Universität Ulm

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Amtierender Leiter: Prof. Dr. Steffen Stenger

Micos8 ein antimikrobielles Peptid mitochondrialen Ursprungs

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Sophia Weizenegger

Heidelberg

2025

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Spellerberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Weidinger

Tag der Promotion: 17.04.2026

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Antimikrobielle Peptide 1
1.2 Geschichte der AMPs 1
1.3 Eigenschaften und Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide 2
1.4 AMPs und bakterielle Resistenz 6
1.5 Ziele dieser Arbeit 7
2 Material und Methoden 9
2.1 Material 9
2.2 Methoden 24
2.2.1 Bakterienkulturen 24
2.2.2 Radial Diffusion Assay 24
2.2.3 Survival Assay 26
2.2.4 SYTOX Green Assay 27
2.2.5 pHluorin Assay 27
2.2.6 Generelle DNA Techniken 28
2.2.7 Elektonenmikroskopie 31
2.2.8 Statistische Methode 32
3 Ergebnisse 33
3.1 Antimikrobielle Aktivität von Micos8 unter verschiedenen Umweltbedingungen 33
3.2 Wirkmechanismus von Micos8 39
3.3 EM 48
4 Diskussion 50
4.1 Antimikrobielle Aktivität von Micos8 50
4.2 Wirkmechanismus von Micos8 55

5 Zusammenfassung 59
6 Literaturverzeichnis 60
Danksagung 65
Lebenslauf 66

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. baumannii	*Acinetobacter baumannii*
AMP(s)	Antimikrobielle(s) Peptid(e)
BHI	Brain heart infusion-Medium
BSU	Barbara Spellerberg Ulm
CFU	colony forming-units
Cm	Chloramphenicol
CO_2	Kohlenstoffdioxid
E. coli	*Escherichia coli*
E. faecalis	*Enterococcus faecalis*
ESBL	Extended Spectrum Betalaktamase
FBS	Fetales Bovines Serum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAS	Gruppe A Streptokokken
GBS	Gruppe B Streptokokken
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K. quasipneumonia	*Klebsiella quasipneumoniae*
l	Liter
LB	Lysogeny broth
LMBO	Listeria minimal buffer optimized
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*

LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
µg	Mikrogramm
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M	Molar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MRSA	Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*
Mut	Mutante
n	Anzahl der Wiederholungen eines Experiments
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
$(NH_4)_2SO_2$	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
O.D.	Optische Dichte
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PAMP(s)	pathogen- associated molecular pattern(s)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
rpm	revolutions per minute
S. agalactiae	*Streptococcus agalactiae*

S. anginosus	*Streptococcus anginosus*
S. mutans	*Streptococcus mutans*
SB	Schafblut
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THY	Todd-Hewitt broth mit Hefeextrakt
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase soy broth
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

Die zunehmende Entwicklung von Resistenzen gegen Antibiotika haben das Interesse an alternativen antimikrobiellen Medikamente hervorgerufen. Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind kurze Polypeptide mit der Eigenschaft Bakterien zu eliminieren. Sie zeigen ein weites Wirkspektrum gegen Bakterien, Protozoen und Pilze und kommen natürlicherweise als Teil des angeborenen Immunsystems in vielen Spezies wie Bakterien, Insekten und Menschen vor [52]. Beim Menschen sind sie in allen Körperflüssigkeiten nachzuweisen und bilden eine Schutzbarriere gegen pathogene Mikroorganismen. AMPs können neben ihrer antibakteriellen Wirkung immunregulatorische, antientzündliche Fähigkeiten und andere Eigenschaften haben. Zum Beispiel kann durch Neutralisation proinflammatorischer Zytokine eine überschießende Immunreaktion verhindert werden Eine große Gefahr bei Infektionen mit Gram-negativen Bakterien ist ein durch die Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS) aus der äußeren Membran ausgelöster Zytokin Sturm. Dieser kann zu schweren Entzündungen bis hin zur Sepsis reichen [49]. Darüber hinaus zeigen einige AMPs wachstumshemmende Aktivitäten gegenüber Biofilmen [34].

Über 60 peptidbasierte Medikamente sind bereits in Anwendung zur Bekämpfung von Infektionen. Hunderte therapeutisch wirksamer Peptide sind in prä- und klinischen Studien für pharmazeutische Zulassungen [6]. Neu sind Entwicklungsansätze der Industrie in Kooperation mit universitären Einrichtungen AMPs zu Konservierung von Lebensmitteln einzusetzen [3].

1.2 Geschichte der AMPs

Antimikrobielle Peptide wurden erstmals vor über 100 Jahren beschrieben. Bereits 1909 beschrieb Laschtschenko eine bakterienhemmende Wirkung von Hühnereiklar, welche unter anderem auf das Vorkommen von Enzymen proteolytischen Charakters zurückzuführen ist [26]. 1922 gab Fleming diesem

Enzym den Namen „Lysozym“ [13]. Fleming beschrieb die bakterizide Wirkung von Lysozym zunächst in Nasenschleim, später auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Sputum und Synovia. Ein weiterer Meilenstein in der Historie der AMPs als antibakteriell wirkende Agenzien geht zurück in das Jahr 1939, als Dubos „Gramicidin“ aus *Bacillus brevis,* ein in Böden lebendes Bakterium isolierte. Gramicidin zeigt *in vitro* und *in vivo* antibakterielle Wirkung gegen viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien [2]. In den 1990er Jahren wurden AMPs aus *Drosophila melanogaster* isoliert, die mit Bakterien und Pilzen infiziert waren [30]. Seitdem hat sich die Zahl bekannter AMPs enorm entwickelt.

Heute kennen wir AMPs aus Lebewesen aller Domänen wie der Eukaryonten, Bakterien und Archäen. Gerade Wirbellose sind auf ein breites, wirksames Spektrum an AMPs angewiesen, da aufgrund des Mangels einer adaptiven Immunantwort die Abwehr gegen pathogene Mikroorgansimen allein aus dem angeborenen Immunsystem besteht [56]. Auch einige Viren, unter anderem Bakteriophagen, kodieren für AMPs. Die Peptide unterstützen diese in ihrer Eigenschaft Bakterien zu infizieren [4].

1.3 Eigenschaften und Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide

Die Aktivität und Selektivität von antimikrobiellen Peptiden ist abhängig von den chemischen Eigenschaften der Aminosäuren [39]. AMPs sind in der Regel Oligopeptide mit einer Länge zwischen fünf und 100 Aminosäuren. AMPs sind äußerst divers in ihrer Aminosäurestruktur. Viele AMPs töten Pathogene direkt ab, andere besitzen immunmodulierende Eigenschaften. AMPs sind nach neueren Erkenntnissen auch in der Vermeidung von Krebs und bei der Wundheilung beteiligt [1]. Typischerweise tragen sie eine positive Ladung und sind sowohl in einer hydrophilen und hydrophoben Umgebung löslich (amphiphil). Dies ist in Teilen wichtig für deren antibakterielle Wirksamkeit. Die positive Ladung wird durch geladene Aminosäuren wie z.B. Lysin und Arginin erzielt. Hydrophobe Aminosäuren wie z.B. Alanin oder Glycin geben den AMPs ihre fettlöslichen Eigenschaften.
Gram-negative und Gram-positive Bakterien unterscheiden sich hinsichtlich des Aufbaus der Zellwand. Das Grundgerüst der Zellwand besteht aus Peptidoglykan.

Durch Quervernetzung der Aminosäuren wird dieses Grundgerüst verfestigt. Während Gram-positive Bakterien ein Peptidoglykannetz aus bis zu 40 Schichten besitzen, besteht die Zellwand Gram-negativer Bakterien nur aus wenigen Lagen. Die dünne Peptidoglykanschicht Gram-negativer Bakterien verbindet über Proteine die Zellmembran mit einer zusätzlichen äußeren Membran. Diese, nur bei Gram-negativen Bakterien vorkommende zweite Membran, stellt neben der Zellmembran eine weitere Umweltbarriere dar. Auf der Oberfläche dieser zweiten Membran Gram-negativer Bakterien befinden sich Lipopolysaccharide (LPS). Diese spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Bei Gram-positiven Bakterien enthält die dicke Peptidoglykanschicht Teichonsäuren und der Lipidanteil der Zellmembran ist mit Lipoteichonsäuren verknüpft. Teichonsäure, Lipoteichonsäure sowie LPS wirken als Pyrogene, welche bei einer Immunreaktion eine systemisch entzündliche Reaktion auslösen [19]. Glykopeptid- Antibiotika wie Vancomycin oder Teicoplanin nutzen zum Beispiel die dicke Mureinschicht Gram-positiver Bakterien als Angriffspunkt. Sie binden mit hoher Affinität an die Oligopeptide, die für die Quervernetzung des Peptidoglykangerüsts verantwortlich sind und erreichen so ihre bakterizide Wirkung. Durch diesen Wirkmechanismus sind sie allerdings nur gegen Gram-positive Bakterien wirksam [15]. Das Antibiotikum Colistin zerstört die äußere Membran Gram-negativer Bakterien, indem es mit LPS interagiert. Dieses Antibiotikum ist ein Vertreter der Polymyxine, welche eine hohe Affinität zu LPS zeigen. Diese Eigenschaft des antiendotoxischen Effekts der Polymyxine kommt in der Behandlung des septischen Schocks, ausgelöst durch die übermäßige Freisetzung von LPS [22] zur Anwendung.
Die in der Regel stark positive Ladung von AMPs ist wichtig in Bezug auf ihre Wirksamkeit gegenüber Gram-negativen und Gram- positiven Bakterien. Deren Membranen sind durch LPS respektive durch Teichonsäuren negativ aufgeladen [18]. Dadurch wird die elektrostatische Interaktion als ein erster Schritt die Zellmembran zu zerstören oder sich Zugang in das Zytoplasma zu verschaffen ermöglicht. Der zugrundeliegende Mechanismus wird in verschiedenen Modellen beschrieben.

Etablierte Modelle, um die membranaktiven Peptide zu beschreiben, sind das „barrel-stave“ und das „toroidal-pore“ Modell. Bei Ersterem formen die AMPs ab einer kritischen Konzentration Oligomere aus Membran und Peptid. Die hydrophoben Teile des Peptids binden dabei an den Lipidkopf der Membran. Im

„toroidal-pore“ Modell provozieren die Peptide bei einer bestimmten Konzentration eine Konformationsänderung der Membran. In beiden Fällen kommt es zu Porenbildungen (Abb. 1) [7, 21, 53]. Beispiele für eine Funktionsweise nach dem „barrel-stave“ sind die Peptide Alamethicin und Padaxin [16, 17, 58] und nach dem „toroidal-pore“ Modell LaciticinQ und Melittin [50, 60]. Weitere AMPs, bei denen eine Porenbildung mithilfe des Sytox Assay gezeigt werden konnte, sind Angicin und das Amyloid Beta2-Microglobulin [20, 54]. Im Unterschied dazu beschreibt das “carpet” Modell eine Interaktion der Peptide mit Membranen, die gleichsam von AMPs umhüllte Membranstrukturen (Mizellen) erzeugt. Dies hat hohe Ähnlichkeit mit der Wirkungsweise von Detergenzien. Hier entstehen keine Poren, sondern die Membran wird gleichsam „aufgesplittet“ (Abb. 1). Beispiele sind das Ceropin P1 und das Aurein [12, 14]. Neben den am meisten verwendeten Modellen gibt es z.B. noch das „Agglutinationsmodell“. Die Peptide penetrieren dabei nicht die Zellmembran der Bakterien. Sie induzieren Zellverklumpungen durch die Interaktion mit der Zellmembran Gram-negativer oder dem Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien und induzieren damit eine Phagozytose. Ein AMP-Beispiel für einen solchen Wirkmechanismus ist das Thanatin [51].

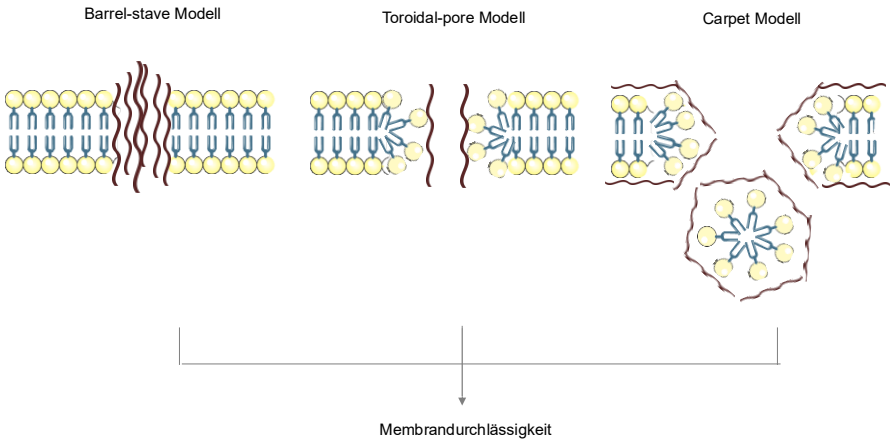


Abb. 1: Mechanismen der Peptid Zellmembran Interaktionen: Abgebildet sind drei verschiedene Mechanismen von AMPs mit der Membran zu interagieren, um eine Membrandurchlässigkeit zu erzeugen. Der hydrophile Kopf der Lipide der Phospholipiddoppelmembran ist gelb dargestellt und der hydrophobe Schwanz blau hervorgehoben. Die AMPs sind dunkelrot gekennzeichnet.

Abbildung entnommen und abgeändert aus [45] CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Antimikrobielle Peptide lassen sich nach ihrer Peptidstruktur klassifizieren. Am häufigsten ist die spiralförmige Sekundärstruktur der α-Helix. Diese Peptide sind oft reich an Leucin, Alanin, Glycin und Lysin. Beispiele hierfür sind die AMPs Melittin und Magainin [59]. Daneben gibt es auch β-Faltblattstrukturen. Diese bilden antiparallele Faltblattstränge aus, die durch eine Schleife miteinander verbunden sind. Cysteinreste stabilisieren diese durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Strängen. Ihre antimikrobielle Aktivität ist meist definiert durch ihre kationische Ladung und die Ausbildung von hydrophoben Seitenketten. Ein Beispiel ist das Protegrin-1, dessen Ausbildung von Disulfidbrücken entscheidend für die antimikrobielle Aktivität ist [39, 44]. Einige AMPs bilden α- und β-Peptidstrukturen aus. Viele finden sich als Abwehrstoffe z.B. gegen Pilzinfektionen in Pflanzen. Beispiele im Menschen sind Abwehrstoffe wie das Beta-Defensin 1 (hBD-1) und Defensin 2 (hBD2), das im menschlichen Körper in größeren Mengen produziert wird und in anaerober Umgebung eine hohe antibakterielle Wirksamkeit entfaltet [11, 48]. Des Weiteren finden sich Peptide, die ringförmige Strukturen ausbilden, aber keine α- und β-Peptidstrukturen besitzen. Sie sind charakterisiert durch das häufige Vorkommen der Aminosäuren Tryptophan, Prolin und Glycin [55]. Als fünfte Klasse werden AMPs zusammengefasst, die nicht in die anderen Strukturklassen eingeordnet werden können. Sie weisen eine zyklische Sekundärstruktur auf, bei der es zu „Kopf-Schwanz“ oder „Kopf-Seitenketten“ Verknüpfungen kommt. Die chemischen Brücken sind als Disulfid- bzw. Thioester ausgebildet [23].

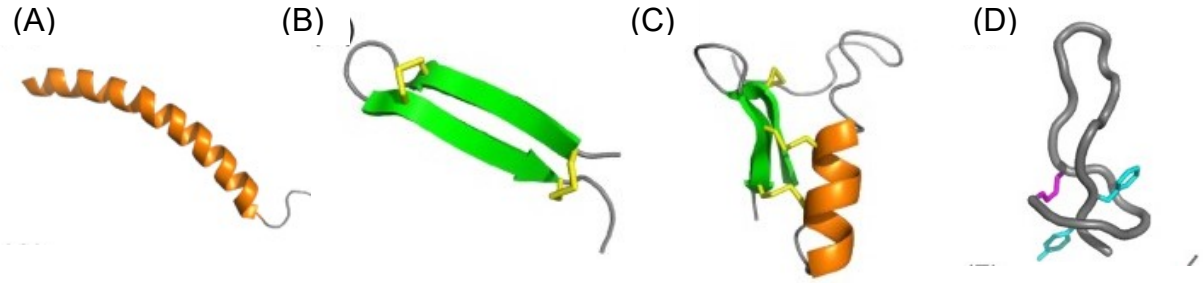


Abb. 2: Gängige Beispiele der Sekundärstrukturen antimikrobieller Peptide. (A) Dargestellt ist die spiralförmige Struktur der α-Helix (orange) und (B) β-Faltblattstruktur (grün) stabilisiert durch Disulfidbrücken (gelb). (C) Peptide können α- und β-Peptidstrukturen ausbilden. (D) Zyklische Sekundärstruktur mit „Kopf-Seitenketten“ Verknüpfungen (magenta) in Form gehalten von sperrigen Seitenketten (türkis). Die Abbildung ist entnommen aus [23].

Die Struktur antimikrobieller Peptide geht direkt mit deren Funktionsweise einher. Dies macht man sich bei der Suche nach neuen erfolgversprechenden Peptiden zunutze. Mithilfe von Computerprogrammen werden Peptidbibliotheken nach Peptiden mit Eigenschaften, die eine antimikrobielle Aktivität prognostizieren, durchforstet. So können potenzielle antimikrobielle Peptide identifiziert und für die weitere experimentelle Beurteilung ihrer Aktivität synthetisiert werden [43]. Ein solches Werkzeug, welches Peptidsequenzen nach möglicher antimikrobieller Aktivität untersucht, ist der ABP- Finder [47]. Mithilfe dieses Programms wurde für das aus der Mitochondrienmembran gewonnene Peptid Micos8 eine antibakterielle Wirkung vorhergesagt.

