

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung des Einflusses verschiedener Testparameter auf die Wirksamkeit
ausgewählter antimikrobieller Peptide**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Thorsten Siebert
aus Kassel

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Podschun, Institut für Infektionsmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.09.2019

gez.: Prof. Dr. Michael Weichenthal

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Antimikrobielle Peptide (AMP).....	2
1.2	Humanes Beta-Defensin 2 (hBD-2).....	3
1.3	Ribonuklease 7 (RNase 7).....	4
2	Material und Methoden.....	5
2.1	Material.....	5
2.1.1	Antimikrobielle Peptide.....	5
2.1.2	Antibiotika.....	5
2.1.3	Mikroorganismen.....	5
2.1.4	Chemikalien.....	5
2.1.5	Enzyme.....	6
2.1.6	Plasmide.....	6
2.1.7	Puffer.....	6
2.1.8	Nährmedien.....	7
2.1.9	Geräte und Materialien.....	7
2.2	Rekombinante Expression von RNase 7.....	9
2.2.1	Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	11
2.2.2	Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie.....	12
2.2.3	Enterokinase-Spaltung.....	13
2.2.4	Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie.....	14
2.3	Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen.....	15
2.4	Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen in 10 mM Natriumphosphatpuffer.....	15

2.5	Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> , bei 3%iger und bei 6%iger TSB-Konzentration.....	17
2.6	Antimikrobieller Test (AMT) von hBD-2 bei 1, 3 und 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer nach 3 Stunden und 24 Stunden.....	18
2.7	Antimikrobielle Testung von hBD-2 bei unterschiedlichen Ausgangs-CFUs	19
2.8	HBD-2 MHK-Test mit unterschiedlichen Platten (Polypropylen und -styrol).....	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Rekombinante Expression von RNase 7	21
3.2	Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen.....	28
3.3	Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen in 10 mM Natriumphosphatpuffer	28
3.4	Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen <i>Staphylococcus aureus</i> , bei 3%iger und bei 6%iger TSB-Konzentration.....	29
3.5	Antimikrobieller Test (AMT) von hBD-2 bei 1, 3 und 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer nach 3 Stunden und 24 Stunden.....	31
3.6	Antimikrobielle Testung von hBD-2 bei unterschiedlichen Ausgangs-CFUs	32
3.7	hBD-2 MHK-Test mit unterschiedlichen Platten (Polypropylen und -styrol)	34
4	Diskussion.....	36
4.1	HBD-2.....	36
4.1.1	Optimale TSB-Konzentration.....	36
4.1.2	Auswertbarkeit der Absorptionsmessung.....	37
4.1.3	Höhere hBD-2-Konzentration.....	37
4.1.4	Antimikrobielle Testung und Auszählung der CFU.....	38
4.1.5	Verringertes <i>Staphylococcus aureus</i> Inokulum.....	38
4.1.6	Polystyrol oder Polypropylen Platten?.....	40
4.2	RNase 7	40

4.2.1	TSB-Konzentration.....	40
4.2.2	Oxidation von RNase 7	40
4.3	Ausblick.....	41
5	Zusammenfassung.....	41
6	Literaturverzeichnis.....	43
7	Abkürzungsverzeichnis.....	47
8	Danksagung	48

1 Einleitung

Mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928 begann eine Ära, in der Infektionskrankheiten endgültig besiegt erschienen.

Aufgrund der großen Erfolge bei der Bekämpfung von Infektionen durch Penicillin und allen weiteren Antibiotika wurden diese seitdem in der Medizin, aber auch in anderen Bereichen, wie z.B. der Massentierhaltung, flächendeckend eingesetzt.

Wegen der steigenden Zahl von Resistenzen werden diese Medikamente jedoch zunehmend unzuverlässiger. Es besteht dadurch die Gefahr, dass Antibiotika bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten in einigen Bereichen ihre Wirksamkeit verlieren und wir somit teilweise in die Zeiten zurückfallen, in denen gegen Infektionskrankheiten kaum Medikamente zur Verfügung standen (Schroeder, Brooks, & Brooks, 2017). Besonders multiresistente Erreger (MRE) wie zum Beispiel Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (VRSA), Extended-Spektrum-Betalaktamasen (ESBL)-bildende Bakterien und andere, stellen bei der medizinischen Versorgung der Bevölkerung eine zunehmend wachsende Bedrohung dar (Schroeder et al., 2017);(Roca et al., 2015). Dies wird besonders deutlich bei der steigenden Zahl von Infektionen im stationären und ambulanten Bereich mit MRE (Martínez & Baquero, 2014).

Den Gefahren durch zunehmende Resistenzbildung gegen Antibiotika kann man nur begrenzt entgegenwirken, denn auch bei hohen Hygienestandards und sachgemäßer Anwendung der Antibiotika wird es immer zu weiteren Resistenzentwicklungen kommen. Lösbar wäre das Problem, wenn andere Substanzen die Lücken bei der Bekämpfung von Infektionen füllen könnten.

Ein vielversprechender Ansatz ist der Einsatz von antimikrobiellen Peptiden (AMP), die ihr großes klinisches Potential auch bei der Bekämpfung von MRE bereits unter Beweis gestellt haben. Daher wird weltweit an Einsatzmöglichkeiten geforscht und die ersten Medikamente sind auch schon in der präklinischen und klinischen Erprobung (Lakshmaiah Narayana & Chen, 2015);(Azmi, Skwarczynski, & Toth, 2016);(Kosikowska & Lesner, 2016). Die Tatsache, dass sich AMP in der körpereigenen Abwehr von Säugetieren seit Jahrtausenden bewähren und sich anscheinend bisher keine Resistenzen entwickelt haben, die die breitbändige Wirksamkeit von

AMP entscheidend beeinträchtigen, lässt die Vermutung nahe liegen, dass Resistenzentwicklung gegen antimikrobielle Peptide relativ unwahrscheinlich ist. Allerdings stellen AMP in vielen Fällen wahrscheinlich auch die letzte Barriere dar, die unseren Organismus, trotz permanentem Kontakt mit Pathogenen, vor den Gefahren einer Infektion schützen. Es sind auch Resistenzen gegen einzelne AMP von verschiedenen Pathogenen durchaus bekannt (Pandini, Caroff, & Condemine, 2016), nur sind sie in keinem Fall derart, dass die Schutzfunktion der antimikrobielle Peptide für unseren Organismus dadurch verloren ginge. Sollte sich dies aber ändern, wäre die Resistenzentwicklung einzelner Pathogene gegen körpereigene AMP ein möglicherweise für die Gesundheit der Bevölkerung dramatisches Ereignis (Nizet, 2006). Daher ist vor dem klinischen Einsatz von AMP in der Infektionsbekämpfung ein dringend notwendiges Resistenzbildungspotential zu identifizieren und gegebenenfalls darauf zu reagieren.

1.1 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Die Produktion von Peptiden oder proteinartigen Molekülen mit antimikrobieller Wirkung zählt, neben der Phagozytose, zu den ältesten Mechanismen der körpereigenen Abwehr (Wiesner & Vilcinskis, 2010). Dabei handelt es um endogen gen-codierte Peptide, die ihre besondere Bedeutung in der frühen Phase der körpereigenen Abwehr gegen mikrobielle Erreger haben. Sie sind dabei erfolgreich in der Bekämpfung aller Arten von Pathogenen, wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Man findet sie in der Natur in Pflanzen, Vögeln, Säugern, Amphibien, aber auch in Bakterien. Zurzeit sind über 2600 AMP bekannt. Eine aktuelle Datenbasis dazu findet sich unter <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. Antimikrobielle Peptide besitzen eine hohe Diversität.

Drei Eigenschaften sind aber in einer großen Anzahl von AMP zu finden, sie haben in der Regel eine Länge von etwa 10-50 Aminosäuren, eine positive Nettoladung und eine amphiphile Struktur (Cederlund, Gudmundsson, & Agerberth, 2011).

AMP verhindern und kontrollieren Infektionen, indem Sie Pathogene direkt bekämpfen, aber sie modulieren auch andere Elemente der körpereigenen Abwehr (Easton, Nijnik, Mayer, & Hancock, 2009). Die direkte Eradikation erreichen AMP durch die Beschädigung der Zell-Membranen oder Translokation in das Zellinnere, um dort Zielstrukturen zu beeinflussen (siehe Abbildung 1). Dabei bindet das kationische, amphiphile AMP an die negativ geladene

Phospholipid-Zellmembran. Dabei wird vermutlich eine Pore in die Zellmembran induziert, bzw. die Zellmembran wird durchlässig, was zum Zerreißen der Membran führt (Lee, Hall, & Aguilar, 2015).

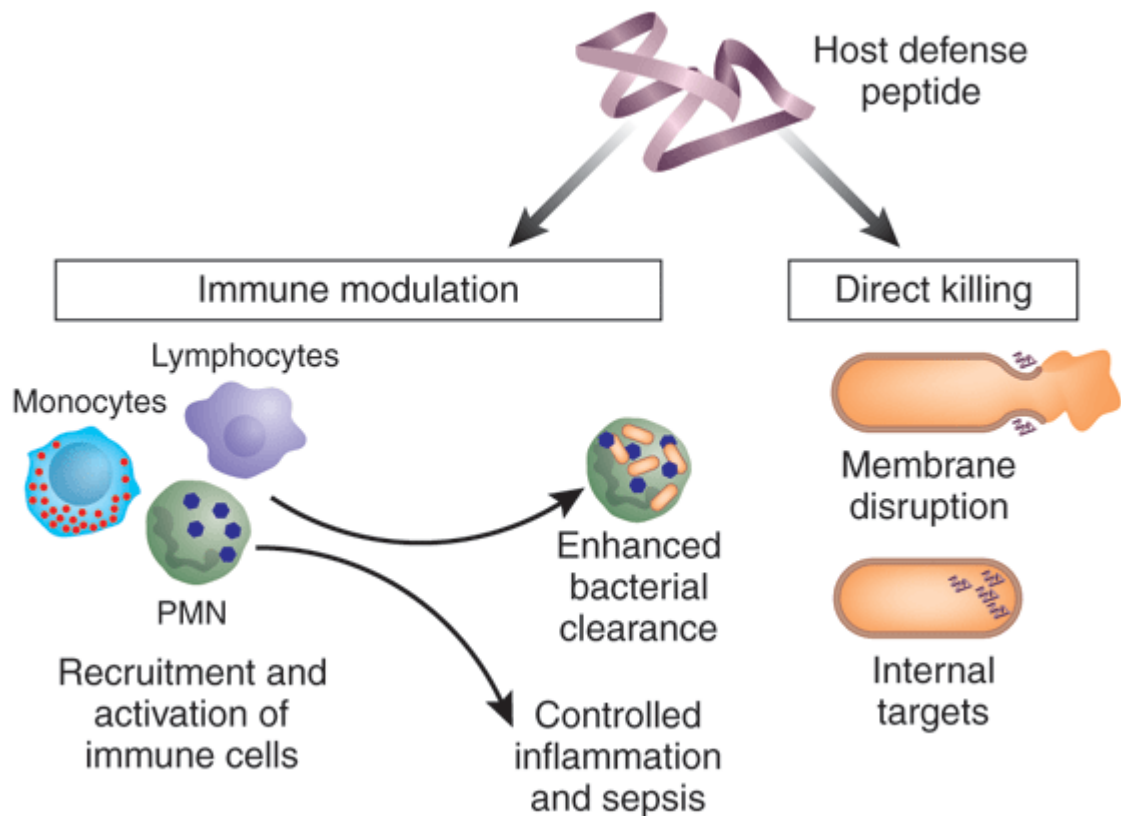


Abbildung 1: Verschiedene Abwehrmechanismen von AMPs. Direkte Neutralisierung von beispielsweise Bakterien durch die Unterbrechung der Zellmembran oder Angriff auf zellinterne Strukturen und Modulation der körpereigenen Abwehr, z.B. Anlockung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen (Martin, van Meegen, Doemming, & Schuerholz, 2015).

Im Folgenden werden die AMPs beschrieben, die für diese Arbeit besonders relevant sind.

1.2 Humanes Beta-Defensin 2 (hBD-2)

HBD-2 ist ein kleines, kationisches und amphiphiles Peptid, das aus 41 Aminosäuren besteht und zur Familie der Säugetier- β -Defensine mit sechs Cystein-Resten gehört. Die Cystein-Reste tragen durch drei Disulfidbrücken zur Struktur und Funktion der Peptide bei. Die Muster dieser

Disulfidbrücken erlauben die Einteilung der Säugetier-Defensine in drei Gruppen, nämlich α -/ β - und θ -Defensine (Schneider, Unholzer, Schaller, Schäfer-Korting, & Korting, 2005).

HBD-2 wurde 1997 zum ersten Mal in psoriatischen Hautläsionen entdeckt (Harder et al 1997). Die Freisetzung von hBD-2 durch Epithelzellen, wie z.B. Keratinozyten oder durch Monozyten wird über Lipopolysaccharide (LPS) oder andere mikrobielle Faktoren als auch durch Zytokine wie z.B. IL-1 β oder TNF- α induziert. *In vitro* konnten auch chemotaktische Aktivitäten nachgewiesen werden. Dazu gehört beispielsweise die Rekrutierung von unreifen dendritischen Zellen und T-Gedächtniszellen (Cobo & Chadee, 2013). Außerdem zeigte sich, dass hBD-2 ein natürlicher Ligand des „Toll-like-receptors-4“ (TLR-4) auf unreifen, dendritischen Zellen und CD4⁺-T-Zellen ist (Machado & Ottolini, 2015). HBD-2 besitzt antimikrobielle Aktivität überwiegend gegen gram-negative Bakterien sowie gegen Pilze (Schneider et al., 2005), es wurde aber auch antimikrobielle Aktivität gegen gram-positive Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, festgestellt (Routsias et al., 2010). Die antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 sinkt mit dem Salzgehalt des Umgebungsmilieus (Bals et al., 1998).

1.3 Ribonuklease 7 (RNase 7)

Ribonuklease 7 gehört zur humanen Ribonuklease A-Familie. RNase 7 ist ein 14,5 kDa großes, kationisches und stark basisches Protein und wird konstitutiv durch verschiedene Epithelzellen exprimiert, einschließlich der Keratinozyten der Haut und den nasalen, trachealen und bronchialen Epithelzellen. Darüber hinaus wird RNase 7 auch durch Hautverletzungen, Bakterien oder Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL17a oder Interferon γ induziert (Harder & Schröder, 2002);(Rademacher, Simanski, & Harder, 2016).

RNase 7 zeigt ein hohes antimikrobielles Potential gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien, z.B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Enterokokken und Pilze wie *Candida albicans*. (Harder & Schröder, 2002);(Köten et al., 2009). Seine Wirkung entfaltet es wahrscheinlich durch eine erhöhte Membrandurchlässigkeit der Zielzellwand (Huang et al., 2007).

