Peptid und dem rekombinanten huBPI in der vorher festgelegten Konzentration. Die Protein- und Peptidverdünnung erfolgte jeweils mit PBS pH 7,4.

Nach der Einstellung der Bakterien auf die Zielbakterienzahl wurden sie in Dreifachbestimmung auf eine 96-well-Platte aufgetragen und mit den Protein- bzw. Peptidverdünnungen vermischt. Jede Vertiefung enthielt dabei ein Gesamtvolumen von 50 μL . Dabei waren pro well 40 μL Bakterien und 10 μL Protein- bzw. Peptidverdünnung enthalten. Die so beladene Platte wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien aus den Wells in einer 1:10 Verdünnung auf Agarplatten ausgestrichen, um die verbliebenen Bakterienzahlen zu bestimmen. Dazu wurden die ausgestrichenen Bakterien über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien gezählt und darüber die Bakterienzahl kalkuliert.

4.4 Viren

4.4.1 Einzelzell-Infektions-Assay

Um die antivirale Aktivität von huBPI und davon abgeleiteten Peptiden zu untersuchen, wurde ein Einzelzell-Infektions-Assay durchgeführt. Dazu werden MDCK-H-Zellen mit Influenza A-Viren (IAV) der Stämme A/PR/8/24 (H1N1) beziehungsweise A/Aichi/2/68 (H3N2) infiziert. Die Nachkommen, die in den

MDCK-H-Zellen gebildet werden, können die Wirtszelle nicht verlassen, da den Zellen Proteasen fehlen, die das HA-Protein der Viren aktivieren. Dadurch können Infektionsereignisse auf Einzelzellniveau analysiert werden.

Für die beiden IAV-Stämme wurden 2 unterschiedliche Versuche durchgeführt. Im 1. Versuch wurde die Viruskonzentration festgelegt, die für die Testung der antiviralen Wirkung genutzt wurde. Im 2. Versuch wurde dann die Wirkung von huBPI- Protein und der verwandten Peptide geprüft.

4.4.2 Bestimmung des Virustiters

Am Vortag der Infektion wurden 5×10^4 MDCK-H-Zellen/ Vertiefung einer 96-well-Platte in einem Volumen von 100 μL (DMEM komplett) ausgesät und über Nacht zur Adhäsion bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Platte kontrolliert und die Virusinfektion vorgenommen. Für die Infektion wurden Viren in einer Konzentration von 400-31,25 pfu/well eingesetzt (Verdünnungen 1:2 in PBS pH 7,4). Vor der Infektion mit den Viren wurden die adhärenen Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurden 100 μL der entsprechenden Viruslösung zu den Zellen pipettiert. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden in 6-fach Bestimmungen angesetzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Infektion für 1h bei 37°C. Danach wurde die 96-well-Platte einmalig mit 200 μL /well PBS gewaschen und jedes well mit 200 μL DMEM komplett beschickt. Bei 37°C wurde die Platte für 9h, max.12h, inkubiert. Nach dem einmaligen Waschen mit 200 μL /well PBS wurden die Zellen in 200 μL 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS pro well für 1 h bei 4°C fixiert und anschließend mit 200 μL /well PBS einmalig gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden 100 μL /well PBS + 0,3% Triton auf die Zellen aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde der Erstantikörper (HB65, α -Influenza Nukleoprotein, 1:25 in DMEM) mit 100 μL /well auf die Zelle pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte dreimalig mit 200 μL /well PBS gewaschen. Die Platte wurde dazwischen für je 10 min auf einem Schüttler inkubiert und dann der Zweitantikörper (Ziege α -Maus IgG HRP verdünnt 1:2000 in DMEM) mit je 100 μL /well aufgetragen. Über Nacht wurde wieder bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum dreimalig mit jeweils 200 μL /well PBS gewaschen und anschließend die

Antikörperbindung durch Zugabe von 40 μL TrueBlue™ Peroxidase Substrat gefärbt. Nach einer deutlichen Farbentwicklung wurde die Färbung durch Zugaben von H_2O abgestoppt. Die Platte wurde anschließend nach Lufttrocknung mikroskopisch ausgewertet.

4.4.2.1 Antivirale Wirkung des huBPI-Protein bzw. -peptid

Am Vortag des Versuches wurden pro Virusstamm je eine 96-well Platte vorbereitet. Hierzu wurden 5×10^4 MDCK-H-Zellen/ Vertiefung in einem Volumen von 100 μL (DMEM komplett) ausgesät und über Nacht zur Adhäsion bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Nach der Kontrolle der Platten am Folgetag erfolgte die Infektion mit den Virusstämmen. Die Viren wurden in einer Konzentration von 4000 pfu/well mit huBPI-Protein beziehungsweise dem huBPI-Peptid im Verhältnis 1:10 (Konzentrationen von 25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgedunkelt vorinkubiert.

Vor der Infektion mit den Viren wurden die adhärennten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurden 100 μL der entsprechenden Viruslösung zu den Zellen pipettiert. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden in 4-fach Bestimmungen angesetzt.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Infektion für 1h bei 37°C . Danach wurde die 96-well-Platte einmalig mit 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS gewaschen und jedes well mit 200 μL DMEM komplett beschickt. Bei 37°C wurde die Platte für 9h, max.12h, inkubiert. Nach dem einmaligen Waschen mit 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS wurden die Zellen in 200 μL 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS pro well für 1 h bei 4°C fixiert und anschließend mit 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS einmalig gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS + 0,3% Triton auf die Zellen aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde der Erstantikörper (HB65, α -Influenza Nukleoprotein, 1:25 in DMEM) mit 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ auf die Zelle pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte dreimalig mit 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS gewaschen. Die Platte wurde dazwischen für je 10 min auf einem Schüttler inkubiert und dann der Zweitantikörper (Ziege α -Maus IgG HRP verdünnt 1:2000 in DMEM) mit je 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ aufgetragen. Über Nacht wurde wieder bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum

dreimalig mit jeweils 200 μL /well PBS gewaschen und anschließend die Antikörperbindung durch Zugabe von 40 μL TrueBlue™ Peroxidase Substrat gefärbt. Nach einer deutlichen Farbentwicklung wurde die Färbung durch Zugaben von H_2O abgestoppt. Die Platte wurde anschließend nach Lufttrocknung mikroskopisch ausgewertet.

4.5 Ergebnisse der bakteriellen Versuche

4.5.1 Kristallviolett Adhäsionsassay

Die biologische Aktivität des rekombinant hergestellten humanen BPI (rhuBPI) wurde mit Hilfe eines Adhäsionstests untersucht. Aus Vorarbeiten aus dem Labor Schnare war bereits bekannt, dass humanes BPI die Adhäsion von *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) an Plastik induziert (Meyer T, 2011).

Darüber hinaus wurde ein huBPI-Peptid, welches aus 28 Aminosäuren, die im N-terminalen Teil von huBPI lokalisiert sind, besteht und dessen antibakterielle Eigenschaften dokumentiert sind (Aichele et al., 2006), mitgetestet.

Wie Abbildung 3 zeigt, führt lediglich die Inkubation von *S. Typhimurium* mit rhuBPI zu einer Adhäsion der Bakterien an die Plastikoberfläche der Mikrowell-Platte. Das huBPI-Peptid war nicht in der Lage, Adhäsion zu induzieren.

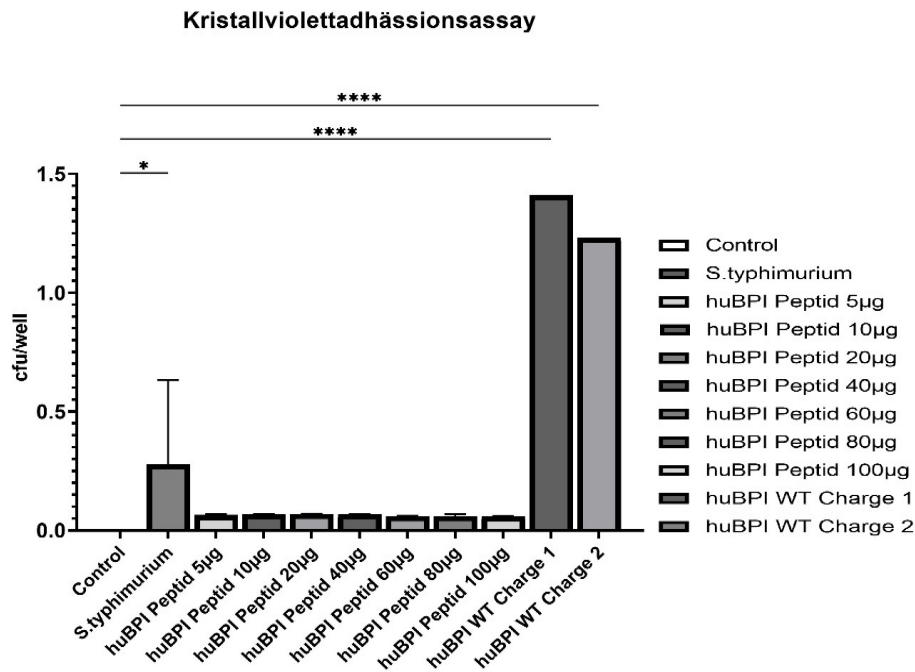


Abbildung 3: huBPI induziert die Adhäsion von *S. Typhimurium* im Vergleich zum huBPI-Peptid

S. Typhimurium in der stationären Wachstumsphase wurde in LB-Medium auf eine optische Dichte bei 600nm von 1,2 eingestellt und in einer 96-Well- Flachboden-Mikrotiter-Platte mit huBPI-Peptid (5, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/mL), rhuBPI (100 µg/mL) gemischt oder unbehandelt belassen (*S. Typhimurium*). Als Leerwert diente LB-Medium ohne Bakterien (Control). Die Inkubation der Reaktionsansätze geschah bei 37°C für 3 h. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension abgesaugt, und die adhärenenten Strukturen mit 1% Kristallviolett angefärbt. Zur Quantifizierung wurde das gebundene Kristallviolett in 100% Ethanol extrahiert und nachfolgend bei 590nm im Plattenphotometer gemessen. Darstellung des repräsentativen Ergebnisses zweier Experimente mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung.

Wie erwartet, zeigt das rhuBPI eine biologische Aktivität resultierend in der Adhäsion von *S. Typhimurium*, während das antibakterielle huBPI-Peptid, erwartungsgemäß, keine bakterielle Adhäsion vermittelt.

4.5.2 Inhibition von Bakterien

Die Hauptzielsetzung der Arbeit liegt auf der Analyse der antibakteriellen Wirkung des huBPI mit besonderem Blick auf die WHO-Liste für gefährliche

Bakterien von 2017 (Tacconelli et al, 2018). In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung bei drei grampositiven Bakterienarten und 6 gramnegativen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf häufige humanpathogene Bakterien gelegt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Aufstellung der verwendeten Bakterien anhand des Färbeverhaltens bei der Gramfärbung und Einteilung nach der Bakterienfamilie

Grampositive Bakterien	Gramnegative Bakterien
Listeriaceae: <i>Listeria monocytogenes</i>	Moraxellaceae: <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter iwofii</i>
Staphylococcaceae: <i>Staphylococcus aureus</i>	Enterobacteriaceae: <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
Streptococcaceae: <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Morganellaceae: <i>Proteus mirabilis</i>
	Pseudomonadaceae <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

In der Arbeit wurden auch multi- oder panresistente Stämme aus der klinischen Kultursammlung der Medizinischen Mikrobiologie, der Philipps-Universität Marburg verwendet.

Die Abfolge der Versuche für einen Bakterien- oder Virusstamm waren immer wie folgt: Zuerst wurde für das huBPI Peptid eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der antimikrobiellen Aktivität erstellt, um die Konzentration zu ermitteln, die einen hohen antimikrobiellen Wirkungsgrad beim untersuchten Bakterienstamm hat. In einem zweiten Experiment wurden dann die Konzentration von huBPI Peptid mit einer hohen antimikrobiellen Wirkung mit den verwandten Peptiden und Proteinen in der gleichen Konzentration verglichen. Dabei wurde die Höchstkonzentration der eingesetzten Peptide und Proteine von 100µg/mL

nicht überschritten, um in einem annähernd physiologischen Konzentrationsbereich von BPI zu verbleiben (Aichele et al., 2006).

4.5.3 Inhibition bei grampositiven Bakterien

Die Wirkung von huBPI-WT und seines Peptids auf grampositive Bakterien wurde bereits mehrfach untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich, dass es weder eine zytotoxische Wirkung noch eine Inhibition des Wachstums bei *Staphylococcus aureus* verursacht (Weiss et al., 1992).

Eine Besonderheit zeigte sich bei grampositiven Bakterienstämmen die in der L-Form (Madoff, 1986) vorlagen. Die L-Form ist ein morphologischer Zustand bei dem ein grampositives Bakterium ohne Zellwand existiert, was auch Einflüsse auf die Antibiotikaresistenz hat (Fuller E et al., 2005).

Versuche in denen Zellwand-defiziente und Wildtyp-Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* komplettem huBPI und einer N-terminalen Variante von huBPI ausgesetzt wurden, führten zum Ergebnis, dass huBPI-WT bei grampositiven Bakterien zwar keine zytotoxischen Effekte aufweist, aber eine Inhibition des Wachstums verursacht (Horwitz et al., 1999).

Diese vorangegangenen Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass auch die hier verwendeten Proteine und Peptide keine Wirkung auf grampositive Bakterien haben. Fraglich ist die Wirkung der BPI-Peptid-Mutanten und des mBPI auf grampositive Bakterien. Wobei Untersuchungen mit mBPI demonstrierten, dass dieses Protein keine antibakterielle Wirkung hat, sondern eine LPS neutralisierende Wirkung zeigt (Wittmann et al., 2008).