1.4 AMPs und bakterielle Resistenz

Bakterielle Resistenzen gegenüber Antibiotika gehören heute zu den großen Herausforderungen bei der Behandlung von Infektionskrankheiten [40]. Es werden drei unterschiedliche Typen bakterieller Resistenz unterschieden: Intrinsische-, erworbene- und phänotypische Resistenz. Bei ersterem Mechanismus verhindern genetische Eigenschaften des sogenannten Wildtyps die Wirksamkeit des Antibiotikums. Durch den Selektionsdruck einer antibiotischen Therapie kann es zu genetischen Adaptionen kommen, die die Wirksamkeit des Medikaments einschränken. Letzte definiert Formen, die nicht direkt auf Mutationen zurückzuführen sind [35].

Prominente Beispiele multiresistenter Bakterien sind ESKAPE Erreger. Dazu zählen Vancomycin resistente Enterokokken (VRE), Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und hochresistente Gram-negative Bakterien z.B. ESBL (extended spectrum beta-lactamase) produzierende Keime. Der hohe Selektionsdruck aufgrund der weitverbreiteten Anwendung von Antibiotika führt bei bestimmten Bakterienstämmen zur Aneignung von Resistenzgenen. Antibiotika, die seit Jahrzehnten bei Infektionen angewendet werden, werden dadurch unwirksam. Das Resultat ist eine hohe Sterblichkeit bei Infektion mit ESKAPE Erregern aufgrund der limitierten Therapiemöglichkeiten. Im Februar 2017 wurde die Suche nach antimikrobiellen Substanzen gegen ESKAPE Erreger von der WHO als „Priorität“ angegeben [10]. Im 2024 aktualisierten WHO- Bericht der pathogenen Bakterien

befinden sich die ESKAPE Erreger weiterhin auf der Liste der Erreger, von denen die größte Gefahr für das Gesundheitssystem aufgrund einer hohen Krankheitslast und eingeschränkter Therapiemöglichkeiten ausgeht. Die eingeschränkte Therapiemöglichkeit wird definiert aufgrund der hohen Resistenzsituation und dem Mangel an der Entwicklung neuer wirksamer Therapeutika [61].

Die Wirkungsweise von AMPs ist im Unterschied zu vielen Antibiotika auf wenig spezifische Strukturen wie z.B. Membranen gerichtet. Damit geht die Hoffnung einher, dass AMPs weniger anfällig gegenüber einer Resistenzentwicklung ihrer Zielorganismen sind. Unterstützt wird dies auch genetisch. AMP kodierende Gene verändern sich im Laufe der Evolution wenig [27].

Ein Beispiel eines gegen multiresistente Erreger wirksamen Peptids ist Teixobactin. 2018 wurde Teixobactin aus *Eleftheria terrae*, einem im Boden lebenden nicht kultivierbarem Bakterium, isoliert [32]. Es inhibiert die Zellwandsynthese von Bakterien, indem es an Vorstufen des Peptidoglykans und der Teichonsäure (Lipid II und III) Gram-positiver Bakterien bindet. Es ist z.B. wirksam gegenüber MRSA. Dieser Wirkstoff befindet sich im pharmazeutischen Zulassungsverfahren. Weitere zugelassene antimikrobielle Substanzen, die die Zellwandsynthese inhibieren, sind das klinisch angewendete Glykopeptid Antibiotikum Vancomycin und das zur Lebensmittelkonservierung verwendete AMP Nisin. Beide binden an Lipid II der Membran Gram-positiver Bakterien und verhindern die Zellwandbiosynthese, was zum Wachstumsstillstand und Untergang der Bakterien führt [31].

1.5 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die phänotypische Charakterisierung von Micos8 sowie die Aufklärung des Wirkmechanismus. Mithilfe des ABP- Finders wurden humane Peptidsequenzen auf mögliche antibakterielle Aktivität untersucht [47]. Durch diese bioinformatische Methode wurde für das Peptid Micos8 eine antimikrobielle Aktivität vorhergesagt.

Die antibakterielle Aktivität des Peptids gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und potenzielle Einflüsse auf die Wirksamkeit des Peptides wie pH- Wert, Temperatur und Enzyme wurden evaluiert (Radial Diffusion Assays", RDA). Der Wirkmechanismus, der die antimikrobielle Aktivität herbeiführt, wurde mit SYTOX

Green Assays, pHluorin Assays und Transmission Elektronenmikroskopie untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	**Hersteller**
Agarose	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Ampicillin	CALBIOCHEM, San Diego, USA Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bactriological Peptone	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Bacto ™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto ™ Tryptone	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bacto ™ Yeast extract	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Bidestilliertes Wasser	Universität Ulm-Klinikum Apotheke, Ulm, Deutschland
Blutagarplatten: Tryptone Soja Agar mit Schafsblut	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion)	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
D-(+)Glucose	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Ethanol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Fetales bovines Serum Superior	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
HEPES Puffer 1M	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach; Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharide von Pseudomonas aeruginosa 10(L9143-10MG)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri

Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
MOPS	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Pepton aus Sojabohne	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Qiaprep® Spin Miniprep kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sodium phosphate, Monobasic	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA
Sodium phosphate, Dibasic	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA
SYTOX™ Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

TODD- Hewitt Broth	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Tryptone soya broth	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK

Tabelle 2: Wachstumsmedien

Todd-Hewitt-Broth mit 5% Hefe Extrakt (THY)	36,4 g l-1 Todd-Hewitt Broth 5 g l-1 Hefe Extrakt
Lysogeny Broth Miller (LB-Miller)-Medium	10 g l-1 NaCl 10 g l-1 Trypton 5 g l-1 Hefe Extrakt
Listeria minimal buffer optimized (LMBO)-Puffer	200 mM MOPS (41,8g) 4,82 mM KH_2PO_4 (0,656g) 11,55 mM NaH_2PO_4 (1,6g) 1,7 mM $MgSO_4$ (1,7ml von 100mM Lösung) 0,6 mg ml-1 $(NH_4)_2SO_4$ (600mg) pH Einstellung durch Titration mit HCL und NaOH
1M Glukose-Lösung	180 g l-1 Glukose

Todd-Hewitt-Broth mit 5% Hefe Extrakt (THY)	36,4 g l-1 Todd-Hewitt Broth 5 g l-1 Hefe Extrakt
Lysogeny Broth Miller (LB-Miller)-Medium	10 g l-1 NaCl 10 g l-1 Trypton 5 g l-1 Hefe Extrakt
Listeria minimal buffer optimized (LMBO)-Puffer	200 mM MOPS (41,8g) 4,82 mM KH_2PO_4 (0,656g) 11,55 mM NaH_2PO_4 (1,6g) 1,7 mM $MgSO_4$ (1,7ml von 100mM Lösung) 0,6 mg ml-1 $(NH_4)_2SO_4$ (600mg) pH Einstellung durch Titration mit HCL und NaOH

Tabelle 3: Agar Komponenten

Agar	10 g l^{-1} Agarose Gelöst in 10 mM Phosphatpuffer
TSB Agar	10 g l^{-1} Agarose Gelöst in TSB-Medium
Phosphatpuffer 10mM	1,25 g l^{-1} NaH_2PO_4

	pH Einstellung durch Titration mit HCl und NaOH
Todd-Hewitt-Broth-Yeast (THY) Agar mit 6µg ml^{-1} Cm	36,4 g l^{-1} Todd-Hewitt Broth 5 g l^{-1} Hefe Extrakt 7,5 g l^{-1} Agar 6 mg l^{-1} Chloramphenicol
Tryptone Soya Broth (TSB) Medium	17 g l^{-1} Pancreatic digest of casein 3 g l^{-1} Ezymatic digest of soya bean 5 g l^{-1} NaCl 2,5 g l^{-1} Dipotassium Hydrogen Phosphat 2,5 g l^{-1} Glucose

Tabelle 4: Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α (BSU 1)	Boehringer Law et al. 1995
Pseudomonas aeruginosa (BSU 856)	ATCC 27853
Enterococcus faecium, VRE (BSU1516)	DSM 17050

Klebsiella quasipneumoniae, ESBL (BSU1353)	ATCC 7000603
Listeria monocytogenes EGDe (BSU1423)	Angewandte Mikobiologie Hr. Riedl
Acinetobacter baumanii (BSU 1514)	ATCC 19606
Streptococcus agalactiae + pNZ-pHin2^{Lm} (BSU-Mut 1229)	AG Spellerberg, Universität Ulm
Streptococcus mutans + pNZ-pHin2^{Lm}) (BSU-Mut 1231)	AG Spellerberg, Universität Ulm
Listeria monocytogenes + pNZ-pHin2^{Lm} (BSU-Mut 1233)	AG Spellerberg, Universität Ulm
Streptococcus. pyogenes + pNZ-pHin2^{Lm} (BSU-Mut 1235)	AG Spellerberg, Universität Ulm
Enterococcus faecalis + pNZ-pHin2^{Lm} (BSU-Mut 1239)	AG Spellerberg, Universität Ulm
Streptococcus agalactiae + pNZ-pHin2^{Lm} (BSU-Mut 1251)	AG Spellerberg, Universität Ulm

Streptococcus agalactiae + pNZ-pHin2^{Lm} (BSU-Mut 1252)	AG Spellerberg, Universität Ulm
E. coli (1286)	Klinisches Isolat

Tabelle 5: Plasmide

pNZ-pHin2^{Lm}	Reich et al.2022

Tabelle 6: Peptide

Micos8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Micos8-D8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nisin von *Lactococcus lactis*	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA
Lipopolysaccharid aus *P. aeruginosa*	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA
Lipopolysaccharid aus *E. coli*	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA
Proteinase K von *Tritirachium*	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA

Lipase von *Aspergillus niger*	Sigma, Co. St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 7: Laborgeräte

Heizblock: Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heizblock: Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubator: Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Inkubator: Certomat® HK	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank: -20°C Bosch economic	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank: -20°C CNP 4758 20A/001)	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank: -70°C Herafreeze HFU B Series	Heraeus SepatechGmbH, Osterode, Deutschland
Kühlschrank: -70°C V86-500.1	Ewald Innovationstechnik GmbH, Rodenberg, Deutschland

Laminar air flow working bench: Lamin Air HBB2448	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Laminar air flow working bench: MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Laminar air flow working bench: HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Magnetrührer: IKAMAG®REC-G	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer: MR 3002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Odyssey Clx near-infrared fluorescence imaging system	LI-COR Corporate Offices, Lincoln, Nebraska, USA
pH-Meter: pHenomenal™	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Photometer: UV-1800 Spectrophotometer	Shimazu Corporation, Kyoto, Japan

Pipetteboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ribolyser: FastPrep FP120	Qbiogene Inc., Hercules, Kalifornien
Schüttelinkubator: Certomat®H	B Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Schüttelinkubator: Certomat®HK	B Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Mikroplatten-Reader: Infinite M plex	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler: TRIO- Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortexmischer: REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer: Vortex-Genie2	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage: Kern 470	Kern und Sohn GmbH, Balligen-Frommern, Deutschland

Waage: AG204	Mettler Toledo, Columbus, Ohio
Wasserbad: GFL 1003	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge: Rotanta 460 RC	Andres Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge: Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Einmal-Wägeschalen: Rotilabo®	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorfgefäß (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon®(15 ml)	Corning Science, Tamaulipas, Mexico
Falcon® (50 ml)	Corning Incorporated, New York, USA

Glasperlen (150 -212 µm)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Glasperlen (3 mm)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glasflaschen (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott, Mainz, Deutschland
Impfnadeln	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Inkubations Röhrchen13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Microbank®	Pro-Lab diagnostics, Richmond Hill, Kanada
Mikro- Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Micro-Touch® Nitra-Tex® Handschuhe	Ansell Healthcare Europe, Brüssel, Belgien

Multikanalpipette: Transferpette® S-8 (5 -50 µl)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Multikanalpipette: Transferpette® S-8 30 -300 µl)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 300 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polystyrol Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Serologische Pipetten 10 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

Serologische Pipetten 25 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
96 Wells Flachboden Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienkulturen

Die verwendeten Bakterienstämme sind aufgelistet in Tabelle 4. Bakterien wurden auf Schafblutagar Platten kultiviert, bei 5°C gelagert und jede Woche neu ausgestrichen. Zur Langzeitlagerung wurden Referenzstränge bei -70° in Microbank® Döschen gelagert. Nach 2 Monaten wurden Referenzstämme neu ausgestrichen. Die Platten wurden regelmäßig auf Reinheit kontrolliert. Zur Vorbereitung der Übernachtkulturen (16- 18h) wurden Kolonien von Blutagar-Platten verwendet und 16 - 18h inkubiert. Alle Stämme wurden bei 37°C + 5% CO_2 inkubiert. *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden in 5 ml LB-Medium angeimpft. Diese Kulturen wurden aerob und geschüttelt inkubiert. *K. quasipneumoniae*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, VRE wurden in 10 ml THY-Medium angeimpft. Wobei *A. baumannii* ebenfalls zum besseren Wachstum aerob inkubiert wurde. BSU-Mut GBS, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* sowie die GBS-Stämme 1251 und 1252, die alle das Plasmid pNZ-pHin2^{Lm} enthalten, wurden in 10 ml THY-Medium, BSU-Mut *L. monocytogenes* in 10ml BHI-Medium angeimpft. Alle BSU-Mutanten wurden in Wachstumsmedium mit dem angemessenen Antibiotikum versehen, um einen Selektionsdruck zu generieren. (10 µl ml^{-1} Cm)

2.2.2 Radial Diffusion Assay

Der „Radiale Diffusion Assay“ ist eine Methode zur phänotypischen Charakterisierung von Peptiden [29]. Diese Methode wird zum Nachweis antimikrobieller Aktivität gegen verschiedene sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterienstämme genutzt. Dabei wurden verschiedene Versionen des Assays durchgeführt, um das Peptid unter unterschiedlichen Bedingungen zu testen.

Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in Flüssigmedien angezüchtet. Um das Wachstumsmedium zu entfernen, wurden die Bakterien gewaschen. Dazu wurden die Übernachtkulturen bei 3000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml 10 mM Phosphat-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde wiederholt der Überstand

verworfen und das Pellet in 5 ml 10 mM Phosphat-Puffer aufgenommen. Um die Konzentration der Bakterien zu bestimmen, wurde die optische Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Mithilfe der Formel CFU/ml = $O.D._{600}$ x 2.5 x 10^8 x 5 ml wurde das Volumen, welches der Menge von 2x10^7 Bakterien entspricht, berechnet und zu 15 ml 1% Agarose hinzugegeben. Der Agar wurde zuvor autoklaviert und bei 56°C flüssig gehalten. Die Bakterien-Agar Suspension wurde in Petrischalen gegossen. Nachdem der Agar nach 15 - 30min erhärtet war, wurden Löcher (d = 3mm) unter Zuhilfenahme von abgeschnittene Pipettenspitzen mit weiter Öffnung in den Agar gestanzt. Die Löcher wurden daraufhin mit 10 µl der Test- und Kontrollsubstanz gefüllt. Die Testsubstanz wurde vorher mit doppelt-destilliertem Wasser (ddH_2O) verdünnt und auf eine Peptidkonzentration von 100µg ml^{-1} eingestellt. Die Platten wurden bei 37°C für 3h inkubiert, damit die Peptide in den Agar diffundieren können. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Platten mit 10 ml des nährstoffreichen 1% TSB-Agars überschichtet und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die visuelle Auswertung der Hemmhöfe erfolgte am nächsten Tag nach 16 - 18h Inkubation.

Durch das Wachstum der Bakterien erscheint die Oberfläche des Agars trüb. Antimikrobielle Aktivität ist durch ein fehlendes Bakterienwachstum (Aufklaren) des Agars um die Peptidproben erkennbar. Klar abgrenzbare Hemmhöfe wurden vermessen, wobei bei nicht perfekt runden Hemmhöfen der kleinste Durchmesser gemessen wurde. Partiell aufgeklarte Hemmhöfe, die auf eine nur partielle Hemmung des Bakterienwachstums schließen lassen, wurden dokumentiert. Bei der Auswertung wurden diese mit 0 mm Durchmesser gewertet.

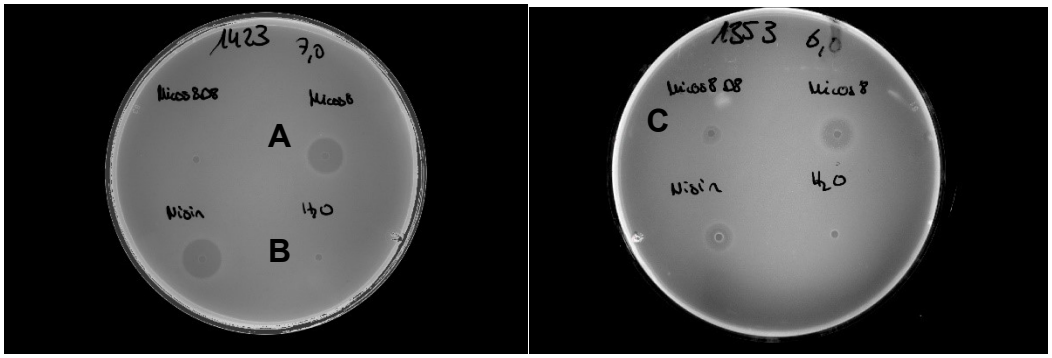


Abb. 3: Auswertung Radial Diffusion Assay A: lokales Aufklaren des Agars durch aktives Peptid. **B:** keine Hemmhof- Bildung. **C:** partiell aufgeklarter Agar. Wird als 0 mm Durchmesser gewertet. Als Positiv Kontrolle wurde 100 µg ml^{-1} Nisin und als Negativ Kontrolle ddH_2O aufgetragen.

