

**Die molekulare Wirkung des humanen β -
Defensins hBD3 auf *Staphylococcus*
*aureus***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Vera Saß

aus

Heidelberg

Bonn 2008

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. H.-G. Sahl

2. Referentin: Prof. Dr. C. Dahl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Material und Methoden | 16 |
| 2.1 | Chemikaliennachweis | 16 |
| 2.2 | Bakterienstämme und Plasmide | 17 |
| 2.3 | Kulturbedingungen | 17 |
| 2.4 | Nährmedien | 18 |
| 2.5 | Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) | 18 |
| 2.6 | Abtötungskinetiken..... | 19 |
| 2.7 | Bestimmung des Membranpotentials..... | 19 |
| 2.8 | Quantitative Bestimmung des Proteingehaltes | 20 |
| 2.9 | Efflux von radioaktiv-markiertem [³ H]-L-Glutamat | 20 |
| 2.10 | Einbau von radioaktiv-markierten Metaboliten | 21 |
| 2.11 | Antagonisierung der Wirkung von hBD3 durch mögliche Zielmoleküle | 21 |
| 2.12 | Inhibierung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II <i>in vitro</i> | 22 |
| 2.13 | Dünnschichtchromatographie | 22 |
| 2.14 | Akkumulation der Zellwandvorstufe UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid | 22 |
| 2.15 | Reversed-Phase Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)..... | 23 |
| 2.16 | Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) | 23 |
| 2.17 | Reinigung der PCR-Produkte | 24 |
| 2.18 | Agarosegelelektrophorese | 24 |
| 2.19 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 24 |
| 2.20 | Isolierung von genomischer DNA aus <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 |
| 2.21 | Präparation von Plasmid-DNA | 24 |
| 2.22 | Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren | 25 |
| 2.23 | Restriktionsverdau und Ligation..... | 25 |
| 2.24 | DNA-Sequenzierung..... | 25 |
| 2.25 | Transformationen von Bakterienzellen..... | 25 |
| 2.25.1 | Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen | 25 |
| 2.25.2 | Elektroporation von <i>Escherichia coli</i> | 26 |
| 2.25.3 | Herstellung elektrokompetenter <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220-Zellen..... | 26 |
| 2.25.4 | Elektroporation von <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220..... | 26 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.25.5 | Herstellung von <i>Staphylococcus carnosus</i> -Protoplasten..... | 26 |
| 2.25.6 | Protoplastentransformation..... | 27 |
| 2.25.7 | Phagentransduktion..... | 27 |
| 2.26 | Insertionsinaktivierung des chromosomalen Gens <i>vraE</i> in <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 durch doppelt homologe Rekombination | 29 |
| 2.27 | Transkriptionsanalyse mittels DNA-Microarrays | 30 |
| 2.27.1 | Zellzucht für Transkriptionsanalyse..... | 30 |
| 2.27.2 | RNA-Präparation | 30 |
| 2.27.3 | cDNA-Synthese und Aufreinigung..... | 30 |
| 2.27.4 | Hybridisierung, Waschen und Scannen von Microarrays | 31 |
| 2.27.5 | Statistische Auswertung von Microarrays..... | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 33 |
| 3.1 | Minimale Hemmkonzentration von hBD3 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 | 33 |
| 3.2 | Physiologische Untersuchungen zur Wirkungsweise von hBD3 auf <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 | 33 |
| 3.2.1 | Abtötungskinetik hBD3-behandelter <i>Staphylococcus aureus</i> -Zellen..... | 33 |
| 3.2.2 | Einfluss von hBD3 auf das Membranpotential..... | 34 |
| 3.2.3 | Einfluss von hBD3 auf den Efflux von Glutamat..... | 35 |
| 3.2.4 | Einfluss von hBD3 auf die Biosynthese von Makromolekülen | 36 |
| 3.3 | Transkriptionsanalyse hBD3-behandelter <i>Staphylococcus aureus</i>-Zellen..... | 38 |
| 3.3.1 | Bestimmung einer subinhibitorischen Peptidkonzentration | 38 |
| 3.3.2 | Transkriptionelle Antwort auf Defensin-Stress | 39 |
| 3.4 | Untersuchung einer <i>vraE</i> Knock-out Mutante..... | 46 |
| 3.4.1 | Inaktivierung des ABC-Transporters <i>VraDE</i> | 46 |
| 3.4.2 | Minimale Hemmkonzentrationen gegen <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 Δ <i>vraE</i> | 51 |
| 3.5 | Einfluss von hBD3 auf die Zellwandbiosynthese..... | 52 |
| 3.5.1 | Akkumulation von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid in hBD3-behandelten Zellen | 53 |
| 3.5.2 | Antagonisierung der Wirkung von hBD3 durch gereinigte Zellwand-Vorstufen | 54 |
| 3.5.3 | Einfluss von hBD3 auf die PBP2-Reaktion <i>in vitro</i> | 55 |
| 4 | Diskussion..... | 58 |
| 5 | Zusammenfassung/ Summary | 76 |

6 Literaturverzeichnis..... 80

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| ABC | ATP binding cassette |
| Amp | Ampicillin |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaar |
| BCA | Bicichoninsäure |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | copy DNA |
| CM | Chloramphenicol |
| CY3 | Casamino-Yeast-Softagar |
| Cy3 | Cyanin-3' |
| Cy5 | Cyanin-5' |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ermB | Erythromycin B |
| EM | Erythromycin |
| F | Farad |
| Fa. | Firma |
| GlucNAc | N-Acetylglucosamin |
| g | Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) |
| kb | Kilobasenpaar |
| KBE | Kolonien-bildende Einheit |
| l | Liter |
| mcs | multiple cloning site |
| MES | 2-Morpholinoethansulfonsäure |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| min | Minute |
| mRNA | messenger RNA |
| MRSA | Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Mur-NAc | N-Acetylmuraminsäure |
| Na | Natrium |

| | |
|-------------------|---|
| nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| Ω | Ohm |
| ORF | open reading frame, offener Leserahmen |
| PBP | Penicillinbindeprotein |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten-Reaktion) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SAM | Significance Analysis of Microarrays |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminoethan |
| TSB | Trypton-Soja-Bouillon |
| V | Volt |
| (v/v) | Volumenprozent |
| VISA | Vancomycin intermediär-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Vol | Volumen |
| VRSA | Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| vs | <i>versus</i> , im Vergleich zu |
| W | Watt |
| (w/v) | Gewichtsprozent |

Nukleotide und Aminosäuren wurden nach den IUPAC-Regeln abgekürzt.

1 Einleitung

Wirts-Abwehr-Peptide (Host Defense Peptides; HDPs)

Wirts-Abwehr-Peptide (englisch: Host Defense Peptides, **HDPs**) sind eine sehr ursprüngliche und wichtige Komponente der angeborenen Immunabwehr. HDPs werden in sämtlichen Lebewesen, von Bakterien über Pflanzen, Invertebraten- und Vertebraten-Spezies bis hin zum Menschen gefunden. Sie umfassen eine strukturell heterogene Gruppe von antimikrobiellen Peptiden (Zasloff, 2002), deren primäre Funktion das effektive Abtöten von in den Organismus eindringenden Pathogenen ist; es ist jedoch in den letzten Jahren zunehmend klar geworden, dass viele HDPs außerdem wichtige Funktionen als Immunmodulatoren haben, die teilweise sogar relevanter als ihre direkt antimikrobiellen Eigenschaften sein könnten (Hancock & Sahl, 2006). HDPs sind gencodiert und entstehen durch einen oder mehrere proteolytische Prozessierungsschritte aus Vorläufer-Peptiden. Folgende Eigenschaften zeichnen sie aus: Sie sind kurze Peptide, die aus 10-50 Aminosäuren bestehen, fast immer eine positive Nettoladung besitzen und einen substanziellen Anteil an hydrophoben Resten enthalten ($\geq 30\%$) (Hancock & Lehrer, 1998; Hancock & Sahl, 2006; Zasloff, 2002). Diese Eigenschaften ermöglichen es den Peptiden, eine amphiphile dreidimensionale Struktur anzunehmen, so dass sich auf der Oberfläche sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche bilden. Lineare Peptide, wie zum Beispiel das aus Fröschen isolierte Magainin (Zasloff, 1987), nehmen diese Konformation nur dann ein, wenn sie mit mikrobiellen Membranen in Kontakt treten; hierbei formen sie eine α -helikale Sekundärstruktur. Generell zeigen HDPs mikrobizide Wirkung gegen Bakterien, Pilze, einige Parasiten und Viren. In multizellulären Organismen können sie systemisch (z.B. in Insekten-Hämolymphe oder in Immunzellen von Vertebraten) oder lokal in spezifischen Zell- oder Gewebetypen (z.B. in Epithelien) exprimiert werden. Bis zum Jahre 2004 sind fast 900 Einträge eukaryotischer HDPs in einer eigens erschaffenen Datenbank annotiert worden (Tossi, 2002). Diese können basierend auf ihren strukturellen Eigenschaften, ihrer Aminosäuresequenz und der Anzahl an Disulfidbrückenbindungen in fünf Gruppen unterteilt werden (s. Tabelle 1.1): Die erste Gruppe erfasst lineare, α -helikale Peptide, die keine Cysteinreste enthalten, wie z.B. das humane Peptid LL-37, das zu der Gruppe der Cathelicidine gehört. Die HDPs der zweiten Gruppe besitzen ausgeweitete α -Helices, die reich an Prolin, Glycin, Tryptophan, Arginin und/oder Histidin sind. Ein Beispiel für diese Gruppe ist das Indolicidin, das in Rindern gebildet wird. Die dritte Gruppe zeichnet sich durch eine Ringstruktur im Molekül aus, die eine Disulfidbrückenbindung enthält. Als Beispiele sind hier das Brevinin und das Bactenesin zu nennen. Die vierte Gruppe ist durch rigide, antiparallele β -Faltblattstrukturen charakterisiert, die durch zwei bis vier Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden.

Tabelle 1.1. Klassifikation von eukaryotischen HDPs gemäß ihrer strukturellen Eigenschaften (verändert nach Schneider et al., 2005).

| Strukturelle Eigenschaften | Beispiele | Spezies |
|---|--|---|
| Amphiphile α -helikale Peptide | LL-37 CAP18 Magainin | Menschen Kaninchen Frösche |
| Verlängerte α -helikale Strukturen, reich an Glycin, Prolin, Tryptophan, Arginin und/oder Histidin | Drosocin Bac-7 Indolicidin | Insekten Huftiere Rinder |
| Ringstruktur mit einer Disulfidbrücke | Brevinin Bactenesin | Frösche Rinder |
| β -Faltblatt-Struktur mit zwei bis vier Disulfidbrücken | α -Defensine β -Defensine Plectasin Protegrine | Menschen, Ratten, Kaninchen Pilze Menschen, Rinder, Mäuse, Schweine |
| Zyklische, dimere Peptide | θ -Defensine Demidefensin-1 | Affen |

Hierzu gehören z.B. die α - und β -Defensine sowie die Protegrine. Die fünfte strukturelle Gruppe bilden die zyklischen θ -Defensine, die komplex durch posttranslationale Zyklisierung von zwei kurzen, α -Defensin-ähnlichen Peptiden modifiziert werden (Tang et al., 1999). Von diesen Peptiden sind bislang erst wenige Vertreter identifiziert worden. Des Weiteren gibt es auch Peptide, die sich in keine der genannten Gruppen einteilen lassen. Abbildung 1.1 zeigt die Strukturen einiger Peptide.

Auch Bakterien selber produzieren antimikrobielle Peptide, die teilweise kationische Eigenschaften besitzen. Diese sogenannten Bacteriocine können bakterielle Konkurrenten abtöten, ohne ihrem Produzenten Schaden zuzufügen; dieser schützt sich durch ABC-Transporter und/oder durch spezifische Immunitätspeptide vor der Wirkung des Peptids (Reis et al., 1994; Saris et al., 1996). Viele Bacteriocine aus Gram-positiven Bakterien werden posttranslational modifiziert, bevor sie aus den Zellen transportiert werden (Hechard & Sahl, 2002; Pag & Sahl, 2002). Die Peptide sind strukturell sehr flexibel und bilden amphiphile Strukturen erst dann aus, wenn sie mit bakteriellen Membranen in Kontakt kommen, ähnlich wie oben für die α -helikalen HDPs beschrieben; allerdings gilt dies auch für solche Bacteriocine die eine oder zwei Disulfidbrückenbindungen enthalten.

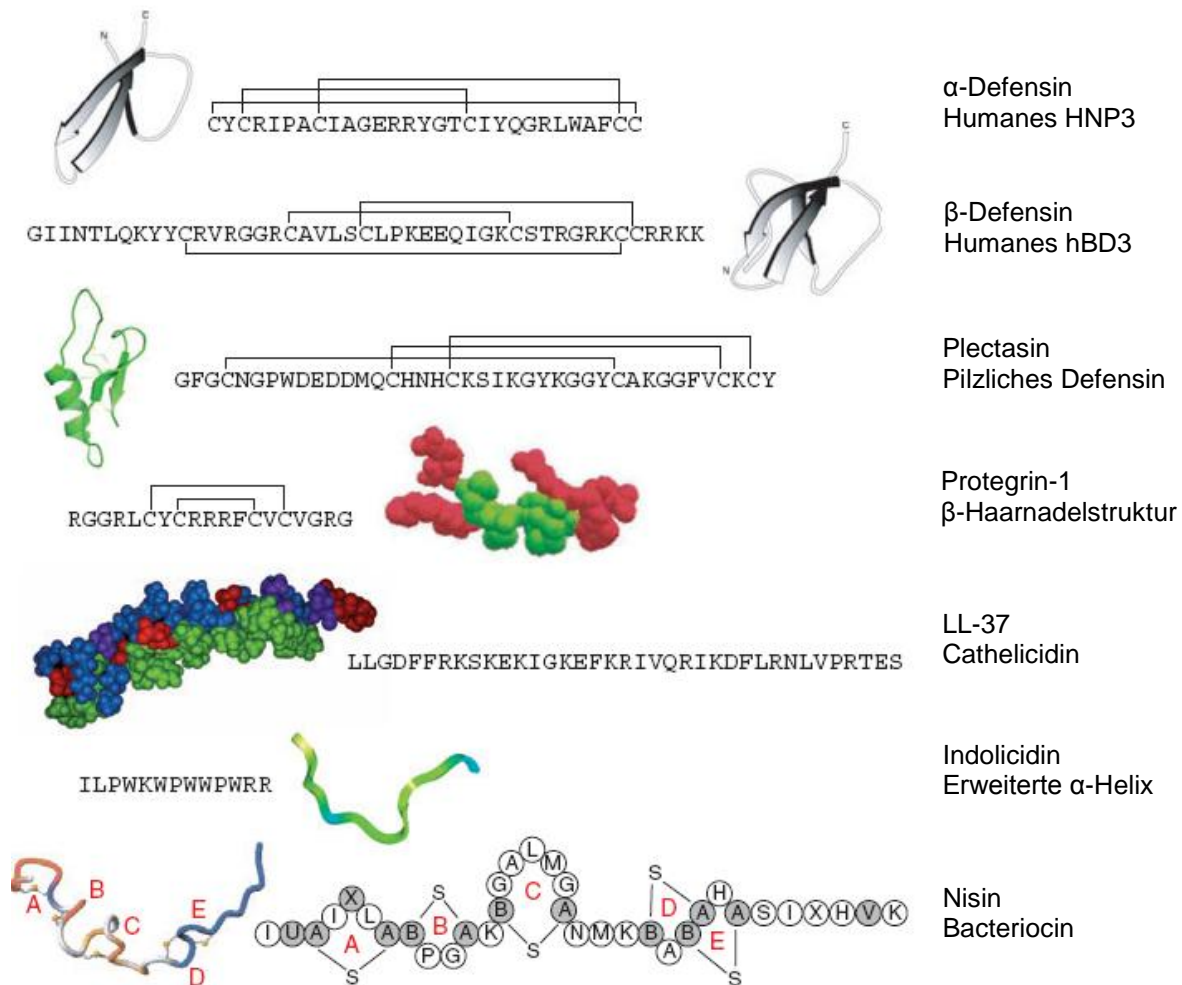


Abbildung 1.1. Strukturen und Sequenzen von ausgewählten Wirts-Abwehr-Peptiden (HDPs) und einem Bacteriocin. Verändert nach Hancock & Sahl (2006).

Kürzlich haben Yount & Yeaman (2004) durch bioinformatische Untersuchungen eine strukturelle und funktionelle Kongruenz zwischen diesen Bacteriocinen und solchen HDPs gefunden, die Disulfidbrücken besitzen: ein hochkonserviertes γ -Kern-Motiv (s. Abbildung 1.2). Dieses Motiv ist eine dreidimensionale Struktur, die sich aus der bidirektionellen Orientierung von spezifischen Aminosäuresignaturen bildet. Das γ -Kern-Motiv kann aus ganz unterschiedlichen Primärstrukturen entstehen und ist nicht nur in HDPs wie den Defensinen, sondern auch in manchen Polypeptid-Toxinen, Kinocidinen (mikrobizide Chemokine) und Thioninen (pflanzliche, cytotoxische Peptide) zu finden, die sich offensichtlich von den bakteriellen Peptiden ableiten und die sich im Laufe der Evolution auf verschiedene Funktionen spezialisiert haben (Yeaman & Yount 2007). Zum Einen haben sich also aus dem gemeinsamen prokaryotischen Vorläufer solche Peptide gebildet, deren Funktion das Abtöten ist, zum Anderen aber auch solche, die Erkennungs- bzw. Signalfunktionen haben. Polypeptide, die vorher als distinkt in Form und Funktion galten, sind demnach Mitglieder

einer evolutionär sehr alten Familie von Wirts-Abwehr-Effektoren, deren Ursprung bei den Prokaryoten selbst liegt.

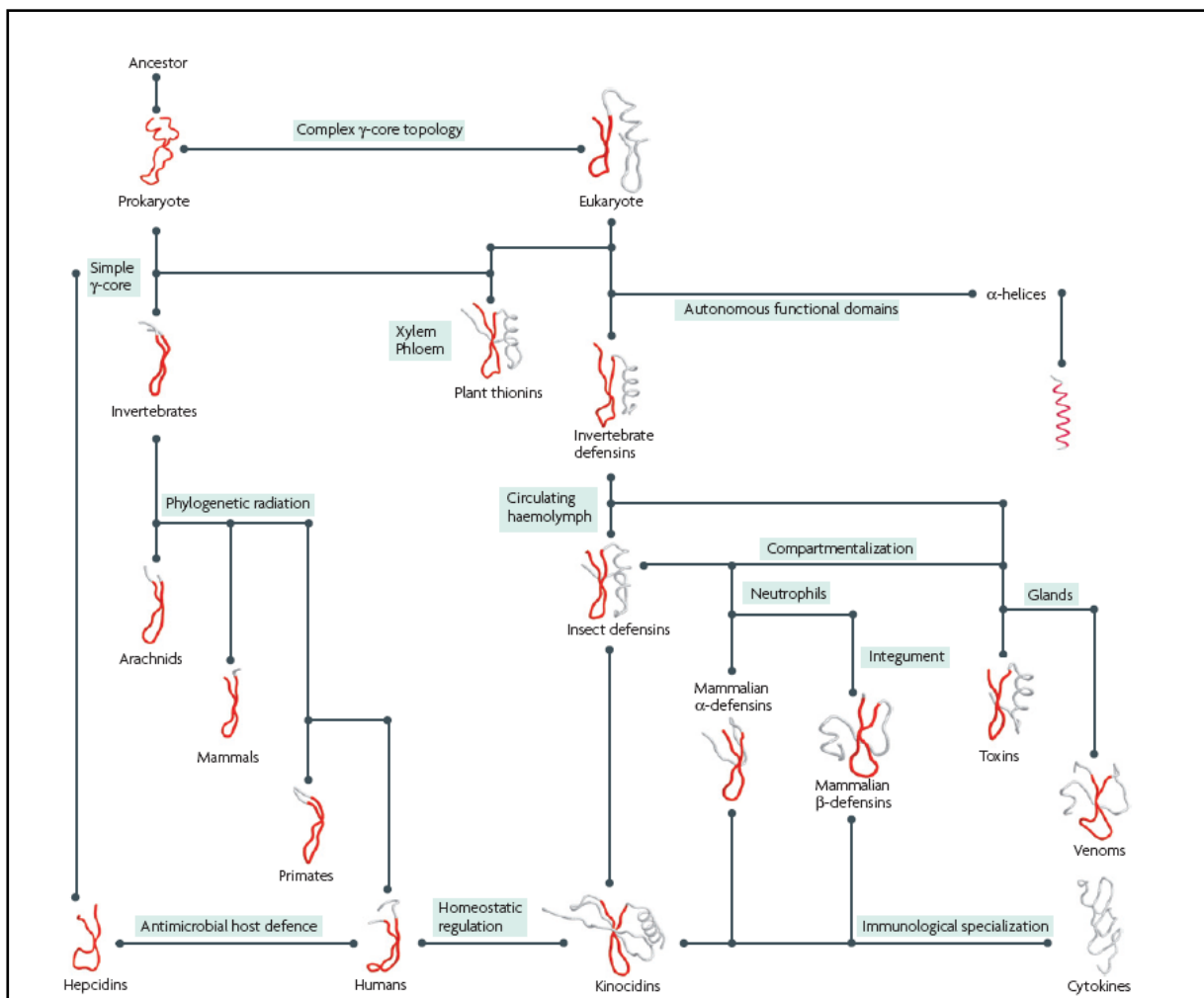


Abbildung 1.2. Die Hypothese der gemeinsamen Herkunft von γ -Kern-enthaltenden HDPs. In diesem Modell entstanden archetypische Vorläufermoleküle in frühen prokaryotischen und eukaryotischen Spezies. Die phylogenetische Diversifikation verstärkt die Gewebespezialisierung und die damit einhergehenden Vorteile für die Immunabwehr. Bis heute können die multidimensionalen Kern-Motive der frühesten prokaryotischen Lebensformen in den hochentwickelten Eukaryoten gefunden werden (Yeaman & Yount, 2007).

Wirkungsweise der Wirts-Abwehr-Peptide (HDPs)

Aufgrund ihrer positiven Nettoladung und ihrer amphiphilen Tertiärstruktur wurde postuliert, dass kationische HDPs mit negativ geladenen bakteriellen Oberflächen und Membranen interagieren und diese zerstören. Dies wurde meist anhand von Modellmembranen und Liposomen untersucht (Fujii et al., 1993; Hristova et al., 1996; Kagan et al., 1990; Matsuzaki et al., 1995; Wimley et al., 1994; Ruhr & Sahl, 1985; Sahl, 1985). Es entstanden mehrere kontroverse Modelle über die Art der Wechselwirkungen zwischen Peptid und Modellmembran. Das „Teppich-Modell“ (Pouny et al., 1992) besagt, dass sich die kationischen

Bereiche der amphiphilen Peptide durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den anionischen Phospholipiden der bakteriellen Membranen an diese anlagern und dabei wie einen Teppich („carpet“) bedecken. Bei einer ausreichend hohen Peptidkonzentration wird dann das Phospholipid-Bilayer durch Bildung von Mizellen und undefinierten Poren zerstört (s. Abbildung 1.3).

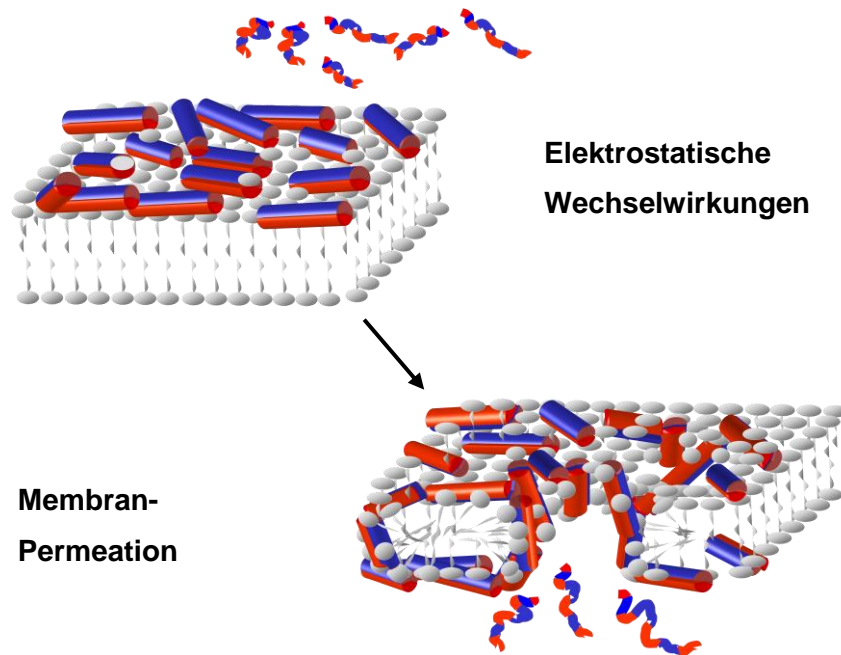


Abbildung 1.3. „Teppich-Modell“ („carpet model“) für die membranzerstörende Wirkung von kationischen, amphiphilen antimikrobiellen Peptiden. Danach lagern sich die Peptide großflächig wie ein Teppich an die negativen Kopfgruppen der Bakterienmembran an und führen zu deren Zerstörung durch Bildung von Mizellen und unspezifischen Poren.

Zwei weitere Theorien beruhen auf der Bildung von fassartigen („barrel-stave“) (Ehrenstein & Lecar, 1977; Yang et al., 2001) oder ringartigen („toroidal“) (Matsuzaki et al., 1996) Poren, die durch die Anlagerung und das Eindringen der Peptide in die Membranen entstehen. Artificielle Membranen, die für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen HDPs und Membranen benutzt wurden und die wichtige Erkenntnisse über die Interaktionen der Peptide mit Membranen geliefert haben, spiegeln jedoch in keinsten Weise die komplexe Situation an und in einer Bakterienmembran und -zellwand wider; sie sind deshalb für die Erforschung der Abtötungsmechanismen nur von begrenzter Aussagekraft. In mikrobiellen Membranen finden komplexe Biosynthese- und Abbau-Prozesse in Raum und Zeit koordiniert statt, die in solchen Modellsystemen vernachlässigt werden. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass die Wirkungsweise der HDPs differenzierter betrachtet werden muss und dass vielfältige, komplexe Eingriffe in die funktionelle Organisation der Cytoplasmamembran in das Abtöten von Mikroben involviert sind (Brogden, 2005; Friedrich et al., 2000; Harder et al., 2001; Koo et al., 2001; Sahl et al., 2005; Vylkova et al., 2007; Xiong et al., 2005); dabei

bleibt unbestritten, dass die bakterielle Membran sicherlich für die meisten Peptide den wesentlichen Wirkungsort darstellt. Für einige HDPs wurden auch intrazelluläre Angriffsorte identifiziert; beispielsweise binden Tachyplesin und Buforin II an DNA, andere HDPs inhibieren die RNA- oder Proteinbiosynthese (Brogden, 2005). Ein eindrucksvolles Beispiel für die Komplexität der Wirkungsmechanismen von amphipathischen Peptiden ist das kationische Lantibiotikum Nisin, das zu der Gruppe der Bacteriocine (bakterielle HDPs) gehört und von *Lactococcus lactis* produziert wird. Lantibiotika wirken nur gegen Gram-positive Bakterien, da sie die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien nicht zu durchdringen vermögen (Kordel & Sahl, 1986). Sie enthalten die seltenen Thioether-Aminosäuren Lanthionin und Methyllanthionin, die posttranslational entstehen. Die Thioether haben die gleiche stabilisierende Funktion wie die Disulfidbrücken in anderen HDPs (z.B. in Defensinen), sind aber chemisch stabiler. Zunächst wurde für den Wirkungsmechanismus von Nisin und anderen Lantibiotika ein Modell postuliert, in dem man von einer fassartigen (Ruhr & Sahl, 1985; Sahl, 1991), später von einer keilförmigen Porenbildung ausging (Driessen et al., 1995). Es konnte dann jedoch für Nisin gezeigt werden, dass es ganz spezifisch die membrangebundene Peptidoglykanvorstufe Lipid II bindet und als Ankermolekül benutzt, um an die bakterielle Membran zu gelangen und anschließend spezifische Poren zu bilden (Breukink et al., 1999; Brötz et al., 1998; Wiedemann et al., 2001). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Nisin sekundär die Autolyse verschiedener Staphylokokkenstämme induziert, indem das kationische Molekül mit den polyanionischen Teichonsäuren in Wechselwirkung tritt (Bierbaum & Sahl, 1985; Bierbaum & Sahl, 1987). Dies führt zum Abbau der Zellwand, der vor allem im Bereich der Septen zwischen zwei Tochterzellen stattfindet (Bierbaum & Sahl, 1991). Nisin besitzt also multiple Wirkungsmechanismen. Ähnlich komplexe Mechanismen sind inzwischen für andere antimikrobielle Substanzen gezeigt worden. Mit einem einfachen Teppich- oder Porenbildungsmodell lassen sich solche molekularen Effekte jedoch nicht adäquat beschreiben.

Bis heute zeigen die evolutionär „alten“ HDPs eine akzeptable Wirksamkeit gegen Mikroorganismen, d.h. sie sind nicht durch die Selektion von Hochresistenzmechanismen wirkungslos geworden. Trotzdem haben Bakterien, die zur Flora von höheren Wirtsorganismen gehören, gewisse Resistenzmechanismen gegen kationische HDPs entwickelt. HDPs müssen die vielschichtige bakterielle Zellhülle durchdringen, um an die Cytoplasmamembran zu gelangen. Daher spielen die Permeabilität, die Dicke und die physikochemischen Eigenschaften der bakteriellen Zellhülle eine wichtige Rolle für die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber HDPs. Durch verschiedene Modifikationen der Zellhülle können Bakterien sich gegen HDPs schützen. Die wohl am besten untersuchten Anpassungen von Bakterien an HDP-Stress sind die kovalente D-Alanylierung der negativ geladenen Teichonsäuren in Gram-positiven Bakterien sowie die kovalente Einführung von Lysin in die an-

ionischen Phosphatidylglycerol-Fettsäuren der bakteriellen Cytoplasmamembran (Peschel & Collins, 2001; Peschel et al., 1999; Staubitz et al., 2004; Staubitz & Peschel, 2002; Weidenmaier et al., 2005). Teichonsäuren bestehen aus alternierenden Phosphat- und Glycerol oder Ribitol-Gruppen, die mit D-Alanin oder N-Acetylglucosamingruppen substituiert sind. Die Teichonsäuren sind entweder in der Cytoplasmamembran (Lipoteichonsäuren) oder im Peptidoglykannetz (Zellwandteichonsäuren) verankert und besitzen polyanionische Eigenschaften. Durch einen hohen Alanylierungsgrad kann die negative Nettoladung der Teichonsäuren reduziert werden und so zu deren geringerer Affinität gegenüber positiv geladenen Molekülen wie den HDPs führen. Analog dazu bewirkt die Einführung von positiv geladenen L-Lysinmolekülen in die anionischen Phosphatidylglycerol-Fettsäuren der Cytoplasmamembran eine Reduktion der negativen Ladungen auf der Oberfläche, die damit ebenfalls eine geringere Affinität zu kationischen Substanzen hat. Andere Resistenzmechanismen beruhen auf der Bildung von Proteasen, der Modifikation von Lipid A in Gram-negativen Bakterien und auf Effluxpumpen, die die Peptide von den Membranen wegpumpen können. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die bisher beschriebenen Resistenzmechanismen. All diese Mechanismen führen jedoch nicht zu einer vollständigen Resistenz gegenüber HDPs.

Tabelle 1.2. Bakterielle Resistenzmechanismen gegen kationische HDPs. Verändert nach Peschel (2002).

| Resistenzmechanismus und beteiligte Gene | Spezies | Peptide, bei denen dieser Mechanismus einen Effekt hat (Beispiele) |
|---|--|--|
| Einfügen von D-Alanin in Teichonsäuren <i>dltABCD</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | α -Defensin HNP1-3 (Mensch) Protegrine (Schwein) α -helikales Magainin II (Frosch) |
| Modifikation von Phosphatidylglycerol mit L-Lysin <i>mprF</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | α -Defensin HNP1-3 (Mensch) Protegrine Indolicidin (Rind) |
| Erhöhte Lipid A-Acylierung <i>phoPQ, pagP</i> | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium | LL-37 (Mensch) CRAMP (Maus) Protegrin PG1 (Schwein) |
| Lipid A-Modifikation mit Aminoarabinose <i>pmrAB, pmrE, pmrHFIJKL</i> | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium <i>Proteus mirabilis</i> | Lipopeptid Polymyxin B (Bakterien) Protegrin IB-367 (synthetisch) |
| Protease in der äußeren Membran <i>pgtE</i> | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium <i>Escherichia coli</i> | LL-37 (Mensch) CRAMP (Maus) α -helikales Protamin (Lachs) |
| Effluxpumpe <i>mtrCDE</i> | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | LL-37 (Mensch) Protegrin PG1 (Schwein) Tachiplesin TP1 (Krabbe) |
| Effluxpumpe <i>quacA</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | Thrombocidin tPMP1 (Kaninchen) |

Dies hat mehrere Gründe. Zum Einen exprimieren die meisten mehrzelligen Organismen neben einer Reihe weiterer antimikrobieller Proteine wie z.B dem Lysozym und der RNase 7

eine Mischung aus HDPs der unterschiedlichen strukturellen Klassen, um ein Gewebe optimal gegen eindringende Pathogene zu schützen. Diese Peptide haben dort dann ein überlappendes Wirkungsspektrum und zwar sowohl auf der antimikrobiellen, als auch auf der immunmodulatorischen Ebene. Des Weiteren könnte das Fehlen von Hochresistenzen durch erhöhte Fitness-Kosten erklärt werden, die durch die Entwicklung und die Expression der Gene entstehen, die für die Resistenzentwicklung nötig sind. Außerdem kann die bakterielle Membran nur in eingeschränktem Maße modifiziert werden, da sie ein strukturell extrem wichtiger Bestandteil der Zelle ist. Eine zusätzliche Erklärung für das Fehlen von hochresistenten Bakterien könnte die spezifische Regulierung der HDPs sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch durch enzymatische Prozessierung und Sekretion liefern. All diese Gründe tragen vermutlich dazu bei, dass die kationischen HDPs über Jahrmillionen ihre antimikrobielle Wirksamkeit behalten konnten.