4.5.3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist die humanpathogenste Form der Listerien und bedeutet für Immunsupprimierte, Schwangere und Kinder eine reale Gefahr im Alltag (Milde-Busch et al., 2010).

In der Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte das huBPI Peptid bei einer Konzentration von 100µg/mL den stärksten Effekt, weshalb für den Vergleich der verschiedenen Agentien im Folgeexperiment diese Konzentration als Vergleichsgröße eingesetzt wurde. Im Vergleich zeigte das rekombinante huBPI

den stärksten antimikrobiellen Effekt, der aber insgesamt gering ausfiel (Abbildung 4).

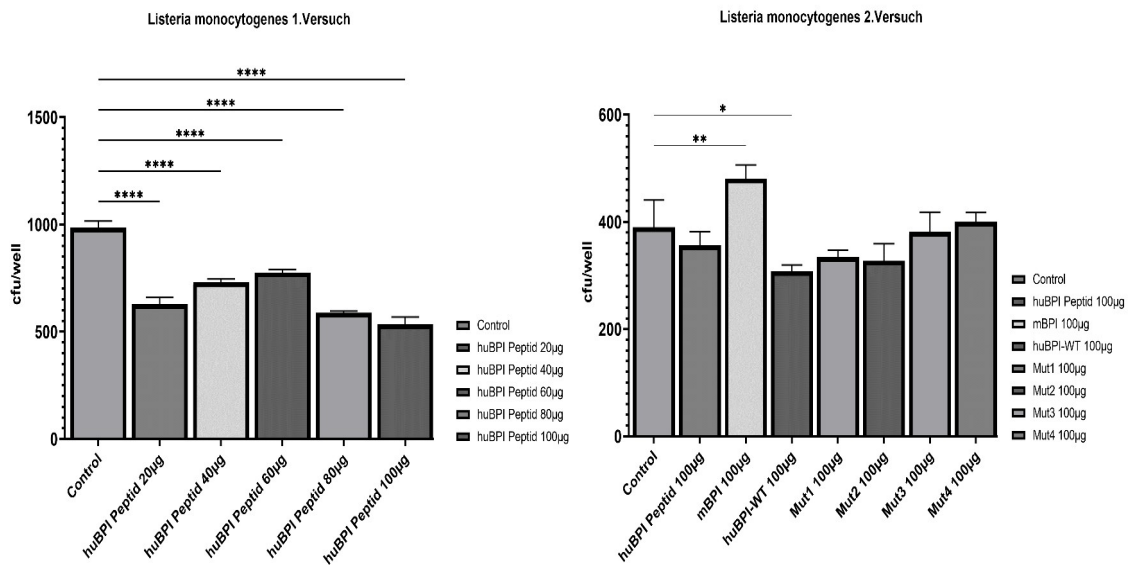


Abbildung 4: huBPI Peptid und seine Verwandten haben nur geringe Wirkung auf das Wachstum von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wurde in LB-Medium bis zu einer OD 600 von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentration in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinantem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden (100µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung.

4.5.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse für *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus agalactiae*

Staphylococcus aureus (*Staph. aureus*) ist unter den nosokomialen Keimen der bekannteste grampositive. Es wurde bereits beschrieben, dass huBPI keinen antimikrobiellen Effekt auf *Staph. aureus* zeigt (Weiss J et al, 1992).

In den hier durchgeführten Experimenten bestätigte sich dies auch für die verwandten Peptide und Proteine (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus agalactiae* wurden ebenfalls keine antibakteriellen Effekte durch die verwendeten Peptide und Proteine beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann man über die getesteten grampositiven Bakterien aussagen, dass lediglich huBPI-Peptid und rekombinantes humanes BPI gegenüber *Listeria monocytogenes* einen schwachen antimikrobiellen Effekt erzielten.

4.5.4 Inhibition bei gramnegativen Bakterien

Gramnegative Bakterien zählen heutzutage zu den häufigsten Problemkeimen und verursachen vor allem bei geschwächten Patienten Infektionen der Atemwege, des Blutstroms und des Harntraktes. In der 2020 von der WHO definierten ESKAPE-Liste für häufig auftretende Krankenhauskeime (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter-Spezies*) finden sich 4 gramnegative Erreger (De Oliveira et al., 2020).

4.5.4.1 Acinetobacter baumannii

Die *Acinetobacter* spp. sind ein Teil der Flora auf der Haut und den oberen Atemwegen (Towner, 2009; Munoz-Price et al., 2008). Sie sind in der Lage, unter herausfordernden Umweltbedingungen zu überleben (Almasaudi, 2018).

Im nosokomialen Bereich zeigen sie häufig Resistenzen gegen Antibiotika und verursachen vor allem auf großen Intensivstationen Ausbrüche (Wareth et al., 2020).

In den Versuchen zeigte sich, dass huBPI-Peptid und verwandte Peptide keine Wirkung auf das Wachstum von *Acinetobacter* spp. haben. Allerdings vermittelte das rekombinante humane BPI-Protein eine starke antimikrobielle Wirkung bei *Acinetobacter iwoffi* (Abbildung 5. Versuch 3). Die gleiche Wirkung des rekombinanten humanen BPI zeigte sich auch bei einem multiresistenten *Acinetobacter baumannii* Stamm (Abbildung 5. Versuch 2).

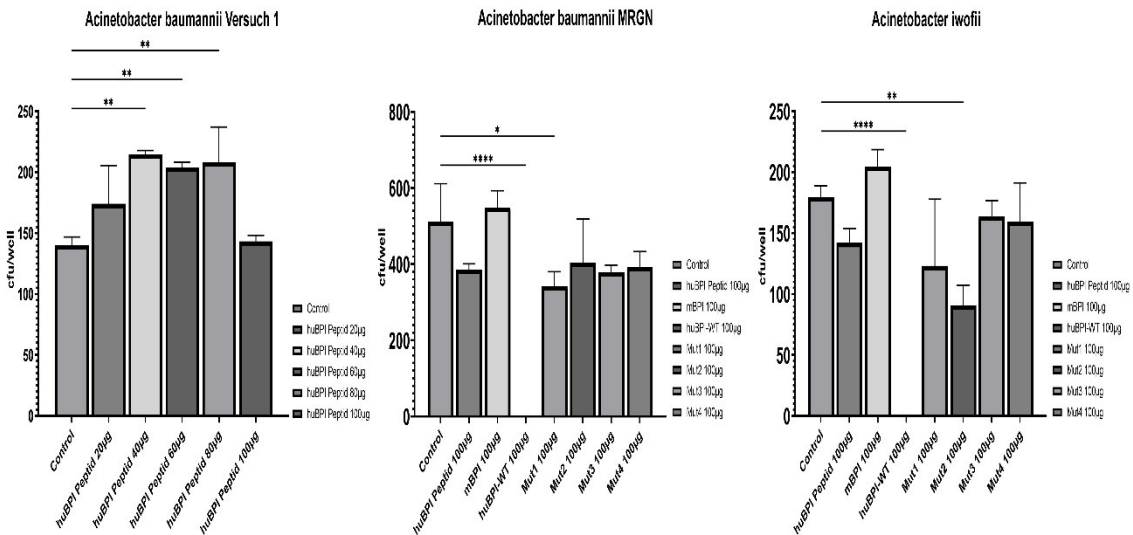


Abbildung 5: Rekombinantes huBPI Protein inhibiert das Wachstum von *Acinetobacter spp.*

Acinetobacter spp. wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentration in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinatem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden (100µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In Versuch 3 wurden anstatt *A. baumannii* *A. iwoffi* verwendet. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** p<0,0001 ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung.

4.5.4.2 *Escherichia coli*

E. coli zählt zu den bekanntesten Bakterien, unter anderem durch sein gut erforschtes Genom und durch sein häufiges Vorkommen in der Umwelt.

Als Einstieg in die Versuche wurde der *E. coli* Stamm DH5α verwendet, dieser wird durch den Verlust von vielen Pathogenitätsfaktoren vor allem in der Molekularbiologie häufig verwendet (Chen et al., 2018).

Deutlich zeigte sich hier die Wirkung des hu-BPI Proteins, welches zu starken antimikrobiellen Effekten bei *E. coli* DH5 α führte.

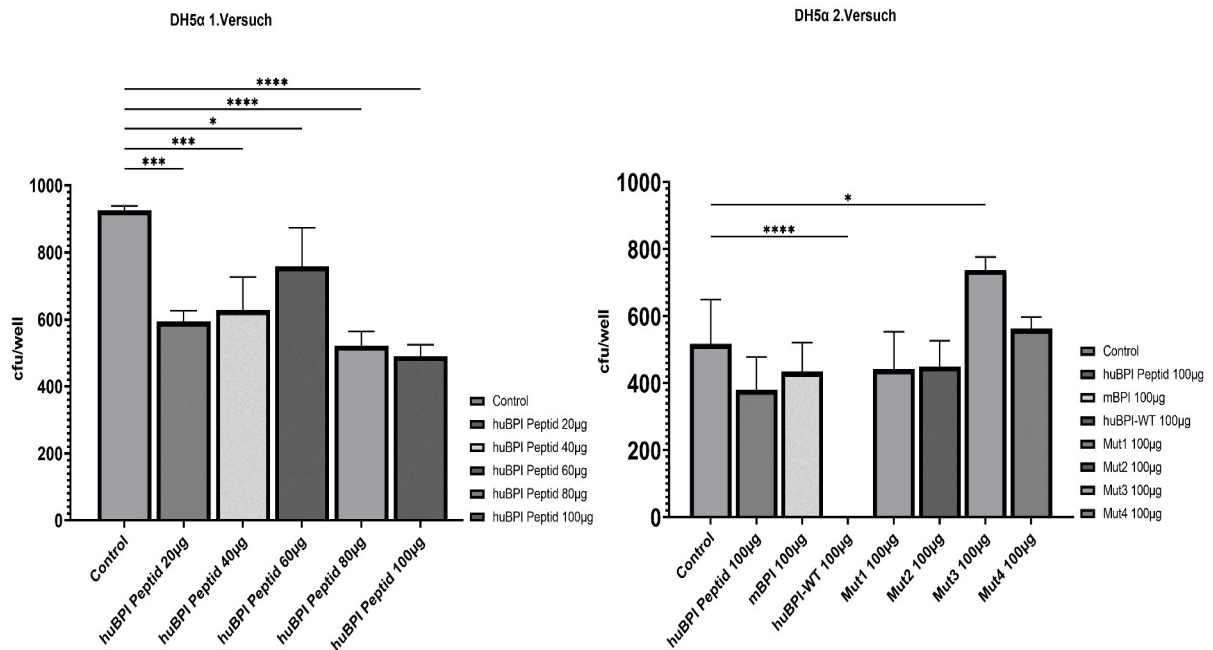


Abbildung 6: Das huBPI-Protein hemmt das Wachstum von *E. coli*, während die Peptide keine antimikrobielle Wirkung zeigen.

E. coli wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentrationen in μ g/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinantem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden (100 μ g/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***, p<0,0001 ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung.

Im Anschluss erfolgte die Analyse der antimikrobiellen Wirksamkeit der Proteine und Peptide an einem uropathogenen *E. coli* Stamm (UPEC). Diese Gruppe innerhalb der *E. coli* zählt zu den häufigsten Verursachern von Harnwegsinfekten (Terlizzi et al., 2017). Die starken antimikrobiellen Effekte des huBPI-Prote-

ins gegenüber *E. coli* konnten hier bestätigt werden, darüber hinaus zeigte auch das huBPI-Peptid eine gewisse Wirksamkeit (Abbildung 7).

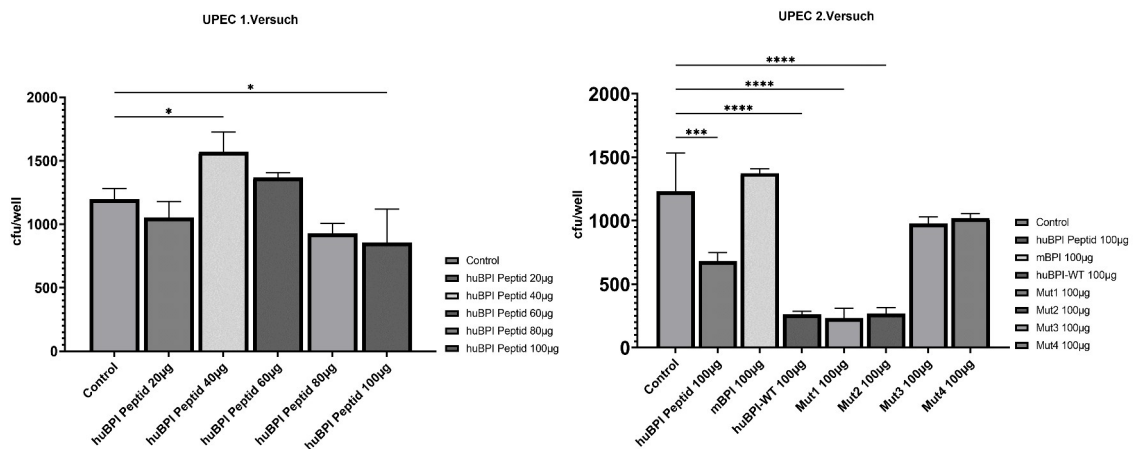


Abbildung 7: Das huBPI-Protein hemmt das Wachstum von UPEC, ebenso trifft das auf die huBPI Peptid-Varianten 1 und 2 zu.

E. coli wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentrationen in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinantem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden (100µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** p<0,0001 ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung.