Micos8 wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet. Dazu wurde Agar mit den pH-Werten 5,0/5,5/6,0/6,5/7,0/7,5/8,5 hergestellt

Ebenso wurde die Interaktion von Micos8 mit Lipopolysaccharid aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien getestet. Dazu wurde LPS von *P. aeruginosa* und *E. coli* in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit 100 µg ml^{-1} Micos8 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Radial Diffusion Assay durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ausschließlich LPS in der höchst getesteten Konzentration getestet, als Positivkontrolle reines Micos8.

Die Stabilität des Peptids unter Hitzeeinfluss wurde ebenfalls mit dem Radial Diffusion Assay getestet. Micos8 wurde in einer Konzentration von 100 µg ml^{-1} für eine Stunde bei jeweils 95°C, 80°C, 60°C und 40°C auf dem Heizblock inkubiert. Als Kontrolle wurde Micos8 bei Raumtemperatur getestet.

Des Weiteren wurde der Effekt der Enzyme Lipase und Proteinase K auf Micos8 untersucht. Dazu wurden die Enzyme jeweils mit Micos8 in gleicher Konzentration von 100 µg ml^{-1} zunächst für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Enzyme, wurde die Enzym-/Peptid Suspension daraufhin nochmal für eine Stunde bei 70°C inkubiert. Als Kontrolle wurde Micos8, Proteinase K und Lipase unabhängig voneinander getestet.

Test- und Kontrollsubstanzen wurden in die Löcher der Bakterien-Agar-Platten gegeben und am nächsten Tag ausgewertet.

2.2.3 Survival Assay

Survival Assays wurden durchgeführt, um die konzentrationsabhängige antimikrobielle Aktivität von Micos8 über einen Zeitraum von 120min zu untersuchen. Dafür wurden Übernachtkulturen auf eine $O.D._{600}$ von 0.1 adjustiert. Zu 900 µl Bakterien in Phosphatpuffer wurde anteilmäßig 100µl Micos8 in Konzentrationen von 100 µg ml^{-1} und 10 µg ml^{-1} hinzugegeben um finale Peptidkonzentrationen von 10 µg ml^{-1} und 1 µg ml^{-1} zu erreichen und anschließend bei 37°C auf einem Heizblock inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ddH_2O in gleicher Menge mit den Bakterien inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden Verdünnungsreihen mit 20 µl der Test- und Kontrollproben gemacht. Die Bakterien- Peptid Suspensionen wurden auf Schafblut Agarplatten

ausplattiert und bei 37°C + 5% CO_2 inkubiert. Nach ca. 20h wurden die Kolonien ausgezählt und der CFU/ml Wert berechnet.

2.2.4 SYTOX Green Assay

Um den Wirkmechanismus von Micos8 zu untersuchen, wurden SYTOX Green Assays durchgeführt. Es wurden Bakterien ~~in~~ aus der Mitte der logarithmischen Phase eingesetzt. Dazu wurden Bakterien aus Übernachtkulturen entnommen und in neuem Medium auf eine $O.D_{600}$ von 0,03 verdünnt. Die Kultur wurde dann erneut für ca. 2h inkubiert. Dadurch erhält man vitale Zellen und eliminiert eine hohe Zahl toter Bakterien für optimale Versuchsbedingungen. In eine schwarze 96 Well Platte wurden in 50 µl Puffer Verdünnungsreihen mit einer maximalen Konzentration von 100 µg ml^{-1} gemacht. Anschließend wurde die Menge an Bakterien, die einer $O.D._{600}$ von 0,2 entsprechen, entnommen und bei 13000 x g 2min zentrifugiert. Die Bakterien wurden in HEPES Puffer mit 1 µM SYTOX Green suspendiert und zu den Peptid- Puffer Lösungen in der 96 Well Platte gegeben. Für die Positivkontrolle wurde ein Teil der Bakterien mit 70% Ethanol behandelt, um einen Zellaufschluss zu bewirken und 5min inkubiert. Die Fluoreszenz wurde im Mikrotiterplatten-Reader über einen Zeitraum von 2h bei einer Temperatur von 37°C gemessen.

2.2.5 pHluorin Assay

Um zu messen, inwiefern Micos8 die Zellintegrität verschiedener Bakterienstämme schädigt, wurde der pHluorin Assay durchgeführt [9, 36, 41]. Das Protein pHluorin besitzt zwei pH-abhängige Peaks bei 395 bzw. 475 nm, wenn es mit Licht von definierter Wellenlänge angeregt wird. Diese Maxima verschieben sich innerhalb eines pH-Bereichs von 8,0 bis 5,5 reversibel zueinander. Aus den beiden Peaks bildet man ein Fluoreszenzemissionsverhältnis R480/400 bilden. Dieses kann, bei einer maximalen Emission von 510 nm gemessen, als Maß für intrazelluläre pH-Änderungen herangezogen werden.

Alle hier getesteten Bakterienstämme tragen das Plasmid pNZ-$pHin2^{Lm}$ und exprimieren pHluorin. Dieses ist ein pH-sensitives Protein. Die bei pH-Umschlag entstehende Fluoreszenz kann gemessen werden. Der intrazelluläre pH-Umschlag ist ein Indikator für das Absterben von Bakterien.

Zunächst wurde ein geeigneter Puffer hergestellt. Dazu wurden 2,75 ml 1M Glucose zu 47,25 ml LMBO gegeben. Die optische Dichte, der das Plasmid pNZ-pHin2^{Lm} tragenden Übernachtkulturen, wurde mit dem Photometer gemessen. Das Pellet aus den Kulturen wurde nach Zentrifugation in LMBO-Puffer resuspendiert und auf eine $O.D._{600}$ von 3 adjustiert. Auf einer schwarzen 96-Well-Platte wurden Verdünnungsreihen angesetzt. Dazu wurden 50 µl Bakteriensuspensionen einer definierten Konzentration und 50 µl Micos8 in LMBO-Puffer in absteigender Micos8 Konzentration pipettiert. Als Negativ Kontrolle wurden 100 µl LMBO-Puffer ohne Bakterien und Peptid verwendet. Als Positiv Kontrolle wurde Nisin in einer mit definierter Wirksamkeit bekannter Konzentration zu der Bakterien-Puffer-Suspension gegeben. Alle verwendeten Peptide wurden mit ddH_2O Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die gefüllte Mikrotiterplatte wurde, aufgrund des lichtsensitiven pHluorins, 30min im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde anschließend im Microtiterplatten-Reader gemessen. Sie wurde bei einer Emission von 510 nm nach Exzitation bei 400 nm und 480 nm, entsprechend der bekannten Exzitationsmaxima von pHluorin, gemessen.

Um den pHluorin Assay für die *S. agalactiae* Stämme1251 und 1252 zu etablieren, wurde das Fluoreszenzsignal von mit AMP behandelten Bakterien mit unbehandelten verglichen. Dazu wurden Bakterien mit 200 µg ml^{-1} Nisin behandelt. Angestrebt wurde eine große Differenz der Werte von unbehandelten zu behandelten Bakterien. Dies ergibt optimale Versuchsbedingungen für aussagekräftige Ergebnisse. Die Messungen wurden in LMBO-Puffer mit Glucose unter verschiedenen pH- Werten, die in 0,5er Schritten von pH 5,5 bis pH 9,0 reichen, getestet. Zusätzlich wurde ein pH von 6,2 getestet In der Erstbeschreibung wurden die Bakterien in Puffer mit einem pH- Wert von 6,2 suspendiert um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen [41].

2.2.6 Generelle DNA Techniken

Der verwendete genetisch modifizierte Bakterienstamm *E. coli* trägt auf dem Plasmid pNZ-pHin2^{Lm} das Gen für pHluorin als Insert. Dieses kodiert für das pH-sensitive, fluoreszierende Protein pHluorin. Ein Inokulum von Kolonien aus 3 Petrischalen wurde in 500 µl 0,9% NaCl suspendiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Isolierung des Plasmids wurde

das QIAprep Spin Miniprep Kit 8250 verwendet. Es wurde entsprechend der Packungsbeilage des Herstellers verfahren. Die Transformation von GBS Stämmen wurde mittels Elektroporation durchgeführt [42].

Zur Überprüfung wurde das Plasmid nach Standardverfahren aus den Streptokokken Stämmen isoliert. Zur Plasmidisolierung von Streptokokken (GBS) wurden Übernachtkulturen der zu isolierenden Streptokokkenklone inokuliert. Nach Zentrifugation bei 3000 U min^{-1} für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS gelöst. Bei 14000U min^{-1} wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und in 350 µl Qiagen Puffer1 resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurde die Suspension in Ribolyser Röhrchen überführt und 4x20s bei Stufe 6.0 im Ribolyser lysiert.

Für die Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation wurde eine Gelelektrophorese des PCR-Produkts durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes zusammen mit Ladepuffer in die Tasche eines mit Ethidiumbromid versehenen 1% Agarose Gels pipettiert. Eine Spannung von 130 mV wurde für etwa 60 min angebracht. Mithilfe von DNA- Leitern, die in einer weiteren Tasche des Gels aufgetragen werden, kann die Größe des Produkts bestimmt werden. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert im UV-Licht.

Ein PCR-Nachweis zur Kontrolle des erfolgreich transformierten Plasmids wurde unter den in Tabelle 9 und 10 aufgeführten Konditionen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden dann mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Machery-Nagel) nach Packungsbeilage aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde durch die Firma Microsynths Seqlab laboratories (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde das gereinigte Plasmid und entsprechende Oligonukleotide („Forward- und Reverse-Primer“) versandt. Hier wurde die DNA nach der Sanger Methode sequenziert. Die genetisch bestätigten Mutanten wurden auf THY-Agar Platten, angereichert mit 6µg ml^{-1} Chloramphenicol kultiviert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatz

Reagenz	**Menge**
dNTPs (10 nM jedes Nukleotid)	1 µl
Buffer (10 x Konzentration)	5 µl
Forward Primer (10 pmol/µl) Sequenz: 5´-caggaattgtcagataggcc-3´	2,5 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl) Sequenz: 5´-caaagcaacacgtgctgtaat-3´	2,5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
H_2O	36 µl
Plasmid-DNA	2 µl

Tabelle 10: PCR- Programm

	Temperatur	Zeit
1. Erhitzen	95°C	5 min
2. Denaturation	95°C	1 min
3. Hybridisierung	50°C	30 s
4. Elongation	72°C	90 s
5. Wiederholung Schritte 2-4 für 33 Zyklen		
Finale Elongation	72°C	7 min
7. Ende	4°C	

2.2.7 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit der zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm durchgeführt. Proben von mit Micos8 behandelten VRE wurden mit Bakterien, die mit ddH_2O unter gleichen Bedingungen behandelt wurden, verglichen. Bakterien in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wurden entsprechend einer $O.D._{600}$ von 0,1 mit Phosphat Puffer gewaschen und mit Micos8 entsprechend einer Konzentration von 1 µg ml^{-1} einmal für 10 min und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Peptid- Behandlung wurden die Zellen in 0,1 M PBS (pH 7,3), der 2,5% Glutaraldehyd und 1% Saccharose

enthält, fixiert. Die Proben wurden dreimal mit PBS gewaschen und in einer wässrigen Lösung mit 2% Osmiumtetroxid nachfixiert. Nach Dehydrierung der Proben in einer Reihe von wässrigen Lösungen mit ansteigender 2 -Propanol Konzentration wurden sie in einem Block mit 1% Uranylacetat gefärbt und in Epon eingebettet. Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 70 nm wurden auf einem kupfernen Rastergitter platziert und mit 0,3% Bleicitrat kontrastiert. Die Bilder wurden im Anschluss mit einem Jeol TEM 1400 oder einem Zeiss TEM aufgenommen und visuell analysiert.

2.2.8 Statistische Methode

Die Daten wurden mithilfe von GraphPadPrism ausgewertet. Benutzt wurde der nonparametrische Mann-Whitney-U Test. Statistische Signifikanz wurde erreicht bei p unter 0.05. P -Werte kleiner 0.05 sind mit einem Stern gekennzeichnet, 2 Sterne bei p -Werten unter 0,01 und 3 Sterne zeigen eine Signifikanz mit p -Werten unter 0,005.

3 Ergebnisse

3.1 Antimikrobielle Aktivität von Micos8 unter verschiedenen Umweltbedingungen

Laborinterne Vorversuche haben eine antimikrobielle Aktivität von Micos8 gegen verschiedene Bakterienstämme gezeigt. Um die Aktivität detaillierter zu charakterisieren, wurden sogenannte Radial Diffusion Assays durchgeführt. Getestet wurde Micos8 mit einer Konzentration von 100 µg ml^{-1} gegen *E. coli* DH5α, *P. aeruginosa*, *K. quasipneumoniae* (ESBL), *L. monocytogenes*, *A. baumannii* und Vancomycin- resistente Enterokokken. Radial Diffusion Assays wurden wiederholt durchgeführt, um über eine Mittelung der Messergebnisse eine verbesserte Aussage treffen zu können. Die Hemmhöfe variierten in ihrer Größe von 0 bis 12 mm. Durchschnittliche Hemmhof- Durchmesser wurden bei einem pH 7,0 gemessen. Diese betragen 7,8 mm bei *P.aeruginosa*, 7,8 mm bei *E. coli* DH5α, 6,4 mm bei *K. quasipneumoniae*, 8,4 mm bei *A. baumannii*, 8,6 mm bei VRE und 9,8 mm bei *L. monocytogenes*. Damit zeigt Micos8 in einer Konzentration von 100 µg ml^{-1} eine vergleichbare Aktivität wie Nisin in gleicher Konzentration.

Zudem wurde ein Derivat des Peptids Micos8 getestet. Micos8 Derivat 8 (Micos8D8) besitzt an achter Stelle die Aminosäure Lysin. Dieses zeigt eine abgeschwächte Aktivität gegenüber allen getesteten Bakterienstämmen (Abb.2).

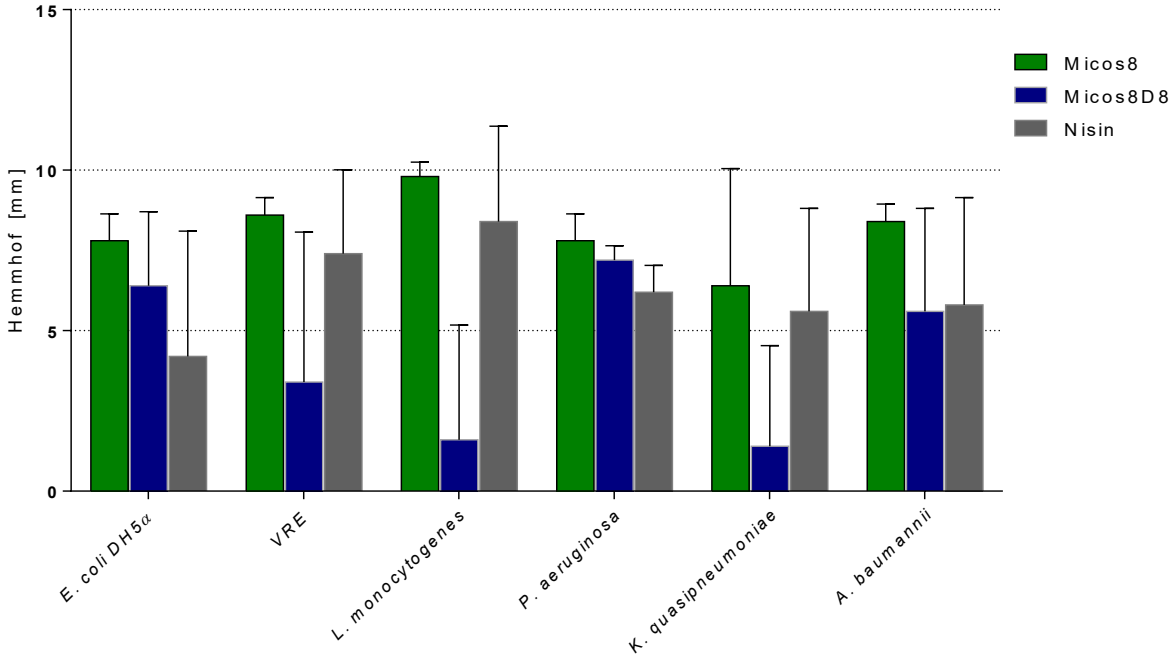


Abb. 4: Antimikrobielle Aktivität von Micos8D8. Getestet wurde die Wirkung des Peptids im Vergleich zu Micos8 und Nisin gegen die Bakterienstämme *E. coli* DH5α, VRE, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *K. quasipneumoniae* und *A. baumannii.* Die Experimente wurden bei einem pH von 7,0 durchgeführt. Alle Peptide wurden in einer Konzentration von 100 µg ml^{-1} mit ddH_2O getestet. Als Negativ Kontrolle wurde ddH_2O benutzt. Dargestellt ist die Auswertung des Radial Diffusion Assay mit Mittelwert sowie Standardabweichungen. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt.

Gegen *P. aeruginosa* zeigt Micos8D8 die stärkste Hemmung. Diese nähert sich der Wirkung von Micos8 deutlich an und übertrifft die des AMP Nisin. Dahingegen zeigt das Derivat kaum Aktivität gegen *L. monocytogenes* und *K. quasipneumoniae*. Micos8D8 zeigt eine Aktivität gegen *A. baumannii* ähnlich der von Nisin. Jedoch wird diese von Micos8 deutlich übertroffen.