Der Fokus der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Resistenzbildung von *Staphylococcus aureus* gegen den Einsatz von hBD-2 und RNase 7. *Staphylococcus aureus* ist

ein ubiquitär in der Natur und auch auf der menschlichen Haut vorkommendes Bakterium, dass auch als Humanpathogen eine bedeutende Rolle spielt (Tong et al., 2015). Da es keinen standardisierten minimalen Hemm-Konzentrations-Test (MHK-Test) zur Untersuchung dieser Resistenzbildung gibt, bildete ein Schwerpunkt dieser Dissertation die Untersuchung der Abhängigkeit der antimikrobiellen Wirksamkeit von hBD-2 und RNase 7 von verschiedenen Testbedingungen (aufgrund Materialmangels wurde dies für RNase 7 im Verlauf der Arbeit aufgegeben (siehe Ergebnisteil)). Das Ziel war gegebenenfalls die Entwicklung eines MHK-Tests für die Untersuchung der Resistenzbildung von *Staphylococcus aureus* zu ermöglichen. Ein adaptierter MHK-Test zur Testung von induzierbarer AMP-Resistenz wäre von Vorteil, da so tägliche und sofortige, wenig zeitintensive Auswertungen des Wachstums nach den jeweiligen Passage-Zeiträumen möglich wären.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antimikrobielle Peptide

Name	Hersteller
hBD-2 (Charge S31Prod2011)	Planton GmbH, Kiel, Deutschland
RNase 7	Labor Hautklinik Kiel

2.1.2 Antibiotika

Name	Hersteller
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbenicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Mikroorganismen

Name	Hersteller
<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 6538	

2.1.4 Chemikalien

Name	Hersteller
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Albumin Fraktion V, Biotin frei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Argon 5.0	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
CASO Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Select Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Enzyme

Name	Hersteller
Enterokinase EKMax™	Invitrogen™ Life technologies, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Plasmide

Expressionsvektor	Inserts	Vektor	Referenz	Datum
R7-BL21(DE)-pLysS-pet32a, His-tag	RNase 7	pET 32a	Novagen	16.12.2004

2.1.7 Puffer

Name	Bestandteile	Menge	Einheit
10x EKMax™ Reaction Buffer	500 mM Tris-HCl 10 mM CaCl ₂ -H ₂ O H ₂ O _{deion}	60,5 g 1,47g 950 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen, auf pH 8,0 einstellen.
Bindungspuffer (FPLC)	NaCl NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O 0,2M Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O 0,2M H ₂ O _{deion}	14,61 g 9,5 ml 40,5 ml 450 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen, auf pH 7,4 einstellen und mit 0,22 µm Filter steril filtrieren
Elutionspuffer (FPLC)	NaCl Imidazol NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O 0,2M Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O 0,2M H ₂ O _{deion}	14,61 g 17,03 g 9,5 ml 40,5 ml 450 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen, auf pH 7,4 einstellen und mit 0,22 µm Filter steril filtrieren
Bindungspuffer (Puffer A) (HPLC)	Trifluoressigsäure (TFA) H ₂ O _{deion}	250 µl 500 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen und

			mit 0,22 µm Filter steril filtrieren
Elutionspuffer (Puffer B) (HPLC)	Trifluoressigsäure (TFA) Isopropanol H ₂ O _{deion}	250 µl 400 ml 100 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen und mit 0,22 µm Filter steril filtrieren
Puffer C (HPLC)	Acetonitril H ₂ O _{deion}	175 ml 325 ml	Acetonitril in H ₂ O _{deion} lösen und mit 0,22 µm Filter steril filtrieren
Natriumphosphatpuffer 10 mM	1M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 1M Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O H ₂ O _{deion}	3,16ml 6,84 ml 990 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen, auf pH 7,2- 7,4 einstellen und autoklavieren

2.1.8 Nährmedien

Name	Bestandteile	Menge	Herstellung
Luria-Broth (LB)	Soja Pepton Hefeextrakt NaCl H ₂ O _{deion}	10 g 5 g 10 g 975 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen, auf pH 7,4 mit 5M NaOH einstellen und autoklavieren
Trypton-Soja – Bouillon (TSB)	CASO Broth H ₂ O _{deion}	30 g 970 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen und autoklavieren.
TSB-Agar	CASO Broth Select Agar H ₂ O _{deion}	30 g 15g 955 ml	Bestandteile in H ₂ O _{deion} lösen und autoklavieren

2.1.9 Geräte und Materialien

Die im Folgenden tabellarisch dargestellten Geräte wurden im Zuge der Experimente genutzt:

Abzüge	Hersteller
Abzug Cytosafe 2004	Gelaire, Seven Hills NSW, Australien
Abzug Fume hood class 2	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland

Messinstrumente	Hersteller
Mikroplattenleser Sunrise	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Kolonienzähler Symbiosis Protocol SR	Synoptics, Cambridge, Großbritannien

pH-Meter pH 720 WTW pH-meter	inoLab, Weilheim, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA

Zentrifugen	Hersteller
Zentrifuge Eppendorf 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1.0R	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland

Pipetten	Hersteller
Accu jet pipette boy	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetboy acu	IBS Integra biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetman 10; 20; 200 und 1000µl	Gilson, Middleton, USA
Reference 2,5; 10; 100 und 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Research 2,5; 10; 100 und 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kühl-/ Gefrierschränke	Hersteller
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlschrank (4°C) mit Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Kryotec-Kryosafe, Hamburg, Deutschland
Sanyo Ultra low MDF-192 (-80°C)	Panasonic Healthcare, Osaka, Japan
Spektralphotometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA

FPLC/ HPLC	Hersteller
ÄKTApurifier UPC mit Monitor UPC-900	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Degassex DG-4400	Phenomex, Aschaffenburg, Deutschland
Degasser	Knauer, Berlin, Deutschland
Fraction Collector Frau-950 for ÄKTA	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
FCV-10AL VP	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland
HisTrap HP, 1 x 5ml	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Integrator 2221 LKB Bromma	Spectra-Physics, Santa-Clara, USA
Integrator SP4270	Spectra-Physics, Santa-Clara, USA
Jupiter® 5µm C4 300 Å, LC Column 250 x 4,6mm, EA	Phenomex, Aschaffenburg, Deutschland
Liquid chromatograph LC-10AT VP	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland
NUCLEOSIL® 300-7 C8 7µm	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
UV-VIS detector SPD-10A VP	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland

Andere	Hersteller
Eiskondensator Alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte IKAMAG	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Laboklav 100 MSLV	Webeco, Selmsdorf, Deutschland
Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sonoplus HD2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
TKA Smart2pure	Thermo Scientific, USA
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Savant Gel Pump GP100	ABM, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aluminiumpapier	Korff AG, Oberbipp, Schweiz
Duran Laborglasflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Eindrückstopfen versch. Farben	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Blutplatten (MHS) Mueller Hinton 2 Agar + 5% Schafblut 90mm	Biomerioux SA, Marcy l'Etoile, Frankreich
Magnetührstäbchen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Mikrotitelplatten 96 Well (Costar #3879), Runder Bd., Unbeschichtet, Polypropylen	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Mikrotiterplatten 96 Well, Ref. 83.3925	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Petrischalen mit Nocken 92 x16 mm	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
pH-Indikatorpapier 1-14	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 100 und 1000µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Reagenzgläser Soda, gl. Rand, runder Boden	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Röhren mit Belüftungsstopfen 13 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Schraubröhren 15 ml und 50 ml mit Spitzboden	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter 0,22 und 0,45µm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Rekombinante Expression von RNase 7

Zur Produktion der RNase 7 wurde die Methode der rekombinanten Expression angewandt. Dies ist eine biotechnische Methode, bei der Proteine mit Hilfe eines Vektors und eines Expressionssystems produziert werden.

Während dieser Arbeit wurde *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE) pLysS als Expressionssystem genutzt. Als Vektor diente ein pET32a-Vektor mit eingebautem RNase 7-Gen.

Dabei wurde RNase 7 als Fusionsprotein exprimiert, mit einer N-Terminale Polyhistidinetag-Sequenz (His-tag). Die *E. coli* waren darüber hinaus mit Resistenzgenen gegen Carbenicillin und Chloramphenicol ausgestattet und wurden in Glycerinstocks bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

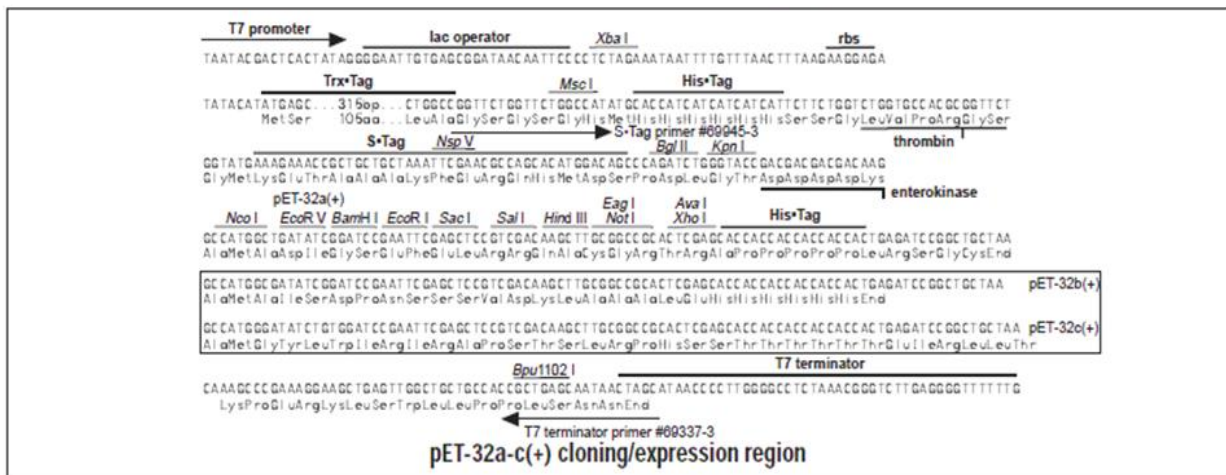
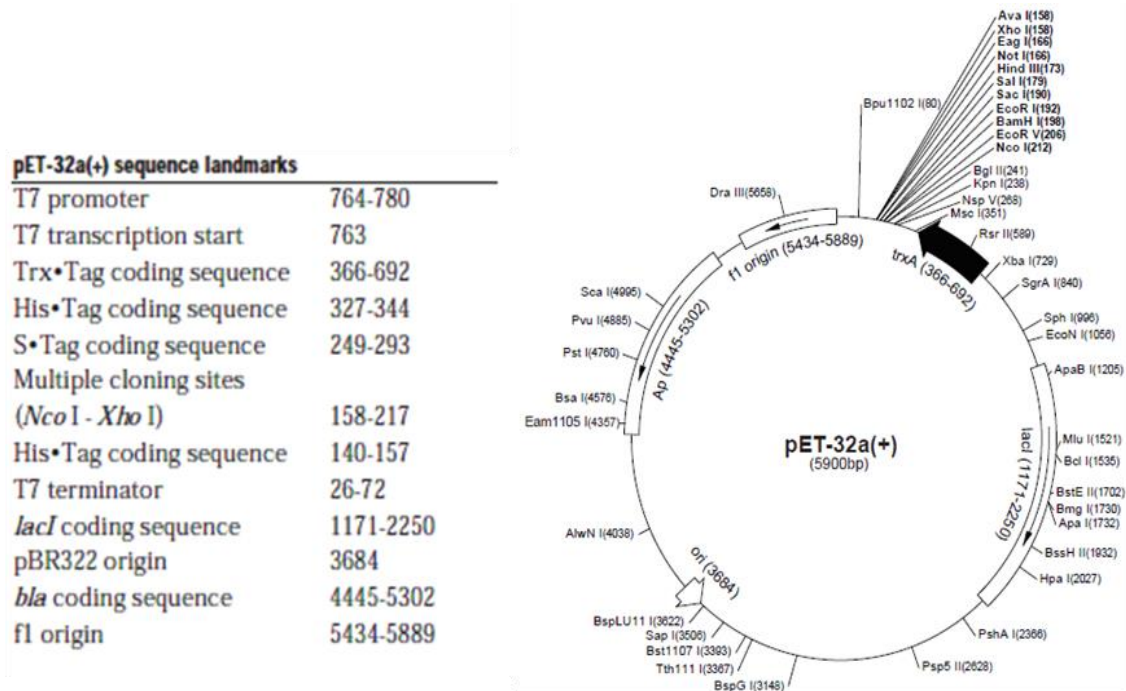


Abbildung 2: PET32a Vektor Darstellung. Der pET32a-Vektor ist 5,9 kBp groß, mit „multiplen cloning sites“. (Novagen, 1993)

Zur Proteinexpression wurden *E. coli* aus den Glycerinstocks in 6 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37°C in Röhren mit Belüftungsstopfen unter Schütteln (170 rpm) kultiviert.

Am nächsten Tag wurden die Kulturen in 200 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37 °C mit o.a. Antibiotikakonzentrationen geschüttelt (170 rpm) kultiviert.

Als die Zellkulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,7 – 1 erreichten, wurde zur Induktion der Proteinexpression Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3 Stunden kultiviert.

Nach den 3 Stunden wurde erneut der OD₆₀₀-Wert bestimmt, um weiteres Wachstum der Kulturen festzustellen. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 6000 upm (= Umdrehungen pro Minute) und 4 °C geerntet und bei -80 °C eingefroren.

Zur Vorbereitung auf die Aufreinigung wurden die Bakterienpellets resuspendiert. Dazu wurden sie in 5ml Bindungspuffer (FPLC) mit 4% Elutionspuffer (FPLC) (siehe 2.1.6 Puffer) mehrere Minuten gevortext. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit einem Sonopuls HD2070 sonifiziert, um die Zellmembran aufzuschließen. Das Zelllysate wurde dann abschließend 45 Minuten bei 4 °C und 13.500 x g zentrifugiert und der Überstand mit einem 0,22 µm-Filter steril filtriert.

2.2.1 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinanten Expression erfolgte in drei Schritten.

Für die erste Aufreinigung der Proben wurde die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie genutzt. Hierbei wird ausgenutzt, dass mit einem N-terminalen His-Tag fusionierte Proteine an Ni-Chelaten binden (Rehm und Letzel 2010).

Die mit dem N-terminalen His-Tag-fusionierten RNase 7-Proteine wurden dabei an einer mit Nickel-Chelat-Sepharose-Matrix versehenen HisTrap HP, 1x 5 ml (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), als stationäre Phase gebunden, die in einen ÄKTapurifizier UPC-10 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingebaut war. Das gelöste Fusionsprotein wurde mit dem Bindungspuffer (FPLC), (siehe 2.1.6 Puffer), equilibriert und bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min, 5-9,5 ml auf die Säule aufgetragen.

Anschließend wurden die Fusionsproteine durch einen ansteigenden Gradienten des Elutionspuffers (FPLC), (siehe Puffer 2.1.6), eluiert. Dabei verdrängt das in seiner Konzentration ansteigende Imidazol des Elutionspuffers das Fusionsprotein von der Säule. Mit Hilfe eines Detektors misst der ÄKTApurifier die UV-Absorption durch die eluierten Fusionsproteine, fraktioniert sie und zeichnet die UV-Absorption in einem Chromatogramm auf. Die fraktionierten Fusionsproteine wurden mit dem „Fraction collector FRAU-950 for ÄKTA“, (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in 15ml Schraubröhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Karlsruhe) gesammelt und bei -20 °C gelagert. Zur Steuerung und Dokumentierung des Prozesses wurde durch die Software Unicorn 5.20 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) genutzt.

2.2.2 Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie

Zur Reinigung des Fusionsproteins vom Imidazol wurde eine „high Performance liquid“-Chromatographie (HPLC) durchgeführt. Dabei binden die Proteine unterschiedlich fest an die stationäre Phase, d.h. an das Silicagel in der Trennsäule, und werden wieder eluiert (Rehm und Letzel 2010). Dazu wurde der Flüssigkeitschromatograph LC-10AT VP (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) und als Säule NUCLEOSIL® 300-7 C8 7µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) genutzt. Die Säule hat eine Silica-Matrix mit einer Porengröße von 300 Å und einer Partikelgröße von 7µm.

Die Proben wurden zunächst mit 10% TFA auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert, bei 6000 x g, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter steril filtriert. Bei jedem Lauf wurden 8-12 ml der Probe aufgetragen und die Fraktionen manuell mit Reagenzgläsern mit glattem Rand und rundem Boden aufgefangen.