4.5.4.3 Enterobacter cloacae

Enterobacter cloacae zählt mit zur Darmflora und kann unter anderem Pneumonien hervorrufen. Neben seinen Verwandten *E. aerogenes* und *Chromobacter sakazaki* können *Enterobacter cloacae* häufig Multiresistenzen gegenüber Antibiotika entwickeln (Parra-Flores J et al., 2018). Das huBPI-Protein erweist sich hier als wirksamer als die Peptide.

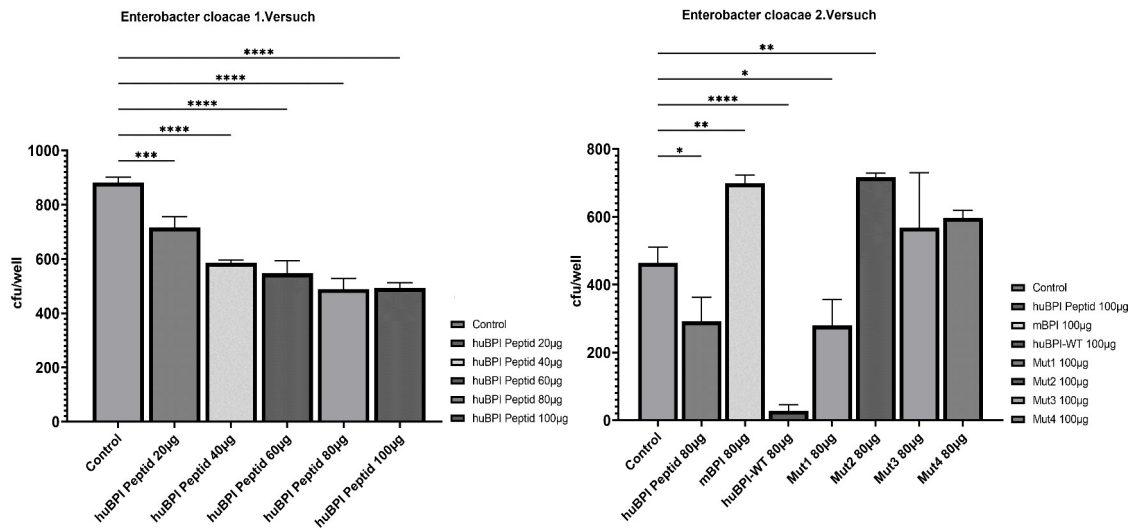


Abbildung 8: huBPI-Protein hemmt das Wachstum von *Enterobacter cloacae*.

Enterobacter cloacae wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentrationen in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinantem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden und Proteinen (100µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***, p<0,0001 ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung

4.5.4.4 Klebsiella spp.

Unter den *Klebsiella* (*K.*) sind vor allem *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* als humanpathogen bekannt. Besondere Krankheitsbilder, die durch Klebsiellen verursacht werden, sind die *Purpura fulminans* und der Leberabszess (Li et al., 2022; Ibrahim et al., 2022)

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung des huBPI-Peptides, um die optimale Wirkkonzentration zu ermitteln, wurde mit *K. pneumoniae* durchgeführt (Abbildung 9, Versuch 1). Der Vergleich der Effekte von verschiedenen BPI-Varianten wurde

dann sowohl an *K. pneumoniae* (Abbildung 9, Versuch 2) als auch an *K. oxytoca* (Abbildung 9, *K. oxytoca*) untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass huBPI Peptid und Protein und seine Verwandten keinen Einfluss auf das Wachstum dieser Bakterien haben. Allerdings wirkten die getesteten Peptide und das rekombinante Protein mit einer leichten Wachstumsinhibition auf *K. oxytoca* (Abbildung 9, Versuch 3).

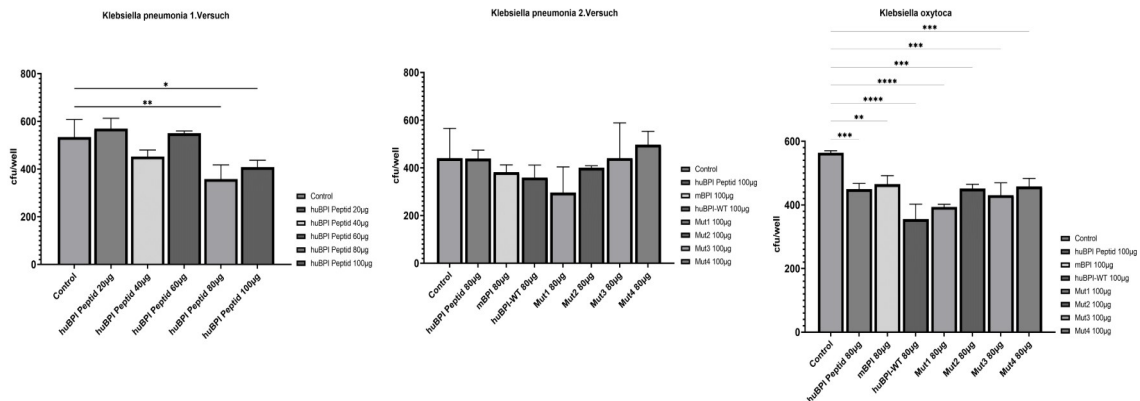


Abbildung 9: huBPI und seine Verwandten Zeigen nur bei *Klebsiella oxytoca* eine leichte Inhibition

Klebsiella pneumoniae und *oxytoca* wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentration in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinatem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden (100µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In Versuch 3 wurde *K. oxytoca* verwendet. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** p<0,0001 ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung

4.5.4.5 *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis ist ein stark peritrich begeißeltes und dadurch sehr bewegliches Bakterium, das zur normalen Darmflora zählt. Hauptsächlich verursacht es

Harnwegsinfektionen, gerne bei einliegenden Blasenkathetern (Jamil et al., 2022).

In den Versuchen konnten weder für das huBPI-Peptid noch für seine verwandten Peptide und Proteine eine Wirkung auf das Wachstum von *Proteus mirabilis* dokumentiert werden. Im Gegenteil schien *Proteus mirabilis* in der Gegenwart von huBPI Protein noch stärker zu wachsen (Abbildung 10, Versuch 2).

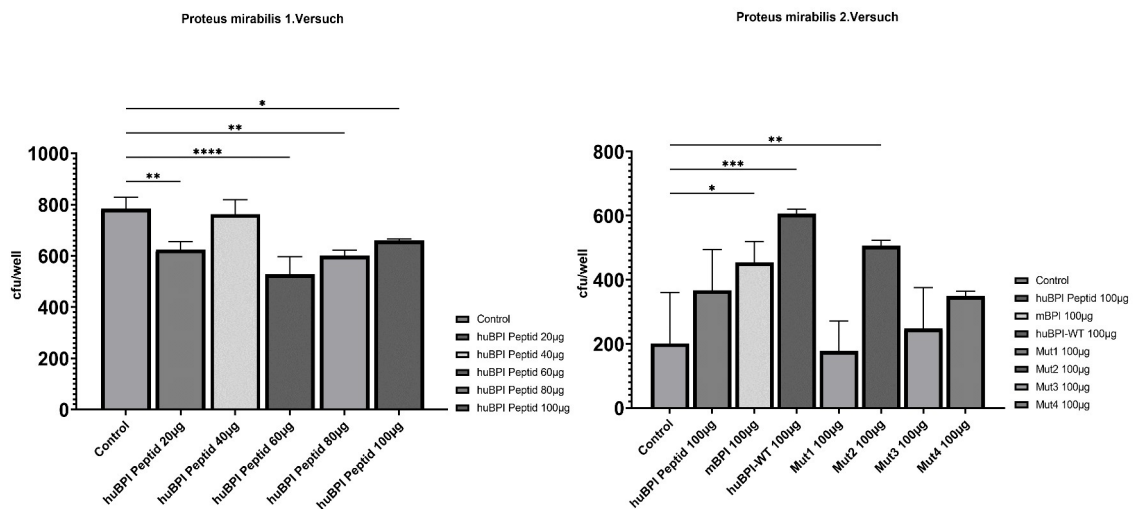


Abbildung 10: huBPI Peptid und seine Verwandten inhibieren das Wachstum von *Proteus mirabilis* nicht.

Proteus mirabilis wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentrationen in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinantem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden (100µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Kontrolle). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***, p<0,0001 ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung

4.5.4.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa hat sich in den letzten Jahrzehnten als einer der wichtigsten nosokomialen Erreger etabliert und ist häufig multiresistent (Ibrahim et al., 2020).

In Versuch 1 zeigte sich das huBPI Peptid in allen Konzentrationen inhibitorisch (Abbildung 11, Versuch 1 und 2),

Da die Ergebnisse bei den huBPI Peptid Konzentrationen von 80µg/mL und 100µg/mL sehr ähnelten wurde aus ökonomischen Gründen entschieden, die niedrigere Konzentration für den direkten Vergleich zu verwenden.

Beim direkten Vergleich zeigten sich auch das huBPI Protein und die huBPI Peptid Mutante 1 inhibitorisch. Die Wirkung des Proteins und der beiden Peptide konnte auch gegenüber eines multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa* Stammes beobachtet werden (Abbildung 11, Versuch 3).

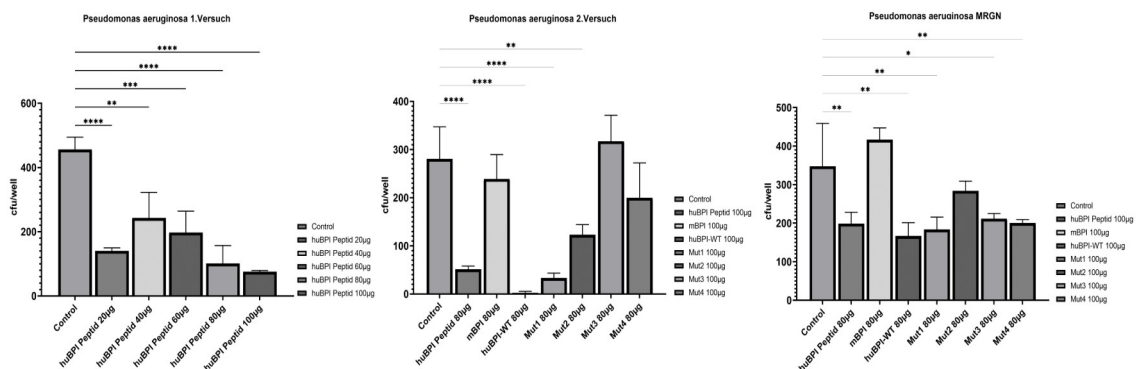


Abbildung 11: huBPI-Peptid, huBPI-Protein und die Mutante 1 zeigen eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa wurde in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C unter Schütteln herangezogen, damit die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Eine Bakterienzahl von 10⁴/mL wurde in PBS pH 7,4 eingestellt und in einer 96-well-Flachboden-Platte in Dreifachbestimmung mit dem huBPI-Peptid in verschiedenen Konzentrationen in µg/mL (Versuch 1; BPI20 – BPI100) oder in Versuch 2 rekombinantem huBPI (huBPI-WT), huBPI-Peptid (BPI100) und verwandten Peptiden und Proteinen (80µg/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In Versuch 3 wurde ein multiresistenter *P. aeruginosa*-Stamm verwendet- Als Referenz diente die Bakterienkultur, die nicht mit huBPI-Peptid behandelt wurde (Control). Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht bebrütet und die Kolonien zur Berechnung der cfu/well am folgenden Tag ausgezählt.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung

4.5.4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse für die Inhibition bei gramnegativen Bakterien

Das breiteste Wirkspektrum und die stärksten antimikrobiellen Effekte gegenüber gramnegativen Bakterien konnten mit dem rekombinanten humanem BPI-Protein beobachtet werden. Dies hemmte stark das Wachstum bei *Acinetobacter* spp., *E. coli* spp., *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Ein sehr ähnliches Wirkspektrum konnte für das humane BPI-Peptid gezeigt werden, allerdings waren die Wachstums-inhibierenden Effekte weniger stark ausgeprägt. Weder das murine BPI-Peptid noch die humanen Peptid-Mutanten 3 und 4 waren in der Lage, das Wachstum der hier analysierten gramnegativen Bakterien zu beeinflussen. Darüber hinaus verdeutlichen die Experimente, dass eine Antibiotikaresistenz der Bakterien nicht unweigerlich mit einer Resistenz gegen huBPI einhergeht.

Gegenüber *Klebsiella* spp und *Proteus mirabilis* hingegen zeigte sich keine Inhibition des Wachstums durch die hier verwendeten Proteine und Peptide. Im Gegenteil schien *Proteus mirabilis* in der Präsenz von rekombinantem humanem BPI verstärkt zu wachsen. Die möglichen zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen werden im Diskussionsteil erörtert.

4.6 Ergebnisse der Versuche mit Influenzastämmen

Influenzaviren gehören zu den häufigsten Erregern von Atemwegserkrankungen; sie verursachen jährliche globale Pandemien. Einige dieser Pandemien erlangten Berühmtheit, zum Beispiel die spanische Grippe von 1918 (Trilla et al., 2008; Gaitonde et al., 2019). Die replikationsinhibitorischen Effekte des huBPI-Peptids gegenüber Influenzaviren konnte im Vorfeld bereits dokumentiert werden (Pinkenburg, 2016). In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob auch das rekombinante humane BPI-Protein eine antivirale Wirkung gegenüber Influenzaviren

entfalten kann. In den Versuchen wurden die beiden Influenzastämme *H1N1* und *H3N2* verwendet.