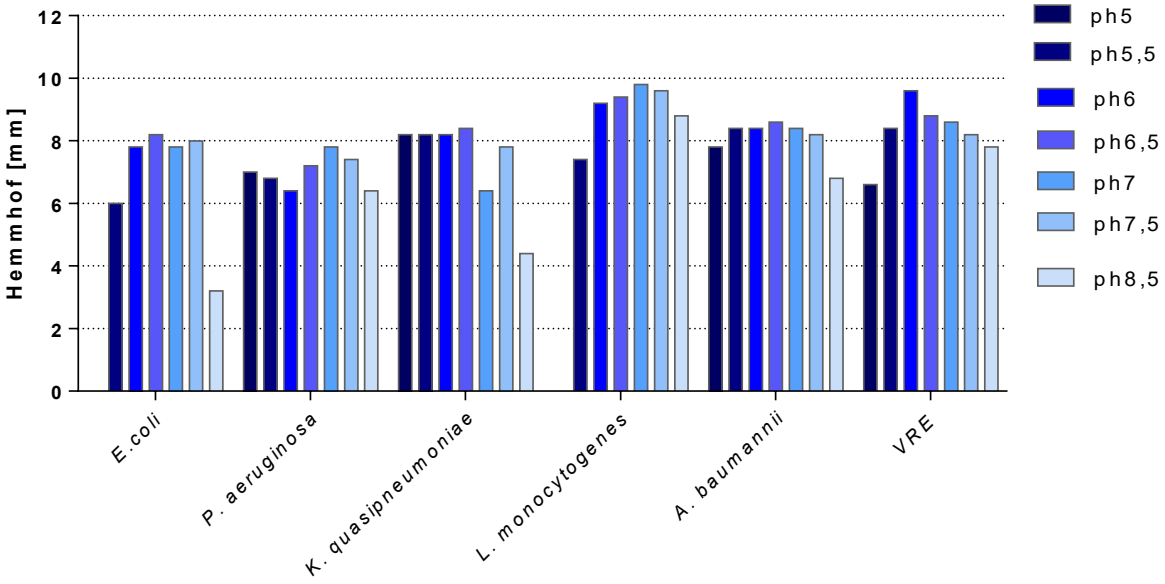


Abb. 5: Radial Diffusion Assays mit 100 µg ml^{-1} Micos8 gegen die angegebenen Bakterienstämme mit verschiedenen pH- Werten.

Inhibition des Bakterienwachstums wurde visuell durch Messen des aufgeklarten Agars ausgewertet. Auf der x- Achse sind die Bakterienstämme aufgelistet. Die y- Achse zeigt die Durchmesser der Hemmhöfe in mm. Die Farbskalierung gibt die getesteten pH- Werte an. Alle Peptid Suspensionen wurden in ddH_2O vorbereitet. Dargestellt sind Daten aus 5 Experimenten unter Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung.

Angepasste Diffusion Assays wurden durchgeführt, um einen Einfluss des pH-Wertes auf die Wirkung von Micos8 zu untersuchen. Micos8 zeigte antibakterielle Aktivität gegen alle getesteten Bakterienstämme bei pH-Werten, die von pH 5,5 bis pH 8,5 reichen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung nicht abhängig vom pH- Wert ist. Es lässt sich lediglich eine Tendenz ableiten, dass Micos8 im sauren pH von 5 weniger aktiv ist. Gegen *E. coli* und *L. monocytogenes* konnte unter diesen Bedingungen keine Aktivität beobachtet werden. Genauso zeigte das Peptid eine abnehmende Wirkung in den höheren der getesteten pH- Werte. Das pH Optimum lag je nach Bakterienstamm bei Werten von 6,0 bis 7,0.

Um die Stabilität des Peptids zu untersuchen, wurde Micos8 verschiedenen Temperaturen ausgesetzt und im Anschluss im Radialen Diffusion Assay auf dessen Wirksamkeit gegen die Bakterienstämme *E. coli* 1286 und VRE getestet. Die Versuche ergaben keine Wirkabschwächung selbst bei einer Temperatur von 95°C.

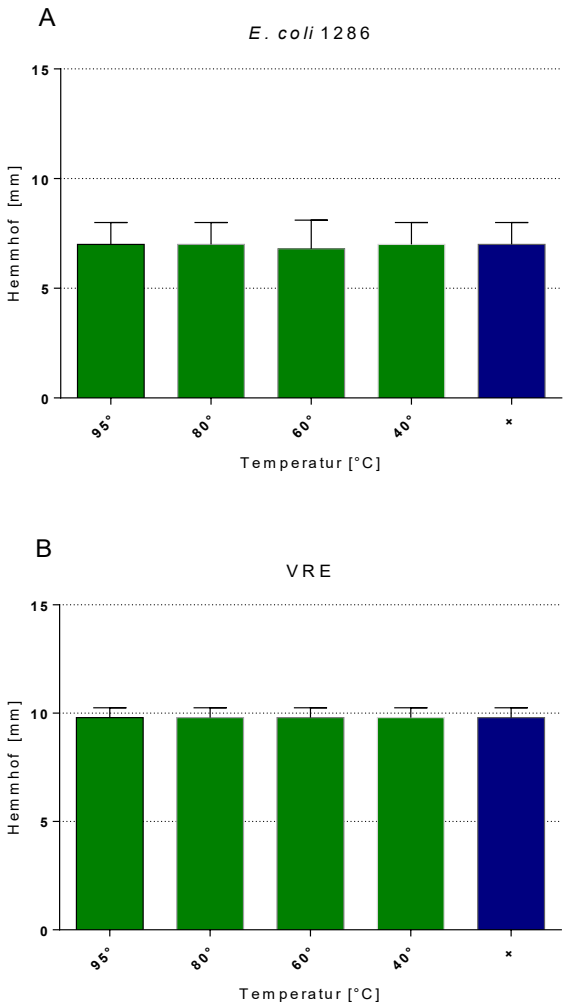


Abb. 6: antibakterieller Effekt von Micos8 nach Inkubation unter verschiedenen Temperaturbedingungen. Getestet wurde die Aktivität gegen *E. coli* 1286 (A) und VRE (B). Die x-Achse zeigt die verschiedenen Temperaturen in °C, denen das Peptid eine Stunde ausgesetzt wurde. Als Positiv Kontrolle wurde die Wirkung des Peptids bei Raumtemperatur gemessen. Auf der y- Achse ist der gemessene Durchmesser der Hemmhöfe in mm angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten.

Weitergehend wurde der Einfluss von Proteinase K und Lipase auf die Wirkung von Micos8 getestet. Beide Enzyme führten zu einem Funktionsverlust des Peptids. Wie schon in vorangegangenen Experimenten beschrieben, zeigt sich auch hier eine stärkere Hemmung des Wachstums des Gram-positiven VRE im Vergleich zu *E. coli* 1286.

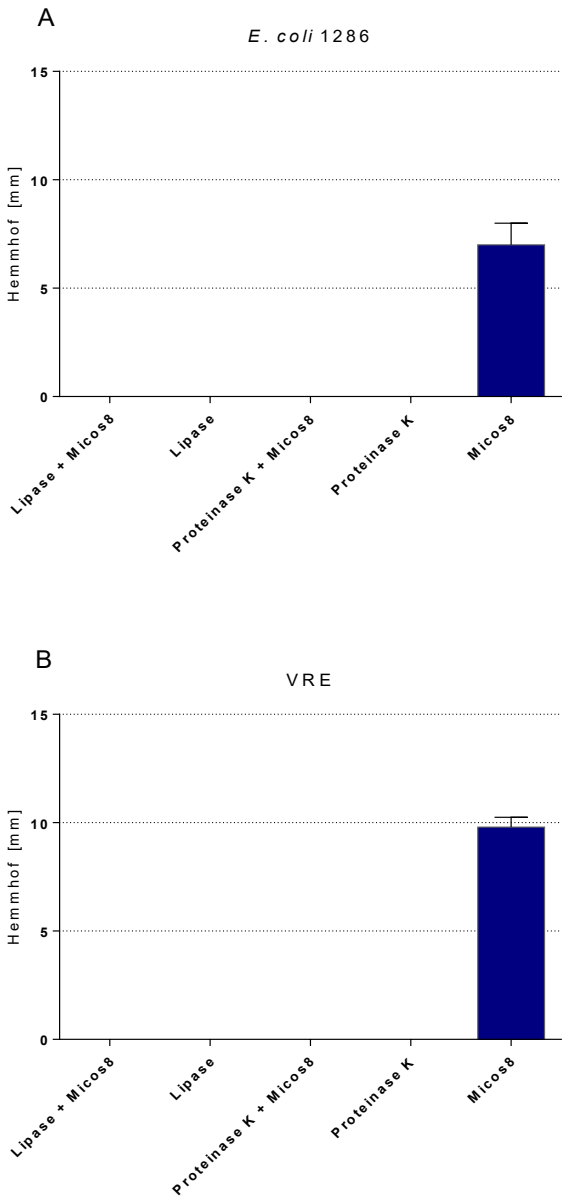


Abb. 7: Der Einfluss von Lipase und Proteinase K auf die Wirkung von Micos8. Gemessen wurde die antibakterielle Aktivität des Peptids gegen *E. coli* 1286 (A) und VRE (B) im Radial Diffusion Assay nach einstündiger Inkubation mit dem Enzym. Wachstumsinhibition wurde mithilfe des Hemmhof Durchmessers ermittelt. Als Negativ Kontrolle wurden die Enzyme jeweils ohne Peptid getestet. Als Positiv Kontrolle wurde erneut die Wirkung des Peptids gegen den Bakterienstamm gezeigt. Insgesamt wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen im Diagramm dargestellt sind.

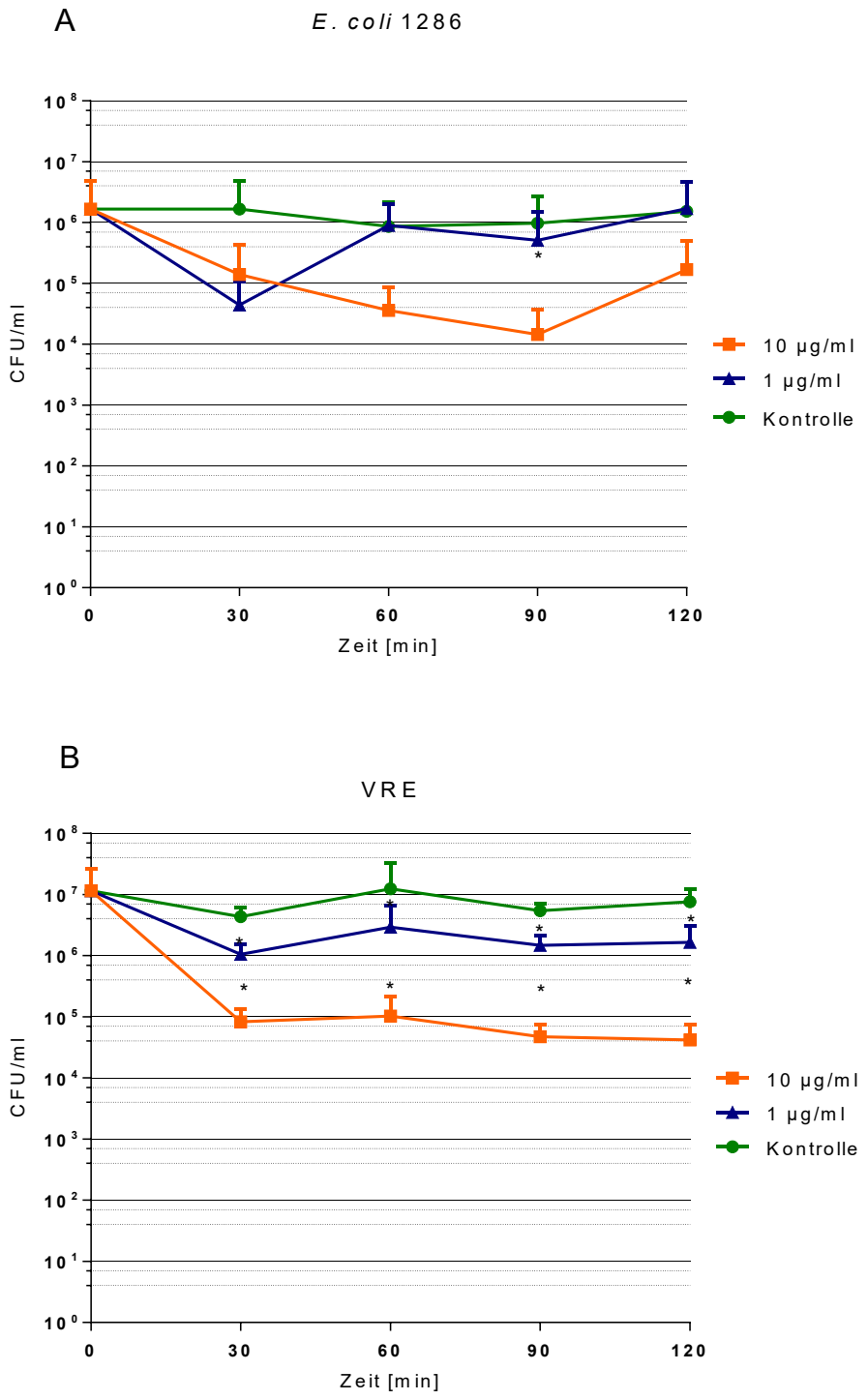


Abb. 8: Bakterizider Effekt von Micos8 über einen Zeitraum von 120 min. Survival Assays von *E. coli* 1286 (A) VRE (B) in Anwesenheit von Micos8. Gemessen wurde der Effekt des Peptids in Konzentrationen von 10 µg ml^{-1} und 1 µg ml^{-1}. Als Vergleich wurde die Zahl der mit ddH_2O behandelten Bakterien gemessen. Bakterienkolonien der Verdünnungen wurden ausgezählt und auf die CFU ml^{-1} umgerechnet. Die CFU sind auf der y- Achse in logarithmischer Skalierung angegeben. Die x- Achse gibt die Zeitpunkte der Messungen in Minuten an. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten.

Der Survival- Assay gibt Aufschluss über das antimikrobielle Potenzial abhängig von der Konzentration und der Zeit. Der bakterizide Effekt von Micos8 gegen VRE ist in diesen Versuchen deutlich messbar. Der Assay zeigt, dass Micos8 seine größte bakterizide Wirkung in den ersten 30 min entfaltet. Bei einer Peptid Konzentration von 10 µg ml^{-1} reduziert das Peptid die Bakterienanzahl um 2 log Stufen.

3.2 Wirkmechanismus von Micos8

Für AMPs sind verschiedene Wirkmechanismen bekannt. Eine davon besteht in der Interaktion mit dem Lipopolysaccharid in der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien. Um diese Wirkung von Micos8 zu untersuchen, wurde LPS aus *E. coli* und *P. aeruginosa* in verschiedenen Konzentrationen mit Micos8 (100 µg ml^{-1}) inkubiert und die danach verbleibende Wirkung des Peptids gegen die bereits zuvor getesteten Bakterienstämme gemessen. Bei einer Interaktion von Micos8 mit LPS kommt es zu einer Abschwächung der antimikrobiellen Wirkung, da nur noch wenig ungebundenes Micos8 die antibakterielle Wirkung entfalten kann. Neben Gram-negativen Bakterien wurde auch dieser Effekt gegen Gram-positive Bakterien getestet. Diese besitzen selbst kein LPS in der Zellmembran, dennoch zeigt sich eine Wirkabschwächung des Peptids durch die Bindung an das hinzugegebene freie LPS.

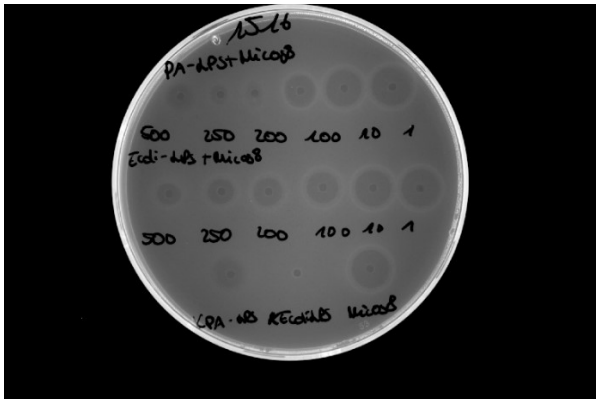


Abb. 9: Visuelle Auswertung des Radial Diffusion Assays. Antibakterielle Wirkung von Micos8 gegen VRE nach Inkubation mit LPS aus *E. coli* und *P. aeruginosa* in Konzentrationen von 1 -500 µg ml^{-1}. Als Positiv Kontrolle wurde 100 µg ml^{-1} reines Micos8 und als Negativ Kontrolle reines *E. coli* -LPS und *P. aeruginosa* -LPS getestet.

