

# **Die Wirkung membranaktiver Peptide auf Biofilminduzierung und Biofilmeliminierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich  
genehmigte

**DISSERTATION**

von

Diplom – Chemikerin Papia Stephanie Sanyal

aus

Rastatt

Dekan: Prof. Peter Roesky

Referent: Prof. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2012 bis April 2015 am Institut für Biologische Grenzflächen 2 (IBG-2) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

DOI: 10.5445/IR/1000048878

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß die Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bereits bekannte Hilfe selbständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Änderung übernommen wurde.

Karlsruhe, den

## **Danksagungen**

Zuallererst danke ich Frau Prof. Anne Ulrich für die herausfordernde interdisziplinäre Aufgabenstellung und die Möglichkeit meinen Horizont um die Mikrobiologie zu erweitern und der Internationalen Graduiertenschule des BioInterfaces Programms beizutreten.

Dr. Parvesh Wadhvani und Dr. Marina Berditsch danke ich für die gute Betreuung während dieser drei Jahre und diversen anregenden Gespräche.

Meinen TAC-Mitgliedern Dr. Jörg Overhage und Dr. Thomas Schwartz danke ich für die tolle Unterstützung sowohl in den TACs als auch im Labor.

In Sachen Transkriptomanalyse haben mich diverse Leute unterstützt und ich danke dafür Dr. Andreas Döttsch und Dr. Olivier Armant. Außerdem meinen Mitstreiterinnen Beatrix Tettmann und Kathrin Richter für die großartigen E-Mail-Diskussionen und den Spaß.

Für diverse Versuche am OCT danke ich Dr. Michael Wagner und Prof. Harald Horn für die Zeit, die Diskussionen und auch die Einführung in ein wenig Bioinformatik.

Meine Mikroskopieerfahrungen wurden erweitert durch die Mitarbeiter am IAM und CFN. Mein Dank geht hier an Dr. Ruth Schwaiger, Dr. Daniela Exner und Dr. Stefan Kühn.

Ich danke dem Karlsruhe House of Young Scientists für das Auslandsstipendium und damit die Ermöglichung das Singapore Centre on Environmental Life Sciences Engineering (SCELSE) zu besuchen. Im selben Atemzug danke ich natürlich auch den Leuten am SCELSE. Vordergründig Prof. Staffan Kjelleberg, der mich praktisch einlud, Dr. Scott Rice der mir sein Labor zur Verfügung stellte und natürlich Dr. Thomas Seviour, der mich die ganzen 2 Monate toll betreute. Außerdem danke ich Toms Frau Dr. Yingyu Law und Dr. Cecillia Cruz, die mich nicht nur wissenschaftlich unterstützten sondern auch ihre Wohnung mit mir teilten.



Den Doktoranden Abeed, Sumitra und Samarpita danke ich für die Unterstützung im und außerhalb des Labors.

Ich danke allen meinen Kollegen am IBG-2. Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck für die unermüdliche Peptidsynthese und die Freundschaft, Benjamin Zimpfer für die Zusammenarbeit am TisB-Projekt, Philipp Mühlhäuser, Jonathan Zerweck, Xiaojun Xu und den diversen Master- und Bachelorstudenten, die unser Großraumbüro freundlicher machten. Außerdem danke ich dem Infrastruktur Team am IBG Johannes Peters, Hartmut Heinzmann und Markus Schmitt für die Späße auf dem Gang und den Kaffee.

Schlussendlich danke ich aber auch meinem Freund Julian, der mich in den 3 Jahren bei allem unterstützte und meine Launen ertragen musste. Es war schön jemanden zum Reden zu haben. Außerdem danke ich meine Eltern, meinem Bruder Sumit und meiner Schwägerin Jessica. Ihr wart immer für mich da.

*Für meinen Dadu...*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Motivation .....	1
1.2	Membranaktive Peptide .....	2
1.3	TisB .....	4
1.3.1	Entdeckung und Wirkweise .....	4
1.3.2	Funktionsmodell des Peptids TisB.....	4
1.4	Antimikrobielle Peptide .....	6
1.4.1	Herkunft der antimikrobiellen Peptide.....	6
1.4.2	Struktur der antimikrobiellen Peptide .....	6
1.4.3	Wirkweise und Resistenzen.....	7
1.5	Bakterielle Biofilme .....	9
1.5.1	Biofilmentstehung (Oberflächenanlagerung, Reifung und Ablösung) .....	9
1.5.2	Bestandteile der Biofilmmatrix .....	10
1.5.3	Extrazelluläre DNA .....	11
1.5.4	Extrazelluläre polymere Substanzen .....	13
1.5.5	Die Persistenz bakterieller Zellen .....	13
1.5.6	Small-Colony Varianten .....	14
1.6	Untersuchte Pathogene .....	15
1.6.1	Staphylokokken .....	15
1.6.2	Enterokokken.....	16
1.7	Methoden zur Biofilmuntersuchung .....	18
1.7.1	Biofilmwachstum.....	18
1.7.2	Flow-Cells vs. Calgary Biofilm Device und Mikrotiterplatten .....	18
1.7.3	Qualitative Biofilmuntersuchungen – optische Methoden .....	21
1.7.3.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	21
1.7.3.2	Inversmikroskopie.....	23

1.7.3.3	Elektronenmikroskopie und Helium-Ionen-Mikroskopie .....	24
1.7.4	Quantitative Methoden zur Biomassebestimmung .....	27
1.7.4.1	Kolorimetrische Methoden .....	27
1.7.4.2	Optische Kohärenztomographie .....	27
1.8	Transkriptomanalyse .....	29
1.9	Biofilme in der Abwasserwirtschaft .....	29
2	Aufgabenstellung .....	32
3	Material und Methoden .....	34
3.1	Material .....	34
3.2	Zellkulturen .....	34
3.3	Peptide .....	35
3.4	Methoden .....	36
3.4.1	Bakterielles Wachstum und Anzucht der Biofilme .....	36
3.4.2	Biofilmquantifizierung mittels Kristallviolett (MBHK, MBAHK und MBEK) .....	36
3.4.3	Optische Kohärenztomographie zur Biomassequantifizierung ....	38
3.4.4	Identifikation von Biofilminduktion durch Beobachtung der Atmungsaktivität und Inversmikroskopie .....	38
3.4.5	Fluoreszenzmikroskopie: Identifikation der biofilmabtötenden Konzentrationen und des Austritts von extrazellulärer DNA .....	39
3.4.6	Probenvorbereitung für Rasterelektronenmikroskopie und Helium- Ionen-Mikroskopie .....	40
3.4.7	Isolation und Anreicherung von mRNA für die Transkriptomanalyse .....	41
3.4.8	Charakterisierung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) .....	41

3.4.9	TisB induzierte Membrandepolarisation von <i>E. coli</i> .....	42
3.4.10	Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm.....	43
4	Das biofilminduzierende Peptid TisB .....	45
4.1	Ergebnisse.....	45
4.1.1	Konzentrationsabhängige Biofilminduzierung und Steigerung von Biomasse.....	45
4.1.2	Optische Kohärenztomographie – Quantifizierung der jungen Biofilmmassesteigerung durch TisB .....	53
4.1.3	Untersuchung des Effekts von TisB an der bakteriellen Membranpolarisation .....	59
4.1.4	Die Wirkung von TisB auf anaerobe Bakterien .....	62
4.1.5	Transkriptomanalyse .....	65
4.1.6	Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm.....	66
4.2	Diskussion .....	71
4.2.1	Die Wirkung von TisB auf bakterielle Biofilmbildung.....	71
5	Untersuchungen an der Matrix peptidinduzierter Biofilme – Extrazelluläre DNA (eDNA) und Polysaccharide (EPS).....	77
5.1	Ergebnisse.....	77
5.1.1	Fluoreszenzmikroskopie und die Rolle der eDNA bei peptidinduzierten Biofilmen.....	77
5.1.2	Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) bei peptidinduzierten Biofilmen – Gel-Permeations-Chromatographie.....	84
5.2	Diskussion .....	92
5.2.1	Vergleich der eDNA und EPS induzierter Biofilme .....	92

6	Antimikrobielle Peptide .....	95
6.1	Ergebnisse.....	95
6.1.1	Identifizierung von Biofilminduktion .....	95
6.1.2	Biofilminduktion und Oberflächenanhaftung .....	102
6.1.3	Biofilmbekämpfung .....	106
6.1.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme auf zwei unterschiedlichen Oberflächen .....	113
6.2	Diskussion .....	120
6.2.1	AMP und ihre Möglichkeiten in der therapeutischen Anwendung	120
7	Zusammenfassung .....	124
8	Ausblick .....	127
9	Literaturverzeichnis .....	128
10	Anhang .....	142
A	Material.....	142
B	TisB .....	145
C	Untersuchungen an Biofilmmatrix.....	148
D	Antimikrobielle Peptide .....	150
E	Lebenslauf .....	192

## Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid/e
Alameth	Alamethicin
BP	Biofilmphänotyp
CBD	Calgary Biofilm Device
d	Tag
DDAO	(7-Hydroxy-9H-[1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one])
DMAC	N,N-dimethylacetamid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EMIM-ac	1-Ethyl-3-methylimidazoliumazetat
EtOH	Ethanol
eDNA	Extrazelluläre DNA
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
g	Gramm
GA	Gramicidin A
GS	Gramicidin S
h	Stunde
HIM	Helium-Ionen Mikroskopie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KbE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid

LB	Luria-Miller Medium
LBG	Luria-Miller Medium mit Glukose
Mag2	Magainin2
MBK	Minimale Bakterizide Konzentration (engl. minimal bactericidal concentration)
MBAHK	Minimale Biofilm atmungshemmende Konzentration
MBEK	Minimale biofilmeliminierende Konzentration (engl. minimal biofilm eradication concentration)
MBHK	Minimale biofilmhemmende Konzentration
MeOH	Methanol
MH	Müller-Hinton Medium
MHK	Minimale Hemmkonzentration
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD	Optische Dichte
PM	PGLa/Magainin2 (1:1)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SCV	Small-Colony Variante



SVI	Schlammvolumenindex
TA	Toxin/Antitoxin
TempA, L oder Shf	Temporin A, L oder Shf
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Vanco	Vancomycin

## 1 Einleitung

### 1.1 Motivation

Ein Mikrobiologe sieht Bakterien in einem flüssigen Medium, das mit allen lebensnotwendigen Nährstoffen versetzt ist, am häufigsten als freischwimmende planktonische Zellen. Mit diesen Bakterien werden Tests durchgeführt, wie z.B. die Untersuchungen des Effekts von Antibiotika auf diese Bakterien. Trifft diese Art der Kultivierung aber tatsächlich auf die Realität zu? Leben Bakterien tatsächlich in dieser Art in unserem Körper, in Flüssen oder im Abwasser? Oftmals ist es nicht so einfach. Bakterien leben in der Natur als sogenannter Biofilm. Dies sind Lebensgemeinschaften unterschiedlicher Mikroorganismen, die sich an Oberflächen anhaften und dort wachsen. Biofilme finden sich überall in unserer Umwelt. Sie bilden sich auf Oberflächen wie Zähnen als Plaque, in Rohrsystemen oder auch an Schiffsrümpfen. Sie sind zuständig für Biofouling und Korrosion. In Abbildung 1 ist ein Biofilm gezeigt, der sich auf der Innenseite eines Duschschauchs gebildet hat.



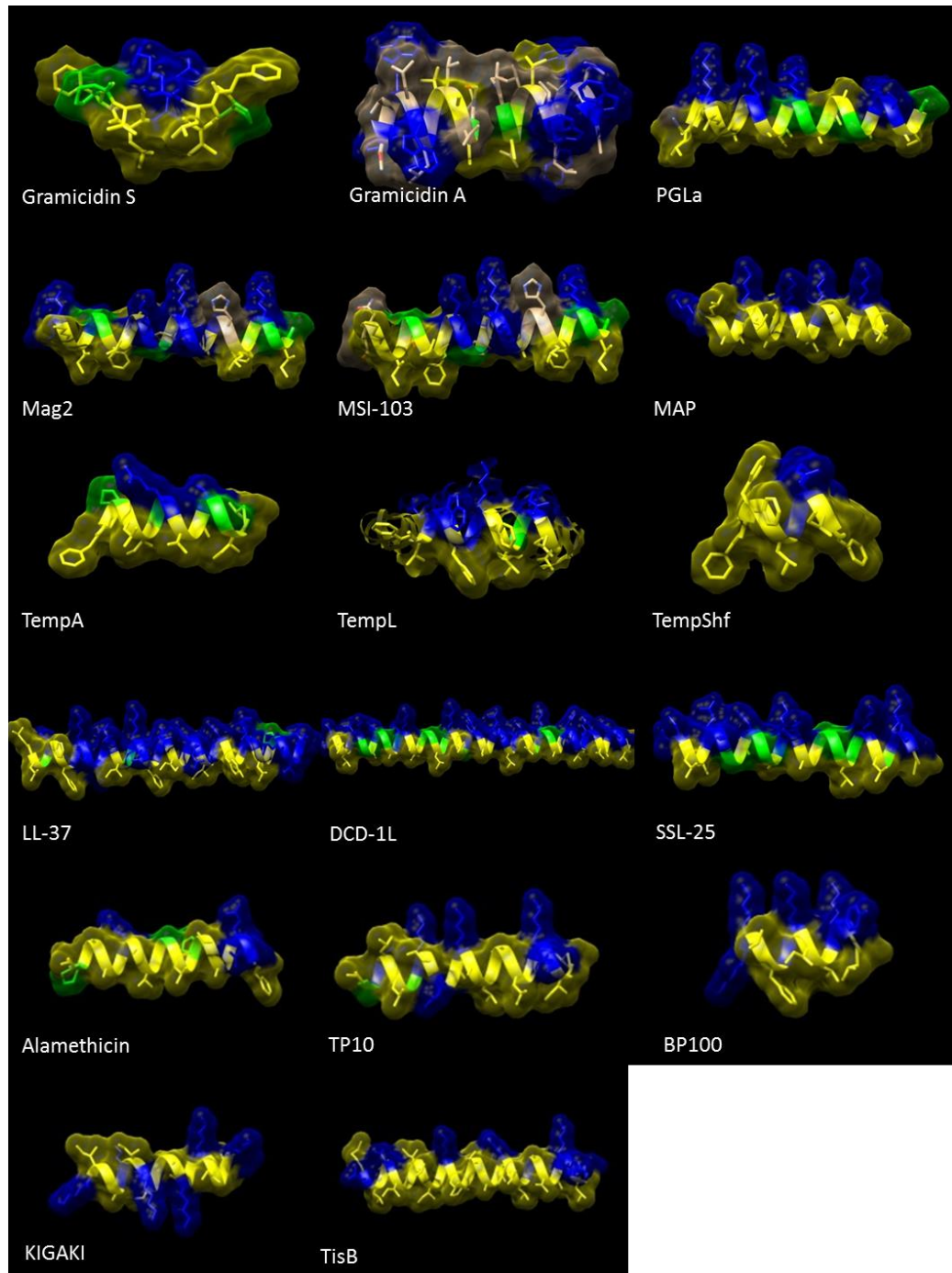
**Abbildung 1** Biofilm auf der Innenseite eines Duschschauchs (Szewzyk, 2003).

Biofilme in Rohrsystemen und an Schiffen verursachen jährlich immense Kosten für die Entfernung und zumeist müssen hierfür starke Chemikalien wie Chlor und Peroxide eingesetzt werden. Daher sind Biofilme zumeist unerwünschter oder sogar gefährlicher Natur. Sie sind jährlich verantwortlich für tausende persistente Infektionen in Krankenhäusern und aufgrund ihrer erhöhten Antibiotikatoleranz (Hoiby et al., 2010) schwer zu

bekämpfen. Jedoch gibt es auch eine Kehrseite dieser Medaille. Biofilme können auch eine wirtschaftliche Anwendung haben. Sie erleichtern durch ihre Lebensweise die Umsetzung verschiedener organischer und anorganischer Stoffe. Daher sind sie in der Abwasserwirtschaft unerlässlich (Flemming, 1991). Sie erhöhen die Produktion von diversen bakteriell hergestellten Stoffen, wie beispielsweise Alkoholen durch die Bildung sogenannter Biofilm-Fabriken. In dieser Arbeit sollen die Eigenschaften von amphiphilen membranaktiven Peptiden auf Biofilme und somit die Kontrolle über diesen Lebensraum untersucht werden. Hierzu gehört sowohl die Möglichkeit unerwünschte Biofilme mit Hilfe antimikrobieller Peptide (AMP) als Antibiotikaersatz zu eliminieren, als auch die Möglichkeit Biofilme gewollt zu induzieren, z.B. durch das biofilminduzierende, bakterielle Toxin TisB, um sie nutzbar zu machen.

### **1.2 Membranaktive Peptide**

Membranaktive Peptide werden im Allgemeinen als antimikrobielle Peptide (AMP), zellpenetrierende Peptide (aus dem Engl. Cell-penetrating peptides, CPP) oder auch Fusionspeptide bezeichnet (Wadhvani et al., 2012). Oft verschwimmen die Grenzen zwischen diesen 3 Klassen von Peptiden ineinander. So sind zum Beispiel AMP bekannt, die auch eine zellpenetrierende Eigenschaft besitzen (vgl. KIGAKI oder BP100). Die Peptide sind in der Lage Membranen aufgrund ihrer spezifischen chemischen und strukturellen Eigenschaften zu überwinden (Mink, 2010). Betrachtet man die in dieser Arbeit untersuchten Peptide, ist auffallend, dass alle einen amphiphilen Charakter und kationischer Natur sind. In der folgenden Abbildung sind alle Peptide in ihrer 3-dimensionalen Struktur gezeigt. Die polaren Seitenketten sind in Blau, die hydrophoben in Gelb und Prolin und Glycin in Grün dargestellt. Sowohl das biofilminduzierende Peptid TisB, als auch die unterschiedlichen AMP sehen sich in ihrer Struktur sehr ähnlich. Die hydrophoben und polaren Seitenketten zeigen zumeist in entgegengesetzte Richtungen. Die zu den Peptiden dazugehörigen Aminosäuresequenzen können Tabelle 2 und Abbildung 4 entnommen werden.



**Abbildung 2** Vergleich der 3-dimensionalen Strukturen aller in dieser Arbeit verwendeten membranaktiven Peptide. In Gelb sind die hydrophoben Seitenketten, in Blau die polaren und in Grün sind Pro und Gly dargestellt.

Alle Peptide haben gemeinsam, dass sie Membranen stören. In wie fern diese peptidinduzierten Störungen mechanistisch ablaufen und biotechnologisch oder medizinisch anwendbar sind, wird in den weiteren Kapiteln untersucht und diskutiert.

### 1.3 TisB

#### 1.3.1 Entdeckung und Wirkweise

TisB ist ein amphipathisches,  $\alpha$ -helikales Peptid aus dem Bakterium *E. coli* K12. Es besteht aus 29 Aminosäuren und ist positiv geladen. Seine Primärsequenz ist in Abbildung 3 gezeigt.

NH<sub>2</sub>-M N L V **D** I A I L I L **K** L I V A A L **Q** L L **D** A V L **K** Y L **K**-COOH

**Abbildung 3** Primärsequenz von TisB im Einbuchstabencode. Die positiv geladenen Aminosäuren sind in rot, die negativ geladenen Aminosäuren in blau dargestellt.

TisB ist Teil des Toxin/Antitoxin-Systems (TA) *tisAB/istR1* von *Escherichia coli* (Dörr et al., 2010). Dieses System wird initiiert als SOS-System bzw. als Antwort auf die Einwirkung von Stress auf die Zelle. Im Besonderen wird dieses TA-Modul angeworfen, wenn die Gefahr der DNA-Beschädigung besteht (Weel-Sneve et al., 2008). Das Peptid wird von der Zelle exprimiert und akkumuliert in der inneren Membran, was zu einem Zusammenbruch des Protonengradienten führt und einen Abfall des ATP-Niveaus innerhalb der Zelle zur Folge hat. Diese Absenkung führt zu einem metabolischen Stillstand der Zelle und damit zu den sogenannten persistenten oder dormanten Zellen (Lewis, 2010). Diese Zellen zeichnen sich durch ihre minimale metabolische Aktivität aus und entwickeln daher im dormanten Zustand hohe Toleranzen gegenüber Antibiotika (Steinbrecher et al., 2012). Aus vorangegangenen Studien weiß man bereits, dass TisB höchstwahrscheinlich Anionen-selektive Poren ausbildet (Gurnev et al., 2012). In der Gruppe von Frau Prof. Ulrich wurde diese Hypothese weiterhin untersucht und ein Funktionsmodell des Peptids TisB ausgearbeitet.

#### 1.3.2 Funktionsmodell des Peptids TisB

Durch die Analyse des Peptids mit Methoden wie Zirkulardichroismusspektroskopie und diversen Fluoreszenz-



## 1.4 Antimikrobielle Peptide

### 1.4.1 Herkunft der antimikrobiellen Peptide

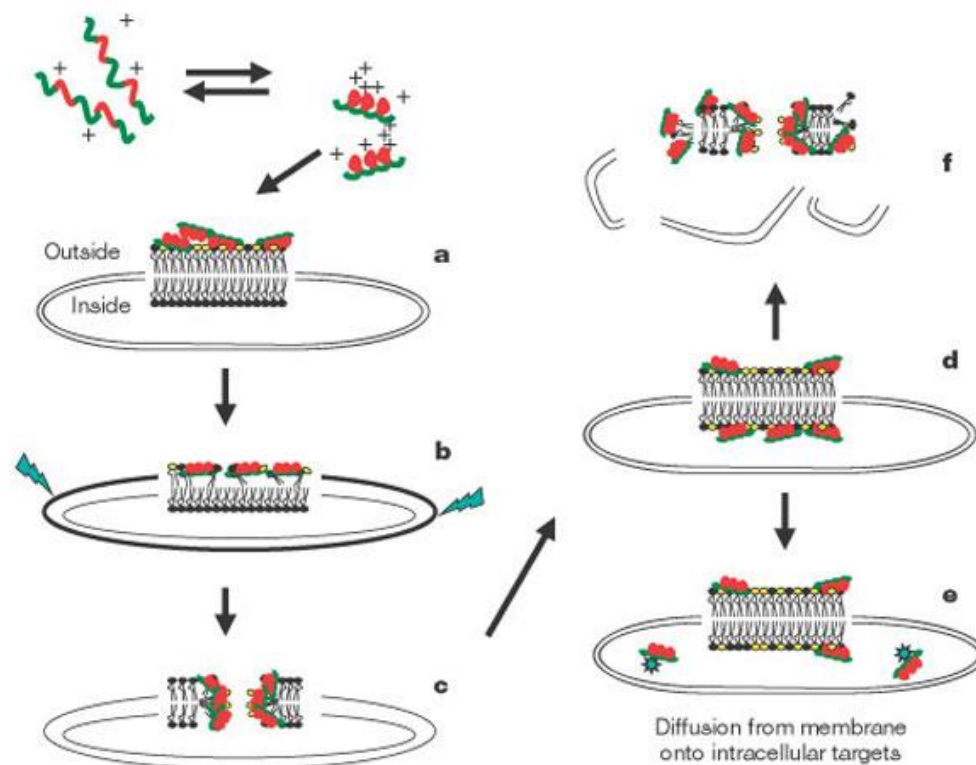
Seit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928 sind Wissenschaftler auf der Suche nach antimikrobiell wirkenden Therapeutika. Nicht zuletzt durch den rasanten Anstieg von resistenten bakteriellen Stämmen wird dieses Bestreben auch im öffentlichen Leben immer präsenter. Seit 1939 sind antimikrobielle Peptide (AMP) bekannt. Inzwischen wurden mehr als 5000 dieser Stoffe entdeckt und synthetisiert (Dacheng und Bahar, 2013). Sie werden auch als „host defense peptides“ bezeichnet, da sie in der Natur von ihren Erzeugern als Schutz vor potentiellen Angreifern oder Konkurrenten produziert werden. Man findet sie in jeglicher Umgebung, beispielsweise in der schützenden Schleimschicht von Fröschen (Temporine) (Wade et al., 2001), in menschlichem Schweiß (Dermcidin) (Paulmann et al., 2012) und auch in Insekten wie die Apidaecine von Honigbienen (Boman, 1995). Die ersten AMP entstammen dem Bodenbakterium *Bacillus brevis*, aus dem Gramicidin A und Tyrocidine isoliert wurden (Dubos, 1939). Später wurde dann auch das dazugehörige zyklische Dekapeptid Gramicidin S entdeckt (Gause, 1944). Inzwischen weiß man, dass das Auftreten dieser interessanten und vielversprechenden Moleküle keine Seltenheit ist.

### 1.4.2 Struktur der antimikrobiellen Peptide

AMP sind Oligopeptide, die eine Länge von 5 bis mehreren 100 Aminosäuren haben. (Brogden, 2005). Sie werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Es gibt sowohl kationische als auch anionische AMP. Sie können linear angeordnet sein,  $\alpha$ -helikal oder auch  $\beta$ -Faltblätter bilden. Es gibt einige Klassen, in denen sich bestimmte Aminosäuren anhäufen, z.B. die Prolin-reichen Bactenicine (Shamova et al., 1999), oder auch die Cystein-reichen Defensine von Insekten (Cociancich et al., 1993). Fast alle diese Peptide sind amphipathischer Natur, wie beispielsweise auch die Froschpeptide Magainin 2 (Zaslhoff, 1987) oder PGLa (Tremouilhac et al., 2006).

### 1.4.3 Wirkweise und Resistenzen

Eine der vielversprechendsten Charakteristika der AMP ist ihre breite Anwendungsmöglichkeit, denn sie sind aktiv gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien. Aber auch Viren, Pilze und Parasiten können durch AMP neutralisiert werden (Dacheng und Bahar, 2013). Das besondere an den Peptiden ist ihr Mechanismus. Sie wirken in erster Linie direkt auf die Zellmembran, indem sie Poren bilden oder örtlich begrenzte Membranstörungen verursachen. Man bezeichnet sie daher als membranaktiv. Es gibt hierzu verschiedene Theorien wie diese Poren gebildet werden. Das Modell von Shai-Huang-Matsuzaki ist eines der am besten charakterisierten Modelle und wird in Abbildung 4 gezeigt (Zhang et al., 2001; Matsuzaki, 1998).



**Abbildung 5** Shai-Huang-Matsuzaki Modell (Zaslhoff, 2002). Es wird gezeigt wie sich Peptide einer Membran nähern und ihre  $\alpha$ -helikale Struktur annehmen. Zunächst bedecken sie die Membran wie eine Art Teppich (a). Dann integrieren sie sich in die Membran und führen zu einer Ausdünnung der Membran (b). Es werden transiente Poren gebildet, eine Art „Wurmloch“ (c). Dadurch können Proteine und Lipide in das Innere der Zelle gelangen (d) und die Peptide können intrazelluläre Ziele erreichen (e). Letztendlich kollabiert die Membran (f).

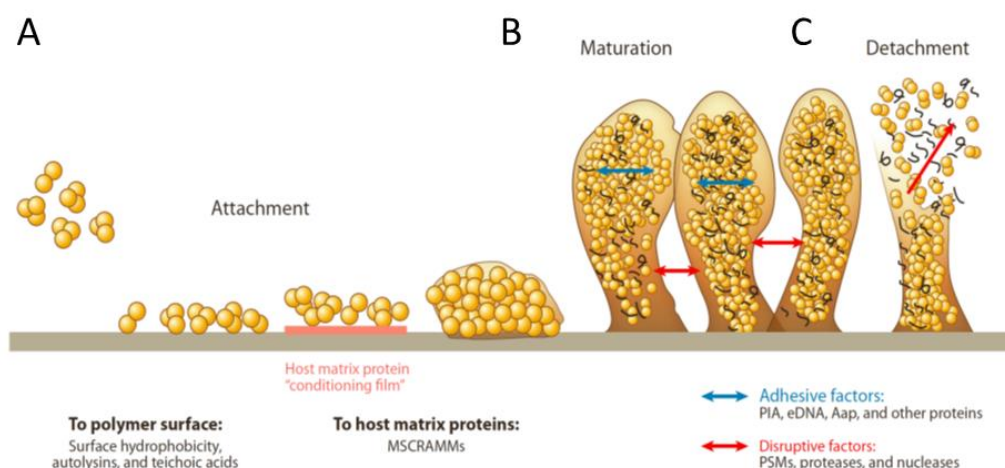


Die Peptide werden in diesem Modell zunächst durch die negativ geladene Oberfläche der Zellmembran angezogen (a). Sie binden an der Oberfläche (b) und insertieren in die Membran. Die Einlagerung der Peptide in die Membran veranlasst eine Ausdünnung der Lipiddoppelschicht. Durch diese Ausdünnung entstehen Deformationen und Poren in der Membran (c). In manchen Fällen gelangen einige der Peptide in die Zelle (d) und weiter zu intrazellulären Zielen (e) und/oder die Membran kollabiert vollständig (f) (Zasloff, 2002). Es existieren beispielsweise einige AMP, die die Proteinbiosynthese (Brogden, 2005) stören. Das zyklische Dekapeptid Gramicidin S ist in der Lage, Nukleinsäuren zu komplexieren (Krauss et al., 1984) und damit die DNA-Synthese empfindlich zu stören. Trotz des zerstörerischen Mechanismus der physiologischen Zerstörung der Lipiddoppelschicht sind einige Resistenzen gegen AMP bekannt. Es gibt erste verzeichnete Fälle, dass es durch Modifizierungen wie Acetylierungen der bakteriellen Membran, zu einer verschlechterten Bindung der Peptide an die Membranen kommt (Gunn et al., 2001). Verschiedene Mechanismen der Umgestaltung der bakteriellen Zellmembran sind bekannt, wie die Lysinylierung oder Alanylierung der Lipiddoppelschicht. Hier wird die Membran so verändert, dass die elektrostatische Bindung der Peptide an die Lipide durch Einlagerung von positiver Ladung oder Kompensation von negativer Ladung der Membran verhindert wird (Yeaman and Yount, 2003). Außerdem steuern Bakterien dem Eindringen der Peptide auch durch sogenannte Efflux-Pumpen entgegen, die aktiv Peptide aus der Zelle herauspumpen (Shafer et al., 1998). Trotz der bekannten Fälle scheinen Bakterien eine langsamere Resistenzbildung gegen AMP zu zeigen als gegen konventionelle Antibiotika. Daher ist die Forschung an AMP als zukünftige Therapeutika unerlässlich.

## 1.5 Bakterielle Biofilme

### 1.5.1 Biofilmentstehung (Oberflächenanlagerung, Reifung und Ablösung)

Bakterien leben in der Natur nicht in ihrer planktonischen Form. Die neuen Methoden der DNA Sequenzierung haben gezeigt, dass weniger als 0,1 % der bakteriellen Welt als planktonische Zellen vorliegen (Bjarnsholt et al., 2013). Bakterien schützen sich vor Umwelteinflüssen, indem sie sich als sogenannter Biofilm zusammenschließen. Dabei besteht ein Biofilm nicht nur aus einer Gattung Bakterien, sondern setzt sich aus einer Vielfalt von Bakterien, Einzellern, Pilzen und Algen zusammen (McDougald et al., 2012). Dieser Biofilm bildet sich in einer schützenden Schicht aus sekretierter DNA, Proteinen und Polysacchariden, im Ganzen Biofilmmatrix genannt. Diese Schicht unterstützt den Biofilm in seiner Anhaftung an Oberflächen, versorgt ihn mit Nährstoffen und hält die polymikrobielle Zusammensetzung eines jeden Biofilms zusammen (Friedmann und Kolter, 2004). Es ist heutzutage bekannt, dass Biofilme eine ganz eigene Art von Lebenszyklus besitzen.



**Abbildung 6** Lebenszyklus eines Biofilms bestehend aus Anhaftung (A), Wachstum (B) und Ablösung (C) (Otto, 2013).

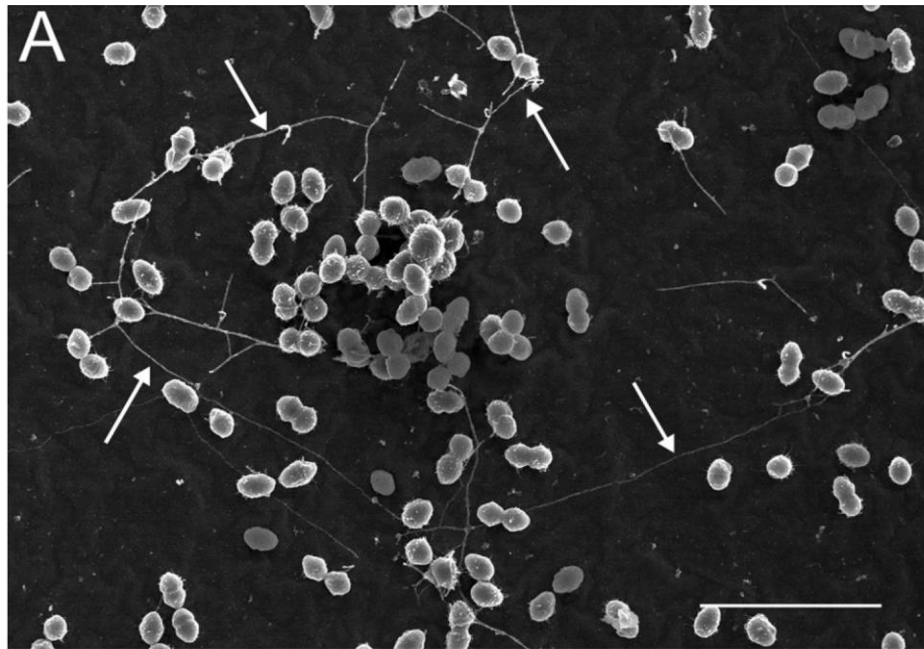
Wie in Abbildung 6 gezeigt, umfasst der Lebenszyklus eines Biofilms drei unterschiedliche Stufen. Zunächst findet die Anhaftung der Bakterien an die Oberfläche statt. Oft geschieht dies durch einfache elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen. Es kommt bei einigen Stämmen jedoch auch vor, dass aktiv DNA entlassen wird (vgl. Kapitel 1.5.3), die dann ihrerseits an geeigneten Oberflächen anhaftet und so den Bakterien eine lebenswerte Grundlage bildet (Barnes et al., 2012; Tang et al., 2013). Darauf folgt die Wachstumsphase des Biofilms, in dem auch andere Organismen hinzukommen können. Insgesamt ist die metabolische Rate des Biofilms langsamer als die der planktonischen Zelle. Daher zeigen Biofilme eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika (Hoiby et al., 2010). Diese Toleranz beruht ebenfalls auf der Ausbildung der Matrix als eine Art polymere Barriere und des vereinfachten Gentransfers der Zellen untereinander in einem Biofilm. Als letzter Schritt im Lebenszyklus des Biofilms findet dann die Teilablösung von ganzen Stücken des Biofilms statt. Dies kann zur Besiedlung neuer Flächen führen und damit zu einer potentiellen Vermehrung der Infektionsherde (Otto, 2013).

### **1.5.2 Bestandteile der Biofilmmatrix**

Die Matrix von Biofilmen ist bis heute noch nicht vollständig untersucht. Sie wird von den Bakterien selbst produziert und besteht aus DNA, Proteinen und Polysacchariden unterschiedlicher Größe, aber auch Nukleinsäuren und Lipiden (Barnes et al., 2012). Man weiß bisher, dass die Matrix unerlässlich für die Anlagerung der Bakterien an die Oberfläche ist und dass sie ein Grund für die vielfach erhöhte Resistenz der Biofilme gegen Antibiotika ist (Hoiby et al., 2010). Außerdem ist sie zuständig für den Zusammenhalt und die Form der Biofilme (Bjarnsholt et al., 2013). Welche Rollen die einzelnen Komponenten dieses schleimartigen Gebildes spielen, ist noch relativ unbekannt und soll in den nächsten beiden Kapiteln diskutiert werden.

### 1.5.3 Extrazelluläre DNA

DNA findet sich in allen biologischen Proben. Dabei spielt der Ort der Probennahme kaum eine Rolle. Aus dem Auffinden von DNA kann geschlossen werden, dass der Ort besiedelt ist oder war. Wie die DNA freigesetzt wurde, spielt zunächst eine untergeordnete Rolle. Daher betrachtete man ehemals auch die extrazelluläre DNA (eDNA) in der Biofilmmatrix als Reststoff der Lyse von Zellen mit keinerlei Funktion. Heute weiß man, dass dies nicht der Fall ist (Allesen-Holm et al., 2006). Es existieren verschiedene Theorien über die Aufgaben der DNA in der Matrix. Man weiß bereits, dass eDNA vorrangig in der frühen Phase der Biofilmbildung auftritt und dass eDNA junge Biofilme von beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* strukturell stabilisiert (Whitchurch et al., 2002). Die Quantität der eDNA in der Matrix sagt hierbei nichts über die Stabilität der Biofilme aus. Dies scheint stammspezifisch zu sein (Tang et al., 2013). Es besteht der begründete Verdacht, dass eDNA für die initiale Bindung der Bakterien an die feste Oberfläche von Bedeutung ist. Durch elektrostatische Wechselwirkungen ist die negativ geladene DNA im Besonderen in der Lage einen Film an positiv geladenen Oberflächen zu bilden und damit einen attraktiven Grund für die Bakterien zu schaffen (Heijstra et al., 2009). In Abbildung 7 kann man einen frühen Biofilm von *E. faecalis* sehen.



**Abbildung 7** Elektronenmikroskopische Untersuchung eines frühen Biofilms (4 h). Es handelt sich um einen Biofilm von *E. faecalis*. Der Maßstab beträgt 5  $\mu\text{m}$  (Barnes et al., 2012).

Zwischen den Zellen kann man lange, gerade Strukturen an der Oberfläche erkennen, die die einzelnen Zellen miteinander verbinden (weiße Pfeile). Bei diesen Strukturen handelt es sich um eDNA (Barnes et al., 2012). Einerseits weiß man, dass die eDNA genomischer Natur ist, also von lysierten Zellen stammen kann. Eine andere Theorie besagt jedoch, dass sogenannter „Brudermord“ durch quorum sensing eingeleitet wird (Quorum sensing bezeichnet die spezielle auf Signalmolekülen basierende Kommunikation der Bakterien innerhalb eines Biofilms). Hierbei werden einige Bakterien geopfert, um den Weg für die anderen zu erleichtern (Thomas et al., 2008). Eine andere Möglichkeit der eDNA-Produktion ist die aktive Sekretion (Barnes et al., 2012). Unabhängig von der Herkunft der eDNA ist aber sicher, dass sie eine wichtige Basis für die erfolgreiche Anhaftung der Bakterien an Oberflächen darstellt. Aus diesem Grund ist sie aber auch ein geeignetes Ziel, um Biofilme zu zerstören oder ihre Bildung komplett zu verhindern. Die eDNA ist sensitiv gegenüber enzymatischem Abbau durch DNAsen und stellt daher auch ein Schwachpunkt des Biofilms im frühen Bildungsstadium dar (Jakubovics et al., 2013). Man hat die Art der enzymatischen Biofilmkontrolle bereits bei

verschiedenen Laborstämmen untersucht und einige positive Einblicke gewonnen. Jedoch gibt es immer noch viele Unbekannte im Hinblick auf natürliche polymikrobielle Biofilmsysteme (Tang et al., 2013; Villarreal et al., 2013).

### **1.5.4 Extrazelluläre polymere Substanzen**

Der Hauptteil der Biofilmmatrix besteht aus den extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Sie bestehen hauptsächlich aus unterschiedlich großen Polysacchariden, Nukleinsäuren und Proteinen. Die sekretierten Substanzen schützen die Bakterien vor äußeren Einflüssen und werden in unterschiedlichen Situationen wie Hungersnot oder extremen Temperatur- oder pH-Bedingungen produziert (Vijayabaskar et al., 2011). In der EPS finden Schlüsselfunktionen statt, wie der horizontale Gentransfer (Lee et al., 2012), Bildung von Signalmolekülen (Ghosh et al., 2009) oder einfache Zellbewegungen (Pesci et al., 1999).

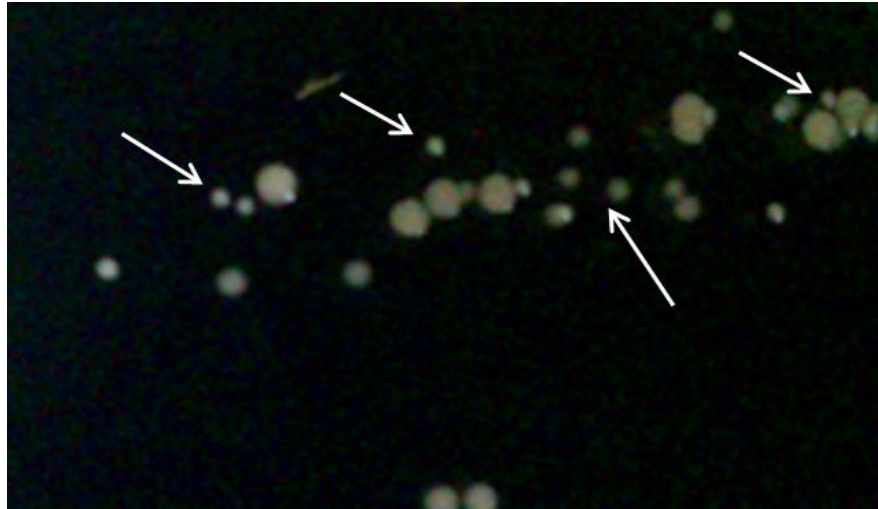
### **1.5.5 Die Persistenz bakterieller Zellen**

Vor 70 Jahren wurden erstmals bakterielle Subpopulationen entdeckt, die einerseits keine metabolische Aktivität zeigen, also nicht wachsen, und andererseits aber eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika zeigen. Das Besondere an diesen Zellen, den sogenannten persistenten Zellen, ist, dass die erhöhte Toleranz nicht als klassische genetische Resistenz angesehen werden kann (Desai et al., 1998). Sie sind genetisch identisch mit dem ursprünglichen Phänotyp. Diese persistenten Zellen können sich zufällig bilden und erreichen ihre maximale Zahl in der stationären Phase des bakteriellen Wachstums, aber auch nach Einwirkung von Stress durch beispielsweise Antibiotika oder bedrohlichen Umwelteinflüssen [vergleichbar zu 1.3.1 Bildung von persistenten Zellen durch Aktivierung der TA-Module (Lewis, 2010; Cogan, 2006)]. Nach der Entfernung des Stressfaktors können diese überlebenden Zellen wieder zu ihrem ursprünglichen Wachstum zurückkehren und zeigen wieder dieselbe genetische Zusammensetzung wie vor der Stresseinwirkung (Kint et al., 2012). Medizinisch sind diese persistenten Zellen von großer Bedeutung,

da sie in bakteriellen Biofilmen gehäuft auftreten und dadurch Infektionen schwer bekämpfbar machen (Keren et al., 2012). Durch ihre Eigenschaft nicht zu wachsen, zeigen sie große Ähnlichkeit zum „Viable-but-not-culturable“ Status (deutsch: „Lebendig-aber-nicht-kultivierbar“). Dadurch ist es schwer, sie durch Wachstumskurven oder Ähnliches nachzuweisen. Nur PCR-Analysen können die Anwesenheit dieser speziellen Zellen aufdecken (Amato et al., 2014).

### **1.5.6 Small-Colony Varianten**

Im Gegensatz zu den im vorigen Kapitel definierten persistenten Zellen, stellen die Small-Colony Varianten (deutsch: „Kleine Kolonien“) oder SCV eine phänotypische Veränderung eines Ursprungsstammes dar. Sie zeichnen sich durch ihren langsamen Stoffwechsel und ihr bedächtiges Wachstum aus, welches zur Bildung von Zwergkolonien führt, die etwa 10-mal kleiner sind als ihre ursprüngliche Koloniegröße (Singh et al., 2009). Identifiziert werden diese Zellen durch das verkleinerte Wachstum, aber auch andere Änderungen können beobachtet werden, wie der Verlust von Pigmentierung und hämolytischen Eigenschaften (von Eiff et al., 2006). Außerdem zeigen sie atypische Koloniemorphologien und einige biochemische Prozesse sind herunterreguliert oder komplett ausgeschaltet. Alle SCV sind Koagulase-positiv. Die Identifikation dieser Varianten ist schwierig, da sie sich jederzeit zurück in die Ursprungsvariante transformieren können und durch ihr langsames Wachstum auch schlichtweg durch den metabolisch aktiveren Ursprungsstamm „überwachsen“ werden (von Eiff et al., 2006).



**Abbildung 8** Auftreten von SCV Kolonien auf einer Agarplatte mit *S. aureus* DSM 1104. Aufgetaucht sind diese Kolonien nach Behandlung mit Vancomycin. Einige SCV Kolonien sind mit weißen Pfeilen markiert.

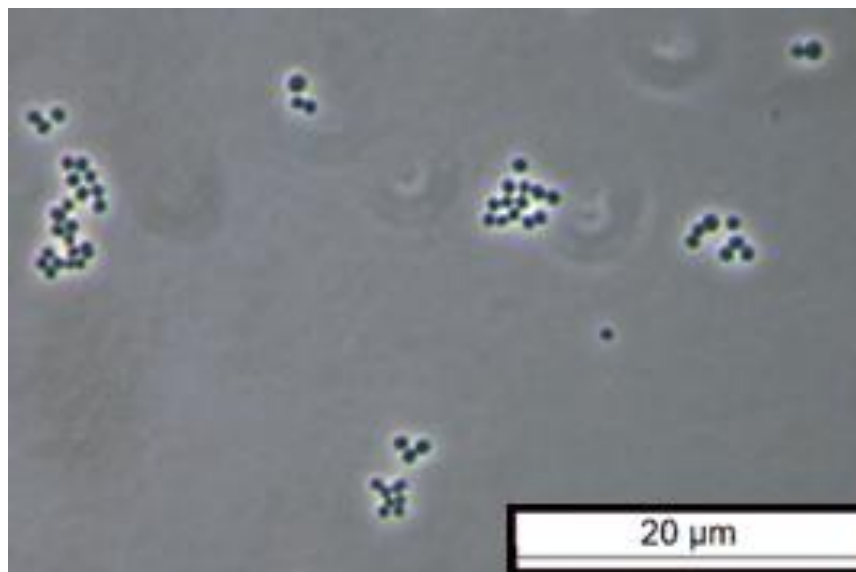
In Abbildung 8 kann man SCV-Kolonien des Kontrollstammes *S. aureus* DSM 1104 sehen, die nach der Behandlung mit 1 µg/ml Vancomycin entstanden sind. Man erkennt sofort die Problematik der SCV. Hier finden sich gemischt mit den kleineren Kolonien auch noch die normal großen Kolonien der ursprünglichen *S. aureus* Bakterien. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach der Isolation einer SCV-Kolonie eine Rücktransformation zum normalen Phänotyp des Stammes stattfindet.

## 1.6 Untersuchte Pathogene

### 1.6.1 Staphylokokken

Staphylokokken sind kugelförmige, grampositive Bakterien. Sie ballen sich gerne zu kleineren, frei schwimmenden Gemeinschaften von einigen wenigen Zellen zusammen, was ihnen den Namen Staphylo (aus dem griech. für staphyle = Weintraube) einbrachte. In Abbildung 9 kann man die Anordnung der Zellen als planktonisches Wachstum gut sehen. Sie sind fakultativ anaerob und damit sowohl zur oxidativen Energiegewinnung als auch zur Fermentation im Stande (Otto, 2013).





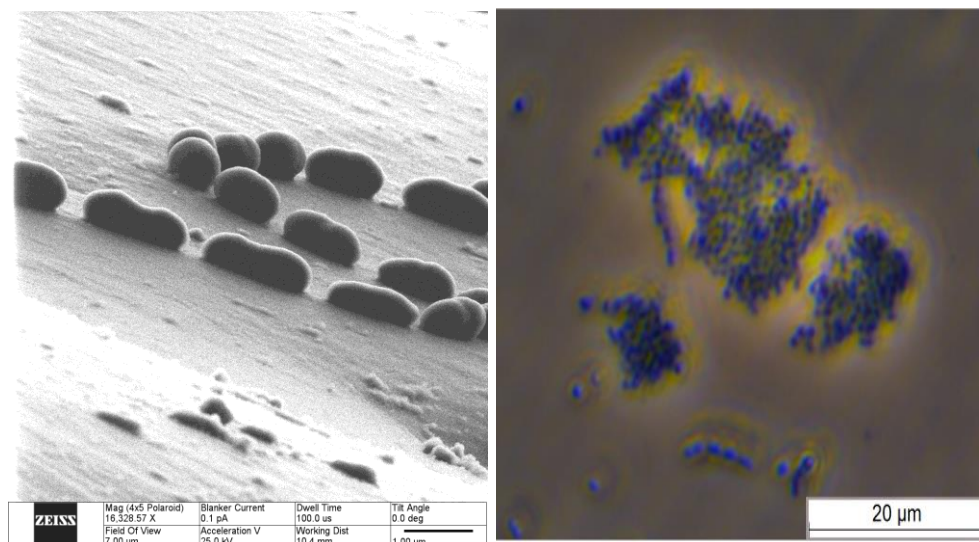
**Abbildung 9** Hellfeldaufnahme einer Übernachtkultur von *S. aureus* DSM 1104 in MH Medium. Aufgenommen wurde bei 1000-facher Vergrößerung und der Maßstab beträgt 20 µm.

Staphylokokken sind stark reproduktiv und unterliegen einer immens schnellen Evolution. Sie sind in der Lage sich schnell an neue Umgebungen anzupassen und besitzen eine hohe Virulenz und einem sehr ausgeprägten quorum sensing Apparat zur chemischen Kommunikation zwischen den Zellen (Moellering, 2010). Daher sind Staphylokokken auch bekannt für biofilm-assoziierte, persistente Infektionen. Durch den rasanten horizontalen Gentransfer dieser Bakterienklasse ist es in den letzten Jahren zu schwer zu bekämpfenden Resistenzen der Staphylokokken gekommen. Die Methicillin-resistenten Staphylokokken, MRSA, wurden aufgrund ihres angehäuften Auftretens in Krankenhäusern und vieler Todesfälle zur Berühmtheit (Loeb et al., 2008).

### 1.6.2 Enterokokken

Enterokokken sind kugelförmige, grampositive Bakterien. Vor 1984 waren sie auch als Streptokokken bekannt, wurden inzwischen aber von diesen als eigene Gattung abgetrennt. Sie sind eingeordnet als anaerobe aber aerotolerante Bakterien und kommen häufig im Darm vor. Sie sind häufig in Ketten angeordnet wie die folgende elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt.

## Enterokokken



**Abbildung 10** Aufnahme von *E. faecalis* DSM 2570. Das linke Bild zeigt ein Bild aus dem Helium-Ionen Mikroskop mit der Vergrößerung 16000 und der Maßstab beträgt 1 µm. Die Bakterien wuchsen auf dem Calgary Biofilm Device und ordneten sich immer in Ketten an. Das rechte Bild zeigt eine Aufnahme mit einem Inversmikroskop bei Vergrößerung 400. Der Maßstab hier beträgt 20 µm.

Enterokokken sind häufig der Grund für nosokomiale Infektionen. Sie sind auch bekannt dafür, Biofilme zu bilden, sodass häufig eine physische Entfernung des Infektionsherdes nötig wird. In Bezug auf beispielsweise medizinische Implantate bedeutet dies eine vollständige Entfernung und Erneuerung (Paganelli et al., 2012). Endokarditis, Infektionen im Urintrakt oder an Kathetern sind nur drei Beispiele einer ganzen Reihe von Krankheiten, die den Enterokokken zugeschrieben werden. Sie sind bekannt als typische Flora des Darms und Milchprodukten. Über die Aufnahme von beispielsweise Käse, können sich bei Immunschwäche auch Infektionen dieses Erregers im Mundraum bilden. So gelangen sie in den ganzen Körper des Wirts und können großen Schaden anrichten (Heyder et al., 2013). Zusätzlich zu diesen Faktoren sind auch bereits einige schwerwiegende Resistenzen der Enterokokken bekannt, z.B. gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin (Mohamed et al., 2007) und Tetracyclin (Fouad et al., 2005).