Der Auftrag erfolgte mit dem Bindungspuffer (Puffer A) (HPLC). Eluiert wurde mittels Gradientenelution mit Elutionspuffer (Puffer B) (HPLC) (beide siehe 2.1.6 Puffer). Der Gradient für die Elution war wie folgt (Flow 3,0 ml/min, Maximaldruck 245 bar):

Laufzeit in min	Elutionspuffer (Puffer B) in %
0,01	10
5	10
25	70
30	100
35	100

Tabelle 1: Elutionsgradient bei der Aufreinigung von RNase 7 mit NUCLEOSIL® 300-7 C8 7µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland).

Die Fraktionen wurden mit Argon überzogen, um Oxidation zu vermeiden und bei -20 °C gelagert. Aliquots von 100 µl wurden für die Massenspektrometrie abgenommen, um die Fraktionen vor der Enterokinase-Spaltung auf RNase 7-Fusionsprotein zu kontrollieren.

2.2.3 Enterokinase-Spaltung

Vor der Spaltung des Fusionsproteins wurde die Fraktionen aus der 2. Aufreinigung in der Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konzentriert, vereinigt und danach gefriergetrocknet (Eiskondensator Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz, Deutschland) und bei -20 °C gelagert.

Um das His-Tag von der RNase 7 abzuspalten, wurde Enterokinase (Enterokinase EKMax™, Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Enterokinase ist eine Serinprotease, die spezifisch Peptidbindungen mitten in der Polypeptidkette, an der Sequenz –(Asp)₄-Lys, schneidet.

Anhand der Chromatogramme aus der 2. Aufreinigung wurde die Menge an RNase 7/His-Tag-Fusionsprotein, die sich in den gefriergetrockneten Proben befand, bestimmt. Dabei wurde

angenommen, dass die Proteinkonzentration und die entsprechende Peak-Area in den Chromatogrammen proportional zueinander waren. Es wurde der Betrag der berechneten Peak-Area, ohne die letzten fünf Stellen, als durchschnittliche Menge an Protein (in µg) gesetzt (Salzer et al. 2013). Diese Menge an gefriergetrocknetem Fusionsprotein wurde in gleicher Menge EKMax-Puffer (in µl) durch mehrminütiges Vortexen resuspendiert. Daraufhin wurde 1/1000 des EKMax-Puffer-Volumens an Enterokinase (EKMaxTM, Invitrogen) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 37 °C, ohne schütteln, für 24 h inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert oder direkt zur nächsten Aufreinigung vorbereitet.

2.2.4 Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie

Nach der Spaltung der Peptide wurden diese durch HPLC mit Flüssigkeitschromatograph LC-10AT VP (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) und zunächst mit Jupiter[®] 5µm C4 300 Å, LC-Säule 250 x 4,6 mm, Ea (Phenomex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgereinigt. Nach 4 Aufreinigungsläufen wurde zur NUCLEOSIL[®] 300-7 C8 7µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) zurückgewechselt, um eine größere Menge Probe/Lauf auftragen zu können.

Der Gradient für die Elution mit der Jupiter[®] C4-Säule war wie folgt (Flow 0,5 ml/min, Maximaldruck 245 bar):

Laufzeit in min	Elutionspuffer (Puffer B) in %
0,01	10
5	10
15	40
30	60
40	100

Tabelle 2: Elutionsgradient bei der Aufreinigung von RNase 7 mit Jupiter[®] 5µm C4 300 Å, LC Säule 250 x 4,6 mm, Ea (Phenomex, Aschaffenburg, Deutschland).

Alle weiteren Läufe mit der NUCLEOSIL[®] 300-7 C8 7µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) wurden mit dem in Tabelle dargestellten Elutionsgradienten durchgeführt.

Durch den Wechsel zurück zur NUCLEOSIL[®]-Säule konnte erhebliche Zeit eingespart werden, da die aufgetragene Menge an Probe/Lauf von 1-2 ml auf 3-4 ml erhöht werden konnte.

Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und stichprobenartig ein Aliquot von je 100 µl zur massenspektrometrischen Untersuchung abgenommen. Danach wurden die Proben wie oben beschrieben getrocknet, in 0,01% Essigsäure gelöst, aliquotiert, erneut massenspektrometrisch untersucht und bei – 80 °C gelagert.

2.3 Wachstum von *Staphylococcus aureus* in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen

HBD-2 wird in seiner Wirksamkeit durch hohe Konzentrationen NaCl gehemmt (Midorikawa et al., 2003);(Jin et al., 2004);(Routsias et al., 2010). Zum Anzüchten von *Staphylococcus aureus* wurde TSB-Medium verwendet, dieses hat einen Salzgehalt von 7,5 g/l, bestehend aus 5 g/l NaCl und 2,5 g/l Dikaliumhydrogenphosphat (~97,8 mM/l). Daher wurde angestrebt, den TSB-Gehalt auf die für das Wachstum der Bakterienstämme, minimal notwendige Menge zu begrenzen.

Dazu wurde zunächst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 aus einem Glycerinstock auf Blutplatte angeimpft. Aus dieser Reinkultur wurden drei Kolonien in 7 ml TSB-Medium als Übernachtskultur überführt und bei 37 °C mit 170 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden jeweils 10, 20 und 50 µl in 7 ml TSB-Medium überimpft und einer dieser Ansätze bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,2 inkubiert (drei Ansätze, um leichter den richtigen Zeitpunkt zu treffen). Dieser Ansatz wurde 1:100 in 1-10 % TSB in 10 mM Natriumphosphatpuffer verdünnt, und in 100µl-Triplets, je TSB-Konzentration, in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausplattiert und über Nacht im CO₂-Inkubator bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei 620 nm im Mikroplattenleser „Sunrise“ gemessen und daraus Rückschlüsse auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* gezogen.

2.4 Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus* bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen in 10 mM Natriumphosphatpuffer

Nachdem die TSB-Konzentration für ein adäquates Wachstum von *Staphylococcus aureus* in den Mikrotiterplattenwells bestimmt wurde, war es notwendig zu bestimmen, in wie weit sich

unterschiedliche TSB-Konzentrationen auf die Aktivität von hBD-2 auswirken und ob sich dies anhand der Absorption mit dem Mikrotiterplattenleser bestimmen lässt. Dazu wurden TSB-Konzentrationen von 3, 4 und 5 %, (aufgrund der Ergebnisse aus 2.3) gewählt.

Das Wachstum von *Staphylococcus aureus* in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit den oben aufgeführten TSB-Konzentrationen wurde mit dem Wachstum in annähernd gleichen TSB-Konzentrationen und 50 µg/ml hBD-2 je Well verglichen. Hierfür wurde zunächst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 aus einem Glycerinstock auf Blutplatte angeimpft. Aus dieser Reinkultur wurden drei Kolonien in 7 ml TSB-Medium als Übernachtskultur überführt und bei 37 °C mit 170 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden jeweils 10, 20 und 50 µl in 7 ml TSB-Medium überimpft und einer dieser Ansätze bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,2 inkubiert (drei Ansätze, um leichter den richtigen Zeitpunkt zu treffen). Dieser Ansatz wurde 1:10 in TSB-Medium verdünnt und daraufhin wurden 10 µl (in zwei Triplets je TSB-Konzentration) in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausplattiert. Durch nachfolgendes Auffüllen der Wells auf 100 µl ergab sich daraus eine Gesamtverdünnung von 1:100 der *Staphylococcus aureus* Bakterien-Lösung je Well. Die hBD-2 Charge S31Prod2011 von Planton (lyophilisiert) wurde in 500 µl 0,01 % HAc resuspendiert. Mit dem Spektralphotometer „Nanodrop 1000“ wurde zunächst die hBD-2-Konzentration im Programm "Protein A280" gemessen und 60 µl 0,01 % HAc-Lösung mit 1 mg/ml hBD-2 Konzentration hergestellt und davon je 5µl in jeweils ein Triplet jeder TSB-Medium Konzentration pipettiert. Daraus ergab sich eine 1:20 Verdünnung und somit eine hBD-2 Konzentration von 50 µg/ml hBD-2 je Well. Letztlich wurde die Wells mit 3, 4, und 5 % TSB in 10 mM Natriumphosphatpuffer auf 100 µl aufgefüllt, um die erwünschten TSB-Konzentrationen zu erreichen. Aufgrund der 5µl 0,01 % HAc-Lösung in den Wells mit dem hBD-2 ergab sich eine leicht geringere Konzentration von TSB je Well (2,85, 3,8 und 4,75 %). Die Mikrotiterplatten wurden dann über Nacht im CO₂-Inkubator bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei 620 nm im Mikroplattenleser „Sunrise“ gemessen (Measurement mode: „Absorbance“, Measurement wavelength: 620 nm, Read mode: „Normal“), um daraus Rückschlüsse auf die antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 zu ziehen.

2.5 Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus*, bei 3%iger und bei 6%iger TSB-Konzentration

Nach der Bestimmung der TSB-Konzentration für ein adäquates Wachstum von *Staphylococcus aureus* in den Mikrotiterplattenwells und dem Ergebnis aus 2.4, sollte jetzt bei einem vorbestimmten Inokulum von *Staphylococcus aureus* die Konzentration von hBD-2 erhöht werden, um sicher eine mangelnde Eradikation aufgrund zu geringer hBD-2 Konzentration auszuschließen. Eine hBD-2-Konzentration von 50 µg/ml in 10 mM Natriumphosphatpuffer sollte *Staphylococcus aureus* annähernd zu 100 % eradizieren (Midorikawa et al., 2003). Es wurde hierfür bei einer 3 % und 6 % TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer und hBD-2-Konzentrationen von 100 µg/ml, 50 µg/ml und 25 µg/ml die antimikrobielle Aktivität von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus* bestimmt.

Dazu wurde zunächst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 aus einem Glycerinstock auf Blutplatte angeimpft. Aus dieser Reinkultur wurden drei Kolonien in 7 ml TSB-Medium als Übernachtskultur überführt und bei 37 °C mit 170 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden jeweils 10, 20 und 50 µl in 7 ml TSB-Medium überimpft und einer dieser Ansätze bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,2 inkubiert (drei Ansätze, um leichter den richtigen Zeitpunkt zu treffen). Dieser Ansatz wurde 1:100 in 10 mM Natriumphosphatpuffer verdünnt. Danach wurden Triplets, bei 3%iger und bei 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer, von einer Verdünnungsreihe mit 25.000/ 12.500/ 6.250/ 3.125 und 1563 CFU *Staphylococcus aureus* in 100 µl je Well auspipettiert.

Die beiden Verdünnungsreihen, mit je 3 % und 6 % TSB-Konzentration und 12.500/6.250/ 3.125/ CFU in 10 mM Natriumphosphatpuffer wurden zusätzlich mit 100, 50 und 25 µg/ml hBD-2 beimpft auspipettiert. Das Verfahren wurde bereits in 2.4 beschrieben. Als Kontrolle wurden noch je ein Triplet mit TSB in 3 und 6%iger Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer und ein Triplet mit *Staphylococcus aureus* in 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer und einer 0,01%igen HAc-Konzentration, auspipettiert. Dann wurde eine Nullmessung mit dem Mikroplattenleser „Sunrise“ durchgeführt.

Die Mikrotiterplatten wurden dann für 48 Stunden im CO₂-Inkubator bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert.

Nach 24 und 48 Stunden Inkubation wurde die Absorption bei 620 nm im Mikroplattenleser „Sunrise“ gemessen (Measurement mode: „Absorbance“, Measurement wavelength: 620 nm, Read mode: „Normal“).

2.6 Antimikrobieller Test (AMT) von hBD-2 bei 1, 3 und 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer nach 3 Stunden und 24 Stunden

Um die durch die Messung der Absorption mit dem Mikrotiterplattenleser gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen, wurde ein antimikrobieller Test (AMT) durchgeführt.

Der AMT wurde als Flüssigkulturtest durchgeführt. Es wurde zunächst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 aus einem Glycerinstock auf Blutplatte angeimpft. Aus dieser Reinkultur wurden drei Kolonien in 7 ml TSB-Medium als Übernachtskultur überführt und bei 37 °C mit 170 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden jeweils 10, 20 und 50 µl in 7 ml TSB-Medium überimpft und einer dieser Ansätze bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,2 inkubiert. Danach wurden aus diesem Ansatz drei 10⁻⁴ Verdünnungen erstellt, eine in 1%TSB/0,1%BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer, eine in 3%TSB/0,1%BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer und eine in 6%TSB/0,1%BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer.

Aus diesen Verdünnungen wurden jeweils zur Bestimmung des Inokulums 50 µl pro Platte auf drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Verdünnungen in fünf 500 µl Eppendorf Mikroreaktionsgefäße gegeben. In je ein Mikroreaktionsgefäß wurde die pure jeweilige Verdünnung gegeben, eines wurde zusätzlich mit HAc in einer Konzentration von 0,01 % als Kontrolle versehen und die anderen drei Gefäßen wurden zusätzlich mit jeweils 50, 25 und 12,5 µl/mg hBD-2 beimpft. Die Ansätze wurden für drei bzw. 24 h bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Nach drei Stunden Inkubation wurden je 50 µl aller Ansätze 1:5 verdünnt und auf jeweils drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze mit der 1%igen und 6%igen TSB-Konzentration auf jeweils drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Nach weiteren 22 Stunden wurden die Kolonien auf diesen Platten mit dem Kolonienzähler Synbiosis (Protocol SR) ausgezählt.

2.7 Antimikrobielle Testung von hBD-2 bei unterschiedlichen Ausgangs-CFUs

Bisher wurde die Wirksamkeit von hBD-2 in Abhängigkeit von der Konzentration des AMPs bestimmt. Dieser Versuch sollte beleuchten, in wie weit das *Staphylococcus aureus* Inokulum eine Auswirkung auf die Eradikation durch hBD-2 hat.

Der AMT wurde als Flüssigkulturtest durchgeführt. Es wurde zunächst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 aus einem Glycerinstock auf Blutplatte angeimpft. Aus dieser Reinkultur wurden drei Kolonien in 7 ml TSB-Medium als Übernachtskultur überführt, bei 37 °C und mit 170 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden jeweils 10, 20 und 50 µl in 7 ml TSB-Medium überimpft und der 10µl Ansatz bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,216 inkubiert. So dann wurden aus diesem Ansatz drei Verdünnungen, einmal 10⁻⁴, 10⁻³ und 10⁻² erstellt, in 1%TSB/0,1%BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer. Aus diesen Verdünnungen wurden jeweils 50 µl pro Platte auf drei TSB-Agarplatten als Inokulum ausplattiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Verdünnungen in fünf 500 µl Eppendorf Mikroreaktionsgefäße gegeben. Je einmal pur, einmal mit Zusatz von HAc auf eine Konzentration von 0,01 % als Kontrolle und mit 25, 12,5 und 6,25 µl/mg hBD-2 beimpft. Das Inokulum wurde unverzüglich auf jeweils drei Agarplatten ausplattiert. Die 10⁻⁴ Verdünnung pur, die 10⁻³ Verdünnung nochmals 1:5 verdünnt und die 10⁻² Verdünnung 1:50 verdünnt. Die anderen Ansätze wurden für drei Stunden bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert.

Nach drei Stunden Inkubation wurden je 50 µl aller Ansätze ausplattiert. Die Ansätze aus der 10⁻⁴ Verdünnung wurden 1:5 verdünnt und auf jeweils drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Die Ansätze aus der 10⁻³ Verdünnung wurden dreimal auf jeweils drei TSB-Agarplatten in folgenden Verdünnungsstufen ausplattiert: Unverdünnt, 1:10 bzw. mit hBD-2 Zusatz 1:50 verdünnt. Die Ansätze aus der 10⁻² Verdünnung wurden unverdünnt, 1:100 bzw. mit hBD-2 Zusatz 1:500 verdünnt, auf jeweils drei TSB-Agarplatten ausplattiert, und über Nacht bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert.