Immunmodulatorische Funktionen von Wirts-Abwehr-Peptiden (HDPs)

Humane HDPs werden in den verschiedenen Geweben des Körpers in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert. α -Defensine sind besonders in den Granulozyten von Neutrophilen (HNP 1-4) und Panethzellen des Dünndarms (HNP 5-6), wo sie in das Darmlumen sekretiert werden können, reichlich vorhanden. β -Defensine werden dagegen hauptsächlich in den Epithelien mehrerer Organe wie der Atemwege, des Darmes und der Haut gebildet (Froy, 2005). LL-37, das einzige humane Cathelicidin, wird ebenfalls in Epithelien (Keratinocyten) und außerdem in Leukozyten produziert (Sayama et al., 2005). Teilweise werden die HDPs in diesen Geweben konstitutiv exprimiert (z.B. humanes β -Defensin 1), teilweise sind sie nach Stimulation durch Kontakt der Zellen mit Pathogenen induzierbar (z.B. humanes β -Defensin 2 und 3). Das LL-37 und die Defensine sind die wichtigsten HDPs der Immunabwehr des Menschen.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die einzige Rolle von HDPs in der angeborenen Immunabwehr die direkte Abwehr von Infektionen durch das Abtöten von eindringenden Mikroorganismen sei. Seit einigen Jahren mehren sich jedoch die Befunde, dass diese Peptide diverse und komplexe Rollen in der Immunantwort spielen (Bowdish et al., 2005a; Bowdish et al., 2005b; Brown & Hancock, 2006; Hancock & Diamond, 2000; Hancock & Sahl, 2006; Hoffmann et al., 1999; Jenssen et al., 2006; Mookherjee et al., 2006; Niyonsaba et al., 2005; Rosenfeld et al., 2006; Selsted & Ouellette, 2005). Ihre Funktionen sind in höheren Tieren nicht nur auf die angeborene Immunabwehr beschränkt, sondern sie wirken auch auf das adaptive Immunsystem ein. Am Besten untersucht sind die Funktionen der humanen HDPs, auf deren immunmodulatorische Effekte hier eingegangen werden soll. Die angeborene Immunabwehr wird durch konservierte bakterielle Signalmoleküle (wie zum

Beispiel dem bakteriellen Lipopolysaccharid) eingeleitet, die von wirtseigenen Struktur-Erkennungs-Rezeptoren wie den Toll-like Rezeptoren (TLRs) gebunden werden. Diese lösen anschließend Effektormechanismen wie die Freisetzung von Cytokinen sowie die Expression von humanen HDPs aus. Im Gegenzug können humane HDPs zelluläre Funktionen wie Chemotaxis, Gentranskription und Cytokinproduktion sowohl auslösen, als auch komplementieren oder verhindern. Solche Effekte führen dann zur Elimination der Bakterien. Des Weiteren haben diese Peptide neben dieser antimikrobiellen Aktivität weitere Funktionen, wie die Unterdrückung der Bakterien-induzierten Cytokinproduktion, die Stimulierung der Wundheilung und Angiogenese.

Im Rahmen einer **Immunaktivierung** werden HDPs am Ort der Infektion oder der Verletzung sekretiert und haben dort eine chemotaktische Wirkung auf Effektorzellen (Neutrophile, Mastzellen und Monozyten). Sie induzieren außerdem die Transkription und Sekretion von Chemokinen und Histaminen (aus Mastzellen) und beeinflussen die Transkription von vielen Genen in Monozyten, Epithel- und anderen Zellen. Zusammen bewirken diese Aktionen die Rekrutierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, die für die zellulären und humoralen Reaktionen auf Pathogene benötigt werden. So sind zum Beispiel α -Defensine und die β -Defensine hBD2, -3 und -4 chemotaktisch wirksam für Monozyten, T-Zellen und unreife Dendrozyten; LL-37 induziert die Freisetzung von IL-8, was wiederum die Chemotaxis von Neutrophilen stimuliert und zu einer Freisetzung von noch höheren LL-37 Konzentrationen führt. Ein weiteres Beispiel ist die Induktion der Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren IL-18, IL-20 und IL-8, die an Hautkrankheiten wie der Pioriasis beteiligt sind, durch β -Defensine und LL-37 in Keratinocyten (Niyonsaba et al., 2005). Viele weitere immunstimulatorische Funktionen sind bekannt, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden kann.

Neben diesen Funktionen, die proinflammatorische Wirkungen haben, zeigen HDPs aber auch wichtige **entzündungshemmende Eigenschaften**, mit denen sie den Wirt gegen überschießende Immunreaktionen und damit potentiell tödliche Effekte schützen. Vor allem eine Entzündungsreaktion durch exzessive TLR-Induzierung kann gefährliche Effekte haben, die durch HDPs unterdrückt werden können. Cathelicidine hemmen beispielsweise die Transkription von Genen, die für proinflammatorische Cytokine kodieren (wie TNF- α und IL-6) und die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, die von LPS oder anderen bakteriellen Faktoren induziert wurden; weiterhin können sie eine Sepsis im Tierversuch verhindern. Rosenfeld et al. (2006) konnten des Weiteren zeigen, dass bestimmte HDPs Lipopolysaccharid (LPS) durch Bindung neutralisieren und so die Sekretion proinflammatorischer Cytokine verhindern können. Auch bestimmte sekretierte Toxine können

von α -Defensinen neutralisiert werden (Kim & Kaufmann, 2006), was den Wirt gegen zerstörerische Komponenten der Entzündungsreaktion schützt.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Cathelicidine und Defensine auch an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr eine Rolle spielen, beispielsweise durch Modulierung von Dendrozyten-Funktionen und von Antigen-spezifischen Immunantworten sowie durch die Induktion von Immunzellmigration und Reifung (Davidson et al., 2004; Yang et al., 2004).

Einige Bakterien haben jedoch Mechanismen entwickelt, um das angeborene Immunsystem zu umgehen. So kann *Staphylococcus aureus* kleine Proteine ausscheiden, die an essentielle Elemente des menschlichen Immunsystems, wie zum Beispiel HDPs und Komponenten des Komplementsystems binden und deren Funktion somit inhibieren können (Rooijackers et al., 2005). Andere Strategien der Immunevasion beinhalten zum Beispiel eine Mikroben-induzierte Aufnahme der Bakterienzelle in die Wirtszelle (intrazelluläre Lebensweise), die „Flucht“ vor dem Phagosom oder die Verhinderung der Opsonisierung der Bakterienzelle (Hornef et al., 2002).

Humanes β -Defensin 3

Die Defensine umfassen eine charakteristische Gruppe von kationischen HDPs. Es gibt in Säugetieren drei Gruppen von Defensinen, die α -, β - und θ -Defensine, die sich aufgrund ihres Cystein-Verbrückungsmusters unterscheiden (s. Abbildung 1.4; Lehrer & Ganz, 1999; Lehrer & Ganz, 2002; Pazgier et al., 2006; Raj & Dentino, 2002; Schibli et al., 2002; Schneider et al., 2005; Schröder & Harder, 2006).

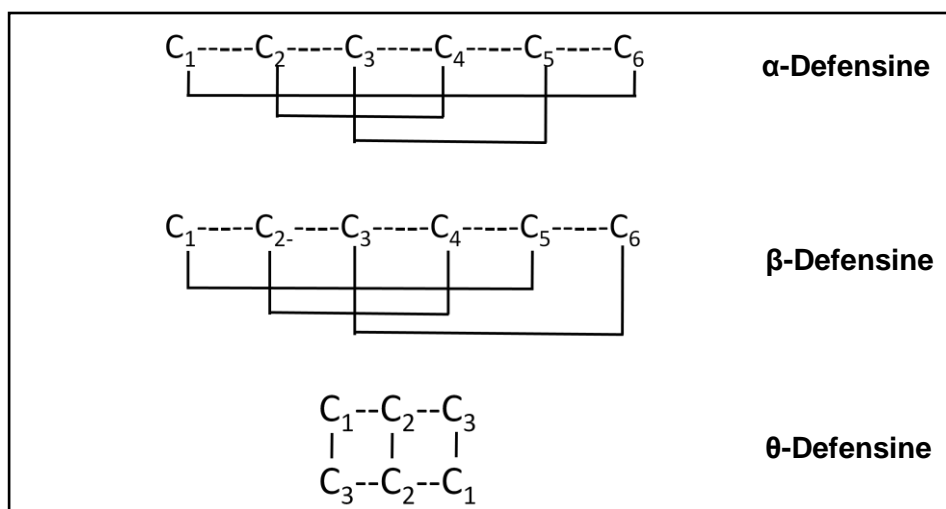


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des Verbrückungsmusters der charakteristischen Cysteinreste in α -, β - und θ -Defensinen von Säugetieren.

Hier soll speziell auf die β -Defensine eingegangen werden, die 1993 als eigene Gruppe entdeckt wurden (Selsted et al., 1993). β -Defensine falten sich selbständig in ihre dreidimensionale Struktur, die aus drei antiparallelen β -Faltblättern und einer N-terminalen α -Helix besteht. Des Weiteren besitzen sie sechs hochkonservierte Cysteinreste, die drei charakteristische Disulfidbrückenbindungen ausbilden. Es gibt zahlreiche β -Defensine, die in Vögeln und Säugetieren exprimiert werden. Aufgrund von Genom- und Homologieanalysen wurden bis heute 33 Gene für humane β -Defensine identifiziert (siehe Defensin-Datenbank <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>), wobei viele von diesen nicht als Protein nachgewiesen werden konnten und zum Teil Pseudogene sind, bei denen mRNA detektiert wurde, die aber nicht für ein funktionales Protein codieren. Gut charakterisiert sind bisher vier humane β -Defensine (hBD1-4) (Schneider et al., 2005). Hierzu gehört auch das humane β -Defensin 3 (hBD3), das 2001 zeitgleich von drei Arbeitsgruppen entdeckt wurde (Garcia et al., 2001; Harder et al., 2001; Jia et al., 2001) und auf Chromosom 8 lokalisiert ist. Es besteht aus 45 Aminosäuren und ist mit einer Netto-Ladung von +11 das am stärksten kationische Defensin. Abbildung 1.5 zeigt die dreidimensionale Struktur eines hBD3-Moleküls. hBD3 liegt in Lösung als Dimer vor und zeigt bei physiologischen Salzbedingungen im mikromolaren Konzentrationsbereich eine gute antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative und –im Gegensatz zu den α -Defensinen und hBD1 und 2- gegen Gram-positive Bakterien, darunter auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*- (MRSA) und Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium*-Stämme (Harder et al., 2001).

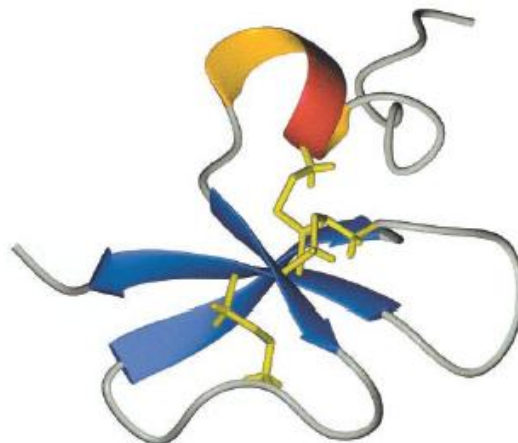


Abbildung 1.5. Dreidimensionale Struktur des humanen β -Defensins 3 (aus Schibli et al., 2002).

Des Weiteren hat hBD3 Aktivität gegenüber Pilzen wie *Candida albicans* und einigen Viren wie HIV1 (Leikina et al., 2005; Quinones-Mateu et al., 2003). Im Gegensatz zu anderen antimikrobiellen Peptiden zeigt hBD3 unter physiologischen Bedingungen keine hämolytische

Aktivität in eukaryotischen Zellen (Harder et al., 2001). Über die molekularen Mechanismen der Wirkungsweise von hBD3 ist bisher kaum etwas bekannt. Harder et al. (2001) beobachteten bei der Erstbeschreibung in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von hBD3-behandelten *Staphylococcus aureus*-Zellen Zeichen einer Perforierung der Zellwand, Ausstülpungen der Plasmamembran und nachfolgende Zellyse, ähnlich wie es bei Penicillin-behandelten Zellen beobachtet wurde (s. Abbildung 1.6); weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus blieben jedoch aus. In einer anderen Studie wurde die Wirkung von hBD3 auf Modellmembranen untersucht und festgestellt, dass das Peptid in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung von Membranen unterschiedlich gut mit diesen interagiert (Bohling et al., 2006).

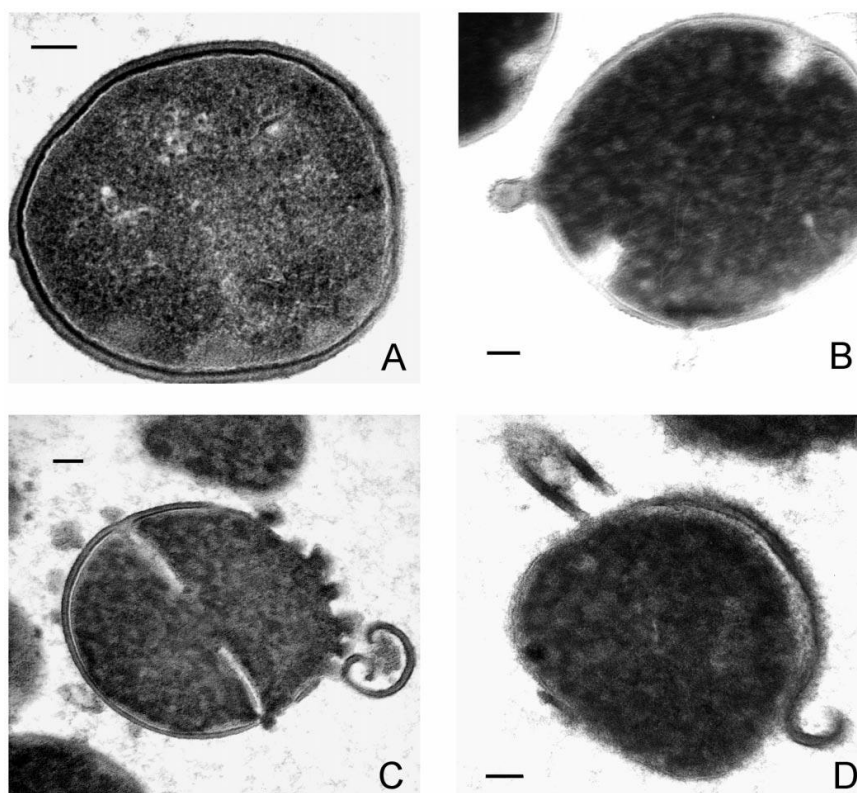


Abbildung 1.6. Morphologie hBD3-behandelter *S. aureus*-Zellen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten (A) oder von 30 min (B) oder 2 h (C und D) mit hBD3 behandelten *S. aureus* Zellen (aus Harder et al., 2001). Die Striche repräsentieren 0,1 μm .

Die Konformation, die hBD3 in Modellmembranen einnimmt, wurde von Morgera et al. (2008) kürzlich studiert. hBD3 scheint hier als kationische β -Faltblatt-Fläche mit Membranen zu interagieren, wobei dann eine amphiphile Helix in die Lipiddoppelschicht inseriert. Über die Art der Interaktionen mit Bakterienzellen auf molekularer Ebene geben diese Studien jedoch keinen Aufschluss.

***Staphylococcus aureus* und hBD3**

S. aureus ist ein vielseitiges Pathogen, das verschiedene schwere Krankheiten hervorrufen kann. Ein Hauptreservoir im Menschen sind die vorderen Nasenhöhlen, wo *S. aureus* 20% der gesunden Bevölkerung permanent, 60% vorübergehend und 20% nie kolonisiert. In solchen Habitaten ist *S. aureus* vielen HDPs, wie Defensinen und LL-37 ausgesetzt (Cole et al., 2001). Hierbei spielt hBD3 eine wichtige Rolle, da es das einzige β -Defensin ist, das eine gute Wirksamkeit gegen *S. aureus* zeigt. Dennoch kommt es, wie oben beschrieben, relativ häufig zu einer Besiedlung der Nase. Momentan wird intensiv daran geforscht, welche Prädispositionen es für eine Besiedlung des Menschen gibt. Hier werden nicht nur bestimmte Eigenschaften des Wirtes eine Rolle spielen, sondern auch bestimmte Eigenschaften der Bakterien, die ihnen dann die Kolonisation des Wirtes ermöglichen. Wahrscheinlich handelt es sich um ein kompliziertes Zusammenspiel aus verschiedenen Faktoren, die dann letztendlich zu einer Kolonisation oder Infektion des Wirtes führen. Welche Rolle die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener *S. aureus*-Stämme gegenüber hBD3 und anderer HDPs dabei spielt, ist ebenfalls Gegenstand aktueller Untersuchungen. Ein Faktor für solche Unterschiede könnten Modifikationen der Zellhülle sein, wodurch das Defensin seinen Angriffsort unterschiedlich gut erreichen könnte. Auf elektronenmikroskopischen Bildern von Harder et al. (2001; s. Abbildung 1.6) scheint es, dass die Zellwand von *S. aureus* der Angriffsort des Peptids sein könnte. Dabei könnten verschiedenste Schritte der Zellwandbiosynthese inhibiert werden; hier soll daher ein kurzer Überblick über die in *S. aureus* beteiligten Reaktionen und Enzyme gegeben werden. Den Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand bildet in Gram-positiven Organismen das Zucker-Peptid-Polymer Peptidoglykan, das in bis zu 40 Schichten vorliegen kann (Schlegel, 1992). Eine Besonderheit des Peptidoglykanaufbaus in Staphylokokken ist die Ausbildung Glycin-reicher Interpeptidbrücken, die bei *S. aureus* aus fünf Glycinresten bestehen. Das Peptidoglykan ist über diese Interpeptidbrücken zu einem hohen Grad (bis zu 95 %) quervernetzt. Dagegen sind die Glykanstränge mit 15 Disaccharideinheiten pro Kette relativ kurz. Des Weiteren liegen in *S. aureus* 50% der Muraminsäurereste als 4-N, 6-O-Diacylderivate vor (Tipper et al., 1971), was zu einer Resistenz gegenüber der Muramidase Lysozym führt (Warren und Gray, 1965). Weitere Modifikationen des Peptidoglykans kommen in Form von kovalent an die Muraminsäurereste gebundenen Teichonsäuren vor, was bei etwa jedem 13. Muraminsäurerest der Fall ist (Götz et al., 2006). Die Zellwandbiosynthese kann in drei distinkte Phasen unterteilt werden: Erstens der Bildung der Vorläufermoleküle UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-N-Acetylmuraminsäure und UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid im Cytosol; zweitens der Transfer dieser Vorläufermoleküle an den Lipidcarrier Undecaprenylphosphat (C_{55} -P), wodurch ein Disaccharid-(Pentapeptid)-Pyrophosphatundecaprenol-Molekül, das Lipid II, entsteht; drittens der Transfer dieser kompletten Einheit durch die Cytoplasmamembran mit

anschließendem Einbau des Disaccharid-(Pentapeptid)-Pyrophosphats in die wachsende Peptidoglykankette. Der Mechanismus der Translokation durch die Membran ist bislang ungeklärt. Die Interpeptidbrückenbindungen sowie andere Modifikationen entstehen dann im neu-synthetisierten Peptidoglykan. Abbildung 1.7 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der membrangebundenen Reaktionen und der beteiligten Enzyme.

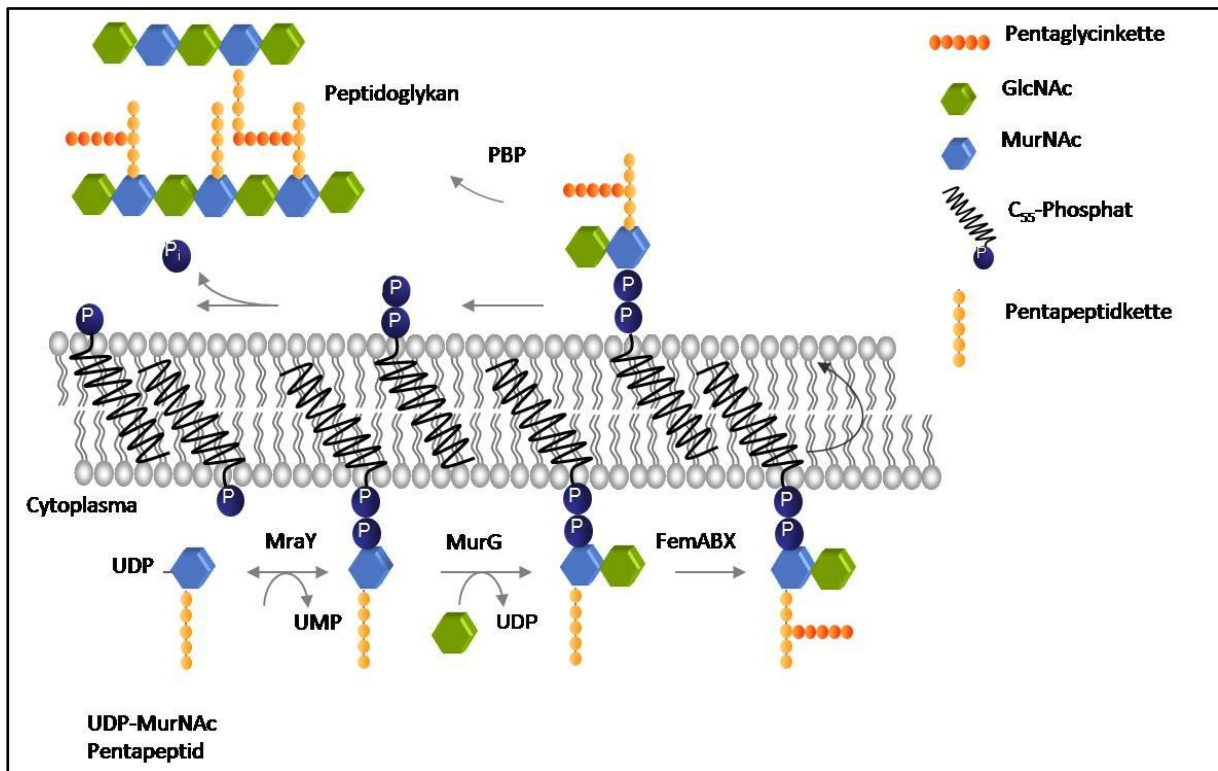


Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der membrangebundenen Zellwandbiosyntheseschritte in *S. aureus*. GlcNAc, N-Acetylglucosamin; MurNAc, N-Acetylmuraminsäure; PBP, Penicillinbindeprotein. (Abb. von Dr. T. Schneider).

Ziel dieser Arbeit

Über die molekularen Mechanismen der Wirkungsweise von β -Defensinen ist bislang kaum etwas bekannt. Für HDPs im Allgemeinen wird postuliert, dass sie Poren in bakteriellen Membranen bilden, die zu einem Ausströmen der zellulären Komponenten und damit zum Absterben der Bakterienzellen führen. Es fehlen jedoch molekulare Untersuchungen zu den Effekten der Peptide auf die bakterielle Zellhülle -hier wurde bislang fast nur mit Modellmembranen gearbeitet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein besseres Verständnis über die molekularen Mechanismen, die an der antimikrobiellen Aktivität des humanen β -Defensins 3 (hBD3) gegenüber Gram-positiven Bakterien beteiligt sind, zu erlangen. Es sollte geklärt werden, ob für hBD3 ein ähnlich komplizierter und spezifischer Wirkungsmechanismus wie der für Nisin beschriebene (siehe oben) gilt, oder ob hBD3 durch unspezifische elektrostatische Inter-

aktionen mit der Membran und/oder durch Porenbildung ein Absterben der Bakterienzellen auslöst. Zu dieser Fragestellung sollten sowohl physiologische als auch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikaliennachweis

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chemikalien, Enzyme und Materialien folgender Hersteller verwendet:

| | |
|--------------------------------|---|
| Amersham | Cyanin-3'-markierte dCTPs [1 mM], Cyanin-5'-markierte dCTPs [1 mM] |
| Baker | Wasser (HPLC-Grade) |
| Becton & Dickinson | Agar, Blutagar (Columbia, 5% Schafsblut), Trypton, Hefeextrakt, Penassy-Broth, Pepton |
| Bioline | Bioscript Reverse Transkriptase |
| Difco | BHI-Medium |
| Fermentas | Agarose Top Vision™ LE GQ, DNA-Molekulargewichtsstandards |
| Finnzymes | Phusion-Polymerase |
| Genmedics | Lysostaphin |
| Invitrogen | DTT [0,1 M], RNase-Out |
| Metabion | Primer |
| Molzym | DNA- und RNA-Isolations-Kits |
| Nunc Brand | 96 Vertiefungen enthaltende Mikrotiterplatten (Polypropylen) |
| Oxoid | Hefeextrakt, Trypton-Soja-Agar, Trypton-Soja-Bouillon |
| Peqlab | dNTPs, Taq-Polymerase |
| Pierce | BCA-Protein-Assay Reagenzien |
| Roche | Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase |
| Schleicher & Schüll | Cellulose-Acetat Filter, 0,2 µm |
| Scienion | Hybridisierungspuffer, <i>sciTRACER S. aureus</i> N315 Full Genome Microarrays |
| Sigma-Aldrich | Ethidiumbromid, Lysozym |
| Whatman | Glas-Mikrofaser Filter, 0,2 µm |

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 sind die Bakterienstämme und Plasmide aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.

| Bakterienstamm | Charakteristika | Literatur |
|--|---|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> K12 JM109 | <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, F', <i>traD36</i> , <i>proA+B+</i> , <i>lacIqZ</i> Δ M15 | (Yanisch-Perron et al., 1985) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 | Methicillin ^S | (Maidhof et al., 1991) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> RN4220 | Restriktase-negatives Derivat von <i>S. aureus</i> NCTC 8325 | (Kreiswirth et al., 1983) |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> TM300 | heterologer Wirtsstamm | (Schleifer & Fischer, 1982) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 pVS <i>vraE</i> -Ery-IN | einfach homolog rekombinierte Mutante von <i>S. a.</i> SG511; chromosomale Insertion des Plasmids pVS <i>vraE</i> -Ery | diese Arbeit |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 Δ <i>vraE</i> | doppelt homolog rekombinierte Mutante von <i>S. aureus</i> SG511 nach Desintegration des Plasmids pVS <i>vraE</i> -Ery | diese Arbeit |

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.

| Plasmid | Charakteristika | Literatur |
|----------------------|--|----------------------|
| pUC19-Ery | high copy plasmid, Amp ^R , pUC19 mit 1,1 kb <i>Sma</i> I/ <i>Eco</i> RI Fragment, das <i>ermB</i> (NCBI AF239772) enthält | (Sass et al., 2008) |
| pTV0mcs | low copy plasmid, mcs aus pUC18, temperatursensitiv, CM ^R | (Guder et al., 2002) |
| pVS <i>vraE</i> -I | pUC19-Ery mit <i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I Fragment <i>vraE</i> | diese Arbeit |
| pVS <i>vraE</i> -II | pVS <i>vraE</i> -I mit <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI Fragment aus <i>vraE</i> | diese Arbeit |
| pVS <i>vraE</i> -Ery | pTV0mcs mit <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI aus pVS <i>vraE</i> I | diese Arbeit |

2.3 Kulturbedingungen

S. aureus SG511 wurde alle zwei Wochen auf frische Blutagarplatten überimpft, für 18-24 h bei 37°C bebrütet und bei 4°C gelagert. Transformierte *E. coli*-, *S. carnosus*- und *S. aureus*-Stämme wurden alle zwei Wochen auf entsprechende Selektionsplatten überimpft (Luria-Bertani- oder Trypton-Soja-Agar mit 25 µg/ml Erythromycin, 20 µg/ml Chloramphenicol oder 40 µg/ml Ampicillin). Die Flüssigkultivierung erfolgte bei *S. aureus* SG511 und *S. aureus* SG511 Δ *vraE* in Luria-Bertani (LB)-Medium oder Trypton-Soja-Bouillon (TSB); bei allen anderen transformierten Stämmen wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Selektions-Antibiotikum zugesetzt. Die Zellen wurden über Nacht im Schüttler (Certomat U, Fa. Braun) bei 150 rpm und 37°C bebrütet. Von allen Stämmen wurden Glycerin-Dauerkulturen

angelegt und bei -70°C gelagert. Dafür wurden Zellen einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:1 mit sterilem Glycerin (100%) gemischt.

2.4 Nährmedien

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien zusammengestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Nährmedien.

| Medium | Zusammensetzung |
|-----------------------------|--|
| B-Bouillon (modifiziert) | 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l K_2HPO_4 , 1,8 g/l Glucose; pH 7,3 |
| Blutagar | 10 g/l Lab-Lemco Pulver; 10 g/l Pepton; 5 g/l NaCl ; 15 g/l Agar ; pH 7,0 ; Zugabe von 9% frischem, defibrinierten Hammelblut nach Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C |
| BM-Agar | 1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,1% (w/v) Glucose, 0,1% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) K_2HPO_4 , 1,2% (w/v) Agar; pH 7,4 |
| Casamino-Yeast-Weichagar | 23 ml CY3 (2,5% (w/v) Caseinhydrolysat; 2,5% (w/v) Hefeextrakt; 1,5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Agar); 23 ml 1 M Na-Succinat (pH 7,3); 4 ml "Mix" (0,75 M Na- β -Glycerolphosphat); 0,25 M MgCl_2 ; 6,25% (w/v) Glucose; 1,2% (w/v) Rinderserumalbumin); CY3 und Na-Succinat autoklavieren, "Mix" steril filtrieren |
| DM3-Regenerationsagar | 200 ml 5% (w/v) Agar; 500 ml 1 M Na-Succinat (pH 7,3 mit Bernsteinsäure einstellen); 100 ml 5% (w/v) Caseinhydrolysat; 60 ml 10% (w/v) Hefeextrakt; 100 ml 3,5% (w/v) K_2HPO_4 mit 1,5% KH_2PO_4 ; 10 ml 50% (w/v) Glucose; 20 ml 1 M MgCl_2 ; 10 ml 5% (w/v) Rinderserumalbumin |
| Luria-Bertani-Medium | 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; bei LB Agar zusätzlich 14 g/l Agar; pH 7,5 |
| Müller-Hinton-Medium | 3 g/l Fleischextrakt, 8,75 g/l Caseinhydrolysat, 0,75 g/l Stärke; bei Müller-HintonAgar zusätzlich 14 g/l Agar; pH 7,4 |
| SMMP-Medium | a: SMM Puffer (1 M Saccharose; 0,04 M Maleat; 0,04 M MgCl_2 ; pH 7,4) b: 7% (w/v) Penassy Broth c: 10% (w/v) Rinderserumalbumin SMMP75: 7,5 Volumen a + 2 Volumen b + 0,5 Volumen c SMMP55: 5,5 Volumen a + 4 Volumen b + 0,5 Volumen c |
| Trypton-Soja-Agar (TSA) | 15 g/l Trypton; 5 g/l Soja Pepton; 5 g/l NaCl; 15 g/l Agar; pH 7,3 |
| Trypton-Soja-Bouillon (TSB) | 17 g/l Caseinpepton; 3 g/l Sojabohnenmehl; 5 g/l NaCl; 2,5 g/l KH_2PO_4 ; 2,5 g/l Dextrose; pH 7,3 |

2.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Bei der minimalen Hemmkonzentration handelt es sich per Definition um die Konzentration einer antibiotisch wirksamen Substanz, bei der kein sichtbares Wachstum mehr zu beobachten ist. Die Bestimmung der MHK erfolgte in 96 Vertiefungen enthaltenden Polypropylen-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc Brand). Es wurden serielle 1:2-Verdünnungen der zu untersuchenden Peptide in Medium angelegt. Der Indikatorstamm wurde in gleichem

Medium bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 1 bebrütet und anschließend bis auf eine Zelldichte von $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. 100 μ l dieser Suspension wurden mit 100 μ l Peptidsuspension in jeder Vertiefung vermischt, die Platte dann für 10 min auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Titertek, Fa. Flow Laboratories) bei Stufe 5 durchmischt und für 24 h bei 37°C bebrütet.

2.6 Abtötungskinetiken

Um Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus einer antimikrobiellen Substanz zu ziehen, ist es hilfreich, eine Abtötungskinetik dieser Substanz zu erstellen. Hierfür wurde eine Bakterienkultur über Nacht in 50% Müller-Hinton-Medium angezogen, auf eine OD_{600} von 0,1 mit frischem Medium verdünnt und hBD3 zugegeben. Die hBD3-Konzentration entsprach der einfachen bzw. fünffachen MHK. Die Lebensfähigkeit der Bakterienkultur wurde anschließend über einen Zeitraum von 22 h beobachtet. 40 μ l-Aliquots wurden den Kulturen in definierten Zeitabständen entnommen, in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7) verdünnt und 100 μ l der Verdünnungen als Dreifachbestimmung auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert. Die ausplattierten Verdünnungsstufen richteten sich dabei nach der erwarteten Zellzahl. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37°C wurde die Anzahl der Kolonien-bildenden Einheiten (KBE) bestimmt.

Kaliumphosphatpuffer: Komponente A: 10 mM KH_2PO_4 ; Komponente B: 10 mM K_2HPO_4 – durch Zugabe von Komponente B zu A auf pH 7 einstellen.

2.7 Bestimmung des Membranpotentials

Um das Membranpotential von Bakterienzellen zu bestimmen, bedient man sich des lipophilen Kations Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+), das sich in Abhängigkeit von der Stärke des Membranpotentials ($\Delta\psi$) über der Membran verteilt und so eine indirekte Bestimmung dessen ermöglicht. Wird die bakterielle Membran durch Porenbildung zerstört, so fällt das Membranpotential durch einen Ladungsausgleich zwischen Cytoplasma und Umgebung ab.

Die Bakterienkultur wurde bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD_{600} von 1 in 50% Müller-Hinton-Medium inkubiert, abzentrifugiert und in einer 1:3 Verdünnung in frischem Medium resuspendiert. Um das Membranpotential zu verfolgen, wurde 1 μ Ci/mL [3 H]-Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+ ; 26 Ci/mMol) zugegeben und die Kultur in zwei Gefäße aufgeteilt. Ein Ansatz war die Kontrolle ohne Peptidbehandlung, dem anderen wurde hBD3 in einer Konzentration entsprechend der fünffachen MHK zugegeben. Über einen Zeitraum von 30 min wurden in bestimmten Abständen 100 μ l entnommen, durch Cellulose-Acetat Filter gefiltert (Porengröße 0,2 μ m; Fa. Schleicher & Schüll) und zweimal mit 5 ml Kaliumphosphatpuffer

(50 mM, pH 7) gewaschen. Die Filter wurden in Zählröhrchen gegeben und getrocknet. Anschließend wurden diese mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Filtersafe; Zinsser, Frankfurt) aufgefüllt und die Radioaktivität mittels eines β -Counters (Tri-Carb; 1900CA; Fa. Packard) gemessen. Die Gesamtradioaktivität des eingesetzten TPP⁺ wurde aus 100 μ l unfiltrierter Probe, die zu Beginn des Experiments in Doppelbestimmung entnommen wurde, ermittelt.

Das Membranpotential $\Delta\psi$ konnte dann mit folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\text{TPP}_i^+ = [(\text{cpm}_{(\text{Probe})} - \text{cpm}_{(\text{BuOH})}) \times M_{(\text{TPP}^+)} \times 1000] / [(\text{cpm}_{(\text{ges})} - \text{cpm}_{(\text{BuOH})}) \times V_i] \quad [\mu\text{M}]$$

$$\text{TPP}_a^+ = [(\text{cpm}_{(\text{ges})} - \text{cpm}_{(\text{BuOH})}) - (\text{cpm}_{(\text{Probe})} - \text{cpm}_{(\text{BuOH})})] \times M_{(\text{TPP}^+)} / (\text{cpm}_{(\text{ges})} - \text{cpm}_{(\text{BuOH})}) \quad [\mu\text{M}]$$

$$\Delta\psi = (-2.3 \times R \times T/F) \times \log (\text{TPP}_i^+ / \text{TPP}_a^+) \quad [\text{V}]$$

Hierbei gilt: cpm, Zählungen pro Minute; $\text{cpm}_{(\text{Probe})}$, cpm in der Probe; $\text{cpm}_{(\text{BuOH})}$, cpm der Butanol-Kontrolle; $\text{cpm}_{(\text{ges})}$, cpm der Gesamtradioaktivität im nicht filtrierten Aliquot; F, Faradaykonstante; $M_{(\text{TPP}^+)}$, Molarität des eingesetzten TPP⁺ [μ M]; R, allgemeine Gaskonstante; T, absolute Temperatur; TPP_a^+ , extrazellulärer TPP⁺-Gehalt; TPP_i^+ , intrazellulärer TPP⁺-Gehalt; V_i , inneres Volumen von 1 ml Zellen [μ l/ml]. -2,3 RT / F entspricht bei 30°C einem Wert von 0,06 V.