Im Experiment der Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte die replikationsinhibitorische Wirksamkeit des huBPI-Peptid gegenüber den beiden Influenzastämmen bestätigt werden (Abbildung 12, A. 1. Versuch nur BPI-Peptid H1N1 und B, 1. Versuch nur BPI-Peptid H3N2). Während das rekombinante humane BPI keine antivirale Wirkung gegenüber den beiden Influenzastämmen über den getesteten Konzentrationsbereich aufwies (Abbildung 12, 2. Versuch BPI-Peptid und huBPI-WT (Protein) H1N1 und 2. Versuch BPI-Peptid und huBPI-WT (Protein) H3N2.), zeigte das huBPI-Peptid, wie bereits beschrieben (Pinkenburg, 2016), einen deutlichen antiviralen Effekt.

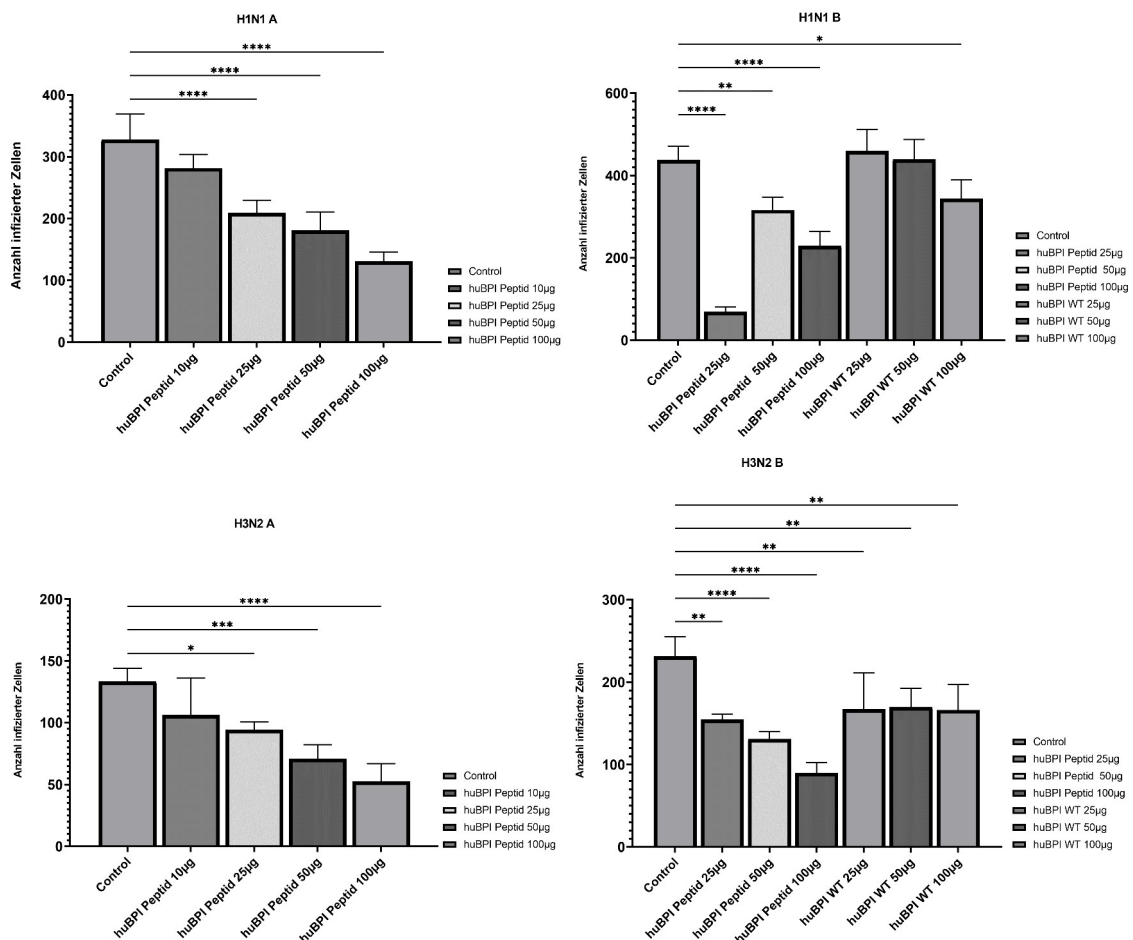


Abbildung 12: huBPI-Peptid hemmt die Infektiosität von Influenzaviren, das huBPI-Protein hemmt Influenzaviren nicht.

Protease-defiziente MDCK(H)-Zellen wurden mit 400 PFU/well der Influenzaviren *H1N1* (Versuch 1 A und B) oder *H3N2* (Versuch 2 A und B) für 1 Stunde infiziert. Vor der Infektion wurde das Virus in der Anwesenheit oder Abwesenheit der angegebenen Konzentrationen des

huBPI-Peptid beziehungsweise huBPI-Protein für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Infektion wurde die Viruslösung entfernt und die Zellen für weitere 12 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Maus Anti-Influenzanucleoprotein Antikörper (Klon HB65) für 12 h bei 4°C inkubiert. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers wurde durch die Zugabe eines Esel anti-Maus IgG-HRP Antiserum nachgewiesen. Die Färbung der Antikörperbindung wurde mittels TrueBlue-Peroxidase vorgenommen. Anschließend wurden die Proben getrocknet und mikroskopisch ausgewertet.

Darstellung des Ergebnisses eines Experimentes mit Mittelwerten aus 3 Einzelbestimmungen und Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA in Graphpad Prism.

In der Abbildung werden nur statistisch signifikante Abweichungen zwischen Ansätzen und Kontrolle dargestellt. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ ****, nicht signifikante Abweichungen ohne Darstellung

Im Versuch zeigte sich, dass das huBPI-Protein keine Wirkung auf die Infektiosität von Influenzaviren hat. Bei den Viren, die dem huBPI Petid ausgesetzt wurden, konnte eine reduzierte Infektiosität, die sich in einer geringeren Zahl infizierter Zellen manifestiert, beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Die Herstellung von rekombinantem humanem BPI und nachfolgende Überprüfung der biologischen Aktivität

Die Herstellung des rekombinanten humanen BPI in *Drosophila melanogaster* Schneider-2 Zell-System, welches für diese Arbeit verwandt wurde und die nachfolgende Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von bereits in der Arbeitsgruppe Schnare etablierten Protokollen. Anschließend wurde das aufgereinigte rekombinante Protein im bakteriellen Adhäsionstest auf seine biologische Aktivität überprüft. Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen und der bereits bestehenden Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Schnare (Meyer, 2011).

5.2 Antibakterielle Wirkung bei Grampositiven Bakterien

Die Resistenz von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* gegenüber humanem BPI wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt (Horwitz et al., 1999; Weiss et al., 1992). Allerdings wurde in diesen Studien noch nicht die Wirksamkeit von Peptiden, die aus der Sequenz von humanem BPI abgeleitet wurden und sich durch eine starke antimikrobielle Wirksamkeit auszeichnen (Aichele et al., 2006), getestet. Hier konnten die bereits publizierten Daten der Resistenz der beiden Bakterienspezies gegenüber BPI bestätigt werden. Sehr wahrscheinlich ist der Einfluss der Zellwand bei grampositiven Bakterien der entscheidende Faktor für die natürliche Resistenz von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* gegenüber BPI. Diese Annahme wird durch die Erkenntnisse bestätigt, dass zellwandlose grampositive Bakterien durch BPI abgetötet werden können (Madoff, 1986).

Die Interaktion vieler antimikrobieller Proteine mit der bakteriellen Zellwand geschieht aufgrund ihrer kationischen Ladung. Dadurch können diese Proteine und Peptide an die primär negativ-geladene bakterielle Zellwand binden. Ein wichtiger Resistenzmechanismus von *Staphylococcus aureus* beruht auf der Modifikation der Zellwand durch D-Alanylierung der Phosphatgruppen von Lipoteichonsäure. Dadurch verändert sich die Nettoladung der eigentlich stark negativen Zellwand zu einer schwach negativen und deswegen werden positiv geladene Proteine, wie zum Beispiel BPI, viel schwächer angezogen und zeigen damit lediglich eine schwache Interaktion mit der bakteriellen Zellwand

(Simanski et al., 2013). Darüber hinaus besitzt *Staphylococcus aureus* die Eigenschaft, Bindeproteine, die an positiv geladene Proteine binden können, freizusetzen oder Enzyme zu sezernieren, die BPI proteolytisch degradieren können (Ryu et al., 2014). In der Summe führen diese Mechanismen zur Aufhebung der antimikrobiellen Aktivität von BPI. Die für *Staphylococcus aureus* aufgezählten Resistenzmechanismen finden sich auch bei Streptokokken (LaRock, 2015).

Bei *Listeria monocytogenes* bestätigt sich die antibakterielle Wirkung von BPI, die bereits in Vorarbeiten der AG Schnare beobachtet wurde. In dieser Vorarbeit konnten klinische Isolate von *Listeria monocytogenes*, die von immunkomprimierten Patienten während einer Listeriose, die bei den Patienten einen letalen Verlauf nahm, isoliert wurden, mit dem humanen BPI-Peptid abgetötet werden (Wittmann, 2014). In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt auch durch das rekombinant hergestellte humane BPI erzielt werden. Hierbei stellt sich die Frage, auf welcher molekularen Basis die Interaktion von BPI mit *Listeria monocytogenes* erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass BPI sowohl mit bakteriellen Lipopeptiden als auch Teichonsäuren, die von grampositiven Bakterien abstammen, wechselwirken kann. Allerdings führte in der beschriebenen Studie diese Wechselwirkung zu einer Verstärkung der Erkennung dieser bakteriellen Produkte durch das Immunsystem. Eine antimikrobielle Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien wurde nicht analysiert (Bülow et al., 2018).

5.2.1 Ausblick zur therapeutischen Nutzung bei grampositiven Bakterien

Die Modifikation des humanen BPI-Peptides, welche eine Auswirkung auf die antivirale Aktivität von BPI zeigt (Pinkenburg, 2016), führte nicht dazu, dass BPI das Wachstum von *Streptococcus pyogenes* oder *Staphylococcus aureus* inhibierte. Durch die Modifikationen des humanen BPI-Peptides verändert sich die Ladung von humanem BPI-Peptid (Mutante 3, plus 3) und gleicht sich der Nettoladung des murinen Homologs des humanen BPI-Peptides an. Das unveränderte humane BPI-Peptid (Wildtyp) trägt eine Nettoladung von plus 5, sodass alleine auf Grundlage der Ladungen der Peptide das unveränderte humane BPI-Peptid mit einer negativen Oberfläche stärker interagieren kann als die Peptid-Mutante, die nur noch eine Nettoladung von plus 3 trägt (Mutante

3 und murines BPI-Peptid). Ob auch andere Mitglieder der Familie der *Streptococcae* und *Staphylococcae* resistent auf die Wirkung von humanem BPI sind, wurde aus Zeitgründen und aus Gründen der geringeren medizinischen Bedeutung dieser Bakterien nicht mitgetestet.

Von den in dieser Arbeit verwendeten grampositiven Bakterienstämmen scheint lediglich *Listeria monocytogens* suszeptibel gegenüber BPI zu sein. Inwieweit die anderen Mitglieder der sechzehn Listerienfamilien ebenfalls gegenüber BPI suszeptibel reagieren, ist eine Fragestellung für Folgeuntersuchungen (Luque-Sastre et al., 2018). Die Listeriose stellt lediglich für Immunsupprimierte oder das sich entwickelnde Kind bei der Infektion einer Schwangeren eine besondere Gefahr dar. Hierbei kann die Infektion jedoch fulminante Konsequenzen haben (Mylonakis et al., 2002). Ob diese spezielle und enge Gruppe von Risikopatienten ökonomisch eine Weiterentwicklung von BPI als Therapeutikum rechtfertigt, muss noch evaluiert werden.

5.3 Antibakterielle Wirkung bei Gramnegativen Bakterien

Die antimikrobielle Wirkung auf gramnegative Bakterien ist bereits für rhuBPI nachgewiesen (Weiss et al., 1992; Ooi et al., 1987; Li et al., 2018; Weitz et al., 2013; Aichele et al., 2006; Chockalingam et al., 2007). Doch zeigen einige Vertreter der Gruppe der gramnegativen Bakterien Unterschiede in der Sensibilität gegenüber BPI, die von verschiedenen Faktoren abhängig sein können. Wahrscheinlich spielen bei der Resistenz der gramnegativen Bakterien gegenüber BPI genau wie bei *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* Veränderungen oder Besonderheiten der Zellwand eine große Rolle.

5.3.1 Resistenz bei *Klebsiella* spp. und *Proteus mirabilis*

Klebsiella spp. und *Proteus mirabilis* zeigten sich gegenüber der Wirkung von BPI resistent. So wurden *Klebsiella* spp. nicht von huBPI-Peptid und seinen Verwandten beeinflusst (Abbildung 9). Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen aus 1992, die eine Zytokinausschüttung durch Immunzellen als Reaktion auf *Klebsiella pneumoniae* bei gleichzeitiger fehlender antimikrobieller Wirksamkeit von huBPI gegenüber Klebsiellen dokumentierten (Weiss, et al. 1992).

Jedoch zeigte eine andere Arbeit von 2008, dass die Expression des Fusionsproteins *BPI 23-Fcy1* im Lungenepithel nach Adenovirustransduktion von *BPI 23-Fcy1*-exprimierenden Viren bei immunkompromittierten Mäusen ein signifikant höheres Überleben bei der Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* verursachte (Li et al, 2008).