Nach etwa 20-22 Stunden wurden die Kolonien auf diesen Platten mit dem Kolonienzähler Synbiosis (Protocol SR) ausgezählt.

Zusätzlich wurde ein weiterer AMT, wie oben bereits beschreiben, mit den *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Verdünnungen 10⁻² und 10⁻¹ durchgeführt, allerdings wurden diese mit 50,

25 und 12,5 µl/mg hBD-2 beimpft. Das Inokulum wurde wieder unverzüglich, die 10⁻² Verdünnung 1:50 und die 10⁻¹ Verdünnung 1:100 verdünnt auf jeweils drei Agarplatten ausplattiert. Die anderen Ansätze wurden wieder für drei Stunden bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Die Ansätze aus der 10⁻² Verdünnung wurden 1:100 verdünnt, auf jeweils drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Die Ansätze aus der 10⁻¹ Verdünnung wurden pur 1:100 bzw. mit hBD-2 Zusatz 1:500 verdünnt, auf jeweils drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden auch über Nacht bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Nach weiteren 22 Stunden wurden die Kolonien mit dem Kolonienzähler Synbiosis (Protocol SR) ausgezählt.

2.8 HBD-2 MHK-Test mit unterschiedlichen Platten (Polypropylen und -styrol)

Es wurde zunächst *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 aus einem Glycerinstock auf Blutplatte angeimpft. Aus dieser Reinkultur wurden drei Kolonien in 7 ml TSB-Medium als Übernachtskultur überführt, bei 37 °C und mit 170 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurden jeweils 10, 20 und 50 µl in 7 ml TSB-Medium überimpft und der 10µl Ansatz bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,25 inkubiert. Anschließend wurde aus diesem Ansatz eine 10⁻⁴ Verdünnung in 2%TSB/0,1%BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer erstellt. Davon wurden 3x 50 µl als Inokulum direkt auf TSB-Platten ausplattiert. Des weiteren wurden 50 µl der Bakterienkultur je Well jeweils in eine Platte Costar # 3879 (Polypropylen) und in eine Platte Sarstedt REF 83.3925 (Polystyrol) wie folgt auspipettiert: Die Bakterienkultur in 1%TSB/0,1%BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer, die Bakterienkultur in 1%TSB/0,1%BSA und 0,01% HAc in 10 mM Natriumphosphatpuffer und die Bakterienkultur in 1%TSB/0,1%BSA mit 50, 25, 12,5, 6,25 3,125 µg/ml hBD-2 beimpft auspipettiert. Dabei wurden die Bakterienkulturen in jeder Platte einmal einfach und einmal als Triplets auspipettiert. Nach drei Stunden wurden die einfach auspipettierten Ansätze 1:5 verdünnt und jeder Ansatz auf drei TSB-Agarplatten ausplattiert. Zu den als Triplett auspipettierten Ansätzen in den Mikrotiterplatten, wurde 50 µl 12 %TSB/0,05 % BSA in 10 mM Natriumphosphatpuffer dazu pipettiert und die 96-Well-Platten zusammen mit den TSB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Nach 22 Stunden wurden die Kolonien auf den TSB-Agarplatten mit dem Kolonienzähler Synbiosis (Protocol SR) und die 96-Well-Platten mit dem Mikroplattenleser „Sunrise“ (Measurement mode: „Absorbance“,

Measurement wavelength: 620 nm, Read mode: „Normal“), ausgezählt bzw. die Absorption gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression von RNase 7

Ein Teil dieser Dissertation beinhaltet die rekombinante Expression von RNase 7 durch das prokaryontischen Expressionssystem *Escherichia coli* BL21 (DE) pLysS.

Das Ziel der Expression von RNase 7 war die Herstellung einer ausreichend großen Menge an Peptiden zur Durchführung der Versuche, die für die Ergebnisse dieser Dissertation nötig waren. Darüber hinaus sollten die in unserem Labor etablierten Verfahren verifiziert und optimiert werden.

Das Expressionssystem mit dem entsprechenden pET32a Vektor, inklusive RNase 7-Gen, war im Labor bereits in Glycerinstocks vorhanden und wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt kultiviert, danach wurde am folgenden Tag die Proteinexpression induziert. Die Peptide wurden als Fusionsprotein mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert. Dies erlaubte nach dem Ernten und Lysieren der Bakterien die FPLC-Aufreinigung im IMAC (immobilisierte Metallaffinitätschromatographie)-Verfahren. Die Läufe mit der FPLC-Anlage zeigten im Chromatogramm Peaks, die auf die gelungene Aufreinigung des Fusionsproteins hinwiesen (Abbildung 3).

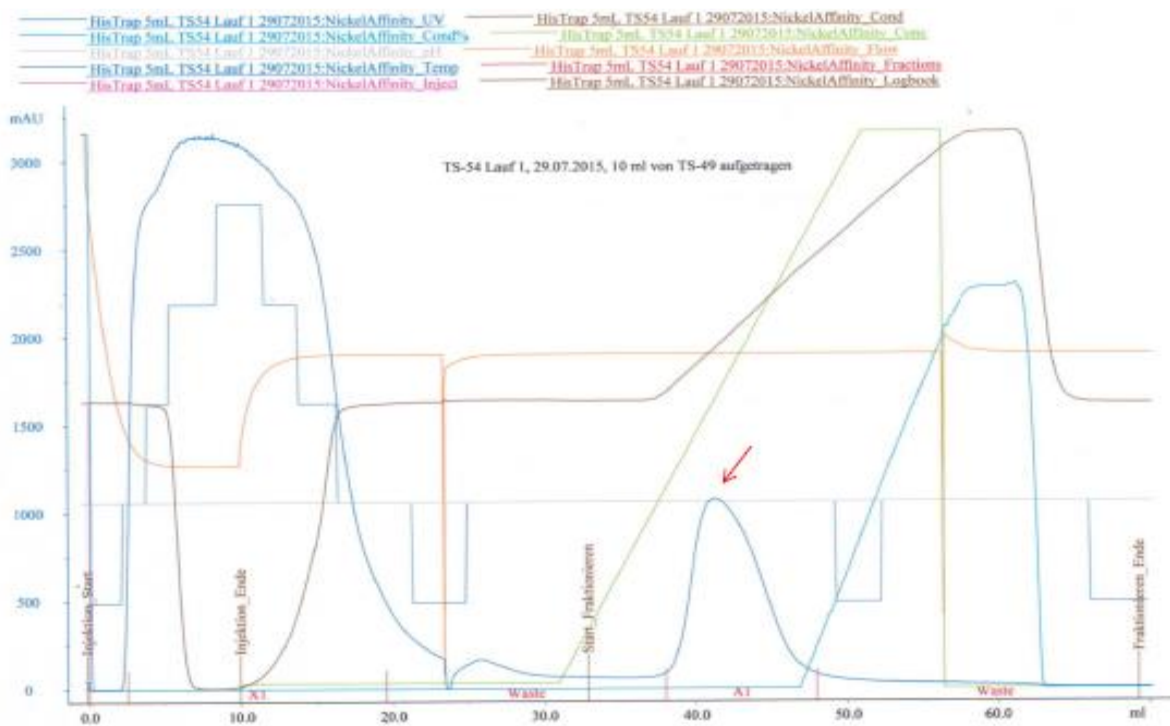


Abbildung 3: Chromatogramm der Affinitätschromatographie (IMAC) des exprimierten Fusionsproteins aus His-Tag und RNase 7. Der Pfeil weist auf den relevanten Peak, der erste Peak wird durch die Substanzen erzeugt, die nicht an Ni²⁺-Säule binden. Die grüne Kurve stellt die den Verlauf des Imidazol-Gradienten dar (mAU: milli-absorbance unit, A1 = gesammelte Fraktion).

Im nächsten Schritt erfolgte die erste umkehrphasenchromatographische Aufreinigung des Fusionsproteins, um dieses vom Imidazol zu reinigen (Abbildung 4).

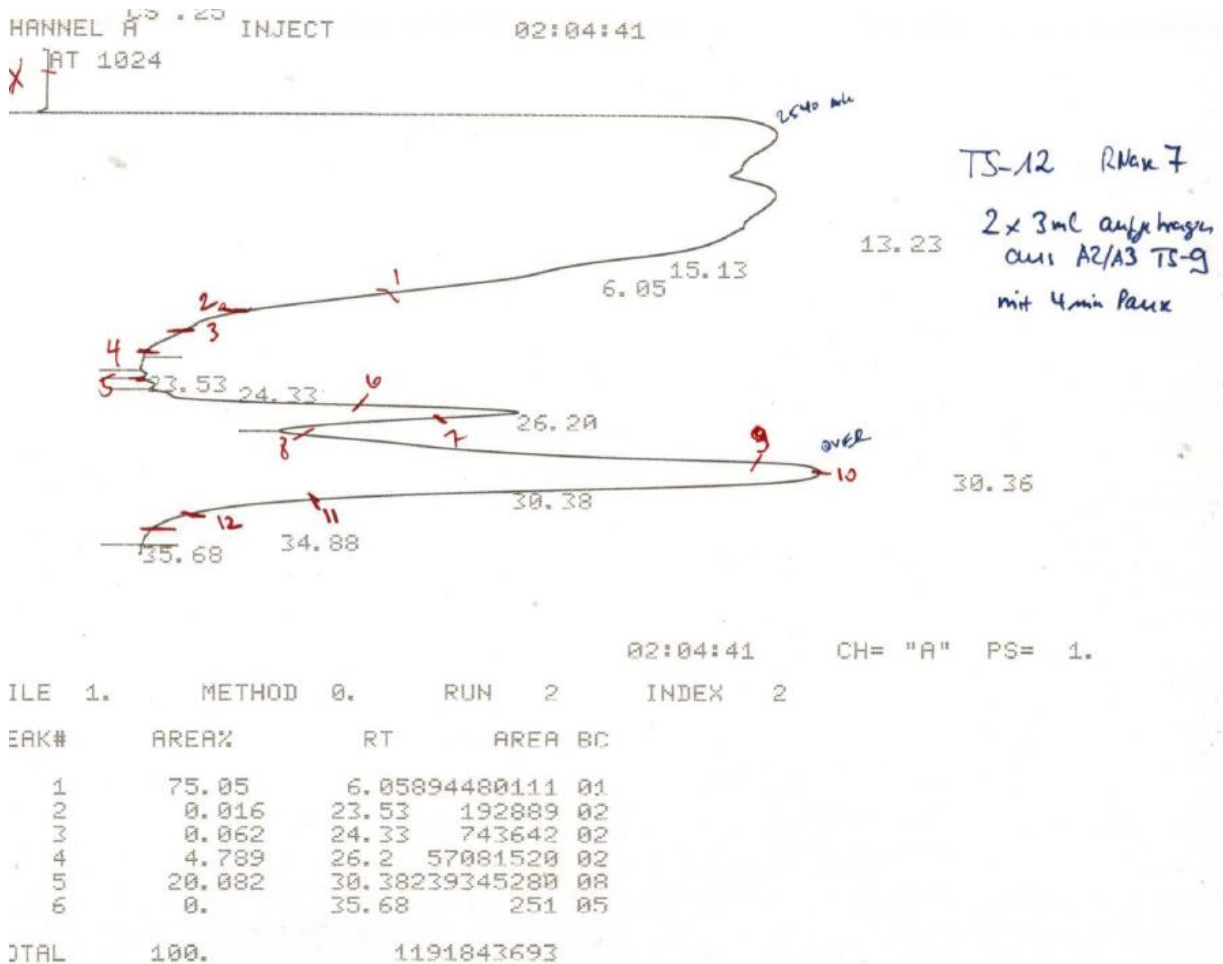


Abbildung 4: Chromatogramm einer Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie des Fusionsproteins aus His-Tag und RNase 7, in den Fraktionen 8-12 ist das Fusionsprotein enthalten

Im Anschluss wurden kleine Aliquots (100 μ l) zur massenspektrometrischen Untersuchung abgenommen. Der gesuchte Massenbereich war dabei \sim 32 kDa, welches der molekularen Masse des RNase 7/His-Tag-Fusionsproteins entspricht (Abbildung 5).

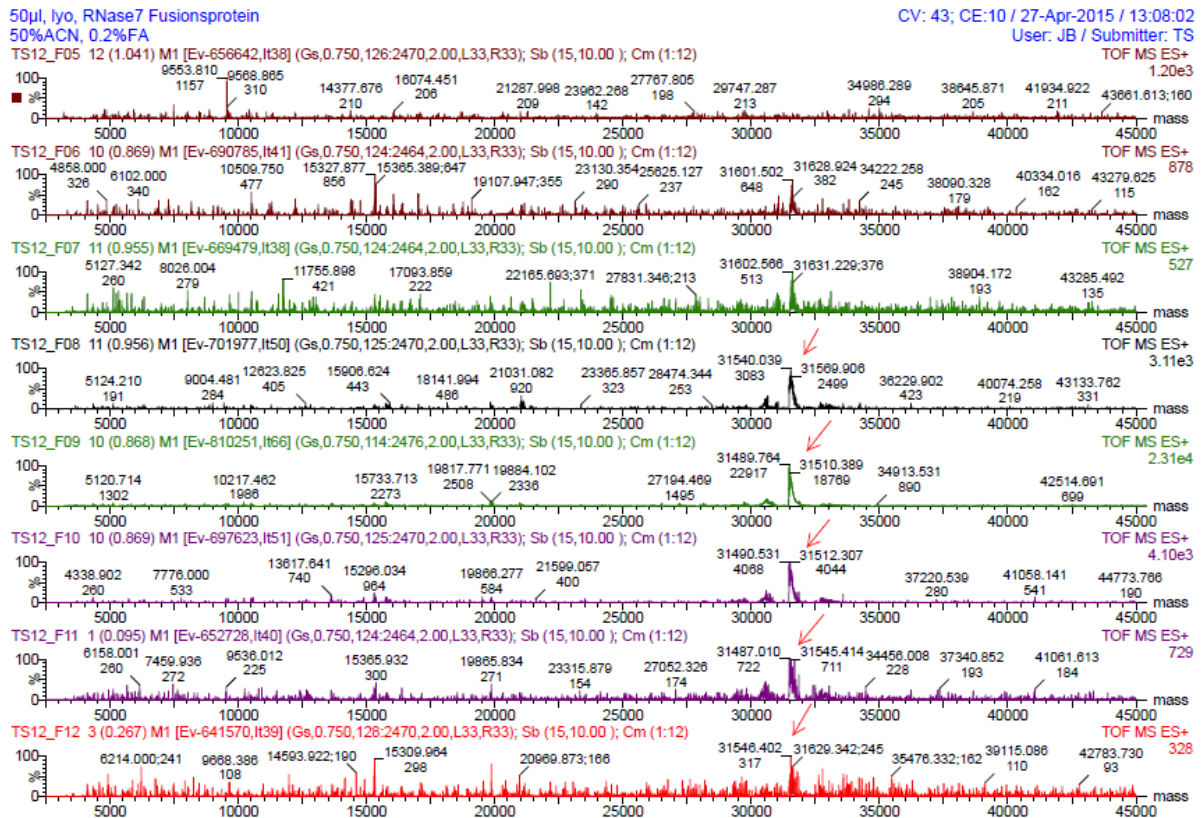


Abbildung 5: Massenspektrometrie des, nach der Aufreinigung mittels Umkehrphasenchromatographie gesammelten, Fusionsproteins aus His-Tag und RNase 7. Die Pfeile weisen auf den Massenbereich des Fusionsproteins aus His-Tag und RNase 7, die in jeder Probe den höchsten Anteil ausmachten.