## **1.7 Methoden zur Biofilmuntersuchung**

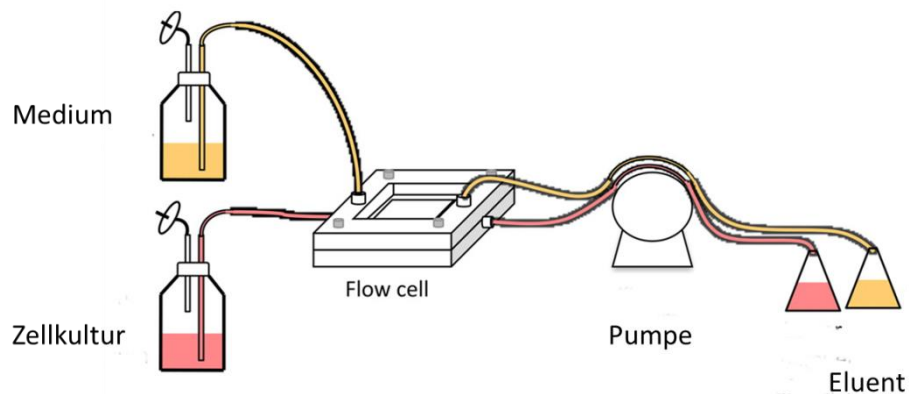
### **1.7.1 Biofilmwachstum**

Die typische planktonische bakterielle Zelle wächst in einer charakteristischen Kurve, die aus Latenz-, exponentieller, stationärer und Absterbephase besteht. Das Biofilmwachstum variiert in diesem Punkt. Hier spielen, wie in Kapitel 1.5.1 bereits beschrieben, die Phasen der initialen Anhaftung, die Bildung von Mikrokolonien zu einem Biofilm und die Ablösung des Biofilms eine Rolle. Während die Kultivierung von planktonischen Zellen relativ einfach ist, müssen bei Biofilmen verschiedene Faktoren wie Nährstoffhaushalt und Kohlenhydratmenge im Medium beachtet werden. Je nachdem wie diese Variablen gewählt werden, ändern sich Inkubationszeiten und auch die Architektur der Biofilme. Gerade die Glukosekonzentration spielt eine große Rolle in der Anzucht der Biofilme, da die Bakterien durch die nötige Ausbildung der EPS hieran einen großen Bedarf haben. Durch die Masse an EPS ändert sich in der Folge die Struktur der Biofilme und damit womöglich auch ihre Resistenz gegenüber Antibiotika (je mehr EPS gebildet wird, desto geschützter sind womöglich die Zellen) (Senevirante et al., 2013). Je nachdem welche Art von Experiment geplant ist, muss evaluiert werden, ob Glukose den Medien hinzugefügt wird oder nicht. Ohne die richtige Zusammensetzung der Medien können die Bakterien nicht genug EPS bilden, welche für die initiale Anhaftung an die Oberfläche essentiell ist. Auch auf die 3-dimensionale Struktur des Biofilms hat die Ausbildung einer starken und ausgeprägten Matrix einen großen Einfluss (Senevirante et al., 2013).

### **1.7.2 Flow-Cells vs. Calgary Biofilm Device und Mikrotiterplatten**

Es gibt unterschiedliche Methoden zur Analyse von Biofilmen. Drei gängige Methoden werden hier vorgestellt, jede mit ihren Vor- und Nachteilen. Die Flow-Cell-Methode bietet die Möglichkeit Biofilme in einem bewegten System zu untersuchen, d.h. es handelt sich hierbei um ein dynamisches Modell. Abbildung 11 zeigt den grundsätzlichen Aufbau einer

Flow-Cell Apparatur. Hierbei werden Medium und Zellkultur durch ein Kanalsystem mit einem festen Träger gepumpt, auf den sich die Zellen absetzen und sich der Biofilm bilden kann. Oft handelt es sich bei den Trägern um einfache Objektträger aus Glas, aber auch viele andere Trägermaterialien sind möglich. Am Ende wird das eluierte Medium aufgefangen.

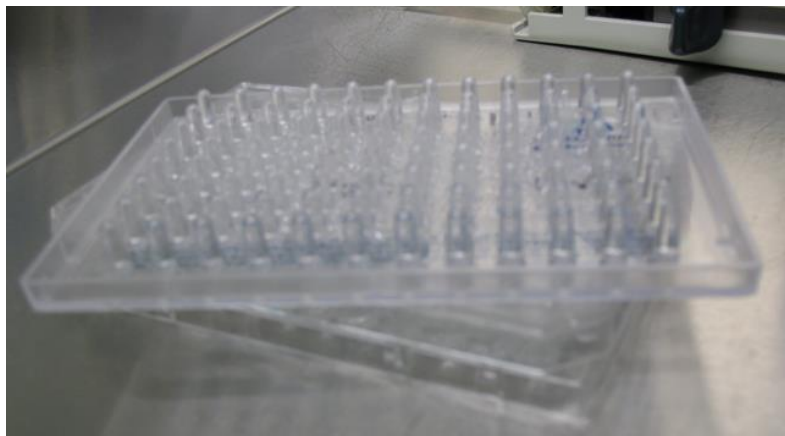


**Abbildung 11** Aufbau einer Flow-Cell Apparatur. Überarbeitet aus (Diaz et al., 2011).

Vorteil dieser Methode ist ganz offensichtlich die Dynamik des Systems. Sie ermöglicht eine Untersuchung des Systems unter realistischen Bedingungen, denn Biofilme bilden sich in der Umwelt an Orten wie Rohrsystemen, Schiffsrümpfen oder im Mundraum, wo ein ständiger Fluss/Strom präsent ist. Die chemischen Bedingungen dieses Aufbaus können leicht variiert und neu eingestellt werden. Außerdem sind mikroskopische Untersuchungen nach Beendigung des Experiments einfach. Die Nachteile dieses Systems sind aber genauso offensichtlich wie die Vorteile. Das ganze System läuft über Schläuche. Deshalb werden entgaste Lösungen verwendet, denn die Bildung von Bläschen im System kann die Apparatur verstopfen (Sternberg et al., 2006). Außerdem benötigt man, für beispielsweise antimikrobielle Tests, große Mengen an Antibiotikallösungen. Daher können die Experimente kostenintensiv sein. Am Ende eines jeden Versuchs muss dieses Modell sterilisiert und

gereinigt werden, denn auch nur kleinste Spuren an Bakterienresten im System gefährden nachfolgende Versuche.

Ist die Dynamik des Systems nicht essentiell wichtig, kann man Biofilme aber auch recht einfach in Mikrotiterplatten oder dem Calgary Biofilm Device (CBD) heranziehen. Der CBD ist eine Variante von herkömmlichen Mikrotiterplatten. Der Boden mit 96-Vertiefungen sieht gleich aus. Nur der Deckel unterscheidet sich, wie man Abbildung 12 entnehmen kann.



**Abbildung 12** Calgary Biofilm Device. Hergestellt und entwickelt von der Universität aus Calgary in Kanada (Harrison et al., 2005) .

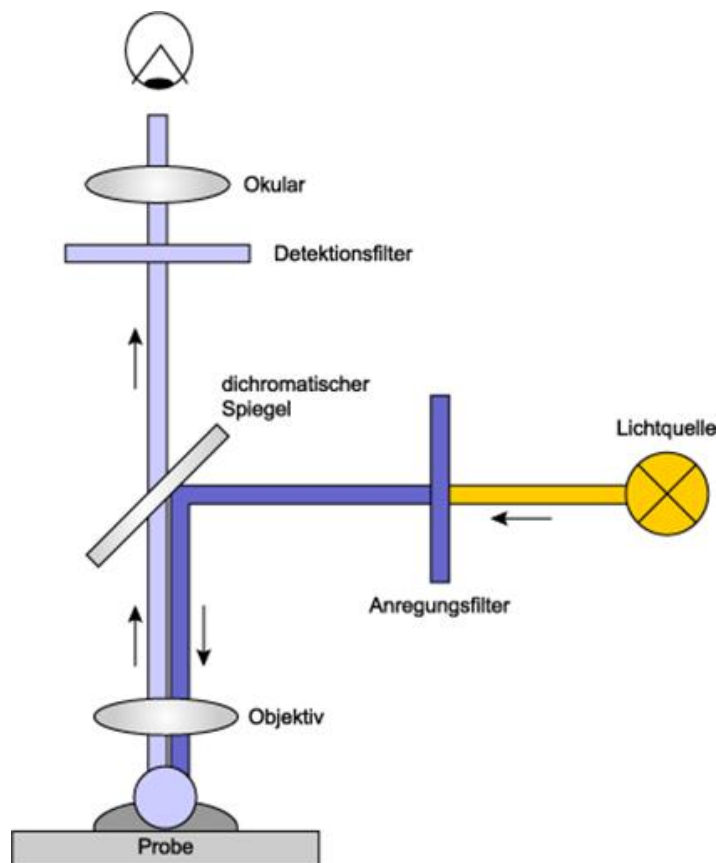
Für jede Vertiefung der unteren Mikrotiterplatte besitzt der Deckel einen Plastiknippel, der in die Vertiefung eintaucht (Harrison et al., 2005). An diesem Nippel bildet sich der Biofilm. Der Vorteil dieses Systems ist, dass der Biofilm an allen Stellen des CBD gleichmäßig wächst und sich somit eine äquivalente Testreihe erzeugen lässt. Außerdem benötigt man für dieses System keine Pumpen oder Schläuche. Die einzelnen Nippel lassen sich relativ einfach aus dem Deckel herausbrechen und können mikroskopisch untersucht werden (wie auch in dieser Arbeit geschehen). Mit Biofilmen in Mikrotiterplatten sind eine mikroskopische Untersuchungen nicht einfach handhabbar. Hier benötigt man ein Inversmikroskop. Die Untersuchung mit einem Elektronenmikroskop wird hier schwierig und stellt daher eine Limitierung dieser Methode dar. Einzelne Waschschriffe während der Versuche werden durch das Modell

des CBD vereinfacht, da man den Deckel herunternehmen und in ein Bad mit Waschlösung hängen kann (Ceri et al., 1999). Dadurch werden waschintensive Methoden wie beispielsweise die Kristallviolettfröbung vereinfacht. Nachteil dieser Methode ist, dass einige Bakterien sich lieber absetzen und die Biofilme sich eher am Boden bilden als an den Kunststoffnippeln. In so einem Fall sollte die Verwendung von Mikrotiterplatten bevorzugt werden. Die Inkubationszeiten dieser beiden Methoden sind ähnhch. Im Falle dieser Arbeit ist ein dynamisches Biofilmmodell nicht von Nöten und auch die Menge an erforderlichem Peptidmaterial ist im statischen System des CBD und der Mikrotiterplatten geringer. Deshalb werden diese Methoden verwendet.

### **1.7.3 Qualitative Biofilmuntersuchungen – optische Methoden**

#### **1.7.3.1 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie und beruht auf der Verwendung von fluoreszierender Farbstoffe oder autofluoreszenter Stoffe. Bei dieser Methode werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und durch ein Filtersystem des Mikroskops wird sichergestellt, dass nur das Licht der erwünschten Fluoreszenz zu beobachten ist. In Abbildung 13 ist der grundsätzliche Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops gezeigt.

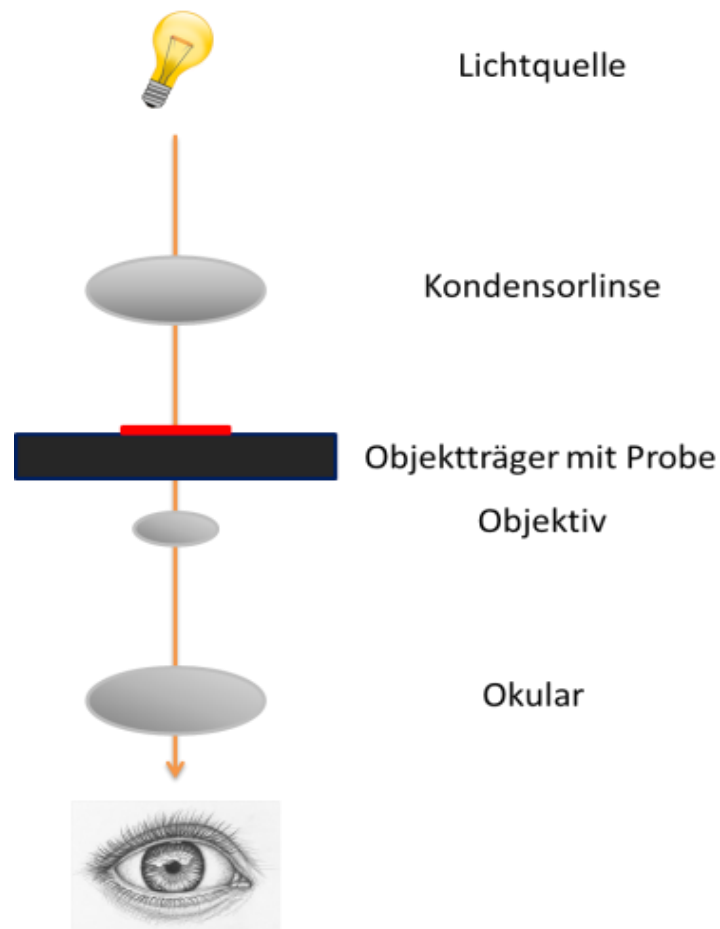


**Abbildung 13** Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops mit Detektor, Filtern, Spiegel, Objektiv und Probe. Übernommen aus (Römpp, 1997).

Das Licht stammt normalerweise aus einer Quecksilberlampe und passiert zunächst den Anregungsfilter. Über einen dichromatischen Spiegel wird das Licht durch das Objektiv auf die Probe geleitet. Die Fluoreszenz der Probe wird angeregt und Licht wird ausgestrahlt. Dieses passiert wiederum das Objektiv und wird über den Emissionsfilter an den Detektor geleitet. Aufgrund der speziellen Eigenschaften des dichromatischen Spiegels lässt dieser das länger wellige Licht der Probe hindurch. Es ist sogar möglich durch eine geschickte Wahl der Anregung und der Filter mehrere Fluoreszenzfarbstoffe in unterschiedlichen Kanaleinstellungen sichtbar zu machen, d.h. beispielsweise grüne von blauer Fluoreszenz getrennt zu beobachten (Spektrum Verlag, 1999). Die Fluoreszenzmikroskopie ist aus der heutigen Forschung nicht mehr wegzudenken und es sind inzwischen unzählige Fluoreszenzfarbstoffe im Handel erhältlich.

### 1.7.3.2 Inversmikroskopie

Die Inversmikroskopie funktioniert grundsätzlich genauso wie die normale Lichtmikroskopie bzw. Auflichtmikroskopie. Der einzige Unterschied liegt in der Anordnung des Objektivs. Die Lichtquelle kommt von oberhalb der Probe, das Objektiv liegt hier unterhalb des Objektträgers. Man blickt also von unten auf die Probe. Ein Aufbau eines solchen Mikroskops ist in Abbildung 14 gezeigt.



**Abbildung 14** Aufbau eines inversen Lichtmikroskops mit Lichtquelle und der zwischen Okular und Linse liegenden Probe.

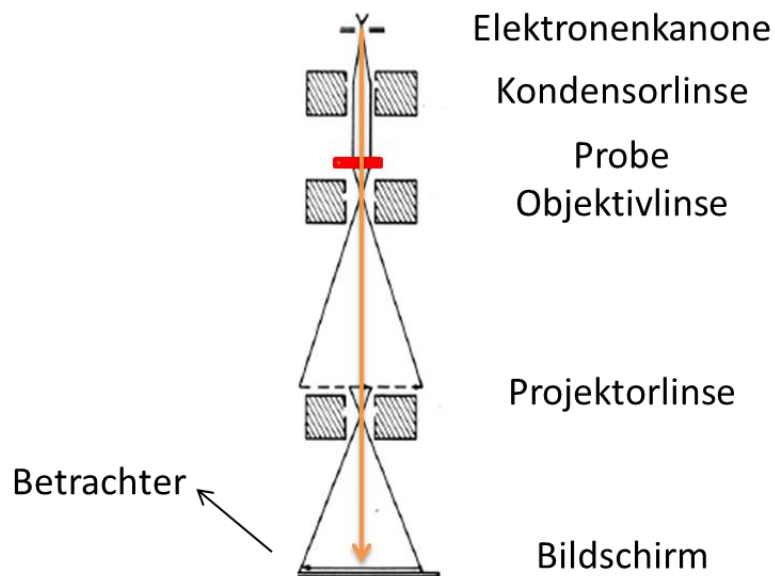
Der große Vorteil eines Inversmikroskops ist, dass man lebendige Zellkulturen ohne Manipulation des Systems untersuchen kann. Die Probe muss nicht entnommen und auf einen Objektträger aufgebracht werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass der größere Raum zwischen Beleuchtung und Objektisch voluminösere Präparate erlaubt. Hier können Petrischalen,



Mikrotiterplatten oder Ähnliches direkt auf den Objektisch gebracht und mikroskopiert werden. Der Boden des Gefäßes wirkt hier als Deckglas.

### **1.7.3.3 Elektronenmikroskopie und Helium-Ionen-Mikroskopie**

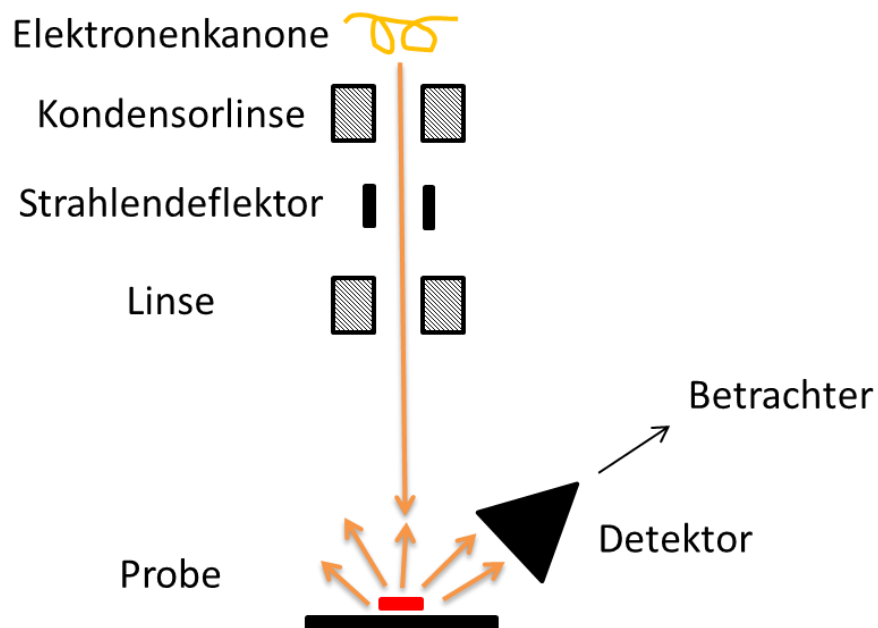
Elektronenmikroskope erlauben einen wesentlich genaueren Blick auf Präparate. Ihre Auflösung liegt bei etwa 0,1 nm, während die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops bei etwa 200 nm liegt. Der grundlegende Unterschied dieser zwei Methoden ist, dass Elektronenmikroskope Elektronen zur Darstellung von Oberflächen verwenden, wie es der Name schon sagt. Die grundlegenden Bausteine eines Elektronenmikroskops sind hierbei die Elektronenkanone, die die Elektronen erzeugt; die Elektronenlinse, die die Elektronen in die gewünschte Bahn lenkt und mit dem Okular des Lichtmikroskops verglichen werden kann und die Detektoren, die die aus der Oberfläche herausgeschlagenen Sekundärelektronen erfasst. Es gibt grundsätzlich zwei unterschiedliche Arten der Elektronenmikroskopie. Einerseits die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und andererseits die Rasterelektronenmikroskopie (REM). Bei der TEM werden zur Bilderzeugung die Rate der durchgegangenen Strahlelektronen verwendet, während bei der REM ein dünner Elektronenstrahl über die Probe läuft und Sekundärelektronen erzeugt, die von einem Detektor erfasst werden.



**Abbildung 15** TEM Aufbau. Entnommen und überarbeitet aus (Eroms, 2003/4). In Gelb ist der Elektronenstrahl dargestellt und in Rot die Probe.

In Abbildung 15 ist der grundsätzliche Aufbau eines TEM gezeigt. Zunächst werden die Elektronen in der Elektronenkanone erzeugt, durch die Kondensorlinse geführt und treffen dann auf die Probe. Der Bildschirm ist meist ein fluoreszierender Schirm, auf den die Elektronen auftreffen und das Bild sichtbar macht. Die Limitierung dieser Mikroskopie ist die Dicke der Proben. Sie müssen besonders dünn präpariert werden.

Abbildung 16 zeigt den grundsätzlichen Aufbau eines REM. Hier werden die Elektronen zunächst durch verschiedene Linsen und einen Strahlendeflektor geführt. Die Probe sitzt hier am Ende des Strahls. Die Elektronen treffen auf die Probe, Sekundärelektronen entstehen und Elektronenstreuung tritt auf. Beides wird von einem Detektor registriert und zu einem Bild übersetzt (Reimer, 1997).



**Abbildung 16** REM Aufbau. Entnommen und überarbeitet aus (Reimer, 1997). In Gelb ist der Elektronenstrahl und die Sekundärelektronen dargestellt und in Rot die Probe.

Bei beiden Mikroskopiearten muss die Probe vorher sorgfältig getrocknet werden und mit einer leitenden Schicht überzogen werden. Diesen Vorgang nennt man „Sputtern“. Unerwünschte leitende Eigenschaften der Probenoberfläche können zu Störungen in der Bildgebung führen. Durch den starken Elektronenstrahl werden die Proben oftmals stark in Mitleidenschaft gezogen und können sogar zerstört werden.

Im Gegensatz hierzu beruht die Helium-Ionen-Mikroskopie (HIM) auf einem Helium-Ionen Strahl, der die Probe abtastet. Diese Methode ist grundsätzlich vergleichbar mit der REM. Die Ionen werden hier durch ein starkes elektrisches Feld an einer Wolframnadel erzeugt. Die Proben werden durch Linsen gebündelt und treffen ebenfalls auf die Probe, bei der Sekundärelektronen bzw. Streuungen auftreten, die von einem Detektor aufgefangen werden. Der große Vorteil dieser Mikroskopieart ist, dass das Sputtern nicht mehr zwingend nötig ist und der Stahl aus Helium-Ionen wesentlich schonender für die Probe ist (Bazou et al., 2011).

## 1.7.4 Quantitative Methoden zur Biomassebestimmung

### 1.7.4.1 Kolorimetrische Methoden

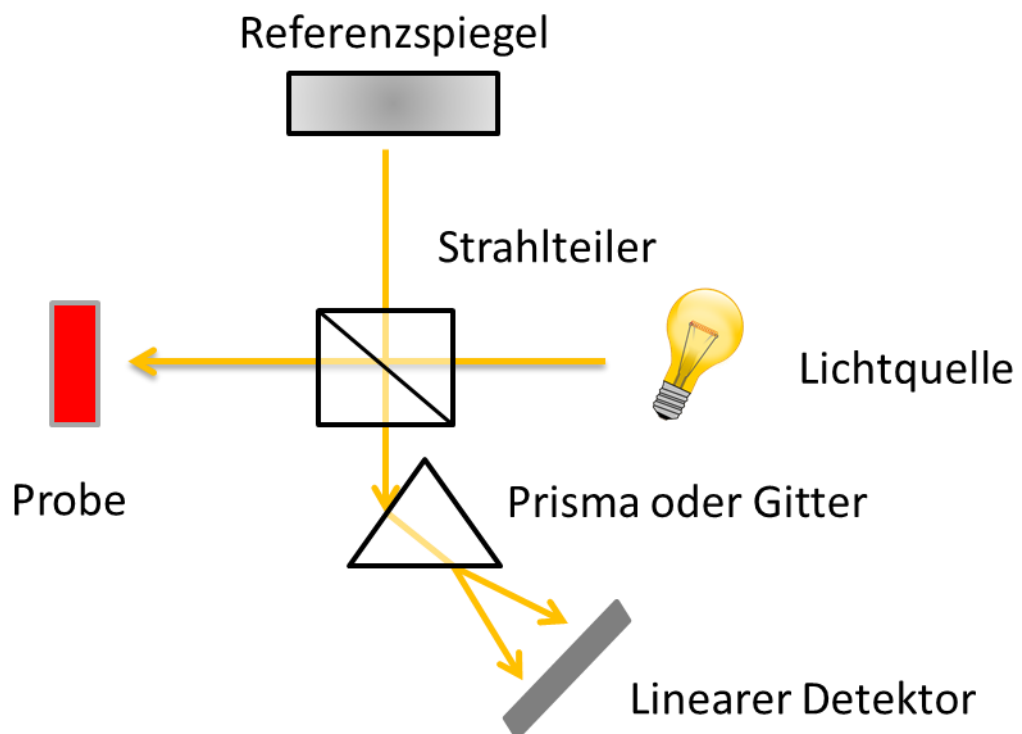
Kolorimetrie wird auch Absorptionsphotometrie genannt. Hier werden Konzentrationsbestimmungen anhand von Farbtintensitäten durchgeführt. Diese Messmethode erlaubt Messungen außerhalb der Grenzen des Lambert-Beerschen Gesetzes, wenn es sich um Suspensionen oder kolloide Flüssigkeiten handelt (Römpp, 1997). Bei dieser Bestimmungsart werden Farbstoffe ausgenutzt, die entweder Proben anfärben oder durch die Proben quantitativ zu einem Farbstoff umgesetzt werden. Durch Vergleich mit einer Kontrolle mit bestimmter Konzentration und damit einer bestimmten Farbdichte, kann man eine Aussage über die unbekannte Probe treffen (Hollemann und Wiberg, 1995). In der vorliegenden Arbeit werden die Absorption von Kristallviolett zur direkten Färbung von Biofilmen (Peeters et al., 2007), und Resazurin, ein blauer Redoxindikator, der durch die Zellatmung zum pinken Resorufin umgesetzt wird, verwendet (Sandberg et al., 2009). Die Zellatmung wird bestimmt durch die Differenz des pinken, reduzierten Farbstoffes (570 nm) und des blauen, oxidierten Farbstoffes (600 nm). Die automatische Vermessung mit einem Mikrotiterplattenreader (FLASHScan 550) erlaubt die einfache Ermittlung der Ergebnisse nach der folgenden Formel.

$$\text{Zellatmung} = \Delta(570 \text{ nm} - 600 \text{ nm})$$

### 1.7.4.2 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (aus dem Engl. Optical Coherence Tomography, OCT) beruht auf dem Prinzip eines Interferometers. Interferenzen sind Überlagerungen von zwei oder mehreren Wellen. Diese Wellen können unterschiedlicher Natur sein, also Licht-, Schall- oder Materialwellen. Hier wird die OCT als bildgebendes Instrument verwendet, das die Streuungsdichte einer Probe misst und somit auf seine Struktur zurück schließt. Hierbei ermöglicht es die OCT sogar, sehr stark streuende Proben zu untersuchen. Die OCT verwendet im Gegensatz zu Ultraschalluntersuchungen elektromagnetische Wellen. Diese Wellen

treffen zunächst auf einen Referenzspiegel und dann auf eine beispielsweise biologische Probe. Es kommt zu interferierenden Reflexionen. Das reflektierte Licht kann vom Detektor dann zu einem 3-dimensionalen Bild zusammengesetzt werden. Letztendlich gemessen wird die Amplitudenänderung der Überlagerung der beiden Reflexionen von Probe und Referenzspiegel. Abbildung 17 zeigt den Aufbau eines OCT. Sie zeigt die Aufspaltung der Wellen durch einen Strahlenteiler in die beiden Messungsarme, einerseits zum Referenzspiegel und andererseits zur Probe. Linear zur Probe aufgebaut ist der Detektor.



**Abbildung 17** Prinzipieller Aufbau einer OCT Messanordnung. Entnommen und überarbeitet aus (Drexler et al., 2008).

Es sind bereits andere Gruppen damit beschäftigt, Biofilme mit Hilfe des OCT zu untersuchen (Wagner et al., 2010). Hier wird gezeigt, dass es sehr gut möglich ist, Biofilme darzustellen. Die OCT hat hierbei die großen Vorteile, dass sie wesentlich weniger kostenintensiv ist als die bisher gebräuchlichen Methoden der Magnetresonanztomographie. Außerdem ist die Akquirierung der Bilder wesentlich schneller als mit anderen Methoden (2 min pro Probe), denn die Bildgebung ist direkt zu vergleichen mit den

Strukturdichten der Proben. Biofilme zeigen eine große Strukturdichte, welche mit Bildverarbeitungssoftware, wie beispielsweise ImageJ, analysiert wird und deren Volumen bestimmt werden kann.

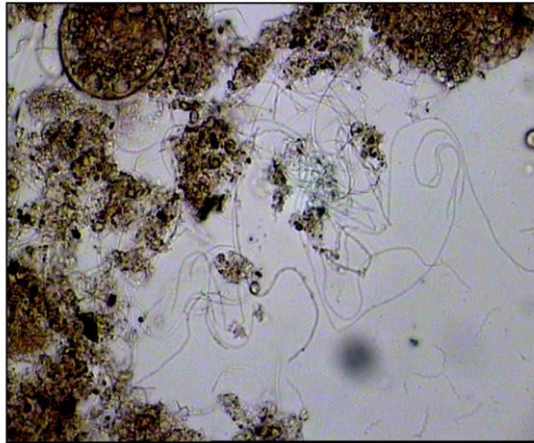
### **1.8 Transkriptomanalyse**

Die Transkriptomanalyse ist eine gängig verwendete Methode um die relevanten Expressionsmuster eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen (Müller-Esterl, 2004). Dies wird in dieser Arbeit genutzt, um den direkten Einfluss des biofilminduzierenden Peptids TisB auf bakterielle Zellen zu untersuchen. Das Transkriptom einer Zelle reflektiert die Gesamtheit aller Genprodukte und damit die Gesamtheit der regulatorischen Mechanismen, die während dieser Phase der Untersuchung ablaufen. Transkriptomanalysen werden gemacht, um beispielsweise aufzuklären wie Wirkstoffe auf Zellen wirken, welche Signalkaskaden aktiviert werden, welchen Effekt ein Wirkstoff auf die Atmungskette hat oder welche Pumpen in den Membranen in Gang gesetzt werden. Zur Analyse des Transkriptoms wird normalerweise die sogenannte messenger RNA (mRNA) der Zelle isoliert und dann analysiert. Diese mRNA ist der Informationsträger der exprimierten Proteine in der Zelle. Neben der mRNA existieren in Zellen auch noch die ribosomale RNA (rRNA) und die Transfer RNA (tRNA), die aber keine zentrale Bedeutung in der Proteinbiosynthese besitzen. Die mRNA wird also aus der Zelle isoliert, danach durch die Reverse Transkriptase in copy DNA (cDNA) als eine Art Bibliothek übersetzt und dann genau wie genomische DNA sequenziert (Dötsch et al., 2012).

### **1.9 Biofilme in der Abwasserwirtschaft**

Klärschlamm ist der Definition nach der Inhalt eines Klärwasserbeckens, der durch Sedimentation abgetrennt werden kann (Bundesministerium für Umwelt). Die Umsetzung von Schadstoffen und anderen Inhaltsstoffen des Klärwassers erfolgt durch diverse Organismen, wie Bakterien, Pilze und Protozoen. Das Überleben dieser Vielfalt an Mikroorganismen setzt die Stoffwechselrate der Abwasseranlagen voraus, und deshalb wird

penibel auf die Gesundheit des Umweltsystems in Klärwasserbecken geachtet (Bundesministerium für Umwelt). Den gesunden Klärschlamm nennt man auch Belebtschlamm. Abbildung 18 zeigt eine mikroskopische Aufnahme einer Flocke eines gesunden Belebtschlammes.



**Abbildung 18** Flocke eines Belebtschlammes. Entnommen aus (Haus, 2010).

Es sind diverse bakterielle Zellen zu erkennen, die in einem lockeren Geflecht aus Filamenten zusammenhalten. Die Folgen von Störungen dieser Lebensgemeinschaften erstrecken sich auf das Aussehen der Klärschlammflocken, die Sedimentationseigenschaften und möglicher Schaumbildung auf den Klärwasserbecken (Seviour R. , 2010). Es gibt unterschiedliche Formen von Veränderungen, je nachdem, welche Art von Störung auftritt. Beispielsweise kann sogenannter Blähschlamm auftreten, der durch Schaumbildung zu erkennen ist. Von diesem Blähschlamm gibt es unterschiedliche Formen. Es kann das sogenannte „filamentous bulking“ (deutsch: faserartiger Blähschlamm) auftreten. Hier bläht sich der Schlamm stark auf, die Flocken vergrößern ihr Volumen und es tritt eine vermehrte Filamentbildung auf. Dadurch zeigt der Schlamm ein verschlechtertes Sedimentationsverhalten und kann das gereinigte Wasser kontaminieren. Andererseits kann auch das sogenannte „viscous bulking“ (deutsch: viskoser Blähschlamm) auftreten. Dieser Schlamm zeigt ebenfalls ein verschlechtertes Sedimentationsverhalten, gleichzeitig jedoch eine immense Bildung von extrazellulären Biopolymeren, wodurch

der Schlamm gelartig wird. Die Flocken des Schlammes sind hier kompakter und es sind kaum noch Filamente zu erkennen (Allen et al., 2004; Metcalf and Eddy, 2004). In dieser Arbeit wird untersucht, wie das Peptid TisB auf Belebtschlamm wirkt. Idealerweise zeigt dieses Peptid eine Induktion von Biofilmbildung und könnte so die katalytische Aktivität des Klärschlammes erhöhen und damit positiv beeinflussen.



## 2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Reihe membranaktiver Peptide unterschiedlicher Eigenschaften (Herkunft, Struktur, Ladung, Wirkmechanismus) auf ihre Wirkung auf die Biofilmbildung von Bakterien zu testen. Hierbei wurde zunächst das biofilminduzierende Peptid TisB untersucht. Es wurden unterschiedliche Einflüsse dieses Peptids auf Bakterien untersucht wie z.B.:

- Effekt auf grampositive und gramnegative Bakterien,
- Effekt auf aerobe und anaerobe Bakterien,
- Beweis der Funktionshypothese mittels Untersuchung unterschiedlicher Peptidderivate und deren Effekt auf Bakterien,
- Effekt auf genregulatorischer Ebene mittels einer Transkriptomanalyse.

Darauf hingehend wurden Untersuchungen an den gebildeten Biofilmen unternommen. Es wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf die gebildete Biofilmmatrix gelegt und hierbei vor allem auf:

- Den Einfluss unterschiedlicher Peptide auf die Sekretion extrazellulärer DNA (eDNA) und
- Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS).

Hierbei wurde nicht nur das Peptid TisB getestet, sondern auch diverse antimikrobielle Peptide (AMP) in sublethalen Konzentrationen, da diese ähnliche strukturelle Eigenschaften wie TisB aufweisen und ebenfalls membranaktive Peptide darstellen. Mit diesen AMP wurden dann weitere Versuche zu ihrer Aktivität oberhalb der sublethalen Konzentrationen unternommen, also in den antimikrobiell wirkenden Konzentrationen. Hier wurden diverse Parameter ermittelt:

- Minimale Hemmkonzentration (MHK),
- Minimale bakterizide Konzentration (MBK),
- Minimale biofilmmhemmende Konzentration (MBHK)

## Aufgabenstellung

- Minimale Biofilm atmungshemmende Konzentration (MBAHK) und die
- Minimale biofilmeliminierende Konzentration (MBEK).

Bei den drei letztgenannten Parametern wurden alle Peptide auf ihre Eigenschaft untersucht, sowohl die primäre Anhaftung der Biofilme zu hemmen als auch ihre Eigenschaften, in Konzentrationen unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (subMHK) Biofilme zu induzieren. Weiterhin wurden auch alle Peptide auf ihre biofilmeliminierenden Eigenschaften untersucht. Alle Parameter wurden mittels unterschiedlicher kolorimetrischer und optischer Methoden, sowohl qualitativ als auch quantitativ definiert. Alle diese Tests wurden mit den beiden Kontrollstämmen *S. aureus* DSM 1104 und *E. faecalis* DSM 2570 durchgeführt. Darüber hinaus ist es für eine solche Studie unerlässlich auch klinische Isolate mit einzubeziehen. Alle hier erhaltenen Ergebnisse wurden in Relation gesetzt zu zwei ausgewählten konventionellen Antibiotika.

Der besondere Fokus dieser Aufgabenstellung lag im Vergleich von vielen verschiedenen Peptiden und ihren unterschiedlichen Wirkungen auf einige repräsentative Bakterien. Zur Charakterisierung der Wirksamkeit dieser Peptide im Vergleich mit konventionellen Antibiotika sind dieses Prüfverfahren und die Validierung aller dieser Parameter unerlässlich.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Alle verwendeten Materialien, wie Medien, Reagenzien und Geräte sind im Anhang A aufgelistet. Sonstige Verbrauchsmaterialien wurden vordergründig bezogen von *Eppendorf*, *VWR*, *Thermo Scientific*, *Sarstedt* und *Falcon*.

#### 3.2 Zellkulturen

Die verwendeten bakteriellen Kulturen werden in Tabelle 1 aufgelistet. Die Kontrollstämme sind von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Die klinischen MRSA Isolate stammen aus dem Städtischen Klinikum Karlsruhe (Berditsch et al., Cell Symposium "Microbiome and Host Health", 2013) und die Enterokokken aus Käse und Wurzelkanal wurden vom Dental Institute des Kings College in London zur Verfügung gestellt (Wade, 2013).

**Tabelle 1** Verwendete Bakterienstämme.

Bakterien	Stamm
<i>S. aureus</i>	DSM 1104 , MN8
<i>E. faecalis</i>	DSM 2570, Isolate WW4 (Käse) und WW6 (Wurzelkanal), OG1RF
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1, DSM 1117
MRSA	Klinische Isolate MRSA 9 und seine Phänotypen SCV und BP
<i>E. coli</i>	DSM 498 (K12)
<i>Z. mobilis</i>	ATCC 31821
<i>C. beijerickii</i>	ATCC 55025

### 3.3 Peptide

Alle Peptide wurden am Institut für Biologische Grenzflächen 2 unter der Leitung von Dr. Parvesh Wadhvani synthetisch hergestellt. Gramicidin S wurde von Dr. Marina Berditsch am Institut für Organische Chemie mittels bakterieller Fermentation hergestellt (Berditsch et al., 2007) und das Peptid Gramicidin A wurde von der Firma Sigma Aldrich (Heidenheim, Germany) gekauft, genau wie die beiden Antibiotika Vancomycin und Demeclocyclin. In Tabelle 2 sind alle eingesetzten Peptide mit ihrer Aminosäuresequenz aufgelistet.

**Tabelle 2** Alle verwendeten antimikrobiellen Peptide mit ihrer Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode.

Peptid	Aminosäuresequenz	Referenzen
Gramicidin S	Cyclo( <sup>F</sup> PVOL <sup>F</sup> PVOL)	(Gause, 1944), (Berditsch, 2007)
Gramicidin A	VGA <sup>D</sup> LA <sup>D</sup> VVVV <sup>D</sup> LW <sup>D</sup> LW <sup>D</sup> LW	(Dubos, 1939)
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-amide	(Hoffmann et al., 1983), (Moore et al., 1992), (Maloy et al., 1995)
Magainin2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	(Zaslouff, 1987), (Gesell et al., 1997)
MSI-103	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-amide	(Strandberg et al., 2008), (Epand et al., 2010)
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA-amide	(Hällbrink et al., 2001), (Oehlke et al., 2005)
TemporinA	FLPLIGRVLSGIL-amide	(Wade et al., 2000), (Wade et al., 2001)
TemporinL	FVQWFSKFLGRIL-amide	(Rinaldi et al., 2002), (Mangoni et al., 2011)
Temporin SHf	FFFLSRIF-amide	(Abassi et al., 2010)
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	(Rivas-Santiago et al., 2008), (Tomasinsig et al., 2005)
DCD-1L	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGGKAVHDVKDVLDSVL	(Schitteck et al., 2001), (Paulmann et al., 2012)
SSL-25	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA	(Baechle et al., 2006)
Alamethicin	Ac-UPUAUAQUVUGLUPVUUEQ-Phe-ol; U = Aib	(Leitgeb et al., 2007)
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-amide	(Song et al., 2011), (Fanghänel et al., 2014)
BP100	KKLFFKILKYL-amide	(Mink, 2010), (Eggenberger et al., 2011)
KIGAKI	KIGAKIKIGAKIKIGAKI-amide	(Blazyk et al., 2001), (Lu et al., 2006)

### **3.4 Methoden**

#### **3.4.1 Bakterielleres Wachstum und Anzucht der Biofilme**

Für alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden Bakterien unterschiedlicher Stämme benötigt. Um durchgängig die gleiche Vitalität und Qualität von Zellen für die Untersuchungen gewährleisten zu können, wurde die Anzucht der Bakterien stets nach demselben Protokoll durchgeführt. Hierzu wurden zunächst aus cryo-Kulturen Übernachtskulturen angezogen und zur Erfrischung eine Passage Agarplatten ausgestrichen. Kolonien dieser Agarplatten wurden für die Kulturen der unterschiedlichen Tests verwendet. Die Agarplatten wurden alle 2 Wochen erneuert. Die verschiedenen Bakterienstämme wurden zunächst über Nacht kultiviert. Für das Heranziehen von Biofilmen wurde im Allgemeinen LB Medium (Luria-Miller) verwendet mit einem Zusatz von 0,5% Glukose (LBG). Die Inokulationsdosis hierbei lag bei einer optischen Dichte ( $OD_{550nm}$ ) von 0,2, welche einer Bakterienzahl von etwa  $10^8$  KbE/ml der grampositiven und  $10^9$  KbE/ml der gramnegativen Bakterien entspricht. Die Biofilme für die entsprechenden Versuche wurden jeweils entweder in Mikrotiterplatten oder dem Calgary Biofilm Device (CBD) angezogen. Die Inkubationsdauer betrug 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Atmungsüberwachung über 48 h und die Mikroskopie-Experimente wurden in MH Medium (Müller-Hinton) durchgeführt. Die Tests wurden mit einer  $OD_{550nm}$  von 0,1 inokuliert. Für die MBHK, MBAHK und MBEK Tests wurde dieselbe Animpfdosis verwendet, wobei bei den MBAHK und MBEK Versuchen zunächst Biofilme in LBG und Mikrotiterplatten oder CBD über 24 h angezogen wurden.

#### **3.4.2 Biofilmquantifizierung mittels Kristallviolett (MBHK, MBAHK und MBEK)**

Kristallviolett wurde zu unterschiedlichen Zwecken benutzt. Einerseits um die peptid-induzierte Biofilmmasse zu quantifizieren, sowohl von den AMP als auch TisB, andererseits um die biofilmeliminierende Konzentration (MBEK) zu bestimmen. Die Praxis dieses Tests ist jedoch dieselbe. Für

die MBAHK/MBEK Bestimmung wurden zunächst, wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben, über 24 h Biofilme in Mikrotiterplatten oder auf dem CBD angezogen. In einer Transfermikrotiterplatte wurden die Verdünnungsreihen mit Peptid- bzw. Antibiotikallösung hergestellt. Die maximale Konzentration betrug 1024 µg/ml. Nach dem Biofilmwachstum wurde mit physiologischer Lösung jegliches planktonisches Wachstum gewaschen und die Verdünnungsreihen von der Transferplatte auf die Biofilme mittels einer Multikanalpipette übertragen und wieder 24 h inkubiert. Der MBAHK Wert wurde vor der Kristallviolettfärbung (MBEK Ermittlung) mittels einer Inkubation mit Resazurin ermittelt. Hierfür wurden 20 µl einer 0,2 mg/ml Resazurinelösung zu den Proben gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde im Mikrotiterplattenreader zunächst die Absorption von Resazurin (vgl. Kapitel 3.4.4) vermessen. Für die Färbung mit Kristallviolett mussten die Biofilme zunächst mit physiologischer Lösung gewaschen werden. Danach wurden die Biofilme mit Methanol fixiert. Nach 10 min wurde das Methanol wieder abgenommen und die Platte an der Luft getrocknet. Ab jetzt musste nicht mehr steril gearbeitet werden. Die Platten wurden mit einer 0,1%igen Kristallviolettlösung versehen und für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend musste das Kristallviolett großzügig gewaschen werden. Dies konnte mehrere Waschgänge benötigen. Am Ende sollten nur noch die violett eingefärbten Biofilme zu sehen sein, entweder am Boden und den Seiten der Mikrotiterplatte oder an dem Zäpfchen des CBD. Diese wurden dann wieder an der Luft getrocknet. Zur Entfärbung und der Quantifizierung des Farbstoffes wurden dann zu den trockenen Biofilmen 100%iger Ethanol hinzugegeben und bei RT 20 min inkubiert. Das Ethanol löst das Kristallviolett wieder aus dem Biofilm heraus und die Menge des Farbstoffes entspricht der Menge der Biofilmmasse. Die Platten wurden bei 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader vermessen. Die Absorptionsintensität korreliert mit der Biofilmmasse. Dies wird immer im Verhältnis zu Kontrollen ohne Peptidzugabe angegeben. Für den MBHK Test wurde im Gegensatz zum MBEK keine Biofilmanzucht benötigt, sondern die Peptide bzw. Antibiotika

wurden direkt mit den Bakterien inokuliert ähnlich zur Methode der Atmungsüberwachung (Kapitel 3.4.4). Nach 24 h Inkubation wurde direkt mit Kristallviolett angefärbt um die Biofilmbildung zu untersuchen. Der MBHK-Wert wurde hierbei als der Wert abgelesen bei dem signifikant (50% weniger) Biofilmmasse detektiert werden konnte.

### **3.4.3 Optische Kohärenztomographie zur Biomassequantifizierung**

Die optische Kohärenztomographie wurde als zusätzliche Methode zur Biomassebestimmung von induzierten Biofilmen verwendet. Diese Methode konnte speziell nur mit den TisB-induzierten Biofilmen durchgeführt werden, da TisB einerseits die Biofilme sehr schnell induziert und andererseits die Aggregation der bakteriellen Zellen bereits frei schwimmend in der Mediumlösung stattfindet. Sind die Biofilme bereits am Boden der Mikrotiterplatten angehaftet, können sie mittels der OCT nicht mehr detektiert und sichtbar gemacht werden. Daher ist die Methode nicht zu verwenden mit den AMP-induzierten Biofilmen, die am Boden der Mikrotiterplatten anhaften. Hierfür wurden Übernachtskulturen von *E.coli* und *S. aureus* in LB-Luria (geringere Salzgehalt, 0,5 g/l, als LB-Medium aufgrund der TisB Löslichkeit) angeimpft. Am nächsten Tag wurden in Mikrotiterplatten Verdünnungsreihen von TisB (gelöst in 50% Ethanol) hergestellt und mit einer Bakteriensuspension mit der  $OD_{550nm}$  von 0,1 inokuliert. Als Kontrolle diente Zellsuspension mit dem gleichen Gehalt an Ethanol wie die TisB Proben. Die Platten wurden für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und danach am Tomograph vermessen.

### **3.4.4 Identifikation von Biofilminduktion durch Beobachtung der Atmungsaktivität und Inversmikroskopie**

Zur Identifikation der Biofilminduktion durch die AMP wurde die Atmungsaktivität mit Hilfe des Redoxindikators Resazurin beobachtet. Hierfür wurden zunächst Übernachtskulturen der jeweiligen Bakterien angeimpft. Am nächsten Tag wurden Testkulturen mit der  $OD_{550nm}$  von 0,2 angeimpft und für 3-4 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert bis eine  $OD_{550nm}$  von 1 erreicht wurde. Die Bakterien befinden sich dann in der

exponentiellen Phase ihres Wachstums und sind damit auf demselben Entwicklungsstand. In Mikrotiterplatten wurden Verdünnungsreihen der AMP hergestellt (jeweils im Triplikate), 2 positive Kontrollreihen nur mit Zellen und eine Reihe zur Sterilitätskontrolle. Die Platten wurden mit den Bakterien ( $OD_{550nm}$  0,2) angeimpft und als letzter Schritt wurde Resazurin mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml hinzu gegeben. Resazurin erscheint als blaue Lösung (Absorption bei 600 nm) und wird durch die Atmungskette der Bakterien reduziert zu dem Farbstoff Resorufin (Absorption bei 570 nm), der pink erscheint. Zieht man die Absorptionsintensität der oxidierten blauen Form von der reduzierten, pinken Form (570 nm – 600 nm) des Resazurin ab, erhält man die eigentliche Atmungsintensität der Bakterien. Aufgrund seines hohen Redoxpotentials, kann Resazurin die komplette Atmungskette von den Cytochromen bis zur ATPase abdecken (Sandberg et al., 2009). Die Platten wurden im Mikrotiterplatten-Reader nach 3 h, 24 h und 48 h vermessen. Nach der letzten Messung wurden die Platten dann mit einem Inversmikroskop auf Biofilmbildung untersucht. Biofilme erschienen als an der Oberfläche festsitzende dunkle Kolonien. Zusätzlich wurden nach 48 h, zur Ermittlung der Minimalen bakteriziden Konzentration (MBK), jeweils 5  $\mu$ l aus allen Vertiefungen entnommen und auf Agarplatten aufgebracht (Spotting). Diese Agarplatten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Die MBK wurden dann als der erste „Spot“ ohne bakterielles Wachstum festgelegt (entnommen und angepasst aus (Herigstad et al., 2001)).

#### **3.4.5 Fluoreszenzmikroskopie: Identifikation der biofilmabtötenden Konzentrationen und des Austritts von extrazellulärer DNA**

Um sicher zu sein, dass Biofilmeliminierung auch gleichzeitig Biofilmabtötung bedeutet, wurden zur Unterstützung der Kristallviolettergebnisse Live/Dead Färbungen mit dem BacLight Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit den Biofilmen wurden mehrmalig mit einer 0,85%igen NaCl-Lösung gewaschen um das planktonische Wachstum zu entfernen. Ein Volumen von 100  $\mu$ l der NaCl-Lösung und 1  $\mu$ l der 160  $\mu$ M BacLight Lösung



wurden danach in die Vertiefungen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit NaCl-Lösung gewaschen und mit dem Inversmikroskop untersucht. Die Anregung erfolgte bei 530 nm für die grünen lebendigen Zellen und 670 nm für die roten toten Zellen.

Um den Austritt von eDNA zu untersuchen erfolgte die Probenvorbereitung wie mit dem BacLight Mix. Als Farbstoff wurde hier jedoch DDAO (7-hydroxy-9H-[1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one]) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in DNA, kann Zellen jedoch nicht penetrieren und die eDNA erscheint in Rot (659 nm).

Für beide Methoden wurden Biofilme wie unter Kapitel 3.4.1 beschrieben angezogen und mit den jeweiligen Peptiden behandelt.