Von allen Werten wurde ein Faktor subtrahiert, der die unspezifische Adsorption von TPP⁺ an die Zellen ausdrückte und in Gegenwart von 10% (v/v) Butanol ermittelt wurde. Als inneres Volumen wurde der von Sahl (1985) für Staphylokokken ermittelte Wert von 3,4 μ l/mg Protein angenommen.

Kaliumphosphatpuffer: Komponente A: 50 mM KH₂PO₄; Komponente B: 50 mM K₂HPO₄ – durch Zugabe von Komponente B zu A auf pH 7 einstellen.

2.8 Quantitative Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung wurde mittels des BCA-Protein-Assays der Fa. Pierce nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Diese Methode beruht auf der von Proteinen hervorgerufenen Reduktion von Cu²⁺- zu Cu¹⁺-Ionen in alkalischem Milieu (Biuret-Reaktion) und der anschließenden kolorimetrischen Detektion der Cu¹⁺-Ionen durch Bicinchoninsäure (BCA). Als Eichsubstanz diente in diesem Test Rinderserumalbumin (BSA). Die Vermessung der Proben erfolgte im Nanodrop1000-Spektrophotometer (Fa. Peqlab) unter Anwendung des in der Nanodrop-Software enthaltenen „BCA Protein“ Programms.

2.9 Efflux von radioaktiv-markiertem [³H]-L-Glutamat

Der Efflux von [³H]-L-Glutamat aus ganzen Zellen wurde verändert nach Ruhr & Sahl (1985) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 1 in 50%

Müller-Hinton-Medium inkubiert, abzentrifugiert und 1:3 in frischem Medium, das mit Chloramphenicol (CM, 100 µg/ml) supplementiert war, resuspendiert. CM sollte hierbei den Glutamat-Einbau in Proteine verhindern. Nach 15-minütiger Vorinkubation wurde [³H]-L-Glutamat (10 µCi/ml) zugegeben und die Kultur sofort in zwei Teile aufgeteilt. Dem ersten Teil wurde hBD3 (5x MHK) zugegeben, der zweite Teil diente als Kontrolle. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Kontrolle erneut in zwei Teile geteilt und dem ersten Teil hBD3 (5x MHK) zugegeben, um den Effekt auf prä-akkumuliertes Glutamat zu untersuchen. 100 µl Aliquots wurden in bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Cellulose-Acetat Filter gefiltert (Porengröße 0,2 µm; Fa. Schleicher & Schüll) und zweimal mit 5 ml Kaliumphosphatpuffer (200 mM, pH 7), der 100 µM unmarkiertes Glutamat enthielt, gewaschen. Die Filter wurden getrocknet, in Zählröhrchen überführt und die Radioaktivität in einem β-Counter (Tri-carb; 1900CA; Fa. Packard) ermittelt.

Kaliumphosphatpuffer: Komponente A: 200 mM KH₂PO₄; Komponente B: 200 mM K₂HPO₄ – durch Zugabe von Komponente B zu A auf pH 7 einstellen.

2.10 Einbau von radioaktiv-markierten Metaboliten

Der Effekt von hBD3 auf die Biosynthese von Makromolekülen wurde durch Messung des Einbaus von [³H]- oder [¹⁴C]-markierten Grundbausteinen (5-[³H]-Uridin, [³H]-Glucosaminhydrochlorid, L-[¹⁴C]-Isoleucin) untersucht. Eine Übernachtskultur, die in 50% Müller-Hinton-Medium mit 1 mM des jeweiligen unmarkierten Vorläufers angezogen worden war, wurde 50fach in frischem Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Dann wurden die Kulturen auf zwei Gefäße aufgeteilt, auf eine OD₆₀₀ von 0,04 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 inkubiert. Im Anschluß wurde der radioaktiv-markierte Metabolit zu jeder Kultur (1 µCi/ml) und hBD3 (5x MHK) zu einer der beiden Kulturen gegeben. Der Einbau der Metabolite wurde über 120 min beobachtet. Hierfür wurden 200 µl-Aliquots entnommen, mit eiskalter Trichloressigsäure (TCA, 10%), die unmarkierten Metabolit (1 mM) enthielt, gemischt, für 30 min auf Eis inkubiert und durch Glas-Mikrofaser-Filter (0,2 µm, Fa. Whatman) filtriert. Die Filter wurden noch zwei Mal mit 5 ml TCA (2,5%), die unmarkierten Metabolit (50 mM) enthielt, gewaschen, dann getrocknet und in ein Szintillationsröhrchen überführt. Die Radioaktivität wurde mittels eines β-Counters (Tri-Carb; 1900CA; Fa. Packard) gemessen.

2.11 Antagonisierung der Wirkung von hBD3 durch mögliche Zielmoleküle

Mögliche Interaktionen zwischen einzelnen Komponenten der bakteriellen Zellwandbiosynthese und hBD3 wurden mittels eines Antagonisierungstests untersucht. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Vorstellung, dass ein durch Wechselwirkungen mit einem extern

zugegebenen und gereinigten Zielmolekül gebundenes antimikrobielles Peptid nicht mehr zum Abtöten von Bakterien zur Verfügung steht. Um diesen Effekt zu testen, wurde analog zu 2.5 eine MHK in 50% Müller-Hinton-Medium angesetzt. Vor Zugabe der Bakterienkultur wurde dann zusätzlich der jeweilige potentielle Antagonist in konstanter absoluter Menge (also in ansteigendem molaren Verhältnis zu hBD3, das in jeder Vertiefung in anderer Konzentration vorlag) in jede Vertiefungen gegeben, um das molare Verhältnis einer Antagonisierung ermitteln zu können. Wurde die Wirkung von hBD3 antagonisiert, so fand in der entsprechenden Vertiefung ungehemmtes Wachstum der Bakterien statt.

2.12 Inhibierung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II *in vitro*

Um den Einfluss von hBD3 auf die PBP2-katalysierte Reaktion zu testen, wurde ein *in vitro*-Assay genutzt. PBP2 ist ein essentielles Enzym der Zellwandbiosynthese in *S. aureus*, das sowohl die Transglykosilierungs- als auch die Transpeptidierungsreaktion katalysiert. Der analytische Assay wurde in einem Totalvolumen von 50 µl durchgeführt und enthielt rekombinantes PBP2-His₆ (7,5 µg), Lipid II (2,5 nmol) in MES (100 mM), MgCl₂ (10 mM), CaCl₂ (2 µM) und TritonX-100 (0,1% [w/v]). hBD3 wurde in unterschiedlichen molaren Verhältnissen bezogen auf Lipid II (2,5 nmol) zum Reaktionsansatz gegeben. Nach 1,5 h Inkubation bei 30°C wurde der Ansatz dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt.

2.13 Dünnschichtchromatographie

Für die dünnenschichtchromatographische Detektion von Lipid II wurden Kieselgelplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 nm, Fa. Merck) als stationäre Phase verwendet. Die Auftrennung erfolgte mittels des Laufmittels nach (Rick et al., 1988) für ca. 30 min.

Laufmittel nach Rick: Chloroform, Methanol, Aqua dest., konzentriertes Ammonium-hydroxid [88:48:10:1 (v/v)]

2.14 Akkumulation der Zellwandvorstufe UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid

UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid (UDP-MurNAc-Pentapeptid) ist die letzte lösliche Vorstufe der Lipid II-Biosynthese. Behandelt man Zellen mit Substanzen, welche die Zellwandbiosynthese an der extracytoplasmatischen Seite inhibieren, zum Beispiel durch Bindung an Lipid II (Vancomycin, Mersacidin), so akkumuliert UDP-MurNAc-Pentapeptid in den Zellen und kann über analytische HPLC gemessen werden (Kohlrausch & Holtje, 1991). 50 ml 50% Müller-Hinton-Medium wurden mit 100 µl einer Übernachtskultur *S. aureus* SG511 beimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde Chloramphenicol (130 µg/ml) zu den Zellen gegeben, um eine Zelllyse zu verhindern und Rückkopplungseffekte außer Kraft zu setzen, die in

manchen Spezies die Akkumulation auch in Gegenwart von Inhibitoren der Zellwandbiosynthese verhindern (Dai & Ishiguro, 1988; Ishiguro & Ramey, 1978). Die Kultur wurde in 5 ml Aliquots aufgeteilt und mit 0x (Negativ-Kontrolle), 5x oder 10x MHK hBD3 oder 10x MHK Vancomycin (Positivkontrolle) versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Kulturen abgeerntet, in 0,75 ml kochendem Baker-Wasser aufgenommen, durch 15-minütiges Kochen aufgeschlossen und mit H_3PO_4 auf pH 2 angesäuert. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde der Überstand für die HPLC-Analyse eingesetzt. Es wurde eine isokratische Trennung mit 50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 5,2, Flußrate 1 ml/min) und einer Nucleosil-100-C18-Säule durchgeführt und bei 260 nm detektiert.

Na-Phosphat Puffer: Komponente A: 50 mM NaH_2PO_4 ; Komponente B: 50 mM Na_2HPO_4 – Komponente B zu A geben, bis ein pH von 5,2 erreicht ist.

2.15 Reversed-Phase Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) stellt eine besonders leistungsfähige Form der Flüssigkeitschromatographie dar. Sie ist, je nach eingesetzter Säule, sowohl für analytische, als auch für präparative Zwecke geeignet und besitzt ein sehr hohes Trennvermögen. Die chromatographische Trennung von Substanzen beruht auf der in Abhängigkeit von ihrer physiko-chemischen Natur unterschiedlich stark ausgeprägten Adsorption und Desorption an eine stationäre Phase. Dabei führen starke Wechselwirkungen zu einer langsamen, schwach ausgeprägte zu einer schnellen Elution der entsprechenden Substanzen. Bei der reversed phase (RP-) HPLC erfolgt die Aufreinigung der Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Hydrophobizität. Je hydrophober die Substanz also ist, desto länger verbleibt sie auf der Säule. In dieser Arbeit wurde mit einer analytischen C18-Trennsäule gearbeitet. Bei diesen Säulen besteht die stationäre Phase aus einem Kieselgel, das mit C18-Kohlenwasserstoffketten silanisiert ist.

2.16 Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR erlaubt eine exponentielle Vervielfältigung von spezifischen Abschnitten genomischer DNA. Sie wurde mit der Taq- (Fa. Peqlab) oder Phusion-Polymerase (Fa. Finnzymes) bei unterschiedlichen Temperaturprofilen, die sich vor allem nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer sowie nach der erwarteten Größe des PCR-Produkts richteten, durchgeführt. Die als Primer benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem PCRExpress Thermal Cycler (Fa. Hybaid-AGS) oder dem Labcycler (Fa. Sensoquest) durchgeführt.

2.17 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen erfolgte mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.18 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese nach Sambrook & Russell (2001). Die DNA-Banden wurden durch 20-30-minütiges Färben in Ethidiumbromidlösung sichtbar gemacht und mit dem Image Master System (Fa. Amersham Bioscience) dokumentiert.

2.19 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Über Agarosegele aufgetrennte DNA-Fragmente wurden anhand des MinElute Gel Extraction Kits (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Mit diesem Kit können Fragmente einer Größe von 70 bp bis 4 kb aufgereinigt werden.

2.20 Isolierung von genomischer DNA aus *Staphylococcus aureus*

Die Zellwand von *S. aureus* ist aufgrund eines hohen Quervernetzungsgrades über Pentaglycinbrücken und aufgrund von Modifikationen der Muraminsäurereste extrem stabil und resistent gegenüber Abbau durch die Hydrolase Lysozym. Um die Zellwand von *S. aureus* aufzuschließen, erfolgte daher zunächst eine Inkubation der Zellen bei 37°C mit unterschiedlichen Mengen Lysostaphin (5 mg/ml) für 30-120 min. Lysostaphin ist eine Endopeptidase, die spezifisch die Pentaglycinbrücken im Peptidoglykannetz spaltet und somit die Zellwand-stabilisierenden Quervernetzungen zerstört. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in das High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche) oder das Presto Spin D Bug Kit (Fa. Molzym) eingesetzt und die genomische DNA nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.21 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Zellyse und der Bindung der Plasmid-DNA an Säulen, die eine Silikamatrix enthalten, welche in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen bis zu 20 µg Plasmid-DNA bindet. Die so gewonnene Plasmid-DNA weist einen hohen Reinheitsgrad und eine geringe Salzkonzentration auf. Bei der Isolierung von Plasmiden aus *S. aureus* erfolgte zunächst ein Zellaufschluß wie in 2.20 beschrieben. Plasmide, die in geringer Kopienzahl in den Zellen vorlagen („low-copy plasmids“) wurden mit dem HiSpeed Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen

nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden in der Sigma 2K15 Laborzentrifuge, Rotor Nr. 12148 durchgeführt.

2.22 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm mit dem Nanodrop1000-Spektrophotometer (Fa. Peqlab) bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger und 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger (z.B. RNA) Nukleinsäuren. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt einen Hinweis auf die Reinheit der Nukleinsäuren, wobei der Wert für DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

2.23 Restriktionsverdau und Ligation

Restriktionsverdau und Ligationen von DNA wurden nach Angaben des Herstellers der Enzyme (Restriktionsendonukleasen, Fa. Roche; T4 DNA-Ligase, Fa. Roche und Fa. Fermentas) durchgeführt. Die Ansätze wurden für Restriktionsverdau 1-3 h bei 37°C, für Ligationen über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.24 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve nach dem Prinzip der Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977) durchgeführt.

2.25 Transformationen von Bakterienzellen

Die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA aufzunehmen, ist unter Normalbedingungen gering; die Transformierbarkeit kann aber durch physikalische oder chemische Behandlung der Bakterienzellen erhöht werden. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Transformationsmethoden verwendet, da sich verschiedene Bakterienstämme unterschiedlich gut transformieren lassen. Für Gram-Negative Bakterien ist die Elektroporation eine effektive Methode der Transformation, Gram-positive Bakterien lassen sich hingegen aufgrund ihrer dicken Zellwand nur schlecht elektroporieren. Hier eignen sich andere Transformationsmethoden wie zum Beispiel die Protoplastentransformation und die Phagentransduktion.

2.25.1 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

500 ml LB-Medium wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* JM109 beimpft und bei 37°C und 140 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 -1 inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Nach 15 min Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (Sorvall, Rotor SLC 4000, 15 min, 4°C, Bremse 1, 6000 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 250 ml kalten, sterilen Aqua dest. resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (Einstellungen s.o., jedoch 8000 rpm) wurden die Zellen in 10 ml 10% Glycerin resuspendiert und in Falcon-

Röhrchen (50 ml) überführt. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (Heraeus Multifuge 1 S-R, Rotor FA12.94 Highconic, 6000 rpm, Bremse 1, 4°C), nach dem die Zellen in 800 µl 10 % kaltem Glycerin gelöst, dann aliquotiert und in N₂ (flüssig) schockgefroren wurden. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -70°C.

2.25.2 Elektroporation von *Escherichia coli*

2 µl Ligationsansatz oder salzfreie Plasmid-DNA wurden zu 50 µl kompetenten *E. coli* JM109-Zellen gegeben, 1 min auf Eis inkubiert, luftblasenfrei in eine vorgekühlte Reaktionsküvette (25 x 2 mm Elektrodenlücke, Fa. Peqlab) pipettiert und unverzüglich elektroporiert (Genepulser, Fa. Biorad, 2,5 kV, 200 Ω, 25 µF). Die Zellen wurden anschließend in LB Medium aufgenommen und nach einer Regenerationszeit von 1 h bei 37°C und unter Schütteln (160 rpm) auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert.

2.25.3 Herstellung elektrokompetenter *Staphylococcus aureus* RN4220-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *S. aureus* RN4220-Zellen wurden 500 ml BHI-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft, bei 37°C und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 inkubiert und abzentrifugiert (Sorvall, Rotor SLC 4000, 10 min, RT, Bremse 4, 6000 rpm). Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte mit 1, 1/2, 1/20 und 1/50 Volumen sterilem Glycerin (10%). Danach wurden die Zellen in 0,7 ml Glycerin (10%) resuspendiert und als 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.25.4 Elektroporation von *Staphylococcus aureus* RN4220

2 µl Plasmid-DNA wurden zu 50 µl kompetenten *S. aureus* RN4220-Zellen gegeben, 30 min bei RT inkubiert, luftblasenfrei in eine vorgekühlte Reaktionsküvette (25 x 2 mm Elektrodenlücke, Fa. Peqlab) pipettiert und unverzüglich elektroporiert (Genepulser, Fa. Biorad, 2 kV, 100 Ω, 25 µF). Die Zellen wurden anschließend in SMMP55-Medium aufgenommen und nach einer Regenerationszeit von 2 h bei 37°C und 160 rpm auf BM-Agar, der einen geeigneten Selektionsmarker enthielt, ausplattiert. Da mit dem temperatursensitiven Plasmid pTV0mcs gearbeitet wurde, wurden die Selektionsplatten bei 30°C über Nacht inkubiert.

2.25.5 Herstellung von *Staphylococcus carnosus*-Protoplasten

Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden 300 ml TS-Bouillon mit 1 ml Kultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 bei 37°C und unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen (Heraeus Multifuge 1 S-R, Rotor FA12.94 Highconic, 5800 rpm, Bremse 5, 10°C, 15 min) folgte ein Inkubationsschritt für den Zellwandabbau. Dafür wurden

die Zellen in 30 ml SMMP75-Medium resuspendiert, mit 60 mg Lysozym und 100 µg Lysostaphin versetzt und über Nacht bei 30°C (ohne Schütteln) inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte nach Zentrifugation (25 min, RT, 7500 rpm, ohne Bremse) ein weiterer Waschschrift mit 5 ml SMMP75-Medium, wobei das Pellet durch Schwenken und keinesfalls durch Vortexen oder Pipettieren gelöst wurde, um die extrem empfindlichen Protoplasten nicht zu beschädigen. Nach Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet vorsichtig in 2 ml SMMP75-Medium aufgenommen und mit abgeschnittenen Spitzen in 300 µl Aliquots aufgeteilt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden.

2.25.6 Protoplastentransformation

Die Protoplastentransformation wurde in Anlehnung an die von Götz & Schumacher (1987) verbesserte Methode der PEG-induzierten Transformation (Chang & Cohen, 1979; Götz et al., 1981) von *Staphylococcus carnosus*-Protoplasten durchgeführt. Dieses ist die bisher effizienteste Methode, um Plasmide in *S. carnosus* einzuführen. Um die empfindlichen Protoplasten osmotisch zu schützen, wurde die Transformation in SMMP-Medium durchgeführt, das einen sehr hohen Anteil an Saccharose enthält. Ferner wurden nur sterile Falcon-Röhrchen und keine Glasgefäße verwendet, um zu vermeiden, dass die Protoplasten mit Rückständen auf den Glasgefäßen wie z.B. Detergenzien in Berührung kamen.

Für die Transformation wurden 10 µl Ligationsansatz mit 10 µl SMMP75 Medium gemischt und zu 300 µl *S. carnosus* TM300-Protoplasten gegeben. Anschließend wurden 2 ml 40% PEG (Fa. Merck, in 50% SMM-Puffer gelöst) dazugegeben, die Suspension 2 min unter vorsichtigem Schwenken inkubiert und dann 7 ml vorgewärmtes SMMP75-Medium zugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (Heraeus Multifuge 1 S-R, Rotor FA12.94 High-conic, 7500 rpm, ohne Bremse, RT, 25 min) wurde das Pellet unter vorsichtigem Schwenken in 900 µl SMMP75-Medium gelöst und je 150 µl auf eine DM3-Agarplatte ausplattiert. Nach 4-5-stündiger Inkubation bei 30°C (da das temperatursensitive Plasmid pTV0mcs verwendet wurde, sonst 37°C) wurden die Platten mit je 3 ml Casamino-Yeast-Weichagar, der ein geeignetes Selektions-Antibiotikum enthielt, überschichtet und für 58 -70 h bei 30°C inkubiert.

2.25.7 Phagentransduktion

Die Phagentransduktion stellt eine Möglichkeit der Transformation von Bakterienzellen dar, bei der diese nicht chemisch oder physikalisch verändert werden müssen. Bakteriophagen dienen hierbei als Vektor, um ein Plasmid in einen *S. aureus*-Stamm einzuführen. Zunächst infiziert man dafür den Donorstamm, der das gewünschte Plasmid enthält, mit einem geeigneten Bakteriophagen. In wenigen Phagen wird dabei die Plasmid-DNA aufgenommen.

Nach der „Ernte“ der so behandelten Phagen kann man dann den gewünschten Empfängerstamm mit diesen infizieren und über Selektionsplatten die Kolonien selektieren, die das Plasmid aufgenommen haben. In dieser Arbeit wurde mit dem Phagen 85 gearbeitet, der in der Lage ist, sowohl den Stamm *S. aureus* RN4220 als auch den Stamm *S. aureus* SG511 zu infizieren.

Infektion des Donorstammes

Für die Phagentransduktion wurde *S. aureus* RN4220 pVS*vraE*-Ery als Donor, *S. aureus* SG511 als Empfänger und der Phage 85 als transduzierender Phage verwendet. 20 ml LB-Medium mit 20 mg/l Chloramphenicol wurden mit dem Donorstamm beimpft und über Nacht bei 30°C (da der Donorstamm ein temperatursensitives Plasmid enthielt) inkubiert. Für die Transduktion wurde das Phagenlysate (von M. Türck angereichert und zur Verfügung gestellt) mit Phagenpuffer verdünnt, so dass man 10^{-1} - 10^{-5} Verdünnungen erhielt. Unmittelbar vor der Adsorption der Phagen an die Bakterien wurden diese mit 5 mM CaCl₂ versetzt, um die Anlagerung der Phagen zu erleichtern. Die Bakterienkultur wurde zu je 300 µl in sterile Falcon-Röhrchen (15 ml) aliquotiert und diese, falls Donor und Akzeptor nicht isogenisch waren, für 2 min bei 52°C inkubiert, um Restriktionssysteme zu inaktivieren. Dann wurden von jeder Verdünnungsstufe der Phagensuspension 100 µl zu je einem Aliquot Bakterienkultur gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle angesetzt, bei der anstatt der Phagensuspension reiner Phagenpuffer zugegeben wurde. Nach der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz mit 4 ml warmen (55°C) LB-Weichagar (+ CaCl₂) gemischt, kurz gevortext und zum Überschichten einer Blutagarplatte verwendet, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Die Blutplatte derjenigen Verdünnung, die eine konfluente Lyse zeigte, wurde weiterverwendet. Hierbei weist braun gefärbter Blutagar auf Bakterienwachstum und aufgeklärter LB-Agar in der oberen Schicht auf Bakterienlyse hin. Die Platte wurde mit 2 ml Phagenpuffer versetzt, der LB-Weichagar mit einer spatelförmig gebogenen Pasteurpipette abgeschabt und in ein steriles Falcon-Röhrchen (50 ml) überführt. Die Agar-Phagenlysate-Mischung wurde nach kurzem Vortexen zum Entfernen von Agar- und Zellrückständen abzentrifugiert (15 min, RT, 9000 rpm, Bremse 9) und der Überstand in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, RT, 9000 rpm, Bremse 9) wurde das Phagenlysate in 1,8 ml Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (Fa. Nalgene Cryoware) überführt und bei 4 °C gelagert. Die Haltbarkeit der Phagenlysate beträgt so mehrere Jahre.

Infektion des Rezipientenstammes

Für die Infektion des Rezipientenstammes wurde der Stamm *S. aureus* SG511 in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und unter Schütteln angezogen. Für die Transduktion wurde das aus dem Donor gewonnene Phagenlysate (Phage 85 pVS*vraE*-Ery) mit Phagenpuffer verdünnt, so dass man 10^{-1} bis 10^{-5} Verdünnungen erhielt. Die Infektion erfolgte analog zu

der Infektion des Donorstammes. Zusätzlich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt, bei denen statt Phagensuspension reiner Phagenpuffer zugegeben wurde. Nach der 15-minütigen Inkubationszeit wurde jeder Ansatz mit 4 ml warmen (55°C) LB-Weichagar (+20 mM Na₃-Citrat) gemischt, kurz gevortext und bis auf die Negativkontrolle zum Überschichten einer Selektionsplatte (LB + CM [20 mg/l]) verwendet, die für 48-60 h bei 30°C (wegen des temperatursensitiven Plasmids pVS*vraE*-Ery) inkubiert wurde. Die Negativkontrolle wurde zum Überschichten einer Blutplatte verwendet. Der LB-Weichagar enthielt 20 mM Na₃-Citrat, um zu verhindern, dass an infizierten Zellen andere Phagen adsorbieren konnten und durch diese eine Zellyse stattfand. Das Citrat cheliert dabei die im Ansatz enthaltenen und für die Absorption notwendigen Ca²⁺-Ionen. Nach der Inkubationszeit wurden Kolonien mit Zahnstochern gepickt, auf Selektionsplatten (LB + CM [20 mg/l]) vereinzelt und auf das Vorhandensein des vollständigen Plasmids pVS*vraE*-Ery hin überprüft.

Phagenpuffer: LB-Medium, 5 mM CaCl₂

2.26 Insertionsinaktivierung des chromosomalen Gens *vraE* in *Staphylococcus aureus* SG511 durch doppelt homologe Rekombination

Das für eine hypothetische ABC-Transporter-Permease codierende Gen *vraE* wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Insertion eines Erythromycin-codierenden Genes ausgeschaltet. Hierfür musste eine doppelt homologe Rekombination stattfinden. Zu diesem Zweck wurde der temperatursensitive Vektor pTV0mcs verwendet, der bei 30°C repliziert wird, bei 44°C jedoch nicht. Zunächst wurden zwei ca. 500 bp große Fragmente, die am 5'- bzw. am 3'-Ende von *vraE* lagen, in den Vektor pUC19-Ery kloniert, so dass sie das in diesem Vektor enthaltene Erythromycin (EM)-Gen flankierten. Anschließend wurde das entstehende Fragment aus diesem Vektor ausgeschnitten und in pTV0mcs eingefügt. Dieses Plasmid besitzt ein Chloramphenicol (CM)-Resistenzgen und einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Folglich konnte nach Transformation in den Stamm *S. aureus* SG511 und anschließender Selektion bei 44°C auf CM (20 µg/ml) und EM (25 µg/ml) enthaltenden Agarplatten solche Klone isoliert werden, die infolge einer einfachen homologen Rekombination den kompletten Vektor in das Chromosom integriert hatten. Zur Isolierung einer Mutante, in der eine doppelt homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurden die entsprechenden einfach rekombinierten Mutanten in jeweils 20 ml TSB-Medium mit 25 µg/ml EM inokuliert, bei 44°C inkubiert und alle 4 h in frisches Medium überimpft. Nach insgesamt ca. 60 h wurden Aliquots in verschiedenen Verdünnungen auf TSA-Platten mit EM (25 µg/ml) ausplattiert und für 12 h bei 44°C bebrütet. Gepickte Kolonien wurden anschließend parallel auf EM (25 µg/ml) und EM und CM (20 µg/ml) haltige TSA-Platten überimpft und bei 44°C

inkubiert. In einer Kolonie, die nun auf EM-haltigen Platten wuchs, auf EM- und CM-haltigen jedoch nicht, hatte potentiell eine doppelt homologe Rekombination stattgefunden. Solche Kolonien wurden dann durch PCR und Sequenzierungen näher untersucht.

2.27 Transkriptionsanalyse mittels DNA-Microarrays

2.27.1 Zellzucht für Transkriptionsanalyse

3 ml B-Bouillon wurden mit 60 µl einer Übernachtskultur von *S. aureus* SG511 beimpft. Die Inkubationen erfolgten immer bei 37°C und unter Schütteln (160 rpm). Die transkriptionelle Antwort auf hBD3-Behandlung in *Staphylococcus aureus* SG511 wurde unter zwei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Im ersten Ansatz (Langzeit-Experiment) wurden die Zellen in Anwesenheit einer subinhibitorischen hBD3-Konzentration (2 µM) bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert und dann unter Verwendung von RNAprotect (Fa. Qiagen) abgeerntet. Im zweiten Ansatz (Kurzzeit-Experiment) wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 (exponentielle Wachstumsphase) ohne Peptid inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von hBD3 (2 µM) und nach weiterer 20 minütiger Inkubation die Zellernte unter Verwendung von RNAprotect nach Angaben des Herstellers. RNAprotect sorgt hierbei für die Stabilisierung der empfindlichen Gesamt-RNA. Eine Kontrollkultur ohne Zugabe von hBD3 wurde jeweils auf gleiche Weise inkubiert und abgeerntet.

2.27.2 RNA-Präparation

Für die Lyse der *S. aureus*-Zellen wurde das Zellpellet in 700 µl TE-Puffer mit 24 µl Lysostaphin (5 mg/ml) resuspendiert und für 30 -120 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte die RNA-Präparation mittels des PrestoSpin Kits der Fa. Molzym nach Angaben des Herstellers. Alle Arbeiten mit RNA wurden mit RNase freien Reagenzien und Gefäßen durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase-freiem Aqua dest. eluiert und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.27.3 cDNA-Synthese und Aufreinigung

Alle Arbeitsschritte wurden bei möglichst wenig Lichtzufuhr durchgeführt, da die verwendeten Farbstoffe lichtempfindlich sind. 9 µg Gesamt-RNA (je 3 µg RNA aus drei separaten RNA-Präparationen) wurde mittels einer Reversen Transkriptase (BioScript, Fa. Bionline) nach Angaben des Herstellers in copyDNA (cDNA) umgeschrieben, wobei zwei 30-minütige Transkriptionsschritte bei 42°C erfolgten. Die Transkriptionsreaktion wurde in Anwesenheit von 0,2 mM dCTP, 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP, 75 µg/ml random hexamer primer (Fa.

GE Healthcare), 25 U/ml RNase-Out (Fa. Invitrogen) und 0,1 mM Cyanin-3' (Cy3) - oder Cyanin-5' (Cy5)-Fluoreszenz-markiertem dCTP (Fa. Amersham oder Fa. Perkin Elmer Life Science) durchgeführt. Auf diese Weise wurde der Farbstoff simultan in die cDNA eingebaut. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl EDTA (0,5 M) abgestoppt, die RNA durch alkalische Hydrolyse (1 N NaOH) bei 65°C abgebaut und die cDNA nach Neutralisation durch Zugabe von 25 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) mittels des MinElute PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) aufgereinigt. Die Menge an cDNA sowie die Menge an inkorporiertem Farbstoff wurde im NanoDrop Spektrophotometer (Fa. Peqlab) vermessen.

2.27.4 Hybridisierung, Waschen und Scannen von Microarrays

DNA-Microarrays eignen sich für die Analyse des Transkriptions- und Expressionsstatus aller auf dem Microarray realisierten Gene und können so z.B. Hinweise auf Genfunktionen oder Regulationswege geben. In dieser Arbeit wurde ein PCR-Produkt-Gesamt-Genom-Chip (sciTRACER, Fa. Scienion) verwendet. Auf diesem Microarray sind ca. 90% der Sequenzen (2338 von insgesamt 2593 proteinkodierenden ORFs) des *S. aureus* N315-Genoms als PCR-Produkt („Feature“) vorhanden. Es wurden die Expressionsprofile von *S. aureus* SG511 in An- und Abwesenheit von hBD3 verglichen. Dazu wurde die Cy3- oder Cy5-markierte cDNA der behandelten Zellen mit der cDNA der Kontrollen, die mit dem jeweils anderen Farbstoff markiert worden war, kompetitiv und nach Angaben des Herstellers auf den sciTRACER gegeben und für 60-72 h bei 42°C hybridisiert. Außerdem wurde ein weiterer Chip, bei dem die cDNAs umgekehrt markiert waren, hybridisiert („dye swap“), da die Farbstoffe Cy3 und Cy5 unterschiedlich effektiv in cDNA eingebaut werden und dieser Effekt berücksichtigt werden muss. Zum Entfernen der nicht hybridisierten cDNA-Reste wurden die Chips nach der Inkubationszeit bei RT in SSC-Puffer mit abnehmenden Salzkonzentrationen gewaschen (1x SSC/0,3% SDS, 5 min; 0,2x SSC, 5 min; 0,06x SSC, 30 s) und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Microarrays im GenePix 4000B Scanner (Fa. Axon Instruments) gescannt und die erhaltenen Daten einer statistischen Analyse unterzogen.

2.27.5 Statistische Auswertung von Microarrays

Die Bildanalyse und die Auswertung der Daten wurde mit der GenePixPro 4.1 Software (Fa. Axon Instruments) durchgeführt. Der Cy3-Farbstoff fluoresziert bei Anregung mit einer Wellenlänge von 532 nm grün, der Cy5-Farbstoff fluoresziert nach Anregung bei 635 nm rot. So konnte mittels der GenePixPro 4.1 Software der Quotient aus den beiden Wellenlängen gebildet (532 nm/635 nm) und damit Aufschluß über das Verhältnis der gebundenen cDNAs zueinander gewonnen werden. Nach der Berechnung der Spot-Intensitäten wurden die

einzelnen Datensets in der Acuity-Software zusammengeführt und dort unter Anwendung des Lowess-Algorithmus, bei dem eine nicht-lineare Normalisierung der Daten erfolgt, normalisiert. Anschließend wurden die signifikant regulierten Gene mit der SAM Software (Significance Analysis of Microarrays, Tusher et al., 2001) ermittelt. SAM ist eine statistische Methode, um speziell Microarray-Experimente auszuwerten und signifikante Änderungen der Genexpression aufzufinden. Für die Auswertung wurden die Parameter „One Class Response“ und „False Discovery Rate“ (FDR) < 1% gewählt. Die FDR gibt die Anzahl der Gene in Prozent an, die bei der SAM-Auswertung fälschlicherweise als signifikant angegeben werden. Da SAM nicht die Mediane der Ratio-Werte (532 nm/635 nm), sondern die Lowess M normalisierten, logarithmischen Ratio-Werte als Grundlage zur Auswertung nimmt, gibt das Programm erstere auch nicht an. Die Mediane der Ratio-Werte liefern jedoch Information über die Stärke der Regulation der einzelnen Gene und sind mit den Ratios in anderen Arbeiten vergleichbar. Deshalb wurde nach der Auswertung mit SAM von allen als signifikant ausgegebenen Genen die Ratios separat ermittelt und dann solche Gene, bei denen die Ratios um ≥ 2 fach verändert waren, als signifikant reguliert gewertet. Hierfür wurden die Mittelwerte aus den Medianen der Ratios (532nm/635nm) der einzelnen spots herangezogen. Bei herunterregulierten Genen wurde der Kehrbuch aus diesem Wert gebildet ($1/\text{Mittelwert der Mediane der Ratios}$), um die Daten anschaulicher präsentieren zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Minimale Hemmkonzentration von hBD3 gegen *Staphylococcus aureus* SG511

Für sämtliche Experimente wurde der Stamm *Staphylococcus aureus* SG511 ausgewählt, der sehr sensitiv gegenüber vielen antimikrobiellen Substanzen, inklusive der kationischen antimikrobiellen Peptide, ist. Um eine geeignete Peptidkonzentration für die Experimente auszuwählen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) von hBD3 gegen *S. aureus* SG511 in 50% Müller-Hinton-Medium und in B-Bouillon ermittelt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Bestimmung der MHK von hBD3 gegen *S. aureus* SG511.

| Medium | MHK |
|--------------------------|------------|
| 50% Müller-Hinton-Medium | 1 μ M |
| B-Bouillon | 16 μ M |

3.2 Physiologische Untersuchungen zur Wirkungsweise von hBD3 auf *Staphylococcus aureus* SG511

Alle physiologischen Experimente wurden mit dem gleichen experimentellen Aufbau, Medium (50% Müller-Hinton), Bakterienstamm (*S. aureus* SG511) und der gleichen hBD3-Konzentration (5x MHK, bei der Abtötungskinetik zusätzlich 1x MHK) durchgeführt, um die Ergebnisse der einzelnen Experimente optimal miteinander korrelieren zu können.