Als nächstes wurde das Fusionsprotein proteolytisch mittels Enterokinase gespalten und ein zweites Mal mittels Umkehrphasenchromatographie aufgereinigt. Die bei dieser Aufreinigung gewonnenen reinen RNase 7-Peptide wurden erneut massenspektrometrisch analysiert. Aufgrund der Aminosäuresequenz wurde ein theoretisches Molekulargewicht von 14553 Da für das rekombinante RNase 7-Peptid erwartet. Dies sind 8 Da mehr als die zum überwiegenden Teil gemessene Atommasse von 14545 Da. Dies erklärt sich aus den 8 Cystein-Resten, die durch 4 Disulfidbrücken verbunden sind. Die erhöhten Massen von 14561 Da und 14577 Da ergeben sich aus Oxidation der Peptide (Abbildung 6).

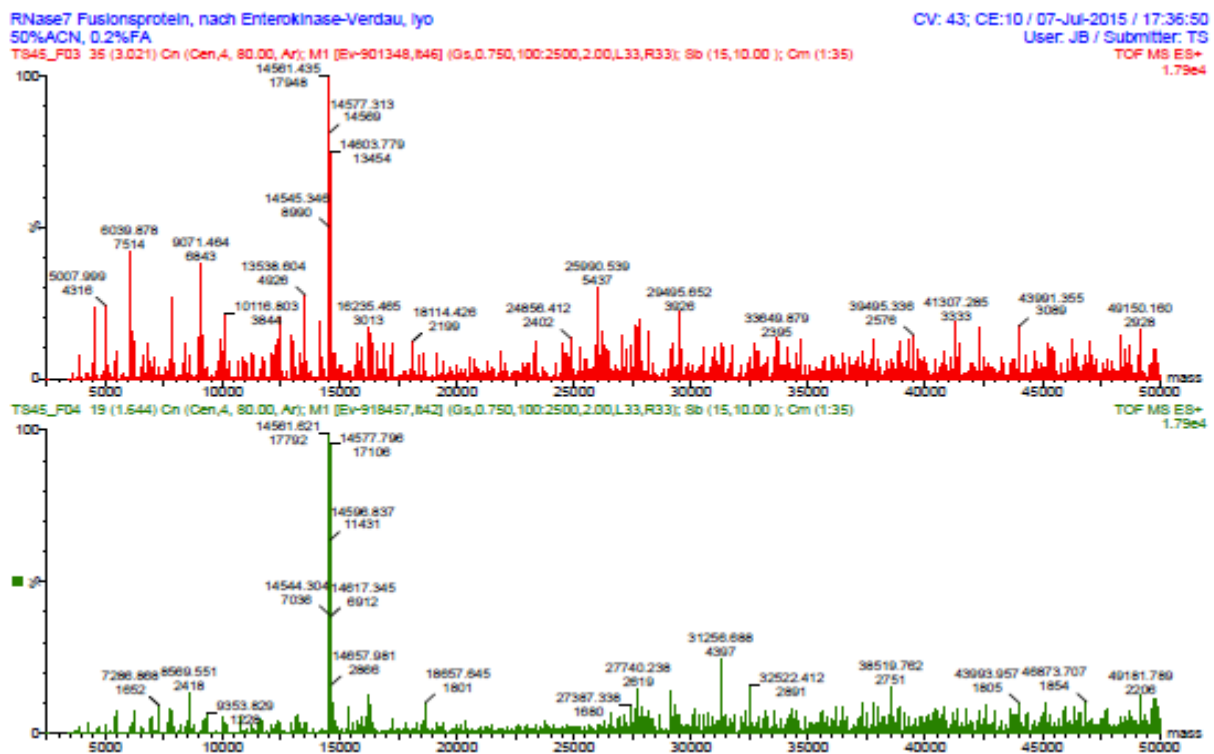


Abbildung 6: Massenspektrometrie der aufgereinigten rekombinanten RNase 7-Peptide. Die dargestellten Anteile der berechneten Massen in der Probe zeigen, dass es sich bei dem größten Anteil (>90 %) um oxidierte rekombinante RNase 7, mit der Atommasse von 14544, 14561 und 14577, handelt.

Daraufhin wurden die Fraktionen, die das gesuchte RNase 7-Peptid beinhalten, zusammengefasst, die Konzentration des Peptids bestimmt, konzentriert, getrocknet in 0,01 % HAc aufgenommen, massenspektrometrisch untersucht und in 500 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Die massenspektrometrischen Messungen der ersten Aliquots enthielten keine Anteile von RNase 7 mit der Atommasse von 14544 bzw. 14561 oder 14577 Da mehr, sondern überwiegend aus dem Atommassebereich um 14610 (Abbildung 7).

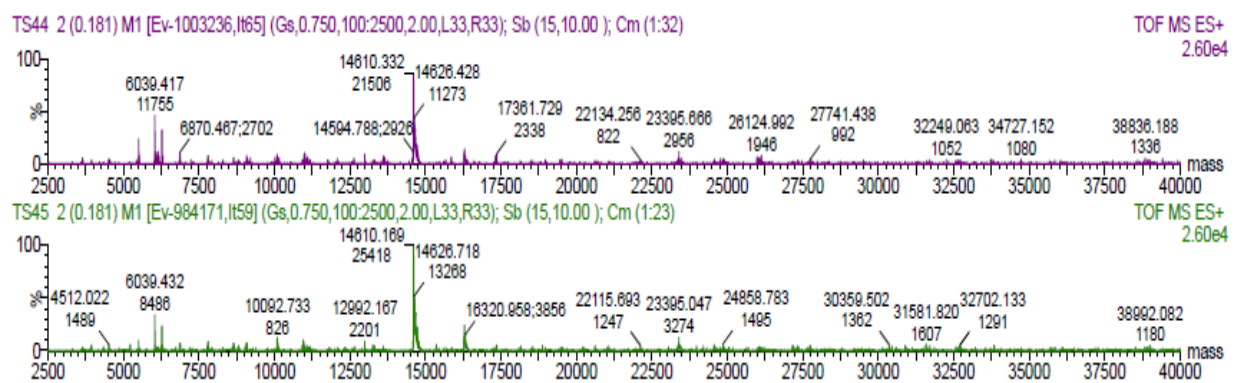


Abbildung 7: Massenspektrometrie der Aliquots der aufgereinigten rekombinanten RNase 7-Peptide. Die dargestellten Anteile der berechneten Massen in der Probe zeigen, dass es sich bei dem größten Anteil (>90 %) um rekombinante RNase 7, mit der Atommasse von 14610 Da handelt.

Die mit der rekombinant gewonnen, oxidierten RNase 7, durchgeführte antimikrobielle Testung gegen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 zeigte bei Konzentrationen von 20/10/5 µg/ml eine deutlich schlechtere Wirksamkeit, als bei den RNase 7 Vergleichszeptiden und die bereits veröffentlichte antimikrobielle Wirkung (letale Dosis von 90 % = 3–6 µg/ml) wurde ebenfalls nicht erreicht (Simanski et al., 2010). Außerdem zeigte sich, dass die RNase 7 Aktivität bei steigender TSB-Konzentration (hier 1 % und 4 %) nachlässt. Eine komplette Eradikation von *Staphylococcus aureus* ATC 6538 wurde durch die oxidierte RNase 7 nur bei Konzentrationen von 80 µg/ml erreicht (Abbildung 8).

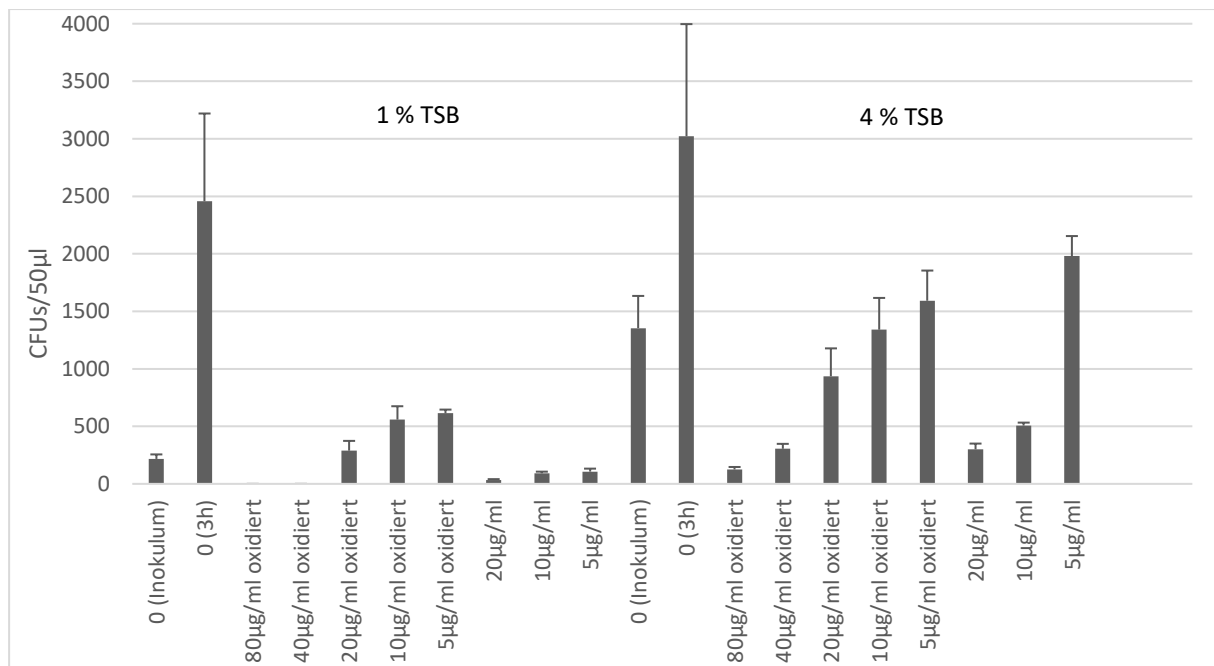


Abbildung 8: Oxidation von RNase 7 verringert die antimikrobielle Aktivität. *Staphylococcus aureus* wurde für 3 Stunden, mit den dargestellten Konzentration oxidierter und nicht oxidierter RNase 7, in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 % bzw. 4 % TSB, inkubiert. Dann wurden die verbleibenden CFU auf Agarplatten ausplattiert und am nächsten Tag gezählt.

3.2 Wachstum von *Staphylococcus aureus* in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen

Um den Salzgehalt der Nährlösung zu minimieren wurde angestrebt, die zum Wachstum von *Staphylococcus aureus* notwendige TSB-Konzentration so gering wie möglich zu halten. Es zeigte sich, dass sich ein mit dem Mikroplattenleser auswertbares Wachstum erst ab einer TSB-Konzentration von 3 % ergibt, wobei sich bei mehr als 4 % TSB-Konzentration die Absorptionskurve und somit das Wachstum von *Staphylococcus aureus* abflachte (Abbildung 9).

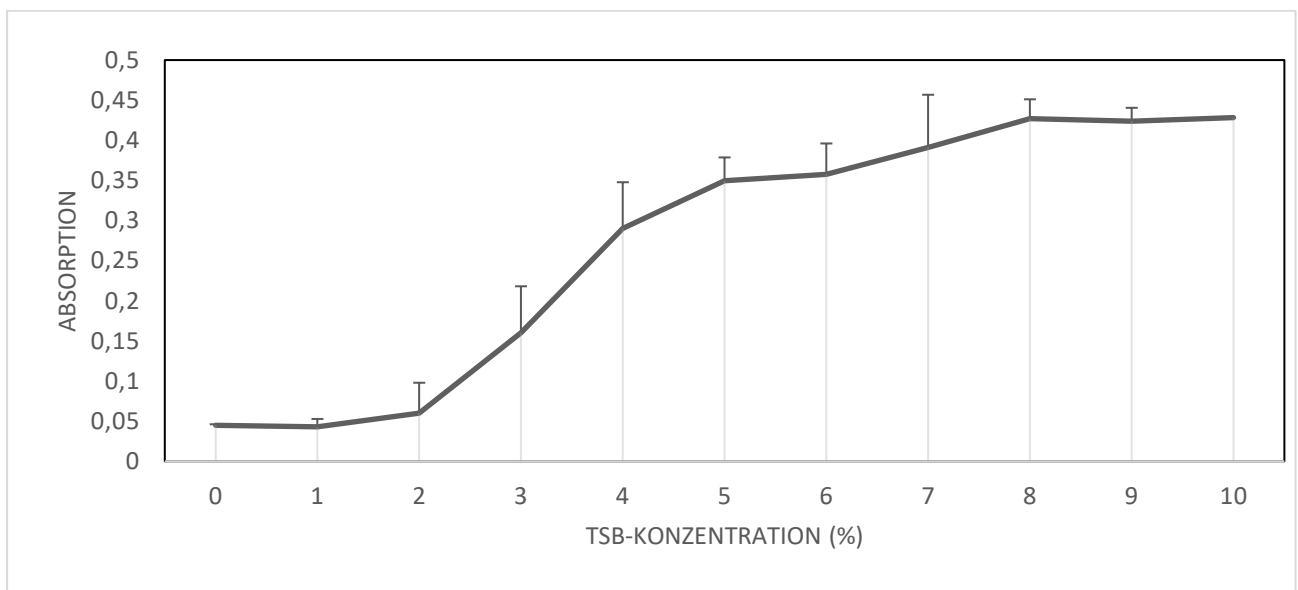


Abbildung 9: Das Wachstum von *Staphylococcus aureus* in 10 mM Natriumphosphatpuffer ist abhängig von der TSB-Konzentration. *Staphylococcus aureus* wurde über Nacht, bei 37 °C, in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit den dargestellten TSB-Konzentrationen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption gemessen

3.3 Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus* bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen in 10 mM Natriumphosphatpuffer

Nachdem die TSB-Konzentration für ein adäquates Wachstum von *Staphylococcus aureus* in den Mikrotiterplattenwells bestimmt war, sollte bestimmt werden, in wie weit

unterschiedliche TSB-Konzentrationen Auswirkungen auf die Aktivität von hBD-2 haben und ob sich dies anhand der Absorption mit dem Mikrotiterplattenleser bestimmen lässt.

Das Ergebnis dieses Versuchs überraschte dadurch, dass nach 22 Stunden Inkubation bei 37 °C, die Absorption und somit das Wachstum in den Wells mit *Staphylococcus aureus* und hBD-2 höher war, als in den Wells ausschließlich mit 10 mM Natriumphosphatpuffer und TSB. Erwartet wurde aufgrund der bakteriziden Wirkung von hBD-2 das Gegenteil, da ein stärkeres Wachstum ohne den Einfluss und hBD-2 angenommen wurde und somit eine höhere Absorption (Abbildung 10).