### **3.4.6 Probenvorbereitung für Rasterelektronenmikroskopie und Helium-Ionen-Mikroskopie**

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Helium-Ionen-Mikroskopie (HIM) wurden sowohl Biofilme am CBD als auch auf Hydroxylapatitplättchen wachsen gelassen. Die Biofilme wurden jeweils zunächst für 24 h inkubiert, um den Biofilm anzuziehen und danach für weitere 24 h mit Gramicidin S behandelt. Nach der Behandlung wurde zunächst mit Resazurin überprüft, ob die Biofilme respiratorisch aktiv sind oder nicht. Danach wurden die Proben mit Glutaraldehyd (0,2%) für 1 h fixiert. Zur Trocknung der Proben wurden sie dann nacheinander mit 50%, 70% und 100% Ethanol behandelt. Jeder der Trocknungsschritte wurde zwischen 10 min und 30 min bei RT inkubiert. Der letzte Schritt des Trocknungsprozesses wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Helium-Ionen-Mikroskopie (HIM) war dieser Trocknungsprozess der letzte Schritt der Probenvorbereitung. Danach konnte mit dieser Methode direkt mikroskopiert werden. Für die REM mussten die Proben noch mit Platin gesputtert werden. Mit der HIM Methode wurden vornehmlich die Hydroxylapatitplättchen untersucht und mit REM die Biofilme auf dem CBD.

### **3.4.7 Isolation und Anreicherung von mRNA für die Transkriptomanalyse**

Zunächst wurden die Bakterien in Übernachtkulturen in LB-Luria (LB Medium mit 0,5 g/L NaCl) in Kulturkölbchen inokuliert. Um eine erhöhte genetische Vielfalt zu erreichen wurden insgesamt 6 Kulturen angesetzt. Von allen Kulturen wurden Proben in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen mit 32 µg/ml TisB behandelt und für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um genügend Zellen für die RNA-Isolation zu erhalten wurde eine OD<sub>550nm</sub> von 1,0 eingestellt. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit RNAprotect® behandelt und die RNA mit dem RNeasy® Kit isoliert wie im Protokoll von Qiagen beschrieben. (Qiagen, 2011) Zur Zellyse wurde für *E. coli* DSM 498 handelsübliches Lysozym aus Ei verwendet und für *S. aureus* DSM 1104 das Enzym Lysostaphin (Kumar, 2008), beide in einer Konzentration von 5 mg/ml. Nach der Isolation wurden die Proben mit SuperaseIn™ behandelt (1 U/µl) und danach die DNA in der Probe mit dem DNAfree™ Kit verdaut. (Life technologies, 2013) Zur ersten Quantifizierung der RNA in der Probe wurden alle Proben mit Hilfe eines NanoDrop (260/280 nm) vermessen. Es sollte hier schon eine RNA Konzentration von etwa 10 ng/µl erreicht werden, um einen etwaigen Verlust während der mRNA Anreicherung vorzubeugen. War die RNA Konzentration ausreichend, wurde mit dem MicroExpress™ Kit zur mRNA Anreicherung fortgefahren. Auch hier wurde das Kit wie beschrieben benutzt (Life technologies, 2011). Am Ende der Anreicherung musste eine Konzentration von 10 ng/µl mRNA und eine totale Menge von 200-300 ng angereicherter mRNA für die Sequenzierung vorhanden sein. Die Proben wurden dann am Institut für Toxikologie und Genetik (KIT) unter der Leitung von Dr. Olivier Armant sequenziert.

### **3.4.8 Charakterisierung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS)**

Hierbei wurden einige ausgewählte Peptide zur Analyse verwendet, sowohl AMP als auch TisB. Zunächst mussten hierfür die Stämme *S. aureus* MN8, *E. faecalis* OG1RF und *P. aeruginosa* PAO1 auf ihre

Biofilmbildung in subMHK-Bereichen von den Peptiden untersucht werden. Dafür wurde die Atmungsaktivität überwacht, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, und die induzierenden Konzentrationen festgelegt. Für TisB wurde aus Erfahrungswerten die Konzentration 32 µg/ml verwendet. Die erhaltenen MHK-Werte und die identifizierten biofilminduzierenden subMHK Konzentrationen können in Tabelle 7 und Tabelle 8 in Kapitel 5.1.2 eingesehen werden. Da Peptide, wie beispielsweise GS, nicht biofilminduzierend sind, wurde hier eine Konzentration einen Verdünnungsschritt unter dem MHK-Wert gewählt. Welche Peptide letztendlich induzierend wirkten, wird in den Ergebnissen diskutiert. Nach der Identifikation der Peptidkonzentrationen wurden 15 ml Ansätze mit Bakterien hergestellt. Hierfür wurde eine Inokulationsdosis von OD<sub>550nm</sub> von 0,1 gewählt. Die Proben wurden für 96 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben gewaschen und bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert, um die Biomasse vom Überstand abzutrennen. Die Proben mit Biofilmbildung zeigten durch die Sekretion von EPS eine erhöhte Biomasse im Gegensatz zu den Proben, in denen nur planktonisches Wachstum vorlag. Der Überstand der Proben wurde abgenommen und die Proben gefriergetrocknet. Danach konnte man die Biomasse auswiegen. Die Biomassen werden im entsprechenden Ergebnisteil gezeigt und diskutiert. Für die gelchromatographische Analyse wurden die Proben dann in der ionischen Lösung 1-Ethyl-3-methylimidazoliumazetat (EMIM-ac) und N,N-dimethylacetamid (DMAC) in einem Verhältnis von 40/60 % (v/v) gelöst. Die Biomassekonzentration betrug hierbei 10 mg/ml. Dieses Lösungsmittelgemisch wurde auch als Laufmittel für die Gelchromatographie verwendet (Seviour T. , unveröffentlicht).

### **3.4.9 TisB induzierte Membrandepolarisation von *E. coli***

Es wurde der Effekt von TisB auf die Membranpolarisation von *E. coli* DSM 498 Bakterien untersucht. Dieser Bakterienstamm ist der natürliche TisB-Produzent (Lewis, 2010). Dafür wurde zunächst eine Übernachtskultur von *E. coli* benötigt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 5000 rpm, 10 min zentrifugiert und zweimal mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-

ethansulfonsäure Puffer (HEPES) in einer Konzentration von 5 mM gewaschen. Die Zellen wurden dann in mit Glukose und KCl versetztem HEPES-Puffer resuspendiert und auf die  $OD_{550nm}$  von 0,05 verdünnt. Es wurden dann in einer Mikrotiterplatte zunächst der Puffer und die Zellen gemischt und mit 2  $\mu$ l 3,3'-Diethylthiocarbocyaniniodid (DiSC3) Farbstoff versetzt. Direkt anschließend wurde mit dem Kinetik Programm (20 Zyklen, Zeitabstand 0,5 s) eines Mikrotiterplatten-Readers gemessen. Der Farbstoff akkumuliert in hyperpolarisierten Zellmembranen und hat seine Emission bei 620 nm. Seine Anregung liegt bei 670 nm. Der erste Zyklus diente zur Stabilisation der Fluoreszenz und als 0-Wert. Nach der Messung wurde ohne Umweg das Peptid hinzugegeben und direkt wieder vermessen. Die Änderung der Fluoreszenz im Vergleich zum 0-Wert zeigte die Störung des Membranpotentials an (übernommen wurde diese Methode aus (Hinks et al., 2014)).

### **3.4.10 Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm**

Um den Effekt von TisB auf Klärschlammproben zu untersuchen, musste zunächst einmal die Wirkkonzentration von TisB ermittelt werden. Dazu wurden kleine Versuchsansätze gewählt mit 7 ml Klärwasser, 7 ml Klärschlamm und 1 ml Peptidlösung. Zunächst getestet wurden die TisB-Konzentrationen 32  $\mu$ g/ml und 128  $\mu$ g/ml. Diese Testansätze wurden für 24 h bei RT und Schütteln in Petrischalen inkubiert. Dann wurden die Proben in 15 ml Plastikgefäße überführt, gut geschüttelt und das Sedimentationsverhalten der Proben innerhalb von 30 min beobachtet. Die Werte wurden hierzu alle 2 min aufgenommen. Danach wurde die Gesamtmasse der suspendierten Feststoffe (engl.: „total suspended solids“) mittels gravimetrischer Methoden evaluiert. Hierfür wurden Filter bei 105°C ausgeheizt, im Exsikkator trocken abgekühlt und dann gewogen. Die Massen wurden notiert und den Filtern eindeutig zugeordnet. Es wurde ein bestimmtes Volumen an Probe hindurch filtriert und die Filter mit den Proben wieder zum Trocknen über Nacht ausgeheizt, danach abgekühlt und gewogen. Pro Probe wurden 3 Ansätze filtriert. Aus diesen Werten konnte die Menge an Biomasse, die

## Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm

Konzentration und der Schlammvolumenindex (SVI) in ml/g nach folgender Formel berechnet werden:

$$SVI = \frac{\text{Volumen nach 30 min Sedimentation}}{\text{Konzentration der suspendierten Feststoffe}}$$

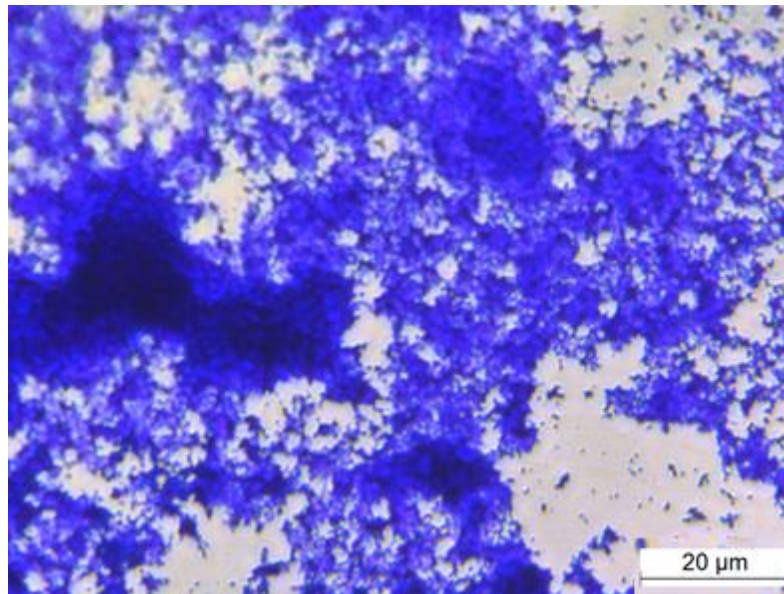
Im darauffolgenden größeren Ansatz des Versuches mit 50 ml Volumen wurden alle Verhältnisse genauso übernommen. Dieser Versuch verlief über 3 Tage. Am ersten und am dritten Tag wurde TisB mit der Konzentration von 128 µg/ml hinzugegeben. Bei diesem Versuch wurde zunächst die anaerobe Phase des Schlammzyklus durch Zugabe von Stickstoff eingeleitet und danach die aerobe Phase durch Zugabe von Luft. Die beiden Phasen wurden durch die Evaluierung des pH-Werts stabilisiert, der in der anaeroben Phase steigt und in der aeroben Phase fällt. Am Ende des Versuches wurden, wie bereits beschrieben, die Gesamtmasse und der SVI bestimmt. Außerdem wurden die Proben mit einem Inversmikroskop untersucht.

## 4 Das biofilminduzierende Peptid TisB

### 4.1 Ergebnisse

#### 4.1.1 Konzentrationsabhängige Biofilminduzierung und Steigerung von Biomasse

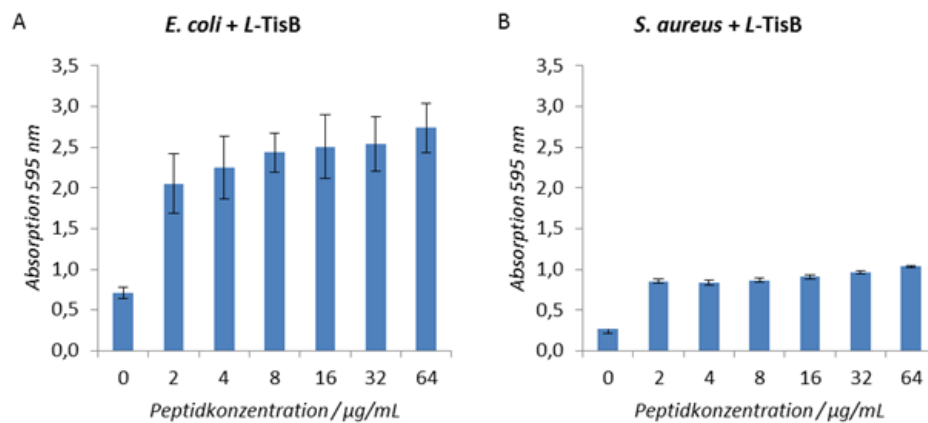
Bakterien werden heutzutage in unterschiedlichsten industriellen Zweigen zur Gewinnung von Proteinen, Enzymen und Chemikalien, wie Alkoholen, verwendet. Hierfür werden große Mengen an biologischem Material benötigt. Die Suche nach Optimierungsmöglichkeiten ist daher essentiell. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob das Peptid TisB in der Lage dazu ist, bei unterschiedlichen bakteriellen Stämmen eine Biomassesteigerung durch Biofilminduktion hervorzurufen. Die Wirkung von TisB wurde zunächst auf die beiden Stämme *E. coli* DSM 498 und *S. aureus* DSM 1104 untersucht. *E. coli* stellt ein gramnegatives Bakterium dar, das fakultativ anaerob ist und damit sowohl zur oxidativen als auch substratspezifischen Phosphorylierung fähig ist. Außerdem wurde TisB im Genom von *E. coli* gefunden. Es wird dort als Stresspeptid exprimiert. *S. aureus* ist grampositiv und ebenfalls fakultativ anaerob und ist daher unabhängig von Sauerstoff, aber auch zur oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Produktion fähig. Zur Bestimmung der Biofilminduktion von TisB und der Quantifizierung dieser Biofilme wurde Kristallviolett verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in die Polyglykanschicht der bakteriellen Zellwand (Stepanovic et al., 2000; Pitts et al., 2003) und in die extrazellulären Polymere der Matrix und färbt den gesamten Biofilm an. Abbildung 19 zeigt, wie ein solcher angefärbter Biofilm aussieht.



**Abbildung 19** *S. aureus* Biofilm angefärbt mit Kristallviolett nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Danach wurde das planktonische Wachstum abgetrennt und der Biofilm an der Oberfläche der Mikrotiterplatte mit Kristallviolett angefärbt. Der Maßstab beträgt 20 µm.

Die Absorption von Kristallviolett wurde, wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben, bei 595 nm vermessen und kann mit der Biomasse des Biofilms gleichgesetzt werden. Die Biofilminduktion wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen TisB und einer Inkubationszeit von 24 Stunden untersucht. Einerseits wurde das gramnegative Bakterium *E. coli* DSM 498 verwendet, da TisB aus diesem Bakterium stammt (Lewis, 2010). Andererseits wurde das Bakterium *S. aureus* DSM 1104 gewählt um zu untersuchen ob TisB auch auf grampositive Bakterien wirkt. Da TisB bei diesen Versuchen nicht exprimiert wird, sondern chemisch synthetisiert wurde und daher bei Zugabe zu den Zellen von außerhalb auf die Zellen wirkt, wird angenommen, dass der Aufbau der Membran und von welcher Seite TisB mit ihr interagieren kann keine Rolle spielt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Kristallviolett färbung beider mit TisB behandelten Stämme gezeigt und in beiden Experimenten kann eine Steigerung der Biomasse mit Zunahme der Peptidkonzentration beobachtet werden.

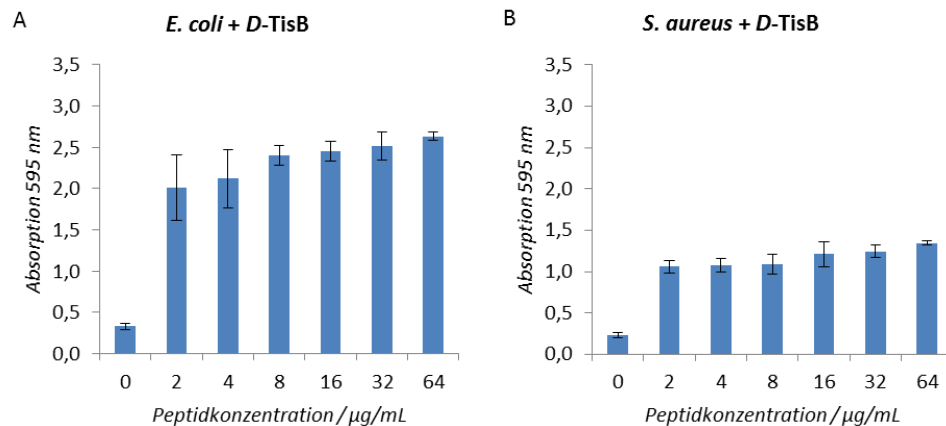
## Konzentrationsabhängige Biofilminduzierung und Steigerung von Biomasse



**Abbildung 20** Kristallviolett mit TisB-behandelten Bakterien. Die Stämme *E. coli* (A) und *S. aureus* (B) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen TisB behandelt und für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Inokuliert wurde in Mikrotiterplatten mit 5\*10<sup>7</sup> KbE/ml.

Bei *E. coli* handelt es sich bei der maximalen Peptidkonzentration um eine Biomassesteigerung um das 5-6-fache und bei *S. aureus* um das 4-fache. Allerdings kann bereits bei der kleinsten TisB-Konzentration von 2 µg/ml eine deutliche Steigerung der entstandenen Biomasse beobachtet werden, die bis zur höchsten getesteten Konzentration von 64 µg/ml noch zunimmt. Um den Mechanismus von TisB aufzuklären und sicher zu stellen, dass TisB nicht mit Membranrezeptoren interagiert sondern rein physisch auf die Bakterien wirkt, wurde ein Derivat von TisB synthetisiert, das rein aus *D*-Aminosäuren aufgebaut ist. Dieses Molekül sollte nicht in der Lage sein, an einen Rezeptor zu binden. Wirkt TisB hingegen rein mechanisch auf die Zellmembran sollte dieses *D*-TisB genauso wirken wie der Wildtyp *L*-TisB. Auch dies wurde mit Hilfe von Kristallviolett getestet und in Abbildung 21 gezeigt. Vergleicht man die Abbildungen 19 und 20, kann kaum einen Unterschied erkannt werden.





**Abbildung 21** Kristallviolett mit *D*-TisB-behandelten Bakterien. Die Stämme *E. coli* (A) und *S. aureus* (B) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen *D*-TisB behandelt und für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Inokuliert wurde in Mikrotiterplatten mit 5\*10<sup>7</sup> KbE/ml.

Das *D*-Aminosäuren Derivat von TisB induziert Biofilme und zeigt grundsätzlich denselben Effekt wie *L*-TisB. Die Steigerung hier beträgt bei der maximalen Peptidkonzentration von 64 µg/ml bei *E. coli* 8- und bei *S. aureus* 6-fach. Auch hier beginnt die Steigerung der Biomasse bereits bei 2 µg/ml TisB. Dies bedeutet, es ist nicht möglich, dass TisB an eine Rezeptorstelle bindet, um das Membranpotential zu stören, sondern selbst einen Protonenpfad bildet. Im Folgenden stellt sich nun die Frage nach der Struktur von TisB in der Zellmembran. Wie man Kapitel 1.3.2 entnehmen kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass TisB ein antiparalleles Dimer bildet, das durch einen sogenannten „charge-zipper“ (deutsch: „Reißverschluss“) stabilisiert wird, also sich die entgegengesetzten Ladungen der Aminosäureseitenketten anziehen und so einen Pfad bilden (siehe Abbildung 4). Um die Bildung des charge-zipper-Motivs zu beweisen, wurden 4 weitere Derivate von TisB synthetisiert. Tabelle 3 und Abbildung 21 zeigen diese Derivate. Hierbei wurden in der TisB-Sequenz die Ladungen ausgetauscht. Einerseits wurden zwei Derivate so verändert, dass die Bildung des antiparallelen Dimers durch Ladungsabstoßung inhibiert wird (**D5K/K12D** und **D22K/K26D**). Die anderen beiden Derivate wurden so gewählt, dass sich die komplette Ladung austauscht und das Dimer begünstigt wird (**K12D/D22K** und **D5K/K12D D22K/K26D**).

**Tabelle 3** TisB Ladungsderivate mit Angabe der möglichen Funktionsaktivität.

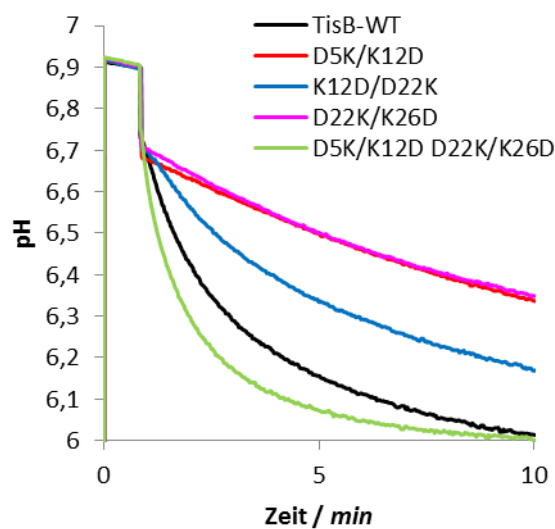
Peptid	Aminosäuresequenz	Funktion
TisB-WT	MNLV <b>D</b> IAILIL <b>K</b> LIVAALQLL <b>D</b> AVL <b>K</b> YL <b>K</b>	Volle Aktivität
<b>D5K/K12D</b>	MNLV <b>K</b> IAILIL <b>D</b> LIVAALQLL <b>D</b> AVL <b>K</b> YL <b>K</b>	Reduzierte Aktivität
<b>D22K/K26D</b>	MNLV <b>D</b> IAILIL <b>K</b> LIVAALQLL <b>K</b> AVL <b>D</b> YL <b>K</b>	Reduzierte Aktivität
<b>K12D/D22K</b>	MNLV <b>D</b> IAILIL <b>D</b> LIVAALQLL <b>K</b> AVL <b>K</b> YL <b>K</b>	Mögliche Aktivität
<b>D5K/K12D D22K/K26D</b>	MNLV <b>K</b> IAILIL <b>D</b> LIVAALQLL <b>K</b> AVL <b>D</b> YL <b>K</b>	Mögliche Aktivität

Um Tabelle 3 noch einmal zu veranschaulichen, werden die potentiellen Dimere und der Wildtyp von TisB mit ihren Salzbrücken in der nächsten Abbildung dargestellt.



**Abbildung 22** Darstellung der möglichen antiparallelen Dimere gebildet aus (A) TisB-WT, (B) **D5K/K12D**, (C) **D22K/K26D**, (D) **K12D/D22K** und (E) **D5K/K12D D22K/K26D**. Eingezeichnet sind mögliche stabilisierende Salzbrücken (Pfeile) oder Abstoßungskräfte (Halbkreise) aufgrund gleicher Ladung.

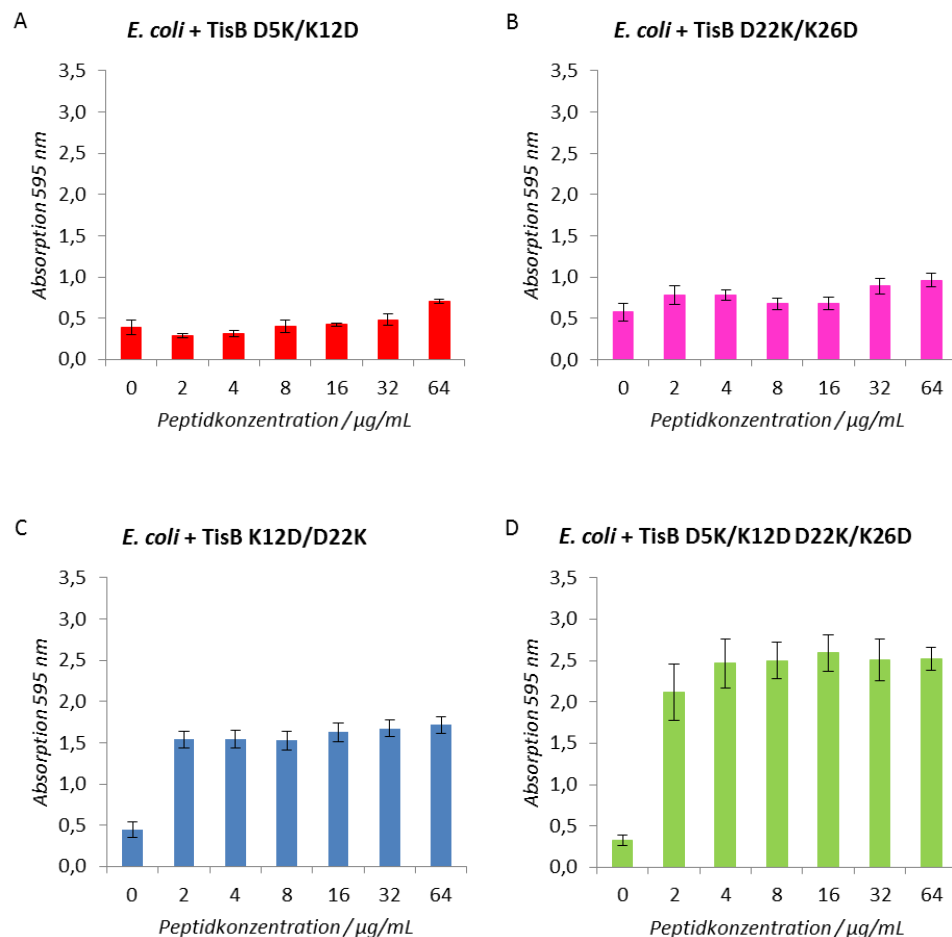
Es wird nun angenommen, dass die Peptide, die in der Dimerbildung gestört sind, ein geringeres Aktivitätspotential haben als die Peptide mit begünstigter Dimerbildung. Mit diesen Peptiden wurde zunächst in einem pH Leakage Experiment mit Lipid-Vesikeln versucht zu zeigen, wie stark das Membranpotential in Modelmembranen beeinflusst wird (Zimpfer, 2015). Dieses Experiment ist in Abbildung 23 gezeigt.



**Abbildung 23** Leakage Experiment mit Vesikeln aus POPC/PG (7:3). Verwendet wurden Peptidkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$ , eine Lipidkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  und ein Peptid-Lipid-Verhältnis von 1:40. Entnommen aus (Zimpfer, 2015).

Den Leakage-Experimenten ist zu entnehmen, dass die beiden Peptide **D5K/K12D** und **D22K/K26D** einen verminderten Effekt zeigen und dass der an die Vesikel angelegte Protonengradient weniger gestört wird als mit dem Wildtyp und den Peptiden **K12D/D22K** und **D5K/K12D D22K/K26D**. Methoden, wie das Leakage-Experiment zeigen jedoch nur das Verhalten der Peptide in Modelmembranen, welche nicht die wirkliche Zusammensetzung von beispielsweise bakteriellen Membranen widerspiegeln können. Dieses Experiment gibt einen ersten Hinweis auf die Bestätigung der in Tabelle 3 aufgestellten Hypothese über die Aktivität

der TisB-Derivate. Im weiteren Verlauf werden die Peptide mit Hilfe der Kristallviolett Methode an realen bakteriellen Membranen getestet, wie auch bereits mit TisB-WT gezeigt.

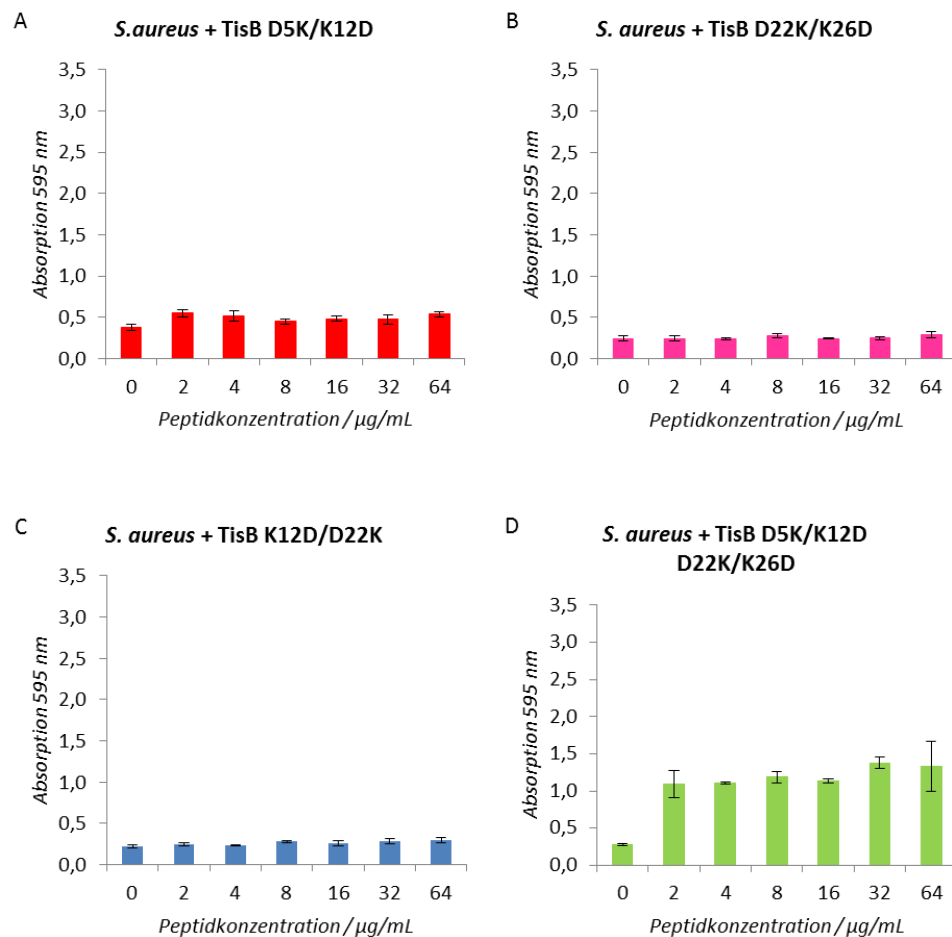


**Abbildung 24** *E. coli* K12 behandelt mit den TisB Derivaten. Die Bakterien wurden für 24 h, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert mit (A) TisB D5K/K12D, (B) TisB D22K/K26D, (C) TisB K12D/D22K und (D) TisB D5K/K12D D22K/K26D. Inokuliert wurde mit 5\*10<sup>7</sup> KbE/ml in LB Luria.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der TisB Derivate mit *E. coli*. Mit allen Peptiden kann ein Anstieg der Biomasse beobachtet werden und zwar in einem ähnlichen Verhältnis zu den Ergebnissen der pH Messungen. Ein kleiner Anstieg der Biomasse kann auch bei den beiden Peptiden beobachtet werden, bei denen sich der charge-zipper nicht formen kann.

## Konzentrationsabhängige Biofilminduzierung und Steigerung von Biomasse

Jedoch zeigen auch diese beiden Peptide einen Effekt auf den Protonengradient des Vesikel-Leakage. Demnach scheint diese Beobachtung erklärbar. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse mit *S. aureus* gezeigt.



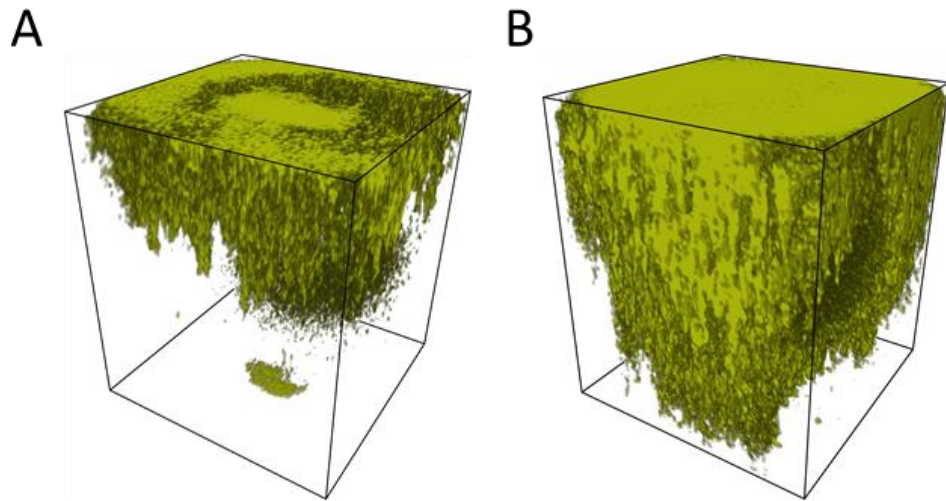
**Abbildung 25** *S. aureus* behandelt mit den TisB Derivaten. Die Bakterien wurden für 24 h, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert mit (A) TisB D5K/K12D, (B) TisB D22K/K26D, (C) TisB K12D/D22K und (D) TisB D5K/K12D D22K/K26D. Inokuliert wurde mit 5\*10<sup>7</sup> KbE/ml in LB Luria.

Die Biomassesteigerung des D5K/K12D D22K/K26D Derivat, in Abbildung 25, ist fast so hoch wie mit dem Wildtyp oder dem D-Aminosäuren Derivat von TisB. Während D5K/K12D und D22K/K26D wie erwartet keine Aktivität zeigen, zeigt auch das Peptid K12D/D22K kaum Aktivität. Während bei *E.coli* und diesem Derivat noch ein ähnlicher Anstieg wie bei TisB-WT zu sehen ist, kann bei *S. aureus* kaum noch eine

Steigerung erkannt werden, aber auch hier sollte die Funktion jedoch wieder hergestellt sein. Allgemein kann man aus den Intensitäten der Färbung der Abbildungen 20 und 21 bereits entnehmen, dass *S. aureus* nicht so stark auf die TisB Wirkung reagiert wie *E. coli*. Bisher zeigte dieser Stamm zwar einen ähnlich starken Anstieg bei 2 µg/ml TisB, jedoch insgesamt scheint der Einfluss der Peptide geringer zu sein. Die Wirkung ist hier verzögert, was auch bei späteren Untersuchungen an der Sekretion der Bakterien in Kapitel 5.1.1 nochmals beobachtet wird. Das Peptid **K12D/D22K** scheint in seiner vollständigen Funktion behindert, wie auch unterstützend in den Leakage-Experimenten gezeigt werden konnte. Deutlich sichtbar ist dieser Effekt nun bei den Ergebnissen mit *S. aureus*. Die Ergebnisse aus den biophysikalischen Vorversuchen mit den Modellmembranen unterstützen die Ergebnisse in realen bakteriellen Membranen. Es kann hieraus geschlossen werden, dass die Hypothese der Bildung eines antiparallelen Dimers bestätigt ist.

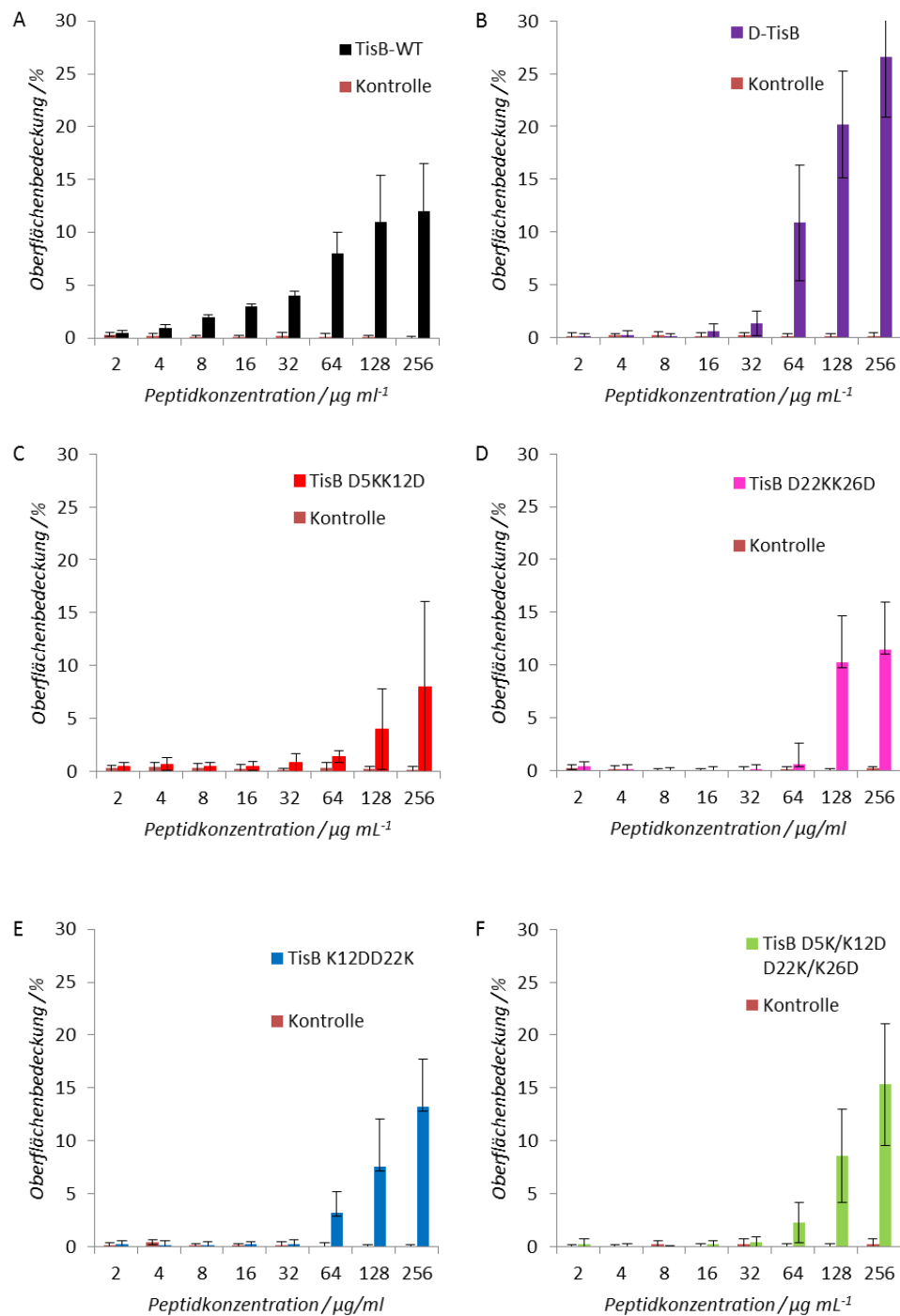
#### **4.1.2 Optische Kohärenztomographie – Quantifizierung der jungen Biofilmmassesteigerung durch TisB**

Die optische Kohärenztomographie (aus dem Englischen „Optical coherence tomography“, OCT) wurde hier verwendet um eine Alternative zur Biomassequantifizierung mit Kristallviolett zu haben. Hierbei wurden jedoch nicht 24 h inkubierte Proben, sondern die initiale Wirkung von TisB auf die Bakterien untersucht. Die Bakterien wurden nur 1 h mit den Peptiden inkubiert. In der folgenden Abbildung wird gezeigt wie die aggregierten Zellen von *P. aeruginosa* in der Mikrotiterplatte aussehen und wie diese Methode die Proben darstellt. Die Ergebnisse dieses Stammes werden jedoch im weiteren Verlauf nicht diskutiert, da man sich weiterhin auf die Stämme *E.coli* als Ursprung und *S. aureus* als grampositives Bakterium konzentrieren will.



**Abbildung 26** OCT Auswertung von *P. aeruginosa* Proben, behandelt mit (A) 64 µg/ml und (B) 256 µg/ml TisB-WT. Das Volumen der analysierten Proben beträgt hier in etwa 6,6 mm<sup>3</sup> und befindet sich an der Grenze von Medium zu Luft. Mit grüner Farbe sind die bereits verklumpten Zellen an der Oberfläche des Mediums zu sehen.

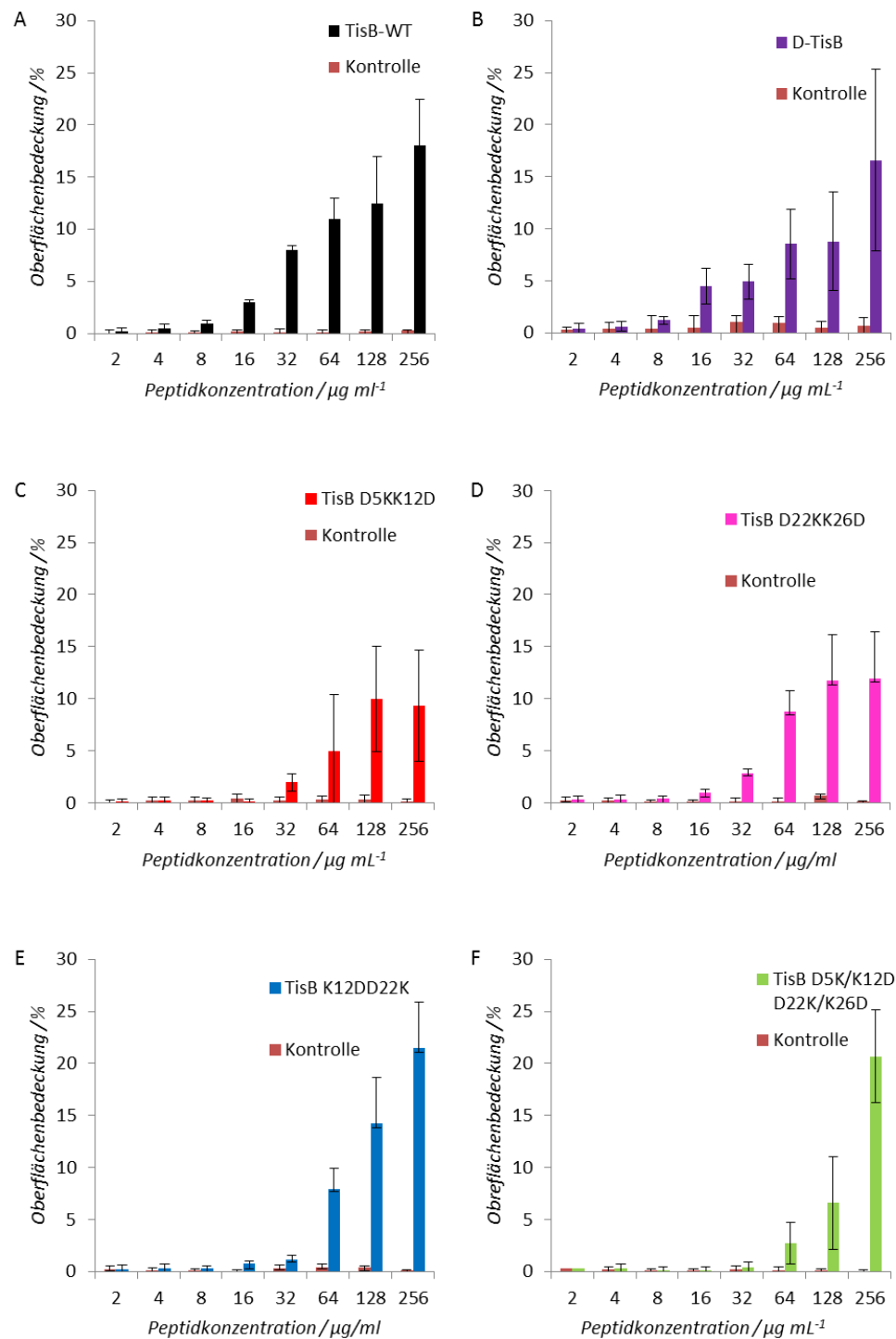
Diese Methode eignet sich besonders gut für die Proben mit TisB. Hier haben Beobachtungen gezeigt, dass die Bakterien zunächst in der Lösung aggregieren und dann auf den Boden zu sinken scheinen. Daher ist nach der ersten Stunde die meiste Biomasse an der Grenzfläche des Mediums zur Luft und nicht am Boden zu finden. Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Michael Wagner am Engler-Bunte-Instituts des KIT entwickelt und durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 27 gezeigt. Hier werden der Wildtyp, das *D*-Aminosäure Derivat und die Ladungsderivate von TisB zusammen gezeigt. Die Stammlösungen der Peptide wurden in 50%igen Ethanol hergestellt. Daher besitzen alle Verdünnungsstufen einen unterschiedlichen prozentualen Ethanolgehalt korrelierend zu der Peptidkonzentration in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten. Die Kontrollen wurden entsprechend hergestellt, mit dem gleichen Ethanolgehalt, aber ohne TisB. Daher sind die Proben der Kontrollen auch entsprechend der Peptidkonzentrationen in den Abbildungen 26 und 27 aufgetragen und nicht als Peptidkonzentration von 0 µg/ml angegeben.



**Abbildung 27** OCT mit allen TisB Derivaten und *E. coli*. Die Bakterien wurden 1 h mit den Peptiden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und dann vermessen. (A) zeigt TisB-WT, (B) *D*-TisB, (C) *D5K/K12D*, (D) *D22K/K26D*, (E) *K12D/D22K* und (F) *D5K/K12D D22K/K26D*. Zusätzlich ist in jedem Diagramm die dazugehörige Kontrolle ohne Peptid gezeigt, die parallel auf derselben Mikrotiterplatte inkubiert wurde. Inkubiert wurde in LB Luria.



Abbildung 27 zeigt alle OCT Messungen mit *E. coli*. Die Ergebnisse präsentieren eine große Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Kristallviolett-färbungen. TisB-WT, das *D*-Derivat und auch das Peptid **D5K/K12D D22K/K26D** besitzen die größte Wirkung auf die Bakterien. Es gibt jedoch auch eine Aggregationstendenz bei den beiden Peptiden die keine Biofilme induzieren sollten. Der Effekt fällt bei diesen beiden Peptiden jedoch geringer aus als bei den Peptiden mit möglicher Dimerbildung. Interessanterweise ändert sich bei dieser Methode der Verlauf der Kurven. Während bei TisB-WT, ähnlich wie bei den Kristallviolettergebnissen, eine konzentrationsabhängige Steigerung der Masse ab der niedrigsten Peptidkonzentration zu erkennen ist, ändert sich dies bei der OCT. Der Schwellenwert verschiebt sich hier zu 64 µg/ml bei den Peptiden mit möglicher Dimerbildung und 128 µg/ml bei den Peptiden, die keinen erwarteten Effekt zeigen sollten. Möglicherweise ist hierfür die Änderung der Inkubationszeit von 24 h auf 1 h der Grund. Die gleichen Beobachtungen können in Abbildung 28 für die Messungen mit *S. aureus* gemacht werden.



**Abbildung 28** OCT mit allen TisB Derivaten und *S. aureus*. Die Bakterien wurden 1 h mit den Peptiden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und dann vermessen. (A) zeigt TisB-WT, (B) *D*-TisB, (C) *D5K/K12D*, (D) *D22K/K26D*, (E) *K12D/D22K* und (F) *D5K/K12D D22K/K26D*. Zusätzlich ist in jedem Diagramm die dazugehörige Kontrolle ohne Peptid gezeigt, die parallel auf derselben Mikrotiterplatte inkubiert wurde. Inkubiert wurde in LB Medium (Luria).

Um die maximalen Werte der verschiedenen Proben zu verdeutlichen, wurde Tabelle 4 erstellt.

**Tabelle 4** Werte der Oberflächenbedeckung der OCT Messungen bei 256 µg/ml Peptidkonzentration und beiden getesteten Stämmen.

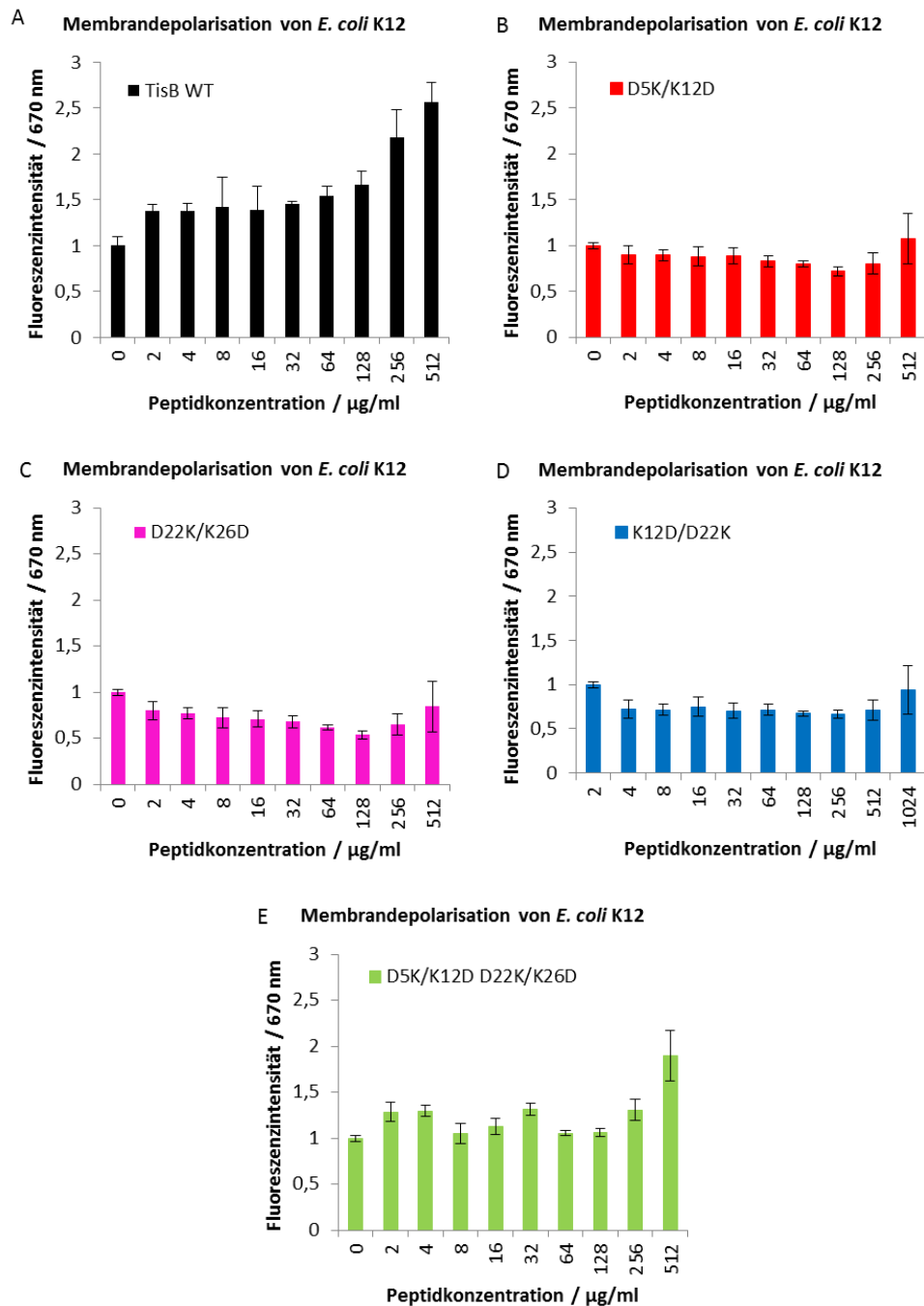
Peptid	Oberflächenbedeckung bei 256 µg/ml Peptid und <i>E. coli</i> [%]	Oberflächenbedeckung bei 256 µg/ml Peptid und <i>S.aureus</i> [%]
TisB-WT	12	18
<i>D</i> -TisB	27	17
D5K/K12D	8	9
D22K/K26D	11	12
K12D/D22K	13	21
D5K/K12D D22K/K26D	15	20

Vergleicht man die Werte der Oberflächenbedeckung der höchsten Peptidkonzentration von 256 µg/ml, kann man bei den TisB Derivaten einen Verlauf vom schwächsten Peptid D5K/K12D hin zum aktivsten Peptid D5K/K12D D22K/K26D erkennen. Bei den *S. aureus* Proben sind die Ergebnisse des Peptid K12D/D22K kontrovers, denn hier zeigen sie nun den höchsten Wert im Gegensatz zu den 24 h inkubierten Proben bei den Kristallviolettversuchen. Einzig das Peptid D5K/K12D hat durchweg weniger Aktivität gezeigt. Die Ergebnisse der OCT-Methode lassen einen initialen Einfluss aller Peptide auf die Bakterien erscheinen, jedoch eine definitive verminderte Wirkung des Peptids D5K/K12D und eine vergleichbare starke Wirkung der Peptide TisB-WT, *D*-TisB und D5K/K12D D22K/K26D.