3.2.1 Abtötungskinetik hBD3-behandelter *Staphylococcus aureus*-Zellen

Um einen Hinweis auf die Wirksamkeit und den Wirkungszeitpunkt von hBD3 zu bekommen, wurden Abtötungskinetiken erstellt. In einem Kurzzeit-Experiment wurde die Abtötung der Zellen innerhalb der ersten 30 min nach Peptidzugabe, in einem Langzeit-Experiment das Wachstum über 22 h beobachtet, wobei je eine Kultur mit 1x und eine mit 5x MHK behandelt wurde (siehe Abbildung 3.1). Die Kinetiken zeigten, dass bei 5x MHK eine effiziente und schnelle Abtötung der Bakterienzellen stattfand. Schon am Zeitpunkt „0 min“, innerhalb von Sekunden nach Peptidzugabe, war die Anzahl der Kolonien-bildenden Einheiten (KBE) um mehrere log-Stufen reduziert. Es ist jedoch zu beachten, dass mit diesem Experiment nicht unterschieden werden kann, ob wirklich ein direktes und unmittelbares Abtöten der Zellen stattfindet oder ob die Bildung einer Kolonie auf der Agarplatte nur durch Haften des Peptids an den Zellen verhindert wird. Dies ist gerade bei einem stark kationischen Peptid wie hBD3 nicht auszuschließen. Im Langzeitexperiment wurde bei der 5x MHK eine Regeneration der Zellen erst nach 22 h beobachtet.

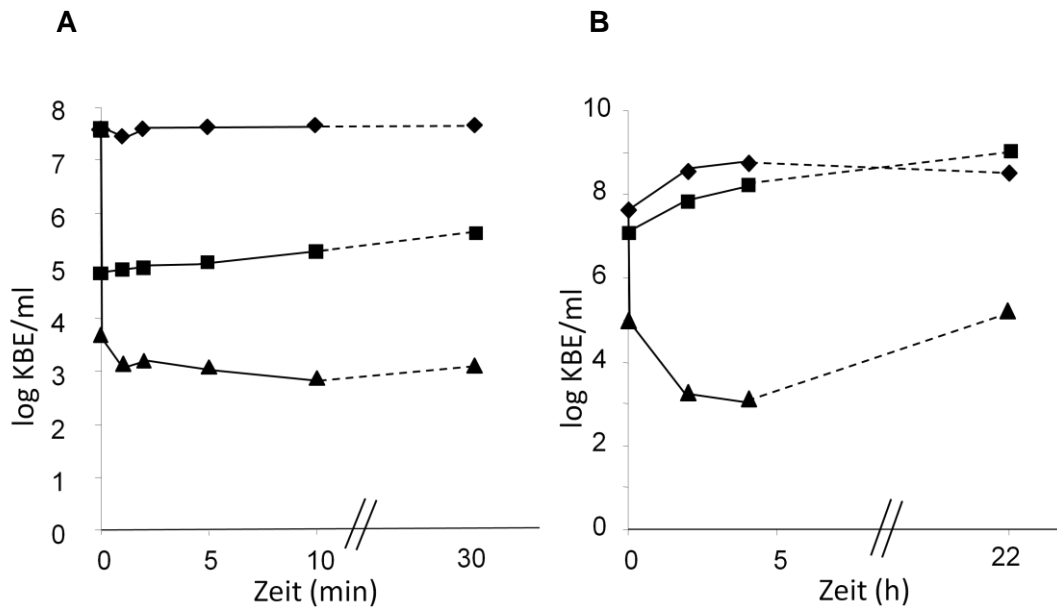


Abbildung 3.1. Kurzzeit- (A) und Langzeit- (B) Abtötungskinetiken von *S. aureus* SG511 nach Behandlung mit 1x (Quadrate) oder 5x (Dreiecke) MHK hBD3 und Kontrolle ohne Peptidzugabe (Diamanten).

Im Gegensatz dazu wurden bei der 1x MHK deutlich weniger Zellen abgetötet und es war bereits nach 2 h eine erneute Zunahme der KBE zu beobachten.

3.2.2 Einfluss von hBD3 auf das Membranpotential

Die Bildung von Membranporen oder die unspezifische Zerstörung der Membranintegrität sollte zu einem starken Abfall des Membranpotentials führen.

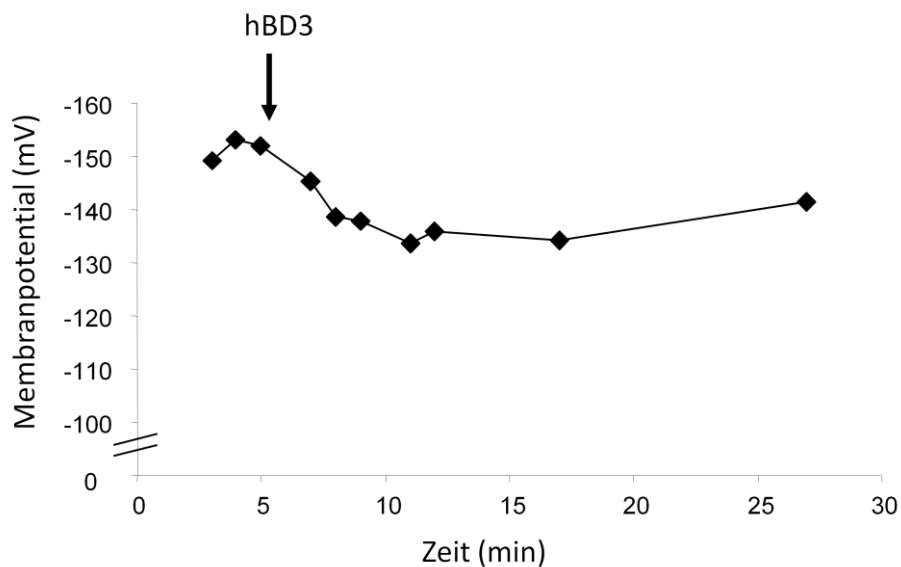


Abbildung 3.2. Wirkung von hBD3 auf das Membranpotential von *S. aureus* SG511; der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Peptidzugabe (5x MHK) an.

Um das Membranpotential in wachsenden Zellen zu messen, wurde [^3H]-Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+), das sich in Abhängigkeit von $\Delta\psi$ über der Membran verteilt, eingesetzt. Die Abnahme des Membranpotentials nach hBD3-Zugabe betrug nur etwa 15 mV, jedoch war dieser geringe Effekt reproduzierbar. Offensichtlich wurde die bakterielle Cytoplasmamembran nicht zerstört, sondern ihre Integrität nur kurzfristig beeinträchtigt. Daher spricht dieses Ergebnis gegen eine Wirkungsweise, die auf einer Membranzerstörung basiert.

3.2.3 Einfluss von hBD3 auf den Efflux von Glutamat

Ein membranschädigender Effekt von antimikrobiellen Substanzen beeinflusst Energieabhängige Transportprozesse. Um zu testen, ob hBD3 solche Prozesse beeinträchtigt, wurde der Effekt von hBD3 auf die Aufnahme und die Akkumulation von [^3H]-L-Glutamat in ganzen Zellen untersucht (s. Abbildung 3.3). Hierfür wurde in einem Ansatz eine Kultur in Anwesenheit von hBD3 und radioaktiv-markiertem Glutamat angezogen, um den Einfluss auf die Aufnahme von Glutamat zu untersuchen.

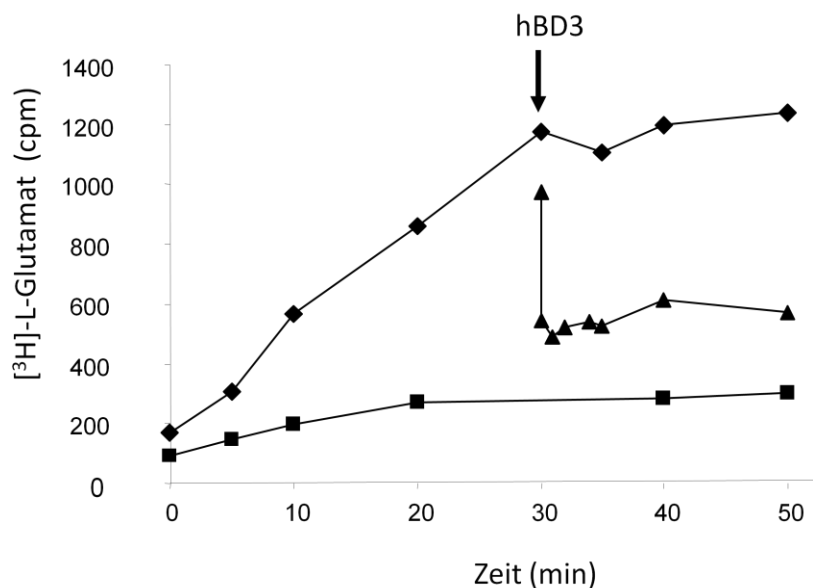


Abbildung 3.3. Akkumulation von [^3H]-L-Glutamat in unbehandelten (Diamanten) oder hBD3-behandelten (Quadrat) *S. aureus* SG511-Zellen. Um den Efflux von [^3H]-L-Glutamat zu untersuchen, wurde die unbehandelte Kontrolle nach 30 min in zwei Teile geteilt. Anschließend wurde einem Teil hBD3 zugegeben (Pfeil; Dreiecke) und der zweite Teil wurde als Kontrolle mitgeführt (Diamanten). Die hBD3-Konzentration entsprach der 5x MHK.

In einem zweiten Ansatz wurde erst nach 30-minütigem Wachstum in Anwesenheit von [^3H]-L-Glutamat hBD3 zu einer Kultur gegeben, um zu testen, ob hBD3 einen Glutamat-Efflux bewirkt; die Effekte wurde dann jeweils über eine definierten Zeitraum beobachtet. Die Zellen

waren nicht in der Lage, Glutamat aufzunehmen, wenn sie mit hBD3 vorbehandelt worden waren. In Abwesenheit von Peptid nahmen die Zellen wie erwartet das radioaktiv-markierte Glutamat auf. Unmittelbar nach Peptidzugabe wurde der Marker dann freigesetzt, wobei allerdings dennoch ein signifikanter Anteil in den Zellen verblieb.

Dies war zu beobachten, obwohl die Zellen zuvor mit Chloramphenicol behandelt worden waren, welches einen Glutamat-Einbau in Proteine verhindert. Eine Verstoffwechslung des Glutamats kann also kein Grund für den inkompletten Efflux sein. Dieses Ergebnis ist nicht eindeutig zu erklären, da porenbildende Substanzen eine vollständige Freisetzung des Markers bewirken. Da aber dennoch ein deutlicher Effekt von hBD3 auf die Aufnahme und den Efflux von Glutamat zu beobachten war, wird die Membran offensichtlich zumindest zum Teil beeinträchtigt. Infolgedessen wäre dann auch die energieabhängige Aufnahme von Glutamat gehemmt.

3.2.4 Einfluss von hBD3 auf die Biosynthese von Makromolekülen

Um zu untersuchen, ob hBD3 spezifisch die Biosynthese von Makromolekülen hemmt, wurde der Einbau von verschiedenen radioaktiv-markierten Grundbausteinen in ganze Zellen beobachtet. Hierbei wurde radioaktiv-markiertes Glucosamin (als Indikator für die Zellwandbiosynthese), radioaktiv-markiertes Uridin (als Indikator für die Nukleotidbiosynthese) und radioaktiv-markiertes Isoleucin (als Indikator für die Proteinbiosynthese) eingesetzt. Der Einbau der genannten Grundbausteine in wachsende *S. aureus* SG511-Zellen wurde über einen Zeitraum von 120 min beobachtet (Abbildung 3.4). Die spezifische Hemmung eines dieser Biosynthesewege könnte Aufschluss über den Angriffsort von hBD3 liefern.

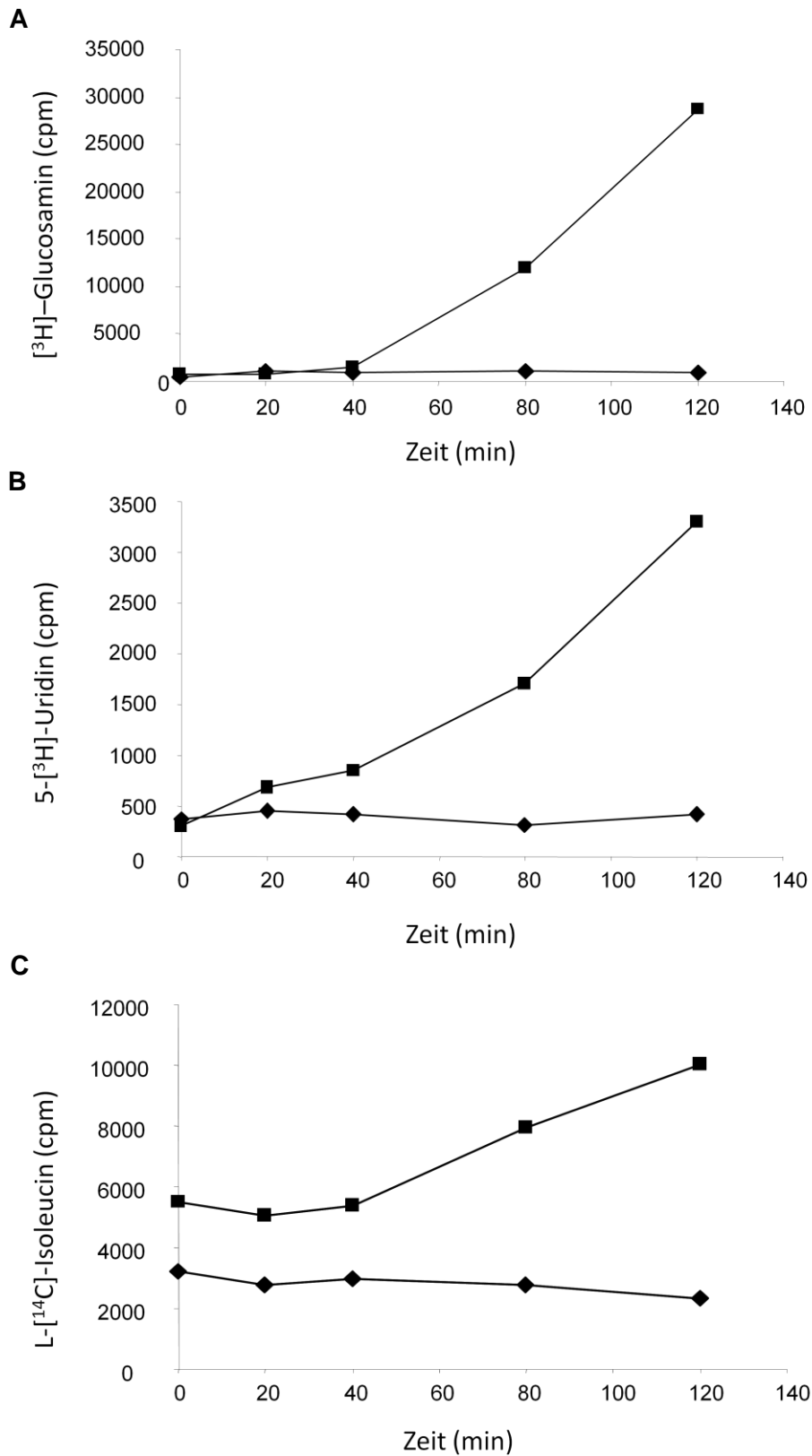


Abbildung 3.4. Einfluss von hBD3 auf die Biosynthese von Makromolekülen in *S. aureus* SG511. Einbau von [³H]-Glucosamin (A), 5-[³H]-Uridin (B) und L-[¹⁴C]-Isoleucin (C) in hBD3-behandelten (Diamanten) und unbehandelten (Quadrate) Zellen. Der Glucosamin-Einbau diente hierbei als Indikator für die Zellwand-Biosynthese, der Uridin-Einbau als Indikator für die Nukleotid-Biosynthese und der Isoleucin-Einbau als Indikator für die Proteinbiosynthese.

Bei allen drei Grundbausteinen fand eine komplette Inhibierung der entsprechenden Biosynthesen in hBD3-behandelten Zellen statt. Es kann also kein Rückschluss auf einen spezifischen Angriffspunkt von hBD3 gezogen werden. Vielmehr scheinen energieabhängige Syntheseprozesse und/oder die Aufnahme der Metabolite in die Zellen global durch hBD3-Behandlung blockiert zu werden.

3.3 Transkriptionsanalyse hBD3-behandelter *Staphylococcus aureus*-Zellen

Das Transkriptionsprofil von *S. aureus*-Zellen, die mit subinhibitorischer hBD3-Konzentration behandelt worden waren, wurde untersucht, um das Expressionsmuster dieser Zellen mit dem solcher Zellen zu vergleichen, die mit anderen antimikrobiellen Peptiden oder Antibiotika behandelt worden waren (Cirz et al., 2007; Cui et al., 2005; Kuroda et al., 2000; Utaida et al., 2003). Dies könnte wichtige Hinweise auf die Wirkungsweise von hBD3 liefern. Es wurde sowohl die unmittelbare Antwort auf hBD3-Stress, als auch der Langzeit-Effekt von hBD3 auf die Genexpression untersucht. Beide Ansätze könnten wertvolle Informationen über potentielle Zielmoleküle oder Ziel-Stoffwechselwege von hBD3 sowie über die Lebensweise von Staphylokokken, die diesem Defensin ausgesetzt sind, liefern.

3.3.1 Bestimmung einer subinhibitorischen Peptidkonzentration

Um spezifisch die durch hBD3 hervorgerufenen Effekte in den Transkriptionsprofilen zu sehen, musste die Peptidkonzentration so gewählt werden, dass die Zellen nicht nur eine generelle Stressantwort, sondern möglichst eine charakteristische Reaktion auf das verwendete Peptid zeigten. Die Peptidkonzentration wurde daher so gewählt, dass nur ein ganz geringer inhibitorischer Effekt auf wachsende Zellen zu sehen war. Keinesfalls sollte die Bakterienkultur von der Peptidkonzentration komplett abgetötet werden. Um eine solche sublethale hBD3-Konzentration zu ermitteln, wurde eine Wachstumskurve von *S. aureus* SG511 in B-Bouillon in Anwesenheit von verschiedenen Peptidkonzentrationen aufgenommen (s. Abbildung 3.5).

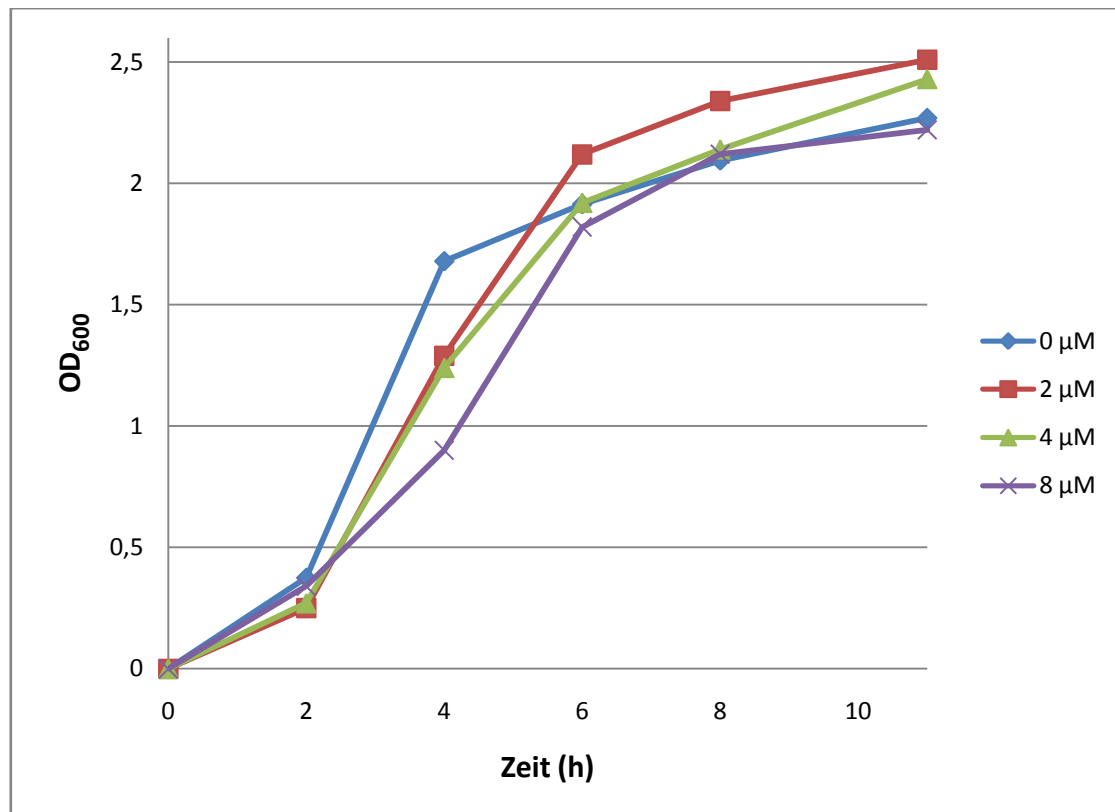


Abbildung 3.5. Wachstumskurve von *S. aureus* SG511 in B-Bouillon zur Ermittlung einer subinhibitorischen Peptidkonzentration. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 0 μM (blaue Rauten), 2 μM (rote Quadrate), 4 μM (grüne Dreiecke) oder 8 μM (lila Kreuze) hBD3 bei 37°C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert und ihr Wachstum über 11 h beobachtet.

Bereits bei 2 μM (entspricht 1/8 der MHK von 16 μM) hBD3 war ein leichter Effekt auf das Wachstumsverhalten zu sehen. Daher wurde diese Konzentration als sublethale hBD3-Konzentration festgesetzt und für sämtliche Microarray-Analysen verwendet.

3.3.2 Transkriptionelle Antwort auf Defensin-Stress

In Tabelle 3.2 und Tabelle 3.4 sind die Gene aufgeführt, die bei Behandlung von *S. aureus* SG511 mit subinhibitorischer hBD3-Konzentration im Kurz- und Langzeit-Experiment signifikant reguliert waren. Im Kurzzeit-Experiment wurden Zellen für 20 min einer subinhibitorischen hBD3-Konzentration ausgesetzt, im Langzeit-Experiment wuchsen sie über mehrere Stunden in Anwesenheit des Peptids bis zu einer OD_{600} von 1 (s. 2.27.1). Insgesamt waren die Änderungen in der Höhe der Genexpressionen mit 2-3facher Erhöhung/Erniedrigung in beiden Ansätzen bis auf wenige Ausnahmen sehr moderat. Ein großer Teil der beteiligten Gene gehörte zu der Gruppe, deren Proteinfunktion bisher unbekannt ist (hypothetische Proteine).

Tabelle 3.2: Liste aller in hBD3-behandelten *S. aureus* SG511-Zellen \geq 2fach hochregulierten Gene.

| Gen-ID (N315) | Name | Funktion | Prozess | Mittelwert des Medians der 532/635 Ratio | |
|---------------|-------------|---|---|--|------|
| | | | | KZE | LZE |
| SA0181 | | HP, Ähnlichkeit mit Isochorismatase | Metabolismus von Coenzymen und prosthetischen Gruppen | 2.0 | |
| SA0192 | | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein) | | 30.7 | 12.7 |
| SA0205 | | HP, Ähnlichkeit mit Lysostaphin-Vorläufer | Zellwand | 2.5 | |
| SA0219 | <i>pflA</i> | Format-Acetyltransferase-aktivierendes Enzym | Metabolismus von Kohlenhydraten und ähnlichen Molekülen | 2.9 | |
| SA0244 | | HP, Ähnlichkeit mit Teichonsäurebiosyntheseprotein F | Zellwand | 2.2 | |
| SA0336 | | HP | | 2.5 | |
| SA0427 | | konserviertes HP | | 2.1 | |
| SA0521 | <i>sdrE</i> | Ser-Asp reiches Fibrinogen-bindendes Protein | Pathofaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren) | | 2.2 |
| SA0591 | | HP | | 2.9 | |
| SA0647 | | HP | | 2.1 | |
| SA0648 | | konserviertes HP | | 2.2 | |
| SA0750 | | konserviertes HP | | 2.3 | |
| SA0824 | | konserviertes HP | | 2.2 | |
| SA0825 | <i>spsA</i> | Typ-I Signalpeptidase | Proteinsekretion | 2.6 | |
| SA0826 | <i>spsB</i> | Typ-I Signalpeptidase 1B | Proteinsekretion | 2.1 | |
| SA0903 | | konserviertes HP | | 3.9 | |
| SA0909 | <i>fmtA</i> | FmtA, Autolyse und Methicillin-Resistenz-bezogenes Protein | Pathofaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren) | 2.6 | |
| SA1201 | <i>trpD</i> | Anthranilate Phosphoribosyltransferase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 2.4 |
| SA1202 | <i>trpC</i> | Indol-3-glycerolphosphat-Synthase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 4.6 |
| SA1203 | <i>trpF</i> | Phosphoribosylanthranilat-Isomerase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 3.2 |
| SA1204 | <i>trpB</i> | Tryptophan-Synthase beta-Kette | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 4.5 |
| SA1205 | <i>trpA</i> | Tryptophan-Synthase alpha-Kette | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 2.7 |
| SA1227 | <i>dapA</i> | Dihydrodipicolinat-Synthase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 2.6 |
| SA1228 | <i>dapB</i> | Dihydrodipicolinat-Reduktase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | | 2.3 |
| SA1237 | | HP, Ähnlichkeit mit 5-Bromo-4-Chloro-indolyolphosphat-Hydrolyse Protein <i>xpaC</i> | Phosphatmetabolismus | 2.1 | |
| SA1316 | | konserviertes HP | | 2.6 | |
| SA1442 | | HP, Ähnlichkeit mit Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase | Metabolismus von Coenzymen und prosthetischen Gruppen | 2.0 | |
| SA1549 | | HP, Ähnlichkeit mit Serine-Proteinase Do, Hitzeschockprotein <i>htrA</i> | Anpassung an atypische Bedingungen | 2.7 | |

Tabelle 3.2. Fortsetzung.

| Gen-ID (N315) | Name | Funktion | Prozess | Mittelwert des Medians der 532/635 Ratio | |
|---------------|-------------|---|--|--|------|
| SA1601 | | konserviertes HP | | 2.1 | |
| SA1659 | <i>prsA</i> | Peptidyl-prolyl cis/trans-Isomerase-Homolog | Proteinfaltung | 2.6 | 2.4 |
| SA1666 | | Zweikomponentensystem-Transkriptionsregulator-Homolog | RNA-Synthese - Regulation | 2.1 | |
| SA1691 | <i>sgtB</i> | HP, Ähnlichkeit mit Penicillin-bindendem Protein 1A/1B | Zellwand | 2.1 | |
| SA1700 | <i>vraR</i> | Zweikomponentensystem Transkriptionsregulator | RNA-Synthese - Regulation | 2.4 | |
| SA1701 | <i>vraS</i> | Zweikomponentensystem Histidinkinase | Sensoren (Signaltransduktion) | 2.8 | |
| SA1702 | | konserviertes HP | | 2.9 | |
| SA1703 | | HP | | 2.2 | |
| SA1712 | | konserviertes HP | | 2.7 | |
| SA1748 | | HP, Ähnlichkeit mit Transkriptionsregulator, GntR Familie | RNA-Synthese - Regulation | 2.1 | |
| SA1985 | | HP | | | 2.2 |
| SA1986 | | HP | | | 2.3 |
| SA2106 | | HP, Ähnlichkeit mit Protein von pXO2-46 | | 2.3 | |
| SA2113 | | HP | | 3.1 | |
| SA2125 | | HP, Ähnlichkeit mit Formiminoglutamase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 2.0 | |
| SA2142 | | HP, Ähnlichkeit mit Multiresistenzprotein | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | | 2.1 |
| SA2143 | | konserviertes HP | | | 2.4 |
| SA2146 | <i>tcaA</i> | TcaA Protein | | 3.0 | |
| SA2185 | <i>narG</i> | Nitratreduktase Alpha-Kette | Membran-Bioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase) | 4.2 | -3.1 |
| SA2220 | | konserviertes HP | | 2.2 | |
| SA2221 | | HP | | 2.2 | |
| SA2296 | | HP Ähnlichkeit Transkriptionsregulator, MerR Familie | RNA-Synthese - Regulation | 2.2 | |
| SA2415 | | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter (Permease) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 4.6 | 2.1 |
| SA2416 | | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 3.0 | 2.1 |
| SA2481 | | konserviertes HP | Zellwand | 2.6 | |
| SA2492 | <i>vraD</i> | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 57.6 | 30.5 |
| SA2493 | <i>vraE</i> | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter (Permease) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 47.6 | 18.4 |
| SAS055 | <i>tnp</i> | verkürzte Transposase | Transposon und IS | 2.2 | |

KZE, Kurzzeit-Experiment; LZE, Langzeit-Experiment; HP, Hypothetisches Protein

Im Kurzzeit-Experiment waren insgesamt 100 Gene signifikant reguliert. Davon waren 43 Gene in Defensin-behandelten Zellen hoch-, 55 Gene herabreguliert. In den langfristig dem

Defensin ausgesetzten Zellen waren mit 26 Genen (19 Gene hoch-, 7 herabreguliert) deutlich weniger Gene in ihrer Expression verändert. In beiden Ansätzen fielen jedoch zwei Gene besonders auf: *vraD* (SA2492) und *vraE* (SA2493) waren bis zu 57fach hochreguliert. Diese beiden Gene codieren für einen bislang nicht näher charakterisierten ABC-Transporter. Die Expression von drei Genen, die für weitere zwei hypothetische ABC-Transporter codieren, war ebenfalls deutlich erhöht (SA0192, 30fache Induktion; SA2415 und SA2416, 2,1 fache Induktion). Solche ABC-Transporter könnten die Zellen möglicherweise entgiften, indem sie das Peptid von der Cytoplasmamembran weg pumpen, bevor es seine Wirkung entfalten kann. Des Weiteren waren 11 von 15 Genen, die nach McAleese et al. (2006) zum sogenannten „Kern-Zellwandstress-Stimulon“ gehören und als Antwort auf Zellwandstress hochreguliert werden, in der Kurzzeitantwort in ihrer Expression erhöht (s. Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3. Liste der 15 Gene, die nach McAleese et al. (2006) zum Kern-Zellwandstress-Stimulon gehören und ihre Regulation in hBD3-behandelten *S. aureus* SG511-Zellen (Kurzzeit-Experiment).

| Gen-ID (N315) | Name | Funktion | Prozess | Mittelwert des Medians der 532/635 Ratio |
|---------------|-------------|---|--|--|
| SA0909 | <i>fmtA</i> | FmtA, Autolyse und Methicillin-Resistenz-bezogenes Protein | Pathofaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren) | 2,6 |
| SA1549 | | HP, Ähnlichkeit mit Serine-Proteinase Do, Hitzschockprotein <i>htrA</i> | Anpassung an atypische Bedingungen | 2,7 |
| SA1659 | <i>prsA</i> | Peptidyl-prolyl cis/trans-Isomerase-Homolog | Proteinfaltung | 2,6 |
| SA1691 | <i>sgtB</i> | HP, Ähnlichkeit mit Penicillin-bindendem Protein 1A/1B | Zellwand | 2,1 |
| SA1701 | <i>vraS</i> | Zweikomponentensystem Histidinkinase | Sensoren (Signaltransduktion) | 2,8 |
| SA1702 | | konserviertes HP | | 2,9 |
| SA1703 | | HP | | 2,2 |
| SA1712 | | konserviertes HP | | 2,7 |
| SA1926 | <i>murZ</i> | UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyl-vinyl-Transferase 2 | Zellwand | n.s. |
| SA2103 | | HP, Ähnlichkeit mit LytR | RNA-Synthese - Regulation | n.s. |
| SA2146 | <i>tcaA</i> | TcaA Protein | | 3,0 |
| SA2220 | | konserviertes HP | | 2,2 |
| SA2221 | | HP | | 2,2 |
| SA2297 | | HP, Ähnlichkeit mit GTP-Pyrophosphokinase | Metabolismus von Nukleotiden und Nucleinsäuren | n.s. |
| SA2343 | | HP | | n.s. |

HP, Hypothetisches Protein; n.s., nicht signifikant

Auch das Zweikomponentensystem VraRS, das eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Zellwandstress spielt (Gardete et al., 2006; Kuroda et al., 2003; McAleese et al., 2006; Sobral et al., 2007; Utaida et al., 2003; Yin et al., 2006), war signifikant hochreguliert. Dies deutet einen Zellwand-schädigenden Effekt von hBD3 an. Ein weiteres auffälliges Gen war *tcaA*, das 3fach in seiner Expression erhöht war. Dieses Gen codiert für ein Membranprotein, das in einer anderen Studie als Antwort auf Glykopeptid-Behandlung hochreguliert worden war (Maki et al., 2004).

Bei den herunterregulierten Genen (Tabelle 3.4) fielen einige Gene auf, die mit anaerobem Wachstum in Zusammenhang stehen. Ein in die Nitratatmung involvierter Regulator, SA2189, (Neubauer et al., 1999) war in beiden Experimenten in der Expression verringert.