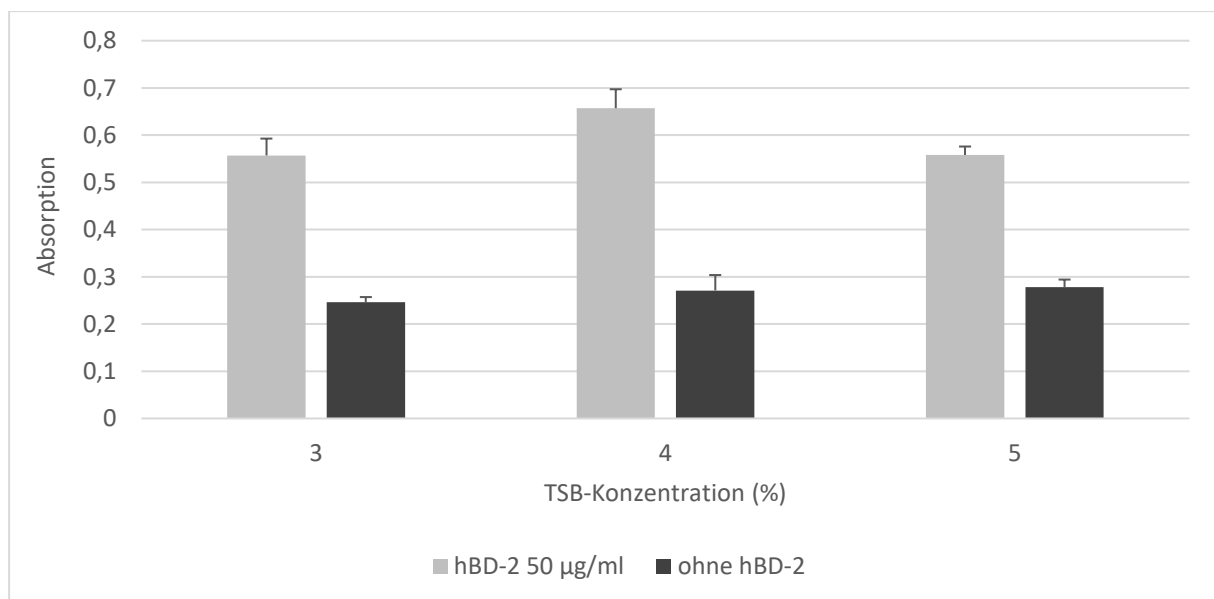


Abbildung 10: Stärkeres *Staphylococcus aureus* Wachstum trotz Beimpfung mit hBD-2. *Staphylococcus aureus* Bakterien wurden über Nacht bei unterschiedlichen TSB-Konzentrationen (3, 4 und 5 % in 10mM Natriumphosphatpuffer) inkubiert. Dabei wurde das gleiche Inokulum mit 50 µg/ml hBD-2 beimpft und unbeimpft inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption gemessen.

3.4 Antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus*, bei 3%iger und bei 6%iger TSB-Konzentration

Nach der Bestimmung der TSB-Konzentration für ein adäquates Wachstum von *Staphylococcus aureus* in den Mikrotiterplattenwells und dem Ergebnis aus 3.3, sollte jetzt bei einem vorbestimmten Inokulum von *Staphylococcus aureus* die Konzentration von hBD-2

erhöht werden, um sicher eine mangelnde Eradikation aufgrund zu geringer hBD-2 Konzentration auszuschließen.

Bei 3%iger und 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer und 100 µg/ml, 50 µg/ml und 25 µg/ml hBD-2-Konzentration wurde die antimikrobielle Aktivität von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus* bestimmt. Wie in Abbildung 11 für 6%ige TSB-Konzentration dargestellt, ergab sich auch der höchsten hBD-2-Konzentration von 100 µg/ml, nach 24 bzw. 48 Stunden ein weiteres Wachstum von *Staphylococcus aureus*, sichtbar an der weiter ansteigenden Absorption.

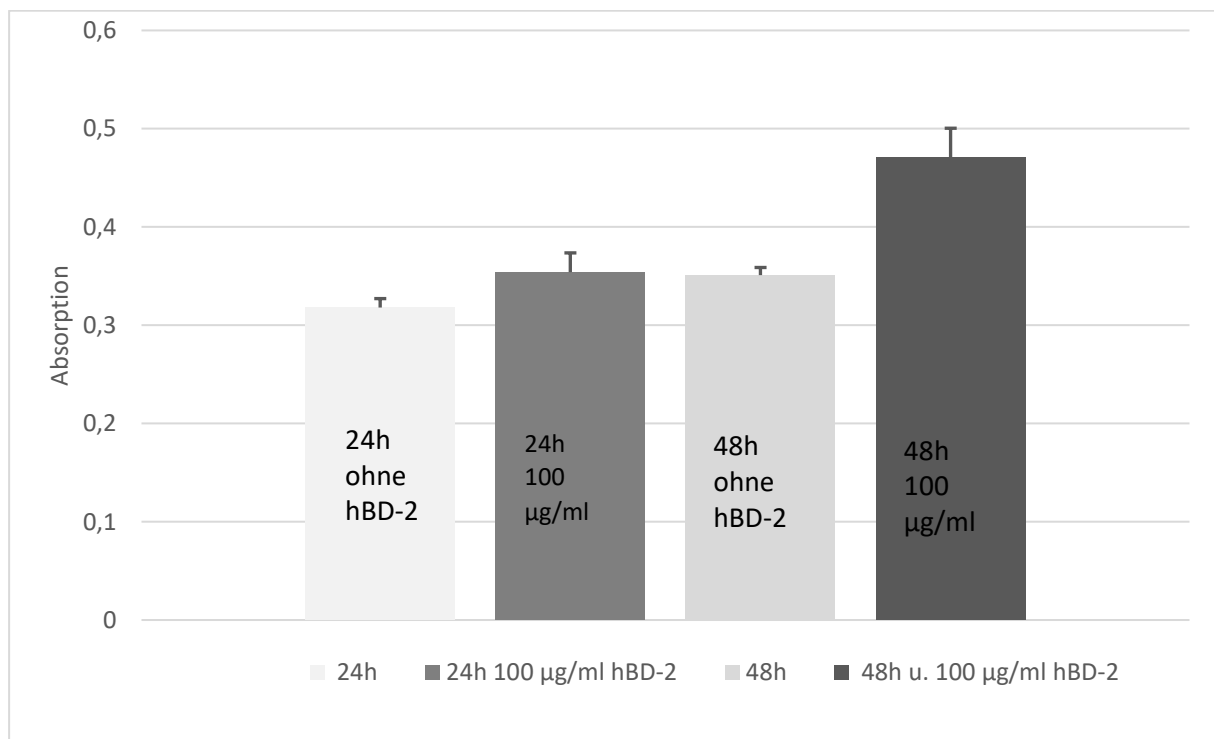


Abbildung 11: Wachstum von *Staphylococcus aureus* nach 24h bzw. 48h Inkubation bei hoher hBD-2-Konzentration. Das Inokulum von 12.500 CFU *Staphylococcus aureus* wurde jeweils in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 6 % TSB-Konzentration mit und ohne 100 µg/ml hBD-2 Beimpfung, inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Absorption gemessen.

3.5 Antimikrobieller Test (AMT) von hBD-2 bei 1, 3 und 6%iger TSB-Konzentration in 10 mM Natriumphosphatpuffer nach 3 Stunden und 24 Stunden

Um die durch die Messung der Absorption mit dem Mikrotiterplattenleser gewonnen Erkenntnisse zu bestätigen, wurde ein AMT durchgeführt. Wie in den u.a. Abbildungen dargestellt, zeigte sich auch hier, dass eine ansteigende Konzentration von TSB die antimikrobielle Wirkung von hBD-2 hemmt (Abbildung 12) und das *Staphylococcus aureus*, wegen nicht vollständiger Eradikation, über Nacht wieder stark anwächst (Abbildung 13).

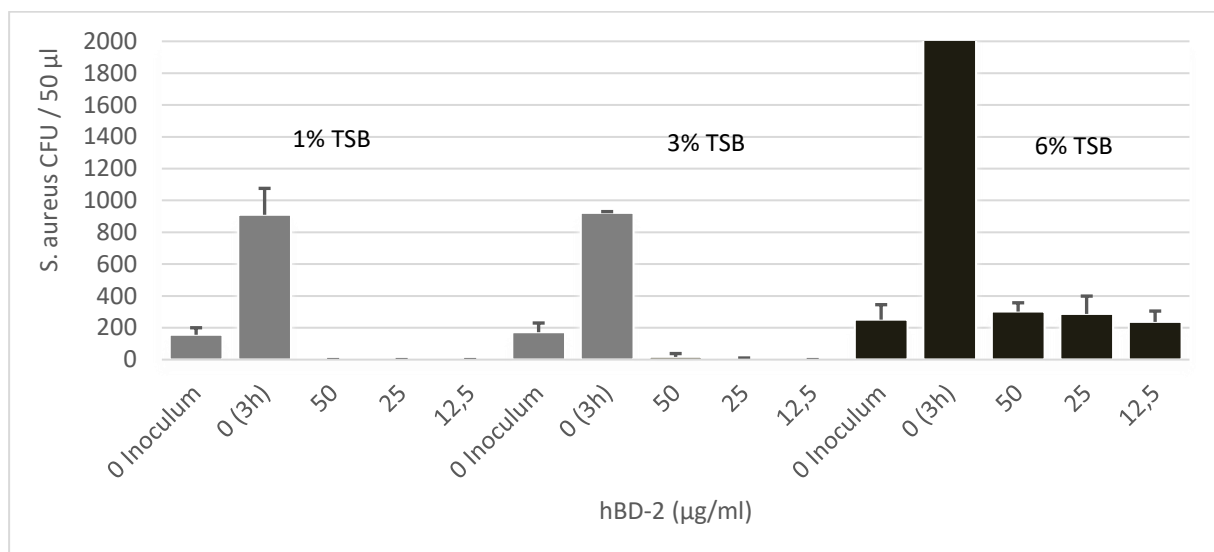


Abbildung 12: Antimikrobielle Wirkung von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus* sinkt bei steigenden TSB-Konzentrationen. *Staphylococcus aureus* wurde mit den dargestellten hBD-2-Konzentrationen beimpft und für 3h in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1, 3 und 6 % TSB-Konzentration inkubiert. Danach wurden verschiedene Verdünnungen der Ansätze auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die CFU ausgezählt.

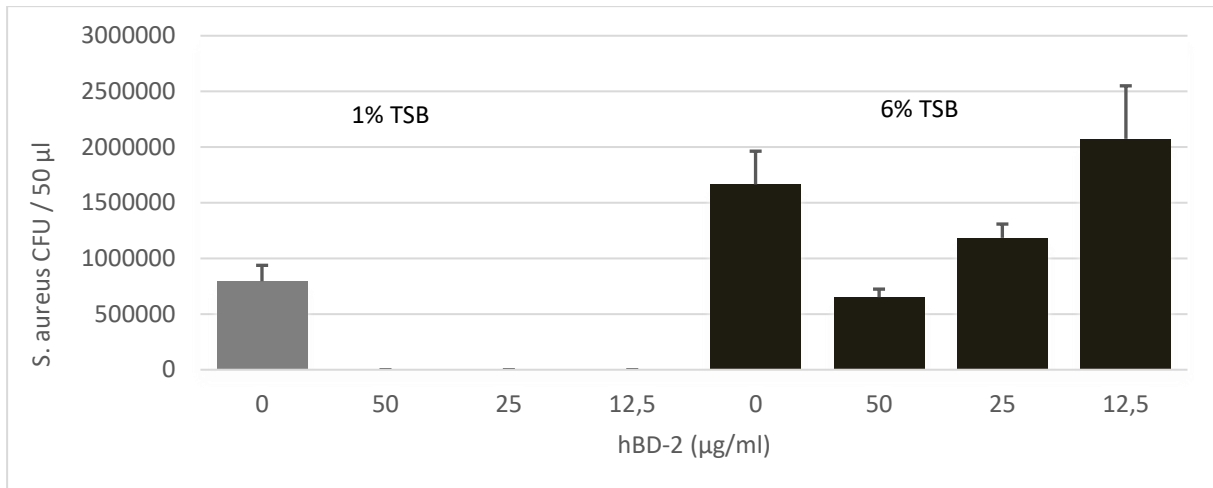


Abbildung 13: Wachstum von *Staphylococcus aureus* nach 24 Stunden bei unterschiedlichen hBD-2- und 1 % bzw. 6 % TSB-Konzentration im 10 mM Natriumphosphatpuffer. *Staphylococcus aureus* wurde mit den dargestellten hBD-2-Konzentrationen beimpft und für 24h in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 und 6 % TSB-Konzentration inkubiert, so dann auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die CFU ausgezählt.

3.6 Antimikrobielle Testung von hBD-2 bei unterschiedlichen Ausgangs-CFU

Es stellte sich die Frage in wie weit die Wirksamkeit von hBD-2 von dem *Staphylococcus aureus* Inokulum abhängig ist. Daher wurde ein AMT mit unterschiedlichen Verdünnungen des Bakterienansatzes durchgeführt. Es zeigte sich, dass mit abnehmender Verdünnung des Bakterienansatzes, die antimikrobielle Wirkung von hBD-2 unverändert blieb, jedoch die absolute Zahl überlebender Bakterien anstieg (Abbildung 14).

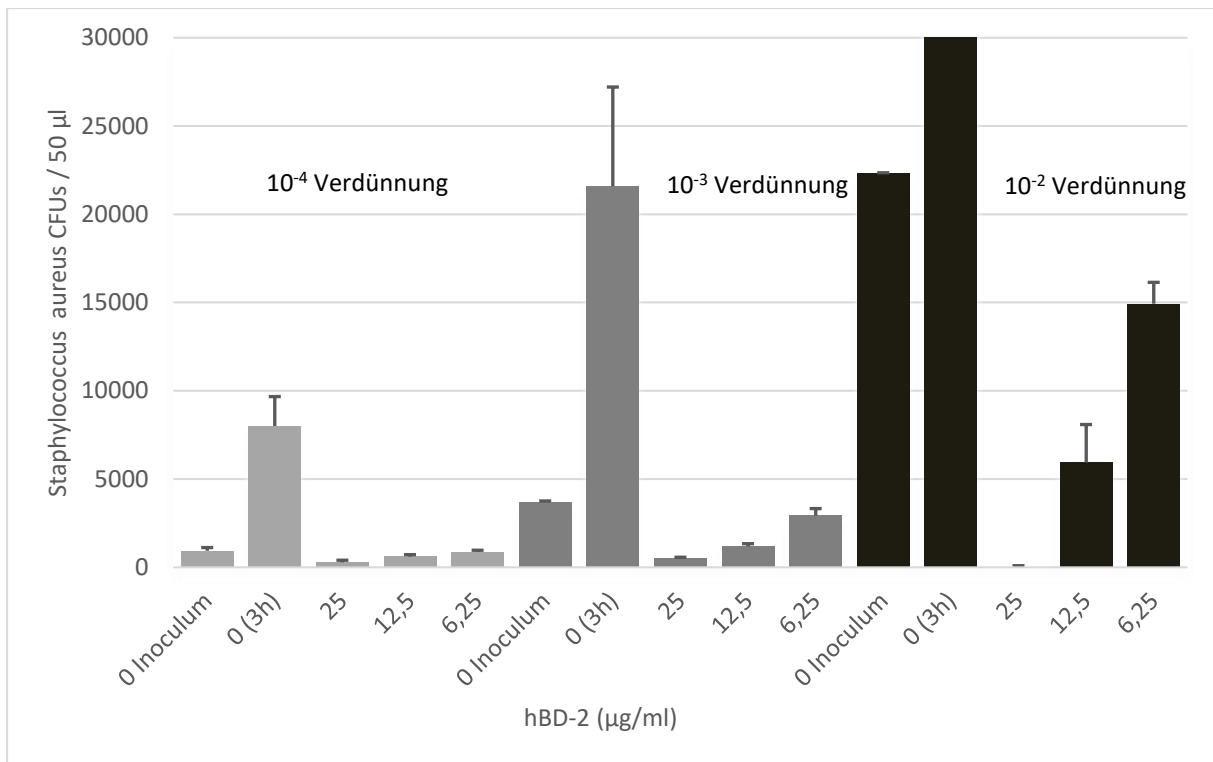


Abbildung 14: Absolute Anzahl überlebender *Staphylococcus aureus* Bakterien in Abhängigkeit des Inokulums. *Staphylococcus aureus* wurde in drei Verdünnungen mit den dargestellten hBD-2-Konzentrationen beimpft und für 3h in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 % TSB-Konzentration inkubiert, so dann auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die CFU ausgezählt (Wert des 3h-Stunden-Balkens bei 10⁻²: 277333).