#### 4.1.3 Untersuchung des Effekts von TisB an der bakteriellen Membranpolarisation

Die Wirkung von TisB auf Membranen ist eine elektrostatische Wirkung. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 und 1.3.2 beschrieben, stört TisB durch die Bildung eines Protonenpfades den Protonengradienten von biologischen Membranen. Dies soll nun auch mittels Untersuchungen an der Membranpolarisation gezeigt werden. TisB soll hier eine gezielte Depolarisierung der Membran hervorrufen. Als Teststamm wird hier wiederum *E. coli* verwendet. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Singapore Centre on Environmental Life Science Engineering (SCELS) in Singapur durchgeführt. Um die Depolarisation der Zellmembran durch die Peptide sichtbar zu machen, wird hierbei ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff namens DiSC3 (3,3'-Diethylthiodicarbocyaniniodid) verwendet. Dieser Farbstoff wird angeregt bei 620 nm und die Emission liegt bei 670 nm. Er akkumuliert an hyperpolarisierten Membranen (Mohanram, 2014). Der Versuch wurde mit unterschiedlicher Konzentration an TisB durchgeführt und die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse. Die Membranpolarisation wird deutlich gestört von TisB-WT. Hier lassen die Ergebnisse wieder einen konzentrationsabhängigen Verlauf beobachten beginnend von der geringsten Peptidkonzentration. Die Peptide **D5K/K12D**, **D22K/K26D** und **K12D/D22K** zeigen im Vergleich zur Kontrolle bei 0 µg/ml Peptid kaum bis gar keinen Effekt. Einzig das Peptid **D5K/K12D D22K/K26D** stört wiederum das Membranpotential.

# Untersuchung des Effekts von TisB an der bakteriellen Membranpolarisation



**Abbildung 29** Ergebnisse der Membrandepolarisation durch die TisB Derivate und *E.coli*. Die Ergebnisse verdeutlichen den sofortigen Effekt der Peptide (A) *L*-TisB (WT), (B) **D5K/K12D**, (C) **D22K/K26D**, (D) **K12D/D22K** und (E) **D5K/K12D D22K/K26D** auf *E. coli*. Verwendet wurde hier der Farbstoff DiSC3 und LB Luria.

Um die Ergebnisse dieses Tests noch einmal zu verdeutlichen wurde eine Tabelle mit den maximalen Absorptionswerten bei der höchsten

## Untersuchung des Effekts von TisB an der bakteriellen Membranpolarisation

Peptidkonzentration zusammengestellt. Tabelle 5 zeigt, dass eine Membrandepolarisation nur bei zwei Peptiden auftritt (positive Absorptionswerte) und zwar dem Wildtyp von TisB und dem Derivat mit kompletten Ladungsaustausch, **D5K/K12D D22K/K26D**.

**Tabelle 5** Absorptionswerte bei 670 nm und der höchsten Peptidkonzentration aus den Ergebnissen der Membranpolarisation.

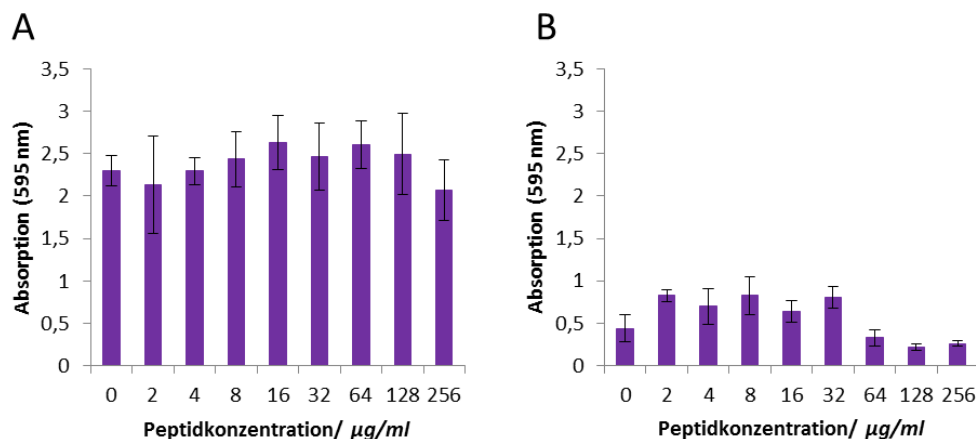
Peptid	Absorption bei 670 nm und bei 512 µg/ml Peptidkonzentration
TisB-WT	+1,5
<b>D5K/K12D</b>	0
<b>D22K/K26D</b>	-0,2
<b>K12D/D22K</b>	-0,1
<b>D5K/K12D D22K/K26D</b>	+0,9

Beide Peptide zeigen auch in den Kristallviolett-färbungen und in der OCT die höchste Biofilminduktion und sind in der Lage das Dimer zu bilden. Sie sollen somit gleich funktionell sein. Überraschenderweise zeigt das Peptid TisB **K12D/D22K** mit dieser Methode keine Aktivität. Im Leakage Experiment ist es jedoch auch weniger aktiv im Vergleich zum Wildtyp (Zimpfer, 2015). Da im Falle dieses Tests jedoch der unmittelbare Einfluss von den Peptiden gezeigt wird, ist es möglich, dass die Wirkung dieses TisB-Derivates langsamer stattfindet und man daher hier keine Depolarisation sehen kann. Die beiden anderen Peptide TisB **D5K/K12D** und **D22K/K26D** können das antiparallele Dimer nicht mehr bilden und zeigen hiermit, wie erwartet, keine Wirkung auf die Membranpolarisation.

#### 4.1.4 Die Wirkung von TisB auf anaerobe Bakterien

Zusätzlich zu den Stämmen *E. coli* und *S. aureus* wurden in der Zusammenarbeit mit dem SCELSE noch der obligat anaerobe Stamm *Clostridium beijerickii* und fakultativ anaerobe Stamm *Zymomonas mobilis* untersucht. Beide Stämme werden in der Biotechnologie zur Herstellung von Ethanol verwendet, da sie eine höhere Toleranz gegenüber Alkohol als zum Beispiel Hefen zeigen. Damit eignen sie sich besser zur Ethanolherstellung als Hefen und ermöglichen höhere Ausbeuten an Produkt. Während *C. beijerickii* nur einen anaeroben Stoffwechsel betreibt und die oxidative Phosphorylierung nicht durchführt, besitzt *Z. mobilis* diese Fähigkeit. Jedoch ist es bisher noch nicht klar, zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Bedingungen dieser Stamm auf diese Art des Stoffwechsels zurückgreift. Es ist bekannt, dass *Z. mobilis* bei Anwesenheit von genügend Zucker eher bei der anaeroben substratspezifischen Phosphorylierung von Zuckern bleibt, selbst bei Anwesenheit von Sauerstoff. Darüber hinaus verlangsamt sich sein Stoffwechsel eher noch bei einem Überschuss von Sauerstoff (Toh et al., 1997). Beide Stämme sind daher nicht auf den Erhalt des Protonengradienten zur Energiegewinnung angewiesen. Hier soll nun der Effekt von TisB untersucht werden. Zunächst wurde unter aeroben Bedingungen der Stamm *Z. mobilis* untersucht. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit *E. coli* oder *S. aureus* kann eindeutig aus Abbildung 30 entnommen werden, dass TisB keinen signifikanten Effekt auf die Biofilmbildung von *Z. mobilis* hat, obwohl der Versuch im aeroben durchgeführt wurde. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Z. mobilis* tatsächlich nicht auf die oxidative Phosphorylierung zurück greift und durch die ausreichende Zugabe von Glukose bei einem anaeroben Stoffwechsel bleibt. Es wurde auch versucht, auf ein anderes Medium zu wechseln, doch auch ein geringerer Anteil an Glukose im Medium beeinflusst hier die TisB Wirkung nicht (B). Es wurde sogar eine Verschlechterung der Biofilmbildung beobachtet, was auf die geringe Glukosekonzentration des Mediums zurückgeführt werden kann. Einen Anstieg der Biomasse mit der TisB-Konzentration oder auch nur ein

deutlicher Unterschied zur Kontrolle ohne Peptidzugabe kann in Abbildung 29 nicht beobachtet werden.

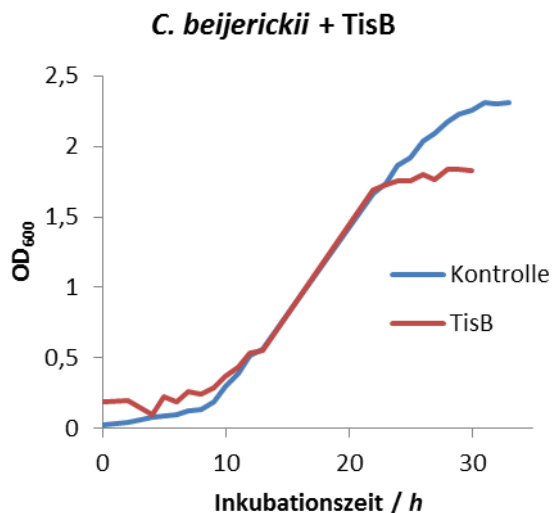


**Abbildung 30** Untersuchung der Biofilminduktion von TisB mit *Z. mobilis*. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von TisB mit den Bakterien ( $OD_{550nm}$  0,1) bei 37°C für 24 h in **LB Medium + 20 mg/l Glukose (A)** und **TSB Medium + 5 mg/l Glukose (B)** inkubiert. Das LB-Medium (A) wird von der DSMZ für *Z. mobilis* empfohlen.

Im nächsten Versuch wurde TisB zu *C. beijerickii* hinzugegeben. Da dieser Versuch anaerob verlaufen musste, konnte nur eine Konzentration an TisB verwendet werden (128 µg/ml). Diese Konzentration zeigte bei allen bisherigen Versuchen auf fakultativ anaerobe Bakterien (außer *Z. mobilis*) eine Wirkung und wurde deshalb für diesen Versuch gewählt. Außerdem konnte durch den anaeroben Versuchsaufbau keine Kristallviolett-färbung in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, sondern die Bakterien wurden in Kulturkölbchen unter Ausschluss von Sauerstoff inkubiert und das Wachstum über das Messen der optischen Dichte bestimmt. Nach der Inkubation mit TisB wurde eine Änderung des Wachstums erwartet, d.h. das planktonische Wachstum ändert sich in ein oberflächenassoziiertes Biofilmwachstum. Um auszuschließen, dass sich nur Zellaggregate im Medium wie bei den OCT Versuchen bilden, wurde eine lange Inkubationszeit von 33 h gewählt. Abbildung 31 zeigt die Wachstumskurve von *C. beijerickii* mit (rot) und ohne (blau) TisB Zugabe. Es kann in Abbildung 30 kein signifikanter Unterschied zwischen den

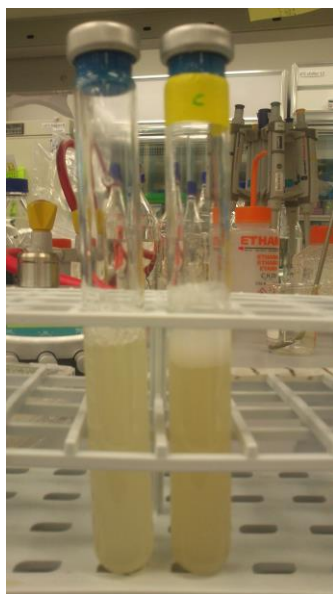


beiden Ansätzen während der 33-stündigen Inkubation beobachtet werden.



**Abbildung 31** Wachstumskurve von *C. beijerickii* inkubiert mit 128 µg/ml TisB. Die Bakterien wurden bei 37°C und Schütteln in RCM Medium inkubiert (Yerushalmi et al., 1985). Die Messpunkte wurden bei OD<sub>600nm</sub> aufgenommen. Die blaue Kurve zeigt die Kontrolle ohne Peptid, die rote Kurve mit TisB.

Gegen Ende ist die Bakterienzahl mit TisB in der stationären Phase sogar kleiner als in der Kontrolle und wird auch früher erreicht. Die wichtige exponentielle Phase des Wachstums zeigt keine Unterschiede und es ist nach dem Experiment auch keine Änderung der Wachstumsform in den Teströhrchen zu sehen (Abbildung 32).



**Abbildung 32** Teströhrchen des *C. beijerickii* Versuchs. TisB wurde mit den Bakterien für 33 h bei 37°C anaerob inkubiert. Das linke Röhrchen ist die Inkubation mit TisB, das rechte mit „c“ markierte Röhrchen zeigt die Kontrolle ohne TisB. Es gibt keinen eindeutigen Unterschied zwischen den beiden Versuchsansätzen.

#### 4.1.5 Transkriptomanalyse

Um die Regulationsmechanismen der Bakterien auf die Einwirkung von TisB zu untersuchen, wurden 4 verschiedene Stämme mittels einer Transkriptomanalyse untersucht. Dabei wurde auch hier die initiale Wirkung untersucht. Die Bakterien wurden in LB-Luria mit und ohne TisB für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und angereichert. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse aller 4 Stämme gezeigt. Hierbei wurden der grampositive Stamm *S. aureus* gewählt und als gramnegative Stämme der ursprüngliche Stamm *E. coli*, der exoelektrogene Stamm *S. oneidensis* und der biofilmbildende Stamm *P. aeruginosa*. Die Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit dem Institut für Angewandte Biowissenschaften und der Gruppe von Herrn Prof. Johannes Gescher und dem Institut für Funktionelle Grenzflächen mit Herrn Dr. Andreas Dötsch durchgeführt. Sequenziert wurden die Proben am Institut für Toxikologie und Genetik bei Herrn Dr. Olivier Armant. Die Ergebnisse der TisB-behandelten Proben und der unbehandelten Proben wurden miteinander verglichen und darauf untersucht, welche Gene herauf- oder herunterreguliert sind. Der Wert  $\log_2fc$  zeigt die Änderung der Expression eines Gens im Verhältnis zwischen den Proben mit TisB-Zugabe und der Kontrolle (im zweifachen Logarithmus). Liegt der  $\log_2fc$  dabei bei +1 oder höher, ist das entsprechende Gen heraufreguliert. Liegt der  $\log_2fc$  bei -1 oder niedriger, ist das entsprechende Gen herunterreguliert (siehe Anhang B). Der entsprechende p-Wert gibt die Varianz des Ergebnisses an und wurde als signifikant erachtet bei einem Wert von kleiner gleich 0,05.

**Tabelle 6** Zusammenfassung der Transkriptomanalyse. Angegeben ist die Anzahl der herauf- und herunterregulierten Gene aller vier bakteriellen Stämme nach Behandlung mit TisB.

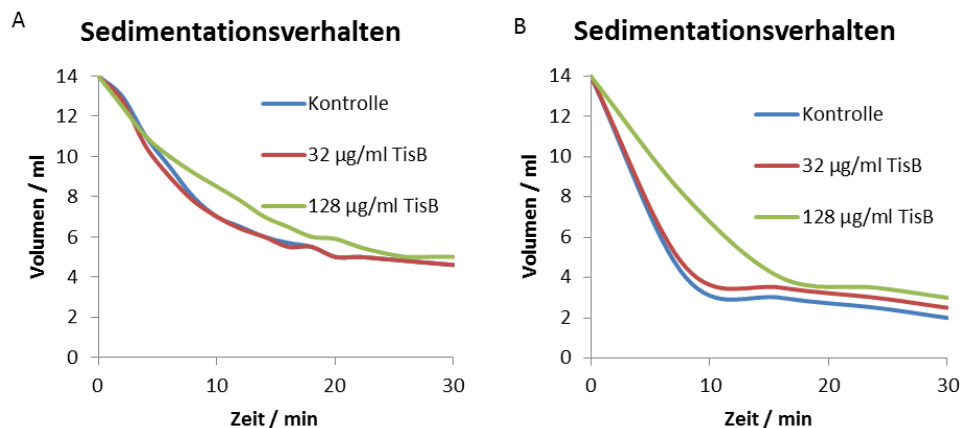
Spezies	Heraufregulierte Gene	Herunterregulierte Gene	Summe
<i>E. coli</i>	14	3	17
<i>S. aureus</i>	0	1	1
<i>S. oneidensis</i>	16	1	17
<i>P. aeruginosa</i>	170	457	627

Die einzelnen Ergebnisse der Stämme mit den genauen Angaben der Gene finden sich im Anhang B. Auffallend ist die große Anzahl an beeinflussten Genen bei *P. aeruginosa*. Höchstwahrscheinlich rührt dies aus dem Umstand, dass bei diesem Stamm die mRNA nicht angereichert wurde und daher ein großer Anteil 16S rRNA in den Proben anwesend war. Dies stellt ein großes Problem in der Datenauswertung dar. Die Ergebnisse müssen zunächst reproduziert werden, um über die genaue Anzahl der regulierten Gene sicher zu sein. Deshalb werden sie nun nicht weiter diskutiert, werden aber trotzdem im Anhang mit dargestellt. Die Ergebnisse von *E. coli* und *S. oneidensis* zeigen mehrere Regulationen auf genetischer Ebene und eher eine erhöhte Aktivität und Heraufregulation. Bemerkenswert ist das Ergebnis der *S. aureus* Proben. Hier wurde genau ein Gen herunterreguliert und spiegelt daher am besten den initialen Einfluss von TisB auf den Stoffwechsel der Bakterien wider. Nach nur einer Stunde Inkubation ist ein solches Ergebnis sehr interessant und hat eine hohe Aussagekraft über die Wirkung von TisB.

### **4.1.6 Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm**

TisB könnte eine mögliche Anwendung in der Abwasserkontrolle haben, da hier große Mengen an aggregierter Biomasse erwünscht sind. Der sogenannte Klärschlamm ist essentiell für die Umsetzung der Schadstoffe im Abwasser, um am Ende wieder trinkbares Wasser zu erhalten. Man will hier zeigen, welchen Effekt ein biofilminduzierendes Peptid wie TisB haben könnte und ob es eine Erhöhung der Biomasse ermöglicht. Dieser Vorgang benötigt in künstlichen Reaktoren normalerweise Wochen. Dabei wird der Schlamm ständig mit Luft umgewälzt und der pH auf 7 gehalten. Die folgenden Ergebnisse wurden am SCELSE in Singapur erhalten, das einen engen Kontakt zur Abwasserwirtschaft pflegt. Zunächst wurde in kleinem Maßstab die Wirkungskonzentration von TisB ermittelt, die Absetzungsrate und die Biomasse bestimmt.

## Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm

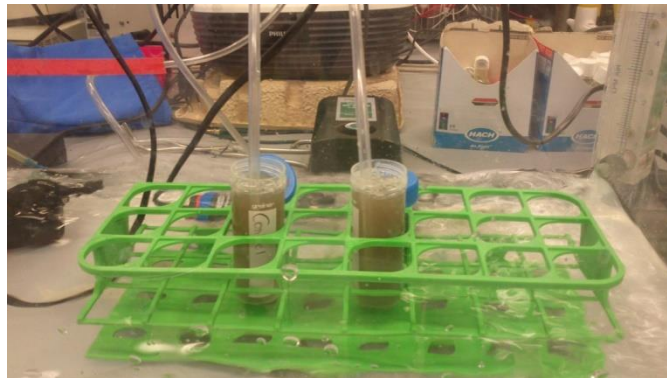


**Abbildung 33** Überprüfung des Sedimentationsverhaltens von Klärschlamm nach Inkubation mit TisB. Es wurden 2 Versuche an unterschiedlichen Tagen (A und B) angesetzt, um den Effekt von zwei unterschiedlichen Konzentrationen *L*-TisB (32 und 128 µg/ml Peptid) zu untersuchen. Inkubiert wurde unter Schütteln und Raumtemperatur für 24 h. Danach wurde direkt das Sedimentationsverhalten in 15 ml Plastikgefäßen untersucht.

In Abbildung 33 ist das Sedimentationsverhalten (innerhalb von 30 min) der Proben nach einer 24-stündigen Inkubation des Klärschlammes mit TisB gezeigt. Es wurden 2 unterschiedliche Peptidkonzentrationen hinzugegeben und mit einer Kontrolle ohne Peptid verglichen. In diesen Vorversuchen wurden die Parameter wie aerobe und anaerobe Phase des Schlammzyklus nicht kontrolliert, nur die Ernährung des Klärschlammes wurde durch Zugabe von Klärwasser sichergestellt. Die Ansätze wurden an unterschiedlichen Tagen vorbereitet und inkubiert. Die Kontrolle und die Inkubation mit 32 µg/ml TisB zeigen das gleiche Ergebnis. Diese Peptidkonzentration ist nicht ausreichend um Einfluss auf den Klärschlamm zu nehmen. Mit 128 µg/ml TisB jedoch, kann man eine Verlangsamung der Sedimentation erkennen. Zusätzlich wurde hier auch die Biomasse am Ende mittels Gravimetrie untersucht. Beide Ansätze zeigen mit 128 µg/ml Peptid eine Steigerung um etwa 37% und einer Erhöhung des SVI von 3,0 ml/g bei der Kontrolle zu 3,4 ml/g bei 128 µg/ml TisB. Da nun klar ist, dass ab 128 µg/ml TisB eine Wirkung auf den Schlamm gezeigt werden kann, wurde ein Experiment in größerem Maßstab angesetzt. Hierbei wurde ein größeres Volumen gewählt und auch die Parameter anaerobe, aerobe Phase des Klärschlammes und pH-

## Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm

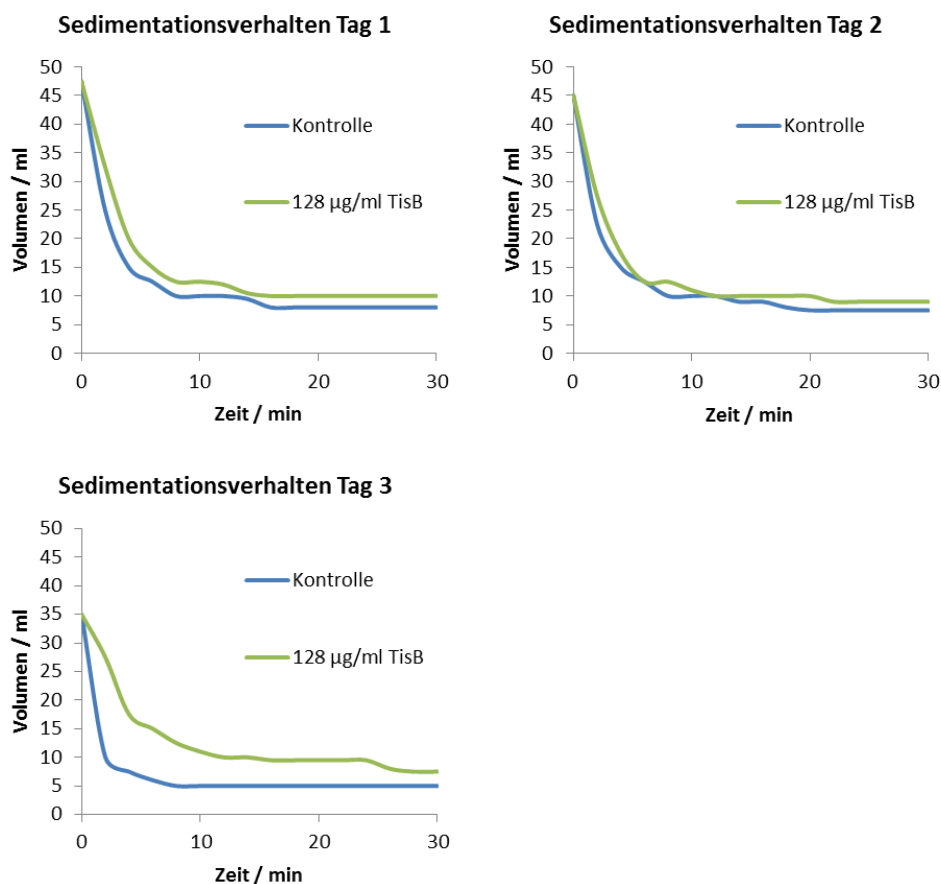
Wert kontrolliert und reguliert. Der experimentelle Aufbau wird in Abbildung 34 gezeigt.



**Abbildung 34** Experimenteller Aufbau des Klärschlammexperiments über 3 Tage mit TisB. Gezeigt ist der Aufbau an Tag 1, direkt nach Beginn der Inkubation. Das linke Plastikgefäß zeigt die Kontrolle ohne Peptidzugabe, das rechte Gefäß den Ansatz mit TisB. Über die eingeführten Schläuche werden je nach Bedarf  $N_2$  oder Luft in die Proben geführt. Der ganze Aufbau steht in einem Wasserbad, in dem die Temperatur konstant auf  $30^\circ\text{C}$  gehalten wird.

Nach jedem Zyklus wurde am Ende des Tages das Sedimentationsverhalten des Klärschlammes aufgenommen. Die Ergebnisse hierzu zeigt Abbildung 35.

## Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm

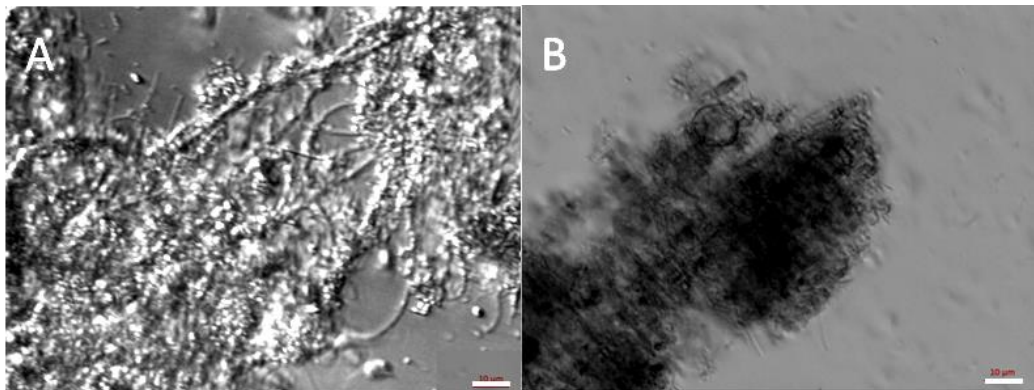


**Abbildung 35** Sedimentationsverhalten der Inkubation mit TisB über 3 Tage. Das Volumen der Ansätze betrug 50 ml und die verwendete Peptidkonzentration 128 µg/ml. Die Proben wurden ständig auf ihren pH-Wert kontrolliert um die Dauer der anaeroben und aeroben Phase zu kontrollieren und dementsprechend wurden die Proben entweder mit N<sub>2</sub> oder Luft umgewälzt. Jeweils nach Beendigung der aeroben Phasen wurde das Sedimentationsverhalten aufgenommen. An Tag 1 und 3 wurde vor Beginn der anaeroben Phase 128 µg/ml TisB hinzugegeben.

Das Sedimentationsverhalten zeigte zunächst nach dem ersten Zyklus mit Zugabe von Peptid eine leichte Verlangsamung, jedoch nicht so signifikant wie in den Vorversuchen. Da dies ein größerer Ansatz war, konnte man eine gleiche Ausprägung des Effekts aber auch nicht erwarten. Überraschenderweise war dieser kleine Effekt aber nach Tag 2 gänzlich verschwunden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde entschlossen an Tag 3 eine weitere Zugabe von 128 µg/ml Peptid vorzunehmen. Daraufhin konnte ein deutlicher Effekt auf das Sedimentationsverhalten des Klärschlammes beobachtet werden. Nach Tag 3 wurde das Experiment

## Die Wirkung von TisB auf Klärschlamm

abgeschlossen und die Proben auf ihre Biomasse und Optik untersucht. Man erhielt eine Biomassesteigerung um 27 % und eine Erhöhung des SVI von 1,9 ml/g in der Kontrolle zu 2,2 ml/g mit Peptidzugabe. Dieser Anstieg ist ein deutliches Anzeichen für eine Veränderung der Probe, d.h. eine Veränderung der Flocken des Klärschlammes. Es wurden Proben auf Objektträger gegeben und an einem Inversmikroskop untersucht. Die Resultate zeigt Abbildung 36.



**Abbildung 36** Mikroskopie der Klärschlammproben. Die Bilder zeigen einzelne Flocken des Schlammes, einmal der Kontrolle ohne Peptid (A) und der TisB-behandelten Proben(B). Aufgenommen wurden die Bilder mit einem Inversmikroskop der Firma Zeiss mit 40-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt in beiden Bildern 10 µm.

Der Unterschied der beiden untersuchten Flocken ist deutlich zu erkennen. Die Kontrolle (A) zeigt einige Filamente und auch Einzeller. Sie ist der Flocke aus Abbildung 18, die eine gesunde Flocke von Belebtschlamm zeigt, sehr ähnlich. Die Flocke ist wesentlich größer und weniger dicht gepackt als die Flocke der TisB-behandelten Proben (B). Hier kann man aufgrund der dichten Packung der Flocke kaum einzelne Zellen erkennen. Insgesamt sind diese Flocken auch weniger groß und zeigen keine Filamente.

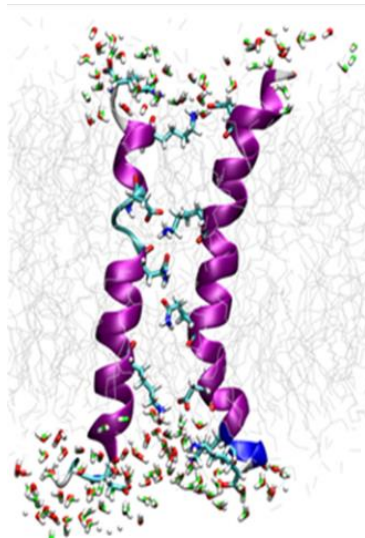
## 4.2 Diskussion

### 4.2.1 Die Wirkung von TisB auf bakterielle Biofilmbildung

Biofilmwachstum zu induzieren kann aus unterschiedlichsten Motiven lohnend sein. Die Katalyse- oder auch Synthesekraft von Bakterien wird in Biofilmen durch die enge, räumliche Nähe effektiver, und die Bakterien werden durch die Ausbildung der Biofilmmatrix widerstandsfähiger gegen äußere Einflüsse. Aus Sicht der Nutzer der Bakterien ist dies eine erwünschte Entwicklung. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Peptid wie TisB eine solche Transformation von planktonischem bakteriellem Wachstum zur Biofilmbildung herbeiführen kann und welche Limitierungen diese Wirkung hat. Aus den Untersuchungen an sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterien kann man schlussfolgern, dass die Beschaffenheit der bakteriellen Membran keinen großen Einfluss auf die Wirksamkeit von TisB hat. Da bei den Versuchen TisB auch nicht in den Zellen exprimiert wurde, wie es das natürlicherweise von *E. coli* wird, sondern von extern zugegeben wurde, scheint die Richtung, von der aus es die Zellmembran angreift, die Aktivität des Peptids nicht zu beeinflussen und damit ist die Symmetrie des antiparallelen Dimers nahe liegend. Der limitierende Faktor für den biotechnologischen Einsatz dieses Peptids scheint der Stoffwechsel der Bakterien zu sein. Obligat anaerobe Bakterien scheinen aufgrund ihres auf der Substratphosphorylierung beruhenden Stoffwechsels nicht auf TisB zu reagieren. Sie sind weitestgehend unabhängig vom Protonengradienten und müssen aufgrund dessen Störung durch TisB nicht mit einem Herunterfahren des Metabolismus reagieren. Daher wird keine Biofilmbildung induziert. Fakultativ anaerobe Bakterien müssen von Fall zu Fall betrachtet werden. Während *Z. mobilis* keine Anstrengung tätigt seinen Stoffwechsel auf die oxidative Phosphorylierung umzustellen solange genügend Substrat anwesend ist, stellen *E. coli* und *S. aureus* ihre Stoffwechsel um. Parallel zu diesen Studien wurde gezeigt, dass *S. oneidensis*, ebenfalls ein fakultativ anaerobes Bakterium, eine Biofilmbildung induziert durch TisB zeigt (Richter, 2014). Dieses Bakterium zeigt jedoch aufgrund seiner



elektronentransportierenden Eigenschaften einen ganz besonderen Stoffwechsel auf. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass die Biomassen der induzierten Biofilme mit der Peptidkonzentration ansteigen und die Biofilmbildung durch TisB-Zugabe mit einer Atmungsabsenkung und Membrandepolarisation korreliert, sodass der Zusammenhang zwischen persistierendem Zustand und Biofilmentwicklung bei *E. coli* und anderen aeroben oder fakultativ anaeroben Bakterien erklärt werden kann. Mittels unterschiedlicher Methoden, wie der Kristallviolett-färbung, der OCT und den Membranpolarisationsstudien konnte gezeigt werden, dass das Austauschen oder die Tilgung der Ladungen der TisB-Sequenz ein Ausbleiben der Funktion zur Folge haben kann. Was beim Betrachten der drei unterschiedlichen Methoden beachtet werden muss, ist die unterschiedliche Inkubationszeit. Während mit Kristallviolett die Peptide 24 h mit den Bakterien inkubiert waren, handelte es sich bei der OCT nur um 1 h und bei den Membranpolarisationsstudien sogar um den unmittelbaren Effekt der Peptide. Durch diesen Unterschied ändern sich in den Ergebnissen der Verlauf der Steigung der Biofilminduktion und der Schwellenwert, ab dem eine Wirkung beobachtet werden kann. Während man bei den Kristallviolettergebnissen einen dramatischen Anstieg schon bei niedrigen Peptidkonzentrationen erkennen kann und die Kurve eine Sättigungskurve darstellt, steigen die Kurven der anderen beiden Methoden langsam an und zeigen ein progressives Wachstum. Es konnte gezeigt werden, dass die TisB Derivate, die keine Ausbildung der Salzbrücken des hypothetischen Dimers mehr zulassen, eine niedrigere Aktivität aufweisen sowohl in ihrem Effekt auf den Protonengradienten als auch auf die Biofilmbildung. Die Hypothese einer Bildung eines antiparallelen Dimers durch die Ausbildung stabilisierender Salzbrücken in einer Art Reißverschluss konnte somit bestätigt werden. Das mögliche Dimer könnte, wie in der Abbildung 37 gezeigt, in der Membran eingebettet sein.



**Abbildung 37** TisB-Dimer in der Membran, stabilisiert durch die Ausbildung von Salzbrücken. Das Dimer bildet einen kleinen Pfad, der den Durchfluss von Protonen ermöglicht (**Steinbrecher et al., 2012**).

Darüber hinaus konnte durch die Analyse der Wirkung von *D*-TisB gezeigt werden, dass TisB nicht mit Rezeptoren der Membran wechselwirkt, sondern rein physikalisch auf die Membran durch Ausbildung eines Protonenpfades das Potential der Zelle beeinflusst.

Die Zugabe von TisB zu planktonisch wachsenden Bakterien, induziert in den Zellen offensichtlich eine Stressantwort, die zu einer Bildung von persistenten Zellen (Dörr et al., 2010) und darauf hingehend, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu Biofilmwachstum führt. Es wurde gezeigt, dass TisB ein antiparalleles Dimer formt und so einen kleinen Protonenpfad bildet (Steinbrecher et al., 2012), der physisch eine Störung des notwendigen Protonengradienten der Zellmembran hervorruft. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zeigen auf, was nach der allmählichen Beeinflussung des Protonengradienten passiert und wie die Zelle auf diese Wirkung reagiert. Deshalb wurde hier eine sehr kurze Inkubationszeit von einer Stunde gewählt, um den unmittelbaren Effekt von TisB zu beleuchten. Die Ergebnisse des Stammes *S. oneidensis* wurden bereits in der Doktorarbeit von Katrin Richter diskutiert (Richter, 2014). In dieser Arbeit werden vor allem die Ergebnisse von *E. coli* und *S.*

*aureus* betrachtet. Auffallend ist, dass bei *S. aureus* genau ein Gen signifikant herunterreguliert wird. Es handelt sich hierbei um das cold shock protein *cspB*. Die Inaktivierung dieses Gens führt zur Bildung von neuen Phänotypen, wie Small-Colony-Varianten (SCV), und zum Verlust der Pigmentierung (Willimsky et al., 1992). Darüber hinaus wird nach dem Verlust dieses Proteins der Metabolismus der Bakterien verlangsamt, was zu einer erhöhten Resistenz der Bakterien führt (Duval, 2010). Letztendlich kann diese Veränderung zur Biofilmbildung führen. Diese signifikante Regulation eines einzelnen Gens zeigt, dass TisB einen gezielten Effekt auf die Bakterien zu haben scheint und bekannte Wege der unmittelbaren Stressreaktion induziert. Bei *E. coli* liegt eine höhere Anzahl von regulierten Genen vor, in der Summe 17. Hier tauchen auch einige interessante heraufregulierte Gene auf, wie *cyoA* und *cyoB*, die beide Untereinheiten der Cytochrom-Ubiquinol-Oxidase sind und damit direkt in den Protonentransport und die Energiegewinnung der Zelle involviert sind (Thomas et al., 1993). *CyoA* spielt darüber hinaus auch eine wichtige Rolle in der stressinduzierten Mutagenese von *E. coli* (Mamun et al., 2012). Eine ähnliche Funktion besitzt das Gen *sdhA*, die Succinatdehydrogenase, welche wichtige Aufgaben in der Atmungskette übernimmt und den Elektronentransport reguliert (Mamun et al., 2012). Die Aktivität dieser Gene ist nach der Zugabe von TisB heraufreguliert. Es werden somit mehrere Protonenpumpen der Zelle erhöht aktiv, um der membrandepolarisierenden TisB-Wirkung entgegen zu wirken. Interessanterweise ist hier auch ein Gen namens *ompT* heraufreguliert, welches eine Aspartylprotease darstellt und zuständig ist für den Abbau von zellfremden Peptiden, die in die Zelle gelangt sind (Haiko et al., 2002). Es scheint, als reagiert *E. coli* nicht direkt mit Biofilmbildung, sondern als sei der initiale Effekt dieses Stammes auf Verteidigung und Kompensation ausgelegt. Im Gegensatz dazu scheint *S. aureus* direkt in den persistenten Zustand überzugehen. Die Analyse zeigt die erwarteten Ergebnisse. Es findet eine Regulation auf der Ebene der Atmungskette und der Protonenpumpen statt, sodass der Effekt von TisB auf den Protonengradienten bestätigt ist. Außerdem ist die Hypothese des

Übergangs in einen persistenten biofilmbildenden Zustand durch das einzeln regulierte Gen in *S. aureus* bestätigt.

Um die Wirkung von TisB auf ein biotechnologisch relevantes Katalysesystem zu untersuchen, wurde TisB zu Klärschlammproben gegeben. Klärschlamm besteht aus aggregierten Zellen unterschiedlichen Ursprungs. Es findet sich in dieser Umwelt eine Vielzahl von Bakterienarten und Einzellern. Eine Förderung des Biofilmwachstums könnte zu einer höheren Effektivität in der Reinigung des Klärwassers führen und soll mit TisB induziert werden. Interessanterweise zeigt TisB hier einen gänzlich unerwarteten Effekt. Es förderte die Bildung von sogenanntem Blähschlamm, der ein erster Schritt in Richtung granulärem Klärschlamm darstellt (Seviour R. , 2010). Durch die Zugabe von TisB erhöhten sich die Biomassekonzentration in den Proben und auch der Schlammvolumenindex. Die Erhöhung dieser beiden Faktoren spricht für die Bildung von einer ganz bestimmten Art des Blähschlammes, dem sogenannten viskosen Blähschlamm (aus dem Engl. „viscous bulking“) (Allen et al., 2004). Diese Art des Schlammes zeigt ein vermindertes Sedimentationsverhalten und einen gesteigerten Austritt von extrazellulären Biopolymeren (EPS). Dadurch erhält man die gesteigerte Biomasse in den TisB-Proben im Gegensatz zu den Kontrollen ohne Peptid. Die Flockenform des Blähschlammes ist kompakter als die des normalen Belebtschlammes, was man auch in den Bildern der Mikroskopie der TisB Proben erkennen kann. Es ist offensichtlich, dass TisB einen Effekt auf den Klärschlamm hat, jedoch zeigt es nicht den erhofften Effekt. Die Bildung von Bläh- oder granulärem Schlamm ist in der Abwasserwirtschaft unerwünscht, denn er zeigt auch eine verminderte Katalyseaktivität und es bildet sich oft Schaum auf den Abwasserbecken (Metcalf and Eddy, 2004). Auffallend im 3-Tage Experiment war, dass TisB kontinuierlich anwesend sein muss, um eine Wirkung zu zeigen. Das zeigt der Abfall des Sedimentationsverhaltens an Tag 2 der Untersuchung. Wahrscheinlich wird das Peptid durch Proteasen der Bakterien abgebaut. Möglicherweise könnte hier eine Verwendung von *D*-TisB einen längerfristigen Effekt ermöglichen, da es unempfindlicher gegen

Proteasen ist. Auch wenn TisB in diesem Falle eine Transformation des Schlammes zu einer unerwünschten Form induziert, ist der Effekt interessant, denn unter normalen Umständen findet auch diese Umwandlung nicht so schnell statt. Um absichtlich Blähschlamm oder granulären Schlamm zu untersuchen, benötigt man normalerweise Wochen in gut ausgestatteten Laboren mit Reaktoren, die den Schlamm und alle wichtigen Parameter wie pH-Wert und Temperatur ständig überwachen.

Die potentielle Struktur des Peptids TisB wurde untersucht und die Hypothese einer Bildung eines antiparallelen Dimers wurde durch die biologische Untersuchung verschiedener TisB-Derivate unterstützt. Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen deutlich, dass TisB Biofilme induzieren kann, aber einigen Limitierungen, wie beispielsweise der Art des Metabolismus (aerob/anaerob etc.), unterworfen ist. Weitere Anwendungen dieses Peptids müssen gezielt studiert werden, wie die Versuche mit den Klärschlammproben zeigen. Die Wirkung von TisB stellt aber eine gute Möglichkeit zur Beeinflussung eines bakteriellen Systems dar, wie auch die Ergebnisse an *S. oneidensis* zeigen (Richter, 2014).

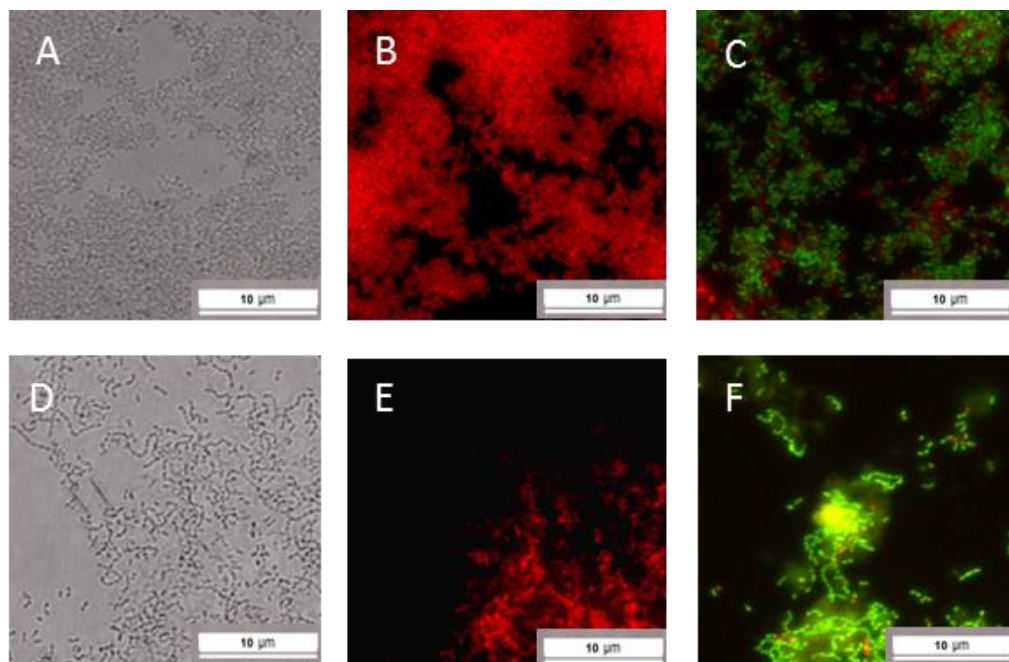
## **5 Untersuchungen an der Matrix peptidinduzierter Biofilme – Extrazelluläre DNA (eDNA) und Polysaccharide (EPS)**

### **5.1 Ergebnisse**

#### **5.1.1 Fluoreszenzmikroskopie und die Rolle der eDNA bei peptidinduzierten Biofilmen**

Die Bildung von Biofilmen geht immer einher mit der Ausbildung der Biofilmmatrix. In diesem Kapitel wurden zunächst die TisB induzierten Biofilme auf die Sekretion von eDNA untersucht und weitergehend auch Biofilme, die durch andere membranaktive Peptide induziert wurden. Die Biofilme wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht, indem mit DDAO (7-Hydroxy-9H-[1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one]) angefärbt wurde. Dieser Farbstoff interkaliert in DNA, in diesem Falle jedoch nur in extrazelluläre DNA (eDNA), da der Farbstoff nicht in der Lage ist in die Zellen einzudringen. Die Live/Dead lassen lebendige Zelle in grün und tote Zellen in Rot erscheinen. Abbildung 38 zeigt beide Farbstoffe bei TisB induzierten Biofilmen. Die DDAO-Anfärbung (B, E) deckt eine immense Sekretion von DNA in den extrazellulären Raum auf, während die Live/Dead Färbung (C, F) deutlich zeigt, dass die Bakterien gesund und vital sind. Somit kann die eDNA nicht von lysierten Zellen stammen. Das Auftreten einiger roter Zellen in Biofilmen kommt gelegentlich vor und ist auch in den Kontrollen zu beobachten. Dies bedeutet aber nicht, dass TisB im Allgemeinen toxisch ist.

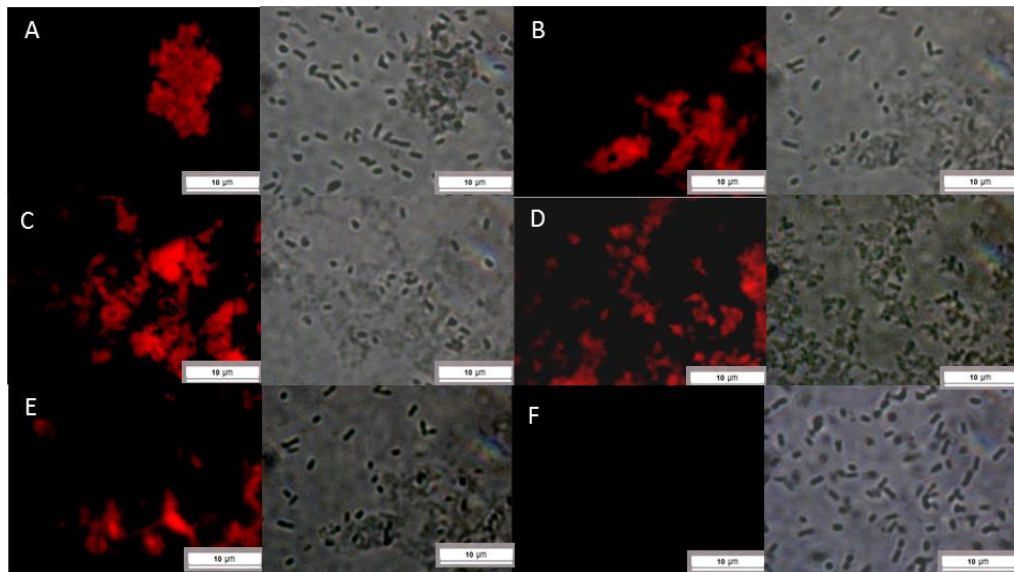
## Fluoreszenzmikroskopie und die Rolle der eDNA bei peptidinduzierten Biofilmen



**Abbildung 38** Biofilme von *S. aureus* (A-C) und *E. coli* (D-F) induziert von TisB. Die Bilder zeigen die Phasenkontrastaufnahmen (A,D), die Einfärbung mit DDAO (B,E) und die Einfärbung mit Live/Dead Mix (C,F). Die Vertiefungen A und B zeigen dieselbe Vertiefung der Mikrotiterplatte, wie auch die Bilder D und E. C und F zeigen eine andere Vertiefung, jedoch auf derselben Platte und demselben Versuchsansatz. Die Inkubationsdauer von TisB mit den Bakterien beträgt 1 h, bei einer Peptidkonzentration von 32 µg/ml. Aufgenommen mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Der Maßstab ist bei allen Bildern gleich und beträgt 10 µm.

Im weiteren Verlauf wurden auch die TisB Derivate auf ihr Verhalten in Bezug auf DNA Sekretion untersucht. In diesem Versuch wurde TisB mit den Bakterien inkubiert und 5 µl Probe unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurde sowohl *E. coli* als auch *S. aureus* getestet, jedoch mit unterschiedlichen Inkubationszeiten. *E. coli* benötigt nur 15 min bis zu einer Reaktion auf TisB. *S. aureus* hingegen zeigt eine deutliche Reaktion erst nach 90 min. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 und Abbildung 40 gezeigt.

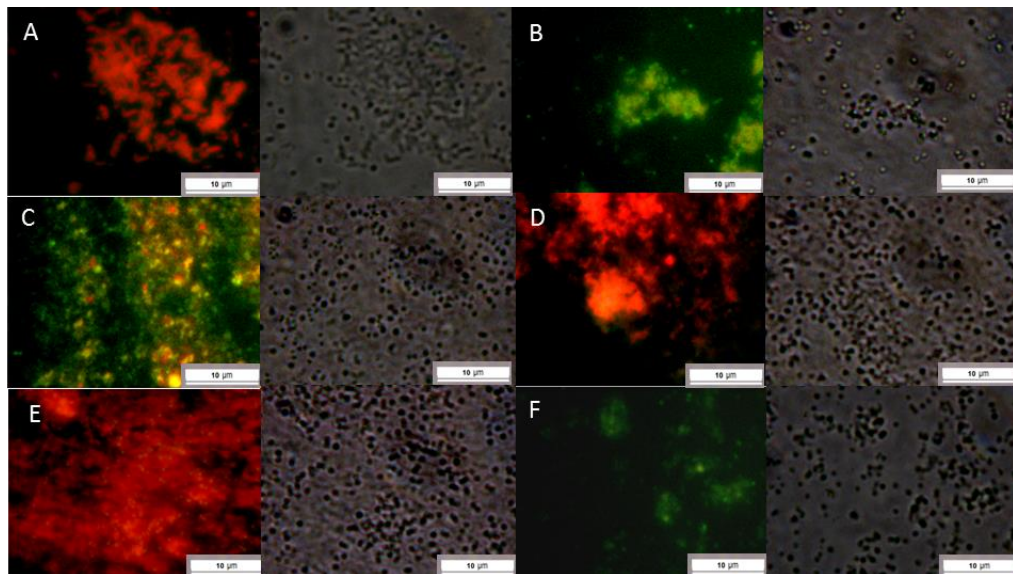
## Fluoreszenzmikroskopie und die Rolle der eDNA bei peptidinduzierten Biofilmen



**Abbildung 39** TisB-behandelter *E. coli*, angefärbt mit DDAO. Die Bakterien wurden behandelt mit TisB WT (A), TisB **D5K/K12D** (B), **D22K/K26D** (C), **K12D/D22K** (D) und **D5K/K12D D22K/K26D** (E). Unter (F) sieht man die Kontrolle ohne Behandlung mit Peptid. Die jeweils linke Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahme und die rechte Spalte zeigt die Zellen im Phasenkontrast. Inkubiert wurden die Bakterien mit den Peptiden bei einer Peptidkonzentration von 32 µg/ml, für 15 min bei 37°C. Danach wurde zentrifugiert und mit DDAO angefärbt. In Rot erscheint die eDNA. Aufgenommen wurde mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 10 µm.