Tabelle 3.4. Liste der in hBD3-behandelten *S. aureus* SG511-Zellen signifikant (≥ 2 fach) herunterregulierten Gene.

| Gen-ID (N315) | Name | Funktion | Prozess | 1/ Mittelwert des Medians der 532/635 Ratio | |
|---------------|-------------|---|---|---|-----|
| | | | | KZE | LZE |
| SA0175 | | konserviertes HP | | 6.3 | |
| SA0218 | <i>pflB</i> | Format-Acetyltransferase | Metabolismus von Kohlenhydraten und ähnlichen Molekülen | 2.7 | |
| SA0232 | <i>lctE</i> | L-Laktat-Dehydrogenase | Metabolismus von Kohlenhydraten und ähnlichen Molekülen | 12.7 | |
| SA0236 | | HP, Ähnlichkeit mit PTS Fruktose-spezifischer Enzym IIBC-Komponente | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.0 | |
| SA0249 | <i>scdA</i> | Zellteilung- und Morphogenese-bezogenes Protein | Zellteilung | 2.1 | |
| SA0252 | <i>lrgA</i> | Holin-ähnliches Protein LrgA | Phagenbezogene Funktionen | 3.3 | |
| SA0271 | | konserviertes HP | | 3.2 | |
| SA0293 | | HP, Ähnlichkeit mit Formatttransporter NirC | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 7.9 | |
| SA0325 | <i>glpT</i> | Glycerol-3-phosphat-Transporter | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.7 | |
| SA0347 | | HP, Ähnlichkeit mit Cystathionin-Gamma-Synthase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 2.4 | |
| SA0420 | | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.0 | |
| SA0423 | | HP, Ähnlichkeit mit Autolysin (N-Acetylmuramyl-N-Alanin-Amidase) | Zellwand | 2.4 | |
| SA0432 | <i>treP</i> | PTS enzyme II, Phosphoenolpyruvat-abhängig, Trehalose-spezifisch | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.3 | |
| SA0511 | | HP, Ähnlichkeit mit UDP-Glukose 4-Epimerase-Protein | Metabolismus von Nukleotiden und Nucleinsäuren | 2.4 | |
| SA0589 | | HP, Ähnlichkeit mit ABC-transporter (ATP-bindendes Protein) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.1 | |

Tabelle 3.4. Fortsetzung.

| Gen-ID (N315) | Name | Funktion | Prozess | 1/ Mittelwert des Medians der 532/635 Ratio | |
|---------------|--------------|--|---|---|------|
| SA0654 | <i>fruB</i> | Fruktose-1-Phosphat-Kinase | Metabolismus von Kohlenhydraten und ähnlichen Molekülen | 2.1 | |
| SA0707 | | konserviertes HP | | 3.0 | |
| SA0726 | <i>gapR</i> | Glykolytischer Operonregulator | RNA-Synthese - Regulation | 2.7 | |
| SA0746 | | Staphylokokken-Nuklease | Pathofaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren) | 2.2 | |
| SA0747 | <i>cspC</i> | Kälteschock-Protein C | Anpassung an atypische Bedingungen | 3.4 | |
| SA0769 | | ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein-Homolog) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.2 | |
| SA0917 | <i>purK</i> | Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, Carbon-Dioxid-Fixierungs-Kette PurK Homolog | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 2.7 | |
| SA0918 | <i>purC</i> | Phosphoribosylaminoimidazolsuccinocarboxyamid-Synthetase-Homolog | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 3.2 | |
| SA0919 | | konserviertes HP | | 3.6 | |
| SA0920 | <i>purQ</i> | Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase I PurQ | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 3.6 | |
| SA0921 | <i>purL</i> | Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthetase PurL | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 3.0 | |
| SA0939 | | konserviertes HP | | 2.1 | |
| SA0995 | <i>sdhA</i> | Succinate-Dehydrogenase-Flavoprotein Untereinheit | Metabolismus von Kohlenhydraten und ähnlichen Molekülen -TCA Zyklus | 2.2 | |
| SA1041 | <i>pyrR</i> | Pyrimidinoperon Repressor A-Kette | RNA-Synthese - Regulation | 2.6 | 2.4 |
| SA1042 | <i>pyrP</i> | Uracilpermease | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 6.6 | 3.1 |
| SA1043 | <i>pyrB</i> | Aspartattranscarbamoylase A-Kette | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 8.8 | 3.0 |
| SA1044 | <i>pyrC</i> | Dihydroorotase | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 9.2 | 2.0 |
| SA1045 | <i>pyrAA</i> | Carbamoylphosphat-Synthase, kleine Kette | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 8.7 | |
| SA1046 | <i>pyrAB</i> | Carbamoylphosphat-Synthase, große Kette | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 6.1 | |
| SA1047 | <i>pyrF</i> | Orotidine-5-Phosphat-Decarboxylase | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 5.4 | |
| SA1048 | <i>pyrE</i> | Orotatphosphoribosyltransferase | Metabolismus von Nucleotiden und Nucleinsäuren | 4.3 | |
| SA1049 | | HP | | 3.3 | |
| SA1164 | <i>dhoM</i> | Homoserin-Dehydrogenase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 2.1 | |
| SA1174 | <i>lexA</i> | SOS regulatisches Protein LexA | RNA-Synthese - Regulation | 2.1 | |
| SA1226 | <i>asd</i> | Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 2.1 | +2.9 |
| SA1272 | | Alanine-Dehydrogenase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 3.8 | |
| SA1323 | <i>srrA</i> | Respiratorisches Transkriptionsregulatorprotein SrrA in Staphylokokken | RNA-Synthese - Regulation | 2.4 | |
| SA1339 | <i>malR</i> | Maltose-Operon Transkriptionsrepressor | RNA-Synthese - Regulation | 2.3 | |

Tabelle 3.4. Fortsetzung.

| Gen-ID (N315) | Name | Funktion | Prozess | 1/ Mittelwert des Medians der 532/635 Ratio | |
|---------------|-------------|---|--|---|-----|
| SA1435 | | HP, Ähnlichkeit mit Acetyl-CoA Carboxylase (Biotin-Carboxyl-Träger Untereinheit), <i>accB</i> Homolog | Lipidstoffwechsel | 2.4 | |
| SA1617 | | HP, Ähnlichkeit mit latentem nuklearen Antigen [Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus] | Gemischtes | 2.2 | |
| SA1718 | <i>putP</i> | Prolinpermease mit hoher Affinität | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.5 | |
| SA1858 | <i>ilvD</i> | Dihydroxy-Säure- Dehydratase | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 2.1 | |
| SA1996 | <i>lacB</i> | Galaktose-6-Phosphat-Isomerase LacB Untereinheit | Metabolismus von Kohlenhydraten und ähnlichen Molekülen | 2.0 | |
| SA2029 | <i>rplO</i> | 50S Ribosomales Protein L15 | Proteinsynthese - Ribosomale Proteine | 3.0 | |
| SA2062 | | HP | | 2.8 | |
| SA2183 | | HP, Ähnlichkeit mit Nitratreduktase, delta Kette | Membran-Bioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase) | | 3.2 |
| SA2189 | | HP, Ähnlichkeit mit NirR | Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen | 2.6 | 5.6 |
| SA2200 | | HP, Ähnlichkeit mit ABC-Transporter, (ATP-bindende Untereinheit) | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.0 | |
| SA2268 | | HP | | 11.2 | |
| SA2295 | <i>gntR</i> | Gluconate-Operon Transkriptionsrepressor | RNA-Synthese - Regulation | 3.3 | |
| SA2300 | | HP, Ähnlichkeit mit Glucarattransporter | Transport-/Binde-Proteine und Lipoproteine | 2.1 | |
| SA2463 | <i>lip</i> | Triacylglycerol-Lipase Vorläufer | Pathofaktoren (Toxine und Kolonisationsfaktoren) | 2.2 | |

KZE, Kurzzeit-Experiment; LZE, Langzeit-Experiment; HP, Hypothetisches Protein

Des Weiteren wurde die Expression von *lctE*, einem Gen, das für eine L-Laktat-Dehydrogenase codiert, in den Kurzzeit-hBD3-behandelten Zellen um mehr als 12fach reduziert. Auch *srrA* und *nirC* waren herabreguliert. Das Gen *srrA* codiert für den Transkriptionsregulator („response regulator“) des Zweikomponenten-Regulationssystems SrrAB, der ein globaler Regulator des aerob-anaerob Wechsels zu sein scheint. NirC (SA0293) wurde von Fuchs et al. (2007) ebenfalls mit anaeroben Wachstum in Zusammenhang gebracht. Außer diesen mit Anaerobiose in Zusammenhang stehenden Genen wurden sowohl zwei Transkriptionsrepressoren und drei Zuckertransporter, als auch Gene des Purin- und Pyrimidinstoffwechsels herunterreguliert. Eine verringerte Expression des Nukleotidstoffwechsels war in anderen Untersuchungen als Antwort auf Ciprofloxacin- und Säureschockbehandlung beobachtet worden (Bore et al., 2007; Cirz et al., 2007).

In den Zellen, die hBD3 über einen längeren Zeitraum ausgesetzt worden waren (Langzeit-Experiment), waren insgesamt nur sehr wenige Gene signifikant in ihrer Expression

verändert. Unter den hochregulierten Genen tauchten Gene des Lysin- und Tryptophanstoffwechsels auf, die im Kurzzeitexperiment nicht signifikant in ihrer Expression verändert waren.

3.4 Untersuchung einer *vraE* Knock-out Mutante

Die auffällig stark erhöhte Expression des ABC-Transporters VraDE im Transkriptionsprofil könnte auf eine Rolle des Transporters in der zellulären Antwort von Staphylokokken auf Stress durch kationische antimikrobielle Peptide hindeuten. Um die potentielle Funktion des Transporters als Resistenzmechanismus näher zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *vraE*-Knockout-Mutante hergestellt und physiologisch untersucht.

3.4.1 Inaktivierung des ABC-Transporters VraDE

Die Inaktivierung des ABC-Transporters VraDE erfolgte über den Austausch eines zentralen, ca. 800 bp großen Bereiches des Gens *vraE* durch eine Erythromycin-Resistenzkassette. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor konstruiert, bei dem eine aus pUC19-Ery gewonnene Erythromycin-Resistenzkassette von zwei Sequenzbereichen aus *vraE* flankiert wurde (s. Abbildung 3.6). Das entstehende Konstrukt wurde anschließend in den Vektor pTV0mcs eingebracht. Sämtliche im Rahmen der Klonierung verwendeten Primer sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5. Liste der im Rahmen der Inaktivierung von *vraE* verwendeten Primer. Eingebaute Restriktionsschnittstellen in den Primersequenzen sind unterstrichen dargestellt.

| Primer | Sequenz (5'-3') | Restriktionsschnittstellen |
|-----------|--|----------------------------|
| vraE-I-F | TAAA <u>AAGCTT</u> CGTTTTCAAAA <u>ACTTACGAC</u> AAAA | <i>HindIII</i> |
| vraE-I-R | AGC <u>CTGCAG</u> GGGCATCAGTTTTAATTGAATCTTTC | <i>PstI</i> |
| vraE-II-F | ATCGGATCCTCAACTCACCTGTCGTCGAA | <i>BamHI</i> |
| vraE-II-R | TTTGAATT <u>CCA</u> ATTTGTTTGAATGTACAAAAGCA | <i>EcoRI</i> |
| Ptv0INS1 | GATTTACATATGAGTTATGCAG | |
| Ptv0INS2 | CGCTCATGGTCAATATCATC | |
| vraD-F | TGTCGAAAGCAACAATGGAA | |
| SAS091-R | AAGCGCCACCTAATAAACCA | |

Das vordere klonierte Fragment aus *vraE* wies eine Größe von 559 bp auf und entsprach hinsichtlich seiner Sequenz einem Bereich am 5'-Ende des Gens, das hintere Fragment wies eine Größe von 542 bp auf und entsprach einem Bereich am 3'-Ende des Gens. Die für die Klonierungen notwendigen Restriktionsendonuklease-Schnittstellen wurden durch Basenaustausche an den 5'-Enden der verwendeten PCR-Primer generiert. Die Fragmente wurden im ersten Schritt in den Vektor pUC19-Ery stromab- bzw. stromaufwärts des Erythromycin-Gens eingefügt (s. Abbildung 3.6).

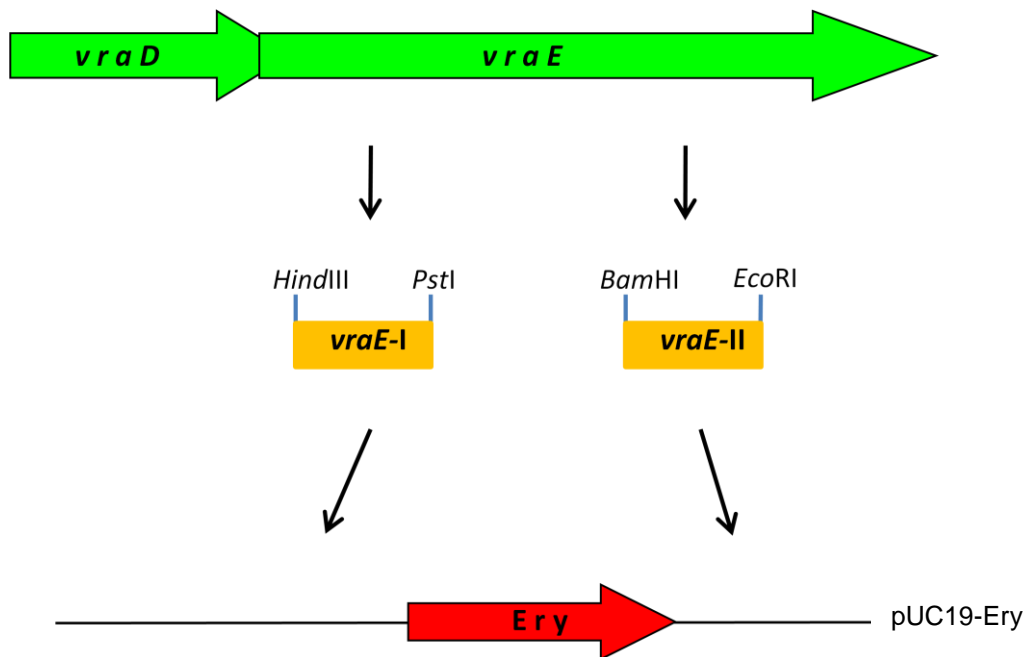


Abbildung 3.6. Schematische Darstellung der Konstruktion von pVSvraE-II.

Das entstehende, ca. 2200 bp große Konstrukt wurde anschließend mit *HindIII* und *EcoRI* aus dem entstandenen Vektor pVSvraE-II ausgeschnitten und in den temperatursensitiven Vektor pTV0mcs eingeführt, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert worden war. Dieser Vektor besitzt eine Chloramphenicolresistenz (*cat*) und einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Der daraus entstehende Vektor pVSvraE-Ery (s. Abbildung 3.7) wurde zunächst durch Protoplastentransformation (s. 2.25.6) in *S. carnosus* TM300 eingeführt.

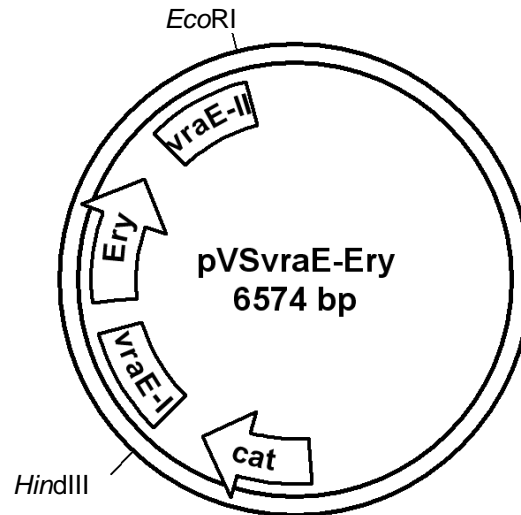
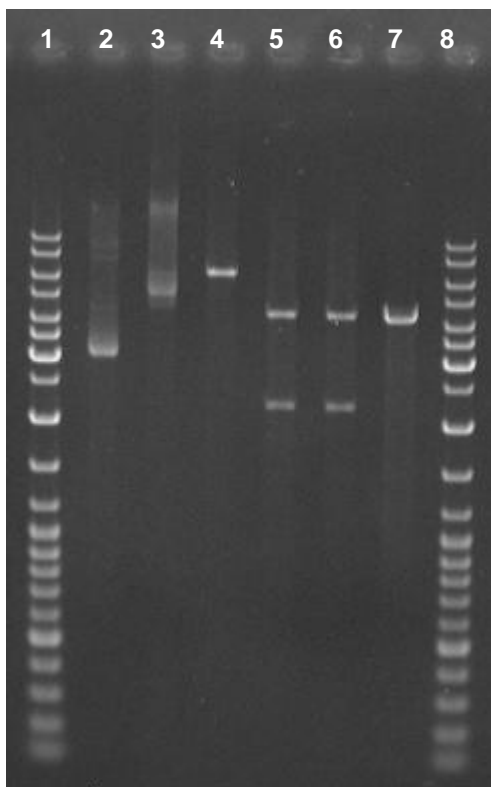


Abbildung 3.7. Vektorkarte von pVSvraE-Ery. Dieser Vektor entstand durch Einführung des *HindIII/EcoRI*-Konstruktes aus pVSvraE-II in den Vektor pTV0mcs.

Potentielle Transformanten wurden gegen Erythromycin selektiert. Positive Mutanten wurden über Testverdaue auf die Aufnahme des korrekten Plasmids überprüft (Abbildung 3.8).



Spur 1: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100)

Spur 2: pTV0mcs, unverdaut

Spur 3: pVSvraE-Ery aus Klon 1, unverdaut

Spur 4: pVSvraE-Ery aus Klon 1, *HindIII*-verdaut

Spur 5: pVSvraE-Ery aus Klon 1, *HindIII-EcoRI*-verdaut

Spur 6: pVSvraE-Ery aus Klon 2, *HindIII-EcoRI*-verdaut

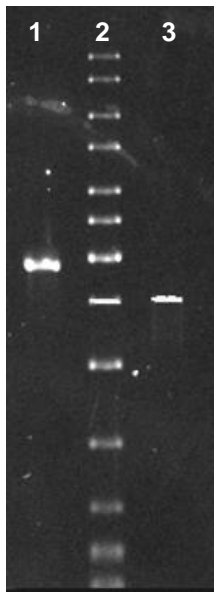
Spur 7: pTV0mcs, *HindIII-EcoRI*-verdaut

Spur 8: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (s.o.)

Abbildung 3.8 Nachweis der Insertion des ca. 2200 bp großen *HindIII/EcoRI*-Konstruktes aus pVSvraE-II in den Vektor pTV0mcs.

Aus einer positiven Mutante wurde das Plasmid anschließend wieder isoliert und in den Restriktionsendonuklease-negativen und dadurch durch Elektroporation transformierbaren Stamm *S. aureus* RN4220 gebracht. Aus einem Klon, der das korrekte Plasmid aufgenommen hatte, wurde pVS*vraE*-Ery dann wiederum isoliert und durch Phagentransduktion (s. 2.25.7) in den Zielstamm *S. aureus* SG511 eingeführt. Die erfolgreiche Aufnahme des Plasmids wurde mittels PCR überprüft. Durch Verwendung des Primerpaares PTV0INS1 und PTV0INS2, die sich an beiden Seiten der multiple cloning site von pTV0mcs anlagern und nur ein PCR-Produkt liefern, wenn das Plasmid pVS*vraE*-Ery zirkulär vorhanden ist, ließ sich nach erfolgreicher Transformation ein ca. 2200 bp großes Fragment amplifizieren.

Eine einfache homologe Rekombination (s. Abbildung 3.10) zwischen den *vraE*-Sequenzbereichen in pVS*vraE*-Ery und der genomischen *vraE*-Sequenz konnte in Stamm *S. aureus* SG511 pVS*vraE*-Ery spontan stattfinden. Um Kolonien zu selektieren, bei denen die Rekombination stattgefunden hatte, wurden die Zellen einer Temperatur von 44°C ausgesetzt und auf Erythromycin (EM)- und Chloramphenicol (CM)-haltigen Agarplatten inkubiert. Bei dieser Temperatur kann das temperatursensitive Plasmid pVS*vraE*-Ery nicht mehr repliziert werden. Es konnten also nur solche Kolonien auf den Selektionsplatten wachsen, die das Plasmid ins Chromosom integriert hatten, so dass die auf dem Plasmid vorhandenen Resistenzgene exprimiert werden konnten. Die Rekombination konnte sowohl mit dem vorderen als auch mit dem hinteren *vraE*-Fragment stattfinden, so dass zwei verschiedene Rekombinanten entstehen konnten. Trotz dieser unterschiedlichen Zwischenstufen ist jedoch die entstehende Mutante nach doppelt homologer Rekombination identisch. Die Bestätigung der erfolgreichen einfach homologen Rekombination erfolgte durch Sequenzierung der multiple cloning site inklusive Insert aus pVS*vraE*-Ery. Mittels PCR mit den Primern PTV0INS1 und PTV0INS2 wurde kontrolliert, dass kein freies Plasmid mehr in den Zellen vorlag; dem entsprechend durfte kein PCR-Produkt entstehen. Der positive Klon wurde als *Staphylococcus aureus* SG511 pVS*vraE*-Ery-IN bezeichnet. Zur Selektion einer Mutante, bei der eine doppelte homologe Rekombination (s. Abbildung 3.10) stattgefunden hatte, wurde eine Kultur von *Staphylococcus aureus* SG511 pVS*vraE*-Ery-IN wie unter 2.26 beschrieben behandelt, nach ca. 60 h parallel sowohl auf EM-haltige als auch auf CM-haltige Platten überimpft und bei 44°C inkubiert. Es konnte eine Kolonie isoliert werden, die auf EM-haltigen, nicht aber auf CM-haltigen Platten wuchs. Diese Mutante, bei der eine doppelt homologe Rekombination erfolgreich stattgefunden hatte, wurde durch PCR-Reaktionen und Sequenzierungen überprüft und als *S. aureus* SG511 Δ *vraE* benannt.



Spur 1: PCR *S. aureus* SG511 Δ *vraE*

Spur 2: O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900)

Spur 3: PCR *S. aureus* SG511 Wildtyp

Abbildung 3.9. PCR zum Nachweis des Klones *S. aureus* SG511 Δ *vraE* mit Primern *vraD*-F und SAS091-R.

Eine PCR-Kontrolle wurde mit Hilfe der Primer *vraD*-F und SAS091-R durchgeführt. *vraD*-F lagert sich innerhalb des Gens *vraD* an, welches unmittelbar stromaufwärts von *vraE* liegt; SAS091-R lagert sich innerhalb des Gens SAS091 an, welches unmittelbar stromabwärts von *vraE* liegt. Bei Integration des Erythromycin-Gens in *vraE* wurde ein PCR-Produkt von ca. 2900 bp Größe erwartet; ohne Integration sollte das PCR Produkt mit ca. 2500 bp Größe deutlich kleiner sein. Wie Abbildung 3.9 veranschaulicht, zeigte die Mutante ein PCR-Produkt in der korrekten Größe. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine PCR mit den Primern PTV0INS1 und SAS091R gemacht, bei der kein PCR-Fragment entstehen sollte, wenn das Plasmid desintegriert worden war. Abbildung 3.10 fasst die einzelnen Schritte der doppelt homologen Rekombination schematisch zusammen.

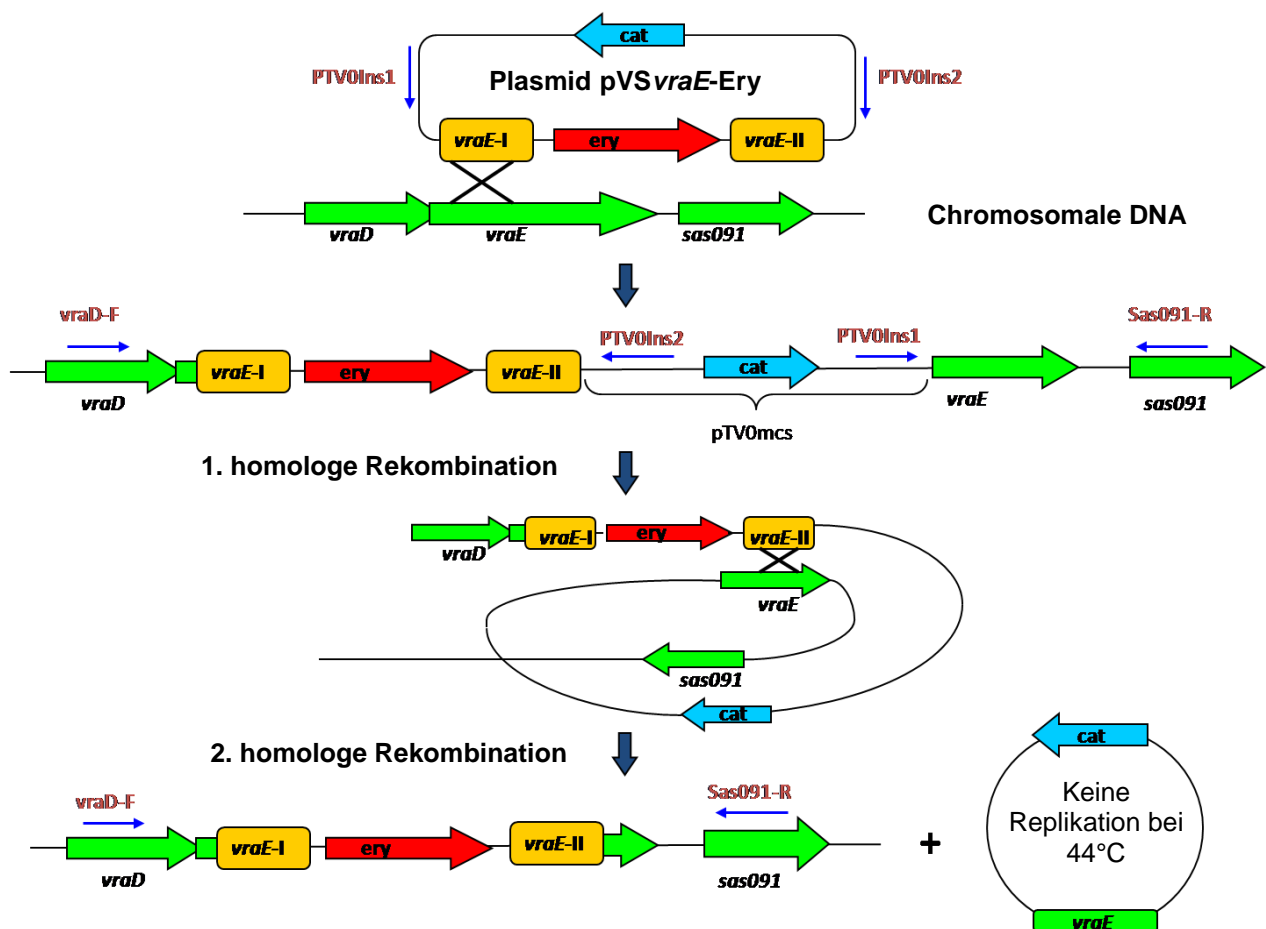


Abbildung 3.10. Schematische Darstellung der Inaktivierung von *vraE* durch doppelt homologe Rekombination. Die Rekombinationsschritte wurden durch PCR mit entsprechenden Primern nachgewiesen.

3.4.2 Minimale Hemmkonzentrationen gegen *Staphylococcus aureus* SG511 Δ *vraE*

Die *S. aureus* SG511 Δ *vraE*-Knockout Mutante wurde in einer MHK-Bestimmung in 50% Müller-Hinton-Medium auf seine Empfindlichkeit gegen hBD3 und weitere Peptide unterschiedlicher Substanzklassen getestet (Tabelle 3.6). Erwartungsgemäß war die Δ *vraE*-Mutante empfindlicher gegenüber hBD3 als der Wildtyp. Die Erhöhung der Empfindlichkeit war signifikant messbar, jedoch mit einem Faktor von ca. 2 eher gering. Des Weiteren war die Mutante gegen klassische Zellwandbiosynthese-Inhibitoren bis auf das β -Laktam-Antibiotikum Oxacillin empfindlicher als der Wildtyp, wobei die weitaus deutlichste Steigerung der Suszeptibilität gegen Bacitracin zu beobachten war. Bacitracin bindet den zentralen Lipid II-Träger C₅₅-Isoprenyl-Pyrophosphat, der Lipid II bei der Translokation aus dem Cytosol zur Außenseite bindet und der in der Membran verankert ist.

Während die Mutante gegen Oxacillin und Chloramphenicol resistenter war als der Wildtyp, war sie gegenüber dem linearen, kationischen, amphiphilen Peptid LL37 in seiner Empfindlichkeit fast unverändert. Bei Daptomycin (Lipopeptidantibiotikum) und Pep5 (Lantibiotikum), deren genaue Wirkungsmechanismen bislang ungeklärt sind bzw. kontrovers diskutiert werden, zeigte die Mutante eine erhöhte Empfindlichkeit.

Tabelle 3.6 Minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) von ausgewählten antimikrobiellen Substanzen gegen *S. aureus* SG511 (Wildtyp) und die *vraE*-Knockout-Mutante *S. aureus* SG511 $\Delta vraE$ in 50% Müller-Hinton-Medium.

| Peptid/ Antibiotikum | Charakteristika | MHK ($\mu\text{g/ml}$) für: | |
|-------------------------|---|-------------------------------|---------------|
| | | Wildtyp | $\Delta vraE$ |
| Bacitracin | Zellwandbiosynthese-Hemmer; Angriffsmolekül: Undecaprenyl- pyrophosphat | 12.0 | 2.0 |
| Nisin | Lantibiotikum; Zellwand- biosynthese-Hemmer; Angriffs- molekül: Lipid II; zusätzlich porenbildende Wirkung in Membranen | 3.8 | 1.2 |
| Vancomycin | Zellwandbiosynthese-Hemmer; Angriffsmolekül: Lipid II | 0.4 | 0.2 |
| Oxacillin | Zellwandbiosynthese-Hemmer; β -Laktamase, Hemmung der Transpeptidierung | 0.4 | 1.3 |
| LL-37 | α -helikales, kationisches anti- mikrobielles Peptid | 12.9 | 9.2 |
| Chloramphenicol | Proteinbiosynthese-Hemmer; Translationshemmer | 4.0 | 4.8 |
| Daptomycin | Lipopeptid-Antibiotikum; bislang unklarer Wirkungsmechanismus | 3.0 | 1.8 |
| hBD3 | Kationisches antimikrobielles Peptid; bislang unbekannter Wirkungsmechanismus | 7.4 | 4.2 |
| Pep5 | Lantibiotikum; keine Interaktion mit Lipid II | 2.0 | 0.5 |

3.5 Einfluss von hBD3 auf die Zellwandbiosynthese

Aufgrund der Hinweise aus den Transkriptionsprofilen hBD3-behandelter *S. aureus*-Zellen, dass hBD3 die Zellwandbiosynthese beeinträchtigen könnte, wurde der Effekt von hBD3 in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Zellwand-Experimenten getestet.

3.5.1 Akkumulation von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid in hBD3-behandelten Zellen

Kommt es bei der Behandlung von Bakterienzellen mit zellwandaktiven Substanzen wie Vancomycin zu einer Hemmung der späten, membranassoziierten Zellwandbiosynthesereaktionen, so sammelt sich die letzte lösliche Zellwand-Vorstufe, das UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid (UDP-MurNAc-Pentapeptid), im Cytoplasma der Zellen an (Kohlrausch & Holtje, 1991). Der Einfluss von hBD3 auf die späten Zellwandbiosynthesereaktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

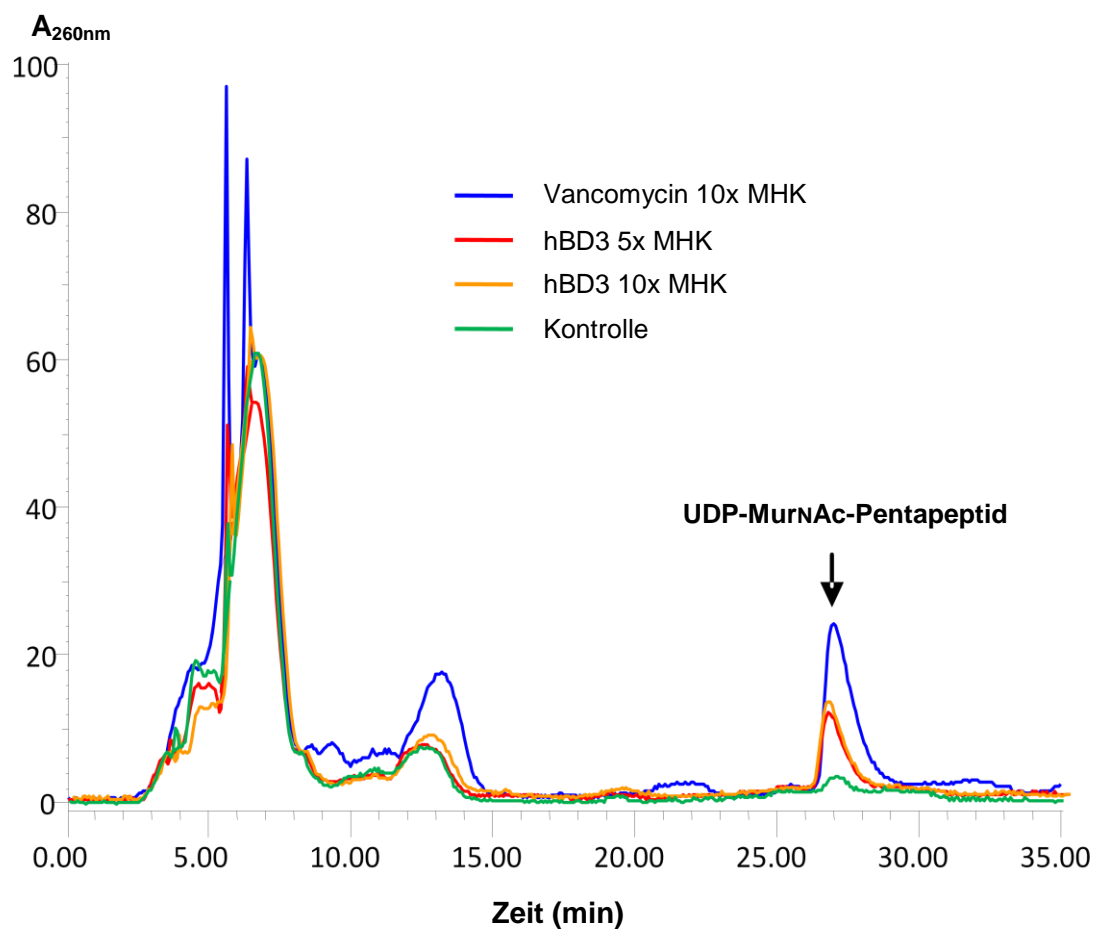


Abbildung 3.11. Analyse der Akkumulation von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid während hBD3-Behandlung. HPLC-Profile der Zellextrakte von *S. aureus* SG511-Zellen nach Inkubation ohne Antibiotikum (grün, Negativkontrolle), mit Vancomycin (blau, 10x MHK, Positivkontrolle), oder mit hBD3 (rot, 5x MHK; orange, 10x MHK). Die Detektion der nukleotidhaltigen Zellkomponenten erfolgte bei 260 nm.

Nach Behandlung wachsender Zellen mit hBD3 und 30-minütiger Inkubation in 50% Müller-Hinton-Medium wurden die Zellen abgeerntet, aufgeschlossen und die löslichen, cytoplasmatischen Zellwandvorstufen durch Hitzeextraktion isoliert (siehe 2.14). Über HPLC wurden diese Bestandteile aufgetrennt und bei 260 nm detektiert. Wie Abbildung 3.11 zeigt, war sowohl bei 5x also auch bei 10x MHK eine deutliche Akkumulation von UDP-MurNAc-Penta-

peptid zu beobachten, auch wenn diese nicht so stark wie bei der Positivkontrolle mit Vancomycin ausgeprägt war. Dieses Ergebnis spricht sowohl für das Eingreifen von hBD3 in die späten, membranassoziierten Zellwandbiosynthesereaktionen als auch gegen eine membranzerstörende Wirkung durch das Peptid, bei der es zu einem Efflux der löslichen Zellkomponenten, inklusive UDP-MurNAc-Pentapeptid, kommen würde. Auch eine komplette Desenergetisierung der Zellen durch hBD3 ist damit auszuschließen, da bei Energiemangel keine Biosynthesereaktionen mehr in den Zellen ablaufen sollten. In der Negativkontrolle, bei der keine antimikrobielle Substanz zugegeben wurde, fand erwartungsgemäß keine Akkumulation statt.