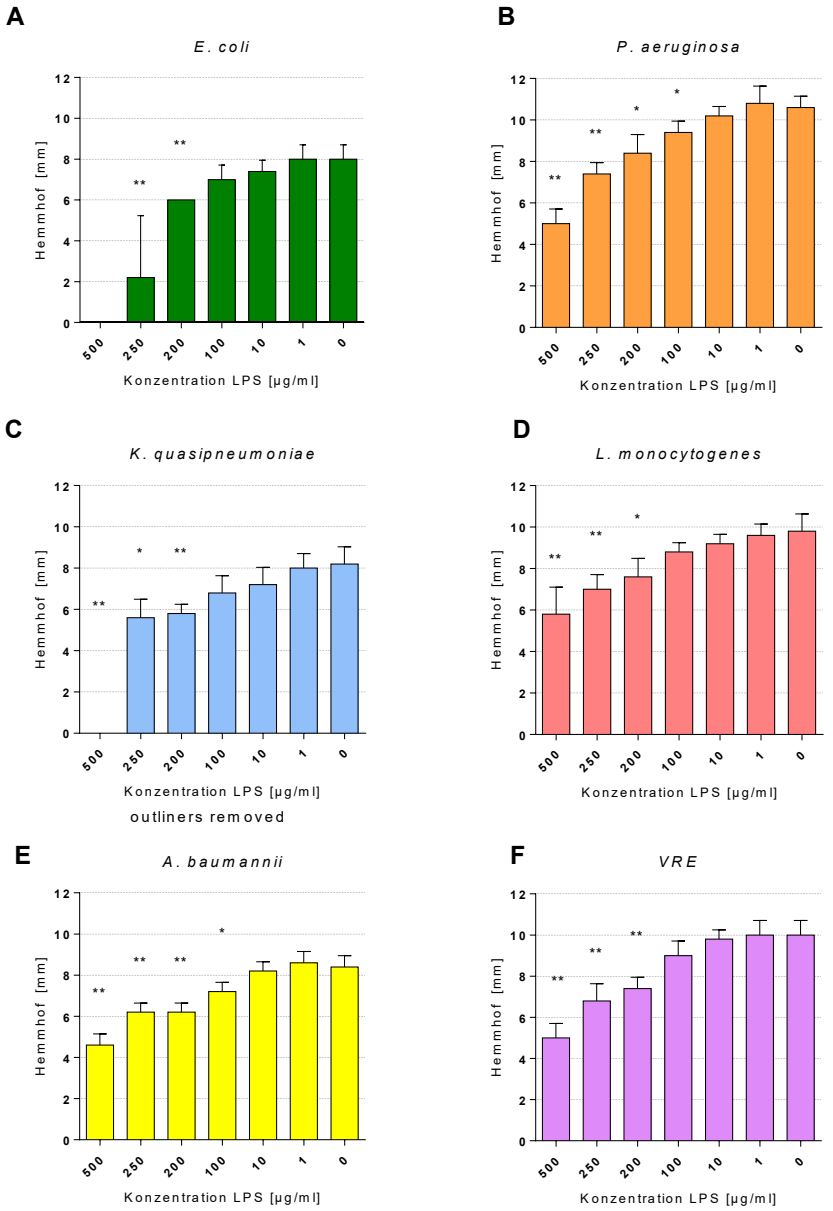


Abb. 10: Interaktion von Micos8 mit LPS aus *E. coli* gemessen mit dem Radialen Diffusion Assay. Dargestellt ist der antimikrobielle Effekt des Peptids nach Inkubation mit LPS in verschiedenen Konzentrationen gemessen mit dem Radial Diffusion Assay. Auf der y- Achse sind die Durchmesser der Hemmhöfe angegeben. Als Negativ Kontrolle wurde reines LPS in einer Konzentration von 500 µg ml^{-1} und als Positiv Kontrolle 100 µg ml^{-1} Micos8 getestet. Dargestellt sind fünf unabhängige Versuche mit den ermittelten Mittelwerten und Standardabweichungen. **A:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *E. coli* DH5α. **B:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *P. aeruginosa*. **C**: antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *K. quasipneumoniae*. Aufgrund der hohen Abweichung der Messwerte einer Versuchsdurchführung wurden diese Ergebnisse nicht in die Auswertung mit einbezogen. **D:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *L. monocytogenes*. **E:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *A. baumannii*. **F:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen VRE.

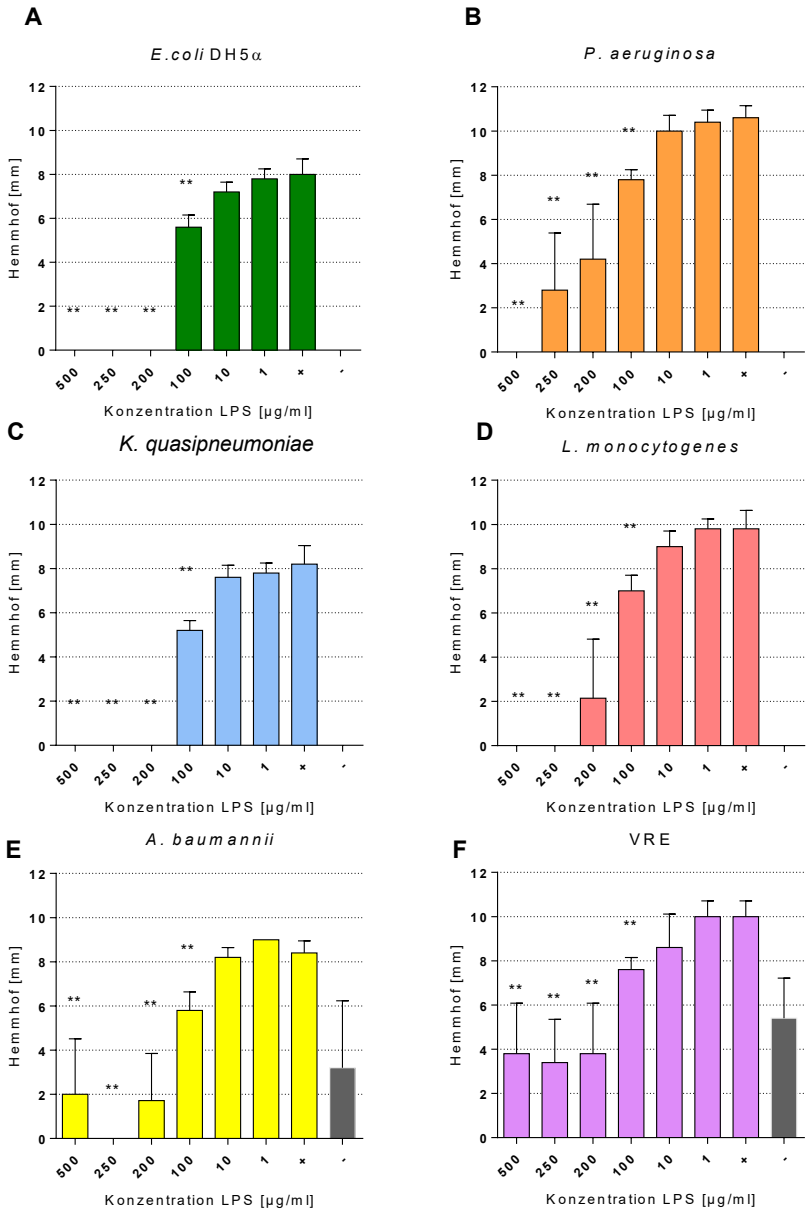


Abb. 11: Interaktion von Micos8 mit LPS aus *P. aeruginosa* gemessen mit dem Radialen Diffusion Assay.

Getestet wurde LPS in verschiedene Konzentrationen. Alle Peptide wurden in ddH_2O gelöst. Als Negativ Kontrolle wurde reines LPS in einer Konzentration von 500 µg ml^{-1} und als Positiv Kontrolle 100 µg ml^{-1} Micos8 getestet. Auf der x- Achse sind die LPS- Konzentrationen in absteigender Reihenfolge aufgelistet. Die y- Achse gibt den durchschnittlichen Durchmesser der Hemmhöfe aus fünf unabhängigen Experimenten in mm wieder. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. **A:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *E. coli* DH5α. Aufgrund der hohen Abweichung der Ergebnisse einer Versuchsdurchführung wurden Ausreißer eliminiert. **B:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *P. aeruginosa*. **C**: antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *K. quasipneumoniae*. **D:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *L. monocytogenes*. **E:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegen *A. baumannii*. **F:** antibakterieller Effekt nach Inkubation mit LPS gegenVRE.

Die abgeschwächte Wirkung von mit LPS inkubiertem Micos8 wurde in Relation zur Wirkung von reinem Micos8 gesetzt. Steigende LPS-Konzentrationen zeigten gegen alle getesteten Bakterienstämme einen signifikanten Rückgang der Micos8 Aktivität.

Daraus kann gefolgert werden, dass eine Interaktion zwischen Micos8 und LPS stattfindet. Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkabschwächung von Micos8 nach Inkubation mit Lipopolysacchariden. Reines *E. coli*- LPS zeigte keine inhibitorische Wirkung auf das Bakterienwachstum. *P. aeruginosa*- LPS zeigte ausschließlich in den Versuchen gegen *A. baumannii* und VRE eine Beeinträchtigung des Bakterienwachstums. *P. aeruginosa*- LPS zeigte ein stärkeres Interaktionspotenzial mit dem Peptid als *E. coli*- LPS. Gegen *K. quasipneumoniae* und *L. monocytogenes* konnte bis zu einer *P. aeruginosa*- LPS Konzentration von 250 µg ml^{-1} keine antibakterielle Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Weiterführend wurde die Wirkweise von Micos8 hinsichtlich des Einflusses auf die Membranintegrität der Bakterienstämme mithilfe von „SYTOX Green Assays“ untersucht. Der Farbstoff bindet an freie Nukleinsäuren, wodurch das Fluoreszenzsignal als Marker für Membranzerstörung dient, da der Farbstoff bei intakter Zellmembran nicht in die Bakterien eindringen kann. Gemessen wurde das Fluoreszenzsignal von mit Micos8 in verschiedenen Konzentrationen behandelten Bakterien der Stämme *E. coli* 1286 und VRE.

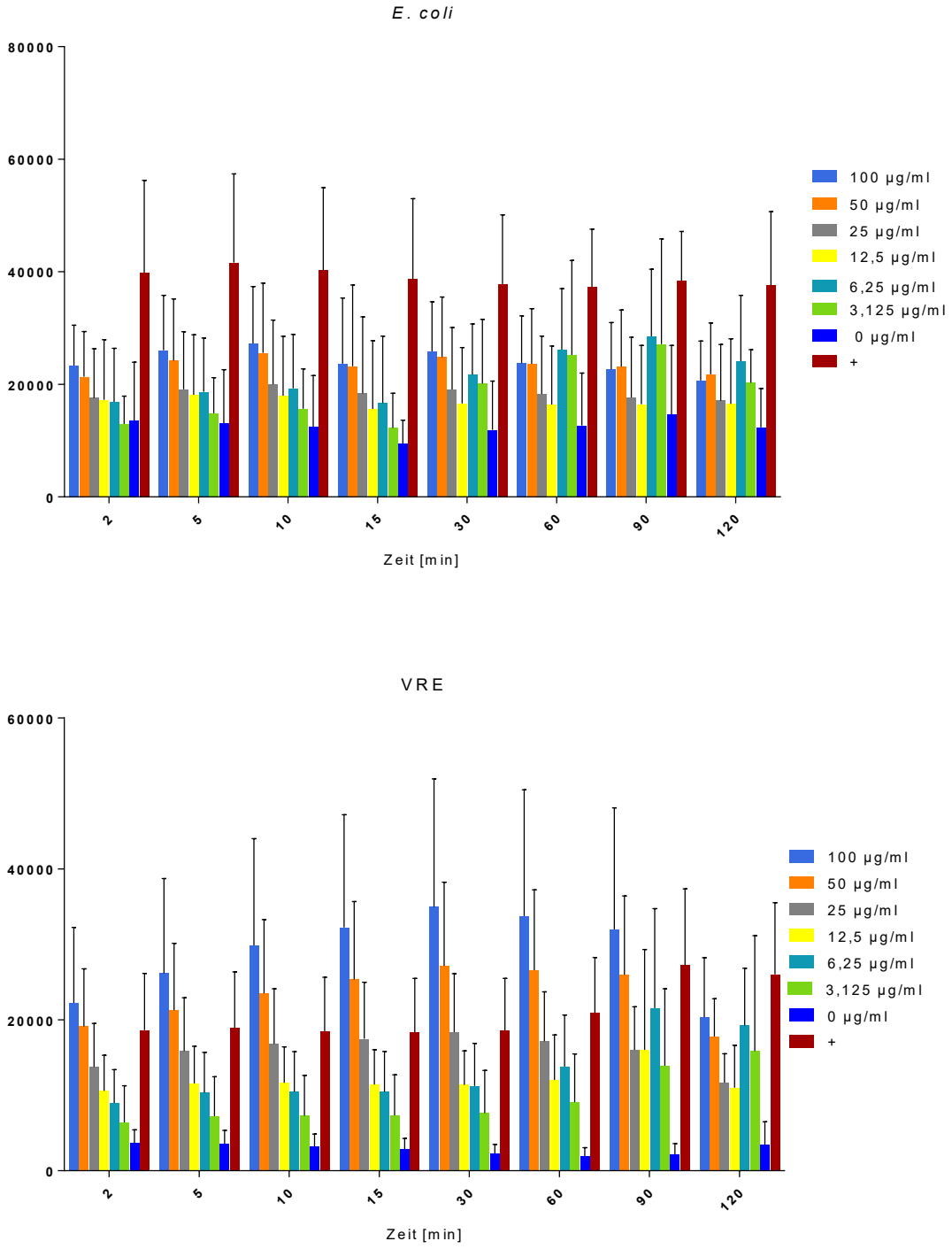


Abb. 12: SYTOX Green Fluoreszenz Signal von mit Micos8 behandelten Bakterienzellen über einen Zeitraum von 90 Minuten. Verdünnungsreihen mit einer maximalen Micos8 Peptidkonzentration von 100 µg ml^{-1} wurden getestet. Als Positiv Kontrolle wurden Bakterien mit 70% Ethanol behandelt. Als Negativ Kontrolle wurde ddH_2O gemessen. Auf der y- Achse ist das Fluoreszenz Signal, gemessen bei einer Exzitation von 488 nm und Emission von 530 nm, angegeben. Die x- Achse gibt die Messpunkte in Minuten an. Die Farbskalierung kodiert die getesteten Peptidkonzentrationen. Es wurden je fünf unabhängige Versuche mit *E. coli* 1286 (A) und VRE (B) durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen hier dargestellt sind.

Micos8 zeigte gegen beide Bakterienstämme einen dosisabhängigen membranzerstörenden Effekt. Gegen *E. coli* kam es innerhalb der ersten 10 Minuten zu einem Anstieg des Signals. Zu den späteren Zeitpunkten der Messung blieb dieses gleich oder ging etwas zurück. Daraus lässt sich schließen, dass das Peptid gegen *E. coli* den größten membranzerstörenden Effekt innerhalb der ersten 10 Minuten ausübt. Gegen den getesteten VRE-Stamm zeigte sich der Anstieg des Signals bis zum Zeitpunkt 30 min.

Die Ergebnisse des SYTOX Green Assay haben Hinweise auf einen membranzerstörenden Effekt von Micos8 gegeben. Um diesen zu bestätigen, wurden der pHluorin Assay durchgeführt. Das fluoreszierende Protein pHluorin detektiert eine Änderung des pH-Gradienten, ausgelöst durch den membranzerstörenden Effekt von AMPs. So konnte die Wirkung von Micos8 quantifiziert werden. Die minimale Konzentration an Micos8, die eine Auflösung des pH- Gradienten entlang der Membran induziert, wurde gemessen. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit einer maximalen Konzentration von 200 µg ml^{-1} Micos8 durchgeführt. Getestet wurden die Bakterienspezies GBS*, S. mutans,* Gruppe A Streptokokken*, E. faecalis, L. monocytogenes.* Die relative Fluoreszenz Intensität (RFI) variiert je nach pH-Wert. Sie zeigt zwei Intensitäts-Maxima. Erstere bei einer Exzitation von 400 nm, wobei die Intensität mit zunehmendem pH-Wert steigt. Ein zweites Maximum liegt bei 480 nm, wobei die Intensität mit abnehmendem pH-Wert steigt. Das Verhältnis der relativen Fluoreszenz bei Exzitation von 400 zu 480 quantifiziert den membranzerstörenden Effekt der Testsubstanz, der mit einem pH-Umschlag einhergeht.

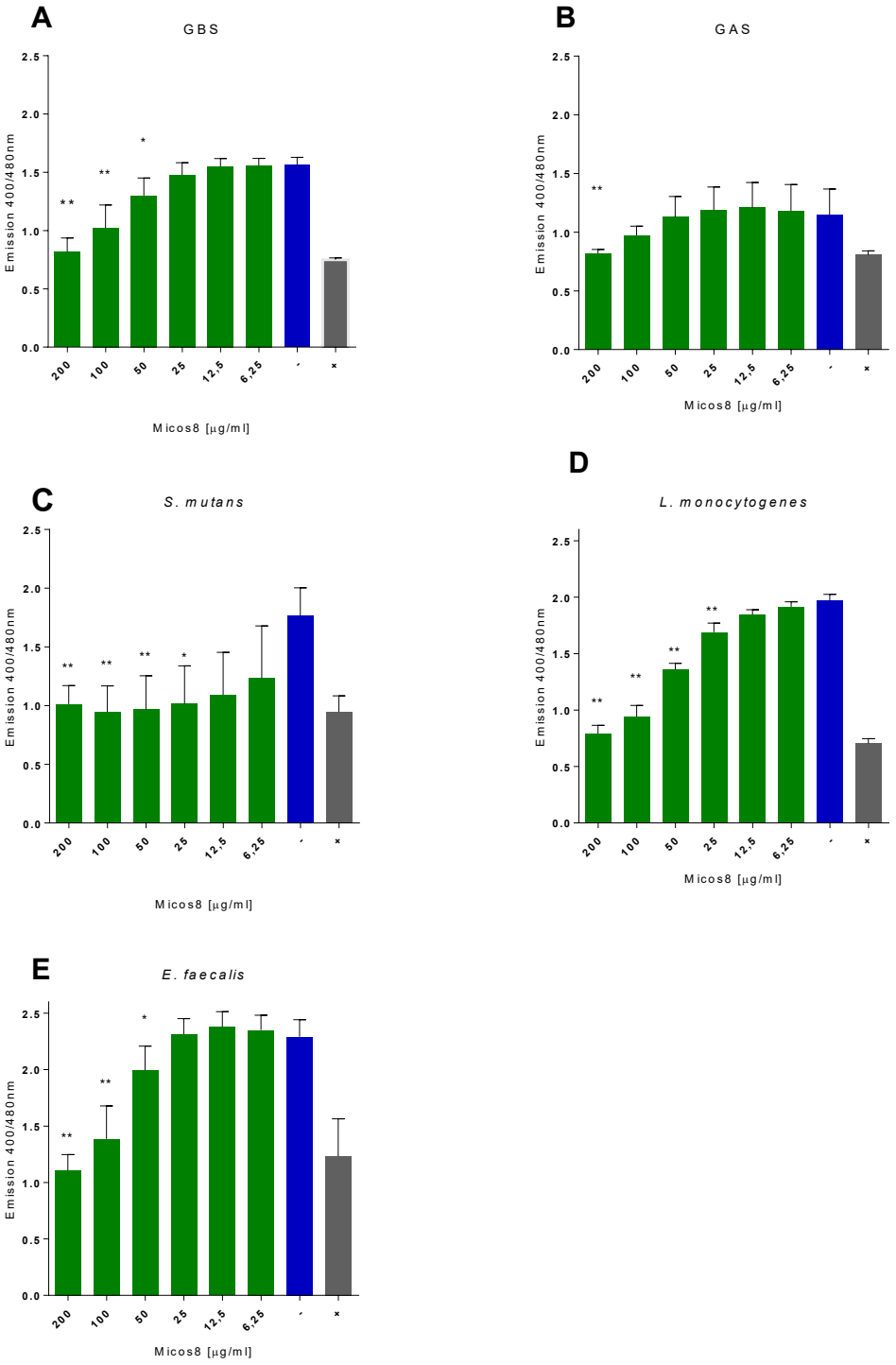


Abb. 13: Zellmembran Disruption von Micos8 gemessen mit dem pHluorin Assay. Die x- Achse zeigt die getestete Micos8 Konzentration in µg ml^{-1}. Dazu wurden Verdünnungsreihen des Peptids gemacht. Auf der y- Achse ist das Verhältnis der Emission unter Exzitation bei 400 nm zu 480 nm angegeben. Die Fluoreszenz wurde bei einer Emission von 510 nm gemessen. Als Positiv Kontrolle wurde Nisin in einer Konzentration von 100 µg ml^{-1} gemessen. Als Negativ Kontrolle wurde ddH_20 zu den Proben gegeben. Dargestellt sin Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen

Experimenten. **A:** Gruppe B Streptokokken. **B:** Gruppe A Streptokokken. **C:** *S. mutans*. **D:** *L. monocytogenes*. **E:** *E. faecalis*.