Abbildung 39 zeigt eine stark rote Fluoreszenz in allen Bildern und keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Derivaten. Es scheint, dass die Peptide eine Wirkung auf die Zellen haben, die zum Austritt von eDNA führt. Die Aufnahmen konnten bereits nach 15 min Inkubation mit *E. coli* gemacht werden. Dieser Stamm scheint sehr sensitiv auf die Peptide zu reagieren. Es wurden auch längere Inkubationszeiten versucht, jedoch mit demselben Ergebnis. Anders sieht das bei *S. aureus* aus und den Ergebnissen in Abbildung 40.

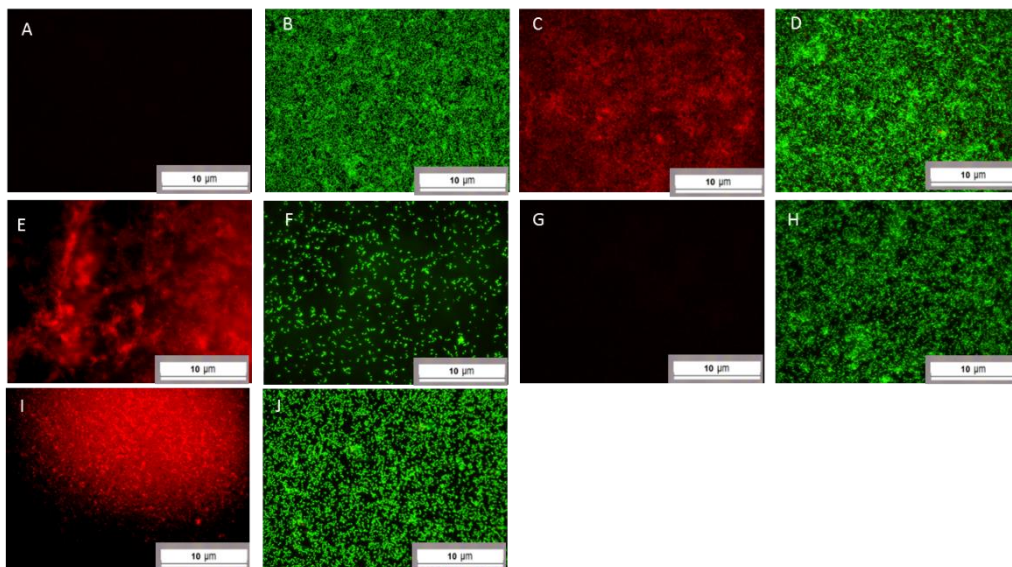




**Abbildung 40** TisB-behandelter *S. aureus*, angefärbt mit DDAO. Die Bakterien wurden behandelt mit TisB-WT (A), TisB **D5K/K12D** (B), **D22K/K26D** (C), **K12D/D22K** (D) und **D5K/K12D D22K/K26D** (E). Unter (F) sieht man die Kontrolle ohne Behandlung mit Peptid. Die jeweils linke Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahme und die rechte Spalte zeigt die Zellen als Phasenkontrastaufnahmen. Inkubiert wurden die Bakterien mit den Peptiden bei einer Konzentration von 32 µg/ml, für 90 min bei 37°C. Danach wurde zentrifugiert und mit DDAO angefärbt. In Rot erscheint die eDNA. Einzelne Zellen erscheinen hier zeitweise grün bis gelblich. Aufgenommen wurde mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 10 µm.

Bei den hier mit DDAO gefärbten Zellen erkennt man eine teilweise grünliche bis gelbliche Färbung. Diese Erscheinung ist wesentlich geringer in ihrer Intensität als die rote Fluoreszenz. Die grüne Fluoreszenz ist nur bei Abwesenheit der roten zu sehen und daher sind hier nur wenige Zellen zu erkennen. Ist nur grüne Fluoreszenz zu beobachten, liegt keinerlei eDNA vor. Vergleicht man die Bilder, sieht man rote Fluoreszenz, also eDNA bei TisB WT (A) und den Derivaten **K12D/D22K** (D) und **D5K/K12D D22K/K26D** (E). Dies bedeutet, dass wir nur bei Peptiden, die das Dimer bilden können, eDNA sehen. Keinerlei bis wenig eDNA ist zu sehen bei den anderen beiden Derivaten (B-C) und der Kontrolle ohne Peptid (F). Zudem wurden die Bakterien hier für 90 min mit den Peptiden inkubiert. *S. aureus* scheint im Vergleich zu *E.coli* weniger sensitiv auf äußere Einflüsse zu sein. Jedoch ist dies nur der Fall bei den TisB Derivaten. TisB-WT zeigt eine Wirkung bereits nach 15 min wie bei *E. coli*. Im Zuge dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob das Auftreten der DNA TisB-

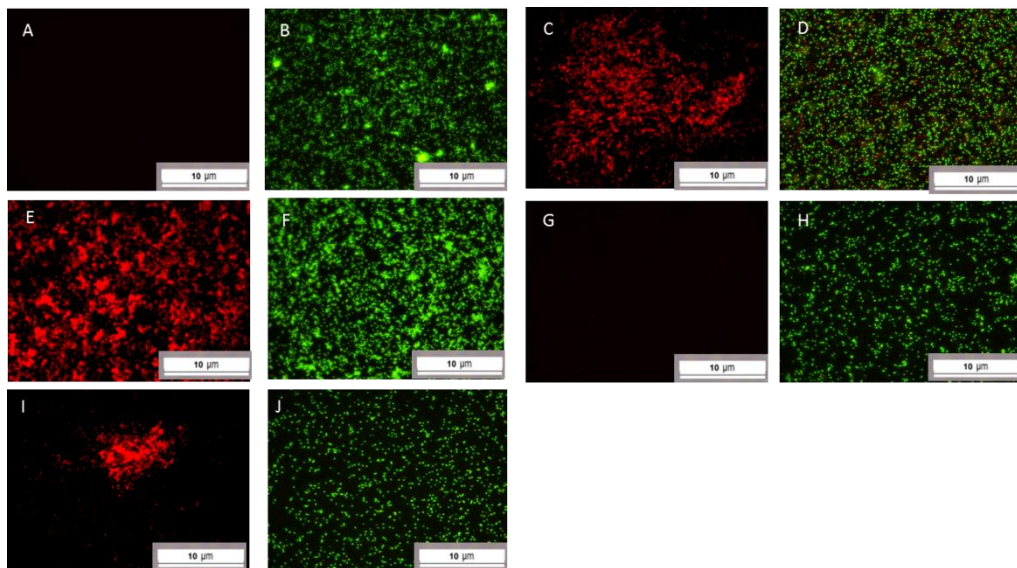
spezifisch ist oder, ob man Sekretion von eDNA auch mit anderen Peptiden, beispielsweise antimikrobiellen Peptiden (AMP), oder auch konventionellen Antibiotika erreichen kann. Deshalb wurden im Weiteren eine ganze Reihe anderer Peptide und zwei Antibiotika in subMHK Konzentrationen auf ihren Effekt auf zwei grampositive, biofilmbildende Bakterienstämme untersucht und zwar *S. aureus* und *E. faecalis*. Die Peptidnamen und ihre Sequenzen können Tabelle 2 entnommen werden. Bei allen Peptiden und Antibiotika wurde zunächst der MHK-Wert beider Stämme festgelegt. Diese Werte werden in den folgenden Kapiteln noch diskutiert und können in Tabelle 10 und Tabelle 11 eingesehen werden. Für die Untersuchung der Sekretion nach Behandlung mit diesen Peptiden und Antibiotika wurden nur subMHK Konzentrationen verwendet. Diese Konzentrationen lagen einen Verdünnungsschritt unter dem getesteten MHK-Wert. Bei einigen Peptiden wurde, wie nach der TisB-Behandlung, Biofilmwachstum beobachtet. Abbildung 41 und Abbildung 42 zeigen die DDAO Anfärbungen einiger dieser gebildeten Biofilme und deren Sekretion von DNA.



**Abbildung 41** Fluoreszenzaufnahmen von *E. faecalis* Biofilmen angefärbt mit DDAO (rot) und Live/Dead (grün/rot). (A,B) zeigt die Kontrolle ohne Peptidzugabe. Die Bakterien wurden mit subMHK Konzentrationen der Peptide (C,D) TemporinShf (512 µg/ml), (E,F) MAP (4 µg/ml), (G,H) GS (2 µg/ml) und (I,J) PGLa/Mag2 (8 µg/ml) für 24 h behandelt. Die Ansätze wurden in LBG Medium inkubiert und die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt 10 µm.

## Fluoreszenzmikroskopie und die Rolle der eDNA bei peptidinduzierten Biofilmen

Die Bilder aus Abbildung 41 zeigen, dass auch nach der Behandlung mit AMP eine Biofilmbildung beobachtet werden kann und dass auch hier eDNA von den Bakterien ausgeschüttet wird. Dies findet nicht in dem starken Ausmaß statt wie bei der Inkubation mit TisB, aber die rote DDAO-Färbung kann bei einigen Peptiden wie TempShf und MAP deutlich erkannt werden. Es gibt jedoch auch Peptide, bei denen eine Biofilmbildung wie bei den Kontrollen zu sehen ist, jedoch keine DNA austritt (GS, G und H). Die Live/Dead Färbung bestätigt die subMHK Konzentrationen und dass keine eDNA durch Zellyse vorliegt.

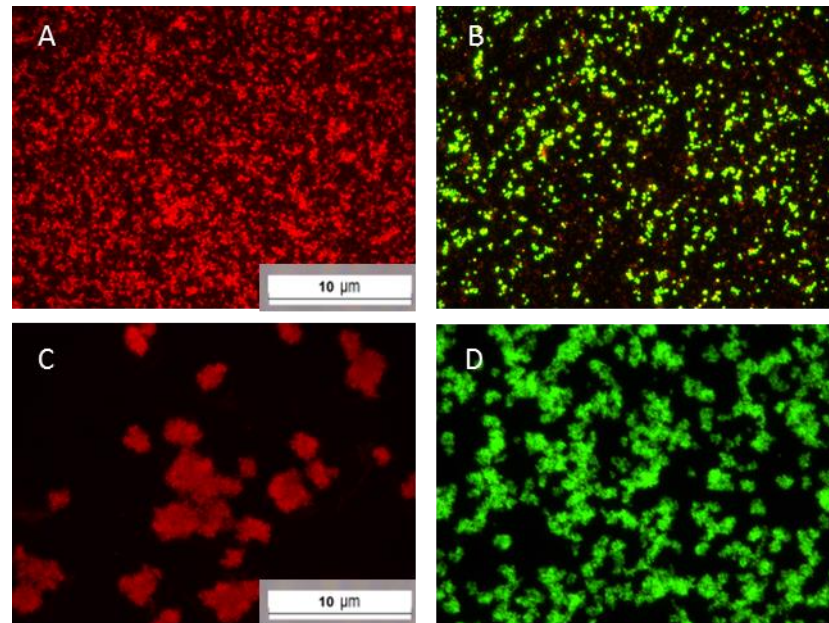


**Abbildung 42** Fluoreszenzaufnahmen von *S. aureus* Biofilmen angefärbt mit DDAO (rot) und Live/Dead (grün/rot). (A,B) zeigt die Kontrollen ohne Peptidzugabe. Die Bakterien wurden mit sublethalen Konzentrationen der Peptide/Antibiotika (C,D) Demeclocyclin (0,25 µg/ml), (E,F) MAP (4 µg/ml), (G,H) GS (2 µg/ml) und (I,J) PGLa/Mag2 (8 µg/ml) für 24 h behandelt worden. Die Biofilme haben sich am Boden der Mikrotiterplatte gebildet. Die Ansätze wurden in LBG Medium inkubiert und die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt 10 µm.

*S. aureus* zeigt die gleichen Erscheinungen der eDNA Sekretion, jedoch bei anderen Peptiden/Antibiotika als bei *E. faecalis*. Die Kontrollen beider Stämme weisen ebenfalls eine Bildung von Biofilmen vor, aber keine Ausschüttung von eDNA. Die gleichen Tests wurden auch mit den klinischen Stämmen MRSA 9, MRSA SCV und BP gemacht. Dabei wurde beobachtet, dass nur bei der BP-Variante mit den Peptiden Magainin 2



und MSI-103 eine Sekretion von eDNA beobachtet werden konnte. Abbildung 43 zeigt die Proben von MRSA BP inkubiert mit diesen beiden Peptiden.



**Abbildung 43** Fluoreszenzaufnahmen von MRSA BP Biofilmen angefärbt mit DDAO. Die Bakterien wurden mit subMHK Konzentrationen der Peptide/Antibiotika Magainin 2 (64 µg/ml) (A,B), MSI-103 (8 µg/ml) (C,D) für 24 h behandelt. Die Biofilme haben sich am Boden der Mikrotiterplatte gebildet. Die linke Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit DDAO und die rechte Spalte mit dem Live/Dead Mix. Die Ansätze wurden in LBG Medium inkubiert und die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt 10 µm.

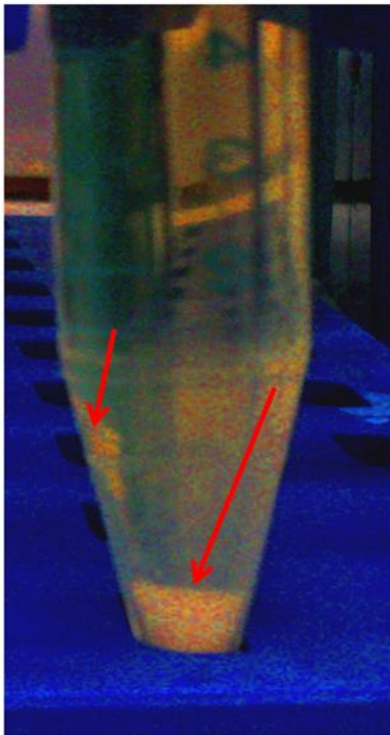
Die Untersuchung mit MSI-103 (C, D) zeigt sogar eine starke Veränderung der Optik der Biofilme. Sie wachsen hier wie kleine Kolonien im Gegensatz zu den Kontrollen, in denen sie sich teppichartig ausbilden. Beim Ursprungstamm MRSA 9 und MRSA SCV kann kaum rote Fluoreszenz von DDAO gezeigt werden. Bei diesen Experimenten muss beachtet werden, dass sie in einem zuckerhaltigen Medium angesetzt wurden. Man wollte damit eine natürliche Biofilmbildung in den Kontrollen erhalten, um die Sekretion der peptidbehandelten Bakterien mit der Sekretion dieser natürlichen Biofilme vergleichen zu können. Dieses Medium verstärkt somit die Bildung von Biofilmen. In den Kontrollen (jeweils Bilder A und B) der Abbildung 41 und Abbildung 42 kann man jedoch entnehmen, dass in den natürlich gebildeten Biofilmen keine eDNA

zu beobachten ist und damit der biofilmsteigernde Effekt des Mediums vernachlässigt werden kann.

### **5.1.2 Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) bei peptidinduzierten Biofilmen – Gel-Permeations-Chromatographie**

Die EPS ist unerlässlicher Bestandteil der Biofilmmatrix zur Stabilisation und zum Schutz der im Biofilm lebenden Organismen. Um auf die Entdeckung der eDNA nach Peptidbehandlung weiter einzugehen, wurden die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) zweier bakterieller Stämme untersucht. Diese Experimente wurden in Kooperation mit SCELSE in Singapur geplant. Die Untersuchungen wurden mit den Stämmen *S. aureus* MN8 und *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt. Beide Stämme sind gute Biofilmbildner und haben in Vorversuchen eine peptidinduzierte Biofilmbildung gezeigt. Für den Versuch wurden zunächst Biofilme herangezogen. Da man eine Biofilmtrockenmasse von etwa 5-10 mg zur EPS-Charakterisierung mittels Gelchromatographie benötigt, wurden die Bakterien mit 32 µg/ml TisB und subMHK Konzentrationen einiger ausgewählter AMP für 3 Tage lang inkubiert. Abbildung 44 zeigt, wo sich der Biofilm vorrangig gebildet hat und zwar am Boden des Gefäßes und den Wänden. Der gebildete Biofilm erscheint als weiße Masse in der Mediumlösung. Zudem waren auch schleimige Fäden zu beobachten, die eindeutig für eine ausgeprägte EPS Bildung sprechen.

## Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) bei peptidinduzierten Biofilmen – Gel-Permeations-Chromatographie



**Abbildung 44** Plastikgefäß mit entstandenem Biofilm nach TisB Behandlung. Das Bild zeigt den entstandenen Biofilm von *S. aureus* MN8 in einem 15 ml Plastikgefäß nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und Behandlung mit 32 µg/ml TisB. Der Biofilm hat sich am Boden und teilweise an den Wänden des Gefäßes gebildet, wie die roten Pfeile zeigen.

Des Weiteren wurden auch die subMHK Konzentrationen von einigen AMP auf ihre EPS Sekretion getestet. Dafür mussten zunächst die MHK-Werte der Peptide bestimmt werden. Die Wertetabelle hierzu findet sich in Tabelle 7.

**Tabelle 7** MHK-Werte der getesteten Peptide für die Bestimmung der sublethalen Konzentrationen zur Biofilminduktion und der nachfolgenden EPS Analyse.

Peptide	<i>S. aureus</i> MN8 [µg/ml]	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 [µg/ml]
TempL	>256	>256
LL-37	>1024	1024
MAP	>1024	1024
PGLa/Mag2	>1024	512
GS	128	>128
PGLa	512	>1024
Mag2	>1024	>1024

In Tabelle 8 sind die zur Biofilminduktion verwendeten subMHK Konzentrationen der AMP gezeigt. Diese Konzentrationen wurden einerseits festgelegt durch die mikroskopische Beobachtung von Biofilmbildung während der Atmungsüberwachung. Konnte andererseits keine optische Biofilmbildung beobachtet werden, wurden Konzentrationen eine Verdünnungsstufe unter dem MHK-Wert gewählt.

**Tabelle 8** SubMHK Peptidkonzentrationen für Biofilminduktion und EPS Analyse. Bei diesen Konzentrationen wurde visuell die Biofilmbildung während der MHK-Bestimmung kontrolliert und deshalb verwendet.

<b>Peptide</b>	<b><i>S. aureus</i> MN8 [µg/ml]</b>	<b><i>P. aeruginosa</i> PAO1 [µg/ml]</b>
TempL	8	8
LL-37	128	32
MAP	64	64
PGLa/Mag2	16	32
GS	4	4
PGLa	128	64
Mag2	256	32
TisB	32	32

Die Bakterien ( $OD_{550nm}$  0,1) wurden mit den Peptiden 3 Tage inkubiert. Mit einigen Peptiden konnte hierbei eine Biofilmbildung erreicht werden und mit anderen Peptiden, wie beispielsweise GS, konnte so gut wie keine Biomasse erreicht werden. Dies ist im Einklang mit den Studien der eDNA Sekretion. Auch hier konnte mit GS keine Sekretion von eDNA gezeigt werden. Der folgenden Tabelle können die erhaltenen Biomassen nach der Gefriertrocknung der Proben entnommen werden.

## Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) bei peptidinduzierten Biofilmen – Gel-Permeations-Chromatographie

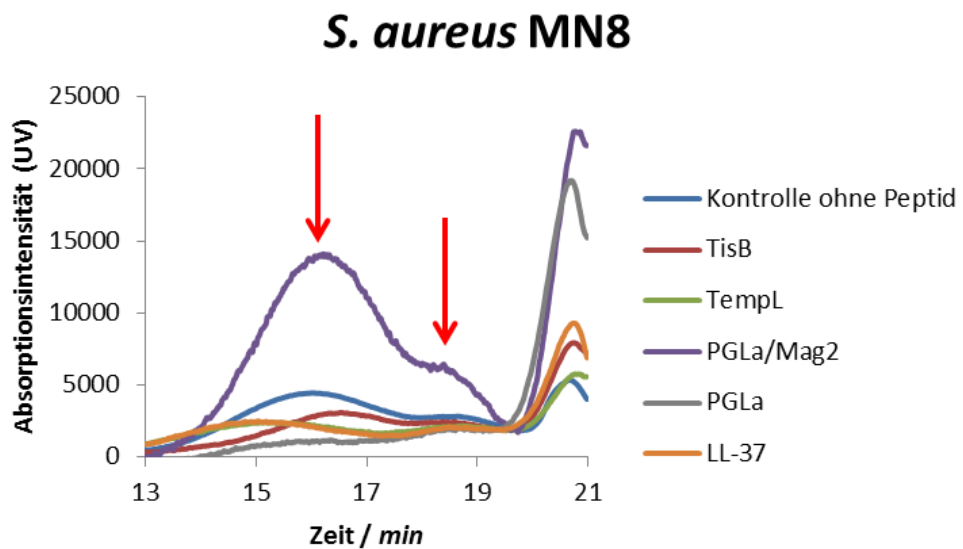
**Tabelle 9** Erhaltene Biomassen nach Inkubation mit verschiedenen Peptiden zur EPS Charakterisierung. Die rot unterlegten Werte zeigen eine erhöhte Biomasse an. Die weiß unterlegten Massen zeigen keine Biofilmbildung und die grau unterlegten Werte sind die Kontrollen. TisB induzierte Biofilme wurden mit grün markiert. Die statistische Abweichung der Waage beträgt 0,01%.

Peptide	<i>S. aureus</i> MN8 [mg]	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 [mg]
TempL	15,4	17,8
LL-37	23,1	16,3
PGLa/Mag2	7,5	14,7
GS	5,2	2,6
PGLa	2,0	14,2
TisB	7,2	3,3
Kontrolle	9,8	10,9

Bei diesen Versuchen muss beachtet werden, dass die TisB-induzierte Biomasse mit der Konzentration, aufgrund der Korrelation der Peptidkonzentration und der Biomasse, von TisB variiert werden kann. Dies gilt jedoch nicht für die AMP. Hier liegt kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Biofilmmasse vor. Die in der Tabelle 9 weiß unterlegten Werte zeigen eine weit unter der Kontrolle liegende Biomasse an und werden deshalb als nicht biofilminduzierend angesehen und die Massen wurden nicht weiter untersucht. Alle anderen Proben wurden in ionischen Lösungen (EMIM-ac/DMAC) gelöst und mit Hilfe der Gel-Permeations-Chromatographie untersucht (Seviour T. , unveröffentlicht). Abbildung 45 zeigt das Ergebnis der peptidbehandelten *S. aureus* Bakterien. Die induzierten EPS von TisB, TempL, PGLa und LL-37 zeigen einen ähnlichen Verlauf mit Maxima bei Minute 16 und 19. Der Anstieg bei Minute 20 und weiterführend präsentieren die kleinen sekretierten Massen, die aber nicht weiter untersucht wurden. Abweichende Ergebnisse zeigt die EPS von PGLa/Mag2. Hier kann ein



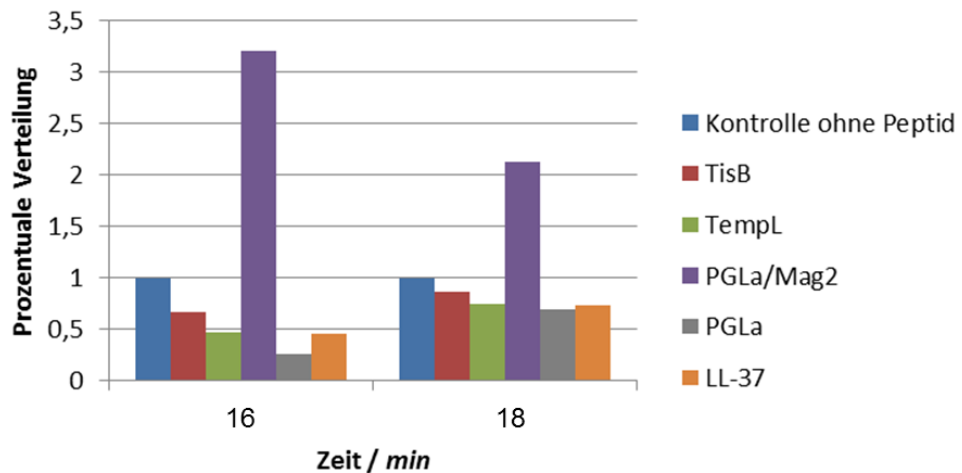
ähnlicher Verlauf beobachtet werden, der aber viel höhere Intensitäten aufweist.



**Abbildung 45** Gelchromatogramm der peptidinduzierten EPS von *S. aureus*. Auf der X-Achse sind die Minuten 13 bis 21 aufgetragen, welche die charakteristischen Banden der großen Polymere zeigen. Die Absorptionsintensitäten sind normiert auf die Kontrolle. Die Konzentrationen der gelösten EPS-Proben betragen alle 10 mg/ml. Die roten Pfeile geben die analysierten Peaks an.

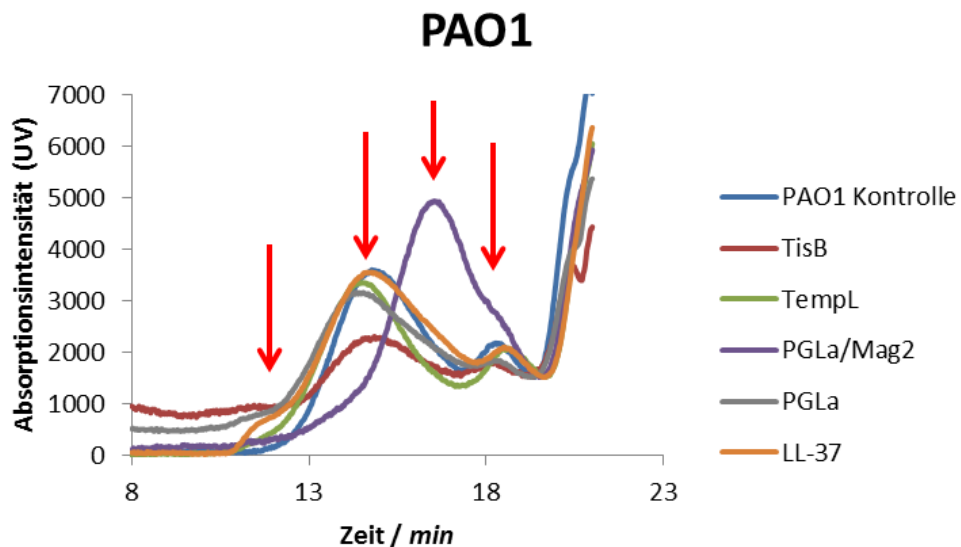
In der nächsten Abbildung ist die prozentuale Verteilung der Polymere bei Minute 16 und 19 dargestellt. Auch hier kann deutlich der Unterschied der PGLa/Mag2 Proben erkannt werden. Während die Werte der anderen Peptide einschließlich TisB eher einen geringeren Anteil an den beiden charakteristischen Polymeren im Vergleich zur Kontrolle zeigen, sind die Werte der PGLa/Mag2 Probe komplett gegensätzlich.

### EPS Zusammensetzung *S. aureus*



**Abbildung 46** Die prozentuale Zusammensetzung der EPS Polymere von *S. aureus*. Das Polymer bei Minute 16 entspricht einer Masse von etwa 268 kDa und bei Minute 18 von etwa 73 kDa. Die Auswertung wurde entnommen aus (Seviour T. , unveröffentlicht). Die EPS Menge der Kontrolle wurde als 100% angenommen und die entsprechenden Intensitäten dazu normiert.

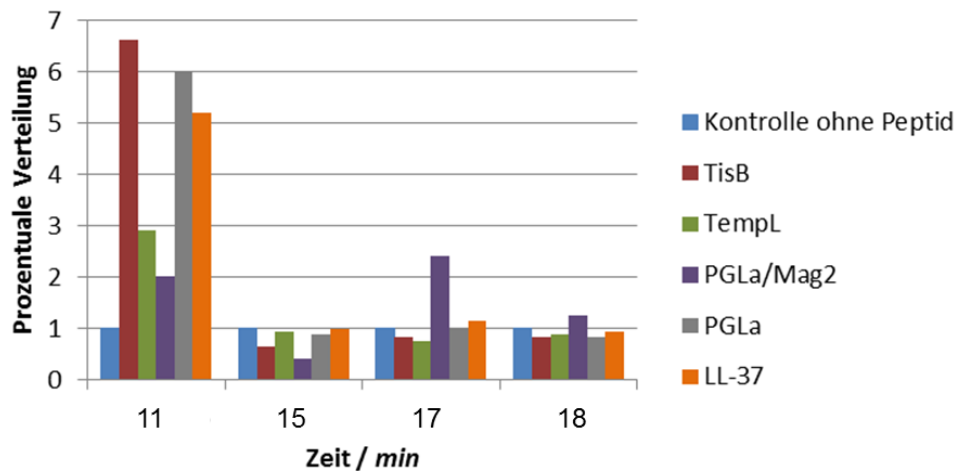
In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der peptidbehandelten *P. aeruginosa* Proben gezeigt. Wieder zeigt PGLa/Mag2 einen Unterschied und diesmal handelt es sich nicht um die Menge der gebildeten EPS. Die Proben zeigen auch einen Trend zur Sekretion von eher kleineren Polymeren im Gegensatz zu den anderen getesteten Peptiden.



**Abbildung 47** Gelchromatogramm der peptidinduzierten EPS von PAO1. Auf der X-Achse sind die Minuten 8 bis 23 aufgetragen, welche die charakteristischen Banden der großen Polymere zeigen. Die Absorptionsintensitäten sind normiert auf die Kontrolle. Die Konzentrationen der gelösten EPS-Proben betragen alle 10 mg/ml. Die roten Pfeile geben die analysierten Peaks an.

Aus Abbildung 47, ebenfalls wie aus Abbildung 48, kann entnommen werden, dass die mit PGLa/Mag2 behandelten Proben einen Trend annehmen, der im Gegensatz zu den anderen Proben steht. Während bei Minute 11 TisB, PGLa und LL-37 eine starke Sekretion dieses bestimmten Polymers zeigen, scheinen TempL und im Besonderen PGLa/Mag2 eher weniger von diesem zu zeigen. Diesen Trend kann man auch bei den anderen Polymeren der Minuten 14, 16 und 18 erkennen. Außerdem zeigen die Proben von *P. aeruginosa* eine höhere Sekretion, durch die Anwesenheit einer höheren Anzahl von Massen, als die Proben von *S. aureus*. Während hier eindeutig 4 Massen im Besonderen herausstechen, sind es bei den Proben von *S. aureus* in der Abbildung 45 und der Abbildung 46 hauptsächlich die beiden prominenten Polymere bei Minute 16 und 18.

## EPS PAO1 Biofilm



**Abbildung 48** Die prozentuale Zusammensetzung der EPS Polymere von PAO1. Das Polymer bei Minute 11 entspricht einer Masse von etwa 2058 kDa, bei Minute 15 von etwa 498 kDa, bei Min 17 von etwa 156 kDa und Min 18 von etwa 87 kDa. Die Auswertung wurde entnommen aus (Seviour T. , unveröffentlicht). Die EPS Menge der Kontrolle wurde als 100% angenommen und die entsprechenden Intensitäten dazu normiert.

Im Besonderen sticht das Polymer der Minute 16 heraus. Hier zeigt der synergistische Mix aus PGLa/Mag2 ein besonders starkes Auftreten im Gegensatz zu den anderen Peptiden. Während beispielsweise bei Minute 11 alle anderen Peptide einen Kontrast aufzeigen im Vergleich zur Kontrolle und PGLa/Mag2. Die Kombination aus PGLa und Mag2 scheint zur Sekretion kleiner Polymere bei *P. aeruginosa* zu führen während der Rest der Peptide die Sekretion großer Polymere veranlassen. Die Kontrolle hingegen zeigt ein gleichmäßiges Erscheinen aller Polymergrößen.

## 5.2 Diskussion

### 5.2.1 Vergleich der eDNA und EPS induzierter Biofilme

Die besonderen Eigenschaften und Funktionen der eDNA und EPS in der Biofilmmatrix wurden bereits in Kapitel 1.5.1 und den weiterführenden Kapiteln beschrieben. Umso wichtiger ist es, diese Bestandteile weiter zu untersuchen und zu klären, welchen Einfluss Therapeutika, wie beispielsweise AMP, haben. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden beschriebenen Methoden zur Untersuchung der bakteriellen Sekretion nach Peptidbehandlung, kann man erkennen, dass es durchaus Gemeinsamkeiten zwischen den gebildeten Biofilmen nach TisB Inkubation und den durch AMP-Behandlung entstandenen Biofilmen gibt. Sie zeigen ein ähnliches Auftreten von eDNA. Die eDNA tritt zwar mit TisB in einer wesentlich höheren Menge und auch schneller auf, trotzdem zeigen auch einige AMP in subMHK Konzentrationen den Trend zur eDNA Bildung. Interessanterweise ist das Auftreten von eDNA aber peptidabhängig. Bei einigen Proben trat zwar Biofilmwachstum auf, aber eDNA-Sekretion konnte nicht beobachtet werden (beispielsweise mit Gramacidin S, Abbildungen 40 und 41 jeweils G und H). Dieses Verhalten zeigte sich auch in den Kontrollen. Es scheint, als ob die Sekretion von eDNA (zumindest bei den getesteten Stämmen *S. aureus* und *E. faecalis*) tatsächlich etwas mit den Peptiden zu tun hat. Was jedoch genau geschieht, ist schwierig zu erkennen. Möglicherweise induzieren diesen Austritt der eDNA nur Peptide, die physikalisch auf die Zellmembran wirken, jedoch keine anderen Ziele innerhalb der Zelle haben. Viele der in dieser Arbeit untersuchten AMP besitzen die Fähigkeit, Zellen zu penetrieren (vgl. Zellpenetrierende Peptide, aus dem Englischen „Cell-penetrating peptides“, CPP). Von Gramacidin S ist beispielsweise bekannt, dass es mehrere Ziele in der Zelle hat und somit anders wirkt als die meisten AMP (Berditsch et al., 2012). Daher zeigen die Proben hier möglicherweise keine eDNA Sekretion. Die anderen Peptide jedoch bilden in der Membran so große Poren, dass DNA austreten kann, jedoch auch nicht so stark, dass die Zellen absterben. Aus diesen Ergebnissen könnte

man auch schließen, dass die eDNA in diesem Falle nicht durch den sogenannten Brudermord oder Selbstmord der Zellen entsteht, sondern hier eher ein Transport aus der Zelle stattfindet. Denn wie die Live/Dead Aufnahmen zeigen, sind die meisten Zellen vital (vgl. Abbildung 41, Abbildung 42 und Abbildung 43). Darüber hinaus zeigt diese Analyse auch, dass die Sekretion dieser Matrixbestandteile nicht bei allen Stämmen gleich abläuft oder gleich essentiell ist. Die Analyse der klinischen Isolate MRSA 9, SCV und BP zeigen, dass bereits innerhalb einer Familie von Bakterien Unterschiede herrschen. Während der DSM Stamm eine starke eDNA Sekretion aufweist, zeigen MRSA 9 und SCV kaum eDNA, und MRSA BP hingegen nur bei zwei AMP. Möglicherweise unterliegt die Anhaftung des Biofilms der MRSA Stämmen einem anderen Mechanismus, bei dem sie auf die Ausschüttung von eDNA verzichten können. Möglicherweise ist hier die EPS von größerer Bedeutung, denn hier lag auch gerade bei MRSA BP eine stark schleimige Substanz schon in den Übernachtskulturen (ohne Peptid) vor.

Die Analyse der EPS zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die eDNA Sekretion. Es liegen sowohl Peptide vor, die eine deutliche Sekretion großer Polymere zeigen, jedoch auch hier bildet das Peptid Gramicidin S eine Ausnahme. Hier entsteht selbst nach 3 Tagen Inkubation keine nennenswerte Menge an Biomasse. Auffallend ist jedoch der synergistische Mix PGLa/Mag2, der einen Trend zu einem höheren EPS Ausstoß zeigt. Möglicherweise könnte dies an dem, im Vergleich zu PGLa oder Mag2, veränderten Mechanismus und der erhöhten Stabilität der durch die Peptide gebildeten Pore liegen (Strandberg et al., 2015; Strandberg et al., 2013). In anderen Untersuchungen ist die synergistische Kombination ebenfalls als besonders aufgefallen, da es als einziges Peptid in subMHK Konzentrationen zur Bildung eines neuen Phänotyps geführt hat. Dieser wurde von Frau Kristina Schkolin (Schkolin, 2011) nach der Behandlung einer Small-Colony Variante (SCV) des Stammes MRSA 9 mit PGLa/Mag2 identifiziert und isoliert (Berditsch et al., Cell Symposium "Microbiome and Host Health", 2013). Interessanterweise zeigt dieser neue Phänotyp wieder eine Sensibilität gegenüber Methicillin

im Gegensatz zu seinem Ursprung MRSA 9 SCV. Schlussfolgernd lässt sich das Fazit ziehen, dass die Biofilminduktion oder induzierte Sekretion der Bakterien durch die verschiedenen Peptide (TisB, diverse AMP) deutliche Ähnlichkeiten zeigt. Diese Induktion ist jedoch stark abhängig von den bakteriellen Stämmen der Peptide und auch der Umgebung bzw. des Mediums der Versuche. Die Entdeckung jedoch, dass auch AMP Behandlung die Entstehung einer Matrix fördert, ist auf jeden Fall alarmierend und muss weitergehend untersucht werden.

## 6 Antimikrobielle Peptide

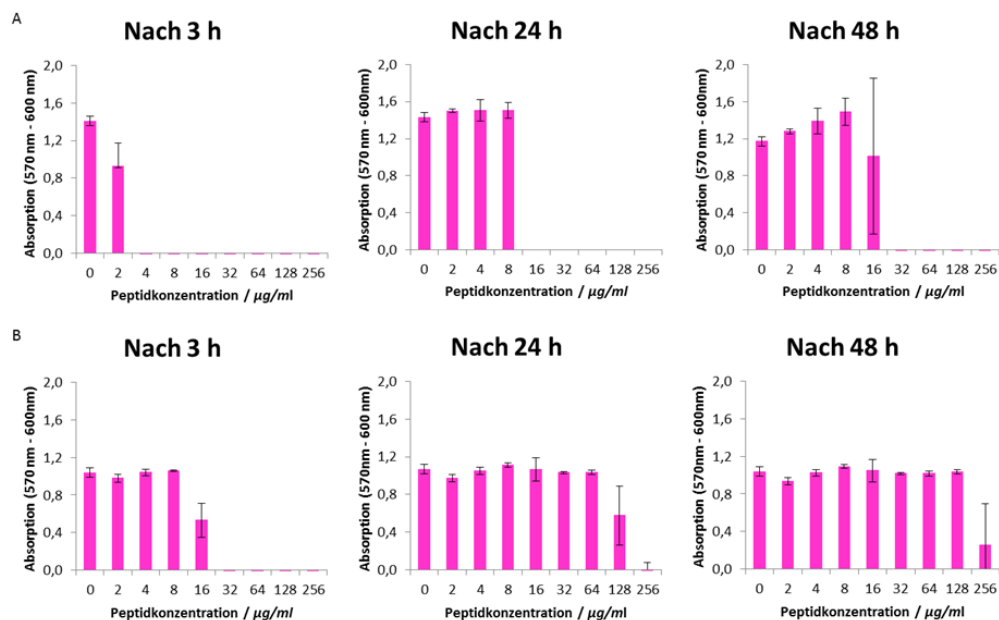
### 6.1 Ergebnisse

#### 6.1.1 Identifizierung von Biofilminduktion

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der AMP zu TisB und der bereits bekannten Gefahr der sublethalen Biofilminduktion konventioneller Antibiotika (Kaplan et al., 2012) und einiger AMP (Berditsch et al., 2012) wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch einige weitere AMP diese Charakteristik besitzen. Deshalb wurde hier ein breites Screening mehrerer dieser amphiphilen Peptide durchgeführt. In diesem Fall stellt das Finden von Biofilminduktion eine Gefahr dar, denn hier sind im Gegensatz zu TisB, Biofilme unerwünscht, da die Peptide als Alternative zu konventionellen Antibiotika in Frage kommen könnten. Die Biofilminduktion wurde durch Anwendung von Resazurin untersucht. Diese Methode wurde von Frau Dr. Marina Berditsch (Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie) entwickelt und in der Diplomarbeit von Frau Tatiana Vladimirova erstmal verwendet (Vladimirova, 2010). Hierfür benötigt man eine höhere Inokulationsdosis als beim standardisierten MHK-Test, um einen sofortigen Umschlag des Indikators zu ermöglichen, nämlich  $>10^7$  KbE/ml statt  $10^5$  KbE/ml (Sandberg et al., 2009). Dieser Redoxindikator ermöglicht es, die bakterielle Atmung über einen längeren Zeitraum zu beobachten und Änderungen schnell und einfach durch Spektrophotometrie nachzuweisen. Die Methode der längerfristigen Atmungsüberwachung ermöglicht mehrere Daten gleichzeitig zu sammeln. Man erhält sowohl den MHK- (nach 24 h) als auch den MBK-Wert (nach 48 h). Des Weiteren kann man den Verlauf der Inhibierung untersuchen und so erste Hinweise auf eine mögliche Entstehung von persistenten Zellen und damit Biofilminduktion bekommen. Es können hier grundsätzlich zwei Gruppen von AMP unterschieden werden. Einerseits die Peptide, die Biofilm induzieren und andererseits die Peptide, die keinen Biofilm induzieren. Zunächst wird auf die erste Gruppe eingegangen. Abbildung 49 zeigt das Ergebnis des



Atmungstests von den Peptiden PGLa und Mag2 (1:1, n/n) und dessen Einfluss auf *S. aureus* und *E. faecalis*.



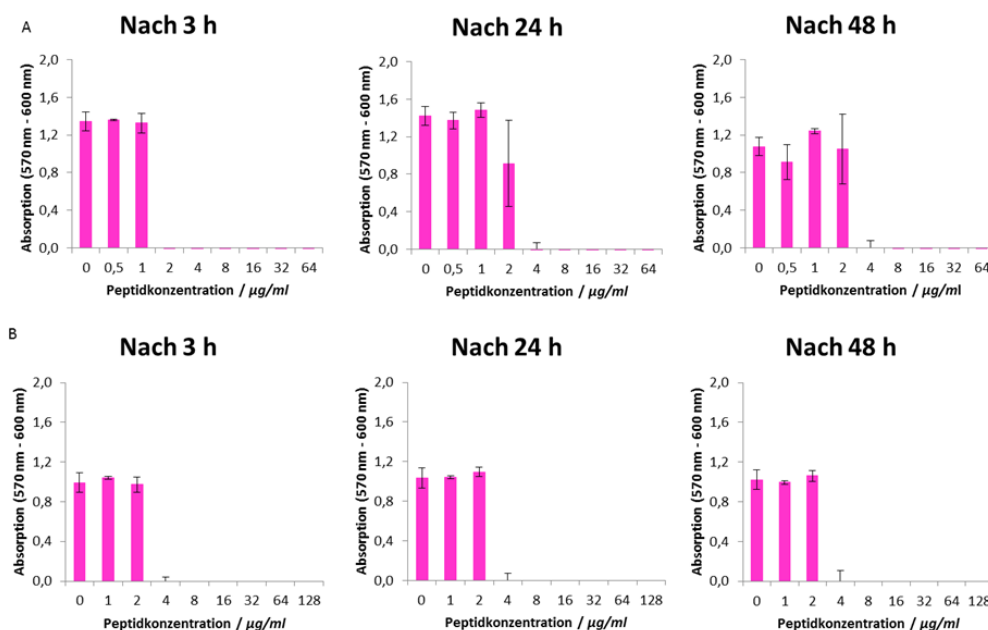
**Abbildung 49** Atmungsaktivität der Bakterien bei Behandlung mit PGLa/Mag2 (1:1). Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien *S. aureus* (A) und *E. faecalis* (B) inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

Die Tests wurden auch mit den 3 MRSA Phänotypen durchgeführt und sind im Anhang D gezeigt. Die beiden *E. faecalis* Isolate wurden in der Bachelorarbeit von Herrn Angel Cerecedo Delgado (Cerecedo Delgado, 2014) vorgestellt. Die Ergebnisse des Atmungstests zeigen, dass zunächst die Bakterien nach 3 h stark inhibiert werden, jedoch nach 24 h und nach 48 h die Atmung der Bakterien in zunächst inhibierten Konzentrationen wieder aktiviert wird. In genau diesen Konzentrationsbereichen kann die Biofilminduktion beobachtet werden. Diese Konzentrationen sind es auch, in denen die besondere Sekretion von eDNA und EPS gezeigt werden konnte. In diesem Fall konnte bei beiden Stämmen eine Biofilminduktion in subMHK Konzentrationen festgestellt werden. Diese Biofilme sind in Abbildung 51 gezeigt. Die

## Identifizierung von Biofilminduktion

Biofilme, die man in dieser Abbildung sieht, sind bereits so groß, dass sie ohne Mikroskop in den Mikrotiterplatten entdeckt werden können. Durch die Beobachtung der Atmungsaktivität lassen sich die MHK (24 h) und MBK (48 h) Werte des Peptids ablesen. Zu erwähnen ist hierbei, dass der MHK dieses Tests nicht zu vergleichen ist mit dem MHK des Standardtests. Durch die höhere Inokulationsdosis ist der Wert der Atmungsaktivitätsüberwachung meist 1-2 Verdünnungsstufen höher. In diesem Fall liegen diese Werte für *S. aureus* bei 16 und 32 µg/ml und für *E. faecalis* bei 256 und 512 µg/ml. Die MBK Werte wurden zusätzlich mit einer Spotting-Methode verifiziert.

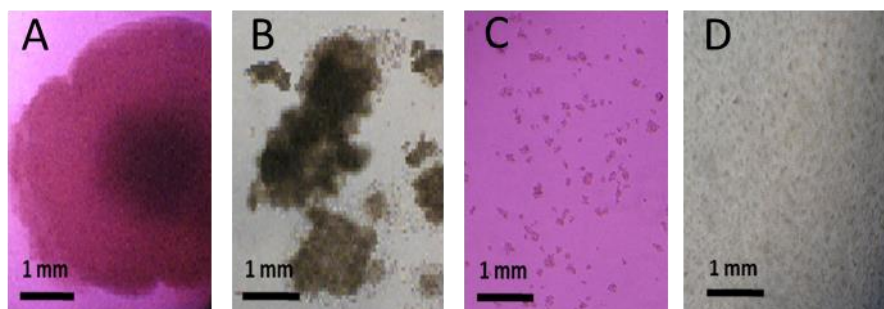
Die zweite Gruppe Peptide induzieren keine Biofilme. Als Beispiel werden in Abbildung 50 die Ergebnisse von Gramicidin S gezeigt.



**Abbildung 50** Atmungsaktivität der Bakterien bei Behandlung mit Gramicidin S. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien *S. aureus* (A) und *E. faecalis* (B) inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

Gramicidin S ist ein sehr effektives antimikrobielles Peptid. Es hat für *S. aureus* MHK- und MBK-Werte von 4 und 8 µg/ml. Für *E. faecalis* liegen

beide Werte bei 8 µg/ml bzw. der MHK Wert liegt zwischen 4 und 8 µg/ml. Nach 24 h und 48 h findet keine erneute Atmung bei beiden Stämmen statt. Es scheint, dass hier nach 24 h einmal inhibierte Zellen nicht mehr aufwachen und es gibt nach der Untersuchung unter dem Mikroskop auch keinerlei Hinweise auf Biofilmbildung (siehe Abbildung 51).



**Abbildung 51** PGLa/Mag2 induzierte Biofilme von (A) *S. aureus* (8µg/ml) und (B) *E. faecalis* (32 µg/ml). Keine sichtbare Biofilminduktion ist zu sehen bei Zugabe von GS (C) *S. aureus* (2µg/ml) und (D) *E. faecalis* (2 µg/ml). Die Biofilminduktion bei *S. aureus* wurde bei einer Peptidkonzentration von 16 µg/ml gefunden und bei *E. faecalis* bei einer Konzentration von 128 µg/ml. Aufgenommen mit dem Inversmikroskop und einer 40-fachen Vergrößerung direkt aus den Mikrotiterplatten des Atmungstests nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

Die Beobachtungen unter dem Mikroskop sind im Falle von Gramicidin S für alle getesteten Stämme gleich. Keine Biofilmbildung ist zu erkennen. Ein Vergleich aller getesteten AMP/Antibiotika miteinander zeigt, dass die Biofilminduktion von Peptid und Stamm abhängig ist. Die folgenden Tabellen zeigen alle MHK- und MBK-Werte mit einer Inokulationsdosis  $5 \cdot 10^7$  KbE/ml. Außerdem werden die biofilminduzierenden Peptide mit einem Plus-Zeichen markiert.

## Identifizierung von Biofilminduktion

**Tabelle 10** MHK- und MBK-Werte von allen Peptiden und zwei konventionellen Antibiotika und den Stämmen *S. aureus* 1104, MRSA 9, SCV und BP. Alle Werte wurden mit einer hohen Inokulationsdosis von  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml bestimmt. Die MHK-Werte wurden aus der Atmungsüberwachung nach 24 h abgelesen und die MBK-Werte wurden nach 48 h durch den Spotting-Assay bestimmt. Die Tests wurden in MH Medium durchgeführt. Die biofilminduzierenden Peptide wurden mit einem Plus-Zeichen versehen und die nicht-induzierenden mit einem Minus.

Peptide	<i>S. aureus</i> DSM 1104				MRSA 9				MRSA SCV				MRSA BP			
	MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm		MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm		MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm		MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm	
Gramicidin S	4	8	-		8	16	-		8	16	-		4	16	-	
Gramicidin A	4	8	-		8	>64	-		8	>64	-		8	>64	+	
PGLa	128	256	+		64	256	-		64	256	-		128	>256	-	
Magainin2	>256	>256	+		>1024	>1024	-		>1024	>1024	-		>1024	>1024	+	
PGLa/Mag2 (1:1)	16	64	+		32	128	+		32	128	+		64	256	+	
MSI-103	16	16	-		32	128	-		16	64	-		16	64	-	
MAP	8	16	+		16	64	-		16	64	-		8	32	+	
TemporinA	64	256	-		64	256	-		64	256	-		64	256	-	
TemporinL	4	8	-		16	32	-		16	32	-		32	128	+	
Temporin Shf	>512	>512	-		>512	>512	-		>512	>512	-		>512	>512	+	
LL-37	256	>256	-		512	>512	-		512	>512	-		512	>512	-	
DCD-1L	>256	>256	-		>256	>256	-		>256	>256	-		>256	>256	-	
SSL-25	>256	>256	-		>512	>512	-		>512	>512	-		>512	>512	-	
Alamethicin	>512	>512	-		>512	>512	-		>512	>512	-		>512	>512	-	
TP10	32	64	+		16	64	+		16	64	+		32	32	+	
BP100	16	64	-		32	64	-		32	64	+		32	64	+	
KIGAKI	256	>1024	-		64	64	+		64	64	+		64	128	+	
Vancomycin	4	8	+		>64	>64	-		>64	>64	-		64	64	-	
Demeclocyclin	<0.5	2	-		>64	>64	-		>64	>64	-		>64	>64	-	

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Atmungsüberwachung. Selbst zwischen den MRSA Stämmen finden sich Unterschiede in der

Biofilminduktion. Bei MRSA BP zeigen einige Peptide häufiger Biofilminduktion als bei anderen MRSA Stämmen. Da dieser der Biofilmphänotyp ist, erscheint dies logisch. MRSA 9 und SCV zeigen gleiche Ergebnisse. In der Transformation des Stammes in seine SCV-Form scheint die Toleranz gegenüber Antibiotika in diesem Fall nicht beeinflusst zu werden, erst durch den Übergang zum Biofilmphänotyp. Dadurch wird der Stamm aber nicht unbedingt toleranter gegenüber den getesteten Peptiden und Antibiotika. Es ist auch nicht auszuschließen, dass der Phänotyp eine Rücktransformation in den Ursprungstamm macht, da auf den Agarplatten des SCV-Stammes immer beide Kolonientypen zu sehen sind (von Eiff et al., 2006). Der Vergleich zwischen Peptiden und den konventionellen Antibiotika zeigt, dass einige der Peptide aktiver sind. Hier sind vor allem Gramacidin S, A, MSI-103 und TemporinL zu nennen. Vor allem bei den Ergebnissen für die MRSA Stämme zeigen diese Peptide eine weitaus deutlichere Effektivität als die beiden getesteten konventionellen Antibiotika. Die Peptide können tatsächlich eine alternative Therapiemöglichkeit darstellen. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse für die *E. faecalis* Stämme zu sehen.