3.5.2 Antagonisierung der Wirkung von hBD3 durch gereinigte Zellwand-Vorstufen

Um zu testen, ob Moleküle, die an der Zellwand-Biosynthese beteiligt sind, spezifisch mit hBD3 interagieren, wurde ein Antagonisierungstest durchgeführt (s. Tabelle 3.7). Dafür wurde eine MHK mit hBD3 gegen *S. aureus* SG511 in 50% Müller-Hinton-Medium in An- und Abwesenheit des potentiellen Antagonisten durchgeführt und verglichen. Das molare Verhältnis zwischen hBD3 und dem Antagonist wurde in den verschiedenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte variiert. Als Antagonisten wurden die gereinigten Zellwandvorstufen Lipid II und Undecaprenylphosphat (C₅₅-P), verkürzte Derivate von C₅₅-P und, zur Untersuchung der Spezifität der Antagonisierung, reine Phospholipide (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, DOPG) eingesetzt. Die wasserunlöslichen Antagonisten Lipid II, C₅₅-P und DOPG und das nur teilweise lösliche Molekül C₂₀-Phosphat wurden in Methanol, der komplett wasserlösliche Antagonist C₁₅-Phosphat in sterilem Aqua dest. gelöst.

Tabelle 3.7. Antagonisierung der Wirkung von hBD3 gegen *S. aureus* SG511 durch verschiedene Moleküle. Angegeben ist das molare Verhältnis, das einen Antagonisierungseffekt hervorrief.

| Antagonist | Molares Verhältnis (Antagonist:hBD3) |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Lipid II | 1:1 |
| C ₅₅ -Phosphat | 2:1 |
| C ₂₀ -Phosphat | 5:1 |
| C ₁₅ -Phosphat | - |
| DOPG | 2,5-5:1 |

Lipid II und C₅₅-P antagonisierten die Wirkung von hBD3 am effektivsten. Lipid II, die letzte membrangebundene Vorstufe des Peptidoglykans (s. Abbildung 1.7), antagonisierte schon bei einem molaren Verhältnis von 1:1 sämtliche hBD3-Moleküle, C₅₅-P, der „recycelte“

Lipid II-Träger, antagonisierte bei einem molaren Verhältnis von 2:1, also um einen Faktor schlechter. Reine Phospholipide (DOPG) antagonisierten die Wirkung von hBD3 noch schwächer, nämlich erst bei einem molaren Verhältnis von 2,5-5:1. Diese drei Moleküle haben gemein, dass sie Mizellen bilden können und so eine große hydrophobe und anionische Fläche bieten. C₂₀-Phosphat, die verkürzte Form von C₅₅-P, die durch ihren kürzeren Lipidschwanz teilweise wasserlöslich ist und vermutlich keine stabilen Mizellen mehr bildet, bewirkte erst bei einem 5:1 Verhältnis eine Antagonisierung der Wirkung von hBD3. Die komplett wasserlösliche Form C₁₅-Phosphat zeigte überhaupt keine antagonisierende Wirkung. Es lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass hBD3 nicht ausschließlich mit Lipid II, sondern auch mit C₅₅-P und Phospholipiden interagiert. Lipid II unterscheidet sich von C₅₅-P und DOPG in der Anzahl der Phosphatgruppen und damit in der Anzahl seiner negativen Ladungen. Lipid II besitzt zwei Phosphatgruppen, C₅₅-P und DOPG nur eine. Man könnte sich also vorstellen, dass die Affinität von hBD3 von der Anzahl der negativen Ladungen des Zielmoleküls abhängt. Dann überrascht jedoch, dass die Phospholipide schwächer antagonisierten als C₅₅-P. Die verkürzten Derivate von C₅₅-P, die wasserlöslich sind, zeigten dagegen kaum Antagonisierungseffekte. Es scheint also außerdem ein Zusammenhang zwischen Antagonisierungseffekt und Mizellenbildung zu geben.

3.5.3 Einfluss von hBD3 auf die PBP2-Reaktion *in vitro*

Um zu testen, ob hBD3 die PBP2-katalysierte Transglykosilierungsreaktion hemmt, wurde dessen Einfluss auf die Reaktion *in vitro* untersucht und mittels Dünnschichtchromatographie sichtbar gemacht (siehe 2.12 und 2.13). Als Substrat diente hierbei Lipid II, dessen Verschwinden seine Umsetzung durch PBP2 anzeigt. Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, erfolgte bei ansteigendem hBD3:Lipid II-Verhältnis eine deutliche und zunehmende Inhibierung der PBP2-katalysierten Reaktion. Dies wird durch das nicht umgesetzte Lipid II, welches als Bande auf einer charakteristischen Höhe zu sehen ist, angezeigt. In der Negativkontrolle, bei der keine antimikrobielle Substanz zugesetzt wurde, fand dagegen eine beinahe vollständige Umsetzung des Substrates statt, es ist hier daher nur eine sehr schwache Lipid II-Bande zu sehen. Wurde Moenomycin, das mit Lipid II um die Interaktion mit Transglykosylasen konkurriert und diese dadurch inaktiviert, als Positivkontrolle zu einem Ansatz gegeben, so wurde die Umsetzung von Lipid II erwartungsgemäß komplett inhibiert. Dieses Ergebnis spricht für eine Inhibierung der PBP2-katalysierten Reaktion durch hBD3, wobei bei diesem Assay nicht zwischen einer Inhibierung des Enzyms und einer Bindung von hBD3 an das Substrat Lipid II diskriminiert werden kann.

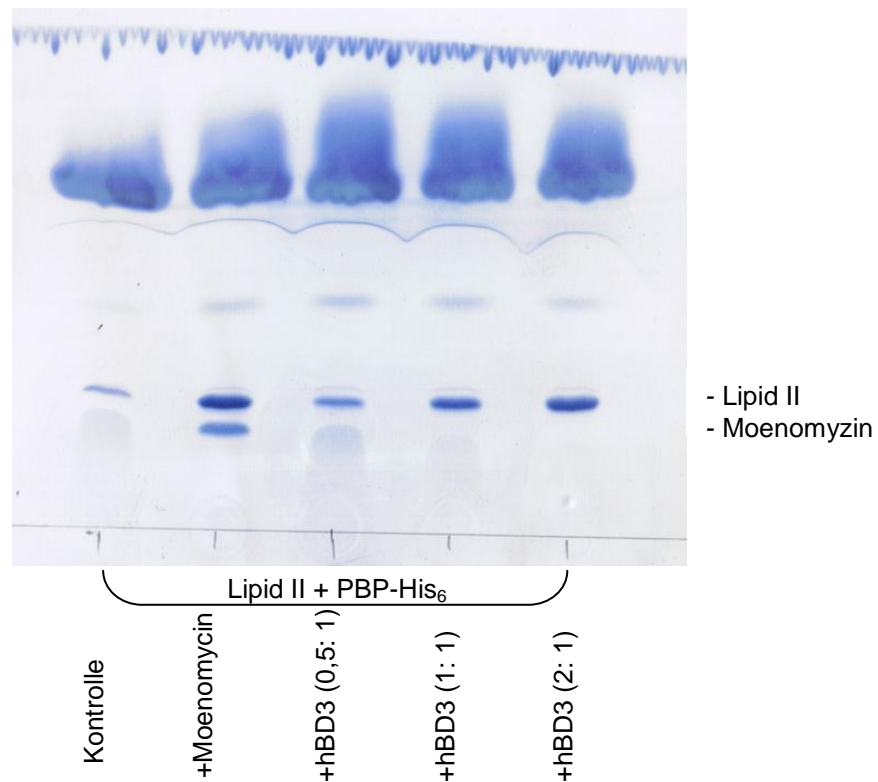


Abbildung 3.12. Hemmung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II durch hBD3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der *in vitro* Reaktionen. Sämtliche Ansätze enthielten Lipid II und PBP2-His₆. Kontrolle, ohne Zugabe weiterer Substanzen; Moenomycin, Positivkontrolle; hBD3, in Klammern ist das molare Verhältnis hBD3:Lipid II angegeben.

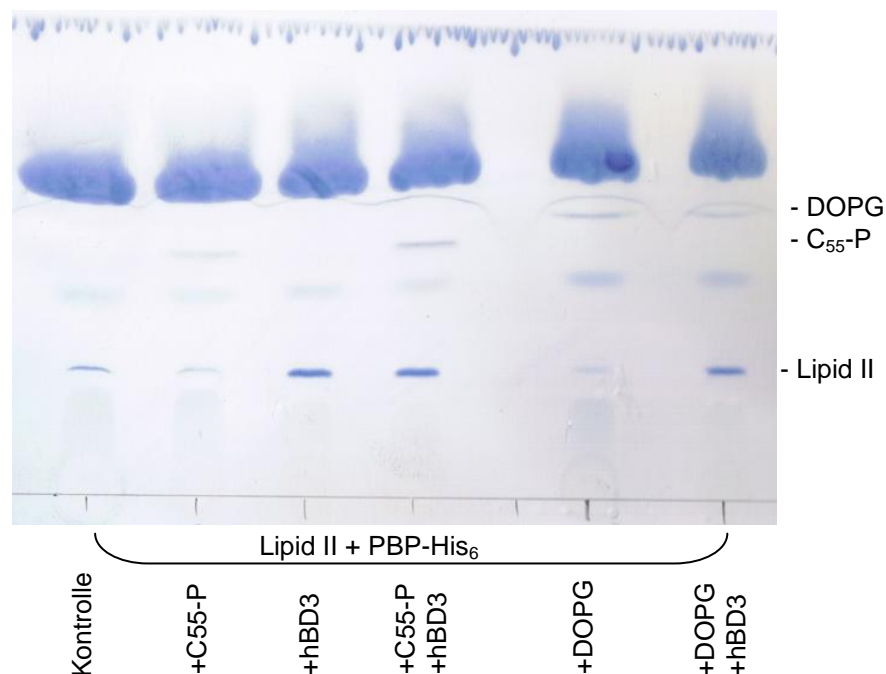


Abbildung 3.13. Hemmung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II durch hBD3 unter Zugabe von C₅₅-P/DOPC. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der *in vitro*-Reaktionen. Sämtliche Ansätze enthielten Lipid II und PBP2-His₆. Kontrolle, ohne Zugabe weiterer Substanzen; C₅₅-P, DOPC und hBD3 wurden jeweils in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu Lipid II eingesetzt.

Um zu testen, ob der hemmende Effekt von hBD3 auf die PBP2-katalysierte Reaktion durch die Zugabe von Undecaprenylphosphat (C_{55} -P) bzw. DOPC aufgehoben wird, wurde der analoge Versuch in Anwesenheit von diesen beiden Molekülen wiederholt, die in 3.5.2 neben Lipid II ebenfalls zu einer Antagonisierung der antimikrobiellen Wirkung von hBD3 geführt hatten. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen ist, hatte das Vorhandensein von C_{55} -P oder DOPC im Reaktionsansatz keinen Effekt auf die Hemmung der Umsetzung von Lipid II durch hBD3; die Reaktion wurde gleichermaßen gehemmt wie in dem Ansatz, in dem nur hBD3 zugesetzt worden war. In den Kontrollansätzen, in denen nur C_{55} -P oder DOPG zugegeben wurde, lief die Reaktion dagegen normal ab. Die Interaktion zwischen hBD3 und Lipid II scheint also stärker zu sein als die zwischen C_{55} -P oder DOPG und hBD3, da sonst C_{55} -P oder DOPC das zugegebene hBD3 zum Teil der PBP2-Reaktion entziehen sollten und folglich eine stärkere Umsetzung von Lipid II stattfinden müsste. Eine Quantifizierung des nicht umgesetzten Lipids II ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich, so dass lediglich qualitative Aussagen mittels des optischen Bildes getroffen werden können.

4 Diskussion

Bislang wurde angenommen, dass antimikrobielle Wirts-Abwehr-Peptide (engl.: Host Defense Peptides, HDPs) Mikroorganismen durch eine Permeabilisation der Zellmembran abtöten. Dies soll durch Bildung von faß- oder ringartigen Poren oder durch die großflächige Perturbation der Membranen („carpet model“), die dann zu der Bildung von Membranläsionen führt, geschehen (s. Einleitung). Für viele einzelne Peptide sind die genauen Mechanismen der Membranzerstörung auf der molekularen Ebene und mögliche andere Effekte jedoch nicht bekannt. Dies gilt auch für β -Defensine, darunter das hBD3. Allein im Rahmen der Erstbeschreibung des Peptids wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen hBD3-behandelter *S. aureus*-Zellen gemacht, die Ähnlichkeiten mit Aufnahmen Penicillin-behandelter Zellen aufwiesen und eine zellwandschädigende Wirkung von hBD3 andeuten könnten (Harder et al. 2001). Andere Untersuchungen zur Wirkungsweise von Defensinen beschäftigten sich bisher meist mit den Interaktionen der Peptide mit Modellmembranen, anhand derer die Art der Peptid-Membran Wechselwirkungen und der Porenbildung beschrieben wurden (Fujii et al., 1993; Hristova et al., 1996; Matsuzaki, et al., 1995; Matsuzaki et al., 1996; Morgera et al., 2008). Diese Untersuchungen geben jedoch keinen Aufschluß darüber, was tatsächlich an und in der lebenden Bakterienzelle geschieht, wenn sie Defensinen wie dem hBD3 ausgesetzt ist.

Um einen ersten Hinweis auf den Wirkungsort von hBD3 in *S. aureus* zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere physiologische Tests an ganzen Zellen durchgeführt. Es wurde der Einfluß von hBD3 auf das Membranpotential, auf den Efflux von Glutamat und auf den ungestörten Ablauf verschiedener Makromolekülbiosynthesen getestet. Die Ergebnisse, die aus diesen Tests gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass eine Zerstörung der bakteriellen Membran durch Porenbildung nicht der primäre Wirkungsmechanismus von hBD3 ist. Das Membranpotential von *S. aureus* SG511 wurde durch hBD3-Behandlung nur wenig beeinflusst, durchschnittlich konnte ein Abfall um 15 mV beobachtet werden. Bei einem typischen porenbildenden Agens würde man einen drastischeren Abfall des Membranpotentials beobachten, da dieses bei Membranzerstörung und damit einhergehendem Ausgleich der Ladungen zusammenbrechen sollte. Ein solcher Effekt kann beispielsweise bei Nisin-Behandlung in *Bacillus subtilis* beobachtet werden (Ruhr & Sahl, 1985); Nisin bildet durch Interaktionen mit dem Zellwandvorläufer Lipid II hochspezifische Poren (Breukink et al., 1999; Brötz et al., 1998; Wiedemann et al., 2001).

Wurden Zellen, die zunächst in Anwesenheit von radioaktiv-markiertem Glutamat angezogen worden waren, mit hBD3 behandelt, so kam es sofort zu einem deutlichen, wenn auch inkompletten Efflux des Markers. Dieser inkomplette Efflux von prä-akkumuliertem Marker

weist genau wie der schwache Effekt von hBD3 auf das Membranpotential darauf hin, dass keine komplette Zerstörung der Membranen stattfindet. Der Efflux kommt also nicht aufgrund einer Zerstörung der Membranen zustande. Ähnliche Beobachtungen machten Cociancich et al. (1993) mit einem Insekten-Defensin bei *Micrococcus luteus*. Sie beobachteten einen eher geringen Einfluss des Peptids auf das Membranpotential aber einen deutlichen Kaliumefflux aus behandelten Zellen. Der Kaliumefflux kam also nicht aufgrund einer Zerstörung der Membranen durch einen detergenzartigen Effekt zustande. In einer anderen Studie wurde der Wirkungsmechanismus verschiedener synthetischer, amphiphiler, kurzer, linearer Peptide untersucht (Pag et al., 2008). Das mit einer Nettoladung von +6 stark positiv geladene Peptid P19|6E führte in dem Laborstamm *Staphylococcus simulans* 22 zu einem kompletten Ausströmen von prä-akkumuliertem Glutamat sowie zu einem deutlicheren Abfall des Membranpotentials um etwa 40 mV. Solche Ergebnisse zeigen eher eine porenbildende Aktivität der eingesetzten Peptide an. Wurde jedoch das gleiche Peptid in verschiedenen klinischen *S. aureus*-Isolaten getestet, so waren die Effekte geringer. Es darf also für die Ergebnisse aus solchen Assays an ganzen Zellen nicht vergessen werden, dass die Effekte oft einer starken Stamm-Spezifität unterliegen. Es scheint, dass ein und dasselbe Peptid durchaus unterschiedliche Wirkungsmechanismen in verschiedenen Bakterien besitzen kann. Sahl et al. (2005) schlagen eine weitere Erklärung für geringe Effekte von verschiedenen hBD3-ähnlichen Peptiden auf das Membranpotential und den Efflux von Glutamat vor. In dieser Studie wurde die Wirkungsweise eines synthetischen Defensins und des dem hBD3 entsprechenden Defensins aus Gibbon-Affen (hcBD3) ebenfalls anhand von physiologischen Assays in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen und *S. simulans* untersucht. Es wurden auch hier nur relativ geringe Effekte der Peptide auf das Membranpotential und den Glutamatefflux beobachtet. Dieses wird von den Autoren durch die Heterogenität in Bakteriensuspensionen erklärt, in denen Subpopulationen vorhanden sind, die der Wirkung der Peptide entgehen und dadurch die gemessenen Effekte abmildern könnten. Es wird deutlich, dass solche Experimente nicht ausreichen, um einen molekularen Wirkungsmechanismus zu erklären, sondern lediglich, um erste Hinweise zu liefern, die dann weiter abgesichert werden müssen.

In den Abtötungskinetiken hBD3-behandelter *S. aureus* SG511-Zellen ist in der vorliegenden Arbeit eine schnelle und effektive Abtötung der Bakterien zu beobachten. Dies ist ein charakteristisches Merkmal von membranaktiven Substanzen (Pag et al., 2004), was den Ergebnissen der Membranpotentialmessungen und des Glutamateffluxes zu widersprechen scheint. Jedoch muss beachtet werden, dass mit dieser Art der Abtötungskinetiken, bei der die Zellen ausplattiert werden, nicht zwischen direktem Abtöten und dem Verhindern des Auswachsens einer Kolonie unterschieden werden kann. Das stark kationische hBD3 könnte

bei der Ausplattierung an die negativen Oberflächen der Bakterien gebunden bleiben und das Auswachsen einer Kolonie verhindern, ohne die Zellen unmittelbar abzutöten.

Die Ergebnisse der Einbauversuche mit radioaktiv-markierten Grundbausteinen der Zellwand-, Protein- und Nukleinsäurebiosynthese deuten an, dass Membran-assoziierte Prozesse wie der aktive Transport von Metaboliten durch hBD3-Stress inaktiviert werden. In allen Einbauversuchen kamen die Biosyntheseprozesse komplett zum Erliegen, sobald die Zellen hBD3 ausgesetzt waren. Die Aufnahme von Glutamat fand ebenso nicht einmal teilweise statt. Vermutlich wird die Membran durch hBD3 partiell beschädigt und/oder die für die Aufnahme der Grundbausteine zuständigen Transporter werden blockiert, so dass die energieabhängigen Prozesse der Glutamataufnahme und der Makromolekülbiosynthese gestört sind. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beobachteten Sahl et al. (2005) ebenfalls, dass DNA-, RNA-, Protein- und Peptidoglykanbiosynthese simultan blockiert wurden, wenn verschiedene *S. aureus*-Stämme mit dem oben erwähnten hcBD3 aus Affen oder mit einem synthetischen β -Defensin (tBD) behandelt wurden. Sie deuteten diesen Effekt als eine Desenergetisierung der Bakterienzellen, die alle wichtigen Biosynthesewege zum Erliegen bringt. Lehrer et al. (1989) machten die gleiche Beobachtung in *Escherichia coli* nach Behandlung mit α -Defensinen. Eine komplette Desenergetisierung der Zellen ist nach den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit jedoch unwahrscheinlich, da andere energieabhängige Biosyntheseprozesse, wie die Bildung von Zellwandvorstufen wie UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid offensichtlich in hBD3-behandelten Zellen noch stattfinden können. Es hat also den Anschein, als ob das Absterben der Bakterienzellen durch verschiedene Aktivitäten des Peptids hervorgerufen wird, bei denen sicherlich eine Beeinträchtigung der Membran und der für die Aufnahme von Grundbausteinen zuständigen Transporter eine Rolle spielt; es könnten darüber hinaus jedoch durchaus auch spezifische Interaktionen an bestimmten Stellen in der Zellwand für den Wirkungsmechanismus wichtig sein.

Um Aufschluß darüber zu erlangen, was in den Bakterienzellen selbst passiert, wenn sie hBD3 ausgesetzt werden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Antworten der Bakterienzellen auf Defensin-Stress auf transkriptioneller Ebene mittels der DNA-Microarray-Technologie untersucht. Ziel war es, Hinweise auf mögliche Zielmoleküle oder -biosynthesewege des Peptids zu erlangen. Um ein Transkriptionsprofil zu erhalten, wurden *S. aureus* SG511-Zellen mit einer subinhibitorischen hBD3-Konzentration behandelt. Eine solche sehr niedrige Peptidkonzentration wurde gewählt, um möglichst keine generelle Stressantwort, sondern eine spezifische Antwort auf dieses Peptid auszulösen. In einem ersten Ansatz wurden Zellen im exponentiellen Wachstum für 20 min dem Peptid ausgesetzt und anschließend ihr Transkriptionsstatus mittels Microarrays untersucht.

Einige Aspekte des entstandenen Profils ähneln der Antwort von *S. aureus* auf membranaktive Substanzen. Pag et al. (2008) untersuchten kürzlich das Transkriptionsprofil des oben erwähnte Peptids P19|6E, das so entwickelt worden war, dass es eine maximale Amphiphilie und antimikrobielle Aktivität besaß. In dieser Untersuchung wurde ebenfalls der Stamm *S. aureus* SG511 genutzt, so dass die Ergebnisse gut mit denen aus der vorliegenden Arbeit verglichen werden können. Das durch P19|6E induzierte Transkriptionsprofil zeigt einige Ähnlichkeiten, aber auch signifikante Differenzen zu dem durch hBD3 induzierten Profil. In beiden Untersuchungen waren Gene des anaeroben Stoffwechsels herunterreguliert, darunter die Lactat-Dehydrogenase *lctE*, das Gen SA2189, *srrA* und *nirC*. SA2189 codiert für ein NirR-ähnliches Protein, das in *S. carnosus* ein Regulator der Nitratatmung ist (Neubauer et al., 1999). SrrA ist der Transkriptionsregulator („response regulator“) des Zweikomponentensystems SrrAB. Dieses System scheint ein globaler Regulator der Umschaltung von aeroben zu anaeroben Wachstum in *S. aureus* zu sein. NirC ist eine Komponente der Nitratatmung, die auch in Zusammenhang mit anaeroben Wachstum steht (Fuchs et al., 2007). Das Herunterregulieren von Genen des anaeroben Stoffwechsels könnte Teil einer generellen Stress-Management-Strategie der Bakterienzellen als Reaktion auf Membranschäden sein. Was diese Regulation der Zelle für einen Nutzen bringt, ist allerdings völlig unklar. Eine weitere generelle Stressantwort ist das Herunterregulieren von Genen, die für den Nukleotidstoffwechsel zuständig sind. Dieses Phänomen wurde auch als Antwort auf verschiedenste Substanzen wie Ciprofloxacin, Vancomycin und Wasserstoffperoxid beobachtet (Chang et al., 2006; Cirz et al., 2007; McAleese et al., 2006). Eine weitere Gemeinsamkeit in beiden Studien war die signifikant erhöhte Expression mehrere Gene, die für hypothetische, bislang uncharakterisierte ABC-Transporter codieren (SA0192, SA2415/2416, *vraDE*). Dies könnte ein Hinweis auf eine wichtige Funktion dieser ABC-Transporter bei dem Schutz vor kationischen amphiphilen Peptiden sein. Man könnte sich beispielsweise vorstellen, dass diese Transporter die Peptide von den Membranen wegpumpen und so zu einer Detoxifikation der Membran beitragen.

Neben diesen Ähnlichkeiten gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen dem Profil, das durch P19|6E und dem, das durch hBD3 hervorgerufen wurde: Als Reaktion auf Behandlung der Zellen mit P19|6E wurde sowohl der Lipidstoffwechsel als auch die Autolysinproduktion signifikant verändert, nicht aber nach hBD3-Behandlung. Betrachtet man also die Transkriptionsprofile im Vergleich, so liegt die Interpretation nahe, dass diese beiden Peptide durchaus ähnliche Wirkungsmechanismen haben, die sich aber im Detail unterscheiden. Das lineare P19|6E scheint die Membran deutlich mehr zu beeinträchtigen als hBD3, bei dem keine entsprechenden Gene differenziert reguliert sind. Das stimmt mit den Daten aus den physiologischen Experimenten überein, die auch Pag et al. (2008) mit P19|6E durchgeführt

hatten und die für dieses Peptid deutlich eine membranschädigende Aktivität angedeutet hatten (siehe oben).

Interessanterweise waren mehrere Gene, die als Reaktion auf hBD3-Behandlung hochreguliert waren, auch in Studien mit typischen Zellwandbiosynthese-Inhibitoren in ihrer Expression erhöht. Die transkriptionellen Antworten auf solche Antibiotika sind in mehreren Studien im Detail untersucht worden (Kuroda et al., 2003; McAleese et al., 2006; Utaida et al., 2003). In ersten Studien beschrieben Kuroda et al. (2003) und Utaida et al. (2003) extensive Änderungen in den Genexpressions-Profilen verschiedener *S. aureus*-Stämme nach Behandlung mit inhibitorischen Konzentrationen von Zellwandbiosynthese-Inhibitoren. In der Studie von Kuroda et al. (2003) wurde der MRSA-Stamm *S. aureus* N315 für 10 min der zehnfachen MHK von Vancomycin ausgesetzt. Utaida et al. (2003) behandelten *S. aureus* 8325 mit Bacitracin, Oxacillin und D-Cycloserin in Konzentrationen, die das Wachstum um 70% reduzierten. Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurde postuliert, dass die Gene, die in diesen Studien in ihrer Expression verändert waren, zu einem koordiniert regulierten „Zellwandstress-Stimulon“ gehören. Kürzlich wurde in einer weiteren Studie (McAleese et al., 2006) die Anzahl und Art der Gene untersucht, deren Expression als Antwort auf einfache oder achtfache MHK Vancomycin in Stamm *S. aureus* JH1 verändert war. In dieser Studie wurde ebenfalls eine große Anzahl an Genen, die in ihrer Expression verändert waren, beobachtet, wenn Stamm JH1 mit seiner isogenischen, Vancomycin-resistenten Mutante, Stamm JH9 mittels Microarray ohne Zugabe von antimikrobiellen Substanzen verglichen wurde. Die Autoren schlugen daraufhin die Benennung eines „Kern-Zellwandstress-Stimulons“ vor, das sich aus den 15 Genen zusammensetzt, die in sämtlichen der hier genannten Studien eine veränderte Expression besaßen. Interessanterweise waren elf dieser 15 Gene bei Behandlung mit subinhibitorischer hBD3-Konzentration ebenfalls signifikant in ihrer Expression erhöht (s. Tabelle 3.3); dies weist deutlich darauf hin, dass auch hBD3 eine zellwandschädigende Wirkung haben muss.

Eine Schlüsselkomponente für die Wahrnehmung von Zellwandstress ist das Zweikomponentensystem **VraRS** (Gardete et al., 2003; Sobral et al., 2006; Sobral et al., 2007; Yin et al., 2006), das auch ein Teil des oben definierten Zellwandstress-Stimulons ist. Seine Benennung erfolgte erstmals von Kuroda et al. (2000), wo dieses Zweikomponentensystem aus Histidin-Kinase (VraS) und Transkriptionsregulator (VraR) in Vancomycin-heteroresistenten (hetero-VRSA) und -resistenten (VRSA) *S. aureus*-Stämmen im Vergleich zu sensitiven Stämmen in seiner Expression erhöht war. Drei Jahre später charakterisierte die gleiche Arbeitsgruppe die Funktionen von VraRS (vra = vancomycin resistance associated) näher (Kuroda et al., 2003). Sie testeten den Effekt verschiedener Zellwandbiosynthese-Inhibitoren (Teicoplanin, Ceftizoxim, Imipenem, Bacitracin und D-Cycloserin), die

alle die *vraS*-Transkription induzierten. Sie konnten weiterhin zeigen, dass *VraRS* ein positiver Regulator der Zellwandbiosynthese ist und darüber hinaus eine wichtige Funktion für die Ausbildung von Glykopeptid- und β -Laktamresistenzen hat. Microarray-Analysen zufolge waren 46 Gene in dieser Studie unter der Kontrolle von *VraRS*, unter ihnen solche, die mit der Zellwandbiosynthese assoziiert sind wie *pbp2*, das für PBP2 codiert, *sgtB* das für ein PBP1-ähnliches Protein codiert oder *murZ*, das eine frühe Zellwandbiosynthesereaktion im Cytoplasma katalysiert. In einer anderen Studie wurde das essentielle Zellwandbiosynthese-Gen *pbp2* aus *S. aureus* unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters gesetzt, um gezielt Störungen in der Zellwandbiosynthese hervorzurufen, ohne eine antimikrobielle Substanz einsetzen zu müssen (Gardete et al., 2006). Dabei beobachtete die Arbeitsgruppe eine Kopplung zwischen Störungen in der Zellwandbiosynthese und der Änderungen der Transkripte von *VraRS*. Dies bestätigt, dass *VraRS* eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung von Störungen der Zellwandbiosynthese hat. Ähnlich dazu waren *VraRS* und viele der Gene, die unter seiner Regulation stehen, in einer konditionellen *murF*-Mutante ebenfalls in ihrer Expression erhöht, wenn es durch mangelndes *murF* zu Störungen in der Zellwandbiosynthese kam (Sobral et al., 2007). *MurF* katalysiert einen späten Schritt der im Cytoplasma stattfindenden Zellwandbiosyntheseschritte, nämlich die Addition von D-Alanyl-D-Alanin an UDP-N-Acetylmuramyl-Tripeptid. Das *VraRS*-System scheint also sehr sensitiv auf Störungen an verschiedensten Stellen der Zellwandbiosynthese zu reagieren und gilt als Indikator für Substanzen, die Zellwandstress hervorrufen. Die molekulare Natur des Signals, das von *VraS* wahrgenommen wird, ist allerdings noch unbekannt. Erst kürzlich wurde eine erste Untersuchung, die die molekularen Details der Aktivierung von *VraRS* beleuchtet, veröffentlicht (Belcheva & Golemi-Kotra, 2008). Über das Signal gibt diese Studie jedoch keinen Aufschluß, sie sagt lediglich etwas über den Phosphatgruppentransfer von *VraS* auf *VraR* und über den aktiven Zustand von *VraR*, das als Dimer vorliegen muss, aus. Das Homolog zu *VraRS* in *Bacillus subtilis* ist als *LiaRS* benannt worden. Diese Systeme haben offensichtlich sehr ähnliche Funktionen in beiden Bakterien behalten. Auch *LiaRS* reagiert auf eine Vielzahl von Substanzen, die die Integrität der Zellhülle stören (Jordan et al., 2006; Mascher et al., 2004; Pietiainen et al., 2005). Auf solche biophysikalischen Veränderungen in der Zellhülle reagiert das System dann hochsensibel. Generell reagieren solche Sensoren entweder direkt auf die Anwesenheit der antimikrobiellen Substanz, oder sie reagieren auf die zellulären, biochemischen Konsequenzen der antimikrobiellen Aktivität. Des Weiteren führt die antimikrobielle Aktivität zu diversen Sekundäreffekten, die dann auch wieder durch Zweikomponentensysteme registriert werden können. Es gibt also eine Vielzahl von Molekülen und Effekten, die als Signal für eine Stressantwort in Frage kommen. Interessanterweise wird *VraRS* auch als Reaktion auf hBD3-Stress in seiner Expression erhöht. Dies bestätigt, dass hBD3 in bisher

unbekannter Weise die Zellwandbiosynthese oder andere Zellwand-bezogene Prozesse beeinträchtigt, es also neben zellmembran- auch zellwandschädigende Wirkung hat, eine Hypothese, die auch durch die elektronenmikroskopischen Bilder hBD3-behandelter *S. aureus*-Zellen unterstützt wird (Harder et al. 2001). Auf welche Weise das Defensin die Zellwandbiosynthese beeinträchtigt, kann aus diesen Ergebnissen jedoch nicht erkannt werden.

In letzter Zeit wurde ein weiteres Zweikomponentensystem namens **GraRS** in Zusammenhang mit Zellwandstress-Wahrnehmung und Resistenzentwicklung gebracht. Erstmals von Cui et al. (2005) benannt, wurde es in Zusammenhang mit Glykopeptidresistenz (gra = glycopeptide resistance associated) gebracht. Mittlerweile wurde es von mehreren Arbeitsgruppen näher untersucht und es wurden Gene identifiziert, die unter der Kontrolle des Systems stehen (Cui et al., 2005; Herbert et al., 2007; Kraus et al., 2008; Li, et al., 2007b; Meehl et al., 2007). So konnte gezeigt werden, dass GraRS wichtig für die Resistenz von Bakterien gegen kationische HDPs ist. GraRS reguliert beispielsweise das *dltABCD* Operon positiv. In diesem Operon sind die Gene codiert, deren Proteine für die D-Alanylierung der Teichonsäuren in der Zellhülle verantwortlich sind. Durch die Einführung von Alanin in die polyanionischen Teichonsäuren wird die Anzahl an negativen Ladungen auf der Oberfläche verringert. Dies ist ein Resistenzfaktor der Bakterien gegen kationische HDPs, da die kationischen Peptide eine geringere Affinität zu der modifizierten bakteriellen Oberfläche besitzen. Des Weiteren steht der ABC-Transporter *VraFG* (vra = vancomycin resistance associated), der wie *VraRS* von Kuroda et al. (2000) in Zusammenhang mit Vancomycin-Stress benannt wurde, unter der Kontrolle von GraRS. Dieser Transporter scheint nicht nur eine Rolle in der Vancomycin-Resistenz, sondern ebenfalls in der Resistenz gegenüber HDPs wie LL-37 und gegenüber dem Lantibiotikum Gallidermin zu spielen (Herbert et al., 2007).