Es stellt sich daher die Frage, ob die Situation *in vitro* versus *in vivo* für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich ist. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass BPI besonders *in vivo* mit einer Vielzahl anderer Proteine, die während einer Immunantwort aktiv sind, zusammenarbeiten kann. Wie in der Einleitung erwähnt, interagiert BPI im Organismus mit dem Komplementsystem, welches die Wirksamkeit von BPI verstärken kann (Nishimura et al., 2001). Darüber hinaus werden durch die Infektion mit Klebsiellen *in vivo* multiple Immunaktivatoren induziert, die ebenfalls mit BPI zusammenarbeiten könnten. So sind besonders die Signalwege über Interleukin-23 und Interferon- γ bei Klebsiellen-Infektionen aktiviert (Bengoechea et al., 2019). Welchen Einfluss diese Aktivierungswege auf die Wirkung von BPI haben, ist noch nicht geklärt.

Neben der Modifikation der Zellwand verfügen *Klebsiella spp.* über eine Auswahl an unterschiedlichen Resistenzmechanismen. So zeigte eine Untersuchung von 2010, dass AcrAB Effluxpumpen eine Rolle bei der Resistenz gegen Antibiotika und antimikrobiellen Proteine spielen. Effluxpumpen sind in der Lage, Substanzen aus dem Zytoplasma oder auch periplasmatischen Raum herauszupumpen und damit die intrazelluläre Konzentration dieser Substanzen zu erniedrigen. Ob dies auch für BPI gilt und damit die Wirkkonzentration von BPI verringert wird, ist nicht bewiesen (Padilla et al., 2010).

Der wahrscheinlich relevanteste Schutzmechanismus von Klebsiellen gegenüber den Effekten von BPI besteht durch eine Kapsel aus Polysacchariden, die die Zellwand der Bakterien umgibt. Diese Kapsel wirkt wie ein Schutzschild, der eine Opsonisierung der Bakterien mit der Folge einer verringerten Phagozytoserate und die Lyse durch antimikrobielle Proteine verhindert. Diese Kapsel der Klebsiellen ist mit 160nm um einiges dicker als die Kapsel bei *E. coli*, die lediglich 10nm misst. Im Gegensatz zu Klebsiellen sind *E. coli* suszeptibel gegenüber der antimikrobiellen Wirkung von BPI (Amako et al., 1988).

Darüber hinaus sind *Klebsiellen* gute Biofilmbildner. Die Biofilmbildung führt ebenfalls dazu, dass die Zugänglichkeit von antimikrobiellen Substanzen zu den Bakterien herabgesetzt wird. Die Kombination aus Kapsel und Biofilmbildung könnte für die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Proteinen unter anderem auch BPI ein entscheidender Faktor sein (Patro et al., 2019).

Proteus mirabilis zeigte in dieser Arbeit ebenfalls eine ausgeprägte Resistenz gegenüber BPI und seinen abgeleiteten Varianten (Abbildung 10), was eine Untersuchung von 1994 bestätigt. Diese Untersuchung kam auch zum Schluss, dass die Länge der LPS-Ketten ein relevanter Faktor für die Resistenz von *Proteus mirabilis* ist. Bei Stämmen die kürzere LPS Ketten trugen, erwies sich rhuBPI antibakteriell wirksam. Die Längen der LPS-Ketten von *Proteus mirabilis* zeigen eine hohe Flexibilität, weshalb Capodici die These aufstellte, dass diese langen LPS-Ketten einen Art Schutzschirm um die anionischen und hydrophobischen Bereiche der Lipid A-Region der äußeren Zellwand aufbauen können, so dass BPI von der inneren Zellwand und der Zellmembran durch sterische Hinderung ferngehalten werden kann. (Capodici et al., 1994)

Dieser Schutzschirm scheint auch gegen die molekular wesentlich kleineren von BPI abgeleiteten Peptiden zu funktionieren (Abbildung 10).

5.3.2 Sensibilität bei *Acinetobacter* spp., *E. coli* spp., *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa*

Die Vertreter der *Acinetobacter* spp, *A. iwoffii* und *A. baumannii* erwiesen sich in dieser Arbeit, auch bei antibiotischer Multiresistenz, als hochsensibel gegenüber BPI vor allem gegenüber rhuBPI. Eine Untersuchung von 2001 dokumentierte erstmals die Wirksamkeit von rBPI-21 gegenüber Polymyxin B resistentem *A. baumannii* (Urban et al., 2001) und eine von 2013 gegenüber panresistentem *A. baumannii* (Weitz et al., 2013). Sodass wir diese Befunde bestätigen und die antimikrobiellen Effekte von BPI auf multiresistente *A. iwoffii* ausweiten konnten.

Die Sensibilität der *E. coli* spp., gegenüber BPI ist noch weitaus länger bekannt (Weiss et al., 1992; Ooi et al., 1987) und tritt in dieser Arbeit ebenfalls sehr deutlich auf (Abbildung 6 & 7). Entgegen der Ergebnisse im Bereich der *Klebsiella* spp. scheint hier die im Vergleich wesentlich dünnere Schicht aus Polysacchariden, keinen Wirkungsverlust bei BPI zu verursachen.

Die Wirkung von BPI auf die *Enterobacter spp.* wurde 2007 bei Isolaten aus entzündeten Eutern von Kühen beschrieben. Dort wirkte ein Peptid, das aus huBPI abgeleitet wurde, antimikrobiell (Chockalingam et al. 2007). Hingegen zeigten frühere Versuche mit Nabelschnurblut, welches mit rBPI-23 substituiert wurde, keinen Effekt von BPI auf das Wachstum von *Enterobacter cloacae* (Levy et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte eine sehr starke antimikrobielle Wirkung besonders von rekombinantem humanem BPI gegenüber *Enterobacter cloacae* bestätigt werden (Abbildung 8). Auch das aus dem rekombinantem humanem BPI abgeleitete humane BPI-Peptid war antibakteriell gegenüber *Enterobacter* wirksam. Wobei die Wirkung wahrscheinlich sehr stark von der Nettoladung des BPI-Peptides abhängt. Denn mutierte Peptide, bei denen die positive Nettoladung auf +3 reduziert wurde, verloren ihren antibakteriellen Effekt auf *Enterobacter* (Abbildung 8). So dass auch für *Enterobacter* abgeleitet werden kann, dass sehr wahrscheinlich die Interaktion von BPI mit der negativ geladenen bakteriellen Zellwand von entscheidender Bedeutung für die antibakteriellen Effekte ist.

In dieser Arbeit konnte die starke antimikrobielle Aktivität von humanem BPI-Peptid auch gegen multiresistente *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen bestätigt werden (Aichele et al., 2006). In der bereits publizierten Studie war das Peptid auch gegen *P. aeruginosa*-Stämme aktiv, die einen Biofilm bilden konnten. Auch die Wirkung von humanem BPI gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* wurde schon 1992 beschrieben (Weiss et al., 1992). Wir konnten in der vorliegenden Studie diese Befunde erweitern, indem die antimikrobielle Aktivität von rekombinantem BPI auch gegen multiresistente *P. aeruginosa* demonstriert wurde und darüber hinaus haben wir dargelegt, dass die positive Nettoladung des humanen BPI-Peptides für seinen antimikrobiellen Effekt gegenüber *P. aeruginosa* verantwortlich ist (Abbildung 11).

5.3.3 Ausblick zur therapeutischen Nutzung bei gramnegativen Bakterien

Wie bereits belegt und auch in dieser Arbeit gezeigt, sind eine Vielzahl von gramnegativen Bakterien gegenüber BPI und seinen abgeleiteten Peptiden und Proteinen sensibel. Von den in dieser Arbeit sensiblen Bakterien werden mehrere von der WHO als besonders gefährlich eingestuft, da sie in der Lage sind, Multiresistenzen auszubilden (Tacconelli et al., 2018). Der Entwicklung

von neuen therapeutischen Methoden gegenüber solchen Bakterien wird daher besondere Dringlichkeit eingeräumt. So sind bereits Versuche mit Nanopartikeln und Bakteriophagen erfolgt und antimikrobielle Peptide (AMP) werden ebenfalls als potentielle Therapeutika gehandelt (Mulani et al., 2019).

Nach unseren Befunden und bereits publizierten Daten bieten sich BPI und daraus entwickelte Peptide ebenfalls als neue Therapiekonzepte an, vor allem bei Infektionen mit *Acinetobacter spp* und *Pseudomonas aeruginosa*.

Die notwendigen Schritte zur Weiterentwicklung von BPI als antiinfektives Therapeutikum umfassen unter anderem die Frage, auf welche Weise diese antimikrobielle Substanz eingesetzt werden kann. Hier wären entweder inhalative, intravenöse oder topische Verfahren denkbar. Die Applikation von neun antiinfektiven Therapeutika (Bacitracin, Dalbavavancin, Daptomycin, Enfuvirtide, Oritavancin, Teicoplanin, Telaprevir, Telavancin, Vancomycin), die auf Peptiden basieren, wurden für die intravenöse und topische Verabreichung von der FDA zugelassen (Lei et al., 2019).

Jedoch muss bei der Entwicklung berücksichtigt werden, dass unter verschiedenen Krankheitsaspekten Autoantikörper gegen BPI zum Beispiel bei Patienten mit Mukoviszidose (CF), Bronchiektasien (BE) oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) nachgewiesen wurden (Theprungsirikul et al., 2020). Diese Autoantikörper sind funktional, indem sie in der Lage sind, die antibakterielle Aktivität von BPI zu neutralisieren. Inwieweit diese Antikörper die von BPI abgeleiteten Peptide oder das in D. mel-2 Zellen hergestellte rekombinate BPI inhibieren, ist noch nicht geklärt.

Desweiteren bestehen zwischen den Ergebnissen im Labor und bei klinischen Beobachtungen hinsichtlich der antimikrobiellen Proteine Unterschiede. So zeigten Untersuchungen, dass AMP in Konzentrationen im Körper von Lebewesen nachgewiesen wurden, die *in vitro* nicht bakterizid wirksam waren (Dorschner et al., 2001). Jedoch reichten diese niedrigen AMP-Spiegel im tierischen Organismus aus, um in Abhängigkeit von anderen Wirtsmolekülen, beispielsweise unter Carbonat, dennoch sehr wirksam zu sein (Dorschner et al., 2006). Hier stellt sich auch generell die Frage, inwieweit die *in vitro* antibakteriell wirksamen Dosen im Körper genutzt werden können. Denn viele AMP zeigen *in vivo* in den *in vitro* wirksamen Konzentrationen hohe Zytotoxizität (Lei

et al., 2019). Im Falle, dass die AMP einen starken amphiphilen Charakter aufweisen, muss mit einer starken hämolytischen Aktivität gerechnet werden (Zhang et al., 2021).

Ein weiteres Hindernis für Kandidatensubstanzen hin zur therapeutischen Anwendung ist die Bioverfügbarkeit der Substanzen bei oraler Einnahme. Besonders für antimikrobielle Moleküle auf Proteinbasis ist dies bereits beobachtet worden. Zum Beispiel kann das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin die Darmwand nicht passieren. Aus diesem Grund wird dieses Antibiotikum nur noch bei Enterokolitiden oral verabreicht (Patel et al., 2023). Selbst wenn die Proteine, die Darmwand in ausreichender Konzentration überwinden können, warten im Körper viele proteolytisch aktive Enzyme, die die Wirksubstanzen degradieren können oder Entgiftungswege, die zur Ausscheidung der Substanzen aus dem Körper führen, zum Beispiel über Albumin und der Ausscheidung von Substanzen über Niere und Leber (Vlieghe et al., 2010). Diese aufgeworfenen Fragen sollten vor einer therapeutischen Nutzung beantwortet werden.

Die Modifikation von AMP, die Verbindung mit Vehikeln oder die Kombination mit bestehenden Antibiotika scheinen hier Möglichkeiten für die therapeutische Weiterentwicklung zu bieten. So führte der Ersatz von L-Aminosäuren mit D-Aminosäuren in aviärem Cathelicidin-2 zu einer Stabilisierung des AMPs bei gleichzeitiger Verringerung der Zytotoxizität ohne des Verlusts der antimikrobiellen Eigenschaften. In anderen Fällen verbesserte sich hierdurch die Widerstandskraft der AMPs gegenüber Proteasen (Zhang et al., 2021). Die Veränderung der räumlichen Struktur der AMPs kann sogar mit einer Effektivitätssteigerung der antimikrobiellen Wirkung einhergehen, wie Versuche mit der Schaffung einer Ringstruktur aus einem linearen Peptid und der Hybridisierung zeigten (Dathe et al., 2004; Zhang et al., 2021). In wieweit solche Modifikationen zur Verbesserung der Stabilität, Bioverfügbarkeit und antimikrobieller Aktivität bei den von BPI abgeleiteten Peptiden führen, muss noch ausgetestet werden.

Um die lokale Wirkkonzentration von AMPs am Ort, wo sie benötigt werden, zu erhöhen, wurden Nanomaterialien verwendet, die dazu führten, dass die AMPs besser lokal freigesetzt wurden. Darüber hinaus kann die Fusion von AMPs mit

Proteinen, die in Zellen eindringen können, hohes Potenzial versprechen, um AMPs zielgerichtet einzusetzen (Zhang et al., 2021).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt um AMPs therapeutisch nutzbar zu machen, ist die Kombinationstherapie. Hierbei werden AMPs in Kombination mit bestehenden Medikamenten oder sogar Desinfektiva verabreicht. Eine Untersuchung von 2017 in Zahnkliniken zeigte die Inhibition der Biofilmbildung bei *Streptococcus mutans* durch die Kombination eines Defensins und eines Desinfektionsmittels (Ahn et al., 2017). Ebenso erwies sich die Kombination eines Tetrazyklins mit einem AMP wirksam bei resistenten *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen (Zheng et al., 2017). Hierbei scheint auch die Reduktion der Konzentration der AMPs möglich, was sofort zu einer reduzierten Toxizität führt.