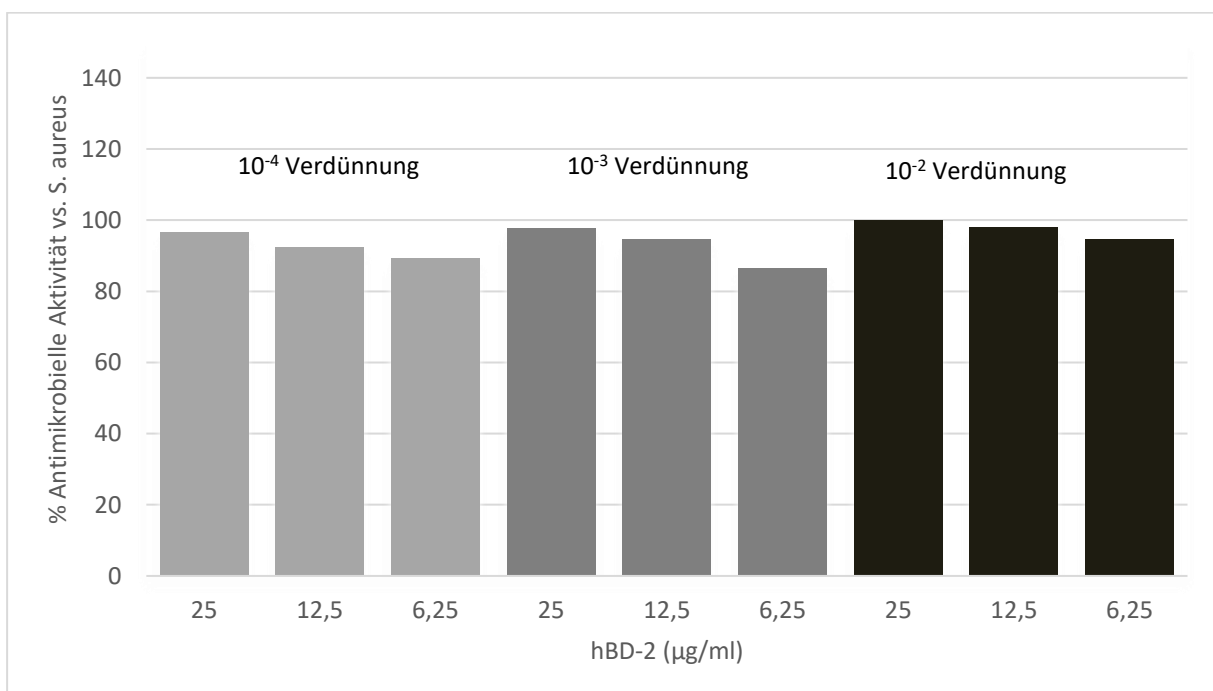


Abbildung 15: Antimikrobielle Aktivität, in % der in Abbildung 14 dargestellten AMT

3.7 hBD-2 MHK-Test mit unterschiedlichen Platten (Polypropylen und -styrol)

Letztendlich dient der Ansatz dieser Dissertation der Fragestellung, ob sich *in vitro* eine Resistenzbildung von *S. aureus* Bakterien gegen antimikrobielle Peptide, speziell RNase 7 und hBD-2, nachweisen lässt.

Bei dem Versuch, dies in einem MHK-Test mit 96-Well Mikrotiterplatten durchzuführen, wurde deutlich, dass die Testparameter einen erheblichen Einfluss auf die Durchführbarkeit dieses MHK-Tests haben. Dieser Versuch sollte nun einen möglichen Ansatz für einen MHK-Test, mit dem das zunächst gesteckte Ziel doch noch erreicht werden könnte, aufzeigen. Es wurden die ausplattierten Ergebnisse mit den Messungen im Mikroplattenleser unter Nutzung zweier unterschiedlicher 96-Well Mikrotiterplatten verglichen, nämlich einmal Costar # 3879 aus Polypropylen und Sarstedt REF 83.3925 aus Polystyrol, um zusätzlich diese beiden gängigen Plattenmaterialien, die Einfluss auf den Ausgang der Versuche haben könnten, zu vergleichen.

Im Ergebnis zeigte sich, dass bei starker Verdünnung der Bakterienkultur auf 10^{-4} (Inokulum), und zunächst geringer TSB-Konzentration für 3h, die Eradikation von *Staphylococcus aureus* in Mikrotiterplatten differenziert nachweisbar war. Um dann nach 22h im Mikroplattenleser auswertbare Ergebnisse durch adäquates Wachstum zu erhalten, muss die TSB-Konzentration vor der Inkubation wieder erhöht werden. Es wurde dazu eine 6%ige TSB-Konzentration gewählt, da diese Konzentration in den vorhergehenden Versuchen ein guter Kompromiss zwischen gutem Bakterienwachstum und Inhibierung des antimikrobiellen Peptids war. Es zeigte sich, dass die Eradikation der *Staphylococcus aureus* Bakterien in den Platten aus Polystyrol über Nacht deutlicher ausfällt, außerdem sind Platten aus Polystyrol aufgrund der Materialeigenschaften besser im Mikroplattenleser auslesbar.

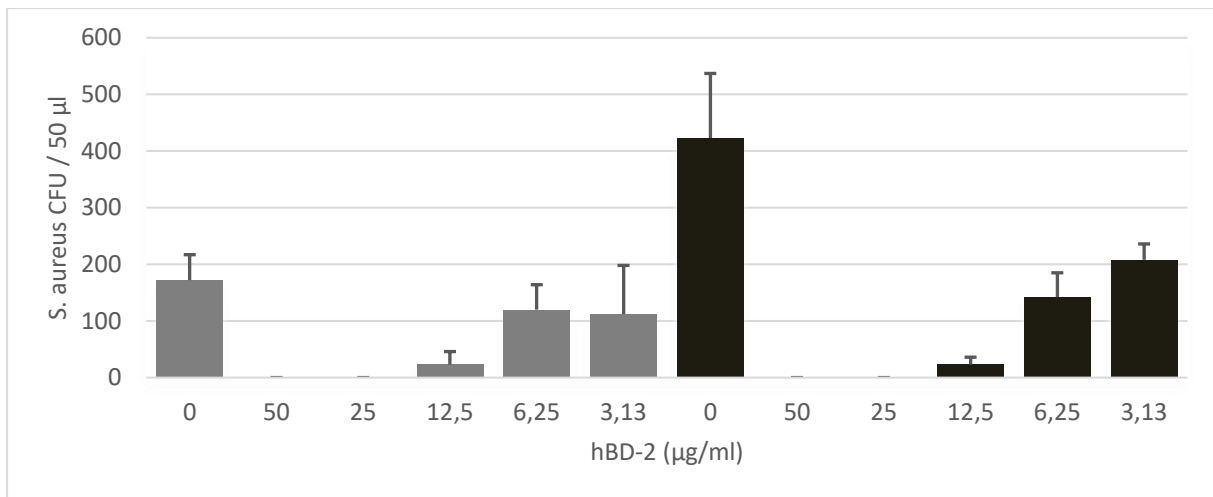


Abbildung 16: Eradikation von *Staphylococcus aureus* 3h in Polypropylen- (links) und Polystyrol-Platte (rechts). *Staphylococcus aureus* wurde auf 10^{-4} verdünnt, 50 µl wurden mit den dargestellten hBD-2-Konzentrationen beimpft und für 3h in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 % TSB-Konzentration in jeweils einer 96-Well-Platte aus Polystyrol (Sarstedt) und Polypropylen (Costar) inkubiert, so dann auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die CFU ausgezählt. Das Inokulum wurde direkt ausplattiert.

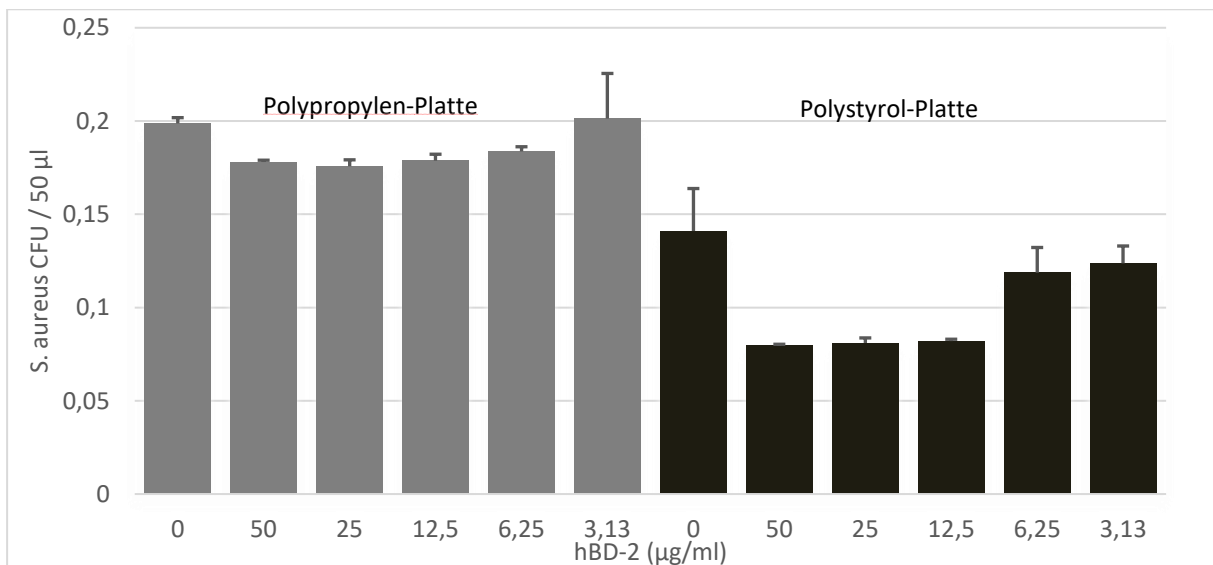


Abbildung 17: Absorption nach 22 Stunden Inkubation in der 96-Well-Platte aus Polypropylen und Polystyrol. *Staphylococcus aureus* wurde auf 10^{-4} verdünnt, 50 µl wurden mit den dargestellten hBD-2-Konzentrationen beimpft und für 3h in 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 % TSB-Konzentration in jeweils einer 96-Well-Platte aus Polystyrol (Sarstedt) und Polypropylen (Costar) inkubiert, danach mit 50 µl 12 % TSB 10 mM Natriumphosphatpuffer ergänzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption bestimmt.

4 Diskussion

Aufgrund des weitreichenden Einsatzes von Antibiotika entstehen immer neue (multi)resistente Keime (Schroeder et al., 2017). Der sich dadurch entwickelnde Bedarf an neuen Mitteln zur Bekämpfung pathogener Keime hat schon seit geraumer Zeit antimikrobielle Peptide der körpereigenen menschlichen Abwehr in den Fokus der pharmakologischen Forschung gerückt (Marr, Gooderham, & Hancock, 2006).

Die Fähigkeit der pathogenen Keime, Resistenzen gegen Bedrohungen zu entwickeln, könnte auch bei der Anwendung von AMPs ein limitierender Faktor sein. Darüber hinaus besteht hier jedoch die Gefahr, dass die Barrierefunktion der körpereigenen menschlichen Immunabwehr kompromittiert werden könnte, mit möglicherweise weitreichenden Folgen (Habets & Brockhurst, 2012);(Dobson, Purves, & Rolff, 2014);(Kristian et al., 2007). Eine umfangreiche Erforschung der Resistenzentwicklung pathogener Keime ist daher notwendig, um diese Gefahren zu identifizieren und zu vermeiden.

Am effizientesten lässt sich diese Resistenzentwicklung mit MHK-Tests analysieren. Entsprechende MHK-Tests für antimikrobielle Peptide sind derzeit noch nicht standardisiert. Die Fragestellung dieser Arbeit war daher, den Einfluss verschiedener Testparameter auf die Testung der Resistenzentwicklungen von *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 gegen RNase 7 und hBD-2, mit Hilfe eines MHK-Tests, zu überprüfen. Dazu sollte mit der Methode der rekombinanten Expression selbst hergestellte RNase 7 und bereits im Labor ausreichend vorrätiges hBD-2 der Firma Planton GmbH verwendet werden.

4.1 HBD-2

4.1.1 Optimale TSB-Konzentration

Die Versuche sollten mit 10 mM Natriumphosphatpuffer und mit TSB-Medium als Nährstoff durchgeführt werden. Da aber der Salzgehalt des TSB-Mediums inhibierend auf die AMPs wirkt (Midorikawa et al., 2003)(Routsias et al., 2010), sollte die Konzentration möglichst gering gehalten werden, das Wachstum der Bakterien in der 96-Well-Platte, mittels Absorptionsmessung, aber dennoch nachweisbar sein. Wie die Versuche zeigten, erschien

eine TSB-Konzentration von 3-6 % vor diesem Hintergrund als die beste Lösung. Geringere Nährstoffkonzentrationen zeigten bei der Absorptionsmessung am nächsten Tag keine auswertbaren Messergebnisse und bei höheren Konzentrationen bildete sich ein Plateau.

4.1.2 Auswertbarkeit der Absorptionsmessung

Nach der Bestimmung des optimalen TSB-Gehalts sollte die Auswertbarkeit der Versuche unter Beimpfung der *Staphylococcus aureus* Bakterien mit hBD-2 bestimmte werden. Hierzu wurde bei einer TSB-Konzentration von 3, 4 und 5 %, *Staphylococcus aureus* über Nacht in einer 96-Well-Platte inkubiert, jeweils mit und ohne 50 µg/ml hBD-2 Beimpfung. Am nächsten Tag wurde die Absorption gemessen. Es zeigte sich dabei die niedrigste Absorption in den Wells, in denen sich ausschließlich 10 mM Natriumphosphatpuffer und TSB befand. Aufgrund der antimikrobiellen Wirkung von hBD-2 wäre aber das Gegenteil zu erwarten gewesen. Es ist anzunehmen, dass bei den verwendeten Konzentrationen von $\geq 3\%$ TSB es nicht zu einer kompletten Eradikation der Bakterien kam (siehe auch Abb. 12, keine komplette Eradikation bei 3% TSB und 50 µg/ml hBD-2). Eine OD-Messung lässt in diesem Zusammenhang im Gegensatz zur Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren keine genauen Rückschlüsse auf die bakterizide Wirkung von hBD-2 zu. Sollten auch nur wenige Bakterien die initiale Einwirkphase überleben, so kann man spekulieren, dass die überlebenden Bakterien sich im Folgenden teilen und auswachsen, was das deutliche Wachstum nach Übernachtinkubation erklärt. Überraschend war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass die Zugabe von 50 µg/ml hBD-2 gegenüber der Kontrolle ohne hBD-2 das Auswachsen über Nacht in Anwesenheit von $\geq 3\%$ TSB noch verstärkte. Hier scheinen sich also die Wachstumsbedingungen durch Zugabe von hBD-2 im Vergleich ohne hBD-2 verbessert zu haben. Ob dies durch inaktiviertes hBD-2 (z.B. durch bakterielle Proteasen), welches dann als zusätzliche Wachstumsquelle für die Bakterien dienen könnte, oder durch initial abgetötete Bakterien, deren Produkte dann wiederum als Nahrungsquelle dienen könnten, vermittelt wurde, bleibt spekulativ.

4.1.3 Höhere hBD-2-Konzentration

Die Konzentration von hBD-2 wurde in einem weiteren Versuch bei 3 und 6 %-TSB Konzentration einerseits auf 100 µg/ml erhöht, andererseits die Inkubationszeit auf 48

Stunden verlängert, um auszuschließen, dass die zwar ohnehin sehr hohe hBD-2-Konzentration nicht suffizient war oder die Zeit länger gewählt werden müsste. Es zeigte sich aber wieder das gleiche Ergebnis: Die gemessene Absorption war in den Wells, in denen sich *Staphylococcus aureus* unter hBD-2 Beimischung befand, erhöht. Die hBD-2 Konzentration von 100 µg/ml hätte *Staphylococcus aureus* aber sicher eradizieren sollen (Routsias et al., 2010).