## Identifizierung von Biofilminduktion

**Tabelle 11** MHK- und MBK-Werte von allen Peptiden und zwei konventionellen Antibiotika und den Stämmen *E. faecalis* 2570, WW4 und WW6. Alle Werte wurden mit einer hohen Inokulationsdosis von  $10^8$  KbE/ml bestimmt. Die MHK-Werte wurden aus der Atmungsüberwachung nach 24 h abgelesen und die MBK-Werte wurden nach 48 h durch den Spotting-Assay bestimmt. Die Tests wurden in MH Medium durchgeführt. Die biofilminduzierenden Peptide wurden mit einem Plus-Zeichen versehen und die nicht-induzierenden mit einem Minus. Die Werte für die beiden Stämme WW4 und WW6 stammen aus der Bachelorarbeit von Herrn Angel Cereceda Delgado (**Cereceda Delgado, 2014**).

Peptide	<i>E. faecalis</i> DSM 2570			<i>E. faecalis</i> WW4			<i>E. faecalis</i> WW6		
	MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm	MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm	MHK [µg/ml]	MBK [µg/ml]	Biofilm
Gramicidin S	4	8	-	16	>128	-	128	>128	-
Gramicidin A	2	4	-	<0,25	<0,25	-	<0,25	<0,25	-
PGLa	>256	>256	-	512	>512	+	>512	>512	+
Magainin2	>256	>256	-	>1024	>1024	-	>1024	>1024	-
PGLa/Mag2 (1:1)	>256	>256	+	128	>256	-	>256	>256	-
MSI-103	256	>256	-	>256	>256	-	>256	>256	-
MAP	32	64	+	16	>64	-	>64	>64	-
TemporinA	256	>256	-	64	256	-	>256	>256	-
TemporinL	32	64	-	32	>512	-	128	>512	-
Temporin Shf	>512	>512	-	>128	>128	+	>128	>128	+
LL-37	>256	>256	-	512	>1024	+	>1024	>1024	+
DCD-1L	>256	>256	-	>1024	>1024	-	>1024	>1024	-
SSL-25	>256	>256	-	>1024	>1024	-	>1024	>1024	-
Alamethicin	256	512	-	>512	>512	+	>512	>512	+
TP10	256	256	+	32	128	-	>256	>256	-
BP100	128	256	+	256	>512	+	>512	>512	+
KIGAKI	1024	>1024	+	128	>256	+	>256	>256	+
Vancomycin	1024	>>	-	>64	>64	-	>64	>64	-
Demeclocyclin	4	64	-	>32	>32	-	>32	>32	-

Auch diese Ergebnisse zeigen den Unterschied der Wirksamkeit der Peptide zwischen den Stämmen. Tatsächlich ist der *E. faecalis* Stamm WW6, isoliert aus einer Wurzelkanalentzündung (Wade, 2013), der toleranteste Stamm. Hier liegen hohe MHK-Werte vor und er bildet auch am schnellsten Biofilme, z.B. beim menschlichen antimikrobiellen Peptid LL-37. Das wirksamste Peptid ist hier vor allem Gramicidin A.

Interessanterweise ist dieses Peptid wirksamer gegen die Enterokokken, was auch aus der Literatur bekannt ist (Harold et al., 1967). Die konventionellen Antibiotika zeigen hier eine stark erhöhte Wirkungskonzentration von mehreren Verdünnungsstufen. In beiden Tabellen ist festzustellen, dass die Peptide DCD-1L und SSL-25 keine Aktivität aufweisen. Diese Problematik wird später diskutiert.

### **6.1.2 Biofilminduktion und Oberflächenanhaftung**

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass AMP eine tatsächliche Alternative zu konventionellen Antibiotika darstellen können. Deshalb müssen sowohl die Risiken, als auch die Möglichkeiten beleuchtet werden. In Kapitel 6.1.1 wurde die Gefahr der Biofilminduktion durch subMHK Konzentrationen der AMP und Antibiotika gezeigt. Nun geht es weiterhin um die Anwendung, wie beispielsweise die Möglichkeit, der Entstehung von Biofilmen vorzubeugen, indem man den ersten Schritt der bakteriellen Oberflächenanhaftung verhindert. Hierzu wurde zusätzlich zu den reinen MHK-Auswertungen und den Tests mit Resazurin auch untersucht, wie sich die Biofilme entwickeln, wenn die Peptide direkt zu den planktonischen Zellen der Testkulturen gegeben werden. Dies wurde mit Kristallviolett ausgewertet und eine biofilmfreundliche Umgebung gewählt, um zu prüfen, ob die AMP und Antibiotika die Biofilmanhaftung an Oberflächen, trotz optimaler Bedingungen für die Biofilme, unterdrücken können. Der bestimmte Wert wird als Konzentration der Minimalen biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) bezeichnet und definiert die Peptidkonzentration, bei der im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger (50% weniger) Biofilm entstanden ist. Tabelle 12 und Tabelle 13 zeigen die Ergebnisse dieses Tests. Zu wünschen sind Werte, die die Anhaftung der Bakterien an die feste Oberfläche bereits bei niedrigen Konzentrationen unterdrücken. Dies würde bedeuten, dass die Peptide/Antibiotika in der Lage sind, auch in niederen Dosen eine primäre Anhaftung zu behindern. Diese Werte sagen jedoch nichts über die Bildung von dormanten Zellen aus, die sich wie in der Atmungsüberwachung gezeigt, nach 48 h trotzdem zu einem Biofilm

formen können. Im Falle dieses Tests werden die Peptide und Antibiotika nur auf ihren primären Effekt getestet und nach 24 h mögliche gebildete, persistente Zellen im planktonischen Wachstum im Überstand gewaschen. Diese Ergebnisse deuten auf einen möglichen Einsatz der Peptide als Oberflächenbeschichtungen zur Prävention von Infektionen auf beispielsweise Implantate hin. Sie sagen jedoch nichts aus über die Entwicklung von persistenten Zellen.



## Biofilminduktion und Oberflächenanhaftung

**Tabelle 12** Werte der Hemmung von Biofilmbildung der Bakterien. Biofilme bildeten sich an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte mit den Stämmen *S. aureus*, MRSA 9, MRSA SCV und MRSA BP in LBG Medium. Der MBHK gibt eine mind. 50%ige Verminderung der Biofilmmasse an.

Peptide	MBHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	<i>S. aureus</i> DSM 1104	MRSA 9	MRSA SCV	MRSA BP
Gramicidin S	4	8	8	8
Gramicidin A	1	<0,5	0,5	<0,5
PGLa	32	64	64	64
Magainin2	64	512	512	512
PGLa/Mag2 (1:1)	8	32	32	32
MSI-103	64	64	64	32
MAP	8	8	8	8
TemporinA	8	32	64	128
TemporinL	8	8	8	16
TemporinShf	64	64	64	64
LL-37	>1024	1024	>1024	512
DCD-1L	>1024	>1024	>1024	>1024
SSL-25	>1024	>1024	>1024	>1024
Alamethicin	16	32	32	128
TP10	32	32	32	32
BP100	32	128	128	128
KIGAKI	64	128	256	512
Vancomycin	< 1	<0,5	<0,5	1
Demeclocyclin	< 0,5	<0,5	<0,5	<0,5

An den Werten erkennt man, dass so gut wie jedes AMP und auch die Antibiotika die Oberflächenanhaftung der Bakterien und Biofilmbildung behindert. Hauptsächlich die beiden Gramicidine und die konventionellen Antibiotika zeigen die besten Ergebnisse. Jedoch zeigen selbst hier die

beiden Peptide DCD-1L und SSL-25 keine Aktivität und LL-37 nur auf den Biofilmphänotyp von MRSA 9.

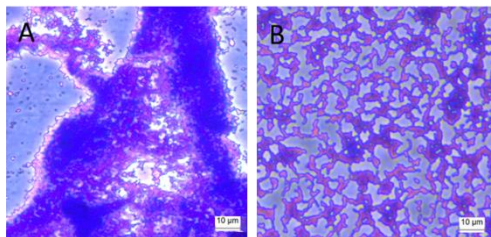
**Tabelle 13** Werte der Hemmung von Biofilmbildung der Bakterien. Biofilme bildeten sich an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte mit den Stämmen *E. faecalis*, *E. faecalis* WW4 und WW6 in LBG-Medium. Der MBHK gibt eine mind. 50%ige Verminderung der Biofilmmasse an.

Peptide	MBHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	<i>E. faecalis</i> DSM 2570	<i>E. faecalis</i> WW4	<i>E. faecalis</i> WW6
Gramicidin S	4	8	8
Gramicidin A	1	<0,5	<0,5
PGLa	256	256	512
Magainin2	64	64	128
PGLa/Mag2 (1:1)	16	32	128
MSI-103	128	256	256
MAP	8	8	32
TemporinA	256	64	128
TemporinL	8	16	32
Temporin Shf	256	64	128
LL-37	32	512	512
DCD-1L	>1024	>1024	>1024
SSL-25	>1024	>1024	>1024
Alamethicin	8	64	32
TP10	8	16	128
BP100	64	256	512
KIGAKI	32	256	128
Vancomycin	<1	1	1
Demeclocyclin	<0,5	4	0,5

Bei den *E. faecalis* Stämmen kann man ein ähnliches Bild sehen. Interessant ist, dass LL-37 hier nun auch Aktivität zeigt und bisher eigentlich aktiver gegen *S. aureus* war. Gramicidin A zeigt gegen die Enterokokken die besten Werte, zusammen mit den konventionellen Antibiotika. Die Werte der Biofilmhemmung liegen in ähnlichen Bereichen wie die MHK-Werte oder auch darunter. Einige der AMP und auch die konventionellen Antibiotika sind damit fähig Biofilmanhaftung präventiv zu verhindern.

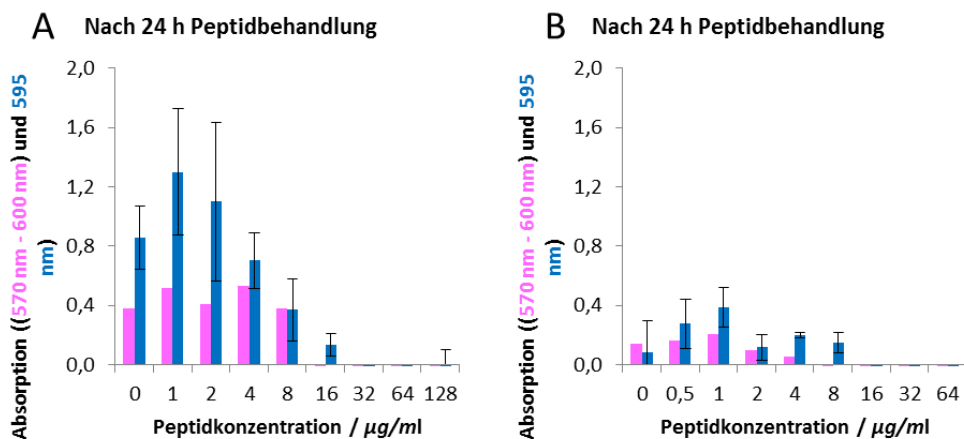
### 6.1.3 Biofilmbekämpfung

Trotz der Gefahr der Biofilminduktion in subMHK Konzentrationen sollte auch festgestellt werden, ob die AMP in der Lage sind, existierende Biofilme zu bekämpfen. Hierbei muss man zwischen der Fähigkeit der Oberflächenablösung und Abtötung der Biofilme unterscheiden. Ein perfektes antimikrobielles Therapeutikum sollte beide Fähigkeiten besitzen. Wird der Biofilm nur abgelöst, können sich die Bakterien weiter im Körper ungehindert verbreiten, wird der Biofilm nur abgetötet kann er als Nährmedium für neue Bakterienherde und neue Biofilmbildung dienen. Um beide Fähigkeiten zu untersuchen, wurde hier eine Kombination aus kolorimetrischer Methode und Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Zum einen wurde die Biofilm atmungshemmende Konzentration (MBAHK) und biofilmeliminierende Konzentration (MBEK) mittels Resazurin und Kristallviolett ermittelt. Erwähnenswert ist, dass nicht alle getesteten Stämme gleich gut Biofilme bilden und sich diese auch stark in ihrer Struktur unterscheiden. In Abbildung 52 kann das unterschiedliche Wachstum der beiden Stämme gut erkannt werden. Während *S. aureus* dick und geballt an einem Ort wächst (A), wächst *E. faecalis* wie ein feines Netz (B). Dieses Verhalten könnte sich natürlich auch auf die Stabilität der Biofilme auswirken.



**Abbildung 52** Biofilme von *S. aureus* (A) und *E. faecalis* (B) angefärbt mit Kristallviolett nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

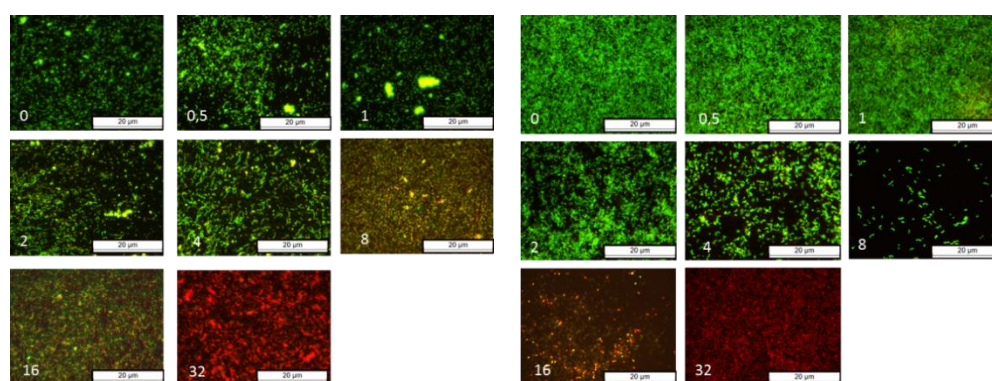
Ob die Biofilme tatsächlich auch abgetötet sind, wurde mit Hilfe der Farbstoffe der Live/Dead Färbung bestimmt. In der nächsten Abbildung ist das Ergebnis des Peptids Gramicidin S gezeigt, welches am effektivsten Biofilme auflöst.



**Abbildung 53** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Gramicidin S. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A) und *E. faecalis* (B) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

Auffallend in Abbildung 53 B ist, dass die Intensität der Kristallviolett färbung der *E. faecalis* Biofilme wesentlich geringer ist als die der *S. aureus* Biofilme. Dies konnte auch durch die Untersuchung mit dem Inversmikroskop bestätigt werden. Die *S. aureus* Biofilme wachsen wesentlich schneller und dichter als die *E. faecalis* Biofilme, welche zunächst eher 2-dimensional in einer Lage auf dem Boden der

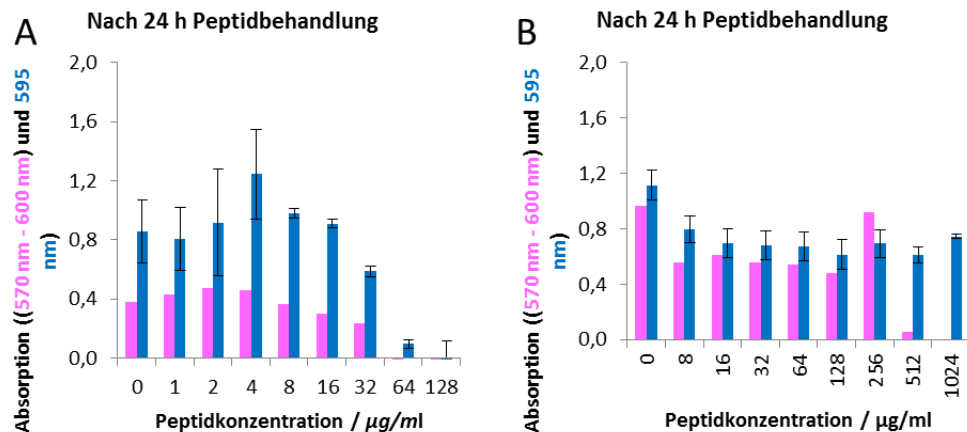
Mikrotiterplatten wachsen (siehe Abbildung 52). Der Verlauf der Kurve über die Peptidkonzentrationen ist charakteristisch. Man erkennt, dass ab einer bestimmten Schwellenkonzentration die Menge des Biofilms über ein Maximum verläuft und dann abnimmt. Diese Schwellenkonzentration bezeichnet häufig den MHK-Wert des Peptids und ab hier beginnt eine erste Hemmung der Bakterien. Im Fall von Gramicidin S ist dieses Peptid sogar aktiver gegen *E. faecalis* Biofilme als gegen *S. aureus* Biofilme im Gegensatz zu den MHK- und MBK-Werten im planktonischen Wachstum, bei dem *E. faecalis* toleranter gegen Gramicidin S ist. Abbildung 54 zeigt nun die zu den Ergebnissen von Abbildung 53 dazugehörigen Live/Dead Färbungen mit *S. aureus* und *E. faecalis*.



**Abbildung 54** Live/Dead Färbung der *S. aureus* (links) und *E. faecalis* (rechts) Biofilme nach Behandlung mit Gramicidin S. Die Biofilme wurden zunächst über 24 h angezogen und danach für 24 h mit Gramicidin S behandelt. Die Peptidkonzentration wurde mit den weißen Zahlen in den Bildern in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben. Die Inkubation erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$ . Grüne Zellen sind lebendig, rote Zellen sind tot und gelbe Zellen sind eine Überlagerung von rot und grün. Bei  $32 \mu\text{g/ml}$  Gramicidin S sind alle Zellen tot. Die Bilder wurden mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt  $20 \mu\text{m}$ .

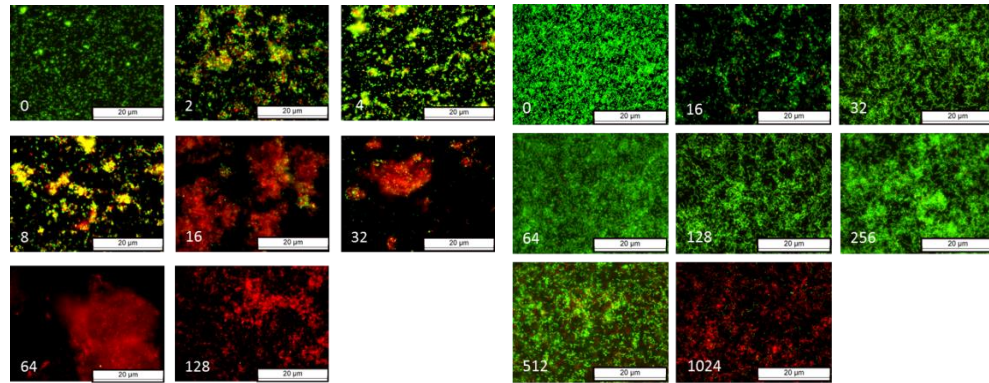
Beide Stämme erscheinen ab  $8 \mu\text{g/ml}$  die Bakterien nicht mehr gesund und sind definitiv ab  $32 \mu\text{g/ml}$  Gramicidin S tot. Die Live/Dead Färbungen sind dahin gehend übereinstimmend mit den Ergebnissen der Kristallviolett färbung und der Atmungskontrolle und unterstützen die Methode. Als weiteres Beispiel wird hier jetzt noch ein Peptid gewählt, das in Kapitel 6.1.1 zwar als aktiv aber biofilminduzierend charakterisiert wird.

Hiermit wird gezeigt, dass solche Peptide mit besonderer Vorsicht in subMHK Konzentrationen gehandhabt werden müssen und dennoch in genügend hohen Konzentrationen zur Therapie verwendet werden können. In Abbildung 55 werden die Ergebnisse des Peptids MAP gezeigt.



**Abbildung 55** Bestimmung der MBAHK und MBEK von MAP. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A) und *E. faecalis* (B) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

MAP löst nur den *S. aureus* Biofilm ab. *E. faecalis* ist zwar metabolisch gestört wie die Atmungskontrolle zeigt, aber die Biomasse befindet sich noch immer an der Platte bzw. dem CBD. Ob die Zellen noch lebendig sind, zeigen die Ergebnisse der Live/Dead Färbung in der nächsten Abbildung.



**Abbildung 56** Live/Dead Färbung der *S. aureus* (links) und *E. faecalis* (rechts) Biofilme nach Behandlung mit MAP. Die Biofilme wurden zunächst über 24 h angezogen und danach für 24 h mit Gramicidin S behandelt. Die Peptidkonzentration wurde mit den weißen Zahlen in den Bildern in µg/ml angegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Grüne Zellen sind lebendig, rote Zellen sind tot und gelbe Zellen sind eine Überlagerung von rot und grün. Bei 32 µg/ml Gramicidin S sind alle Zellen tot. Die Bilder wurden mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstab beträgt 20 µm.

Beide Versuche zeigen, dass MAP erst bei höheren Konzentrationen zu wirken beginnt. Zusätzlich zu den Kristallviolettergebnissen sagen die Daten, dass MAP im Vergleich zu GS schwächer wirkt und bei *E. faecalis* auch zu keiner Ablösung der Biofilme führt. In den folgenden Tabellen können nun die MBAHK und MBEK-Werte der anderen getesteten Peptide und der beiden Antibiotika entnommen werden.

**Tabelle 14** MBAHK- und MBEK-Werte aller getesteten Peptide und der zwei konventionellen Antibiotika mit den Stämmen *S. aureus*, MRSA 9, MRSA SCV und MRSA BP. Es wurde der Effekt der Peptide auf bereits bestehende Biofilme in LBG Medium untersucht.

Peptide	<i>S. aureus</i> DSM 1104		MRSA 9		MRSA SCV		MRSA BP	
	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]
Gramicidin S	16	32	64	>128	64	>128	32	>128
Gramicidin A	32	32	>128	>128	>128	>128	128	>128
PGLa	256	>512	1024	>1024	1024	>1024	512	512
Magainin2	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
PGLa/Mag2 (1:1)	128	256	1024	>1024	1024	>1024	256	>1024
MSI-103	64	512	512	>1024	512	>1024	256	>1024
MAP	64	128	256	>1024	512	>1024	512	>1024
TemporinA	64	512	256	1024	256	256	128	>1024
TemporinL	64	128	512	>512	512	>512	64	>512
Temporin Shf	256	512	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
LL-37	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
DCD-1L	>128	>128	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
SSL-25	>128	>128	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Alamethicin	64	>512	>256	>256	>256	>256	>256	>256
TP10	256	512	1024	>1024	1024	>1024	1024	>1024
BP100	64	>512	>256	>256	>256	>256	1024	>1024
KIGAKI	>512	>512	1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Vancomycin	4	32	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Demeclocyclin	<0.5	<0.5	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024



**Tabelle 15** MBAHK- und MBEK-Werte aller getesteten Peptide und der zwei konventionellen Antibiotika mit den Stämmen *E. faecalis*, *E. faecalis* WW4 und WW6. Es wurde der Effekt der Peptide auf bereits bestehende Biofilme in LBG Medium untersucht.

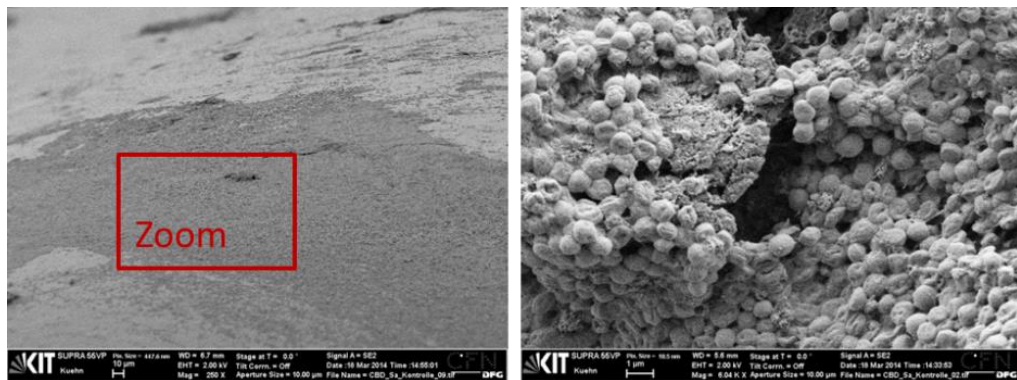
Peptide	<i>E. faecalis</i> DSM 2570		<i>E. faecalis</i> WW4		<i>E. faecalis</i> WW6	
	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]	MBAHK [µg/ml]	MBEK [µg/ml]
Gramicidin S	8	16	64	>64	64	64
Gramicidin A	>256	>256	>1024	>1024	>1024	>1024
PGLa	>512	>512	>1024	>1024	>1024	>1024
Magainin2	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
PGLa/Mag2 (1:1)	512	512	1024	>1024	1024	>1024
MSI-103	>512	>512	>1024	>1024	>1024	>1024
MAP	1024	>1024	512	>1024	1024	>1024
TemporinA	>512	>512	1024	>1024	>1024	>1024
TemporinL	256	>256	256	>512	512	>512
Temporin Shf	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
LL-37	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
DCD-1L	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
SSL-25	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Alamethicin	64	>512	64	64	32	32
TP10	1024	>1024	1024	>1024	>1024	>1024
BP100	>512	>512	>1024	>1024	>1024	>1024
KIGAKI	>512	>512	>1024	>1024	>1024	>1024
Vancomycin	>64	>64	>1024	>1024	>1024	>1024
Demeclocyclin	16	>64	>1024	>1024	>1024	>1024

Die Werte der beiden Tabellen zeigen eindeutig, dass *E. faecalis* die stabileren Biofilme bildet und nur schwer abzulösen bzw. abzutöten ist. Kaum ein Peptid kann es mit diesen Biofilmen aufnehmen, jedoch auch nicht die beiden konventionellen Antibiotika. Einzig GS zeigt gegen alle Stämme eine durchweg gute Aktivität im Vergleich zu den anderen, aber

auch Alamethicin erscheint als eines der wirkungsvolleren AMP. Auffallend sind auch die Werte von GA. Dieses Peptid ist gegen die planktonischen Bakterien noch sehr aktiv, aber gegen Biofilmwachstum scheint es nichts ausrichten zu können. Aus Tabelle 10 und Tabelle 11 kann man ersehen, dass GA eine sehr hohe Aktivität gegen planktonischen *E. faecalis* hat, gegen *E. faecalis* als Biofilm ist es jedoch nicht aktiv. Möglicherweise ist es diesem Peptid nicht möglich durch die EPS vorzudringen im Gegensatz zu den bereits genannten Peptiden GS und Alamethicin.

#### **6.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme auf zwei unterschiedlichen Oberflächen**

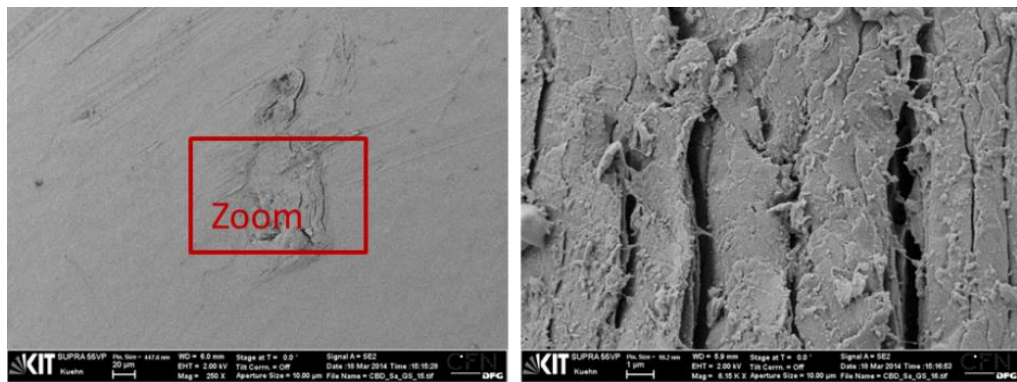
In den bisherigen Methoden wurden nur Biofilme untersucht, die auf Mikrotiterplatten oder dem Calgary Biofilm Device (CBD) gewachsen sind. Es ist jedoch auch unerlässlich, Biofilme zu untersuchen, die an natürlichen Oberflächen haften. Durch eine andere Oberflächenbeschaffenheit kann sich für die Bakterien und damit auch die Agenzien, die sie angreifen, alles verändern. Deshalb wurden mit zwei unterschiedlichen Mikroskopiearten neue Versuche angestellt, um die Veränderung der Biofilmbeschaffenheit zu verdeutlichen. Einerseits wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) Biofilm auf dem Polystyrol des CBD untersucht und andererseits im Vergleich dazu, wurde die Helium-Ionen-Mikroskopie (HIM) zur Untersuchung von Biofilmen verwendet, die auf Hydroxylapatitscheiben wachsen gelassen wurden. Diese Scheiben ähneln in ihrer Beschaffenheit stark der Beschaffenheit von Zähnen und Knochen. Diese Versuche sollen zeigen, wie ein effektives AMP (GS) verwendet werden könnte und dass es eine gute Alternative zu konventionellen Antibiotika darstellen kann. Zunächst wird der natürlich gebildete *S. aureus* Biofilm in Abbildung 57 betrachtet.



**Abbildung 57** Natürlich gesunder Biofilm von *S. aureus*. Der Biofilm wächst auf dem Polystyrol des CBD und wurde 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium inkubiert. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die REM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 250-fache und das rechte Bild 5000-fache Vergrößerung des Biofilms. Aufgenommen mit einem REM.

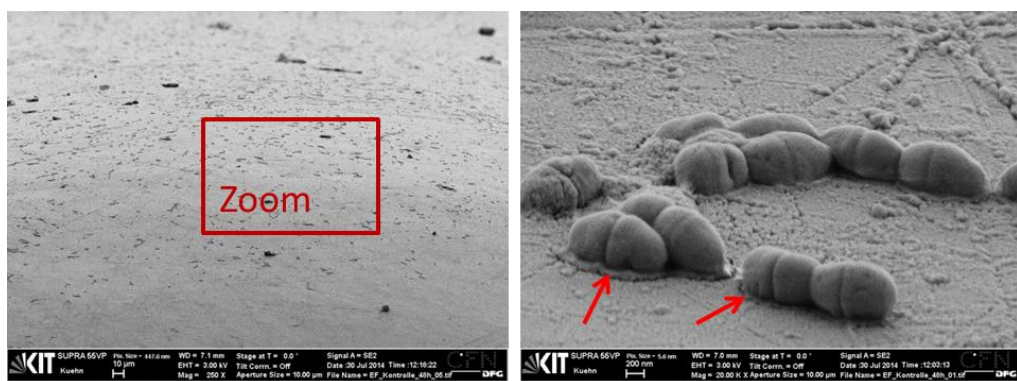
Der Biofilm von *S. aureus* wächst sehr dicht aneinander und bildet ein geschlossenes Aggregat. Die Zellen sehen alle sehr gesund aus bis auf ein paar deformierte Zellen, die aber in einem solchen Gebilde normal vorkommen. Außerdem ist ersichtlich, dass die Zellen auf einer Art organischer Struktur sitzen, die wahrscheinlich die gebildete EPS darstellt. Der Biofilm von *S. aureus* nach der Behandlung mit GS zeigt ein ganz anderes Bild als die Kontrolle. Es sind keine Zellen mehr aufzufinden. Einige Überreste organischer Substanzen sind zu finden, die womöglich Reste von EPS sind und die nicht mit abgelöst wurden. Die Behandlung von GS ist hier sehr effektiv und löst den Biofilm komplett ab wie es auch schon die Kristallviolettergebnisse andeuteten.

## Elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme auf zwei unterschiedlichen Oberflächen



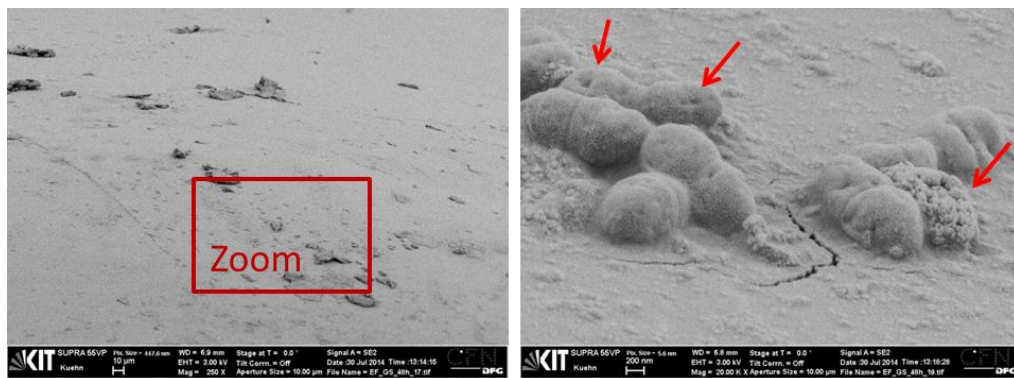
**Abbildung 58** Biofilm von *S. aureus* nach Behandlung mit GS. Die Biofilme wurden zunächst 24 h auf dem CBD wachsen gelassen und danach mit 32 µg/ml GS für 24 h behandelt. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die REM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 250-fache und das rechte Bild 5000-fache Vergrößerung des Biofilms. Aufgenommen mit einem REM.

Der Biofilm von *E. faecalis* wächst wie bereits in einem vorigen Kapitel angesprochen ganz anders als der Biofilm von *S. aureus*. Er scheint sich eher zunächst über die Oberfläche zu verteilen, bevor er in die Höhe wächst und sich zusammenschließt. Auf diesen Bildern (Abbildung 58) ist jedoch sehr deutlich zu sehen, wie die einzelnen Bakterien auf einer Art Bett aus EPS sitzen. Zum Großteil befinden sie sich auch gerade im Moment der Teilung, das bedeutet, sie sind sehr gesund.



**Abbildung 59** Natürlich gesunder Biofilm von *E. faecalis*. Der Biofilm wächst auf den Polystyrol des CBD und wurde 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium inkubiert. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die REM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 250-fache und das rechte Bild 5000-fache Vergrößerung des Biofilms. Die roten Pfeile zeigen auf eine organische Substanz zwischen Zellen und Oberfläche, die möglicherweise EPS darstellt. Aufgenommen wurde mit einem REM.

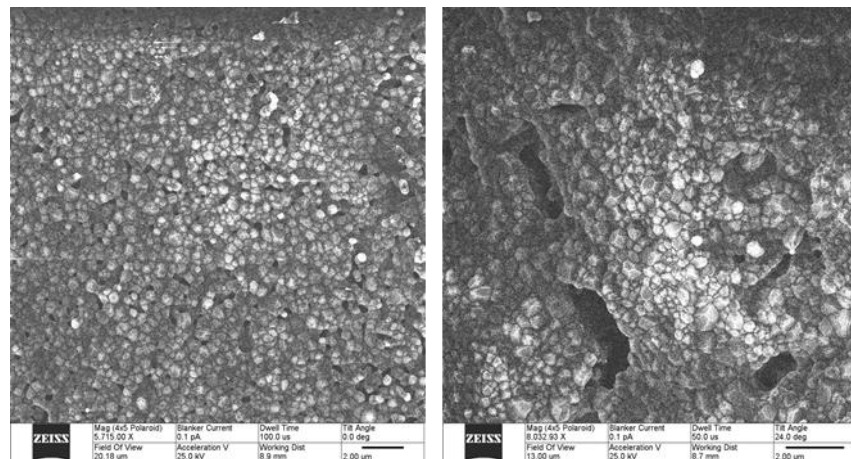
Diese Biofilme wurden nach 24 h Wachstum mit 32 µg/ml GS behandelt. Das Ergebnis dieser Behandlung ist in Abbildung 60 zu sehen. Hier liegt ein anderes Bild vor. Es sind noch Überreste von Zellen zu sehen. Diese sind jedoch stark in Mitleidenschaft gezogen und haben Löcher und Dellen. Sie sehen im Gegensatz zu der Kontrolle überhaupt nicht mehr gesund aus, lösen sich jedoch nicht vollständig ab.



**Abbildung 60** Biofilm von *E. faecalis* nach Behandlung mit GS. Die Biofilme wurden zunächst 24 h auf dem CBD wachsen gelassen und danach mit 32 µg/ml GS für 24 h behandelt. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die REM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 250-fache und das rechte Bild 5000-fache Vergrößerung des Biofilms. Die roten Pfeile zeigen auf stark deformierte Zellen mit Löchern. Aufgenommen wurde mit einem REM.

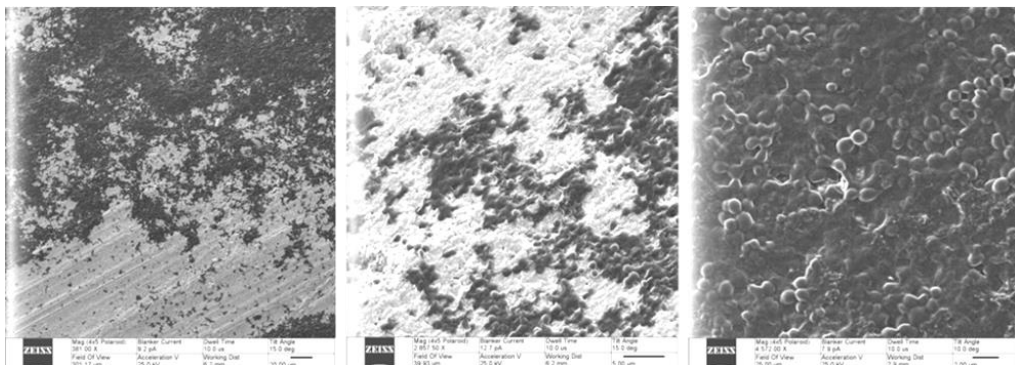
Von den Oberflächen, die man im Labor benutzt, wechseln wir nun zu Oberflächen, die natürlicher sind und zwar zu den Hydroxylapatitscheiben. Zunächst wird die Oberfläche der sauberen Hydroxylapatitscheiben betrachtet um ein Gefühl für die Oberfläche dieser Substanz zu bekommen.

## Elektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme auf zwei unterschiedlichen Oberflächen



**Abbildung 61** Hydroxylapatitscheiben ohne bakterielle Zellen. Aufgenommen mit einem HIM. Das linke Bild zeigt die 5000-fache und das rechte Bild die 8000-fache Vergrößerung der Scheibe.

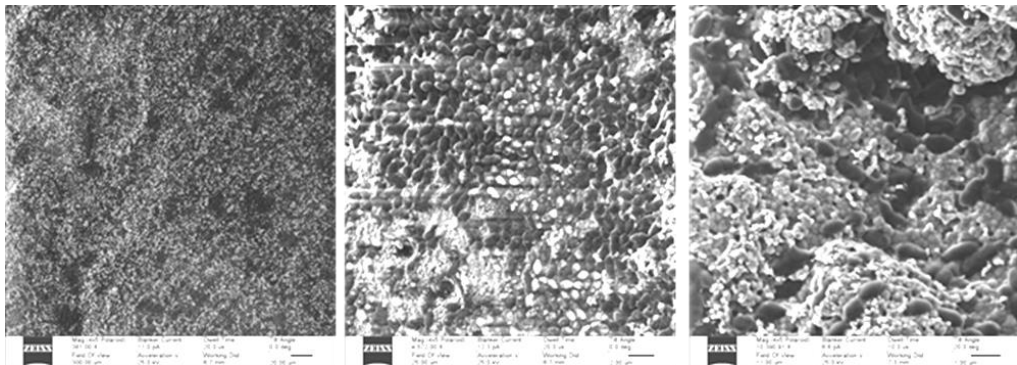
Abbildung 61 zeigt deutlich, dass die Scheiben eine wesentlich rauere Oberfläche als Polystyrol besitzen. Es sind Furchen und Höhlen zu sehen. Diese Stellen werden bevorzugt von Zellen besetzt, da sie hier geschützter sind als auf dem glatten Plastik des CBD. Abbildung 62 zeigt die Kontrolle des *S. aureus* Biofilm in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Bilder erscheinen hier anders, da nun zur HIM gewechselt wurde. Auch hier, wie auf dem CBD, sitzt der Biofilm dicht gepackt in einer organischen Substanz. Die Zellen sind rundlich und gesund.



**Abbildung 62** Natürlich gesunder Biofilm von *S. aureus*. Der Biofilm wächst auf den Hydroxylapatitscheiben und wurde 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium inkubiert. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die HIM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 380-fache, das mittlere Bild die 2800-fache und das rechte Bild 4500-fache Vergrößerung des Biofilms. Aufgenommen mit einem HIM.

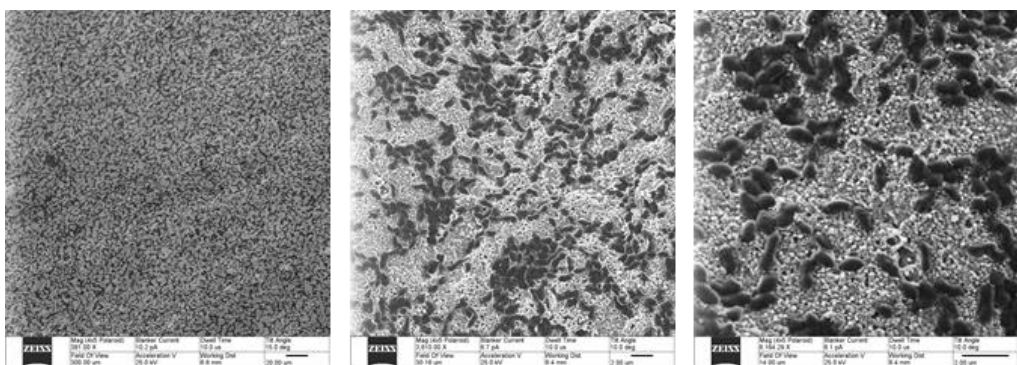






**Abbildung 64** Natürlich gesunder Biofilm von *E. faecalis*. Der Biofilm wächst auf den Hydroxylapatitscheiben und wurde 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium inkubiert. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die HIM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 380-fache, das mittlere Bild die 4500-fache und das rechte Bild 10000-fache Vergrößerung des Biofilms. Aufgenommen mit einem HIM.

Die *E. faecalis* Proben zeigen nach der Behandlung ein ähnliches Bild wie die *S. aureus* Proben. Nur sind hier deutlich mehr Zellen auf der Oberfläche übrig wie in Abbildung 65 zu erkennen ist. Aus diesen Versuchen geht ganz deutlich hervor, dass die Oberfläche, an der ein Biofilm haftet, eine wichtige Rolle spielt. Vergleicht man alle Ergebnisse miteinander, sieht man ganz eindeutig, dass der Biofilm viel stärker am Hydroxylapatit haftet als am CBD und dadurch auch die Konzentration an AMP nicht mehr ausreicht, um den Biofilm abzulösen.



**Abbildung 65** Biofilm von *E. faecalis* nach Behandlung mit GS. Die Biofilme wurden zunächst 24 h auf Hydroxylapatit wachsen gelassen und danach mit 32 µg/ml GS für 24 h behandelt. Inkubiert wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in LBG Medium. Danach wurde er wie im Methodenteil beschrieben für die HIM vorbereitet. Das linke Bild zeigt die 380-fache, das mittlere Bild die 3800-fache und das rechte Bild 8500-fache Vergrößerung des Biofilms. Aufgenommen mit einem HIM.



## 6.2 Diskussion

### 6.2.1 AMP und ihre Möglichkeiten in der therapeutischen Anwendung

In dieser Arbeit wurden unterschiedlichste Methoden zur Evaluierung des therapeutischen Potentials von AMP verwendet. Gleichzeitig wurden die erhaltenen Werte immer mit den Werten der bewährten konventionellen Antibiotika Vancomycin und Demeclocyclin verglichen. Es wurde sowohl die Aktivität der AMP gegen planktonisches Bakterienwachstum als auch gegen Biofilmwachstum untersucht. Wie man den MHK- und MBK-Werten entnehmen kann, sind einige der Peptide ebenso wirksam wie die Antibiotika oder sogar noch aktiver. Die Peptide Gramicidin S, Gramicidin A und TemporinL zeigen beim Kontrollstamm *S. aureus* eine ebenso starke Wirkung wie das bereits therapeutisch eingesetzte Vancomycin (vgl. Tabelle 10). Jedoch scheinen die MRSA Stämme gegen Vancomycin toleranter zu sein, während einige AMP auch diese Stämme inhibieren können. Gegen *E. faecalis* steigen im Allgemeinen die MBK-Werte an, doch ist hier gerade das Peptid Gramicidin A sehr aktiv, aktiver noch als Gramicidin S (vgl. Tabelle 11). Hier versagt Vancomycin fast gänzlich sowohl gegen den Kontrollstamm als auch gegen die Isolate WW4 und WW6. Gegen Biofilme zeigen diese Peptide vielversprechende Wirkkonzentrationen, aber auch einige Peptide wie MAP, TP10, Alamethicin und BP100 sind relativ wirksam zumindest gegen den Kontrollstamm. Die meisten AMP, wie TempShf und KIGAKI und auch die beiden konventionellen Antibiotika scheitern jedoch komplett an den Biofilmen der MRSA Isolate (vgl. Tabelle 14). GS beseitigt erfreulicherweise sogar diese Biofilme, während fast alle anderen, die konventionellen Antibiotika eingeschlossen, hier keine Eliminierung zeigen (vgl. Tabelle 15). Die Peptide aus menschlichem Schweiß DCD-1L, sein Derivat SSL-25 und das menschliche Peptid der angeborenen Immunantwort LL-37 markieren in dieser Arbeit eine Besonderheit. Während von LL-37 bereits eine nur mäßige Aktivität gegen *P. aeruginosa* bekannt ist (Overhage et al., 2008), zeigen die beiden anderen Peptide in

keinem der angewendeten Tests eine Aktivität. Diese Peptide wurden aufgrund ihrer veröffentlichten Aktivität mit in die Reihe der zu untersuchenden Peptide aufgenommen und wurden trotz ihres inaktiven Charakters komplett analysiert (Paulmann et al., 2012). Die Bedeutung dieser Peptide wird weiterhin in der Gruppe von Frau Prof. Ulrich untersucht.

Die Untersuchungen zur Prävention der Bildung von Biofilm durch die AMP zeigen, dass alle mehr oder weniger in der Lage sind, die Bakterien so zu behindern, dass es nicht zur Ausbildung von Biofilmen kommt (vgl. Tabelle 12 und Tabelle 13). Die Peptide wären hiermit als Beschichtung auf Prothesen oder Implantaten geeignet. Die MBHK-Werte zeigen die Möglichkeit der Biofilmprävention durch AMP bzw. Antibiotikabehandlung auf. Dies gibt aber keinen Hinweis auf die Bildung von aggregierten Zellclustern, wie man sie beispielsweise bei der TisB-Inkubation in der OCT sieht, oder auf persistente Zellen, die nur noch nicht an der Oberfläche haften. In der Praxis könnte dies bedeuten, dass diese Zellen zwar am beschichteten Implantat nicht anhaften, sich aber im Körper verbreiten und möglicherweise an anderer Stelle eine Infektion verursachen können. Auf diese Fragestellung kann nur die Atmungsüberwachung erste Hinweise liefern. Den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie kann man entnehmen, dass die natürlich vorkommenden Oberflächen in der Biofilmforschung auch nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Die chemische Zusammensetzung der Oberfläche ändert die Stärke der Haftung der Bakterien an ihr und damit erhöht sich auch die erforderliche Wirkkonzentration der Peptide/Antibiotika. Da bereits von den konventionellen Antibiotika bekannt ist (Kaplan et al., 2012), dass sie Biofilme in subMHK Konzentrationen induzieren können, wurde dies natürlich auch mit den AMP untersucht (Berditsch et al., 2012). Wie in Kapitel 5 beschrieben, zeigen die induzierenden Peptide, wie PGLa/Mag2, einen erhöhten Ausstoß von eDNA und großen extrazellulären Polymeren. Hier zeigte sich, dass viele Peptide in subMHK Konzentrationen genauso wirken wie konventionelle Antibiotika und Biofilme induzieren. Manche Peptide

jedoch, wie das bakterielle Peptid Gramicidin S, zeigen diesen Effekt nicht. Dieses zyklische Peptid besitzt neben seiner Membranaktivität auch noch weitere intrazelluläre Wirkungsorte. Es übt beispielsweise eine Hemmung einer Cytochromquinoloxidase und einer NADH Dehydrogenase aus (Mogi and Kita, 2009). Ein anderes solches Beispiel ist Gramicidin A, das den Energiestoffwechsel der Bakterien stört und die ATP Hydrolyse einleitet (Rao et al., 2014). Möglicherweise ist diese breitere Wirkung der Grund für die Unterdrückung einer Stressantwort der Bakterien und damit einer Unterdrückung der Biofilmbildung (Zasloff, 2002). Die meisten anderen Peptide wirken ausschließlich als Porenbilder in der Zellmembran.