Das Potenzial von AMP für die antimikrobielle Therapie scheint nach vorliegenden Befunden groß zu sein, inwieweit rhuBPI und die daraus abgeleiteten Peptide sich hier einfügen könnten, muss über weitere Untersuchungen eruiert werden.

5.4 Influenzaviren werden in ihrer Infektiösität durch huBPI-Peptid beeinflusst, wo rhuBPI keine Wirkung zeigt

Vorhergehende Arbeiten aus der Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass huBPI-Peptid eine Wirkung auf Influenzaviren hat und es zu einer direkten Interaktion von huBPI-Peptid mit der Virushülle kommt, was unter anderem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie belegt werden konnte. Hierbei wird die Virushülle geschädigt, bei höheren Konzentrationen (500µg/mL) kam es sogar zur Zerstörung des Virus (Pinkenburg et al., 2016).

Das rekombinante humane BPI hingegen zeigte hier keine nachweisbare Wirkung gegenüber Influenza-Viren. Jedoch wurde humanes BPI von neutrophilen Granulozyten nach Infektion mit Influenza-Viren freigesetzt (Pinkenburg et al., 2016). Dabei stellt sich die Frage, warum ein antimikrobielles Protein von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird, obwohl es gegen das induzierende Agens keine direkte Wirksamkeit aufzeigt. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass BPI von neutrophilen Granulozyten nicht isoliert freigesetzt wird, sodass die Wahrscheinlichkeit besteht, dass BPI im Konzert

mit anderen von neutrophilen Granulozyten freigesetzten Substanzen gegenüber Influenza-Viren wirksam sein könnte. Warum das aus der Sequenz von humanem BPI abgeleitete Peptid eine Wirkung gegen Influenza entfaltet und das rekombinante Protein unwirksam blieb, kann nicht abschließend geklärt werden. Berücksichtigt werden sollte allerdings die unterschiedlichen molaren Konzentrationen der beiden Produkte, die in die Experimente eingesetzt wurden. Das Peptid hat eine molekulare Größe von rechnerisch 3 kDa, während das Protein alleine aufgrund seiner Aminosäuresequenz ohne potentielle posttranslationale Modifikationen eine Größe von 55 kDa aufweist. Das heißt, dass molekular betrachtet, lediglich 1/16 der Moleküle des rekombinanten Proteins im Vergleich zum Peptid eingesetzt wurden. Inwieweit jedoch 1,6 mg rekombinantes Protein, wenn man die höchste eingesetzte Konzentration des Peptides für die Berechnung zu Grunde legt, physiologisch oder auch biologisch sinnvoll sind, ist sehr zweifelhaft. In Sputumproben von CF-Patienten konnten bis zu ca. 100µg/mL an humanem BPI in einem ELISA gemessen werden (Aichele et al., 2006). Dadurch kann eine Konzentration von 100µg/mL rekombinantes BPI als sinnvoll und physiologisch relevant angesehen werden.

Neben der reinen Konzentrationsbetrachtung könnte auch der C-Terminus des Proteins, der beim Peptid nicht vorhanden ist, einen Einfluss auf die anti-Influenza Aktivität des Proteins einnehmen. Der C-Terminus von humanem BPI zeigt verschiedene Eigenschaften, die bei der antimikrobiellen Funktion von BPI hilfreich sind, aber bei der Aktivität gegenüber Influenza inhibitorischen Charakter aufweisen könnten. Hier könnte die Analyse des rBPI-23, welches nur aus dem N-terminalen Teil des humanen BPI besteht, Klarheit bringen.

5.4.1 Therapeutische Perspektive bei Infektionen mit Viren

Da bei der saisonalen Influenza Impfstoffe gut verfügbar sind und mit den Neuraminidasehemmern bereits therapeutische Optionen zur Verfügung stehen (Choi et al., 2014), besteht im Rahmen der Influenza-Grippe lediglich Bedarf bei Viren, die gegenüber Neuraminidasehemmern resistent sind, für neue Antiinfektiva. Jedoch ist in Zukunft die Zunahme der Resistenzen von Influenza, die schon jetzt beobachtet werden können, anzunehmen. Dadurch könnte in der Zukunft durchaus Bedarf an neuen antiinfektiven Substanzen bestehen (Thorlund et al., 2011).

Die Frage ist natürlich, was rhuBPI und seine Peptide bei anderen Viren, die behüllt sind und über Endozytose aufgenommen werden, ausrichten können.

SARS-CoV2, das seit 2020 die letzten Jahre dominiert hat, ist ein Virus, das Lungenepithelzellen über Endozytose infiziert und für welches hochwirksame Impfstoffe zur Verfügung stehen (Alkafaas et al., 2023). Allerdings hat man auch für SARS-CoV2 Resistenzentwicklungen durch Mutationen beobachtet und zusätzlich gibt es immer wieder Menschen, wie Patienten mit Autoimmunerkrankheiten, die nach erfolgter Impfung, keinen ausreichenden Immunschutz aufgebaut haben, der das Virus nach Infektion kontrollieren kann (Ferri et al., 2022). Hier könnte man darüber nachdenken, huBPI-Peptid auf seine Wirksamkeit gegen SARS-CoV2 zu testen, um es potentiell zukünftig zur inhalativen Therapie bei viralen pulmonalen Infektionen zu nutzen. Die ökonomischen und praktischen Fragestellungen, die sich daraus ergeben, müssen dabei genau kalkuliert und erfasst werden.

6 Zusammenfassung

Die bakterielle Resistenz gegenüber antibiotischer Therapiekonzepte spielt eine wichtige Rolle in der Medizin. Dabei können die Resistenzfaktoren der Bakterien gegenüber Antibiotika auf unterschiedlichste Art und Weise wirken. Die klinisch relevantesten Erreger in diesem Zusammenhang wurden von der WHO in der, von gramnegativen Bakterien dominierten, ESKAPE-Liste zusammengefasst. Deshalb ist die Beschreibung von alternativen Therapieansätzen zur Bekämpfung bakterieller Infektionen eine wichtige Aufgabe. Als Alternative könnten zum Beispiel antimikrobielle Proteine, die unser Immunsystem bereitstellt und vor allem auf Haut und Schleimhäuten zu finden sind, dienen. Besonders für diese antimikrobiellen Proteine ist, dass trotz der Evolution Bakterien weiterhin keine Panresistenz gegenüber der gesamten Bandbreite der antimikrobiellen Proteine ausbilden konnten.

Das humane *bactericidal permeability increasing protein* (BPI) ist ein Vertreter einer lipidbindenden Glykoproteinfamilie, die mehrere antimikrobielle Proteine umfasst und vor allem in neutrophilen Granulozyten zu finden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein systematischer Vergleich der Wirkung von BPI und hieraus entwickelter Peptide gegenüber verschiedenen Bakterien durchgeführt. Dazu wurde zu Beginn der Arbeit BPI rekombinant in Dmel-2 Zellen hergestellt. Die antimikrobielle Testung zeigte, dass auch panresistente gramnegative Bakterien empfindlich gegenüber BPI waren, was zu einer deutlichen Wachstumshemmung bei *Acinetobacter spp.*, *E. coli spp.*, *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa* führte. Auffällig waren die Resistenzen von *Klebsiella spp.* und *Proteus mirabilis* gegenüber BPI, die bei den Klebsiellen am wahrscheinlichsten auf die sehr dicke Polysaccharidkapsel der Zellwand zurückzuführen ist und bei *Proteus* sehr wahrscheinlich auf den sehr langen Lipopolysaccharidketten, die als eine Art Schutzschirm dienen könnten, basieren.

Bei den grampositiven Bakterien kam es lediglich bei *Listeria monocytogenes* zu einer antimikrobiellen Wirkung, während Staphylokokken und Streptokokken eine bereits beschriebene natürliche Resistenz gegenüber BPI zeigten. Die Empfindlichkeit der Listerien gegenüber BPI wurde bereits beschrieben, doch sind die molekularen Mechanismen hierfür noch unbekannt.

Darüber hinaus zeigte lediglich das huBPI-Peptid, wie in Vorarbeiten bereits beschrieben, eine inhibitorische Wirksamkeit gegen die Infektiösität von Influenzaviren, während das rekombinante huBPI keinen antiinfektiven Einfluss auf Influenza-Viren hat. Worauf diese Unterschiede in der Wirkung von BPI-Peptid und rekombinantem Protein begründet sind, bleibt in dieser Arbeit ungeklärt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BPI und hieraus abgeleitete Peptide das Potenzial für die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe allerdings primär im Bereich der gramnegativen Bakterien haben. Dazu müssen jedoch weitere Analysen durchgeführt werden, wie zum Beispiel pharmakologische Untersuchungen zur Verträglichkeit der Proteine oder Peptide *in vivo*. Bei der Kontrolle der Influenza-Infektion spielt die Prävention über vorhandene Impfstoffe die wesentliche Rolle. Allerdings werden trotzdem immer wieder schwerwiegende Influenza-Infektionen registriert. Hierbei könnte das von BPI abgeleitete Peptid möglicherweise auch bei viralen Infektionen zukünftig eingesetzt werden. Jedoch müssen auch dazu, wie bereits bei den Bakterien angeführt, weiterführende Experimente angeschlossen werden.

7 Summary

Bacterial resistance to antibiotic therapy is a frequent and growing problem in medicine. Bacterial resistance factors can exert a diverse range of effects on antibiotics. These effects encompass various mechanisms, such as the enzymatic modification and the reduction of the intracellular concentration of antibiotic molecules as a result of modifications of the cell wall or active transport. Furthermore, the reconfiguration of points of attack, such as cell wall synthesis and enzyme methylation, and alterations at the cellular level, such as changes in membrane fluidity lead to antibiotic resistance as well. The most clinically relevant pathogens in this context are summarized by the WHO in the ESKAPE list, which is dominated by gram-negative bacteria. Hence, the exploration of alternative therapeutic approaches to combat bacterial infections is vital. A potential alternative is the use of antimicrobial proteins, which are produced by our immune system and represent major antimicrobial strategies of the skin and mucous membranes. What makes these antimicrobial proteins remarkable is that, despite evolutionary processes, bacteria have not yet been able to develop pan-resistance to the entire spectrum of the antimicrobial proteins.

The human *bactericidal permeability-increasing protein* (BPI) belongs to a family of lipid-binding glycoproteins, which includes several antimicrobial proteins and is primarily to be found in neutrophil granulocytes.

This study presents the first comprehensive and systematic comparison of the effects of BPI and its derived peptides on various bacterial strains. To this end, BPI was produced in Dmel-2 cells using recombinant techniques at the beginning of this research. Antimicrobial testing revealed that even pan-resistant gram-negative bacteria were susceptible to BPI, leading to significant growth inhibition of *Acinetobacter spp.*, *E. coli spp.*, *Enterobacter cloacae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. A particularly remarkable finding was the resistance of *Klebsiella spp.* and *Proteus mirabilis* to BPI, which in the case of *Klebsiella* is most likely attributable to the very thick polysaccharide capsule of the cell wall, while in the case of *Proteus* is very likely based on the very long lipopolysaccharide chains, which could serve as a kind of protective shield.

Among the gram-positive bacteria, an antimicrobial effect was only evident against *Listeria monocytogenes*, whereas staphylococci and streptococci displayed a previously described natural resistance to BPI. Although the sensitivity of *Listeria* to BPI has already been described, the underlying molecular mechanisms for this remain unknown.

As already described in previous research, it was also observed that only the huBPI peptide exhibited an inhibitory effect against the infectivity of influenza viruses. In contrast, the recombinant huBPI showed no anti-infective effect against this virus. The reason for these disparities in the effect of BPI peptide versus recombinant protein remains unclear in this study

In summary, BPI and its derived peptides exhibit potential for the development of antimicrobial agents, although primarily in the area of gram-negative bacteria. However, further analyses, such as pharmacological studies assessing the tolerability of the proteins or peptides *in vivo*, are still necessary. In the control of influenza infections prevention via existing vaccines plays the key role. Nevertheless, severe influenza infections are reported again and again. In this context, the BPI-derived peptide could potentially also be used against viral infections in the future. However, as with its use against bacterial infections, further trials are needed.

8 Literaturverzeichnis

- Ahmed A, Siman-Tov G, Hall G, Bhalla N, Narayanan A (2019):** Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections. *Viruses* 11(8), 704. DOI: 10.3390/v11080704.
- Ahn KB, Kim AR, Kum KY, Yun CH, Han SH (2017):** The synthetic human beta-defensin-3 C15 peptide exhibits antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, both alone and in combination with dental disinfectants. *Journal of Microbiology* 55(10), 830–836. DOI: 10.1007/s12275-017-7362-y.
- Aichele D, Schnare M, Saake M, Röllinghoff M, Gessner A (2006):** Expression and antimicrobial function of bactericidal permeability-increasing protein in cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity* 74(8), 4708–4714. DOI: 10.1128/IAI.02066-05.
- Alkafaas SS, Abdallah AM, Ghosh S, Loutfy SA, Elkafas SS, Abdel Fattah NF, Hessien M (2023):** Insight into the role of clathrin-mediated endocytosis inhibitors in SARS-CoV-2 infection. *Reviews in Medical Virology* 33(1), e2403. DOI: 10.1002/rmv.2403.
- Almasaudi SB (2018):** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25(3), 586–596. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.02.009.
- Amako K, Meno Y, Takade A (1988):** Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *Journal of Bacteriology* 170(10), 4960–4962. DOI: 10.1128/jb.170.10.4960-4962.1988.
- Balakrishnan A, Schnare M, Chakravorty D (2016):** Of men not mice: bactericidal/permeability-increasing protein expressed in human macrophages acts as a phagocytic receptor and modulates entry and replication of gram-negative bacteria. *Frontiers in Immunology* 7, 455. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00455.
- Ball PR, Shales SW, Chopra I (1980):** Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93(1), 74–81. DOI: 10.1016/s0006-291x(80)80247-6.

- Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D (1997):** Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* 276(5320), 1861–1864. DOI: 10.1126/science.276.5320.1861
- Beeken WL, Northwood I, Beliveau C, Baigent G, Gump D (1987):** Eosinophils of human colonic mucosa: C3b and Fc gamma receptor expression and phagocytic capabilities. *Clinical Immunology and Immunopathology* 43(3), 289–300. DOI: 10.1016/0090-1229(87)90138-3.
- Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, Hammerum AM, Schaffer K, Burns K, Murchan S, Novais C, Freitas AR, Peixe L, Del Grosso M, Pantosti A, Werner G (2018):** Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates* 40, 25–39. DOI: 10.1016/j.drug.2018.10.002.
- Bengoechea JA, Sa Pessoa J (2019):** Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews* 43(2), 123–144. DOI: 10.1093/femsre/fuy043.
- Beveridge TJ (1990):** Mechanism of gram variability in select bacteria. *Journal of Bacteriology* 172(3), 1609–1620. DOI: 10.1128/jb.172.3.1609-1620.1990
- Bingle CD, Craven CJ (2004):** Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends in Immunology* 25(2), 53–55. DOI: 10.1016/j.it.2003.11.007.
- Buda De Cesare G, Cristy SA, Garsin DA, Lorenz MC (2020):** Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy. *mBio* 11(6), e02123-20. DOI: 10.1128/mBio.02123-20.
- Bülow S, Zeller L, Werner M, Toelge M, Holzinger J, Entzian C, Schubert T, Waldow F, Gisch N, Hammerschmidt S, Gessner A (2018):** Bactericidal/permeability-increasing protein is an enhancer of bacterial lipoprotein recognition. *Frontiers in Immunology* 9, 2768. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02768.

- Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN, Colgan SP (2002):** Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6), 3902–3907. DOI: 10.1073/pnas.052533799.
- Canny GO, Trifonova RT, Kindelberger DW, Colgan SP, Fichorova RN (2006):** Expression and function of bactericidal/permeability-increasing protein in human genital tract epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 194(4), 498–502. DOI: 10.1086/505712.
- Capodici C, Chen S, Sidorczyk Z, Elsbach P, Weiss J (1994):** Effect of lipopolysaccharide (LPS) chain length on interactions of bactericidal/permeability-increasing protein and its bioactive 23-kilodalton NH₂-terminal fragment with isolated LPS and intact *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 62(1), 259–265. DOI: 10.1128/iai.62.1.259-265.1994.
- Cardoso MH, Meneguetti BT, Costa BO, Buccini DF, Oshiro KGN, Preza SLE, Carvalho CME, Migliolo L, Franco OL (2019):** Non-lytic antibacterial peptides that translocate through bacterial membranes to act on intracellular targets. *International Journal of Molecular Sciences* 20(19), 4877. DOI: 10.3390/ijms20194877.
- Chambers HF, Deleo FR (2009):** Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* 7(9), 629–641. DOI: 10.1038/nrmicro2200.
- Chowaniec, Z, Skoczyńska, A (2018).** Plasma lipid transfer proteins: The role of PLTP and CETP in atherogenesis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 27(3), 429–436. DOI: 10.17219/acem/67968
- Chen J, Li Y, Zhang K, Wang H (2018):** Whole-Genome Sequence of Phage-Resistant Strain *Escherichia coli* DH5 α . *Genome Announcements* 6(10), e00097-18. DOI: 10.1128/genomeA.00097-18.
- Chockalingam A, McKinney CE, Rinaldi M, Zarlenga DS, Bannerman DD (2007):** A peptide derived from human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) exerts bactericidal activity against Gram-negative bacterial isolates obtained from clinical cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 125(1-2), 80–90. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.004.

- Choi, WS, Baek JH, Seo YB, Kee SY, Jeong HW, Lee HY, Eun BW, Choo EJ, Lee J, Kim YK, Song JY, Wie SH, Lee JS, Cheong HJ, Kim WJ (2014):** Severe influenza treatment guideline. *The Korean Journal of Internal Medicine* 29(1), 132–147. DOI: 10.3904/kjim.2014.29.1.132.
- Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE (2003):** Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(12), 3675–3681. DOI: 10.1128/AAC.47.12.3675-3681.2003.
- Dathe M, Nikolenko H, Klose J, Bienert M (2004):** Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides. *Biochemistry* 43(28), 9140–9150. DOI: 10.1021/bi035948v.
- Davis CP, Baron S (1996):** Normal flora. In: Medical Microbiology. 4th. edition Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Davlieva M, Wu C, Zhou Y, Arias CA, Shamoo Y (2018):** Two mutations commonly associated with daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* LiaS^{T120A} and LiaR^{W73C} appear to function epistatically in LiaFSR signaling. *Biochemistry* 57(49), 6797–6805. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b01072.
- Dijksteel GS, Ulrich MMW, Middelkoop E, Boekema BKHL (2021):** Review: lessons learned from clinical trials using antimicrobial peptides (AMPs). *Frontiers in Microbiology* 12, 616979. DOI: 10.3389/fmicb.2021.616979.
- Diks SH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2001):** Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. *Journal of Endotoxin Research* 7(5), 335–348.
- Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RH (2001):** Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *Journal of Investigative Dermatology* 117(1), 91–97. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01340.x.
- Dorschner RA, Lopez-Garcia B, Peschel A, Kraus D, Morikawa K, Nizet V, Gallo RL (2006):** The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB Journal* 20(1), 35–42. DOI: 10.1096/fj.05-4406com.

- Eckert M, Wittmann I, Röllinghoff M, Gessner A, Schnare M (2006):** Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta-dependent pathways. *Journal of Immunology* 176(1), 522–528. DOI: 10.4049/jimmunol.176.1.522.
- Ferri C, Ursini F, Gragnani L, Raimondo V, Giuggioli D, Foti R, Caminiti M, Olivo D, Cuomo G, Visentini M, Cacciapaglia F, Pellegrini R, Pigatto E, Urraro T, Naclerio C, Tavoni A, Puccetti L, Varcasia G, Cavazzana I, L'Andolina M, Ruscitti P, Vadacca M, Gigliotti P, La Gualana F, Cozzi F, Spinella A, Visalli E, Dal Bosco Y, Amato G, Masini F, Mariano GP, Brittelli R, Aiello V, Caminiti R, Scorpiniti D, Rechichi G, Ferrari T, Monti M, Elia G, Franceschini F, Meliconi R, Casato M, Iannone F, Giacomelli R, Fallahi P, Santinit SA, Zignego AL, Antonelli A (2021):** Impaired immunogenicity to COVID-19 vaccines in autoimmune systemic diseases. High prevalence of non-response in different patients' subgroups. *Journal of Autoimmunity* 125, 102744. DOI: 10.1016/j.jaut.2021.102744.
- Fuller E, Elmer C, Nattress F, Ellis R, Horne G, Cook P, Fawcett T (2005):** Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* cells that do not require a cell wall for integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(12), 5075–5080. DOI: 10.1128/AAC.49.12.5075-5080.2005.
- Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK (2019):** Influenza: diagnosis and treatment. *American Family Physician* 100(12), 751–758.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P (1998):** Plant defense peptides. *Biopolymers* 47(6), 479–491. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K.
- Gudmundsson GH, Agerberth B (1999):** Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *Journal of Immunological Methods* 232(1-2), 45–54. DOI: 10.1016/S0022-1759(99)00152-0.
- Hancock RE, Scott MG (2000):** The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16), 8856–8861. DOI: 10.1073/pnas.97.16.8856.

- Heumann D, Gallay P, Betz-Corradin S, Barras C, Baumgartner JD, Glauser MP (1993):** Competition between bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding to monocytes. *Journal of Infectious Diseases* 167(6), 1351–1357. DOI: 10.1093/infdis/167.6.1351.
- Hof H, Dörries R (2009):** Medizinische Mikrobiologie. 4, vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Horwitz AH, Williams RE, Liu PS, Nadell R (1999):** Bactericidal/permeability-increasing protein inhibits growth of a strain of *Acholeplasma laidlawii* and L forms of the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(9), 2314–2316. DOI: 10.1128/AAC.43.9.2314.
- Ibrahim D, Jabbour JF, Kanj SS (2020):** Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 33(6), 464–473. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000677.
- Ibrahim S, Nallapaneni NN, Muthulingam D (2022):** Liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* in the absence of hepatobiliary disease. *Cureus* 14(9), e29789. DOI: 10.7759/cureus.29789.
- Jamil RT, Foris LA, Snowden J (2023):** *Proteus mirabilis* Infections. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Kopec KO, Alva V, Lupas AN (2011):** Bioinformatics of the TULIP domain superfamily. *Biochemical Society Transactions* 39(4), 1033–1038. DOI: 10.1042/BST0391033.
- Kraus D, Peschel A (2006):** Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 306, 231–250. DOI: 10.1007/3-540-29916-5_9.
- Laemmli, U (1970):** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- LaRock CN, Nizet V (2015):** Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848(11 Pt B), 3047–3054. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.02.010.

- Leclercq R (2002):** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* 34(4), 482–492. DOI: 10.1086/324626.
- Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, Mackey V, Coy DH, He Q (2019):** The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research* 11(7), 3919–3931.
- Levy O, Sisson RB, Kenyon J, Eichenwald E, Macone AB, Goldman D (2000):** Enhancement of neonatal innate defense: effects of adding an N-terminal recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein on growth and tumor necrosis factor-inducing activity of gram-negative bacteria tested in neonatal cord blood ex vivo. *Infection and Immunity* 68(9), 5120–5125. DOI: 10.1128/IAI.68.9.5120-5125.2000.
- Li J, Kong Q, Lv Z, Guan Y, Qiu Y, Li C, Sun M, Liu Z, An Y (2008):** Protection of immuno-compromised mice from lethal infection of *Klebsiella pneumoniae* by rAAV2-BPI23-Fcγ1 gene transfer. *Cellular & Molecular Immunology* 5(6), 439–445. DOI: 10.1038/cmi.2008.55.
- Li XL, Luan CY, Fan YJ, Lin XY, Jiang D, Su MX, Wang G, Yang X (2022):** A rare case of acute infectious purpura fulminans caused by *Klebsiella pneumoniae* and human herpesvirus Type 5. *Journal of Inflammation Research* 15, 4251–4260. DOI: 10.2147/JIR.S369986.
- Luque-Sastre, L, Arroyo, C, Fox, EM, McMahon, BJ, Bai, L, Li, F, Fanning, S (2018):** Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology Spectrum* 6(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017.
- Mackin, WM (1998):** Neuprex XOMA Corp. *IDrugs: the Investigational Drugs Journal* 1(6), 715–723.
- Madin, SH, Darby, NB (1958):** Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 98(3), 574–576. DOI: 10.3181/00379727-98-24111.
- Madoff, S, Lawson, JW (1992):** The L-Forms of Bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (Hg.): *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 4068–4081.

- Mannion, BA, Weiss, J, Elsbach, P (1990):** Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation* 85(3), 853–860. DOI: 10.1172/JCI114512.
- Matrosovich, M, Matrosovich, T, Carr, J, Roberts, NA, Klenk, HD (2003):** Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *Journal of Virology* 77(15), 8418–8425. DOI: 10.1128/jvi.77.15.8418-8425.2003.
- Meyer T (2011):** Studien zur Funktion von rekombinantem murinem SPLUNC1 und zur Expression von SPLUNC1 im murinen Asthmodell. Masterarbeit. Philipps-Universität, Marburg. Institut für Immunologie.
- Milde-Busch, A, Werber, D, Stark, K, Koch, J (2010):** Epidemiologie der übermittelten *Listeria monocytogenes* Infektionen in Deutschland, 2001–2009. Daten der intensivierten Surveillance. *Das Gesundheitswesen* 72(08/09). DOI: 10.1055/s-0030-1266306.
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR (2019):** Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* 10, 539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539.
- Müller A, Wenzel M, Strahl H, Grein F, Saaki TNV, Kohl B, Siersma T, Bandow JE, Sahl HG, Schneider T, Hamoen LW (2016):** Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(45), E7077–E7086. DOI: 10.1073/pnas.1611173113.
- Munita JM, Arias CA (2016):** Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Munoz-Price LS, Weinstein RA (2008):** Acinetobacter infection. *The New England Journal of Medicine* 358(12), 1271–1281. DOI: 10.1056/NEJMr-a070741.

- Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EL, Calderwood SB, Wing EJ (2002):** Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)* 81(4), 260–269. DOI: 10.1097/00005792-200207000-00002.
- Nishimura H, Gogami A, Miyagawa Y, Nanbo A, Murakami Y, Baba T, Nagasawa S (2001):** Bactericidal/permeability-increasing protein promotes complement activation for neutrophil-mediated phagocytosis on bacterial surface. *Immunology* 103(4), 519–525. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2001.01263.x.
- De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ (2020):** Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 33(3), e00181–19. DOI: 10.1128/CMR.00181-19.
- Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P (1991):** Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 174(3), 649–655. DOI: 10.1084/jem.174.3.649.
- Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B (1987):** A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein. *Journal of Biological Chemistry* 262(31), 14891–14894.
- Opal SM (2007):** The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *International Journal of Medical Microbiology* 297(5), 365–377. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.03.006.
- Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S (2010):** *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(1), 177–183. DOI: 10.1128/AAC.00715-09.