4.1.4 Antimikrobielle Testung und Auszählung der CFU

Daraufhin wurde eine antimikrobielle Testung als Flüssigkulturtest durchgeführt und auf Agarplatten ausplattiert. Die Auszählung der CFU zeigte bei steigendem Nährstoffgehalt eine Inhibierung der antimikrobiellen Wirkung von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus*, bei 6 % TSB-Konzentration erzielte auch die eingesetzte Höchstmenge von 50 µg/ml hBD-2 keine vollständige Eradikation.

Mit der Höhe des Salzgehalts der Nährlösung ließ sich dies aber nicht alleine erklären, denn eine geringe bis keine antimikrobielle Wirkung von hBD-2 stellt sich erst bei einem Salzgehalt von >100 mM/l ein (Midorikawa et al., 2003);(Routsias et al., 2010), die 6%ige Nährlösung hat aber nur ca. 6 mM/l. Möglicherweise beeinflussen andere Bestandteile des TSB-Mediums die anionische Oberflächenspannung von *Staphylococcus aureus* und behindern so die Interaktion von hBD-2 mit der Bakterienhülle. Eine Ähnliche Interaktion wurde bereits beobachtet, indem man Alanin dem TSB-Medium hinzugab. (Li-Chen Chen et al., 2012)

4.1.5 Verringertes *Staphylococcus aureus*-Inokulum

Da ein zu hoher Salzgehalt und eine zu geringe hBD-2-Konzentration als mögliche Erklärungen für die Ergebnisse der Versuche nicht wahrscheinlich waren, wurde das Augenmerk auf das *Staphylococcus aureus*-Inokulum gerichtet. Es stellte sich die Frage, ob die mangelhafte Eradikation mit einem zu hohen Bakterien-Inokulum zusammenhängt? Wäre dies der Fall müsste eine Reduzierung des *Staphylococcus aureus* Inokulums die erwarteten Ergebnisse zeigen.

Zur Überprüfung dieser Frage wurde in einer weiteren Versuchsreihe das Inokulum der Bakterien durch eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} auf 10^{-4} reduziert.

Dabei zeigte sich, dass die relative antimikrobielle Wirksamkeit von hBD-2 bei allen Verdünnungen nahezu unverändert blieb, die absolute Anzahl überlebender Bakterien jedoch mit dem Inokulum anstieg.

Dies erklärte warum der zunächst gewählte Versuchsansatz des MHK-Tests nicht auswertbar war: Die Anzahl der überlebenden Bakterien war aufgrund des Inokulums zu hoch, es wurden niemals alle vollzählig eradiziert, so dass der Bestand an *Staphylococcus aureus*-Bakterien über Nacht wieder auswachsen konnte und am nächsten Tag hohe Absorptionswerte zeigte. Man könnte spekulieren, dass eradizierte Bakterien den überlebenden Bakterien zum Teil zusätzlich als Nährstoff dienten. Dies würde erklären, warum die mit hBD-2 beimpften Bakterien stärker auswachsen, was sich in der höher gemessenen Absorption in den entsprechenden Wells ausdrückte.

Die Erkenntnis, welchen Einfluss das Inokulum auf die absolute Anzahl überlebender Bakterien hat, führte zu einer möglichen Lösung bei der Umsetzung des MHK-Tests in 96-Well-Platten.

Dazu wurde ein geringes Bakterien-Inokulum zunächst in den 96-Well-Platten bei einer 1%igen-TSB Konzentration in einer Verdünnungsreihe von 50 µg/ml – 3,13 mg/ml mit hBD-2 beimpft. Nach 3 Stunden wurde die TSB-Konzentration auf 6 % erhöht und am nächsten Tag wurde die Absorption im Mikroplattenleser bestimmt. Das Ergebnis zeigte, dass dies ein erfolgsversprechender Weg war, einen Versuchsansatz in Anlehnung an den MHK-Test zu entwickeln, um eine Wachstumsinhibition von hBD-2 im Vergleich zur Wachstumskontrolle ohne hBD-2 festzustellen. Das geringe Inokulum und die geringe TSB-Konzentration führen zu einer differenzierbaren Eradikation der *Staphylococcus aureus*-Bakterien in den ersten 3 h. Das Wachstum wäre aber zu gering, um am nächsten Tag auswertbare Absorptionsunterschiede zu messen. Durch die Erhöhung der TSB-Konzentration auf 6 % über Nacht lässt sich dieses Problem lösen. Es bleibt aber fest zu stellen, dass die ermittelten Wachstums-inhibierenden hBD-2 Konzentrationen keine MHK-Werte im eigentlichen Sinne des üblichen MHK-Tests darstellen, da die MHK-Werte sich an der kleinsten Konzentration orientieren, die das Wachstum komplett verhindern.

4.1.6 Polystyrol oder Polypropylen Platten?

Aufgrund der negativen Ladung von beschichteten und/oder aus Polystyrol hergestellten Mikrotiterplatten und der damit verbundenen Gefahr der unspezifischen Bindung der kationischen antimikrobiellen Peptide, wurde der Versuch parallel mit unbeschichteten Platten aus Polystyrol und aus Polypropylen durchgeführt (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008). Im Ergebnis zeigte sich, dass die Eradikation der *Staphylococcus aureus*-Bakterien in den Platten aus Polystyrol deutlicher ausfällt, außerdem sind Platten aus Polystyrol aufgrund der Materialeigenschaften besser im Mikroplattenleser auslesbar, daher wird für weitere Versuche die Verwendung dieser Platten empfohlen.

4.2 RNase 7

4.2.1 TSB-Konzentration

Auch bei der antimikrobiellen Testung der RNase 7 gegen *Staphylococcus aureus* zeigte sich, dass mit steigender TSB-Konzentration die antimikrobielle Wirkung der RNase 7 nachlässt. Diese Ursachen für dieses Versuchsergebnis wurden aber nicht weitergehend untersucht. Auch hier ist es unwahrscheinlich, dass der steigende Salzgehalt bei höherer TSB-Konzentration ursächlich verantwortlich ist. Denn bereits frühere Versuche in unserem Institut haben gezeigt, dass sich die antimikrobielle Aktivität von RNase 7, auch bei NaCl Konzentrationen von 150 mM, nahe bei 100 % befindet (Köten et al., 2009).

4.2.2 Oxidation von RNase 7

Im Zuge der rekombinanten Herstellung der RNase 7 kam es zu der oben beschriebenen Oxidation der RNase 7. Daraufhin wurde diese RNase 7 in einer antimikrobiellen Testung mit bereits im Labor vorhandener, mit der gleichen Methode hergestellten RNase 7, verglichen. Es zeigte sich, dass die oxidierte RNase 7 eine im Vergleich deutlich geringere antimikrobielle Aktivität aufwies. Die Interaktion der kationischen antimikrobiellen Peptide mit der negativ geladenen Bakterienhülle, stellt nach heutigem Verständnis den Hauptmechanismus zur Bekämpfung von Bakterien durch antimikrobielle Peptide dar (Rademacher et al., 2016);(Lee

et al., 2015). Durch die Oxidation von Proteinen, beispielsweise am Methionin, kommt es bei RNase 7 möglicherweise zu lokalen strukturellen Änderungen und dadurch könnte die Interaktion mit der Bakterienoberfläche derart gestört werden, dass daraus auch funktionelle Änderungen resultieren (Kim, Weiss, & Levine, 2014).

Da es nicht gelang, hinreichende Mengen an sauberer, nicht-oxidierter sowie oxidierter RNase 7 im Rahmen dieser Doktorarbeit aufzureinigen, wurde diese in weiteren Tests nicht verwendet.

4.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Entwicklung eines MHK-Tests zur Überprüfung der Resistenzentwicklung von Bakterien, hier am Beispiel *Staphylococcus aureus*, von verschiedenen Testparametern entscheidend abhängt. Aber es konnte auch ein möglicher gangbarer Weg aufgezeigt werden, der die Etablierung eines standardisierten, auf AMP adaptierten MHK-Tests voranbringen kann.

5 Zusammenfassung

Die sich permanent verschlechternde Resistenzlage im Bereich der Antibiotika führt zu einem wachsenden Bedarf an Alternativen zur Bekämpfung pathogener Bakterien (Schroeder et al., 2017).

Eine Möglichkeit kann der Einsatz von antimikrobiellen Peptiden sein, die ihr hohes Potential in der Natur bereits unter Beweis gestellt haben. Dementsprechend wird auch schon seit einigen Jahren an Möglichkeiten der pharmazeutischen Anwendung geforscht (Kosikowska & Lesner, 2016). Diese bergen neben neuen Chancen natürlich auch neue Gefahren, zu denen die Entwicklung von Resistenzen gegen antimikrobielle Peptide der körpereigenen Abwehr zählt (Dobson et al., 2014). Zur Resistenztestung von antimikrobiellen Peptiden gibt es noch keine standardisierten MHK-Tests. Vor diesem Hintergrund befasste sich diese Arbeit mit verschiedenen Testparametern, die die Etablierung eines solchen MHK-Tests beeinflussen können.

Es wurde nachgewiesen, dass die mit steigender Konzentration von Bakterienmedium in den Ansätzen sinkende antimikrobielle Aktivität von hBD-2 und RNase 7 mit dem Bakterieninokulum zusammenhängt. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass im Fertigungsprozess oder in der Lagerung oxidierte RNase 7 eine, im Gegensatz zu nicht oxidiertes RNase 7, geringere antibakterielle Aktivität besitzt.

Letztlich konnte noch eine mögliche Umsetzung eines adaptierten MHK-Tests von hBD-2 gegen *Staphylococcus aureus* entwickelt und eine Empfehlung zur Nutzung von Polystyrol-Mikrotiterplatten ausgesprochen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Azmi, F., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2016). Towards the development of synthetic antibiotics: designs inspired by natural antimicrobial peptides. *Current Medicinal Chemistry*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27570165>
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*(5), 874–80. <http://doi.org/10.1172/JCI2410>
- Cederlund, A., Gudmundsson, G. H., & Agerberth, B. (2011). Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS Journal*, *278*(20), 3942–3951. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08302.x>
- Cobo, E. R., & Chadee, K. (2013). Antimicrobial Human β -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *2*(1), 177–92. <http://doi.org/10.3390/pathogens2010177>
- Dobson, A. J., Purves, J., & Rolff, J. (2014). Increased survival of experimentally evolved antimicrobial peptide-resistant *Staphylococcus aureus* in an animal host. *Evolutionary Applications*, *7*(8), 905–912. <http://doi.org/10.1111/eva.12184>
- Easton, D. M., Nijnik, A., Mayer, M. L., & Hancock, R. E. W. (2009). Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends in Biotechnology*, *27*(10), 582–90. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.004>
- Habets, M. G. J. L., & Brockhurst, M. A. (2012). Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. *Biology Letters*, *8*(3), 416–418. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2011.1203>
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schröder, J.-M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, *387*(26), 861 <http://doi.org/10.1038/43088>
- Harder, J., & Schröder, J.-M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 46779–84. <http://doi.org/10.1074/jbc.M207587200>
- Huang, Y.-C., Lin, Y.-M., Chang, T.-W., Wu, S.-J., Lee, Y.-S., Chang, M. D.-T., ... Liao, Y.-D. (2007).

- 7The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(), 4626–33. <http://doi.org/10.1074/jbc.M607321200>
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., & Tarkowski, A. (2004). Staphylococcus aureus Resists Human Defensins by Production of Staphylokinase, a Novel Bacterial Evasion Mechanism. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1169–1176. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1169>
- Kim, G., Weiss, S. J., & Levine, R. L. (2014). Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(2), 901–5. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.038>
- Kosikowska, P., & Lesner, A. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(6), 689–702. <http://doi.org/10.1080/13543776.2016.1176149>
- Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J.-M., & Harder, J. (2009). RNase 7 contributes to the cutaneous defense against Enterococcus faecium. *PloS One*, 4(7), e6424. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006424>
- Kristian, S. A., Timmer, A. M., Liu, G. Y., Lauth, X., Sal-Man, N., Rosenfeld, Y., ... Nizet, V. (2007). Impairment of innate immune killing mechanisms by bacteriostatic antibiotics. *Faseb J.*, 21(4), 1107–1116. <http://doi.org/10.1096/fj.06-6802com>
- Lakshmaiah Narayana, J., & Chen, J.-Y. (2015). Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides*. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.05.012>
- Lee, T.-H., Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <http://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Li-Chen Chen, Wen-Dee Chiang, Wei-Chiuan Chen, Hui-Huang Chen, Yao-Wen Huang, Wei-Jung Chen, S.-B. L. (2012). Influence of alanine uptake on Staphylococcus aureus surface charge and its susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan. *Food Chemistry*, 135(4), 2397–2403. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.06.122>

- Machado, L. R., & Ottolini, B. (2015). An Evolutionary History of Defensins: A Role for Copy Number Variation in Maximizing Host Innate and Adaptive Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 6. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00115>
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468–72. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Martin, L., van Meegern, A., Doemming, S., & Schuerholz, T. (2015). Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Frontiers in Immunology*, 6, 404. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00404>
- Martínez, J. L., & Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 68–77. <http://doi.org/10.3109/03009734.2014.901444>
- Midorikawa, K., Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Fujiwara, T., ... Sugai, M. (2003). Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infection and Immunity*, 71(7), 3730–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=162002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(1), 11–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16450883>
- Novagen. (1993). *pET-32a (+) Restriction Sites*.
- Pandin, C., Caroff, M., & Condemine, G. (2016). Identification and characterization of antimicrobial peptide resistance genes in the plant pathogen *Dickeya dadantii*. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.01757-16>
- Rademacher, F., Simanski, M., & Harder, J. (2016). RNase 7 in cutaneous defense. *International Journal of Molecular Sciences*. <http://doi.org/10.3390/ijms17040560>
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., ... Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New*

Infections, 6, 22–9. <http://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>

Routsias, J. G., Karagounis, P., Parvulesku, G., Legakis, N. J., & Tsakris, A. (2010). In vitro bactericidal activity of human β -defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*, 31(9), 1654–1660. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.010>

Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., & Korting, H. C. (2005). Human defensins. *Journal of Molecular Medicine*, 83(8), 587–595. <http://doi.org/10.1007/s00109-005-0657-1>

Schroeder, M., Brooks, B. D., & Brooks, A. E. (2017). The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes*, 8(1). <http://doi.org/10.3390/genes8010039>

Simanski, M., Dressel, S., Gläser, R., & Harder, J. (2010). RNase 7 protects healthy skin from *Staphylococcus aureus* colonization. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), 2836–8. <http://doi.org/10.1038/jid.2010.217>

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G., & Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–61. <http://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–75. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

Wiesner, J., & Vilcinskas, A. (2010). Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1(5), 440–64. <http://doi.org/10.4161/viru.1.5.12983>

7 Abkürzungsverzeichnis

AMT	antimikrobieller Test
BSA	bovine serum albumin (Rinderalbumin)
CFU	colony-forming units
FPLC	fast protein liquid chromatography
HPLC	high pressure liquid chromatography
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
LPS	Lipopolysaccharide
mAU	milli-absorbance unit
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemm-Konzentration
MRE	multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaPP	Natriumphosphatpuffer
RNase	Ribonuklease
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TLR-4	toll-like-receptors-4
TSB	Tryptic soy broth
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Harder für die Überlassung des Themas, sowie für die freundliche Betreuung, Unterstützung und die viele Geduld bedanken.

Für eine hervorragende Einarbeitung, viele Tipps und Hilfestellungen für die Praxis und die offene Atmosphäre im Labor danke ich besonders Heilwig, Conny und Franziska.

Außerdem möchte ich mich bei allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Frau Steffanie und meinen Schwiegereltern Annelie und Falko bedanken, ohne deren Motivation und Unterstützung das Studium und diese Arbeit für mich sicherlich nicht realisierbar gewesen wären.