Der Effekt, dass die Bakterien nach 24 h AMP-Behandlung zunächst inhibiert werden und danach wieder erwachen (Kapitel 6.1) ist kürzlich beschrieben worden (Amato et al., 2014). Möglicherweise gehen die Zellen durch die Einwirkung der AMP/Antibiotika in einen persistenten Zustand über. Wie in Kapitel 1.5.5 beschrieben, können Subpopulationen von persistenten Bakterien entstehen, die ihren Metabolismus komplett herunterfahren, um Zeiten der Gefahr zu überstehen. Durch diese besondere Art des Schlafzustandes erlangen die Bakterien eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika. Diese Toleranz kann 1-2 Verdünnungsstufen der Peptide und Antibiotika ausmachen. Nachdem die Gefahr vorüber ist, erwachen die Zellen wieder, gehen entweder in ihren normalen Wachstumszustand über oder aber sie können neue Phänotypen entwickeln (wie beispielsweise der Biofilmphänotyp von MRSA 9, der nach der Behandlung mit PGLa/Mag2 isoliert wurde) und später auch als Biofilm wachsen (Schkolin, 2011). In solchen Fällen muss in Betracht gezogen werden, dass obwohl z.B. PGLa/Mag2 gute Biofilmprävention (vgl. MBHK-Werte in Tabelle 12 und Tabelle 13) zeigt, diese Peptidmischung hierfür weniger geeignet ist, da sich möglicherweise persistente Zellen bilden, die später zu Biofilmbildung führen können. Schlussfolgernd ist der Effekt der subMHK Biofilminduzierung aber ein alarmierendes Ergebnis. Es können sich hierdurch Resistenzen und schwere Infektionen ausbilden. Es ist daher immer wichtig auf die

Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika zu achten. Auch die Dauer der Verabreichung ist essentiell, um Komplikationen zu vermeiden. Zusammenfassend kann man aus der Komplettanalyse dieser AMP das Fazit ziehen, dass es tatsächlich einige sehr wirkungsvolle AMP gibt, die eine gute Alternative zu oder Kombinationsmöglichkeiten mit konventionellen Antibiotika darstellen. Möglicherweise sind diese membranaktiven Peptide tatsächlich gut geeignet als Hilfe zur Einschleusung von Antibiotika, die innerhalb der Zellen wirken. Die zukünftige Rolle der AMP in der Therapie könnte durch die neuesten Ergebnisse sehr viel versprechend aussehen. Durchweg sehr gute Ergebnisse konnten mit dem zyklischen Peptid Gramacidin S gezeigt werden. Dieses spielt deshalb eine zentrale Rolle in dieser Arbeit. Es ist durchaus geeignet für eine direkte Behandlungen an beispielsweise persistenten oberflächlichen Wundinfektionen.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit amphiphilen membranaktiven Peptiden zwei mikrobiologische Fragestellungen verfolgt. Einerseits wurde die Funktion des biofilminduzierenden Peptids TisB untersucht und andererseits die biofilminduzierende und -eliminierende Wirksamkeit und die Grenzen von diversen antimikrobiellen Peptiden unterschiedlicher Herkunft. Es wurde im ersten Teil der Arbeit gezeigt, dass das Peptid TisB eine Biofilminduktion verursacht und diese mit Zunahme der Peptidkonzentration steigt. Bei diesem Prozess scheint es unerheblich zu sein, ob der bakterielle Stamm grampositiv oder gramnegativ ist, die Art des Stoffwechsels ist jedoch entscheidend. Die Ergebnisse legen nahe, dass aerobe Bakterien durch die Verwendung oxidativer Stoffwechselreaktionen auf die Einwirkung von TisB mit einer Stressantwort reagieren. Obligat anaerobe Bakterien, die unabhängig von Sauerstoff andere Substrate zur Energiegewinnung verwenden, sind unabhängig vom Protonengradienten, der von TisB manipuliert wird. Die Hypothese, dass TisB als antiparalleles Dimer einen Pfad für Protonen in der Zellmembran bildet, konnte in dieser Arbeit durch drei unterschiedliche Methoden wie Kristallviolett-färbung, OCT und Membrandepolarisationsstudien bestätigt werden. Alle drei Methoden zeigten trotz unterschiedlicher experimenteller Voraussetzungen ähnliche Ergebnisse in der Funktionsstudie der Derivate von TisB. Die Transkriptomanalyse der früh entstehenden, TisB-induzierten Biofilme zeigte bei allen untersuchten Stämmen einen Effekt auf Proteine der Atmungskette. Die Zellen reagieren auf den Einfluss von TisB auf den Protonengradienten durch eine Heraufregulation der Aktivität der für die Energiegewinnung essentieller Protonenpumpen der Atmungskette. Außerdem werden noch Maßnahmen gegen den Eintritt des Peptids in die Zelle eingeleitet, indem Membranpumpen aktiviert werden. Auch typische Stresssysteme werden aktiviert, wie man an der Regulation des cold shock proteins von *S. aureus* sehen kann. Der Einfluss von TisB auf Klärschlambakterien hat gezeigt, dass dieses Peptid auch eine Wirkung

auf Multispezies-Systeme hat. Das Peptid beschleunigt die Entwicklung zu einem granulärem Klärschlamm.

Im zweiten Teil der Arbeit, zeigte die Analyse der Sekretion der Bakterien nach Inkubation mit TisB eine Anwesenheit von eDNA und auch eine Produktion von EPS, welche typisch für Biofilme ist und die Aggregation der Zellen im frühen Stadium der Biofilmentwicklung erklärt. Zusätzlich wurden hier auch die Effekte von subMHK Konzentrationen von AMP auf die bakterielle Sekretion untersucht. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eDNA und EPS Auftreten. Diese Ergebnisse weisen auf die Gefahr hin, dass Biofilme durch subMHK Konzentrationen von AMP induziert werden können (Berditsch et al., 2012). Dieser Effekt konnte in weiterführenden Experimenten bestätigt werden, da einige der getesteten AMP zu Biofilmbildung führten. Dabei zeigte der synergistische Mix aus PGLa und Mag2 überraschende Ergebnisse auf. Einerseits wurde eine abweichende EPS Zusammensetzung gegenüber den Kontrollen und den TisB induzierten Biofilmen entdeckt. Andererseits führte er auch zu neuen Biofilmphänotypen der Bakterien.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die AMP auf ihre Effektivität im Kampf gegen Biofilme untersucht. Diese Analyse zeigte vielversprechende Ergebnisse, da einige AMP in moderaten Konzentrationen effektiv Biofilme ablösen und abtöten können. Im Vergleich zu konventionellen Antibiotika sind sie teilweise sogar aktiver. Das zyklische Dekapeptid Gramicidin S sticht hierbei besonders hervor. Es zeigt keinerlei Induktion von Biofilmen in subMHK Konzentrationen und eine starke Effektivität gegenüber allen getesteten Bakterien/Biofilmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch anwendungsbezogene Versuche Gramicidin S durchgeführt. Das Peptid Gramicidin S wurde auf seine Effektivität, einen Biofilm auf einer natürlichen Oberfläche zu bekämpfen, getestet. Die Ergebnisse hier zeigen, dass der Einfluss der Oberflächenchemie nicht zu vernachlässigen ist und bei allen antibiotischen Therapien mit in Betracht gezogen werden muss. Alles in allem, zeigt diese Arbeit, dass im Umgang mit Bakterien, Medien und Oberflächen jeder Faktor eine Rolle spielt und man jeglichen

## Zusammenfassung

Ausgang einer Analyse in Betracht ziehen muss. Die hohe Anzahl der in dieser Arbeit erhaltenen Daten müssen vorsichtig abgewogen werden. Einerseits erhält man mit einigen Peptiden gute MHK/MBK-Werte und auch gute Präventionsmöglichkeiten (MBHK), stellt dann aber nach längerer Inkubation fest (Atmungsüberwachung), dass sich nach weiterer Inkubation die maßgeblichen Charakteristika veränderten, da sich persistente Zellen entwickelten und diese zu einer medizinisch gefährlichen Biofilmbildung führten. Trotzdem können diese Peptide jedoch in höheren Konzentrationen auch Biofilme eliminieren. Somit zeigen TisB und einige der AMP ein vielversprechendes Potential für zukünftige biotechnologische bzw. medizinische Anwendungen.

### 8 Ausblick

Für das TisB-Projekt ist ein Ausbau der Kooperation mit SCELSE in Singapur zur Aufklärung des Effekts auf den Klärschlamm naheliegend. Einerseits müsste noch der Effekt des Abbaus von TisB nach der 2-tägigen Inkubation ohne erneute Zugabe des Peptids geklärt werden. Andererseits könnte beispielsweise auch das *D*-Analogon des Peptids getestet werden. Sollte es sich um enzymatischen Abbau des Peptids handeln, sollte *D*-TisB eine größere Haltbarkeit zeigen. Da der Effekt von TisB auf *Shewanella* bereits bekannt ist (Richter, 2014), könnte dahingehend auch noch Forschung mit SCELSE betrieben werden. Dort wird *Shewanella* zur Reduktion toxischer Stoffe in Klärwasserbecken untersucht. Könnte TisB Biofilme von *Shewanella* induzieren und somit die Biomasse steigern, würde das eine höhere Umsetzungsrate in den Becken liefern.

Die eDNA und EPS Sekretion der behandelten Bakterien benötigt noch grundlegende Forschung auf den jeweiligen Ursprung der Stoffe. Außerdem wäre auch eine quantitative Analyse des eDNA Ausstoßes in Betracht zu ziehen. Im Hinblick auf die besonderen Eigenschaften der Peptide PGLa und Mag2 als synergistisches Paar wäre eine Transkriptomanalyse unbedingt von Nöten. Nur so lässt sich herausfinden, warum gerade diese Wirkstoffe ein besonderes Verhalten im Gegensatz zu den anderen AMP zeigen. Eine Transkriptomanalyse von mit Gramcidin S behandelten Bakterien könnte Aufschluss geben, welche anderen interzellulären Ziele dieses Peptid noch hat und warum dieses Peptid so effektiv ist und keinerlei subMHK Biofilminduktion zeigt. Ein weiterer Aspekt der in dieser Arbeit außer Acht gelassen wurde, ist, dass Biofilme in der Natur nicht als Monospezies-Biofilm vorliegen. Daher wären Tests an Umweltproben und Multiinfektionen zukunftsweisend.



## 9 Literaturverzeichnis

- Abassi et al. (2010). Temporin-SHf, a new type of phe-rich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.*, S. 16880-92.
- Afonin et al. (2003). 4-fluorophenylglycine as a label for <sup>19</sup>F NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *Chembiochem* (4), S. 1151-1163.
- Allen et al. (2004). Analysis and glycosyl composition of the exopolysaccharide isolated from the floc-forming wastewater bacterium *Thauera* sp. MZ1T. *Environmental Microbiology* (6), 780-790.
- Allesen-Holm et al. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* (59), 1114-1128.
- Amato et al. (2014). The role of metabolism in bacterial persistence. *Frontiers in microbiology* (5).
- Baechle et al. (2006). Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J. Biol. Chem.* 281, S. 5406–15.
- Balaban, N. Q. (2011). Persistence: mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Current Opinion in Genetics & Development* (21), 768-775.
- Barnes et al. (2012). *Enterococcus faecalis* Produces Abundant Extracellular Structures Containing DNA in the Absence of Cell Lysis during Early Biofilm Formation. *mBio* (3), 1-9.
- Bazou et al. (2011). Imaging of human colon cancer cells using He-Ion scanning microscopy. *Journal of Microscopy* (242), S. 290-294.

- Berditsch et al. (2007). The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Appl. Environm. Microbiol.*, 6620-6628.
- Berditsch et al. (2012). Antimicrobial peptides can enhance the risk of persistent infections. *Frontiers in Immunology* (3), 1-4.
- Berditsch et al. (2013). Cell Symposium "Microbiome and Host Health". Lisabon.
- Bjarnsholt et al. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nature Reviews* (12), 791-808.
- Blazyk et al. (2001). A Novel Linear Amphipathic  $\beta$ -Sheet Cationic Antimicrobial Peptide with Enhanced Selectivity for Bacterial Lipids. *J Biol. Chem*, S. 27899-27906.
- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*(13), S. 61-92.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial Peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews* (3), S. 239-250.
- Bundesministerium für Umwelt, N. B. (kein Datum). Abgerufen am 27. Januar 2015 von <http://www.bmub.bund.de/themen/wasser-abfall-boden/abfallwirtschaft/abfallarten-abfallstroeme/klaerschlamml/>.
- Cereceda Delgado, A. (2014). *Peptidinduziertes Biofilmwachstum und die Rolle der Extrazellulären DNA*. Karlsruher Institut für Technologie: Bachelorarbeit.
- Ceri et al. (1999). The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* (37), 1771-1776.
- Cociancich et al. (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* (26), S. 19239-45.

- Cogan, N. C. (2006). Effects of persister formation on bacterial response to dosing. *Journal of Theoretical Biology* 238, 694-703.
- Dacheng und Bahar. (2013). Antimicrobial Peptides . *Pharmaceuticals* (6), S. 1543-1575.
- Desai et al. (1998). Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin during exponential growth. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 153-160.
- Diaz et al. (2011). Synergistic Interaction between *Candida albicans* and Commensal Oral Streptococci in a Novel In Vitro Mucosal Model. *Infection and Immunity* (80), 620-632.
- Dörr et al. (2010). Ciprofloxacin Causes Persister Formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLOS Biology* (8), S. 1-8.
- Dötsch et al. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms using RNA Sequencing. *PLOS One* (7), 1-11.
- Drescher, K. (2013). Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *PNAS*, S. 4345-4350.
- Drexler et al. (2008). *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*. Springer-Verlag.
- Dubos, R. J. (1939). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. *J.Exp.Medicine* (70), 1-10.
- Duval, B. D. (2010). *Major Cold Inducible Gene of S. aureus, cspB, Modulates Susceptibility to Antimicrobials*. Emory University: Dissertation.
- Eggenberger et al. (2011). Using the Peptide Bp100 as a Cell-Penetrating Tool for the. *ChemBioChem*, S. 132 – 137.

- Epand et al. (2010). Probing the “charge cluster mechanism” in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry*, S. 4076-4084.
- Eroms, M. (2003/4). *Ausbildungsseminar "Mikroskopie"*. Universität Regensburg.
- Fanghänel et al. (2014). Structure Analysis and Conformational Transitions of the Cell Penetrating Peptide Transportan 10 in the Membrane-Bound State. *PLOS One*.
- Flemming, H. C. (1991). *Biofilme und Wassertechnologie Teil 1: Entstehung*.
- Fouad et al. (2005). Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99, 112-118.
- Friedmann und Kolter. (2004). Genes involved in matrix formation in Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilms. *Molecular Microbiology* (51), S. 675-690.
- Gause et al. (kein Datum). Gramicidin S and its use in the treatment. *Nature* 154, 703.
- Gause, G. F. (1944). Gramicidin S. Origin and mode of action. *Lancet* 247, S. 715–716.
- Gesell et al. (1997). Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an  $\alpha$ -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J. Biomol. NMR*, S. 127-135.
- Ghosh et al. (2009). Cloning of feather-degrading minor extracellular protease from Bacillus cereus DCUW: dissection of the structural domains. *Microbiology* (155), 2049-2057.
- Gunn et al. (2001). Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J. Endotoxin Res.*(7), S. 57–62.

- Gurnev et al. (2012). Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. *FEBS Letters* 586, S. 2529-2534.
- Haiko et al. (2002). *Invited review: Breaking barriers--attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens*. 67-80: *Innate Immun.* (2).
- Hällbrink et al. (2001). Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, S. 101–109.
- Harold et al. (1967). Gramicidin, Valinomycin, and Cation Permeability of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 53-60.
- Harrison et al. (2005). High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiology* (5).
- Hartmann et al. (2010). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, S. 3132–3142.
- Haus, J. (2010). *Mikroskopische Untersuchung von Belebtschlamm*. Helmut Hund GmbH.
- Heijstra et al. (2009). Extracellular DNA and Type IV pili mediate surface attachment. *Anton Leeuw* (95), 343–349.
- Herigstad et al. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 121-129.
- Heyder et al. (2013). Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dental Materials* 29, 542-549.
- Hinks et al. (2014). Modeling cell membrane perturbation by molecules designed for transmembrane electron transfer. *Langmuir* (30), 2429-40.
- Hoffmann et al. (1983). A novel peptide designated PYLa and its precursor as predicted from cloned mRNA of *Xenopus laevis* skin. *EMBO J.*

- Hoiby et al. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* (35), 322-332.
- Holleman und Wiberg. (1995). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. deGruyter.
- Jakubovics et al. (2013). Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in Applied Microbiology*.
- Kaplan et al. (2012). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* 34, 737-751.
- Keren et al. (2012). Persister Eradication: Lessons from the World of Natural Products. *Methods in Enzymology* (517), 387-406.
- Kint et al. (2012). New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends in Microbiology* (20), 577-585.
- Krauss et al. (1984). Complexation and Phase Transfer of Nucleic Acids by Gramicidin S. *American Chemical Society* (23), S. 73-77.
- Kumar, J. K. (2008). Lysostathin: an antistaphylococcal agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (80), 555-561.
- Lee et al. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum. Mol. Genet.* (21), 125-134.
- Leitgeb et al. (2007). The History of Alamethicin: A Review of the Most Extensively Studied Peptaibol. *Chemistry & Biodiversity*, S. 1027–1051.
- Lewis, K. (2010). Persister Cells. *Annu. Rev. Microbiol.* (64), S. 357-372.
- Life technologies. (2011). *MicrobExpress Kit*. Abgerufen am 04. 04 2015 von [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_057051.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_057051.pdf)

- Life technologies. (2013). *DNA-free Kit; DNase Treatment and Removal Reagents*. Abgerufen am 04. 04 2015 von [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_055739.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_055739.pdf)
- Loeb et al. (2008). Antimicrobial drugs for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization (Review). *The Cochrane Collaboration*.
- Lu et al. (2006). Exploring membrane selectivity of the antimicrobial peptide KIGAKI using solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.*, S. 1303-13.
- Maloy et al. (1995). Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, S. 105-122.
- Mamun et al. (2012). Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks. *Science (338)*, 1344-1348.
- Mangoni et al. (2011). Structure–Activity Relationship, Conformational and Biological Studies of Temporin L Analogues. *J. Med. Chem.*, S. 1298–1307.
- Matsuzaki, K. (1998). Magainins as paradigm for the method of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1376, S. 391-400.
- McDougald et al. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences of biofilm dispersal. *Nature Reviews (10)*, S. 39-50.
- Metcalf and Eddy. (2004). *Wastewater Engineering – Treatment and Reuse*. Mc Graw Hill.
- Mink, C. (2010). *Zusammenhänge von Struktur und Funktion unterschiedlicher membranaktiver Peptide*. Karlsruher Institut für Technologie: Dissertation.

- Moellering, R. C. (2010). Why has MRSA become such a successful pathogen in adults? *Clinical Updates in Infectious Diseases* (13), 1-6.
- Mogi and Kita. (2009). Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol. Life Sci.*, 3821-6.
- Mohamed et al. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology* (56), 1581-1588.
- Mohanram, H. (2014). Resurrecting Inactive Antimicrobial Peptides from the Lipopolysaccharide Trap. *Antimicrob. Agents Chemother.* (58), 1987-1996.
- Moore et al. (1992). A novel peptide-producing cell in *Xenopus*: multinucleated gastric mucosal cell strikingly similar to the granular gland of the skin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, S. 367-78.
- Müller-Esterl, W. (2004). *Biochemie*. Spektrum Verlag.
- Oehlke et al. (2005). Studies on the cellular uptake of substance P and lysine-rich, KLA-derived model peptides. *J Mol Recognit.*, S. 50-59.
- Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* (64), 176-188.
- Overhage et al. (2008). The Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infection and Immunity* (76), 4176-4182.
- Paganelli et al. (2012). Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends in Microbiology* (20), 40-49.
- Paulmann et al. (2012). Structure-Activity Analysis of the Dermcidin-derived Peptide DCD-1L, an Anionic Antimicrobial Peptide Present in Human Sweat. *Journal of Biological Chemistry* (287), S. 8434-8443.



- Peeters et al. (2007). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 72, S. 157-165.
- Pesci et al. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96), 11229-34.
- Pitts et al. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods* 54, 269-276.
- Qiagen. (2011). *RNAprotect Bacteria Reagent and RNeasy Protect Bacteria Kits*. Abgerufen am 04. 04 2015 von <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=bea04757-b25e-4eb1-86b4-3ef1cb4f94b0&lang=en>
- Rao et al. (2014). A Combination of Curcimin with Either Gramicidin or Ouabain Selectively Kills Cells That Express the Multidrug Resistance-linked ABCG2 Transporter. *Journal of Biological Chemistry* (289), 31397-31410.
- Reimer, L. (1997). *Transmission Electron Microscopy*. Springer.
- Richter, K. (2014). *Etablierung und Intensivierung von Mikroben-Anoden-Interaktionen in synthetischen und natürlichen exoelektrogenen Stämmen*. Karlsruher Institut für Technologie: Dissertation.
- Rinaldi et al. (2002). Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem. J.*, S. 91-100.
- Rivas-Santiago et al. (2008). Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect. Immun.*, S. 935–941.
- Römpp, H. (1997). *Römpp Lexikon*. Stuttgart: Thieme Verlag.

- Sandberg et al. (2009). Pros and Cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *Journal of Microbiological Methods* 78, S. 104-106.
- Schittek et al. (2001). Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2, S. 1133–7.
- Schkolin, K. (2011). *The effect of the antibacterial peptide gramicidin S on clinica Imethicillin-resistant Staphylococcus aureus*. KIT: Bachelorarbeit.
- Senevirante et al. (2013). Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology* (58), 1327-1334.
- Seviour, R. (2010). *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing.
- Seviour, T. (unveröffentlicht). *Unified Theory of Biofilm Matrix Solubilisation*.
- Shafer et al. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95), S. 1829–1833.
- Shamova et al. (1999). Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect. Immun.* (67), S. 4106-11.
- Singh et al. (2009). Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of Medical Microbiology* (58), 1067-1073.
- Song et al. (2011). Cellular uptake of transportan 10 and its analogs in live cells: Selectivity and structure–activity relationship studies. *Peptides*, S. 1934–1941.

- Spektrum Verlag. (1999). Fluoreszenzmikroskopie. *Lexikon der Biologie*.
- Steinbrecher et al. (2012). Peptide-Lipid Interactions of Stress-Response Peptide TisB That Induces Bacterial Persistence. *Biophysical Journal* 103, S. 1460-1469.
- Stepanovic et al. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40, 175-179.
- Sternberg et al. (2006). Growing and Analyzing Biofilms in Flow Cells. *Current Protocols*.
- Strandberg et al. (2008). Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its parent peptide PGLa in lipid bilayers. *Biochemistry*, S. 2601-16.
- Strandberg et al. (2013). Synergistic insertion of antimicrobial magainin-family peptides in membranes depends on the lipid spontaneous curvature. *Biophys. J.* (6), 9-11.
- Strandberg et al. (2015). Influence of hydrophobic residues of the antimicrobial peptide Magainin 2 and its synergy with PGLa. *J. Pept. Sci.*
- Szewzyk, U. (2003). *Biofilme-die etwas andere Lebensweise*. 253-255: BioSpektrum.
- Tang et al. (2013). Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1-10.
- Thomas et al. (1993). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Biochemistry* (7), 910-917.
- Thomas et al. (2008). Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus faecalis* Extracellular Proteases Influences Biofilm Development. *J. Bacteriol.* (190), 5690-5698.

- Toh et al. (1997). Changes in the growth and enzyme level of *Zymomonas mobilis* under oxygen-limited conditions at low glucose concentration. *Arch. Microbiol.* (168), 46-52.
- Tomasinsig et al. (2005). The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.*, S. 23–34.
- Tremouilhac et al. (2006). Synergistic transmembrane alignment of the antimicrobial heterodimer PGLa/Magainin. *J. Biol. Chem.* (281), S. 32089-32094.
- Universität Göttingen. (2010). *Universität Göttingen*. Abgerufen am 22. 01 2015 von <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>
- Vijayabaskar et al. (2011). Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). *Advances in Biological Research* (5), 71-76.
- Villarreal et al. (2013). DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *Journal of Microbiological Methods* (94), 161-169.
- Vladimirova, T. (2010). *Die biologischen Effekte von Peptidantibiotika auf bakterielle Zellen*. Karlsruher Institut für Technologie: Diplomarbeit.
- von Eiff et al. (2006). The small colony variant (SCV) concept-the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* (37), 526-533.
- Wade et al. (2000). Antibacterial activities of temporin A analogs. *FEBS Letters*, S. 6-9.
- Wade et al. (2001). Hematological and antifungal properties of Temporin A and a cecropin A-Temporin A hybrid. *Acta Biochimica Polonica* (48), S. 1185-1189.
- Wade et al. (2001). Hematological and antifungal properties of Temporin A and a cecropin A-Temporin A hybrid.

- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* 69, 137-143.
- Wadhvani et al. (2012). Antimicrobial and cell-penetrating peptides induce lipid vesicle fusion by folding and aggregation. *Eur. Biophys. J.*, 177-187.
- Wagner et al. (2010). Investigation of the Mesoscale Structure and Volumetric Features of Biofilms Using Optical Coherence Tomography. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Weel-Sneve et al. (2008). Overexpression of the LexA-regulated tisAB RNA in *E. coli* inhibits SOS functions; implications for regulation of the SOS response. *Nucleic Acids Research* (36), S. 6249-6259.
- Whitchurch et al. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* (295), 1487.
- WHO. (2012). *The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action.*
- Willmsky et al. (1992). Characterization of cspB, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J. Bacteriol.* (174), 6326-35.
- Yeaman and Yount. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS* (55), 27-55.
- Yerushalmi et al. (1985). Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (22), 102-107.
- 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*, 5449–5453.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* (415), S. 389-95.

Zhang et al. (2001). Interaction of Cationic Antimicrobial Peptide with Model Membranes. *J. Biol. Chem.* (276), S. 35714-35722.

Zimpfer, B. (2015). *Unbekannter Titel*. Karlsruher Institut für Technologie: Dissertation (unveröffentlicht).

Zum Entwurf eines Gesetzes zur Verbesserung der Krankenhaushygiene. (2011). *Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH)*.

## 10 Anhang

### A Material

#### **Medien:**

Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB Medium (Luria-Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MH Medium (Müller-Hinton)	BD, Heidelberg, Deutschland
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

#### **Reagenzien:**

BacLight Mix	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
DiSC3	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
DDAO	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
DMAC	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
DNAfree Kit	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
EMIM-ac	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Ethanol	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Glutaraldehyd Deutschland	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kristallviolett Deutschland	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## A Material

Lysostaphin Deutschland	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lysozym Deutschland	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol Deutschland	Merck Schuchardt, Hohenbrunn,
MicroExpress™ Kit Deutschland	Lifetechnologies, Darmstadt,
RNAprotect®	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperaseIn™ Rnase Inhibitor Deutschland	Lifetechnologies, Darmstadt,

### **Material:**

96er-Mikrotiterplatten (Nunc™)	ThermoScientific, Deutschland
CBD Kanada	Univerity of Calgary, Calgary,
Inversmikroskop Leica DMIL Deutschland	Leica Microsystems, Wetzlar,
Mit LED Modul 365, 470, 530 nm (Kamera Leica DFC 450C)	
Software LAS V4.4 (Leica Application Suite)	
Fluoreszenzmikroskop (Auflicht)	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrotiterplattenreader	Flash Scan 55, Analytik Jena AG, Deutschland



peqlab Nanodrop 2000c

ThermoScientific, Deutschland

Photospektrometer  
Kalifornien, USA

BIO-Rad Smart Spec™,

Zentrifuge 6K15

Sigma Labatory Centriguges,  
Osterode, Deutschland

**B TisB****1. Transkriptomanalyse****Tabelle 16** Übersicht der Transkriptomdaten von *E.coli* K12 mit signifikanter Relevanz ( $\log_2fc > \pm 1$ ).

locus	log2fc	gene name	Funktion
b0428	1,2462243	cyoE	protoheme IX farnesyltransferase
b0431	1,09592413	cyoB	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I
b0432	1,00153107	cyoA	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II
b0565	1,01746052	ompT	DLP12 prophage; outer membrane protease VII
b0723	1,25787882	sdhA	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit
b0724	1,30580003	sdhB	succinate dehydrogenase, FeS subunit
b0726	1,30282206	sucA	2-oxoglutarate decarboxylase
b0727	1,30064117	sucB	dihydrolipoyltranssuccinylase
b0728	1,48768527	sucC	succinyl-CoA synthetase, beta subunit
b1014	1,66733139	putA	fused DNA-binding transcriptional regulator/proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
b1163	1,36447259	bluF	anti-repressor for YcgE, blue light-responsive; FAD-binding; has c-di-GMP phosphodiesterase-like EAL domain, but does not degrade c-di-GMP
b1597	-1,84395688	asr	acid shock-inducible periplasmic protein
b1598	-1,53818624	ydgD	predicted peptidase
b1905	1,13430257	ftnA	ferritin iron storage protein
b3565	-1,17986202	xylA	D-xylose isomerase
b3672	1,11027836	ivbL	ilvB operon leader peptide
b3892	1,13085508	fdol	formate dehydrogenase-O, cytochrome b556 subunit

**Tabelle 17** Übersicht der Transkriptomdaten von *S. aureus* mit signifikanter Relevanz ( $\log_2fc > \pm 1$ ).

locus	log2fc	gene name	Funktion
NWMN_2605	-1,15750516	cspB	Cold shock protein

**Tabelle 18** Übersicht der Transkriptomdaten von *S. oneidensis* mit signifikanter Relevanz ( $\log_2fc > \pm 1$ ).

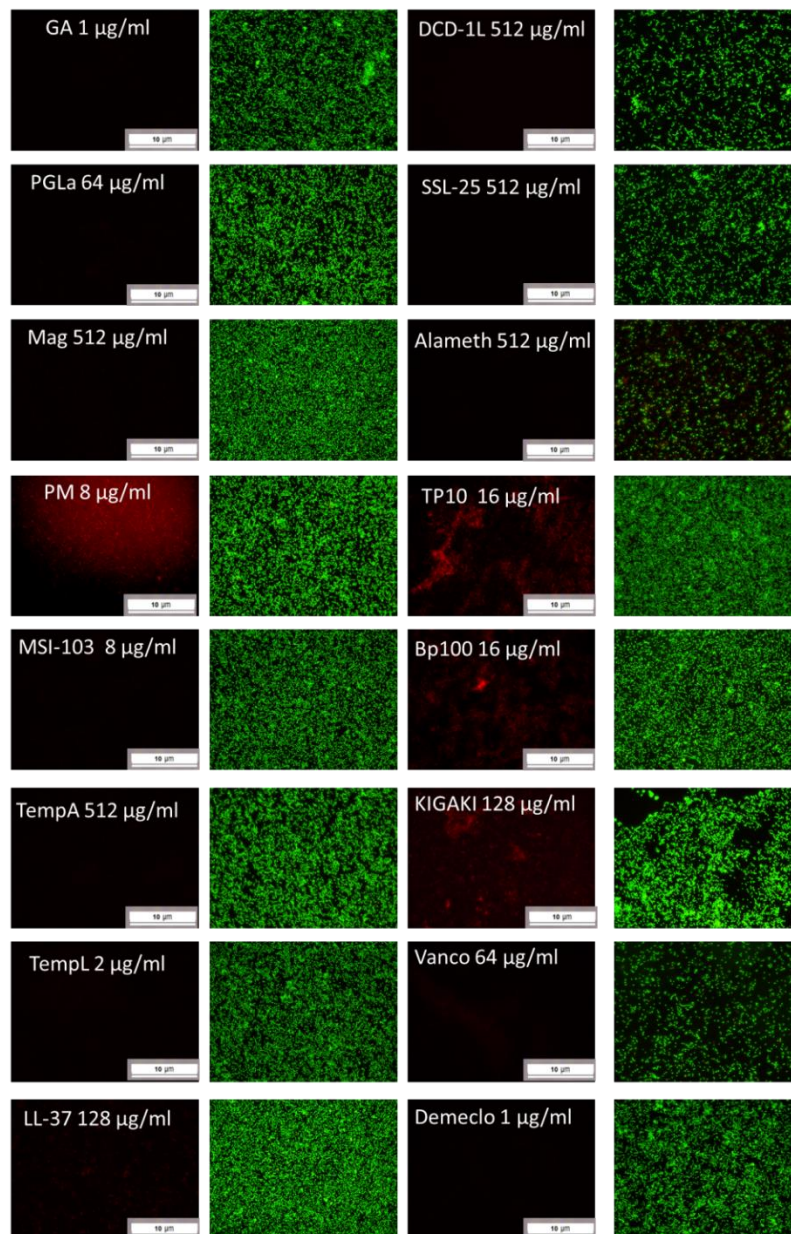
locus	log2fc	gene name	Funktion
SO_0314	1,59339742	speF	ornithine decarboxylase SpeF
SO_0401	2,30868892		putative NADPH-dependent quinone oxidoreductase
SO_0728	1,12461122		hypothetical protein
SO_0798	1,13976218		TonB-dependent receptor
SO_0843	1,00247686		transcriptional regulator LysR family
SO_1427	1,0566352	dmsE	periplasmic decaheme cytochrome c DmsE
SO_1532	1,30949688		predicted periplasmic protein
SO_1917	1,02688674		major facilitator superfamily transporter required for growth on DMSO MFS superfamily
SO_2953	1,03842887	H	Lambda phage tail length tape measure protein H
SO_2956	1,16232271	V	Lambda phage major tail protein V
SO_2963	1,1404241		Lambda phage major capsid protein
SO_3542	1,01214467	xfp	product=D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase Xfp
SO_3668	1,01391955	hmuX	heme iron utilization protein HmuX
SO_3719	1,02760622		cytochrome b561
SO_4516	1,12427873		TonB-dependent siderophore receptor
SO_4742	-1,08028665	glmR	glucosamine-6-phosphate sensitive transcriptional repressor of lipopolysaccharide biosynthesis GlmR
SO_4761	1,57398131		protein of unknown function

**Tabelle 19** Übersicht der Transkriptomdaten von *P. aeruginosa* mit signifikanter Relevanz ( $\log_2fc > \pm 2$ ).

locus	log2fc	gene name	Funktion
PA0263.1	-2,76834463	tRNA-Arg	
PA0836.1	2,32204353	P5	
PA14_02590	2,15162724	mdcE	malonate decarboxylase gamma subunit
PA14_06875	-4,00384669	0	rsmY regulatory RNA
PA14_08690	-2,84192185	0	tRNA-Trp
PA14_09030	-2,22787497	rpmD	50S ribosomal protein L30
PA14_15850	-2,31855596	0	hypothetical protein
PA14_20150	2,02790962	nosL	NosL protein
PA14_20170	2,16839621	nosY	NosY protein
PA14_20500	-2,32170153	0	tRNA-Arg
PA14_23690	2,04064305	0	putative secreted protein
PA14_23730	2,12851175	0	LysR family transcriptional regulator
PA14_27610	-2,24541106	0	tRNA-Gly
PA14_29680	2,01533714	0	hypothetical protein
PA14_30210	-2,5334084	clpS	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS
PA14_33870	2,37274861	0	hypothetical protein
PA14_35700	-2,00515349	0	hypothetical protein
PA14_35720	-2,09357878	0	hypothetical protein
PA14_35760	-2,06406174	0	hypothetical protein
PA14_38180	-2,1245334	0	hypothetical protein
PA14_46530	-2,15459893	0	hypothetical protein
PA14_46540	-2,00098914	0	hypothetical protein
PA14_48310	2,15336216	0	putative transcriptional regulator
PA14_49020	-2,03803145	0	hypothetical protein
PA14_49510	-2,07848649	pyoS3I	immunity protein S3I structural gene
PA14_52560	-2,00514992	0	tRNA-Ser
PA14_55620	-2,42085858	0	5S ribosomal RNA
PA14_56560	2,2608411	0	hypothetical protein
PA14_58740	-2,04193223	0	hypothetical protein
PA14_60030	-2,00104871	0	hypothetical protein
PA14_60180	-2,16197295	0	tRNA-Asn
PA14_61890	2,02088715	0	hypothetical protein
PA14_62060	2,65850782	0	23S ribosomal RNA
PA14_62810	-2,10070688	secG	preprotein translocase subunit SecG
PA14_65210	-2,30690065	0	tRNA-Leu
PA2958.1	-2,20180411	rgsA	
PA3305.1	-2,24123297	phrS	
PA3366.1	-2,79962731	amiE leader	
PA3621.1	-4,15674598	rsmZ	
PA4272.1	2,33297656	P27	
PA4704-PA4705	-2,16440567	prhH	
PA5316.1	3,98461751	102/16	

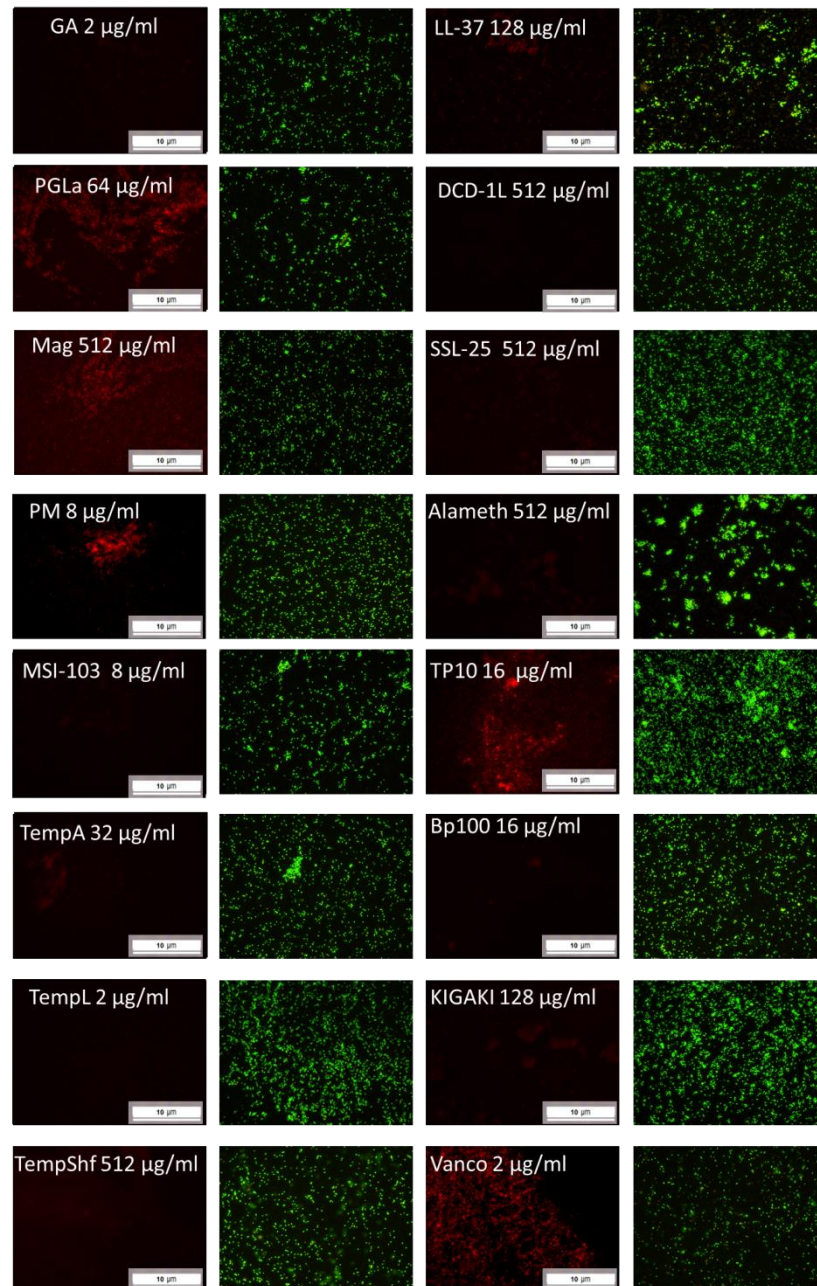
## C Untersuchungen an Biofilmmatrix

### 1. eDNA – nicht gezeigte Färbungen mit DDAO und Live/Dead



**Abbildung 66** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit DDAO und Live/Dead-Mix und *E. faecalis*. Die Bakterien wurden mit sublethalen Konzentrationen der unterschiedlichen AMPs und zwei Antibiotika inkubiert und danach angefärbt. Die Biofilme haben sich am Boden der Mikrotiterplatte gebildet. Die linke Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit DDAO und die rechte Spalte die dazugehörigen Bilder mit dem Live/Dead Mix. Die jeweiligen Peptid-/Antibiotikanamen und Konzentrationen wurden in weißen Buchstaben eingefügt. Die Ansätze wurden in LBG Medium inkubiert und die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

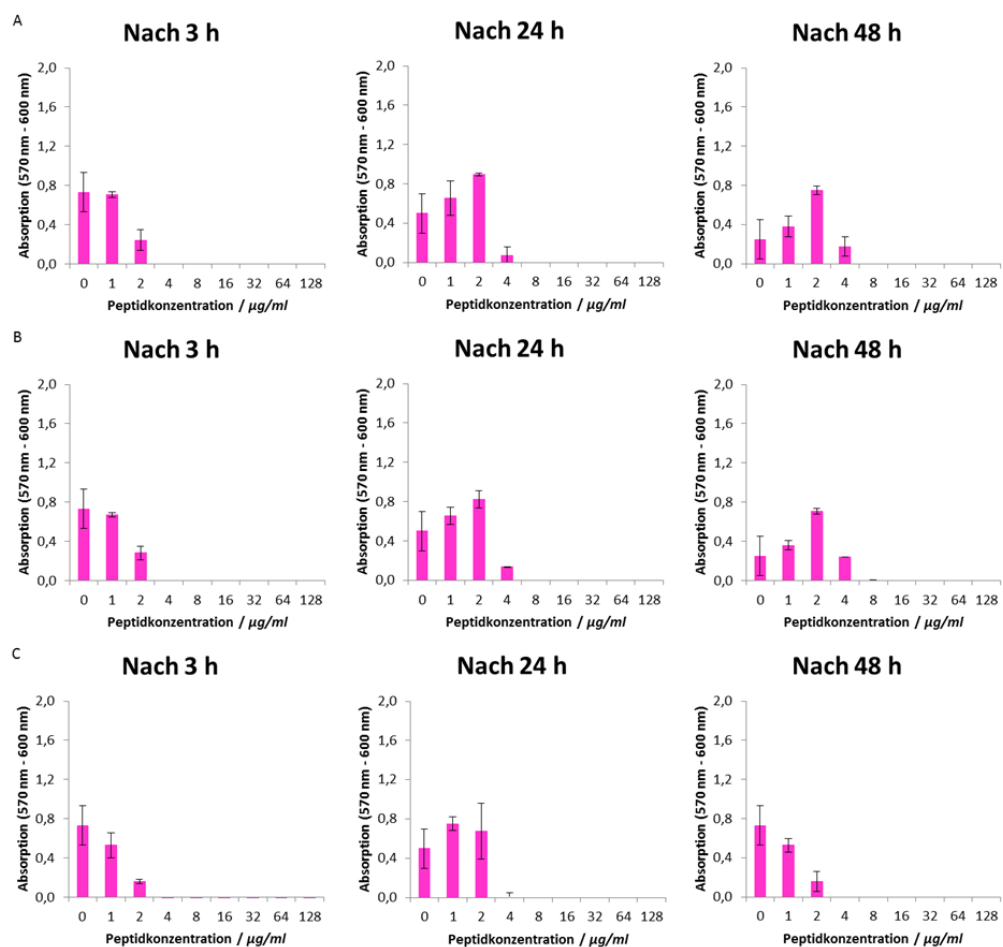
## C Untersuchungen an Biofilmmatrix



**Abbildung 67** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit DDAO und Live/Dead-Mix und *S. aureus*. Die Bakterien wurden mit sublethalen Konzentrationen der unterschiedlichen AMPs und zwei Antibiotika inkubiert und danach angefärbt. Die Biofilme haben sich am Boden der Mikrotiterplatte gebildet. Die linke Spalte zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit DDAO und die rechte Spalte die dazugehörigen Bilder mit dem Live/Dead Mix. Die jeweiligen Peptid-/Antibiotikanamen und Konzentrationen wurden in weißen Buchstaben eingefügt. Die Ansätze wurden in LBG Medium inkubiert und die Aufnahmen wurden mit einem Inversmikroskop bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

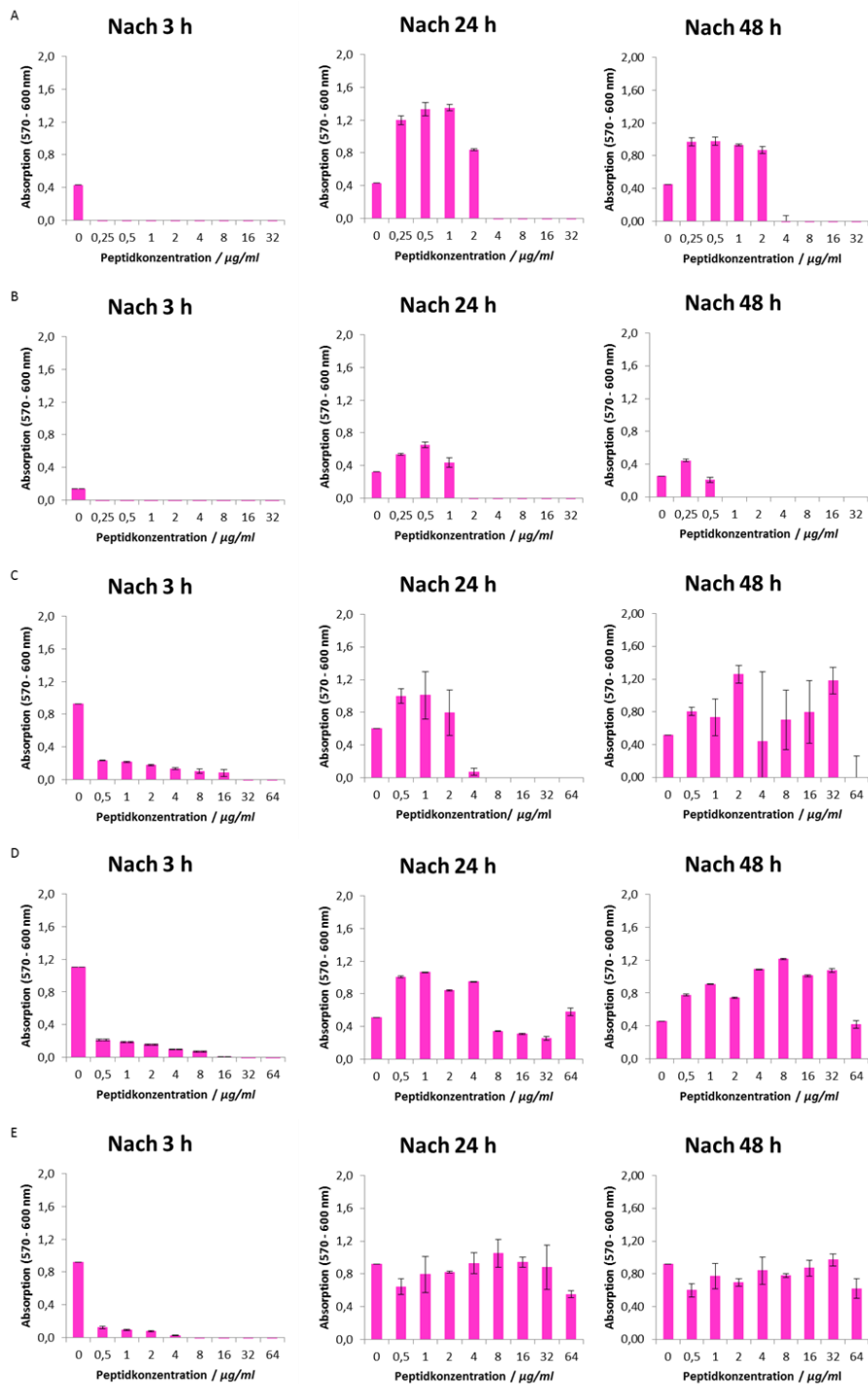
## D Antimikrobielle Peptide

### 1. Atmungsüberwachung der nicht gezeigten, aber untersuchten Peptide



**Abbildung 68** Atmungsüberwachung von Gramicidin S und (A) MRSA 9, (B) MRSA SCV und (C) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

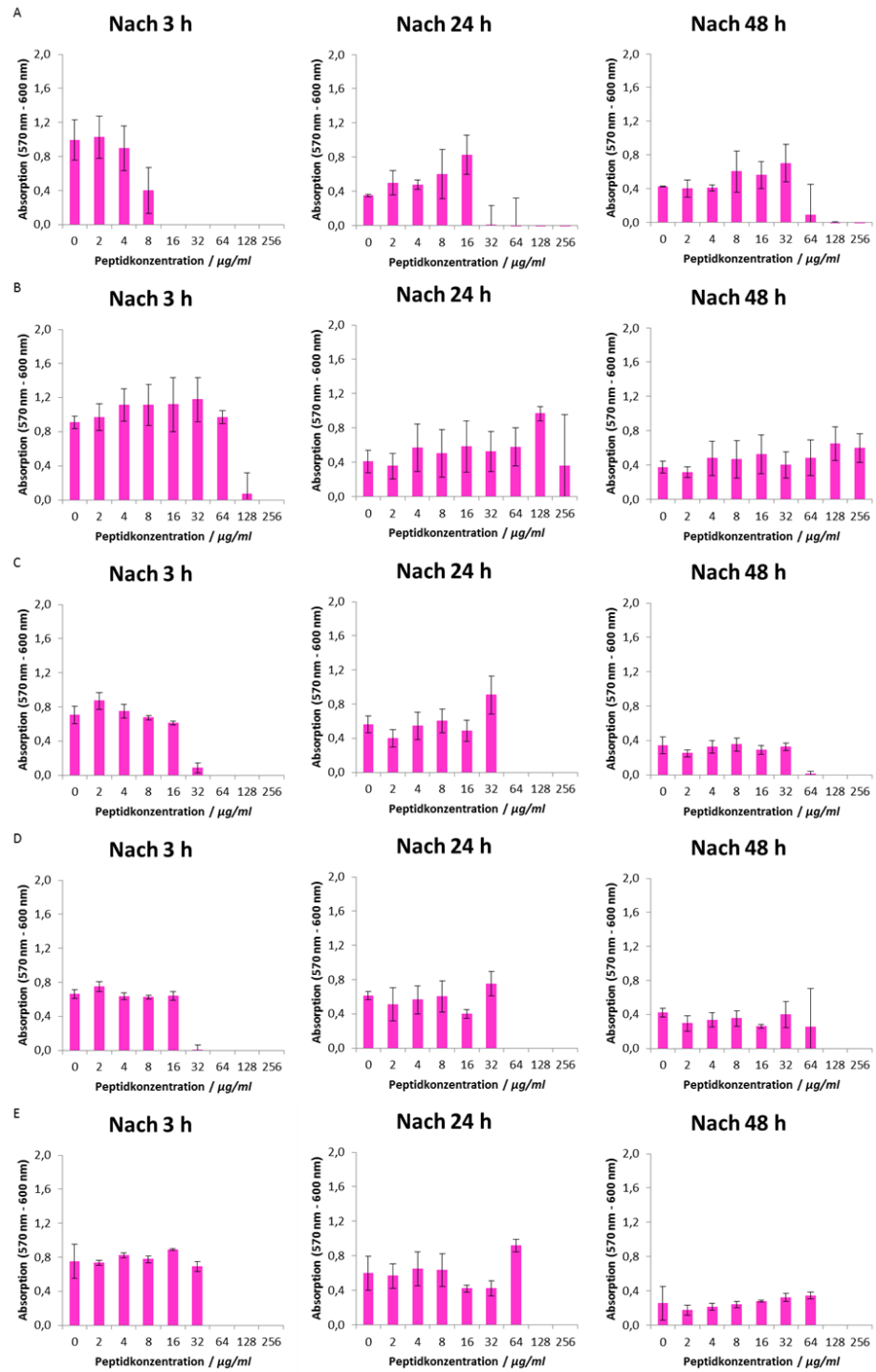
## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 69** Atmungsüberwachung von Gramicidin A und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