- Parra-Flores J, Aguirre J, Juneja V, Jackson EE, Cruz-Córdova A, Silva-Sanchez J, Forsythe S (2018):** Virulence and antibiotic resistance profiles of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter* spp. involved in the diarrheic hemorrhagic outbreak in Mexico. *Frontiers in Microbiology* 9, 2206. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02206.
- Patel S, Preuss CV, Bernice F (2023):** Vancomycin. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Patro LPP, Rathinavelan T (2019):** Targeting the sugary armor of *Klebsiella* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, 367. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00367.
- Pinkenburg O, Meyer T, Bannert N, Norley S, Bolte K, Czudai-Matwich V, Herold S, Gessner A, Schnare M (2016):** The human antimicrobial protein bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits the infectivity of influenza A virus. *PloS One* 11(6), e0156929. DOI: 10.1371/journal.pone.0156929.
- Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V (2018):** Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 9(1), 522–554. DOI: 10.1080/21505594.2017.1313372.
- Ryu S, Song PI, Seo CH, Cheong H, Park Y (2014):** Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences* 15(5), 8753–8772. DOI: 10.3390/ijms15058753.
- Schneider I (1972):** Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 27(2), 353–365.
- Schultz H, Weiss JP (2007):** The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 384(1-2), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.005>
- Sharma VK, Mamontov E, Tyagi M, Qian S, Rai DK, Urban VS (2016):** Dynamical and phase behavior of a phospholipid membrane altered by an antimicrobial peptide at low concentration. *Journal of Physical Chemistry Letters* 7(13), 2394–2401. DOI: 10.1021/acs.jpcllett.6b01006.

- Simanski M, Gläser R, Köten B, Meyer-Hoffert U, Wanner S, Weidenmaier C, Peschel A, Harder J (2013):** Staphylococcus aureus subverts cutaneous defense by D-alanylation of teichoic acids. *Experimental Dermatology* 22(4), 294–296. DOI: 10.1111/exd.12114.
- Sun Y, Shang D (2015):** Inhibitory effects of antimicrobial peptides on lipopolysaccharide-induced inflammation. *Mediators of Inflammation* 2015, 167572. DOI: 10.1155/2015/167572.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N (2018):** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet. Infectious Diseases* 18(3), 318–327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Theprungsirikul J, Thaden JT, Wierzbicki RM, Burns AS, Skopelja-Gardner S, Fowler VG Jr, Winthrop KL, Martin IW, Rigby WFC (2020).** Low-avidity autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein occur in gram-negative and gram-positive bacteremia. *Infection and Immunity*, 88(10), e00444-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00444-20>
- Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME (2017):** Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology* 8, 1566. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01566.
- Thorlund K, Awad T, Boivin G, Thabane L (2011):** Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infectious Diseases* 11, 134. DOI: 10.1186/1471-2334-11-134.
- Towner KJ (2009):** Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection* 73(4), 355–363. DOI: 10.1016/j.jhin.2009.03.032.
- Trilla A, Trilla G, Daer C (2008):** The 1918 "Spanish flu" in Spain. *Clinical Infectious Diseases* 47(5), 668–673. DOI: 10.1086/590567.

- Tulkens J, Vergauwen G, van Deun J, Geurickx, E, Dhondt B, Lippens L, De Scheerder MA, Miinalainen I, Rappu P, De Geest BG, Vandecasteele K, Laukens D, Vandekerckhove L, Denys H, Vandesompele J, De Wever O, Hendrix A (2020):** Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. *Gut* 69(1), 191–193. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317726.
- Urban C, Mariano N, Rahal JJ, Tay E, Ponio C, Koprivnjak T, Weiss J (2001):** Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI21 and cecropin P1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(3), 994–995. DOI: 10.1128/AAC.45.3.994-995.2001.
- van der Schaft DWJ, Wagstaff J, Mayo KH, Griffioen AW (2002):** The antiangiogenic properties of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Annals of Medicine* 34(1), 19–27. DOI: 10.1080/078538902317338607.
- Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR (2013):** Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* 37(6), 955–989. DOI: 10.1111/1574-6976.12026.
- Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M (2010):** Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* 15(1-2), 40–56. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.10.009.
- Wareth G, Brandt C, Sprague LD, Neubauer H, Pletz MW (2020):** Spatio-temporal distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany - a comprehensive systematic review of studies on resistance development in humans (2000-2018). *Microorganisms* 8(3), 375. DOI: 10.3390/microorganisms8030375.
- Weiss J (2003):** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochemical Society Transactions* 31(Pt 4), 785–790. DOI: 10.1042/bst0310785.

- Weiss J, Elsbach P, Shu C, Castillo J, Grinna L, Horwitz A, Theofan G (1992):** Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *Journal of Clinical Investigation* 90(3), 1122–1130. DOI: 10.1172/JCI115930.
- Weiss J, Olsson I (1987):** Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* 69(2), 652–659. DOI: 10.1182/blood.V69.2.652.652.
- Weitz A, Spotnitz R, Collins J, Ovadia S, Iovine NM (2013):** Log reduction of multidrug-resistant Gram-negative bacteria by the neutrophil-derived recombinant bactericidal/permeability-increasing protein. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42(6), 571–574. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.019.
- Wiese A, Brandenburg K, Lindner B, Schromm AB, Carroll SF, Rietschel ET, Seydel U (1997):** Mechanisms of action of the bactericidal/permeability-increasing protein BPI on endotoxin and phospholipid monolayers and aggregates. *Biochemistry* 36(33), 10301–10310. DOI: 10.1021/bi970176m.
- Wittmann EM (2013):** Effects of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) against *Listeria monocytogenes* and its function in an infection model of murine listeriosis. Philipps-Universität Marburg: Medizinische Dissertation.
- Wittmann I, Schönefeld M, Aichele D, Groer G, Gessner A, Schnare M (2008):** Murine bactericidal/permeability-increasing protein inhibits the endotoxic activity of lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. *Journal of Immunology* 180(11), 7546–7552. DOI: 10.4049/jimmunol.180.11.7546.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990):** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12), 4576–4579. DOI: 10.1073/pnas.8712.4576.

- Yamagata M, Rook SL, Sassa Y, Ma RC, Gerald P, Goddard L, Cleremont A, Gao B, Salti H, Gundel R, White M, Feener EP, Aiello LP, King GL (2006):** Bactericidal/permeability-increasing protein's signaling pathways and its retinal trophic and anti-angiogenic effects. *FASEB Journal* 20(12), 2058–2067. DOI: 10.1096/05-5662com.
- Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Bot AA, Roos D (1986):** Bactericidal action of eosinophils from normal human blood. *Infection and Immunity* 53(1), 192–198. DOI: 10.1128/iai.53.1.192-198.1986.
- Zhang QY, Yan ZB, Meng YM, Hong XY, Shao G, Ma JJ, Cheng XR, Lius J, Kang J, Fu CY (2021):** Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research* 8(1), 48. DOI: 10.1186/s40779-021-00343-2.
- Zheng Z, Tharmalingam N, Liu Q, Jayamani E, Kim W, Fuchs BB, Zhang R, Vilciskas A, Mylonakis E (2017):** Synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(7) e00686–17. DOI: 10.1128/AAC.00686-17.

Anhang

Name of the peptide	amino acid sequence	charge
huBPI-Peptid:	NANIKISGGKWAQKRFLKMSGNFDLSI	+5
mBPI-Peptid:	DASIKINGKWMRSRKNFLKAGGNFELSI	+3
Mut.1 (1:N/D):	DANIKISGGKWAQKRFLKMSGNFDLSI	+4
Mut.2 (11:K/M):	NANIKISGGKWAQKRFLKMSGNFDLSI	+4
Mut.3 (1:N/D;11:K/M):	DANIKISGGKWAQKRFLKMSGNFDLSI	+3
Mut.4 (1:D/N;11:M/K):	NASIKINGKWSRKNFLKAGGNFELSI	+5

Negative charged amino acids are marked in bold and positive charged amino acid are under-lined.

doi:10.1371/journal.pone.0156929.t001

Abbildung 13: Aminosäuresequenzen der huBPI-Peptide (Pinkenburg O et al, 2016)

Untersuchungsmaterial:	Sonstige Materialien MRE-Screening	Antibiogramm	K2	K3
Material-Ergänzung	Leiste			
Untersuchung auf:	Sonderscreening MRE	Ampicillin i.v. (4€)	R	R
Kulturergebnis:		Piperacillin (8€)	R	R
K1 mäßig	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicillin/Sulbact. (6€)	R	R
	* Antibiogramm siehe Labor-Nr.:88328473	Piperac.-Tazobact. (40€)	R	S
	(besondere Resistenzsituation! s.u.)	Cefuroxim i.v. (4€)	R	
K2 spärlich	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ceftriaxon (3€)	R	R
	(besondere Resistenzsituation! s.u.)	Cefotaxim (7€)	R	R
K3 mäßig	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidim (10€)	R	R
	(besondere Resistenzsituation! s.u.)	Cefepim	R	R
Befundbemerkung:		Imipenem (44€)		I
* Keim 1,2 und 3: Multiresistenter Keim. 4MRGN (Multiresistenz gegen 4 der 4 Antibiotikagruppen).		Meropenem (40€)	R	I
* Hygienemaßnahmen beachten!		Ertapenem	R	
* Keim 1: Nachweis einer Carbapenemase vom Typ Oxa- 48. Zusätzlich zeigt sich phänotypisch eine ESBL (Fremduntersuchung NRZ Bochum).		Doripenem		I
* Keim 2: Nachweis einer Carbapenemase der Typ Oxa- 23 Gruppe. (Fremduntersuchung NRZ Bochum).		Gentamicin (1€)	R	R
		Amikacin (35 €)	R	R
		Tobramycin		R
		Ciprofloxacin (7€)	R	R
		Levofloxacin (35€)	R	R
		Moxifloxacin (40€)	R	R
		Tetracycline (3€)	R	R
		Aztreonam		I
		Trimethop./Sulfame. (3€)	S	R
		Fosfomycin (77€)		R
		Tigecyclin		R
		Colistin	S	S
ICD Kodiervorschläge				
DRG-Kommentar:				
1. B95.2 - Streptokokken, Gruppe D, als Ursache von Krankheiten, die in anderen Kapiteln klassifiziert sind.				
2. U80.6 - Pseudomonas aeruginosa und andere Nonfermenter mit Resistenz gegen Carbapeneme, Chinolone, Amikacin, Ceftazidim oder Piperacillin/Tazobactam				
3. U80.4 - Escherichia, Klebsiella und Proteus mit Resistenz gegen Chinolone.				

Abbildung 14: Resistenztestung Acinetobacter baumannii und Pseudomonas aeruginosa

Mit freundlicher Genehmigung von Professor Mutters

8.1 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Adamkiewicz, Barth, Bartsch, Bauer U., Bauer S. Baum, Becker A., Becker K., Becker S., Best, Bette, Bien, Birk, Bliemel, Bodnar, Bonaterra Bösner, Brehm, Bücking, Carl, Cetin, Czyubako, Daut, Decher, Del Rey, Dettmeyer, Dietz, Dinges, Donner-Banzhoff, Duda, Eggers, Eigmann, El-Zayat, Engenhardt-Cabillie, Eschbach, Eubel, Fendrich, Feuser, Figiel, Frankenberger, Frink, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Grgic, Grikscheit, Grundmann, Haas, Halaszovich, Hegele, Hertl, Heverhagen, Hildebrand, Hoch, Hofmann, Holzer, Holzinger, Homm, Hoyer, Huber, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießler, Karatolios, Keller, Kemmling, Kern, Kerwat, Kill, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Kleinschnitz, Kluge, Kolb-Niemann, Kortuz-Götze, Kostev, Köhler, König, Kösters, Kruse, Kühnert, Lauth, Lechler, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisner, Meissner, Menzler, Meyer, Meyer-Wittkopf, Milani, Mittag, Moll, Moosdorf, Morin, Mueller, Mutters, Müller, Neff, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Parahuleva, Patrascan, Peterlein, Pfestroff, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Rastan, Reese, Renz, Richter, Rinne, Riße, Roelcke, Roeßler, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schierl, Schmeck, Schneider, Schoner, Schnare, Schratt, Schu, Schumacher, Schütz, Schulze, Schütt, Schüttler, Schwalbe, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stahl,, Steinfeld, Steinhoff, Steininger, Stiewe, Suske, Strik, Stuck, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vannucchi, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Walter, Weber, Weihe, Westermann, Wiesmann, Wilhelm, Wißniowski, Wittig, Wolff, Worzfeld Wrocklage, Wulf, Yu, Zavorotny, Ziring, Zwioreck

8.2 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Schnare herzlich für die Bereitstellung des Themas und die sehr gute Betreuung bedanken. Vielen Dank für die vielen Ratschläge und die Einbringung deines sehr großen Fachwissens

Desweiteren bedanke ich mich bei allen damaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Schnare, vor allem bei Sandra Stein, für die Unterstützung im Labor und bei der Klärung organisatorischer Fragen. Desweiteren gilt mein Dank Dr. Olaf Pinkenburg für die Unterstützung bei den Versuchen, vor allem den Virusversuchen, und Prof Reinier Mutters und seiner damaligen Arbeitsgruppe für die Bereitstellung diverser Bakterienkulturen und Beratung im Umgang mit diesen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Stefan Bauer und allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die freundliche Atmosphäre, die Unterstützung bei der Umsetzung der Versuche und für die kulinarischen Freuden die auch eine Motivationshilfe waren.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinen Eltern Irene und Helmut Rosenthal für die Unterstützung und Begleitung auf meinem Lebensweg und die Hilfe bei allen Schwierigkeiten die sie geholfen haben zu bereinigen. Ebenso mein Dank an meine Liebe Jessica Kathmann und an alle meine Freunde vor allem Ivo Hüttemann, Lisa Kallweit, Jessica Kümpel, Maximilian Oberle und Diego Semmler für ihre Unterstützung in all den Jahren