Gegen alle getesteten Bakterienstämme zeigte sich ein Dosis abhängiger Effekt von Micos8 auf die Membranintegrität der Erreger.

Um diesen Effekt bei weiteren Bakterienstämmen nachzuweisen, wurden mehrere Stämme von *S. agalactiae* genetisch modifiziert. Sie erhielten das vorher aus *E. coli* isolierte Plasmid pNZ-pHin2^{Lm}. Nach erfolgreicher Transformation exprimieren diese Bakterien das Protein pHluorin, das auf diesem Plasmid kodiert ist. Nach durch DNA- Sequenzierung des Plasmids gesicherter Transformation, wurde der pHluorin Assay für die neuen GBS- Stämme etabliert und durchgeführt.

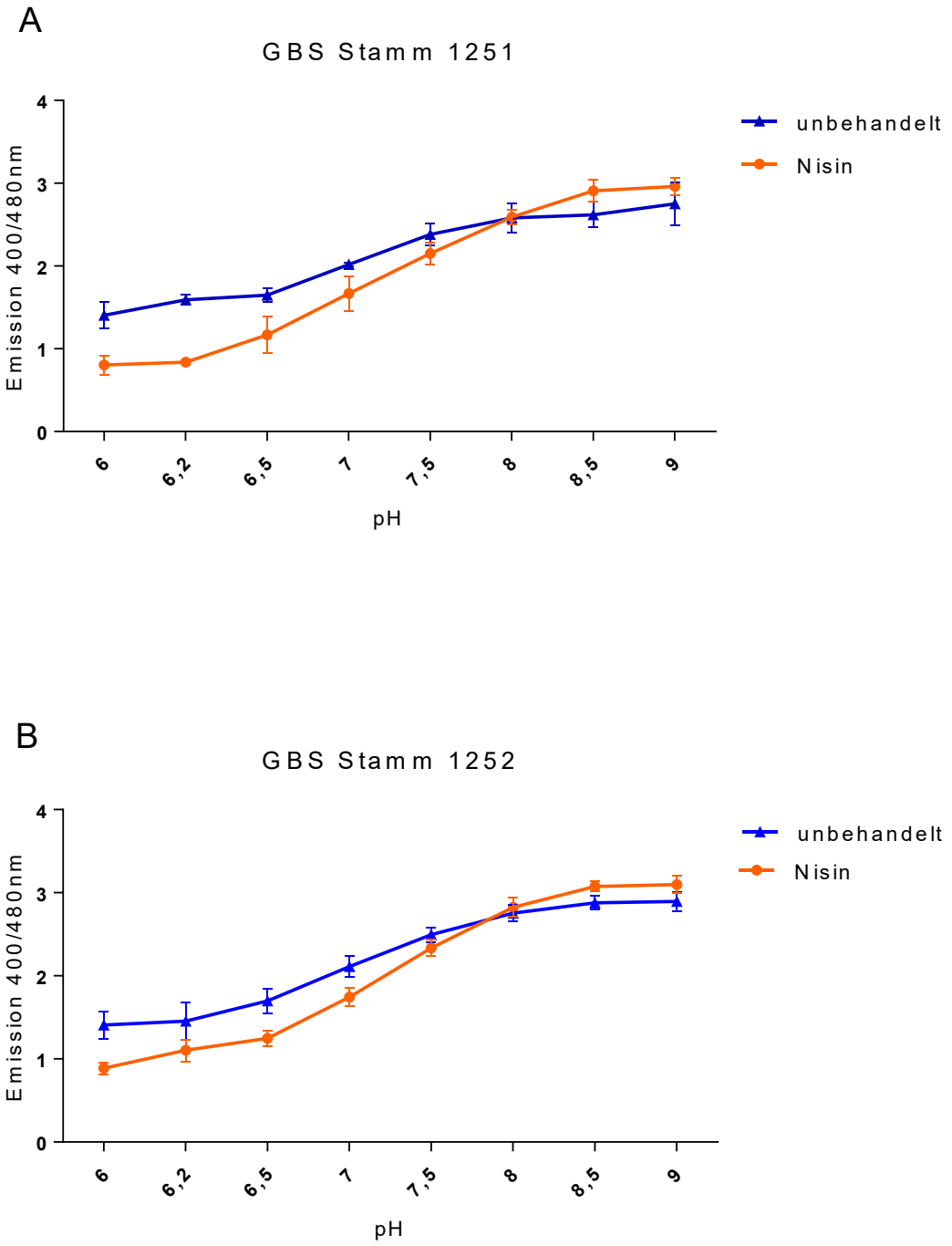


Abb. 14: Verhältnis der Emission von unbehandelten im Vergleich zu mit Nisin behandelter Bakterien der GBS Stämme unter verschiedenen pH-Werten. Gemessen wurde das Fluoreszenz Signal von pHluorin. Die y- Achse zeigt das Verhältnis der beiden Exzitationsmaxima. Auf der x-Achse sind die untersuchten pH- Werte von 6,0 bi 9,0 aufgetragen. Bakterien wurden mit 200 µg ml^{-1} Nisin behandelt. Zu den unbehandelten Bakterien wurde ddH_2O gegeben. pHluorin Assays wurden mit GBS- Stamm 1252 (A) und 1251 (B) durchgeführt. Insgesamt wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt, deren Mittelwerte im Diagramm abgebildet sind.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität vom pH- Wert. Bei *S. agalactiae* Stamm 1252 wurde die größte Differenz zwischen unbehandelten und mit AMP behandelte Bakterien bei einem pH von 6,0 gemessen. Bei dem Stamm 1251 traf dies bei einem pH von 6,2 zu.

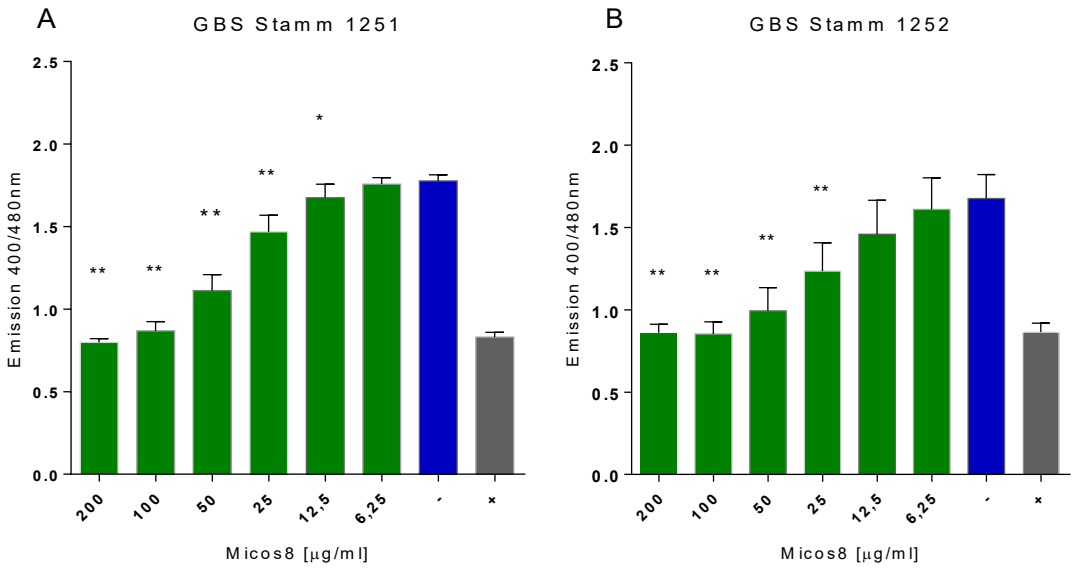


Abb. 15: Zellmembran Disruption von GBS- Stamm 1251 (A) und 1252 (B) durch Micos8 in verschiedenen Konzentrationen gemessen mit dem pHluorin Assay. Die x- Achse zeigt die verschiedenen Micos8 Konzentrationen in µg ml^{-1}. Dazu wurden Verdünnungsreihen des Peptids angefertigt. Auf der y- Achse ist das Verhältnis der Emission unter Exzitation bei 400 nm zu 480 nm angegeben. Als Positiv Kontrolle wurde Nisin in einer Konzentration von 100 µg ml^{-1} gemessen. Als Negativ Kontrolle wurde ddH_20 zu den Proben gegeben. Dargestellt sin Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten

3.3 Elektronenmikroskopie

Um den Wirkmechanismus von Micos8 weiter zu charakterisieren und zu visualisieren, wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt. Es wurden Bilder von VRE nach Inkubation mit Micos8 aufgenommen. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 14. dargestellt. Bei einer Peptidkonzentration von 1 µg ml^{-1} konnten sowohl Bakterienzellen, die durch die antimikrobielle Aktivität des Peptids geschädigt wurden, als auch parallel dazu vitale Bakterien beobachtet werden. Nach 10 Minuten Inkubation mit dem Peptid kam es zu keiner sichtbaren Reduktion von VRE verglichen zu den mit Wasser behandelten

Bakterien. Jedoch zeigen einzelne Bakterien Veränderungen der Zellmembran, die auf eine Auflösung der Membranintegrität und den darauffolgenden Zelltod schließen lassen. Die Zellmembran einzelner Bakterien zeigt nicht mehr die typische Lipiddoppelschicht und es lässt sich eine beginnende Ablösung dieser vermuten. Nach 30 Minuten Inkubation mit Micos8 zeigte die Auswertung der Bilder eine weitere Zunahme der Membranschädigungen. Bei verlängerter Ko- Inkubation mit dem Peptid von 30 Minuten erhöhte sich zudem die Anzahl der lysierten Bakterienzellen.

10 min		30 min	
Micos8	Wasser	Micos8	Wasser

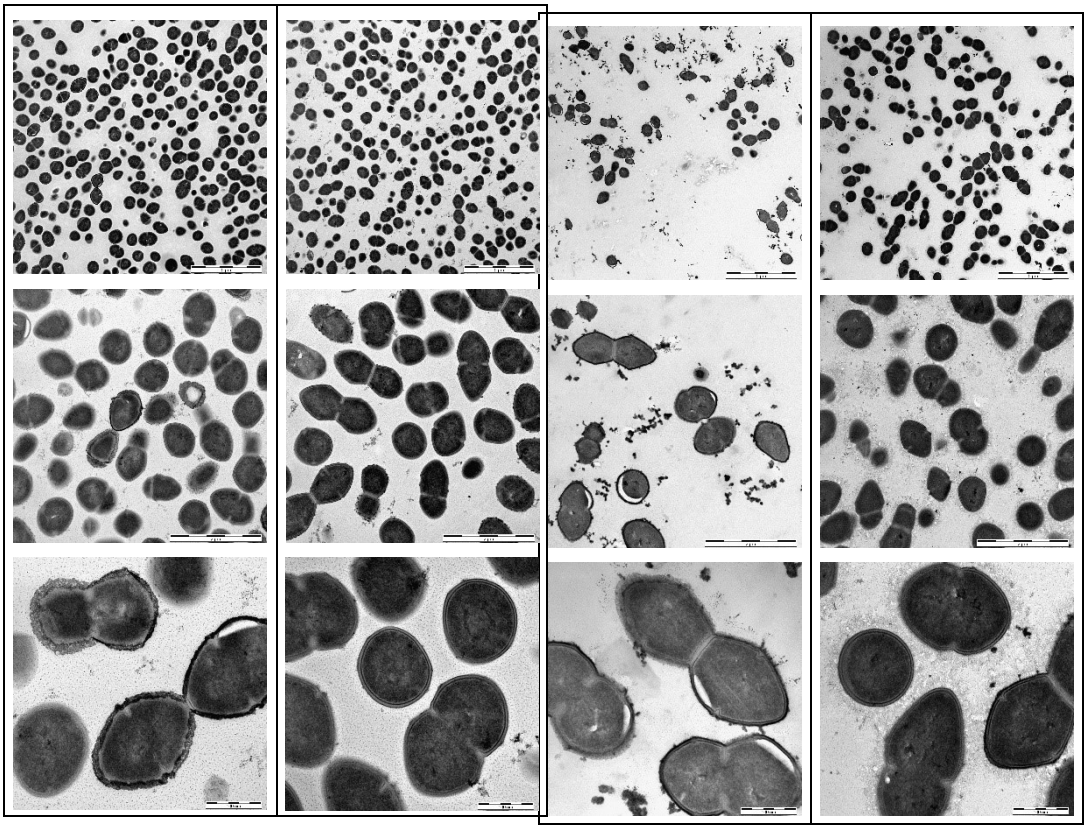


Abb. 16: TEM- Bilder von VRE nach Behandlung mit Micos8. Die Bakterien wurden mit 1 µg ml^{-1} Micos8 für 10 min und 30 min inkubiert. Als Kontrolle wurden VRE mit ddH_2O unter gleichen Bedingungen behandelt.

4 Diskussion

Mithilfe neuer Computerprogramme lassen sich Peptidbibliotheken nach neuen potenziell antimikrobiellen Substanzen durchforsten. In dieser Arbeit wurde das auf diese Weise identifizierte Peptid Micos8 untersucht und charakterisiert. Es konnte eine dosisabhängige antimikrobielle Aktivität gegen sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Erreger, unter anderem gegen ESKAPE- Pathogene, gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen ergaben einen auf Zerstörung der Membranintegrität basierenden Wirkmechanismus.

4.1 Antimikrobielle Aktivität von Micos8

Es gibt verschiedene Herangehensweisen, um neue antimikrobielle Substanzen zu identifizieren. Anders als Fleming bei der Entdeckung von Lysozym im Nasenschleim, einer der ersten entdeckten Substanzen mit bakterizidem Effekt, macht man sich heute Computerprogramme zu Nutze [13].
Antimikrobielle Peptide haben aufgrund ihrer spezifischen Struktur verschiedene Angriffsziele. Ein weitverbreiteter Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide liegt in der Destabilisierung und Auflösung der Membranintegrität von Bakterien. Darüber hinaus können AMPs auch mit intrazellulären Strukturen wie Nukleinsäure und Enzymen interferieren oder Einfluss auf die Proteinbiosynthese nehmen. Selbst kleinste Modifikationen der Peptidstruktur beeinflussen die Wirksamkeit. Werkzeuge, um solche Peptide zu identifizieren müssen daher in der Lage sein, große Peptiddatenbanken präzise auf erfolgsversprechende Peptide zu durchsuchen. Der ABP- Finder und ähnliche Programme durchsuchen gezielt alle bekannten Proteine ausgewählter Organismen, um anhand von bestimmten Kriterien solche mit möglicher antibakterieller Aktivität zu identifizieren.
Antimikrobielle Peptide lassen sich in allen Lebewesen als Teil des angeborenen Immunsystems nachweisen. Auch Wirbellose sind in der Abwehr gegen Pathogene auf solche Peptide angewiesen, da sie kein erworbenes Immunsystem besitzen. Als Beispiel wurde aus dem Weichtier *Nerita versicolor* Peptide (Nv-p1, Nv-p2, Nv-p3) mit antimikrobiellen Eigenschaften computergestützt identifiziert und deren Aktivität gegen verschiedene Bakterien in Radial Diffusion Assays bestätigt [43].

In meiner Arbeit wurde das mithilfe des ABP- Finders identifizierte Peptid Micos8 auf antibakterielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an pathogenen Bakterien untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine antimikrobielle Aktivität gegen sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien. Hervorzuheben ist die Micos8 Aktivität gegen ESKAPE Pathogene wie VRE, *K. quasipneumoniae*, *A. baumannii* und *P. aeruginosa.* Für diese Bakterien gibt es nur eine sehr beschränkte Anzahl wirksamer Antibiotika oder Chemotherapeutika, wie von der WHO auf der Liste der pathogenen Bakterien mit Status „Priorität“ herausgegeben [61] Unter anderem zeigte Micos8 gegen VRE einen antibakteriellen Effekt schon bei einer Konzentration von 1µg ml^{-1}. Der antimikrobielle Effekt von Micos8 gegen diese Stämme wurde mithilfe von Radial Diffusion Assays gezeigt. Diese Labormethode evaluiert, ob eine Hemmung des Bakterienwachstums stattfindet und lässt quantitativ, je nach Größe der Hemmhöfe, Rückschlüsse darauf zu, wie sensibel der Bakterienstamm auf das Peptid reagiert [29]. Diese Methode ist ein Standardverfahren für die Testung der Aktivität von AMP gegen Bakterien. Der Radial Diffusion Assay belegt die antibakterielle Wirkung von Micos8 auf einem Festagar. Der Survival Assay bestätigte die voraus erzielten Messergebnisse in einem Verfahren, das ein flüssigem Medium beinhaltet.