Nun würde man vermuten, dass auch hBD3 ein Signal für GraS darstellt und/oder generiert und dass somit die Gene *graRS* und/oder die Gene, die unter der Kontrolle von GraRS stehen, also *dltABCD* und *vraFG*, in hBD3-behandelten Zellen in ihrer Expression erhöht sein sollten. Für keines dieser Gene war das allerdings der Fall. Zwei aktuelle Studien, in denen der Effekt von hBD3 auf dieses System untersucht wurde, liefern mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz. In der ersten Untersuchung wurde das GraRS-Homolog in *S. epidermidis* durch hBD3 und andere kationische HDPs aktiviert, nicht jedoch durch das anionische Peptid Dermcidin (Li et al., 2007a). Im Transkriptionsprofil hBD3-behandelter *S. epidermidis*-Zellen war das GraRS-System zwar nicht in seiner Transkription erhöht, Li et al. (2007a) konnten jedoch zeigen, dass eine kurze, extrazelluläre Domäne des Sensorproteins GraS, die eine hohe Dichte an negativen Ladungen enthält, für das Binden der antimikro-

biellen Peptide verantwortlich war. Des Weiteren zeigten die Gene, die unter der Kontrolle von *apsRS* standen (so benannte diese Arbeitsgruppe das *graRS*-System), eine erhöhte Transkription im Microarray nach hBD3-Behandlung. Dazu gehörten vor allem der schon erwähnte ABC-Transporter *VraFG*, das für die Teichonsäuren-Alanylierung verantwortliche *DltABCD*-System und das für Lipidmodifikationen verantwortliche *MprF*. *MprF* sorgt für das Einführen von Lysinmolekülen in Phosphatidylglycerol, was zu einer Reduktion der negativen Ladungen in der Zellmembran führt. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte kurz danach den Einfluß von hBD3 und anderen kationischen HDPs auf das *S. aureus*-Homolog des Zweikomponentensystems *GraRS* aus *S. epidermidis* (Li et al. 2007b). Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe in *S. aureus* nicht zeigen, dass hBD3 das *GraRS* System stimuliert. Auch keines der Gene, die unter der Kontrolle von *GraRS* stehen, zeigte eine erhöhte Transkription in hBD3-behandelten Zellen. Dies war nur der Fall, wenn die Zellen mit anderen HDPs wie Indolicidin, Nisin, LL-37 oder Mellitin behandelt wurden. Hier scheint also eine Selektivität des *GraRS* Systems für bestimmte Substanzen vorzuliegen. Es wurde jedoch in dieser Studie des Weiteren herausgefunden, dass die in *S. epidermidis* identifizierte, für die Bindung der HDPs verantwortliche extrazelluläre Domäne von *GraS* in *S. aureus* strukturell verändert ist, was zu einer veränderten Affinität zu HDPs führt. Eine *GraRS* Deletionsmutante war empfindlicher gegenüber allen getesteten kationischen Substanzen, nicht jedoch, analog zu der Situation in *S. epidermidis*, gegenüber dem anionischen Dermcidin. Obwohl also nicht alle kationischen HDPs zu einer Aktivierung des *GraRS*-Systems führen, so bewirken die von *GraRS* induzierten Veränderungen in der bakteriellen Zellhülle doch eine Resistenzsteigerung für alle untersuchten kationischen HDPs.

Die Erkenntnis, dass hBD3 in *S. aureus* in der vorliegenden Arbeit weder *GraRS*, noch *VraFG*, *DltABCD* oder *MprF* induzierte, stimmt also mit den Ergebnissen von Li et al. (2007b) überein. Anscheinend hat sich im Laufe der Evolution die für die Wahrnehmung zuständige extrazelluläre Domäne in *GraS* in *S. aureus* -zumindest in einigen Stämmen- so verändert, dass nicht mehr alle HDPs erkannt werden. Welchen Vorteil diese Selektivität haben könnte, bleibt allerdings völlig unklar. Möglicherweise handelt es sich aber auch um Besonderheiten im Stamm *S. aureus* SG511, der sich durch besondere Sensitivität gegenüber vielen antimikrobiellen Substanzen auszeichnet. Vielleicht ist hier das *GraRS* System durch genetische Veränderungen nicht mehr aktiv, kann deshalb nicht induziert werden und auch selber keine Transkription der unter seiner Kontrolle stehenden Gene induzieren.

Kürzlich wurde ein weiteres Zweikomponentensystem namens **SaeRS** in Zusammenhang mit Defensinen gebracht (Geiger et al., 2008). Dieses System reguliert nach Signalwahrnehmung wichtige Virulenzgene wie z.B. *hla*, das für Hämolyisin codiert, *fnbA*, das für fibronectinbindendes Protein A codiert oder *coa*, das für Koagulase codiert (Giraud et al., 1997;

Novick & Jiang (2003); Steinhuber et al., 2003). Geiger et al. (2008) zeigten, dass SaeRS von α -Defensinen und H_2O_2 , nicht jedoch von dem linearen HDP LL-37 oder von dem Lipopeptidantibiotikum Daptomycin aktiviert wird. Die Autoren spekulierten, dass das System eher Veränderungen in der Zellmembran als in der Zellwand wahrnimmt, dies könnte seine Spezifität erklären. Allerdings wird bisher für das lineare LL-37 primär eine membran-schädigende Wirkungsweise angenommen, für Daptomycin ist der Wirkungsmechanismus noch nicht aufgeklärt; bislang wurden sowohl Porenbildung in Membranen, als auch zellwandschädigende Effekte postuliert (Muthaiyan et al., 2008; Silverman et al., 2003). In den Microarray-Daten aus der vorliegenden Arbeit tauchten weder das Zweikomponentensystem, noch die unter seiner Kontrolle stehenden Gene auf; hBD3 scheint dieses System also nicht zu aktivieren. Dies könnte bedeuten, dass das SaeRS-System spezifisch bestimmte Substanzen erkennen und sogar zwischen α - und β -Defensinen diskriminieren könnte.

Die Gene des ABC-Transporters **VraDE** waren in der vorliegenden Arbeit mit bis zu 57facher Hochregulation nach hBD3-Behandlung am stärksten in ihrer Expression verändert; dieser Transporter wurde, genau wie der oben genannte Transporter VraFG im Zusammenhang mit Vancomycinresistenz entdeckt (Kuroda et al., 2000) und ähnelt diesem strukturell stark. Kuroda et al. (2000) spekulierten, dass die Funktion solcher ABC-Transporter die erhöhte Aufnahme von Zellwand-Vorläufermolekülen aus dem Kulturmedium sein könnte, durch die die Bakterien die Zellwandbiosyntheserate erhöhen und im Rahmen der Ausprägung einer Vancomycin- und β -Laktamresistenz eine Verdickung der Zellwand bewirken könnten. Jedoch widerspricht diese These und der postulierte Resistenzeffekt für β -Laktame dem Ergebnis aus dieser Arbeit, dass die *vraE*-Knockout-Mutante keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Oxacillin aufwies (s. 3.4.2). Auch in einer anderen Studie, in der die Transkriptionsprofile von mit Zellwandbiosynthese-Inhibitoren behandelten Zellen untersucht wurden, fand keine Induktion von *vraDE* durch Oxacillin statt (Utaiida et al., 2003). Der Zusammenhang zwischen β -Laktam-Resistenz und diesem ABC-Transporter müsste also näher untersucht werden, um diese Frage zu klären. Was die tatsächliche Funktion des Transporters ist, ob er, wie von Kuroda et al. (2003) spekuliert, Vorläufermoleküle für die Biosynthese der Zellwand in die Zellen transportiert oder ob er vielleicht antimikrobielle Substanzen von den Zellen wegpumpt, ist bisher nicht bekannt und müsste gezielt untersucht werden. Durch welchen Regulator die Transkription des ABC-Transporters VraDE gesteuert wird, ist ebenfalls unklar. Dass VraDE unter der Kontrolle von VraRS liegt, ist nicht auszuschließen, aber bisher nicht bewiesen. Kuroda et al. (2000) sahen zwar eine Induktion des Transporters durch Vancomycin-Behandlung von *S. aureus*, diese wurde jedoch ihrer Meinung nach nicht durch VraRS vermittelt. Die Einteilung von Kuroda et al. (2003) nach

VraRS-regulierten und –nicht regulierten Genen ist jedoch nicht ganz überzeugend. Allerdings kam es in Studien, in denen *vraRS* durch Zellwandstress hochreguliert wurde oft auch nicht zu einer erhöhten Expression dieses Transporters (Gardete et al., 2006; McAleese et al., 2006; Sobral et al., 2007; Utaida et al., 2003; Yin et al., 2006). Dies könnte aber auch an experimentellen Unterschieden wie z.B. der in allen Studien unterschiedlich eingesetzten Peptidkonzentrationen liegen. Im Gegensatz dazu wurde *vraDE* als Reaktion auf Behandlung mit dem oben erwähnten linearen Peptid P19|6E (Pag et al., 2008), durch das auch VraRS induziert wurde, und mit LL-37 (lineares, kationisches HDP; T. Lüders und H.G. Sahl, unpublizierte Daten) deutlich in seiner Expression erhöht. Li et al. (2007b) fanden diesen ABC-Transporter ebenfalls nach Behandlung mit dem kationischen HDP Indolicidin in seiner Transkription erhöht und auch hier tauchte *vraRS* bei den induzierten Genen auf. Die Arbeitsgruppe, die das oben erwähnte GraRS System untersuchte, postulierte, dass *vraDE* teilweise unter der Kontrolle von GraRS steht. Es muss also einen weiteren Regulator geben, der die Transkription dieses Transporters reguliert. Es ist nicht auszuschliessen, dass VraR dieser zweite Regulator ist.

Das Homolog dieses Transporters in *Bacillus subtilis*, BceAB, spielt bei der Stressantwort auf Bacitracin-Behandlung eine Rolle und wurde als Bacitracin-Resistenz-Determinante identifiziert (Mascher et al., 2003). Ob BceAB aber tatsächlich Bacitracin transportiert und in welche Richtung ist allerdings unbekannt. Dieser ABC-Transporter wird durch das Zweikomponentensystem BceRS induziert, dessen Gene unmittelbar vor *bceAB* liegen. Interessanterweise ist BceRS homolog zum oben diskutierten System GraRS aus *S. aureus*. BceRS wird aber anders als GraRS nicht durch ein breiteres Spektrum an Wirtsabwehrkomponenten induziert, sondern ist ein System, das hochspezifisch nur Bacitracin wahrnimmt (Rietkotter et al., 2008). Dabei spielt die Permease des ABC-Transporters BceB, die VraE und VraG strukturell stark ähnelt, eine essentielle Rolle für die Wahrnehmung des Stresses. Das Protein besitzt eine größere extrazelluläre Domäne, die für die Wahrnehmung von Bacitracin benötigt wird; fehlt diese, so wird auch das BceRS-System nicht aktiviert (Rietkotter et al., 2008). Auch VraE und VraG besitzen eine solche extrazelluläre Domäne, wie die Untersuchung der Proteinsequenz im Topologie-Voraussagungsprogramm TMHMM zeigte (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Es ist daher eine interessante Frage, ob VraDE und VraFG auch eine Rolle für die Wahrnehmung von bestimmten Signalen spielen, die durch die hBD3- oder Bacitracin-Behandlung entstehen. Es scheint also, als seien diese Systeme in *B. subtilis* und *S. aureus* gleichen evolutionären Ursprungs mit bis heute ähnlichen Funktionen, die sich aber im Speziellen doch unterscheiden. Dies könnte an dem unterschiedlichen Habitat der beiden Bakterienspezies liegen. Für das Bodenbakterium *Bacillus* spielt der Schutz vor Bacitracin, das von *Bacillus* selber produziert wird, eine weitaus wichtigere Rolle als für den bevorzugt auf und in Säugetieren lebenden *Staphylococcus*.

Deshalb hat sich in *Bacillus* ein komplexes Bacitracin-Wahrnehmungs-Netzwerk ausgebildet, bei dem das BceRS/AB System die sensitivste Komponente ist (Rietkötter et al., 2008). In *Staphylococcus* hat sich dagegen das GraRS System auf die Wahrnehmung von einem breiteren Spektrum von Wirtsabwehrkomponenten spezialisiert. Nach der Wahrnehmung kommt es dann zu entsprechenden Anpassungen der Bakterien an den Stress durch kationische Substanzen, z.B. durch die Reduzierung der negativen Oberflächenladung.

Aufgrund der in dieser Arbeit beobachteten starken Erhöhung der Expression von *vraDE* als Antwort auf hBD3-Stress wurde vermutet, dass dieser Transporter eine wichtige Rolle als Anpassungsmechanismus der Bakterienzelle gegen Defensin-Stress spielt. Um dieses näher zu untersuchen, wurde eine *vraE*-Knockout-Mutante hergestellt und gegen hBD3 sowie diverse andere antimikrobielle Substanzen getestet. Tatsächlich zeigte die Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber hBD3, allerdings weitaus weniger deutlich als erwartet. Dies könnte möglicherweise an einer gewissen Redundanz verschiedener ABC-Transporter liegen. Neben *vraDE* waren mehrere andere ABC-Transporter im Transkriptionsprofil hBD3-behandelter Zellen deutlich in ihrer Expression erhöht, wenn auch nicht so drastisch wie *vraDE*. Wenn diese alle eine Rolle bei der Abwehr von hBD3 und vielleicht auch anderen HDPs spielen, kann das Ausfallen eines dieser Transporter möglicherweise von den anderen zum Teil kompensiert werden. Interessanterweise war der mit Abstand höchste Zuwachs in der Sensitivität der Knockout-Mutante gegenüber Bacitracin zu beobachten, hier erniedrigte sich die MHK von 12 µg/ml auf 2 µg/ml. Es ist also möglich, dass *VraDE* analog zu *BceAB* in *B. subtilis* eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Bacitracin spielt und dass der Effekt, der bei hBD3 und anderen Substanzen zu sehen ist, ein Nebeneffekt ist. Die extrem starke Änderung in der Expression von *vraDE* im Microarray ist dann jedoch schwer zu erklären. Sollte der Transporter wie *BceAB* eine Rolle für die Stress-Wahrnehmung spielen, könnte das Ergebnis bedeuten, dass nur Bacitracin ein Signal für die Permease *VraE* ist, nicht aber die anderen Substanzen. Man könnte sich dann vorstellen, dass die Stressantwort des Bakteriums auf Bacitracin, das von dem Transporter wahrgenommen wird, effektiver abläuft als die Abwehrreaktion auf Substanzen, die nicht von dem Transporter wahrgenommen werden. Das könnte den im Vergleich zu den anderen Substanzen großen Effekt von Bacitracin auf die Empfindlichkeit der Mutante erklären.

S. aureus SG511 Δ *vraE* zeigte gegenüber typischen Zellwandbiosynthese-Inhibitoren bis auf gegen die β -Laktame eine meist geringe Erhöhung der Empfindlichkeit. Gegen das β -Laktam Oxacillin, das die Transpeptidierungsreaktion in der wachsenden Peptidoglykankette hemmt, war die Mutante sogar resistenter. Keiner der an dieser Reaktion beteiligten Komponenten ist an die Membran gebunden, so dass man sich vorstellen könnte, dass die Reaktion räumlich entfernt von der bakteriellen Cytoplasmamembran stattfindet. Das Antibiotikum wäre daher zu weit von dem Transporter entfernt, so dass dieser es nicht als Substrat nutzen

könnte. Dies könnte erklären, warum die Mutante gegen β -Laktame nicht empfindlicher ist als der Wildtyp. Gegen alle Substanzen, die in irgendeiner Weise die Membranintegrität beeinträchtigen, ist die Mutante dagegen sensitiver. Bacitracin, Vancomycin und Nisin interagieren spezifisch mit membrangebundenen Zellwandbausteinen, LL-37, Daptomycin und Pep5 beeinträchtigen in noch nicht ganz aufgeklärter Weise die Membranintegrität. Diese Gemeinsamkeit könnte diese Peptidantibiotika also als Substrat für VraDE determinieren. Chloramphenicol, das innerhalb der Zellen wirkt, wo es die Proteinbiosynthese hemmt, ist dagegen offensichtlich kein Substrat für VraDE, die Mutante ist gegen diese Substanz sogar etwas unempfindlicher als der Wildtyp.

In der zweiten Microarray-Analyse, dem Langzeit-Experiment, in dem *S. aureus* SG511 bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 1 in Anwesenheit einer subinhibitorischen hBD3-Konzentration gewachsen war, zeigten wenige Gene eine veränderte Expression. Diese Zellen können als adaptierte Organismen gelten. Es fällt auf, dass die oben erwähnten ABC-Transporter in diesen Zellen immer noch signifikant hochreguliert waren, allen voran *vraDE*. Dies unterstützt die Vermutung, dass solche Transporter eine wichtige Rolle für das Abwehren der Peptide spielen. Interessanterweise waren außerdem Gene der Lysinbiosynthese in den angepassten Zellen in ihrer Expression erhöht. Dieser Effekt wurde in anderen Studien als Antwort auf Bacitracin und Glykopeptide ebenfalls beobachtet, was wiederum den Eindruck verstärkt, dass hBD3 die Zellwandintegrität beeinträchtigt (Cui et al., 2005; Utaida et al., 2003).

Für beide Transkriptionsanalysen gilt, dass im Vergleich zu vielen anderen Studien insgesamt eher wenige Gene signifikant reguliert waren und dass das Maß der Regulation meist sehr moderat war. Dies könnte an der geringen eingesetzten Peptidkonzentration liegen. hBD3 wurde in einer Menge, die 1/8 der MHK entsprach, zu den Bakterienkulturen gegeben. Man könnte sich vorstellen, dass bei höheren Konzentrationen mehr Gene induziert würden und größere Änderungen in den Expressionen zu sehen wären. Rietkötter et al. (2008) zeigten kürzlich, dass die zelluläre Reaktion auf Bacitracin-Stress in *B. subtilis* extrem von der einwirkenden Konzentration des Bacitracins abhängt. Die Anpassung an Bacitracin scheint in diesem Organismus allerdings sehr spezifisch zu sein. McCallum et al. (2006) fanden eine gewisse Abhängigkeit der Induktion des Zellwandstress-Stimulons von der Konzentration der eingesetzten zellwandaktiven Antibiotika. Es bestünde jedoch bei einer höheren eingesetzten hBD3-Konzentration die Gefahr, eine generelle Stressantwort hervorzurufen, die die spezifische Antwort auf hBD3 überlagern könnte, so dass interessante Aspekte übersehen werden könnten.

Um der Frage nachzugehen, in welcher Weise hBD3 in die Zellwandbiosynthese eingreift, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt, anhand derer man bestimmte Aspekte der Zellwandbiosynthese beleuchten kann. Zunächst wurde in einem *in vivo* Experiment getestet, ob hBD3 die späten, membranassoziierten Schritte der Zellwandbiosynthese hemmt. Dazu wurde die hBD3-induzierte Akkumulation von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid in *S. aureus* SG511 gemessen. Dieses Molekül ist die letzte lösliche, cytoplasmatische Vorstufe des Peptidoglykans. Es zeigte sich eindeutig, dass der Vorläufer in hBD3-behandelten Zellen akkumulierte. Dies bedeutet folgendes: Zum Einen legt es sehr nahe, dass hBD3 tatsächlich in die Zellwandbiosynthese eingreift. Zum Zweiten impliziert das Ergebnis, dass alle cytoplasmatischen Reaktionen der Peptidoglykansynthese, die vor der Bildung von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid ablaufen, nicht von hBD3 gehemmt werden. Dies bedeutet wiederum, dass eine der nachfolgenden, membrangebundenen Reaktionen durch hBD3-Zugabe blockiert wird. Zum Dritten kann auch eine komplette Desenergetisierung der Zellen ausgeschlossen werden, da bei einer solchen keine Energie für Biosynthesereaktionen mehr generiert werden könnte. Zum Vierten bedeutet dieses Ergebnis, dass keine komplette Zerstörung der Membranen stattfinden kann, da ansonsten die im Cytoplasma gelösten Bestandteile aus den Zellen strömen würden und somit nicht mehr akkumulieren könnten. Das bestätigt die Ergebnisse aus den physiologischen Assays, wo kein starker Abfall des Membranpotentials und ein inkompletter Glutamatefflux zu sehen war. Es lässt sich von diesem Experiment jedoch nicht ableiten, welche der membranassoziierten Reaktionen der Peptidoglykansynthese gehemmt werden, da es zu der Akkumulation des Vorläufermoleküls nicht nur dann kommt, wenn das Enzym MraY (s. Abbildung 1.7), das die Bildung von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid katalysiert, gehemmt wird, sondern auch, wenn eine der nachfolgenden, membranassoziierten Reaktionen nicht mehr stattfinden kann. Unabhängig davon, welcher der membrangebundenen Biosyntheseschritte gehemmt wird, kommt es nämlich immer zu einer Unterbrechung des Zellwandbiosynthese-Zyklus, da der Bactoprenol-Träger Undecaprenylphosphat, dann nicht wiederverwertet werden kann (s. Abbildung 1.7). Beispielsweise konnten Reynolds & Somner (1990) zeigen, dass UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid nach Behandlung mit Vancomycin akkumuliert; dieses Antibiotikum hemmt die Transglykosylierungsreaktion auf der extracytoplasmatischen Seite der Membran durch die Komplexbildung der C-terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Gruppe von Lipid II (Nagarajan, 1991).

Sollte eine spezifische Interaktion zwischen Substraten der Zellwandbiosynthese und hBD3 stattfinden, dann könnte man durch externe Zugabe der gereinigten Zielstruktur bei einer MHK-Bestimmung die antimikrobielle Aktivität des Peptids antagonisieren. Um dies zu testen, wurde in einer MHK-Bestimmung von hBD3 gegen *S. aureus* SG511 ein potentieller

Antagonisierungseffekt durch Lipid II, Undecaprenylphosphat (dem recycelten Lipid II-Träger, C₅₅-P) und verkürzten Derivaten von diesem, sowie durch Phospholipide getestet. Schon bei einem molekularen Verhältnis von Lipid II zu hBD3 von 1:1 war eine komplette Antagonisierung der Wirkung von hBD3 zu beobachten. Dieses Ergebnis alleine betrachtet würde dafür sprechen, dass Lipid II das spezifische Angriffsmolekül für hBD3 ist. Jedoch führte auch C₅₅-P bei einem 2:1 Verhältnis (C₅₅-P:hBD3) zu einer Antagonisierung. Die reinen Phospholipide (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, DOPG) antagonisierten die antimikrobielle Wirkung von hBD3 ebenfalls, allerdings erst bei einem 2,5-5:1 Verhältnis (DOPG:hBD3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Interaktion zwischen hBD3 und Lipid II stattfindet, die jedoch nicht so spezifisch wie die eines typischen Lipid II-bindenden antimikrobiellen Peptids (z.B. Nisin) zu sein scheint. Mit C₅₅-P und DOPG finden vermutlich niedrig-affine Wechselwirkungen über Ionenbindungen statt. hBD3 bindet also keine der getesteten Moleküle mit höchster Spezifität, es gibt aber durchaus unterschiedliche Affinitäten. Die verkürzten Derivate von C₅₅-P, die wasserlöslich sind, zeigten dagegen kaum Antagonisierungseffekte. Diese bilden durch ihre Wasserlöslichkeit wahrscheinlich keine zusammenhängende negativ geladene Oberfläche aus, die für die Wechselwirkungen mit dem amphiphilen hBD3 nötig zu sein scheint.

Um den Effekt von hBD3 auf Lipid II näher zu untersuchen, wurde der Einfluß von hBD3 auf die PBP2-katalysierte Reaktion, in der Lipid II umgesetzt wird, *in vitro* untersucht. PBP2 katalysiert in *S. aureus* die letzten Schritte der Peptidoglykansynthese, die Transglykosilierungs- und die Transpeptidierungsreaktion, bei der die im Lipid II enthaltene Disaccharid-Pentapeptideinheit in das Peptidoglykannetz eingebaut wird (s. Abbildung 1.7). Es konnte eine deutliche Hemmung der Reaktion durch hBD3, die ähnlich stark war wie die Hemmung durch Moenomyzin, das mit Lipid II um die Interaktion mit PBP2 konkurriert und dieses dadurch inaktiviert, beobachtet werden. Dies galt genauso, wenn dem Reaktionsansatz zusätzlich C₅₅-P bzw. Phospholipide zugegeben wurde, die mit Lipid II um die hBD3-Moleküle konkurrieren könnten. Aufgrund der Ergebnisse aus den Antagonisierungstests kann davon ausgegangen werden, dass hBD3 mit Lipid II interagiert und nicht das Enzym PBP2 selber hemmt auch wenn dieses in diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden kann. Es scheint also auch hier, als ob hBD3 eine höhere Affinität zu Lipid II als zu C₅₅-P oder zu reinen Phospholipiden besitzt. Es könnte sein, dass diese höhere Affinität allein auf elektrostatischen Wechselwirkungen der positiven Ladungen im hBD3 mit den zwei negativen Ladungen pro Lipid II-Molekül gegenüber nur einer negativen Ladung pro C₅₅-P oder DOPG-Molekül beruht. Welcher Natur die Wechselwirkungen zwischen hBD3 und Lipid II jedoch genau sind und ob nicht noch andere Effekte neben den elektrostatischen Wechselwirkungen eine Rolle spielen, kann aus diesen Ergebnissen nicht erkannt werden.

Zusammenfassend scheint es, dass hBD3 aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften seine antimikrobiellen Aktivitäten an der bakteriellen Membran entfaltet. Es sprechen jedoch viele Indizien dagegen, dass die Membran allein durch Porenbildung -wie es für HDPs im Allgemeinen angenommen wird- zerstört wird. Sowohl die physiologischen Experimente (Membranpotential und Glutamatefflux) als auch der Akkumulationsversuch deuten an, dass die bakterielle Membran ihre Barrierefunktion nicht komplett verliert -ansonsten sollte das Membranpotential komplett abfallen, das Glutamat restlos aus den Zellen entweichen und es dürfte keine Akkumulation von UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid stattfinden. Vielmehr weisen viele Indizien auf eine Störung der Zellwandintegrität hin: Sowohl die Induktion des Zellwandstress-wahnehmenden Zweikomponentensystems VraRS und anderer Gene des Kern-Zellwandstress-Stimulons, als auch die Akkumulation des löslichen Lipid II-Vorläufers zeigen ganz deutlich, dass die Zellwandintegrität und -biosynthese in irgendeiner Weise gestört sein muss.

Abbildung 4.1 zeigt ein Modell, wie man sich aufgrund der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit die Interaktionen von hBD3 und anderen kationischen HDPs mit bakteriellen Membranen vorstellen könnte. In diesem Modell wirken die kationischen Peptide wie „Sand im Getriebe“ von membrangebundenen, essentiellen Multienzymkomplexen wie der Zellwandbiosynthese-Maschinerie oder den energiebildenden Komplexen. Die Interaktionen mit der Lipid-Doppelschicht der Membranen spielen ebenfalls eine Rolle, sie sind aber nur einer von vielen Aspekten der Wirkung. Die antimikrobielle Aktivität der HDPs basiert nicht wie bei typischen Antibiotika auf Wechselwirkungen mit einer spezifischen Zielstruktur, diese Peptide bewirken vielmehr multiple störende Effekte und greifen an mehreren Stellen simultan in koordinierte Abläufe und Funktionen von membrangebundenen Multienzymkomplexen ein, was dann letztendlich zu einem effektiven Abtöten der Bakterienzellen führt. Innerhalb dieses für kationische, amphiphile HDPs im Allgemeinen postulierten Wirkungsmodells gibt es sicherlich Differenzen zwischen verschiedenen HDPs in der Ausprägung der unterschiedlichen Interaktionsmechanismen mit den bakteriellen Zellhüllen. Sehr polare, kationische Moleküle wie das hBD3 interagieren vermutlich stärker mit den negativ geladenen Komponenten der Zellwandbiosynthese-Komplexe, als helikale, sehr amphiphile Peptide wie das synthetische 19|6E oder LL-37, die vermehrt mit Membranen interagieren und in diese eindringen könnten.

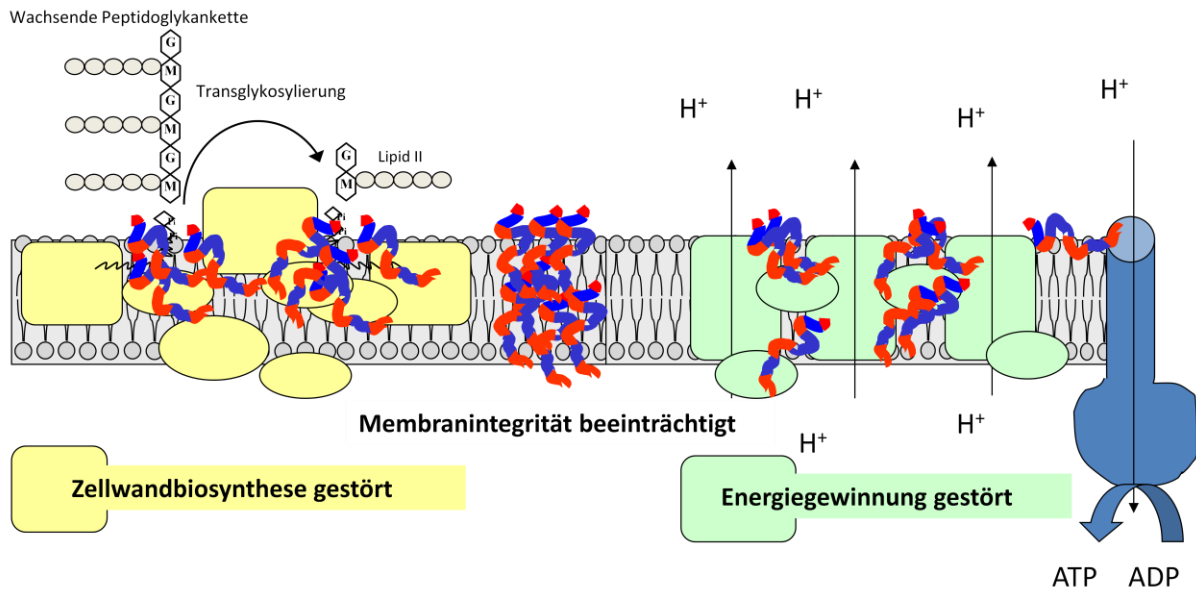


Abbildung 4.1. Schematisches Modell zur Wirkungsweise von kationischen HDPs. Die Peptide greifen danach wie „Sand im Getriebe“ simultan in verschiedene membrangebundene Prozesse ein. Diese Störungen an vielen Stellen gleichzeitig führen dann zu multiplen Schäden, die letztendlich zu einem Absterben der Bakterienzellen führen.

In Teilen kann man eine solche generalisierte Wirkungsweise auch für Bacteriocine in Gram-positiven Bakterien annehmen. Diese Bacteriocine sind fast ausschließlich kationisch und amphiphil und besitzen ähnlich wie Defensine eine relative breite antimikrobielle Aktivität, die erst bei hohen Konzentration (MHKs im mikromolaren Bereich) sichtbar wird. Zusätzlich zu dieser Basisaktivität entfalten diese Bacteriocine aber auch Zielstruktur („target-“)-vermittelte antibiotische Aktivitäten, die gegen ein sehr enges Spektrum an meist nah verwandten Bakterien mit hoher Spezifität und niedrigen Konzentrationen (MHKs im nanomolaren Bereich) zum Tragen kommen, so wie es z.B. für das Nisin bekannt ist. Nisin bindet mit hoher Spezifität an den Zellwandvorläufer Lipid II; durch diese Interaktion wird die Zellwandbiosynthese gehemmt. Gleichzeitig ist Lipid II aber auch ein Anker-molekül für Nisin, das durch diese Interaktionen sehr definierte stabile Poren in den bakteriellen Membranen bilden kann. Bacteriocine wie Nisin und HDPs wie hBD3 besitzen also antimikrobielle Aktivitäten, die durch die Kationizität und Amphiphilie der Peptide bedingt sind, die auf Wechselwirkungen mit Membranen beruhen und mehr oder weniger spezifisch membrangebundene Biosyntheseprozesse hauptsächlich im Bereich der Zellwandbiosynthese stören; darüber hinaus wird die Aktivität der Bacteriocine dadurch enorm gesteigert, dass sie insbesondere durch hochaffine Interaktionen mit Lipid II die Zellwandbiosynthese spezifisch hemmen. Das Konzept multipler Wirkungsmechanismen verbunden mit dem Generieren von vielfältigem Stress hat sich im Verlauf der Evolution als effektiv erwiesen und hat es solchen Peptiden

erlaubt, den gesamten Zeitraum wirksam zu bleiben, ohne gravierende Resistenzentwicklungen auszulösen.

Ausblick

Es ist deutlich geworden, dass der Wirkungsmechanismus von HDPs nicht mit einer einfachen detergentartigen Wirkung beschrieben werden kann und dass Versuche mit synthetischen Membranen nicht für die Erstellung von Modellen zur Wirkungsweise ausreichen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte ein hypothetisches Modell erstellt werden, das die Vorgänge an den bakteriellen Membranen zu beschreiben versucht. Nach diesem Modell wirken kationische Peptide wie das hBD3 als „Dirty Drugs“, also als unpräzise Antibiotika, die nicht ein definiertes Angriffsmolekül besitzen, sondern an vielen Stellen in komplexe Prozesse an den Membranen und in der Zellwandbiosynthese-Maschinerie eingreifen. Um diese Effekte genauer zu untersuchen und das Modell zu festigen, bedarf es weiterer Untersuchungen. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit wäre es interessant, die Interaktionen von hBD3 und Lipid II näher zu charakterisieren. Um die Spezifität und Affinität der Interaktion näher zu untersuchen, könnte die Bindungskonstante von hBD3 an Lipid II bestimmt werden. Hierfür könnte man gezielt Liposomen, die Lipid II enthalten, herstellen und die Bindungsrate mit der Bindungsrate an Liposomen, die kein Lipid II enthalten, vergleichen. Auch Interaktionen mit anderen Multienzymkomplexen und einzelnen Substraten sollten näher charakterisiert werden.

Um den Effekt von hBD3 auf die PBP2-katalysierte Reaktion näher zu untersuchen, sollte man den *in vitro*-Versuch mit radioaktiv-markiertem Lipid II durchführen, was eine Quantifizierung des umgesetzten Substrates erlauben und mehr Aufschluss über die Hemmung der Reaktion durch hBD3 geben würde. Des Weiteren wäre es interessant, auch andere Reaktionsschritte der Zellwandbiosynthese in Anwesenheit von hBD3 *in vitro* zu analysieren. So könnte man klären, ob hBD3 bereits die Lipid I- oder Lipid II-Biosynthese, die jeweils vor der PBP2-katalysierten Transglykosilierungs- und Transpeptidierungsreaktion im Cytosol stattfinden, hemmen kann.

In dieser Arbeit wurde außerdem der ABC-Transporter VraDE als mögliche Resistenz-Determinante gegen hBD3 und andere antimikrobielle Peptide entdeckt. Die Funktion dieses Transporters sollte in Zukunft näher untersucht werden. Es wäre aufschlussreich, die Moleküle zu identifizieren, die von VraDE transportiert werden. Um sich dieser Fragestellung zu nähern, könnte man den Transporter heterolog exprimieren, in Liposomen rekonstituieren und anschließend mit markierten Substraten testen, ob diese von dem Transporter transportiert werden. Außerdem könnte geklärt werden, ob der Transporter tatsächlich die antimikrobiellen Peptide pumpt, oder ob seine Funktion vielleicht doch der Transport anderer Moleküle wie z.B. von Zellwand-Vorläufermolekülen in die Zellen ist, die dann für erhöhte

Biosyntheseleistungen in der Zellwand genutzt werden könnten. Des Weiteren stellt sich die Frage, durch welche Signale der Transporter induziert wird und welche Rolle VraRS spielt. Hierbei gilt es außerdem zu klären, ob die extrazelluläre Domäne der Permease in VraE oder auch in der strukturell sehr ähnlichen Permease VraG in *S. aureus* noch eine signalwahrnehmende Rolle hat und ob Bacitracin das Signal ist. Ein anderer interessanter Aspekt wäre, die Rolle des GraRS Systems in der bakteriellen Antwort auf hBD3 näher zu untersuchen und eine Begründung für seine vermeintliche Selektivität gegenüber bestimmten kationischen HDPs in *S. aureus* zu finden. Mittels Real-Time PCR könnte man die Transkription des GraRS Systems, sowie der unter seiner Kontrolle stehenden Gene DltABCD, MprF und VraFG nach hBD3-Behandlung mit verschiedenen Peptidkonzentrationen und/oder in unterschiedlichen *S. aureus*-Stämmen untersuchen.