Dem Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide unterliegt zumeist ein Angriff auf die Zellmembran der Bakterien. Für diesen Wirkmechanismus sind verschiedene Modelle wie das „carpet“ oder „barrel stave“- Modell bekannt. Da sich der Aufbau der Zellmembran Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien unterscheidet, ist die Wirksamkeit der AMPs oft selektiv. So konnte beispielsweise für das Bakteriocin Angicin eine stärkere Wirkung gegen Gram-positive als gegen Gram-negative Mikroorganismen nachgewiesen werden[54]. Die Messergebnisse der hier durchgeführten Versuche lassen keine Rückschlüsse auf eine spezifische Wirkung abhängig von der Zusammensetzung der Zellmembran zu. Sie zeigten eine vergleichbar ausgewogene antibakterielle Wirkung von Micos8 gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterienstämme. So wurden Bakterienstämme wurde anhand der bestimmt. Im Radial Diffusion Assay wurden Hemmhofdurchmesser für die Gram-negative Bakterienstämme *E. coli*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii* im Bereich von 0,72- 0,86cm Durchmesser gemessen. Gegen Gram-positive Stämme *L. monozytogenes*, VRE und *K. quasipneumoniae* lagen die durchschnittlichen Durchmesser im Bereich 0,84-

0,94cm. Damit konnte im Gegensatz zu Angicin eine Wirkung gegen Bakterien unabhängig vom Aufbau der Zellmembran gezeigt werden.

Mithilfe des modifizierten Radial Diffusion Assays wurde weiter untersucht, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Wirkung von Micos8 hat. Der pH-Wert definiert die Konzentration der H^{+-} und OH^- Ionen. Diese werden in Zahlen als negativ dekadischer Logarithmus ausgedrückt. Deshalb gilt es zu beachten, dass die Konzentrationsunterschiede um den Neutralpunkt pH 7 sehr klein sind. Getestet wurden pH-Werte von 5,0 bis 8,5 in 0,5er Abständen.

Antimikrobielle Peptide nutzen ihre positive Ladung, um die negativ geladene Bakterienmembran anzugreifen. Für Proteine ist der sog. „isoelektrische Punkt“ als der pH-Wert definiert, bei dem das Protein keine Ladung trägt. Durch Verschiebung des pH-Wertes nach oben oder unten kann das Protein seinen Ladezustand verändern und positiv oder negativ geladen sein. Die Charakterisierung des Peptids mithilfe des „Bachem peptide calculator“ ergab, dass Micos8 für die getesteten pH-Werte eine konstante elektrische Ladung von +4 aufweist. Erst ab einem pH von 9 nimmt die Ladung ab. In den durchgeführten Experimenten wurden daher die pH-Werte so gewählt, dass Micos8 immer in einem geladenen Zustand in den Messreihen eingesetzt wurde. Generell zeigte das Peptid eine ähnliche Wirksamkeit im pH Bereich von 6,0 -7,5. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Protonierung in diesem pH-Bereich durch den geringen H^+-Konzentrationsunterschied auf einem ähnlichen Niveau bleibt. Innerhalb des pH-Messfensters (5,0 bis 8,5) konnte gezeigt werden, dass im stärker alkalischen oder sauren Bereich die Wirkung gegen fast alle Bakterienstämme abnimmt.

AMPs sind bekannt dafür, dass sie ihre antimikrobielle Wirkung nur unter bestimmten Bedingungen entfalten. Eine positive Ladung, die z.B. in saurem pH erreicht wird, begünstigt die Bindung an die negativ geladene Bakterienmembran. Die meisten AMPs zeigen die stärkste antimikrobielle Wirkung unter Bedingungen, die dem Wirkungsort der Peptide entsprechen [37]. So entfalten zum Beispiel Peptide, welche als topische Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen eingesetzt werden wie z.B. das fungizide Cathelicidin LL-37, eine stärkere Wirkung bei saurem pH-Wert als unter neutralen Bedingungen [33]. Dieser entspricht dem pH- Wert der Haut.

Die Funktion des Proteins ist von der Struktur abhängig [37]. Neben der Primärstruktur als Abfolge definierter Aminosäuren hat auch der pH-Wert

Auswirkung auf die relevanten Sekundärstrukturen. Ladungen, die in einer Proteinstruktur nach innen gerichtet sind, haben meist einen verringerten Effekt. Es ist bekannt, dass mit der Protonierung von Histidinresten bei niedrigem pH eine Konformationsänderung einhergeht. In den meisten Fällen begünstigt ein niedriger pH die Bildung von α- Helices, was in der Regel die antimikrobielle Aktivität verbessert, da viele wirksame AMPs, die in der Lage sind, Poren zu bilden, einen hohen Anteil an α- Helices besitzen. Bekannte pH- abhängige AMPs, die sich in der klinischen Zulassung befinden, sind zum Beispiel Kappacin, Histatine und Lactoferrin und deren Derivate [37, 38].

Die Protonierung von Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure bei saurem pH verbessert die antibakterielle Wirkung, indem die kationische Ladung des Moleküls zunimmt und damit deren Fähigkeit mit der negativ geladenen Bakterienmembran zu interagieren. Darüber hinaus haben molekulardynamische Simulationen Hinweise darauf gegeben, dass die Anzahl der Histidin Reste von Peptiden eine wichtige Rolle in deren Fähigkeit Membranen zu zerstören, spielen [37].

Die Ergebnisse mit Micos8 unterstreichen diesen Effekt. Auch die Charakterisierung anhand der Aminosäurensequenz bestätigt die in Theorie für die Wirksamkeit wichtigen chemischen Eigenschaften. Das Peptid Micos8 besitzt keine der drei bei einem niedrigen pH protonierten Aminosäuren. Es weist im sauren Bereich eine Ladung von +4 auf. Erst ab einem pH von 9 verringert sich die Ladung.

Die Auswirkung der Aminosäuresequenz auf das antimikrobielle Potenzial des Peptids bestätigen die Versuche mit einem Micos8 Derivat dem Micos8D8. Dieses unterscheidet sich vom ursprünglichen Peptid lediglich durch die Aminosäure Lysin statt Methionin an achter Position. Dieser Austausch einer Aminosäure führt zu einer Abschwächung der antimikrobiellen Aktivität des Peptids.

Neben einem breiten Wirkspektrum sollten erfolgsversprechende antimikrobielle Peptide auch eine gewisse Resistenz gegen Umwelteinflüsse aufweisen. Micos8 erwies sich in den hier durchgeführten Experimenten als sehr hitzestabil. Die Inkubation des Peptids bei verschiedenen Temperaturen (40 - 95°C) nahm keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des Peptids. Selbst bei Temperaturen von 95°C zeigte das Peptid keine Abnahme der antimikrobiellen Aktivität. Vergleichbar ist Micos8 damit dem AMP Angicin, das ebenfalls durch keinen Funktionsverlust bei Erhitzen auf 90°C charakterisiert ist [54].

Micos8 verlor, wie erwartet, seine Wirkung bei Inkubation mit Proteinase K. Proteinase K ist sowohl eine Exo- als auch Endopeptidase und wird aufgrund ihrer Eigenschaften häufig zum vollständigen Abbau von Proteinen, vor allem aus Zelllysaten benutzt. Damit konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Wirkung von Micos8 nicht durch andere Komponenten oder dem Versuchsaufbau geschuldet war. Dennoch muss hinzugefügt werden, dass einige Proteine wie z.B. Prionen und Amyloide aufgrund ihrer Struktur von der Lyse durch die ProteinaseK geschützt sind [25].

Bei den Experimenten mit ProteinaseK wurde der Negativ Kontrolle Lipase aus *Aspergillus niger* zugesetzt. Die Aktivität einer Lipase, die veresterten Fettsäuren von Glyceriden abzuspalten, sollte zu keinem Funktionsverlust eines Proteins führen. Im in dieser Arbeit durchgeführten Experiment war ebenfalls ein Funktionsverlust von Micos8 nach Inkubation mit Lipase zu sehen. Dieses diskrepante Ergebnis hat sich auch in mehreren Wiederholungen des Experiments reproduzieren lassen. Möglicherweise lag hier eine Kontamination der verwendeten Lipase-Charge diesem diskrepanten Ergebnis ursächlich zugrunde. Alternativ stehen auch Alternativen wie z.B. eine DNAse als Negativ Kontrolle zur Verfügung. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Bezüglich der Kinetik der antimikrobiellen Aktivität von Micos8 konnte mithilfe des Survival Assays gezeigt werden, dass die größte Abnahme an vitalen Bakterien in den ersten 30 Minuten nach Behandlung mit dem Peptid stattfindet. Gegen *E. coli* 1286 zeigte Micos8 bei einer Konzentration von 10 µg ml^{-1} innerhalb der ersten 30 Minuten einen Rückgang der Bakterienzahl um eine log- Stufe. Bis zur Inkubationsdauer von 90 Minuten nahm die Zahl intakter Zellen um eine weitere log-Stufe ab. Bei einer sehr niedrigen Peptidkonzentration von 1 µg ml^{-1} ließ sich kein eindeutiger Inhibitionseffekt mehr nachweisen. Bei den Versuchen mit VRE sah man bei einer Peptidkonzentration von10 µg ml^{-1}, dass die Bakterienzahl in den ersten 30 Minuten um mehr als 2 log- Stufen reduziert wurde. Eine weitere Abnahme der Bakterienzahl konnte auch bei verlängerter Inkubation nicht mehr gemessen werden. Möglicherweise lag hier die weitere Abnahme der Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze. Selbst bei einer Peptidkonzentration von 1 µg ml^{-1} zeigte Micos8 einen antimikrobiellen Effekt. Es kam zu einer Reduktion der Bakterienzahl um eine

log- Stufe, welche ebenfalls bereits in den ersten 30 Minuten nach Inkubation erreicht wurden.

Eine Bestätigung der vorausgegangenen Experimente brachte die Transmission Elektronenmikroskopie. Bilder von VRE-Zellen nach 10min Inkubation mit dem Peptid illustrieren einen beginnenden Untergang einzelner Bakterien durch Aufschluss der Zellwand. Nach 30 Minuten Inkubation zeigt sich ein starker Rückgang der Zahl an Bakterien mit intakter Zellwand.

Eine weitere Bestätigung der rasch einsetzenden Wirkung von Micos8 lieferten die Ergebnisse des SYTOX Green Assays. Hier kommt es schon in der ersten Minute bis zum ersten Messpunkt zu einem starken Anstieg des Fluoreszenzsignal. Dies ist als eine mit einem pH Umschlag einhergehende Auflösung der Membranintegrität zu interpretieren. Zu den weiteren Messzeiten sieht man lediglich einen leichteren Anstieg des Signals. Das heißt, der stärkste Effekt von Micos8 wird bereits in den ersten Minuten gemessen.

4.2 Wirkmechanismus von Micos8

Bereits im Radial Diffusion Assays konnte gezeigt werden, dass Micos8 einen stark antimikrobiellen Effekt gegen ein breites Spektrum an Bakterien entfaltet. Verglichen mit der Aktivität des AMPs Nisin, welches als Kontrolle mitgeführt wurde, zeigte das Peptid Micos8 einen deutlich stärkeren Effekt. Der Mechanismus, dem dieser antibakterielle Effekt zugrunde liegt, wurde deshalb in weiteren Versuchen untersucht.

Einer der gängigsten Wirkmechanismen von AMPs ist die Zerstörung der Zellmembran. Diese kann mit der Technik des SYTOX Green Assay untersucht werden. SYTOX Green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der freie Nukleinsäuren bindet, jedoch Membranen nicht überwinden kann. Die Auflösung der Membranintegrität erlaubt es dem Farbstoff, in die Zelle zu gelangen und dort an die Nukleinsäuren zu binden. Damit ist die Änderung der Fluoreszenz immer mit der Beschädigung der Zellmembran verknüpft. Damit ist die Verwendung dieses Assays besonders geeignet, wenn die Wirkung, wie bei Micos8, durch die Zerstörung der Zellmembran vermutet wird. Der Sytox Green Assay bestätigt eine dosisabhängige

Wirkung von Micos8 bis zu einer Konzentration von 5µg ml^{-1}. In dieser Hinsicht verhält sich Micos8 ähnlich wie die aus *N. versicolor* abgeleiteten Peptide (Nv-p1, Nv-p2, Nv-p3), B2M oder Angicin [20, 43, 54].

Gegen die getesteten Stämme *E. coli* 1286 und VRE zeigte Micos8, wie schon in anderen Experimenten, eine konzentrationsabhängige antibakterielle Aktivität. Gegen VRE erreicht Micos8 in der höchsten gemessenen Konzentration ein stärkeres Signal als die mit Ethanol behandelten Bakterien. Somit konnte ein stark membranzerstörender Effekt des Peptids gezeigt werden. Damit ergibt sich aus den verschieden experimentellen Ansätzen ein einheitliches Bild. Micos8 hat ein breites Wirkspektrum gegen sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien. Diese Eigenschaft ist zu betonen, da sich diese Zelltypen im Aufbau der Zellwand stark unterscheiden.

Um das Ergebnis des SYTOX Green Assay weiter abzusichern, wurden Experimente mit dem pHluorin Assay durchgeführt. Das für das fluoreszierende Protein pHluorin kodierende Plasmid ist ein weiteres Werkzeug, um die membranangreifende Wirkung von AMPs zu untersuchen [9].

Die Ergebnisse bestätigten die bisherigen Messdaten. Gegen alle hier getesteten Bakterienstämme zeigte Micos8 eine dosisabhängige Veränderung des intrazellulären pH-Gradienten. Dies ist ein Indikator für die Auflösung der Membranintegrität und somit dem Absterben der Bakterien. Bei allen Bakterienstämmen erreichte die Fluoreszenz bei den höchsten getesteten Micos8 Konzentrationen ähnliche Werte wie Nisin. (100 µg ml^{-1}). Gegen *S. agalactiae* 1229 und *E. faecalis* erzielte das Peptid einen signifikanten membranzerstörenden Effekt ab einer Konzentration von 50 µg ml^{-1}. Gegen *S. mutans* und *L. monocytogenes* wurde diese Eigenschaft schon bei einer Konzentration von 25 µg ml^{-1} erreicht. Lediglich die Messwerte der *S. pyogenes*- Stämme resultierten in insgesamt niedrigeren Fluoreszenzsignalen. Hier ergab sich eine signifikante Reduktion des Signals erst bei der maximal getesteten Konzentration von 200 µg ml^{-1}. Möglicherweise bildet der hier getestete Stamm eine Protease, die zur Wirkabschwächung des Peptids führt. Ein Hinweis aber kein Beweis sind vorangegangene Experimente unter dem Einfluss der Zugabe von Proteinase K auf die antimikrobielle Aktivität von Micos8. So ist beschrieben, dass *S. pyogenes* eine

extrazelluläre Protease bildet, welche das AMP LL-37 spaltet und so zum antimikrobiellen Funktionsverlust führt [5].

Eine weitere hier untersuchte Spezies aus der Gattung der Streptokokken ist *S. agalactiae*. Er ist ein wichtiger humanpathogener Erreger und wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit dem SYTOX Green Assay evaluiert. Diese Messmethode aber setzt voraus, dass die zu untersuchende Stämme das Plasmid pNZ-pHin2^{Lm} tragen und das darauf kodierte Protein auch exprimieren. Deshalb wurden im Zuge dieser Arbeit neue *S. agalactiae*- Stämme mit diesem Plasmid transformiert, um die Ergebnisse des bereits getesteten *S. agalactiae* - Stammes zu präzisieren. Zum Etablieren der experimentalen Bedingungen wie z.B. ein aussagekräftiger pH-Bereich wurde zuerst das Verhältnis der Emission von mit Nisin inkubierten und unbehandelten Bakterien unter verschiedenen pH- Bedingungen von pH 6,0 bis pH 9,0 gemessen. Optimale Bedingungen liegen bei der maximalen Differenz der Werte von unbehandelten und behandelten Bakterien vor. Dies war für den *S. agalactiae*- Stamm 1251 der pH 6,2 und für Stamm 1252 der pH von 6,0. Für die höheren pH- Werte glich sich das Signal immer weiter an, bis die Kurven sich bei einem Wert von ca. pH 8 kreuzten. Eine Messreihe bei höheren pH- Werten würde den geforderten experimentalen Bedingungen nicht entsprechen.

Im pHluorin Assay erreichten die neu transformierten *S. agalactiae*- Stämme 1251 und 1252 höhere Fluoreszenzsignale als der in den ersten Experimenten getestete *S. agalactiae*- Stamm 1229. Darüber hinaus erwiesen sie sich als sensitiver gegenüber Micos8 im Vergleich zum *S. agalactiae* 1229. Eine signifikante Reduktion des Fluoreszenzsignals durch Micos8 wurde gegen Stamm 1251 schon ab einer Konzentration von 12,5 µg ml^{-1} erreicht. Bei Stamm 1252 wurde eine signifikante Wirkung bei Peptid Konzentrationen über 25 µg ml^{-1} erreicht. Damit scheint der Stamm 1251 innerhalb der untersuchten Vertreter der Streptokokken gegenüber Micos8 am empfindlichsten zu reagieren.

Wie zuvor schon beschrieben haben antimikrobielle Peptide verschiedene Wirkmechanismen, um Bakterien zu töten. Für Micos8 deuteten alle experimentellen Ergebnisse auf einen die Zerstörung der Zellmembran beruhende Wirkweise hin. Diese Membranzerstörung kann mittels Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. In den TEM-Bilder von VRE nach Behandlung mit Micos8 ist die Destruktion bakterieller Zellen deutlich zu sehen. Somit stehen die

Ergebnisse der TEM-Untersuchungen im Einklang mit den Daten der Sytox und pHluorin Messungen.

Die Zerstörung der Membran durch AMPs kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Alle führen in der Konsequenz zur Porenbildung und zur teilweisen oder vollständigen Lyse der Membran. In der Literatur sind hierfür verschiedene Modelle beschrieben wie z.B. das „carpet“, „barrel-stave“ und das „toroidal-pore“ Modell [7, 21, 53].

Gram-negative Bakterien besitzen als Oberflächenstruktur Lipopolysaccharide, welche als sogenannte PAMPS (pathogen associated molecular patterns) vom angeborenen Immunsystem erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen [8]. Jedoch kann eine überschießende Immunreaktion durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zu chronischer Entzündung und zum schweren Krankheitsbild der Sepsis führen [28]. Es ist bekannt, dass manche kationische AMPs den negativen Effekt von LPS auf die Immunreaktion neutralisieren, indem sie freies LPS binden und so die Zytokin Freisetzung inhibieren [46]. Zum Beispiel ist bekannt, dass das humane Beta-Defensin und LL-37 in Gegenwart von LPS eine abgeschwächte Wirkung gegen *E. coli* und *S. aureus* [24] haben. Da die Zusammensetzung der Oberflächenstrukturen bakterienspezifisch ist, wurde beispielhaft die Interaktion von LPS mit Micos8 getestet [57]. Auch für Micos8 konnte eine Interaktion mit LPS aus *E. coli* und *P. aeruginosa* gezeigt werden. Eine Präinkubation mit LPS verringerte den antimikrobiellen Effekt von Micos8 konzentrationsabhängig, weil weniger freies Micos8 vorhanden ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das Peptid durch eine Interaktion mit Membranbestandteilen Gram-negativer Bakterien seine antimikrobielle Aktivität ausübt. Jedoch wurde nicht weiter untersucht, ob diese Interaktion allein verantwortlich für das Auflösen der Membranintegrität ist und welchem Mechanismus die Wirkung gegen Gram-positive Stämme unterliegt. Um die Wirkweise bei Gram-positiven Bakterien weiter zu spezifizieren, müssen andere Membranbestandteile Gram-positiver sowie Gram-negativer Bakterien getestet werden, wie z.B. Phosphatidylethanolamine (Bestandteil sowohl der inneren als auch der äußeren Membran), Lipoteichonsäure, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin (Bestandteile der inneren Membran).

5 Zusammenfassung

Aus der zunehmenden Entwicklung von Antibiotikaresistenzen verschiedener pathogener Bakterienstämme ergibt sich die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen. Eine Wirkstoffklasse, die hier einen wichtigen Beitrag leisten können, sind die antimikrobiellen Peptide (AMPs). AMPs finden sich häufig als körpereigene Peptide und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Bei der Suche nach geeigneten Kandidaten helfen computergestützte Programme, welche anhand der Struktur eines Proteins eine mögliche antimikrobielle Aktivität voraussagen. Dadurch wird eine Vorauswahl getroffen. Ob die identifizierten Peptide tatsächlich antibakteriell wirken, muss in daran anschließenden Experimenten charakterisiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die antimikrobielle Aktivität eines mithilfe eines Computerprogramms konstruierten Peptids (Micos8) experimentell zu analysieren.

Micos8 zeigt eine antimikrobielle Aktivität sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien. Auch für multiresistente Bakterienstämme wie die Vancomycin resistente Enterokokken, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa* konnte die antibakterielle Aktivität bestätigt werden. Schon sehr geringe Konzentrationen des Peptids führten zu einer Zelllyse. Neben dem breiten Wirkspektrum zeigte Micos8 eine stabile Wirksamkeit unter verschiedenen pH- Bedingungen sowie hohen Temperaturen bis 95°C. Zusätzlich konnte der Wirkmechanismus des Peptids weiter aufgeklärt werden. Micos8 interagiert mit Lipopolysacchariden und greift die Bakterienmembran an. Die antimikrobielle Wirkung des Peptids beruht vornehmlich auf der Auflösung der Membranintegrität. Visuell bestätigten dies die Bilder der Transmissionselektronenmikroskopie.

Micos8 zeigt eine potente Wirkung gegen ein breites Wirkspektrum verschiedener humanpathogener Bakterien inklusive vieler multiresistenter bakterieller Erreger. Es bedarf aber weiterführender Experimente, um eine mögliche Eignung für den Einsatz am Menschen abzuklären.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahmed TAE, Hammami R (2019) Recent insights into structure-function relationships of antimicrobial peptides. J Food Biochem 43:e12546. doi: 10.1111/jfbc.12546

2. Andersen OS (1984) Gramicidin Channels. Annu Rev Physiol 46:531–548. doi: 10.1146/annurev.ph.46.030184.002531

3. Baindara P, Mandal SM (2022) Plant-Derived Antimicrobial Peptides: Novel Preservatives for the Food Industry. Foods 11:2415. doi: 10.3390/foods11162415

4. Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y (2021) Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. IJMS 22:11691. doi: 10.3390/ijms222111691

5. Biswas D, Ambalavanan P, Ravins M, Anand A, Sharma A, Lim KXZ, Tan RYM, Lim HY, Sol A, Bachrach G, Angeli V, Hanski E (2021) LL-37-mediated activation of host receptors is critical for defense against group A streptococcal infection. Cell Reports 34:108766. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108766

6. Boparai JK, Sharma PK (2020) Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. Protein Pept Lett 27:4–16. doi: 10.2174/0929866526666190822165812

7. Ciumac D, Gong H, Hu X, Lu JR (2019) Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. Journal of Colloid and Interface Science 537:163–185. doi: 10.1016/j.jcis.2018.10.103

8. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. Nature 420:885–891. doi: 10.1038/nature01326

9. Crauwels P, Schäfer L, Weixler D, Bar NS, Diep DB, Riedel CU, Seibold GM (2018) Intracellular pHluorin as Sensor for Easy Assessment of Bacteriocin-Induced Membrane-Damage in Listeria monocytogenes. Front Microbiol 9:3038. doi: 10.3389/fmicb.2018.03038

10. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ (2020) Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev 33:e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19

11. Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1758:1499–1512. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.07.007

12. Fernandez DI, Le Brun AP, Whitwell TC, Sani M-A, James M, Separovic F (2012) The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. Phys Chem Chem Phys 14:15739. doi: 10.1039/c2cp43099a

13. Fleming A (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc R Soc Lond B 93:306–317. doi: 10.1098/rspb.1922.0023

14. Gazit E, Boman A, Boman HG, Shai Y (1995) Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. Biochemistry 34:11479–11488. doi: 10.1021/bi00036a021

15. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H (2016) Pharmakologie und Toxikologie, 2., vollständig überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart

16. Hallock KJ, Lee D-K, Omnaas J, Mosberg HI, Ramamoorthy A (2002) Membrane Composition Determines Pardaxin's Mechanism of Lipid Bilayer Disruption. Biophysical Journal 83:1004–1013. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75226-0

17. Henderson JM, Waring AJ, Separovic F, Lee KYC (2016) Antimicrobial Peptides Share a Common Interaction Driven by Membrane Line Tension Reduction. Biophysical Journal 111:2176–2189. doi: 10.1016/j.bpj.2016.10.003

18. Ho S, Pothoulakis C, Koon HW (2013) Antimicrobial peptides and colitis. Curr Pharm Des 19:40–47. doi: 10.2174/13816128130108

19. Hof H, Schlüter D, Dörries R (2019) Medizinische Mikrobiologie, 7th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

20. Holch A, Bauer R, Olari L-R, Rodriguez AA, Ständker L, Preising N, Karacan M, Wiese S, Walther P, Ruiz-Blanco YB, Sanchez-Garcia E, Schumann C, Münch J, Spellerberg B (2020) Respiratory ß-2-Microglobulin exerts pH dependent antimicrobial activity. Virulence 11:1402–1414. doi: 10.1080/21505594.2020.1831367

21. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H (2020) Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Front Microbiol 11:582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779

22. Khadka NK, Aryal CM, Pan J (2018) Lipopolysaccharide-Dependent Membrane Permeation and Lipid Clustering Caused by Cyclic Lipopeptide Colistin. ACS Omega 3:17828–17834. doi: 10.1021/acsomega.8b02260

23. Koehbach J, Craik DJ (2019) The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. Trends in Pharmacological Sciences 40:517–528. doi: 10.1016/j.tips.2019.04.012

24. Krishnakumari V, Binny TM, Adicherla H, Nagaraj R (2020) *Escherichia coli* Lipopolysaccharide Modulates Biological Activities of Human-β-Defensin Analogues but Not Non-Ribosomally Synthesized Peptides. ACS Omega 5:6366–6375. doi: 10.1021/acsomega.9b03770

25. Kushnirov VV, Dergalev AA, Alexandrov AI (2020) Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. Prion 14:11–19. doi: 10.1080/19336896.2019.1704612

26. Laschtschenko P (1909) Uber die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß. Zeitschr f Hygiene 64:419–427. doi: 10.1007/BF02216170

27. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J (2020) Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. Science 368:eaau5480. doi: 10.1126/science.aau5480

28. Lee S-H, Jun H-K, Lee H-R, Chung C-P, Choi B-K (2010) Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. International Journal of Antimicrobial Agents 35:138–145. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.09.024

29. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSSL, Jackson R, Eisenhauer P (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. Journal of Immunological Methods 137:167–173. doi: 10.1016/0022-1759(91)90021-7

30. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA (1996) The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spätzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults. Cell 86:973–983. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80172-5

31. Li Q, Cebrián R, Montalbán-López M, Ren H, Wu W, Kuipers OP (2021) Outer-membrane-acting peptides and lipid II-targeting antibiotics cooperatively kill Gram-negative pathogens. Commun Biol 4:31. doi: 10.1038/s42003-020-01511-1

32. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schäberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millett WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature 517:455–459. doi: 10.1038/nature14098

33. López-García B, Lee PHA, Yamasaki K, Gallo RL (2005) Anti-Fungal Activity of Cathelicidins and their Potential Role in Candida albicans Skin Infection. Journal of Investigative Dermatology 125:108–115. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23713.x

34. Luo Y, Song Y (2021) Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. Int J Mol Sci 22:11401. doi: 10.3390/ijms222111401

35. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, Giulianotti MA, Apidianakis Y, Bradfute S, Ferguson AL, Cherkasov A, Seleem MN, Pinilla C, De La Fuente-Nunez C, Lazaridis T, Dai T, Houghten RA, Hancock REW, Tegos GP (2020) The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. The Lancet Infectious Diseases 20:e216–e230. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3

36. Mahon MJ (2011) pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green florescent protein. ABB 02:132–137. doi: 10.4236/abb.2011.23021

37. Malik E, Dennison S, Harris F, Phoenix D (2016) pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. Pharmaceuticals 9:67. doi: 10.3390/ph9040067

38. McDonald M, Mannion M, Pike D, Lewis K, Flynn A, Brannan AM, Browne MJ, Jackman D, Madera L, Power Coombs MR, Hoskin DW, Rise ML, Booth V (2015) Structure-function relationships in histidine-rich antimicrobial peptides from Atlantic cod. Biochim Biophys Acta 1848:1451–1461. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.03.030

39. Mohanram H, Bhattacharjya S (2014) Cysteine deleted protegrin-1 (CDP-1): Anti-bacterial activity, outer-membrane disruption and selectivity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1840:3006–3016. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.06.018

40. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Kashef Hamadani BH, Kumaran EAP, McManigal B, Achalapong S, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Babin F-X, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Berkley JA, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalheiro C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Clotaire Donatien R, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, De Luca M, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Duong Bich T, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garcia C, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Hsia Y, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Jenney AWJ, Khorana M, Khusuwan S, Kissoon N, Kobeissi E,

Kostyanev T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Lim K, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Manoharan A, Marks F, May J, Mayxay M, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Musila LA, Mussi-Pinhata MM, Naidu RN, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Ochoa TJ, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Ounchanum P, Pak GD, Paredes JL, Peleg AY, Perrone C, Phe T, Phommasone K, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Rattanavong S, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rosenthal VD, Rudd KE, Russell N, Sader HS, Saengchan W, Schnall J, Scott JAG, Seekaew S, Sharland M, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Simpson AJ, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Tigoi C, Turner C, Turner P, Van Doorn HR, Velaphi S, Vongpradith A, Vongsouvath M, Vu H, Walsh T, Walson JL, Waner S, Wangrangsimakul T, Wannapinij P, Wozniak T, Young Sharma TEMW, Yu KC, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet 399:629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0

41. Reich SJ, Stohr J, Goldbeck O, Fendrich B, Crauwels P, Riedel CU (2022) Improved fluorescent *Listeria* spp. biosensors for analysis of antimicrobials by flow cytometry. MicrobiologyOpen 11. doi: 10.1002/mbo3.1304

42. Ricci ML, Manganelli R, Berneri C, Orefici G, Pozzi G (1994) Electrotransformation of *Streptococcus agalactiae* with plasmid DNA. FEMS Microbiology Letters 119:47–52. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06865.x

43. Rodriguez A, Martell-Huguet EM, González-García M, Alpízar-Pedraza D, Alba A, Vazquez AA, Grieshober M, Spellerberg B, Stenger S, Münch J, Kissmann A-K, Rosenau F, Wessjohann LA, Wiese S, Ständker L, Otero-Gonzalez AJ (2023) Identification and Characterization of Three New Antimicrobial Peptides from the Marine Mollusk Nerita versicolor (Gmelin, 1791). Int J Mol Sci 24:3852. doi: 10.3390/ijms24043852

44. Rodziewicz-Motowidło S, Mickiewicz B, Greber K, Sikorska E, Szultka Ł, Kamysz E, Kamysz W (2010) Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide: Conformational studies of protegrin-1 analogues. FEBS Journal 277:1010–1022. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07544.x

45. Rončević T, Puizina J, Tossi A (2019) Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? IJMS 20:5713. doi: 10.3390/ijms20225713

46. Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y (2006) Endotoxin (Lipopolysaccharide) Neutralization by Innate Immunity Host-Defense Peptides. Journal of Biological Chemistry 281:1636–1643. doi: 10.1074/jbc.M504327200

47. Ruiz-Blanco YB, Agüero-Chapin G, Romero-Molina S, Antunes A, Olari L-R, Spellerberg B, Münch J, Sanchez-Garcia E (2022) ABP-Finder: A Tool to Identify Antibacterial Peptides and the Gram-Staining Type of Targeted Bacteria. Antibiotics 11:1708. doi: 10.3390/antibiotics11121708

48. Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J, Buchner J, Schaller M, Stange EF, Wehkamp J (2011) Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β-defensin 1. Nature 469:419–423. doi: 10.1038/nature09674

49. Scott MG, Vreugdenhil ACE, Buurman WA, Hancock REW, Gold MR (2000) Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. The Journal of Immunology 164:549–553. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.549

50. Sengupta D, Leontiadou H, Mark AE, Marrink S-J (2008) Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778:2308–2317. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.06.007

51. Sinha S, Zheng L, Mu Y, Ng WJ, Bhattacharjya S (2017) Structure and Interactions of A Host Defense Antimicrobial Peptide Thanatin in Lipopolysaccharide Micelles Reveal Mechanism of Bacterial Cell Agglutination. Sci Rep 7:17795. doi: 10.1038/s41598-017-18102-6

52. Toke O (2005) Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. Biopolymers 80:717–735. doi: 10.1002/bip.20286

53. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML (2020) Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. Molecules 25:2850. doi: 10.3390/molecules25122850

54. Vogel V, Bauer R, Mauerer S, Schiffelholz N, Haupt C, Seibold GM, Fändrich M, Walther P, Spellerberg B (2021) Angicin, a novel bacteriocin of Streptococcus anginosus. Sci Rep 11:24377. doi: 10.1038/s41598-021-03797-5

55. Wang G (2010) Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA

56. Wang L, Qiu L, Zhou Z, Song L (2013) Research progress on the mollusc immunity in China. Dev Comp Immunol 39:2–10. doi: 10.1016/j.dci.2012.06.014

57. Wilkinson SG (1996) Bacterial lipopolysaccharides—Themes and variations. Progress in Lipid Research 35:283–343. doi: 10.1016/S0163-7827(96)00004-5

58. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW (2001) Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. Biophysical Journal 81:1475–1485. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75802-X

59. Yi H-Y, Chowdhury M, Huang Y-D, Yu X-Q (2014) Insect antimicrobial peptides and their applications. Appl Microbiol Biotechnol 98:5807–5822. doi: 10.1007/s00253-014-5792-6

60. Yoneyama F, Imura Y, Ohno K, Zendo T, Nakayama J, Matsuzaki K, Sonomoto K (2009) Peptide-Lipid Huge Toroidal Pore, a New Antimicrobial Mechanism Mediated by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. Antimicrob Agents Chemother 53:3211–3217. doi: 10.1128/AAC.00209-09

61. (2024) WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024 Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. World Health Organization, Geneva

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Barbara Spellerberg danken, dass Sie mir die Möglichkeit gab Ihrer Arbeitsgruppe im Zuge meiner Promotion beizutreten und darüber hinaus für Ihre Anleitung und Beratung. Die Tür zu Prof. Dr. Spellerbergs Büro war offen wann immer Fragen und Probleme bezüglich meiner Arbeit aufkamen.

Besonderer Dank geht an Dr. Verena Vogel für ihre herausragende Anleitung und wissenschaftlichen Input für den experimentellen Teil meiner Arbeit. Bei allen kleineren und größeren Schwierigkeiten konnte ich mich an sie wenden.

Auch möchte ich Stefanie Mauerer, Dorina Haider und Ulrike Simnacher für die positive Arbeitsatmosphäre im Labor und in den Mittagspausen bedanken.

Zuletzt möchte ich mich zutiefst bei meiner Familie bedanken, die mich über den Prozess der Recherche, Forschung und während des Schreibens dieser Arbeit durchweg unterstützt und ermutigt haben.

Lebenslauf

Sophia Weizenegger

1998