Es wäre zudem aufschlussreich, zu klären, ob und inwieweit β -Defensine zu einer Aktivierung des SaeRS-Systems führen, das auf α -Defensine zu reagieren scheint. Es sollte mit anderen hBD3-Konzentrationen und mit anderen α - und β -Defensinen mittels Real-Time PCR untersucht werden, ob β -Defensine tatsächlich nicht zu einer Stimulation des Systems führen. Dies würde bedeuten, dass das spezifische Verbrückungsmuster der Defensine für die Erkennung durch das Zweikomponentensystem wichtig ist.

5 Zusammenfassung/ Summary

Wirts-Abwehr-Peptide (engl.: Host Defense Peptides, **HDPs**) sind eine sehr ursprüngliche Komponente der angeborenen Immunabwehr und kommen in sämtlichen Lebewesen vor. Die heterogene Gruppe zeichnet sich durch eine amphiphile dreidimensionale Struktur aus. Als genereller Wirkungsmechanismus für HDPs wird eine Porenbildung in bakteriellen Membranen postuliert. Untersuchungen dazu fanden fast ausschließlich an Modellmembranen statt, die die komplexe *in vivo*-Situation in bakteriellen Membranen, in denen Biosynthese- und Abbauprozesse stattfinden, vernachlässigen. Das HDP humanes β -Defensin 3 (hBD3) gehört zur Gruppe der Defensine, die sich durch mehrere β -Faltblatt-Strukturen und ein charakteristisches Disulfidbrückenmuster auszeichnen. Das Peptid besteht aus 45 Aminosäuren und ist mit einer Nettoladung von +11 stark kationisch; hierdurch behält es seine Wirksamkeit auch bei höheren Salzkonzentrationen, was zur Kontrolle insbesondere von Staphylokokken auf der Haut bedeutsam ist. Im Rahmen der Erstbeschreibung des Peptids zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen hBD3-behandelter *S. aureus*-Zellen Zeichen einer Perforierung der Zellwand, ähnlich wie man es bei Penicillin-behandelten Zellen beobachten kann (Harder et al., 2001). Weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Peptids blieben jedoch aus. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die molekulare Wirkung des humanen β -Defensins hBD3 auf *Staphylococcus aureus* untersucht werden.

- ◆ In Abtötungskinetiken zeigte hBD3 eine schnelle und effektive Wirkung auf *S. aureus* SG511-Zellen.
- ◆ Physiologische Untersuchungen an ganzen Zellen zeigten, dass die Membranintegrität bei hBD3-Behandlung erhalten bleibt; das Membranpotential wurde kaum beeinträchtigt und prä-akkumuliertes Glutamat strömte nur teilweise aus behandelten Zellen aus.
- ◆ Die Nukleotid-, Protein- und Zellwandbiosynthese in wachsenden *S. aureus*-Zellen wurde komplett durch hBD3 blockiert, möglicherweise durch Hemmung der Aufnahme von Grundbausteinen.
- ◆ Mit Hilfe von DNA-Microarrays wurde eine kompetitive Hybridisierung der Gesamt-RNA von hBD3-behandelten vs. unbehandelten *S. aureus* SG511-Zellen zur Transkriptionsanalyse durchgeführt. Das Transkriptionsprofil wies sowohl Ähnlichkeiten mit Profilen membranschädigender als auch mit Profilen zellwandschädigender Peptide und Antibiotika auf. Das Zellwandstress-registrierende Zweikomponentensystem VraRS sowie 11 von 15 Genen des Kern-Zellwandstress-Stimulons (McAleese et al., 2006) waren in hBD3-behandelten Zellen hochreguliert. Die höchste Zunahme in der

Transkription zeigten die Gene des bisher nicht näher beschriebenen ABC-Transporters *VraDE*.

- ◆ Der ABC-Transporter *VraDE* wurde durch den Austausch essentieller Bereiche des Gens *vraE* gegen eine Erythromycin-Resistenzkassette mittels doppelt homologer Rekombination inaktiviert. Die entstandene Mutante *S. aureus* SG511 Δ *vraE* war sensitiver gegenüber hBD3, sowie gegenüber klassischen Zellwandbiosynthese-Inhibitoren und membranschädigenden Substanzen. Eine Ausnahme bildeten die β -Laktame, gegen die die Mutante keine erhöhte Sensitivität zeigte. Die deutlichste Steigerung der Suszeptibilität zeigte die Mutante gegenüber Bacitracin.
- ◆ Die Wirkung von hBD3 auf die Zellwandbiosynthese wurde in wachsenden Zellen untersucht. Die letzte lösliche Zellwandvorstufe UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid akkumulierte in behandelten Zellen, was für eine Hemmung der membrangebundenen Biosyntheseschritte spricht. Des Weiteren kann eine membranzzerstörende Wirkungsweise des Peptids ausgeschlossen werden, da eine solche zu einem Ausströmen des Zellwandvorläufers aus den Zellen führen würde.
- ◆ Antagonisierungsversuche mit verschiedenen Zellwand-bezogenen Molekülen zeigten, dass hBD3 sowohl mit mizellenbildendem Lipid II als auch mit Undecaprenylphosphat (C_{55} -P) und Phospholipiden interagiert, nicht jedoch mit verkürzten und dadurch löslichen Derivaten von C_{55} -P.
- ◆ hBD3 führte zu einer Hemmung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II *in vitro*. Das war auch in Anwesenheit von Phospholipiden oder C_{55} -P im Ansatz der Fall.
- ◆ Ein hypothetisches Modell für die Wirkungsweise von kationischen, amphiphilen HDPs wie hBD3 wurde aufgestellt. In diesem Modell wirken HDPs wie „Sand im Getriebe“ von membrangebundenen Multienzymkomplexen und stören den in Zeit und Raum koordinierten Ablauf der in den Membranen stattfindenden Prozesse, vor allem der Zellwandbiosynthese. Auch Membranbilayer-destabilisierende Effekte selbst spielen abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der einzelnen Peptide eine unterschiedlich große Rolle, sind aber offensichtlich nicht der entscheidende Faktor für die Abtötung von Mikroorganismen. Solche multiplen Mechanismen und zellulären Stresssituationen führen letztendlich zu einem effektiven Abtöten der Bakterienzellen und unterscheiden solche Peptide von den strikt Zielstruktur-vermittelten Wirkungsweisen typischer Antibiotika.

Summary

Host Defense Peptides (HDPs) are an evolutionary ancient component of innate immunity and are present in virtually every life form. This heterogeneous group of peptides displays an amphiphilic three-dimensional structure. Their direct antibiotic activity is thought to be based on pore formation in bacterial membranes. At the molecular level, interactions are best studied with model membranes. However, evidence is increasing that studies on model membranes may not reflect the complex *in vivo* situation where biosynthesis and degradation processes take place within the bacterial membranes. The HDP human β -defensin 3 (hBD3) belongs to the defensin group which is characterised by β -sheet structures and a distinctive disulfide bridge pattern. The peptide consists of 45 amino acids and carries a high number of cationic charges (+11); because of this feature the peptide displays antimicrobial activity even at elevated salt concentrations, which is an important factor for controlling staphylococci on the human skin. When hBD3 was first described, signs of cell wall perforation were observed in electron micrographs of hBD3-treated *Staphylococcus aureus* cells which resembled effects seen in micrographs of penicillin-treated cells (Harder et al., 2001). However, further evidence on the molecular mode of action of hBD3 was not reported. It was the aim of this thesis to elucidate the molecular mechanisms involved in killing of *S. aureus* by hBD3.

- ◆ In killing kinetics hBD3 caused rapid killing of *S. aureus* SG511.
- ◆ Physiological whole cell assays showed that membrane integrity is hardly affected by hBD3; membrane potential just slightly decreased and pre-accumulated glutamate only partially leaked out of treated cells.
- ◆ Nucleic acid-, protein- and cell wall biosynthesis were completely blocked after hBD3 treatment, possibly due to inhibition of the uptake of the precursors.
- ◆ The total RNA of hBD3-treated vs untreated cells was hybridised competitively to a DNA-microarray and a transcriptional analysis was conducted. The transcriptional profile showed similarities and differences to cell wall- as well as cell membrane-damaging peptides and antibiotics. The cell wall stress-sensing two component system *VraRS* and 11 out of 15 genes of a proposed core cell wall stress stimulon (McAleese et al., 2006) were found to be upregulated in hBD3-treated cells. The highest increase in transcription was observed for the hypothetical ABC transporter *VraDE*.
- ◆ The ABC transporter *VraDE* was inactivated by an exchange of essential parts of the gene *vraE* by a double homologous recombination event. The resulting mutant

S. aureus SG511 $\Delta vraE$ was more susceptible than the wildtype to hBD3 and to membrane-damaging agents as well as to classical cell wall biosynthesis inhibitors except for β -lactams. The highest increase in susceptibility was observed with bacitracin.

- ◆ The effect of hBD3 on cell wall biosynthesis was studied in more detail in growing cells. Here, the last soluble cell wall precursor UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide accumulated in treated cells indicating an inhibition of the membrane-bound biosynthesis steps. Furthermore, a membrane-disruptive action of hBD3 can be excluded as this should lead to leakage of the cell wall precursor from the cells.
- ◆ Antagonisation assays using different cell wall related molecules showed that hBD3 interacts with the micelle-forming molecules lipid II, Undecaprenylphosphate (C_{55} -P) and phospholipids but not with the shortened and therefore soluble derivatives of C_{55} -P.
- ◆ hBD3 led to an inhibition of the conversion of lipid II by PBP2 *in vitro*. This was also true in the presence of phospholipids and C_{55} -P.
- ◆ A hypothetical model for the mode of action of cationic and amphiphilic HDPs like hBD3 was proposed. Within this model, HDPs act like “sand in the gearbox” of membrane-bound multienzyme complexes and disturb the processes highly coordinated in time and space which take place within the membranes, especially the cell wall biosynthesis. Additionally, membrane bilayer destabilising effects play a role depending on the physico-chemical characteristics of each peptide, but these effects are not the crucial factor for the killing of microbes. Such multiple mechanisms and cellular stresses finally lead to an effective killing of bacterial cells and distinguish those peptides from typical antibiotics, whose mode of action is based on interactions with highly specific targets.

6 Literaturverzeichnis

- BELCHEVA, A. and GOLEMI-KOTRA, D. (2008).
A close-up view of the VraSR two-component system. A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage. *J.Biol.Chem.* 283, 12354-12364.
- BIERBAUM, G. and SAHL, H.-G. (1985).
Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch.Microbiol.* 141, 249-254.
- BIERBAUM, G. and SAHL, H.-G. (1987).
Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J.Bacteriol.* 169, 5452-5458.
- BIERBAUM, G. and SAHL, H.-G. (1991).
Induction of autolysis of *Staphylococcus simulans* 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes. In: G. Jung and H.-G. Sahl (eds.), *Nisin and novel lantibiotics*, pp. 386-396, Escom, Leiden.
- BOHLING, A., HAGGE, S.O., ROES, S., PODSCHUN, R., SAHLY, H., HARDER, J., SCHRÖDER, J.M., GROTZINGER, J., SEYDEL, U., and GUTSMANN, T. (2006).
Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3. *Biochemistry.* 45, 5663-5670.
- BORE, E., LANGSRUD, S., LANGSRUD, O., RODE, T.M., and HOLCK, A. (2007).
Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* 153, 2289-2303.
- BOWDISH, D.M., DAVIDSON, D.J., and HANCOCK, R.E. (2005a).
A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr.Protein Pept.Sci.* 6, 35-51.
- BOWDISH, D.M., DAVIDSON, D.J., SCOTT, M.G., and HANCOCK, R.E. (2005b).
Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49, 1727-1732.
- BREUKINK, E., WIEDEMANN, I., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O.P., SAHL, H.-G., and DE KRUIJFF, B. (1999).
Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286, 2361-2364.
- BROGDEN, K.A. (2005).
Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat.Rev.Microbiol.* 3, 238-250.
- BRÖTZ, H., JOSTEN, M., WIEDEMANN, I., SCHNEIDER, U., GÖTZ, F., BIERBAUM, G., and SAHL, H.-G. (1998).
Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol.Microbiol.* 30, 317-327.
- BROWN, K.L. and HANCOCK, R.E. (2006).
Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr.Opin.Immunol.* 18, 24-30.
- CHANG, S. and COHEN, S.N. (1979).
High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol.Gen.Genet.* 168, 111-115.

- CHANG, W., SMALL, D.A., TOGHROL, F., and BENTLEY, W.E. (2006).
Global Transcriptome Analysis of *Staphylococcus aureus* Response to Hydrogen Peroxide.
J.Bacteriol. 188, 1648-1659.
- CIRZ, R.T., JONES, M.B., GINGLES, N.A., MINOGUE, T.D., JARRAHI, B., PETERSON, S.N., and ROMESBERG, F.E. (2007).
Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin.
J.Bacteriol. 189, 531-539.
- COCIANCICH, S., GHAZI, A., HETRU, C., HOFFMANN, J.A., and LETELLIER, L. (1993).
Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J.Biol.Chem.* 268, 19239-19245.
- COLE, A.M., TAHK, S., OREN, A., YOSHIOKA, D., KIM, Y.H., PARK, A., and GANZ, T. (2001).
Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 8, 1064-1069.
- CUI, L., LIAN, J.Q., NEOH, H.M., REYES, E., and HIRAMATSU, K. (2005).
DNA Microarray-Based Identification of Genes Associated with Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49, 3404-3413.
- DAI, D. and ISHIGURO, E.E. (1988).
murH, a new genetic locus in *Escherichia coli* involved in cell wall peptidoglycan biosynthesis.
J.Bacteriol. 170, 2197-2201.
- DAVIDSON, D.J., CURRIE, A.J., REID, G.S., BOWDISH, D.M., MACDONALD, K.L., MA, R.C., HANCOCK, R.E., and SPEERT, D.P. (2004).
The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J.Immunol.*, 172, 1146-1156.
- DRIESSEN, A.J., VAN DEN HOOVEN, H.W., KUIPER, W., VAN DE, K.M., SAHL, H.G., KONINGS, R.N., and KONINGS, W.N. (1995).
Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 1606-1614.
- EHRENSTEIN, G. and LECAR, H. (1977).
Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q.Rev.Biophys.* 10, 1-34.
- FRIEDRICH, C.L., MOYLES, D., BEVERIDGE, T.J., and HANCOCK, R.E. (2000).
Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria.
Antimicrob.Agents Chemother. 44, 2086-2092.
- FROY, O. (2005).
Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol.* 7, 1387-1397.
- FUCHS, S., PANE-FARRE, J., KOHLER, C., HECKER, M., and ENGELMANN, S. (2007).
Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 189, 4275-4289.
- FUJII, G., SELSTED, M.E., and EISENBERG, D. (1993).
Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci.* 2, 1301-1312.
- GARCIA, J.R., JAUMANN, F., SCHULZ, S., KRAUSE, A., RODRIGUEZ-JIMENEZ, J., FORSSMANN, U., ADERMANN, K., KLUVER, E., VOGELMEIER, C., BECKER, D., HEDRICH, R., FORSSMANN, W.G., and BALS, R. (2001).
Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 306, 257-264.

- GARDETE, S., WU, S.W., GILL, S., and TOMASZ, A. (2006).
Role of *VraSR* in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3424-3434.
- GEIGER, T., GOERKE, C., MAINIERO, M., KRAUS, D., and WOLZ, C. (2008).
The virulence regulator *Sae* of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J. Bacteriol.* 190, 3419-3428.
- GIRAUDO, A.T., CHEUNG, A.L., and NAGEL, R. (1997).
The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* 168, 53-58.
- GÖTZ, F., AHRNE, S., and LINDBERG, M. (1981).
Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in staphylococci. *J. Bacteriol.* 145, 74-81.
- GÖTZ, F. and SCHUMACHER, B. (1987).
Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 40, 285-288.
- GÖTZ, F., BANNERMAN, T., SCHLEIFER, K.-H. (2006).
The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: *Prokaryotes 4*: 5-75.
- GUDER, A., SCHMITTER, T., WIEDEMANN, I., SAHL, H.-G., and BIERBAUM, G. (2002).
Role of the single regulator *MrsR1* and the two-component system *MrsR2/K2* in the regulation of mersacidin production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 106-113.
- HANCOCK, R.E. and LEHRER, R. (1998).
Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16, 82-88.
- HANCOCK, R.E. and DIAMOND, G. (2000).
The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8, 402-410.
- HANCOCK, R.E. and SAHL, H.-G. (2006).
Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, 1551-1557.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E., and SCHRÖDER, J.M. (2001).
Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707-5713.
- HECHARD, Y. and SAHL, H.-G. (2002).
Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84, 545-557.
- HERBERT, S., BERA, A., NERZ, C., KRAUS, D., PESCHEL, A., GOERKE, C., MEEHL, M., CHEUNG, A., and GÖTZ, F. (2007).
Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathog.* 3, e102.
- HOFFMANN, J.A., KAFATOS, F.C., JANEWAY, C.A., and EZEKOWITZ, R.A. (1999).
Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- HORNEF, M.W., WICK, M.J., RHEN, M., and NORMARK, S. (2002).
Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 3, 1033-1040.
- HRISTOVA, K., SELSTED, M.E., and WHITE, S.H. (1996).
Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2. *Biochemistry* 35, 11888-11894.

- ISHIGURO, E.E. and RAMEY, W.D. (1978).
Effect of amino acid deprivation and chloramphenicol treatment on cell sizes of rel+ and relA- strains of *Escherichia coli*. *Can.J.Microbiol.* 24, 761-764.
- JENSSEN, H., HAMILL, P., and HANCOCK, R.E. (2006).
Peptide antimicrobial agents. *Clin.Microbiol.Rev.* 19, 491-511.
- JIA, H.P., SCHUTTE, B.C., SCHUDY, A., LINZMEIER, R., GUTHMILLER, J.M., JOHNSON, G.K., TACK, B.F., MITROS, J.P., ROSENTHAL, A., GANZ, T., and MCCRAY, P.B., JR. (2001).
Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 263, 211-218.
- JORDAN, S., JUNKER, A., HELMANN, J.D., and MASCHER, T. (2006).
Regulation of LiaRS-Dependent Gene Expression in *Bacillus subtilis*: Identification of Inhibitor Proteins, Regulator Binding Sites, and Target Genes of a Conserved Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System. *J.Bacteriol.* 188, 5153-5166.
- KAGAN, B.L., SELSTED, M.E., GANZ, T., and LEHRER, R.I. (1990).
Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 210-214.
- KIM, C. and KAUFMANN, S.H. (2006).
Defensin: a multifunctional molecule lives up to its versatile name. *Trends Microbiol.* 14, 428-431.
- KOHLRAUSCH, U. and HOLTJE, J.V. (1991).
Analysis of murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 173, 3425-3431.
- KOO, S.P., BAYER, A.S., and YEAMAN, M.R. (2001).
Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. *Infect.Immun.* 69, 4916-4922.
- KORDEL, M., and SAHL, H.-G. (1986).
Susceptibility of bacterial, eucaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol.Letters* 34, 139-144.
- KRAUS, D., HERBERT, S., KRISTIAN, S.A., KHOSRAVI, A., NIZET, V., GÖTZ, F., and PESCHEL, A. (2008).
The GraRS regulatory system controls *Staphylococcus aureus* susceptibility to antimicrobial host defenses. *BMC.Microbiol.* 8:85.
- KREISWIRTH, B.N., LOFDAHL, S., BETLEY, M.J., O'REILLY, M., SCHLIEVERT, P.M., BERGDOLL, M.S., and NOVICK, R.P. (1983).
The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305, 709-712.
- KURODA, M., KUWAHARA-ARAI, K., and HIRAMATSU, K. (2000).
Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 269, 485-490.
- KURODA, M., KURODA, H., OSHIMA, T., TAKEUCHI, F., MORI, H., and HIRAMATSU, K. (2003).
Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol.Microbiol.* 49, 807-821.
- LEHRER, R.I., BARTON, A., DAHER, K.A., HARWIG, S.S., GANZ, T., and SELSTED, M.E. (1989).
Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J.Clin.Invest.* 84, 553-561.
- LEHRER, R.I. and GANZ, T. (1999).
Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr.Opin.Immunol.* 11, 23-27.

- LEHRER, R.I. and GANZ, T. (2002)
Defensins of vertebrate animals. *Curr.Opin.Immunol.* 14, 96-102.
- LEIKINA, E., DELANOE-AYARI, H., MELIKOV, K., CHO, M.S., CHEN, A., WARING, A.J., WANG, W., XIE, Y., LOO, J.A., LEHRER, R.I., and CHERNOMORDIK, L.V. (2005).
Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat.Immunol.* 6, 995-1001.
- LI, M., LAI, Y., VILLARUZ, A.E., CHA, D.J., STURDEVANT, D.E., and OTTO, M. (2007a).
Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *P.N.A.S.* 104, 9469-9474.
- LI, M., CHA, D.J., LAI, Y., VILLARUZ, A.E., STURDEVANT, D.E., and OTTO, M. (2007b).
The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol.Microbiol.* 66, 1136-1147.
- MAIDHOF, H., REINICKE, B., BLUMEL, P., BERGER-BÄCHI, B., and LABISCHINSKI, H. (1991).
femA, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J.Bacteriol.* 173, 3507-3513.
- MAKI, H., MCCALLUM, N., BISCHOFF, M., WADA, A., and BERGER-BÄCHI, B. (2004).
tcaA inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48, 1953-1959.
- MASCHER, T., MARGULIS, N.G., WANG, T., YE, R.W., and HELMANN, J.D. (2003).
Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol.Microbiol.* 50, 1591-1604.
- MASCHER, T., ZIMMER, S.L., SMITH, T.A., and HELMANN, J.D.(2004).
Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48, 2888-2896.
- MATSUZAKI, K., MURASE, O., FUJII, N., and MIYAJIMA, K. (1995).
Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry* 34, 6521-6526.
- MATSUZAKI, K., MURASE, O., FUJII, N., and MIYAJIMA, K. (1996).
An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35, 11361-11368.
- MCALEESE, F., WU, S.W., SIERADZKI, K., DUNMAN, P., MURPHY, E., PROJAN, S., and TOMASZ, A. (2006).
Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate- *S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J.Bacteriol.* 188, 1120-1133.
- MCCALLUM, N., SPEHAR, G., BISCHOFF, M., and BERGER-BÄCHI, B. (2006).
Strain dependence of the cell wall-damage induced stimulon in *Staphylococcus aureus*. *Biochim.Biophys.Acta.* 1760, 1475-1481.
- MEEHL, M., HERBERT, S., GÖTZ, F., and CHEUNG, A. (2007).
Interaction of the GraRS Two-Component System with the *VraFG* ABC-Transporter to Support Vancomycin-Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 51, 2679-2689.
- MOOKHERJEE, N., BROWN, K.L., BOWDISH, D.M., DORIA, S., FALSAFI, R., HOKAMP, K., ROCHE, F.M., MU, R., DOHO, G.H., PISTOLIC, J., POWERS, J.P., BRYAN, J., BRINKMAN, F.S., and HANCOCK, R.E. (2006).
Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J.Immunol.* 176, 2455-2464.

- MORGERA, F., ANTCHEVA, N., PACOR, S., QUARONI, L., BERTI, F., VACCARI, L., and TOSSI, A. (2008). Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. *J.Pept.Sci.* 14, 518-523.
- MUTHAIYAN, A., SILVERMAN, J.A., JAYASWAL, R.K., and WILKINSON, B.J. (2008). Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrob.Agents Chemother.* 52, 980-990.
- NAGARAJAN, R. (1991). Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrob.-Agents Chemother.* 35, 605-609.
- NEUBAUER, H., PANTEL, I., and GÖTZ, F. (1999). Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*. *J.Bacteriol.* 181, 1481-1488.
- NIYONSABA, F., USHIO, H., NAGAOKA, I., OKUMURA, K., and OGAWA, H. (2005). The Human β -Defensins (-1, -2, -3, -4) and Cathelicidin LL-37 Induce IL-18 Secretion through p38 and ERK MAPK Activation in Primary Human Keratinocytes. *J.Immunol.* 175, 1776-1784.
- NOVICK, R.P. and JIANG, D. (2003). The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology* 149, 2709-2717.
- PAG, U. and SAHL, H.G. (2002). Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Curr.Pharm.Des.* 8, 815-833.
- PAG, U., OEDENKOVEN, M., PAPO, N., OREN, Z., SHAI, Y., and SAHL, H.-G. (2004). In vitro activity and mode of action of diastereomeric antimicrobial peptides against bacterial clinical isolates. *J.Antimicrob.Chemother.* 53, 230-239.
- PAG, U., OEDENKOVEN, M., SASS, V., SHAI, Y., SHAMOVA, O., ANTCHEVA, N., TOSSI, A., and SAHL, H.-G. (2008). Analysis of in vitro activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an alpha-helical 'sequence template'. *J.Antimicrob.Chemother.* 61, 341-352.
- PAZGIER, M., HOOVER, D.M., YANG, D., LU, W., and LUBKOWSKI, J. (2006). Human beta-defensins. *Cell Mol.Life Sci.* 63, 1294-1313.
- PESCHEL, A., OTTO, M., JACK, R.W., KALBACHER, H., JUNG, G., and GÖTZ, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J.Biol.Chem.* 274, 8405-8410.
- PESCHEL, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 10, 179-186.
- PESCHEL, A. and COLLINS, L.V. (2001). Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* 22, 1651-1659.
- PIETIAINEN, M., GARDEMEISTER, M., MECKLIN, M., LESKELA, S., SARVAS, M., and KONTINEN, V.P. (2005). Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology.* 151, 1577-1592.
- POUNY, Y., RAPAPORT, D., MOR, A., NICOLAS, P., and SHAI, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12416-12423.

QUINONES-MATEU, M.E., LEDERMAN, M.M., FENG, Z., CHAKRABORTY, B., WEBER, J., RANGEL, H.R., MAROTTA, M.L., MIRZA, M., JIANG, B., KISER, P., MEDVIK, K., SIEG, S.F., and WEINBERG, A. (2003).

Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 17, F39-F48.

RAJ, P.A. and DENTINO, A.R. (2002).

Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol.Lett.* 206, 9-18.

REIS, M., ESCHBACH-BLUDAU, M., IGLESIAS-WIND, M.I., KUPKE, T., and SAHL, H.-G. (1994).

Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene *pepI* and localization and functional analysis of its gene product. *Appl.Environ.Microbiol.* 60, 2876-2883.

REYNOLDS, P.E. and SOMNER, E.A. (1990).

Comparison of the target sites and mechanisms of action of glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Drugs Exp.Clin.Res.* 16, 385-389.

RICK, P.D., WOLSKI, S., BARR, K., WARD, S., and RAMSAY-SHARER, L. (1988).

Accumulation of a lipid-linked intermediate involved in enterobacterial common antigen synthesis in *Salmonella typhimurium* mutants lacking dTDP-glucose pyrophosphorylase. *J.Bacteriol.* 170, 4008-4014.

RIETKOTTER, E., HOYER, D., and MASCHER, T. (2008).

Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.* 68, 768-785.

ROOIJAKKERS, S.H., VAN KESSEL, K.P., and VAN STRIJP, J.A. (2005).

Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol.* 13, 596-601.

ROSENFELD, Y., PAPO, N., and SHAI, Y. (2006).

Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J.Biol.Chem.* 281, 1636-1643.

RUHR, E. and SAHL, H.-G. (1985).

Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob.Agents Chemother.* 27, 841-845.

SAHL, H.-G. (1985).

Influence of the staphylococcin like peptide Pep 5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *J.Bacteriol.* 162, 833-836.

SAHL, H.-G. (1991).

Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, In: G. Jung and H. Sahl (eds.), *Nisin and novel lantibiotics*, pp. 347-358, Escom, Leiden.

SAHL, H.-G., PAG, U., BONNESS, S., WAGNER, S., ANTCHEVA, N., and TOSSI, A. (2005).

Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J.Leukoc.Biol.* 77, 466-475.

SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. (2001).

Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.Aufl., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977).

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 5463-5467.

SARIS, P.E., IMMONEN, T., REIS, M., and SAHL, H.-G. (1996).

Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 151-159.

- SASS, V., PAG, U., TOSSI, A., BIERBAUM, G., and SAHL, H.-G. (2008). Mode of action of human beta-defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. *Int.J.Med.Microbiol.* doi:10.1016/j.ijmm.2008.01.011, *epub ahead of print*.
- SAYAMA, K., KOMATSUZAWA, H., YAMASAKI, K., SHIRAKATA, Y., HANAKAWA, Y., OUHARA, K., TOKUMARU, S., DAI, X., TOHYAMA, M., TEN DIJKE, P., SUGAI, M., ICHIJO, H., and HASHIMOTO, K. (2005). New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur.J.Immunol.* 35, 1886-1895.
- SCHIBLI, D.J., HUNTER, H.N., ASEYEV, V., STARNER, T.D., WIENCEK, J.M., MCCRAY, P.B., JR., TACK, B.F., and VOGEL, H.J. (2002). The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of hBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* 277, 8279-8289.
- SCHLEGEL, H.-G. (1992). Zellwand. In: Schlegel „Allgemeine Mikrobiologie“ 2.2.4: 50-61.
- SCHLEIFER, K.H. and FISCHER, U. (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int.J.System.Bacteriol.* 32, 153-156.
- SCHNEIDER, J.J., UNHOLZER, A., SCHALLER, M., SCHÄFER-KORTING, M., and KORTING, H.C. (2005). Human defensins. *J.Mol.Med.* 83, 587-595.
- SCHRÖDER, J.M. and HARDER, J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol.Life Sci.* 63, 469-486.
- SELSTED, M.E., TANG, Y.Q., MORRIS, W.L., MCGUIRE, P.A., NOVOTNY, M.J., SMITH, W., HENSCHEN, A.H., and CULLOR, J.S. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J.Biol.Chem.* 268, 6641-6648.
- SELSTED, M.E. and OUELLETTE, A.J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat.Immunol.* 6, 551-557.
- SILVERMAN, J.A., PERLMUTTER, N.G., and SHAPIRO, H.M. (2003). Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47, 2538-2544.
- SOBRAL, R.G., LUDOVICE, A.M., DE LENCASTRE, H., and TOMASZ, A. (2006). Role of *murF* in cell wall biosynthesis: isolation and characterization of a *murF* conditional mutant of *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.*, 188, 2543-2553.
- SOBRAL, R.G., JONES, A.E., DES ETAGES, S.G., DOUGHERTY, T.J., PEITZSCH, R.M., GAASTERLAND, T., LUDOVICE, A.M., DE LENCASTRE, H., and TOMASZ, A. (2007). Extensive and genome-wide changes in the transcription profile of *Staphylococcus aureus* induced by modulating the transcription of the cell wall synthesis gene *murF*. *J.Bacteriol.* 189, 2376-2391.
- STAUBITZ, P., NEUMANN, H., SCHNEIDER, T., WIEDEMANN, I., and PESCHEL, A. (2004). MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol.Lett.* 231, 67-71.
- STAUBITZ, P. and PESCHEL, A. (2002). MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Bacillus subtilis*--protection against bacteriocins in terrestrial habitats? *Microbiology* 148, 3331-3332.

- STEINHUBER, A., GOERKE, C., BAYER, M.G., DORING, G., and WOLZ, C. (2003). Molecular architecture of the regulatory Locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J.Bacteriol.*, 185, 6278-6286.
- TANG, Y.Q., YUAN, J., OSAPAY, G., OSAPAY, K., TRAN, D., MILLER, C.J., OUELLETTE, A.J., and SELSTED, M.E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286, 498-502.
- TIPPER, D.J., TOMOEDA, M., and STROMINGER, J.L. (1971). Isolation and characterization of -1,4-N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine and its O-acetyl derivative. *Biochemistry* 10, 4683-4690.
- TOSSI, A. (2002).
<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html>
- TUSHER, V.G., TIBSHIRANI, R., and CHU, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *P.N.A.S.* 98, 5116-5121.
- UTAIDA, S., DUNMAN, P.M., MACAPAGAL, D., MURPHY, E., PROJAN, S.J., SINGH, V.K., JAYASWAL, R.K., and WILKINSON, B.J. (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology* 149, 2719-2732.
- VYLKOVA, S., NAYYAR, N., LI, W., and EDGERTON, M. (2007). Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob.Agents Chemother.* 51, 154-161.
- WARREN, G.H. and GRAY, J. (1965). Effect of sublethal concentrations of penicillins on the lysis of bacteria by lysozyme and trypsin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 120, 504-511.
- WEIDENMAIER, C., PESCHEL, A., KEMPF, V.A., LUCINDO, N., YEAMAN, M.R., and BAYER, A.S. (2005). DltABCD- and MprF-mediated cell envelope modifications of *Staphylococcus aureus* confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. *Infect.Immun.* 73, 8033-8038.
- WIEDEMANN, I., BREUKINK, E., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O.P., BIERBAUM, G., DE KRUIJFF, B., and SAHL, H.-G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J.Biol.Chem.* 276, 1772-1779.
- WIMLEY, W.C., SELSTED, M.E., and WHITE, S.H. (1994). Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 3, 1362-1373.
- XIONG, Y.Q., MUKHOPADHYAY, K., YEAMAN, M.R., ADLER-MOORE, J., and BAYER, A.S. (2005). Functional interrelationships between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49, 3114-3121.
- YANG, L., HARROUN, T.A., WEISS, T.M., DING, L., and HUANG, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys.J.* 81, 1475-1485.
- YANG, D., BIRAGYN, A., HOOVER, D.M., LUBKOWSKI, J., and OPPENHEIM, J.J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu.Rev.Immunol.* 22, 181-215.

- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., and MESSING, J. (1985).
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- YEAMAN, M.R. and YOUNT, N.Y. (2007).
Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nat.Rev.Microbiol.* 5, 727-740.
- YIN, S., DAUM, R.S., and BOYLE-VAVRA, S. (2006).
VraSR two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 50, 336-343.
- YOUNT, N.Y. and YEAMAN, M.R. (2004).
Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 7363-7368.
- ZASLOFF, M. (1987).
Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 5449-5453.
- ZASLOFF, M. (2002).
Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Publikationen:

Sass, V., Pag, U., Tossi, A., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (2008):

Mode of action of human β -defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge.

International Journal of Medical Microbiology, doi:10.1016/j.ijmm.2008.01.011 (Epub ahead of print).

Pag, U., Oedenkoven, M., Sass, V., Shai, Y., Shamova, O., Antcheva, N., Tossi, A., Sahl, H.-G. (2008):

Analysis of *in vitro* activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an α -helical 'sequence template'.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 341-352.

Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind P.H., Neve, S., Ravn, B.M., de Maria, L., Sahl, H.-G., Kristensen, H.-H. (2008):

Plectasin, a fungal defensin antibiotic peptide, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. Nature, zur Veröffentlichung eingereicht.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und zur Anfertigung der Arbeit ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bonn, im Oktober 2008