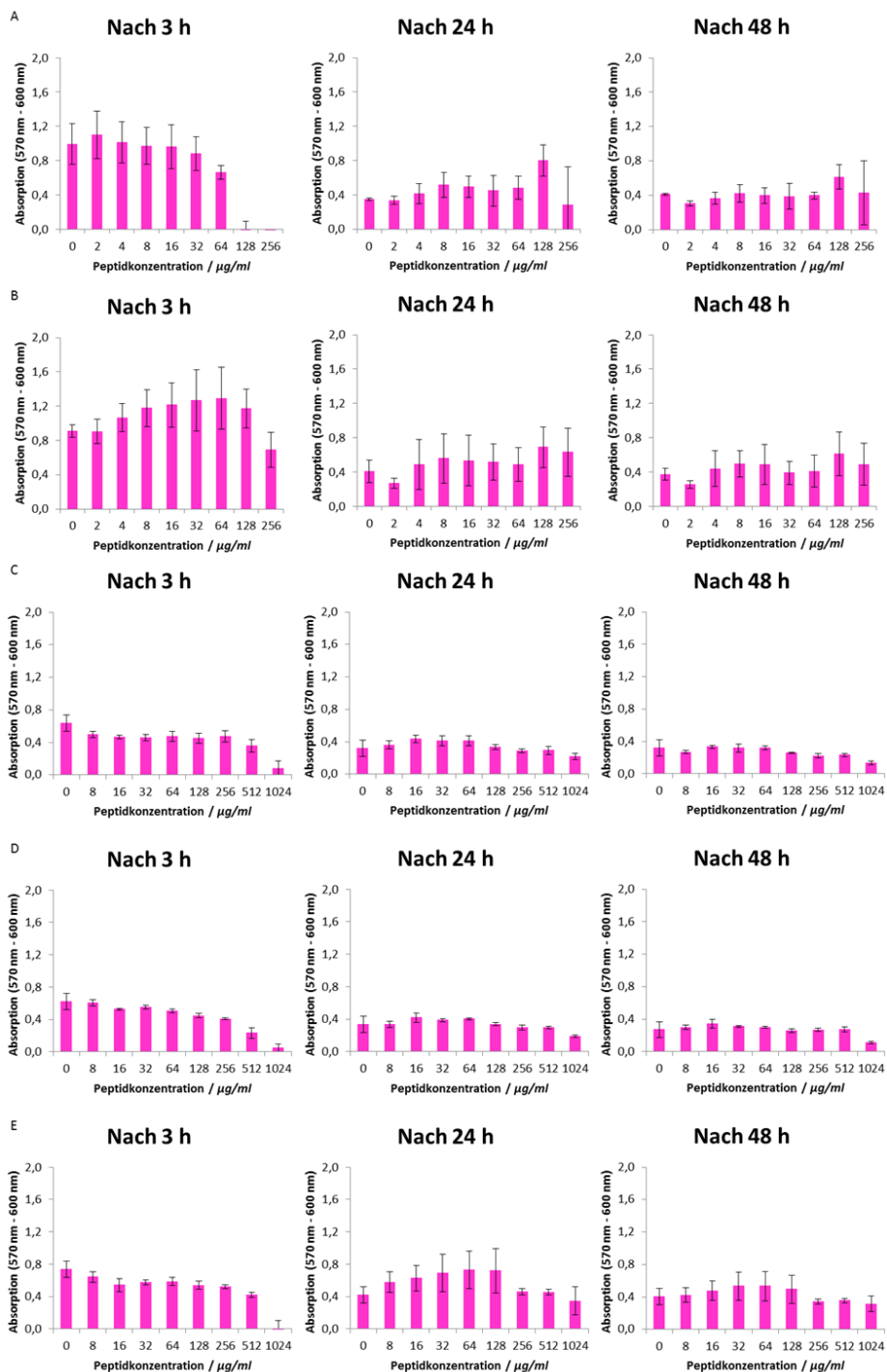


## D Antimikrobielle Peptide



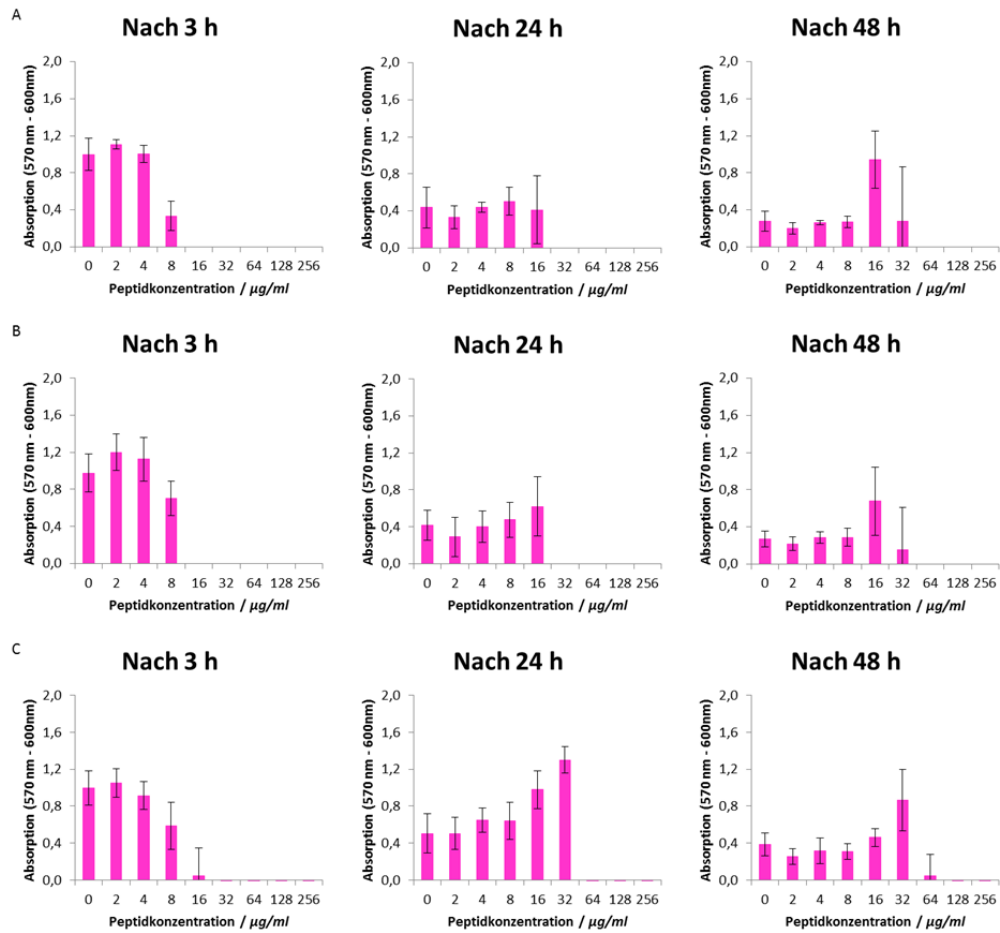
**Abbildung 70** Atmungsüberwachung von PGLa und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



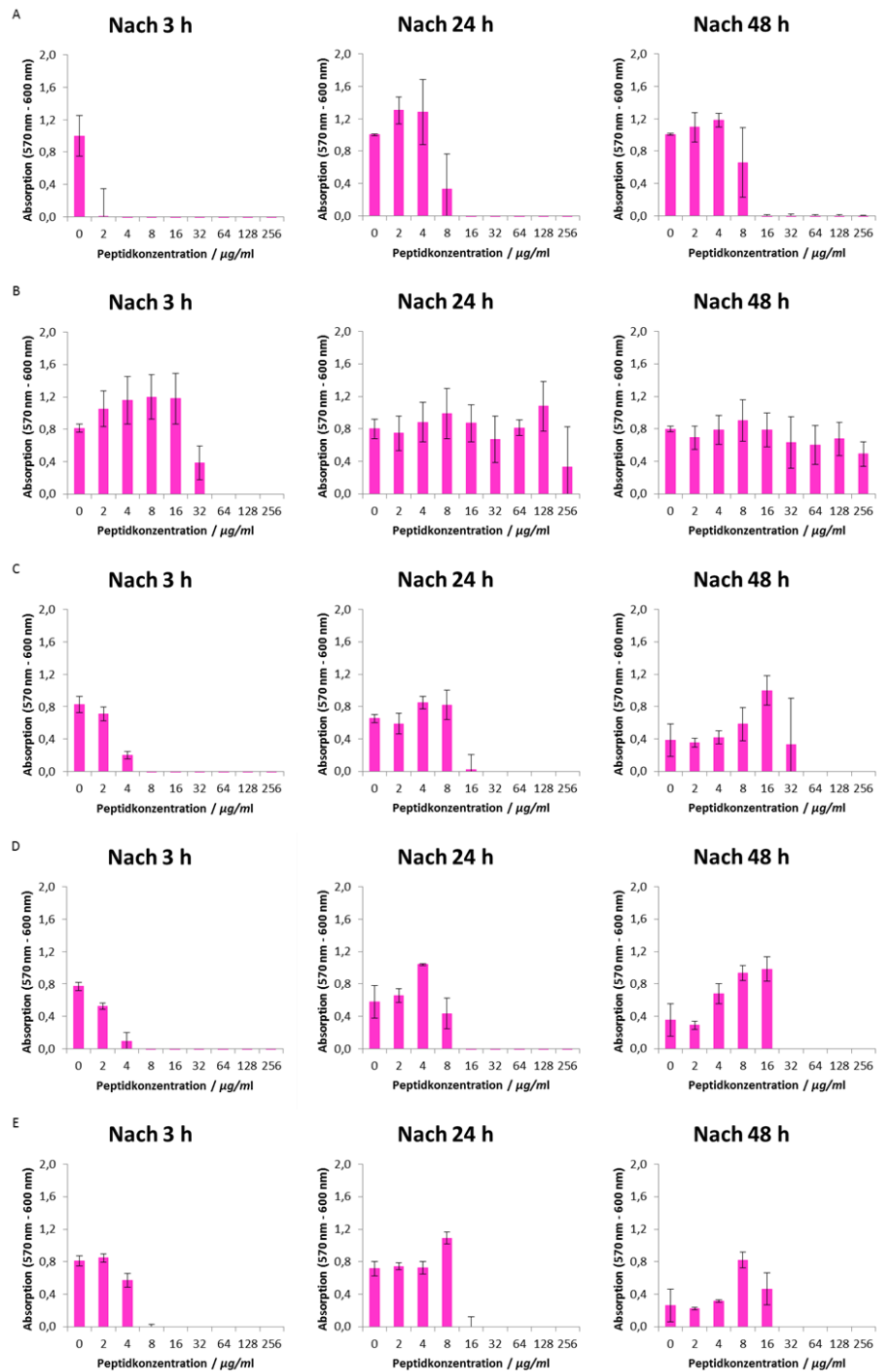
**Abbildung 71** Atmungsüberwachung von Magainin2 und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



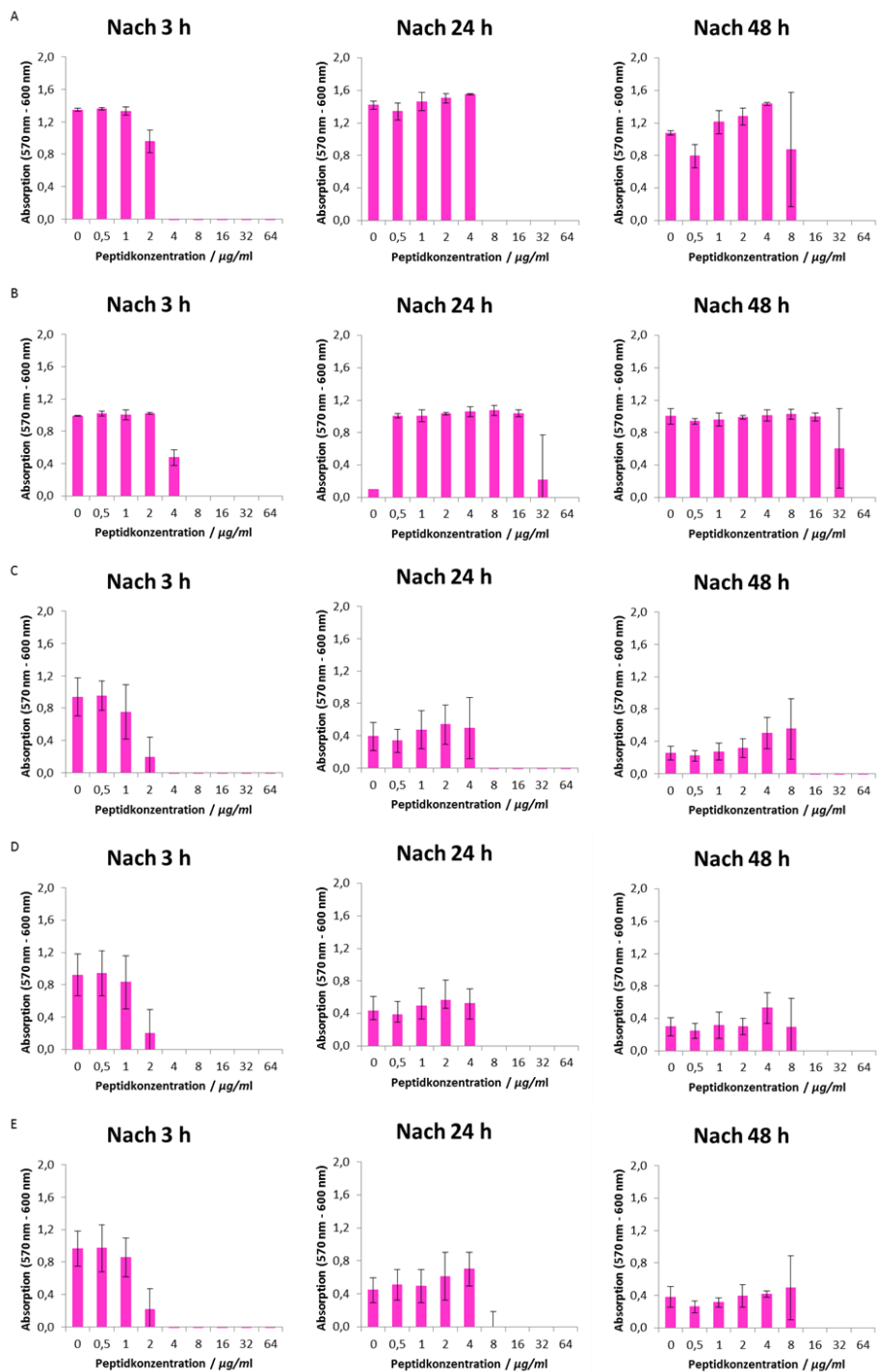
**Abbildung 72** Atmungsüberwachung von PGLa/Mag2 (1:1) und (A) MRSA 9, (B) MRSA SCV und (C) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



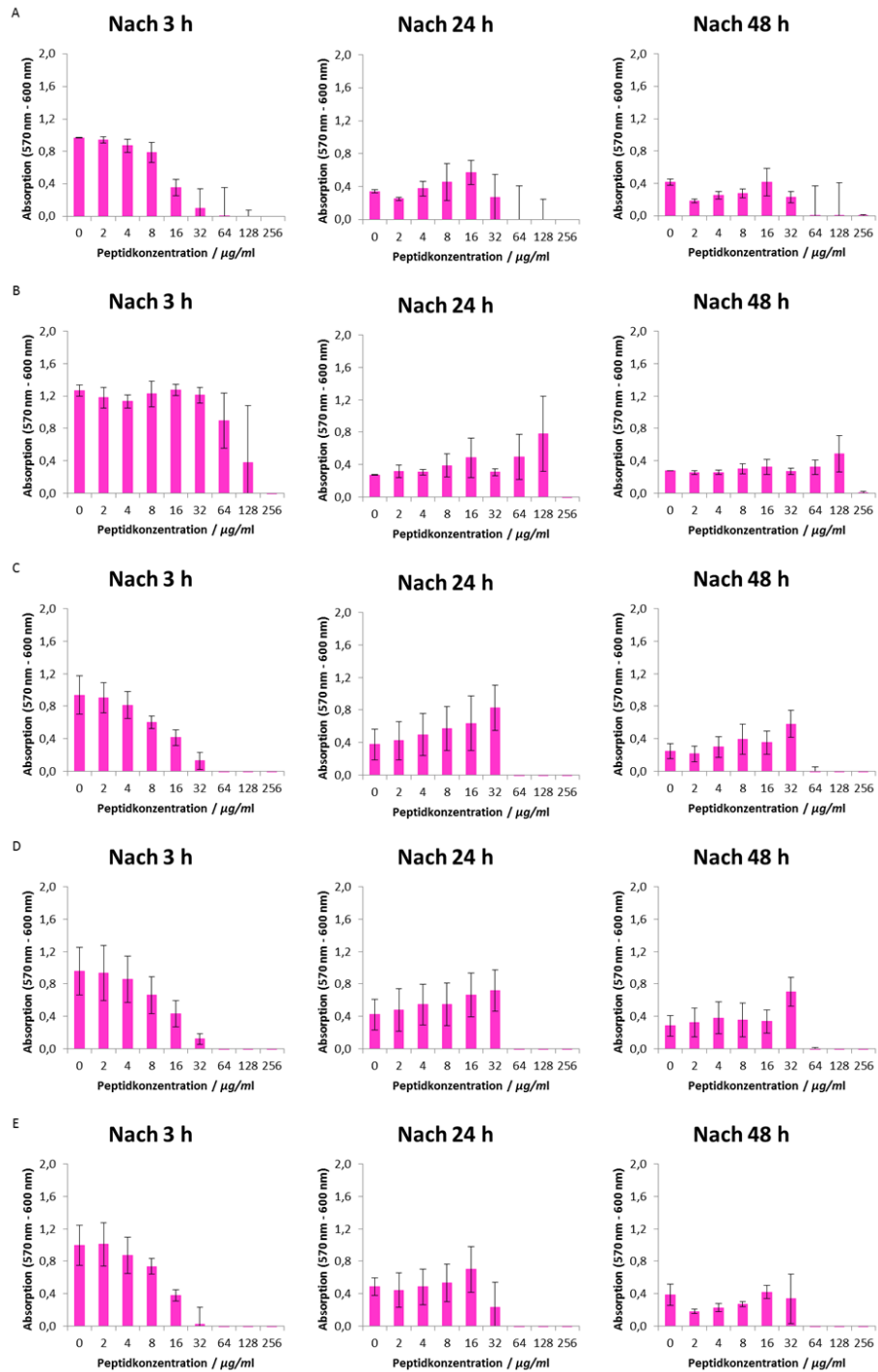
**Abbildung 73** Atmungsüberwachung von MSI-103 und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



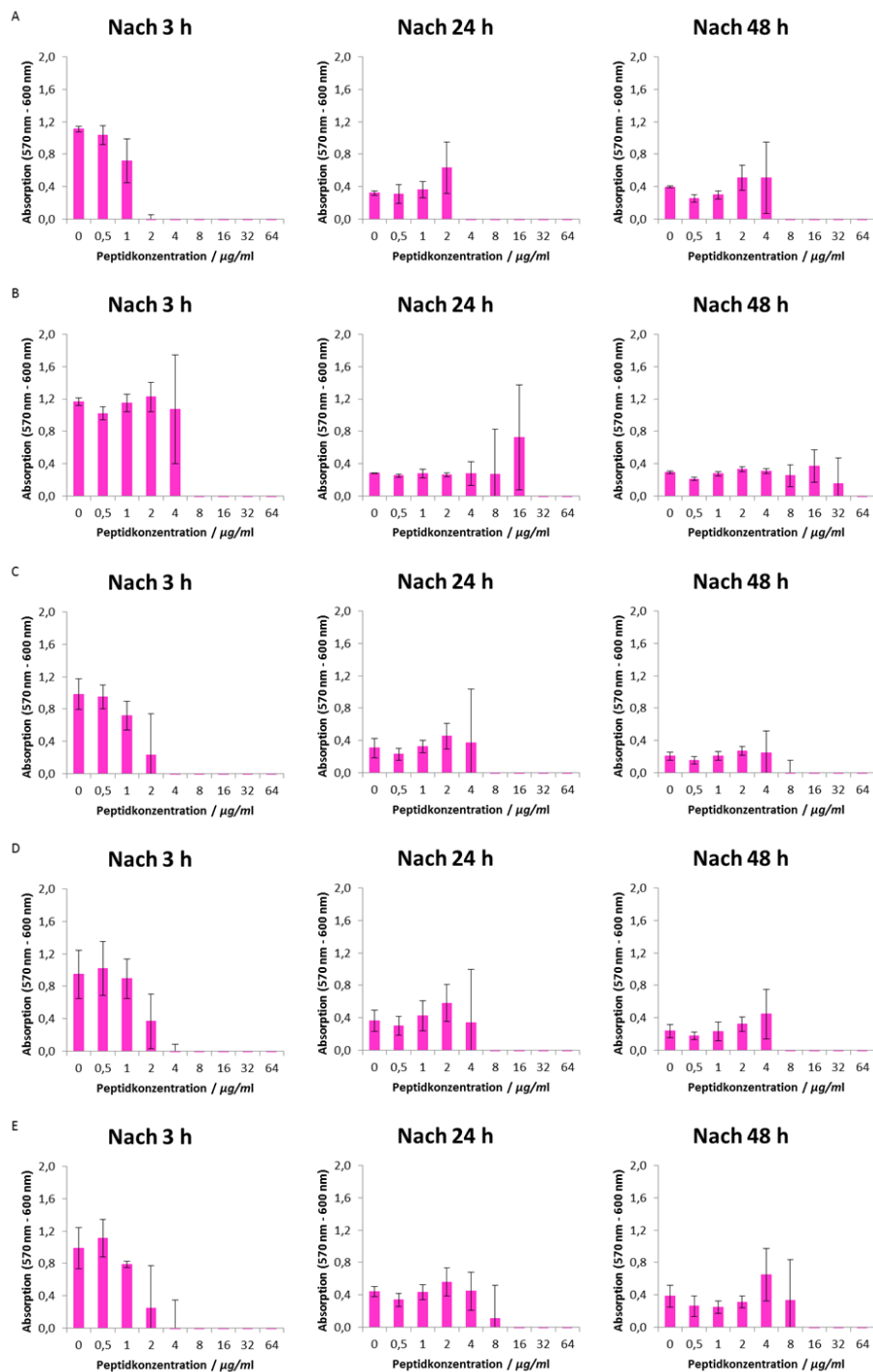
**Abbildung 74** Atmungsüberwachung von MAP und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



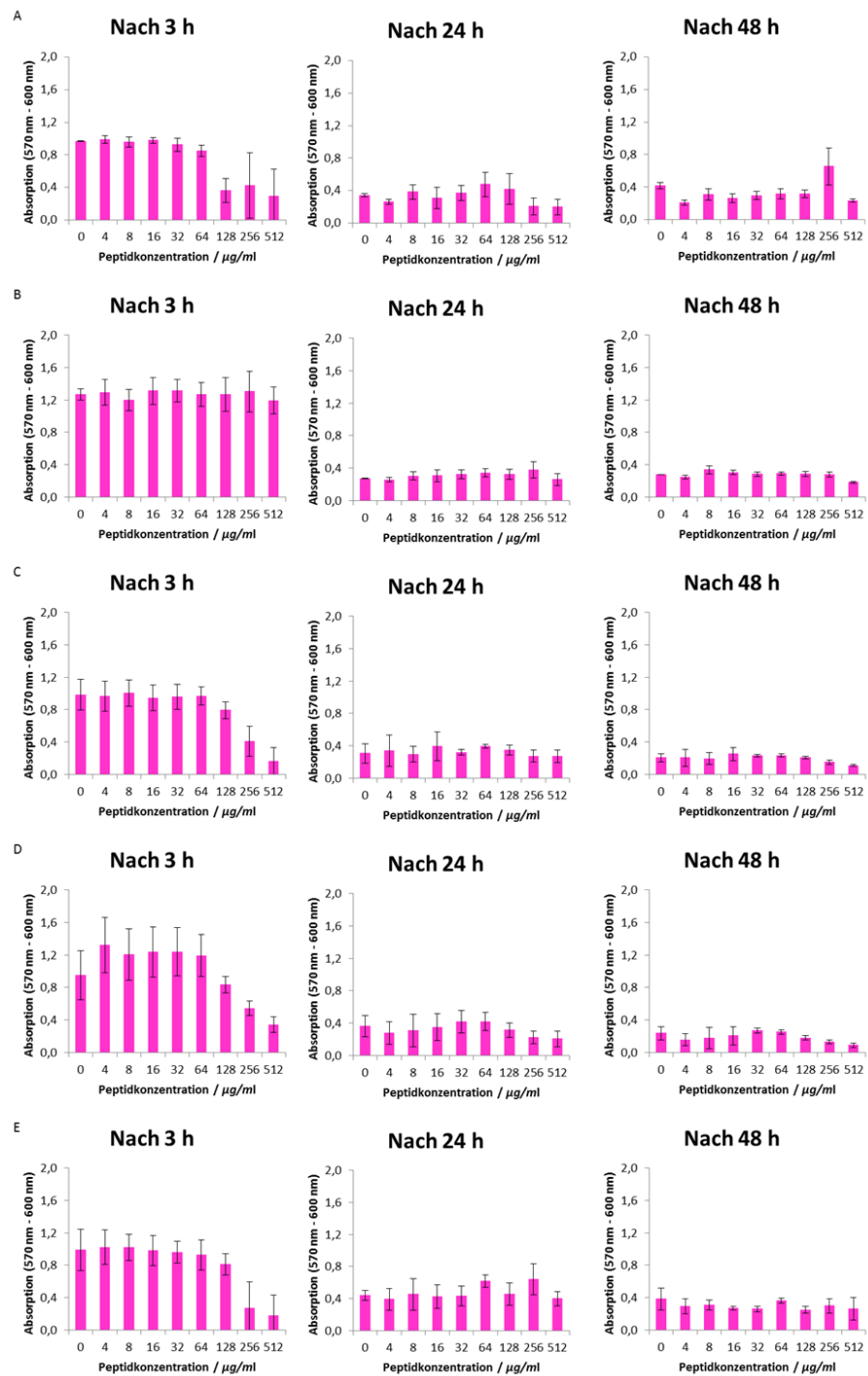
**Abbildung 75** Atmungsüberwachung von TempA und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 76** Atmungsüberwachung von TempL und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

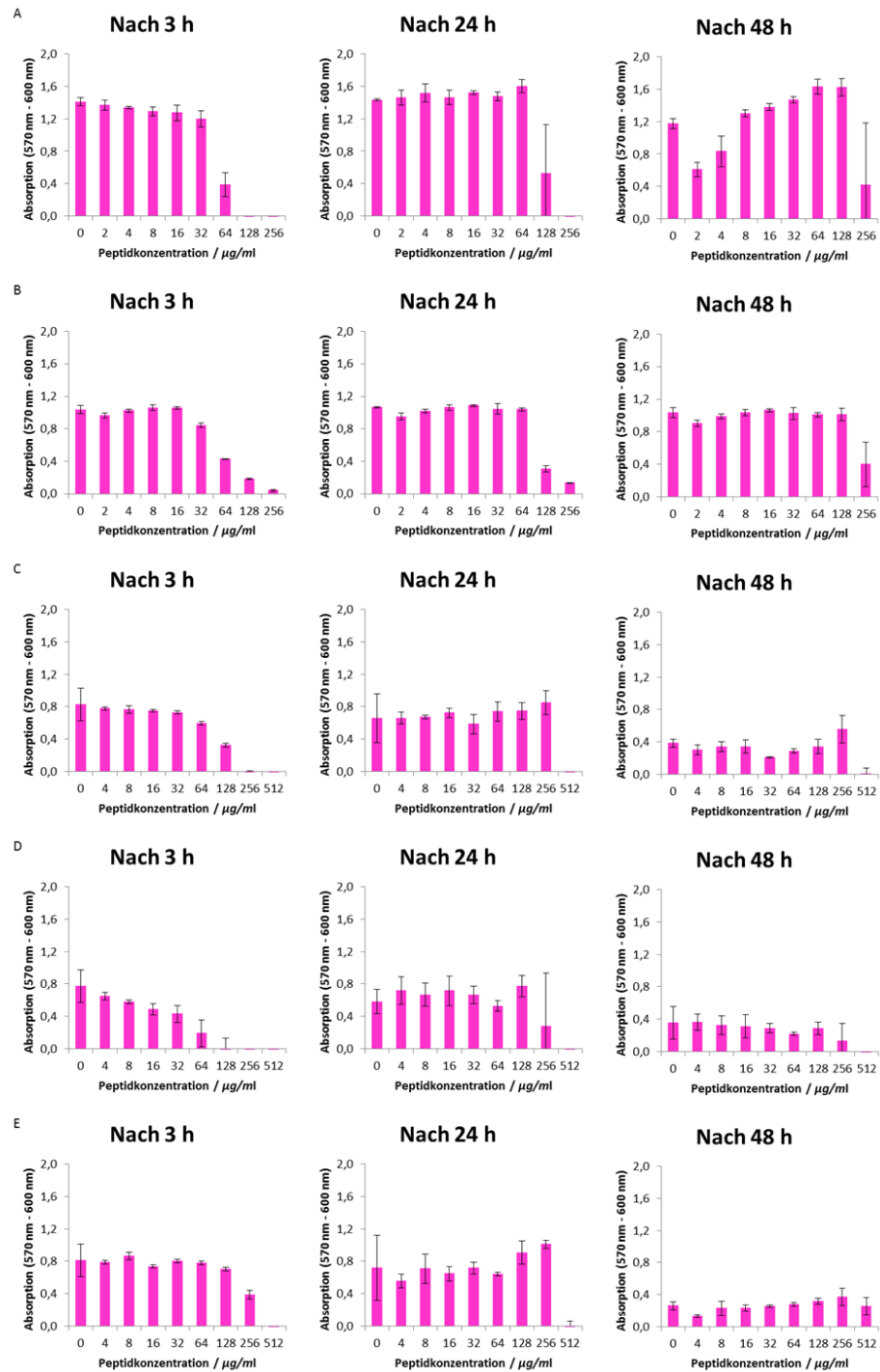
## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 77** Atmungsüberwachung von TempShf und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

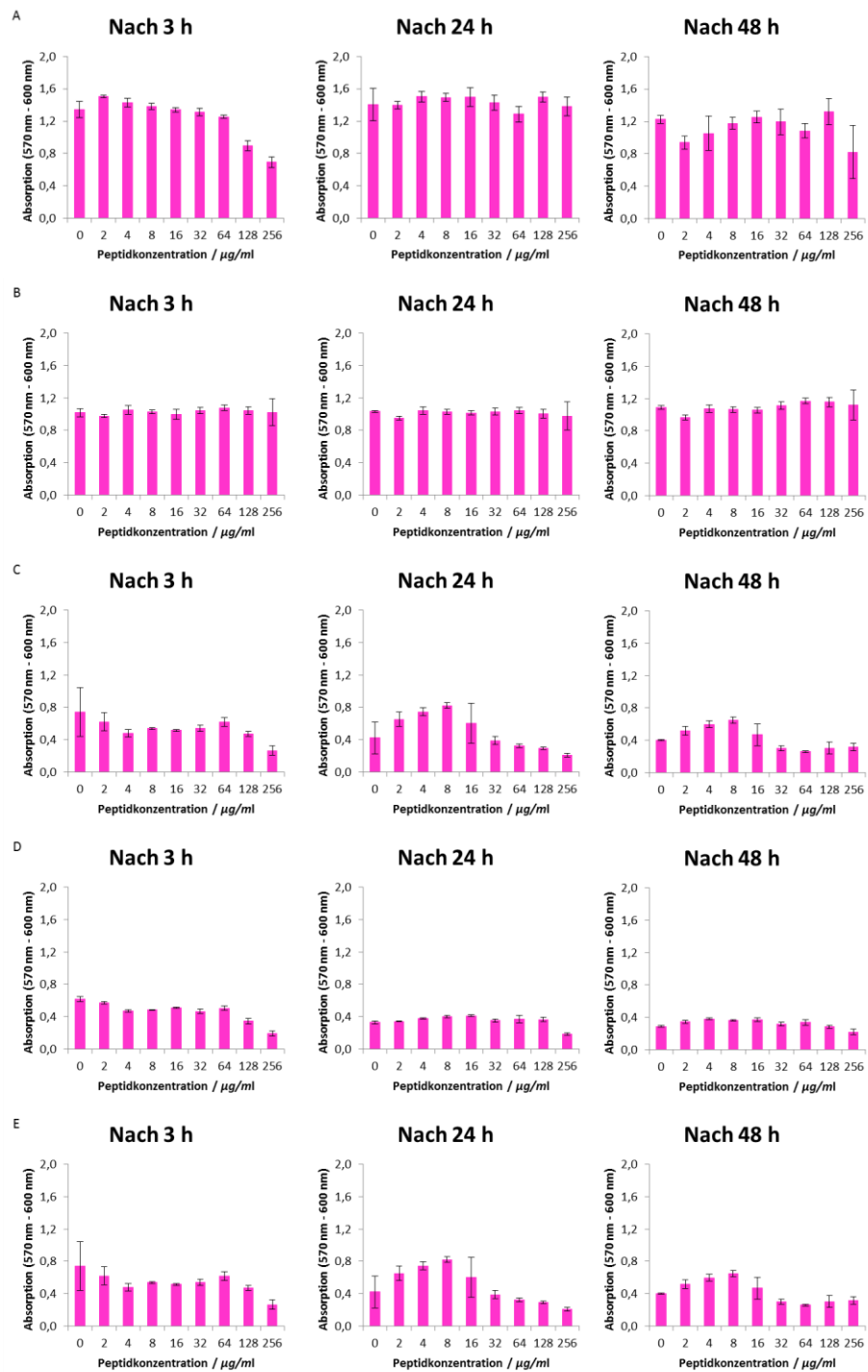


## D Antimikrobielle Peptide



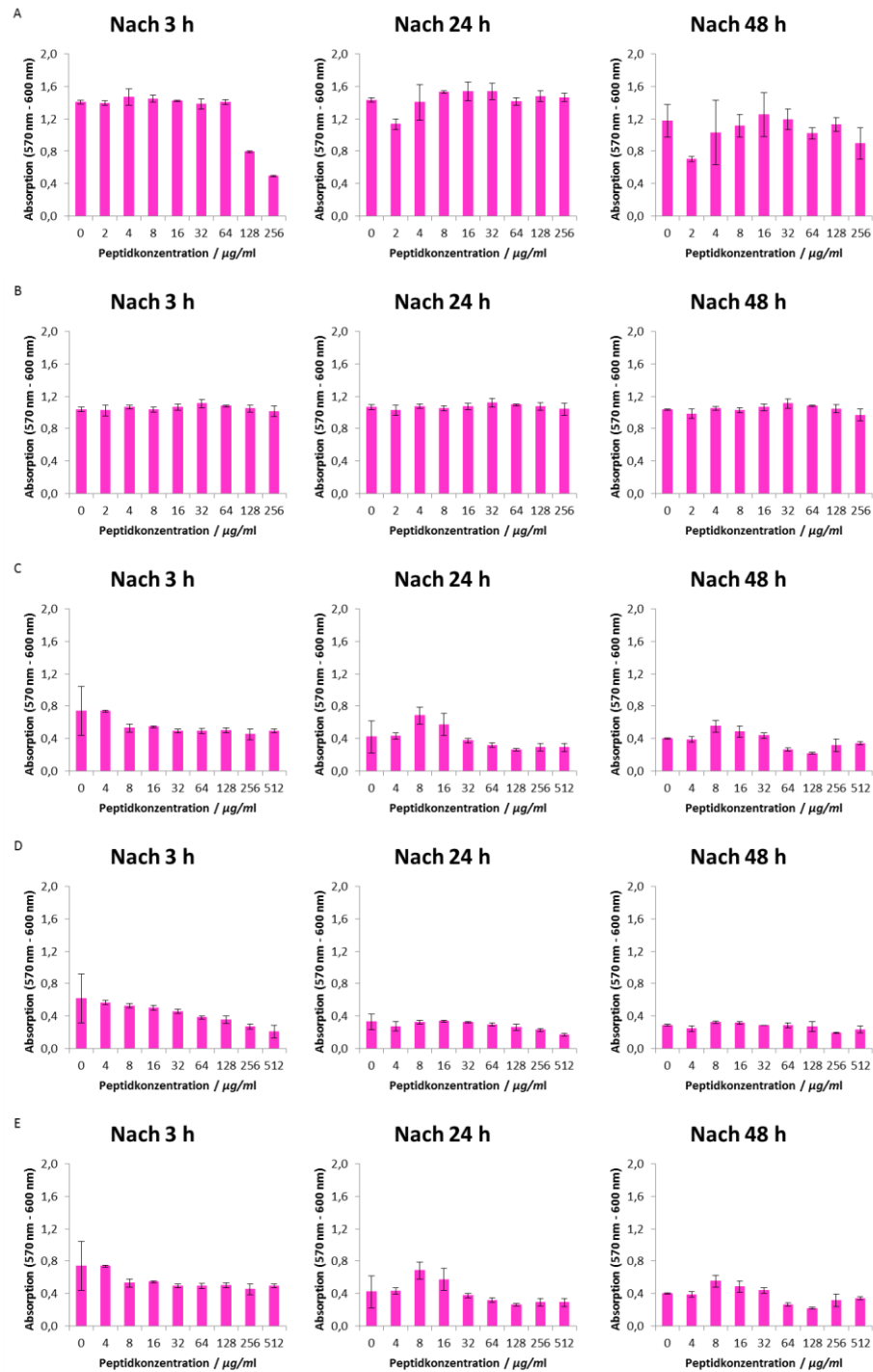
**Abbildung 78** Atmungsüberwachung von LL-37 und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



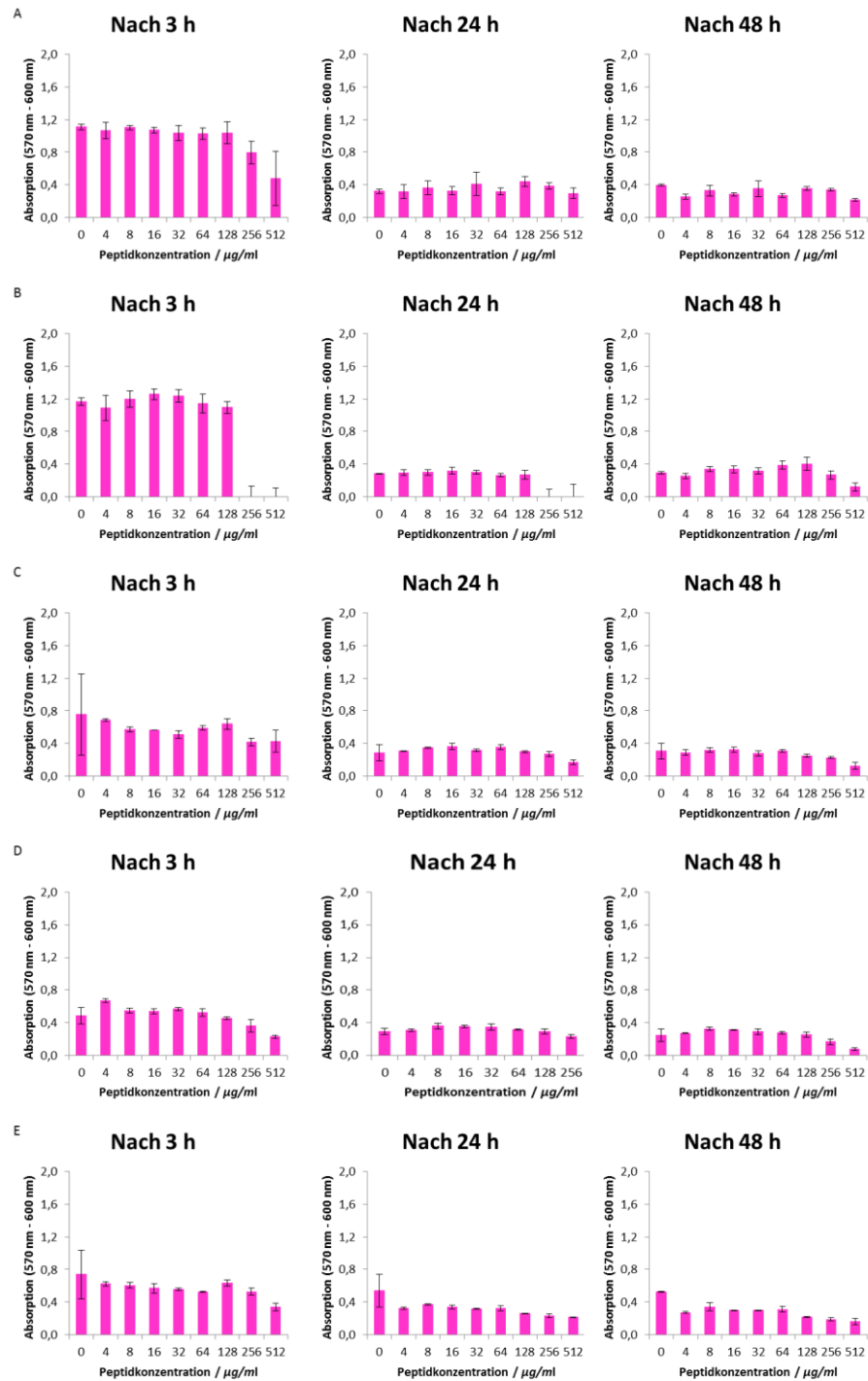
**Abbildung 79** Atmungsüberwachung von DCD-1L und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



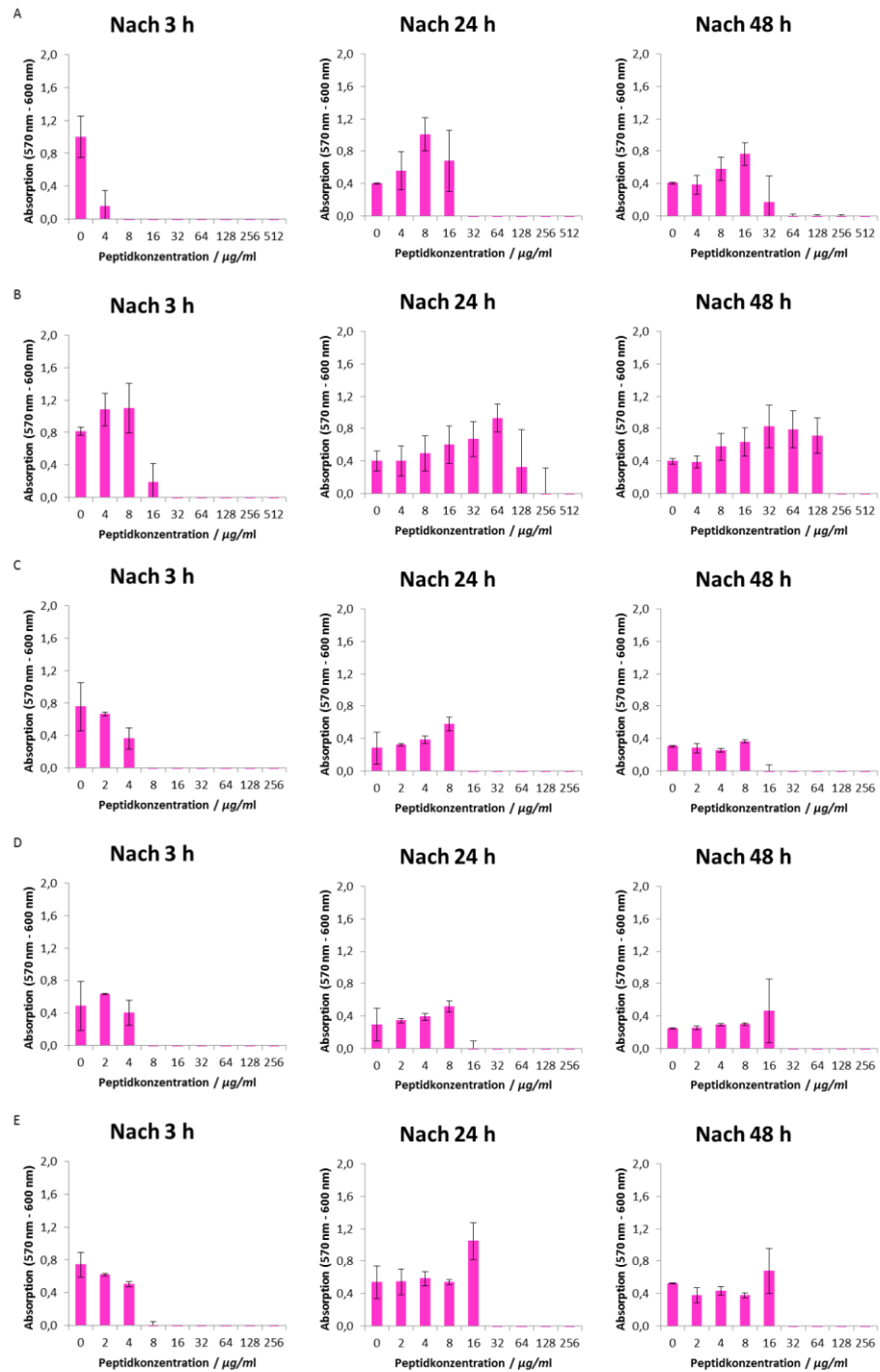
**Abbildung 80** Atmungsüberwachung von SSL-25 und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



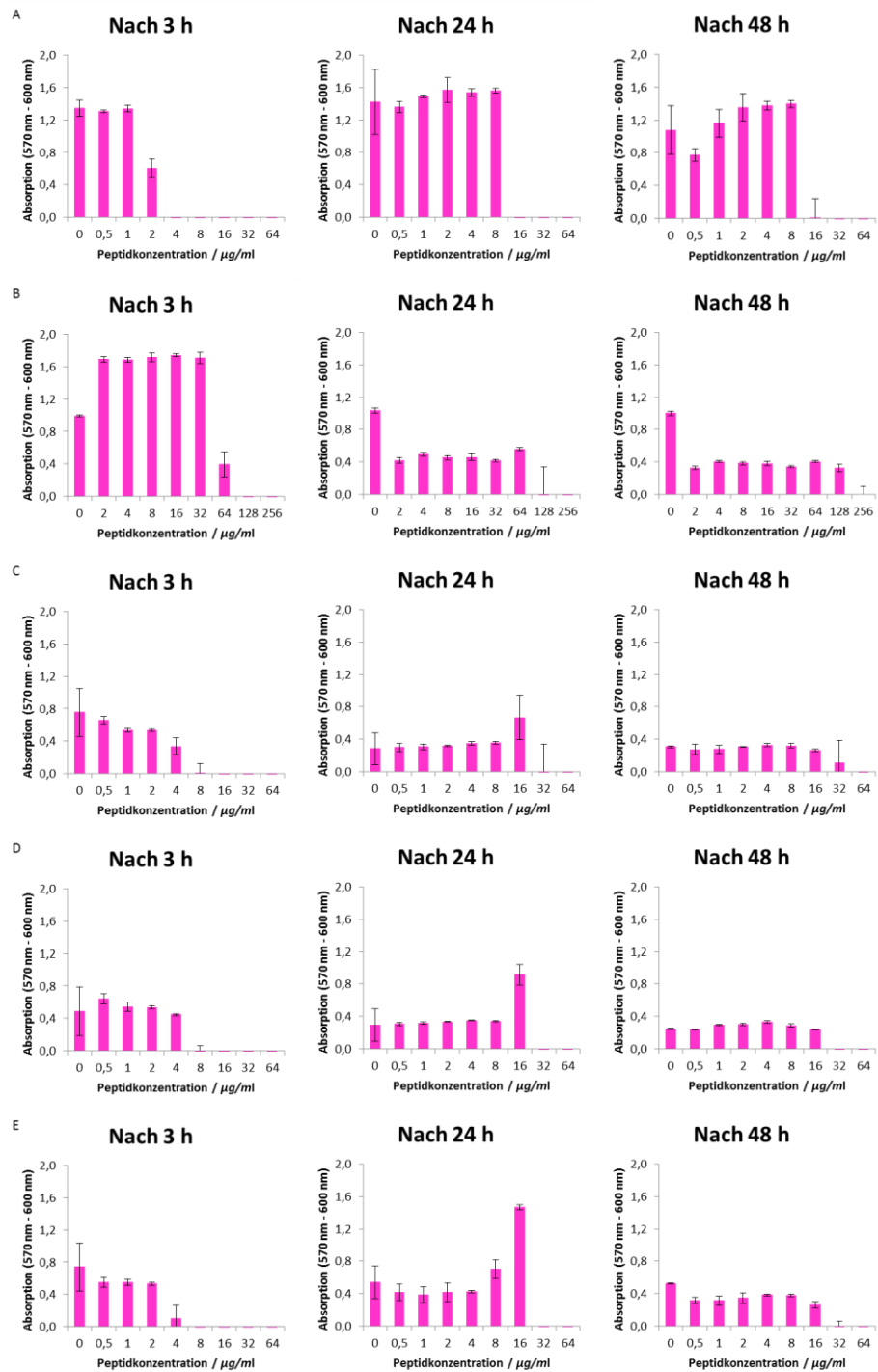
**Abbildung 81** Atmungsüberwachung von Alamethicin und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



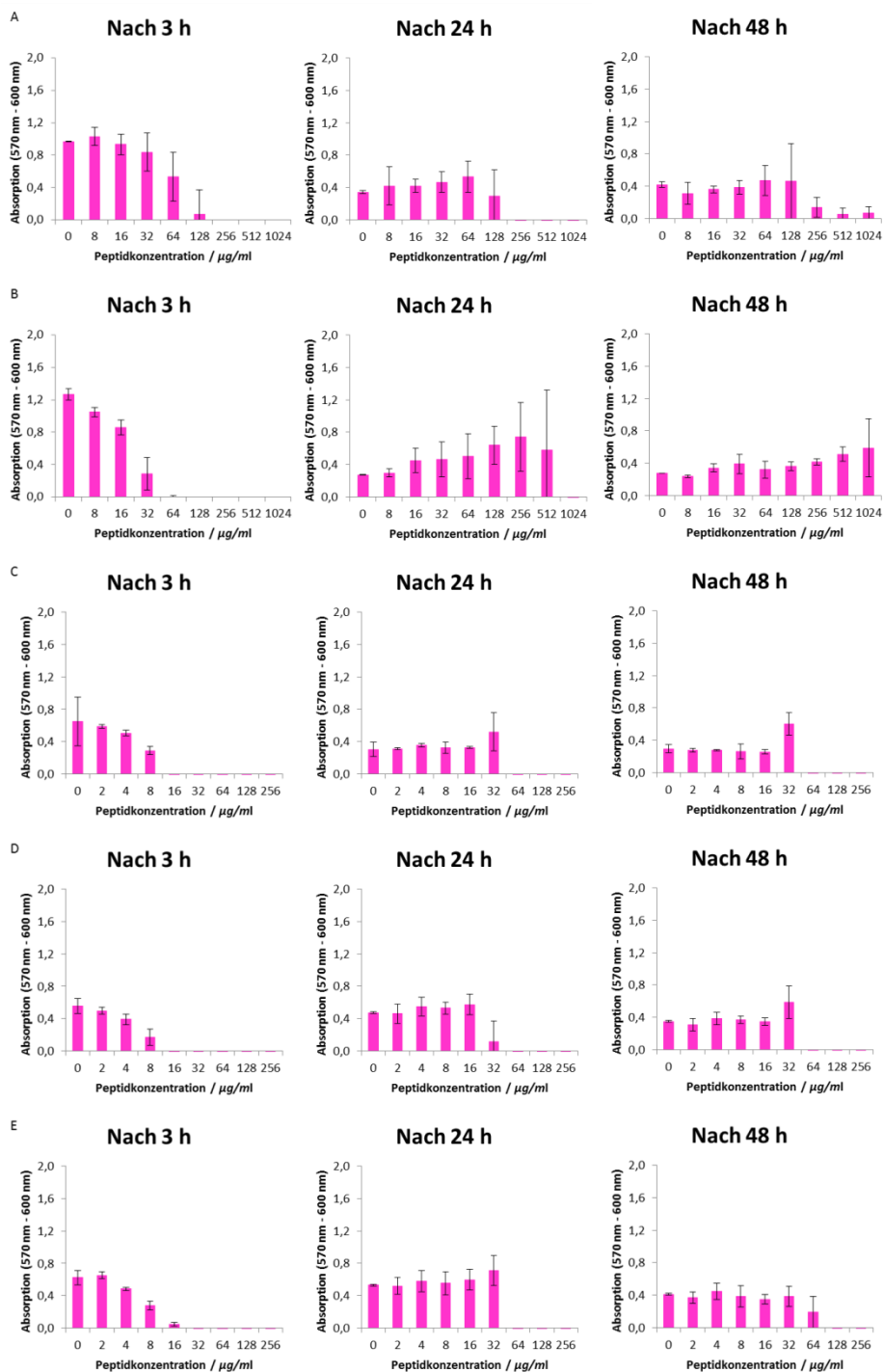
**Abbildung 82** Atmungsüberwachung von TP10 und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



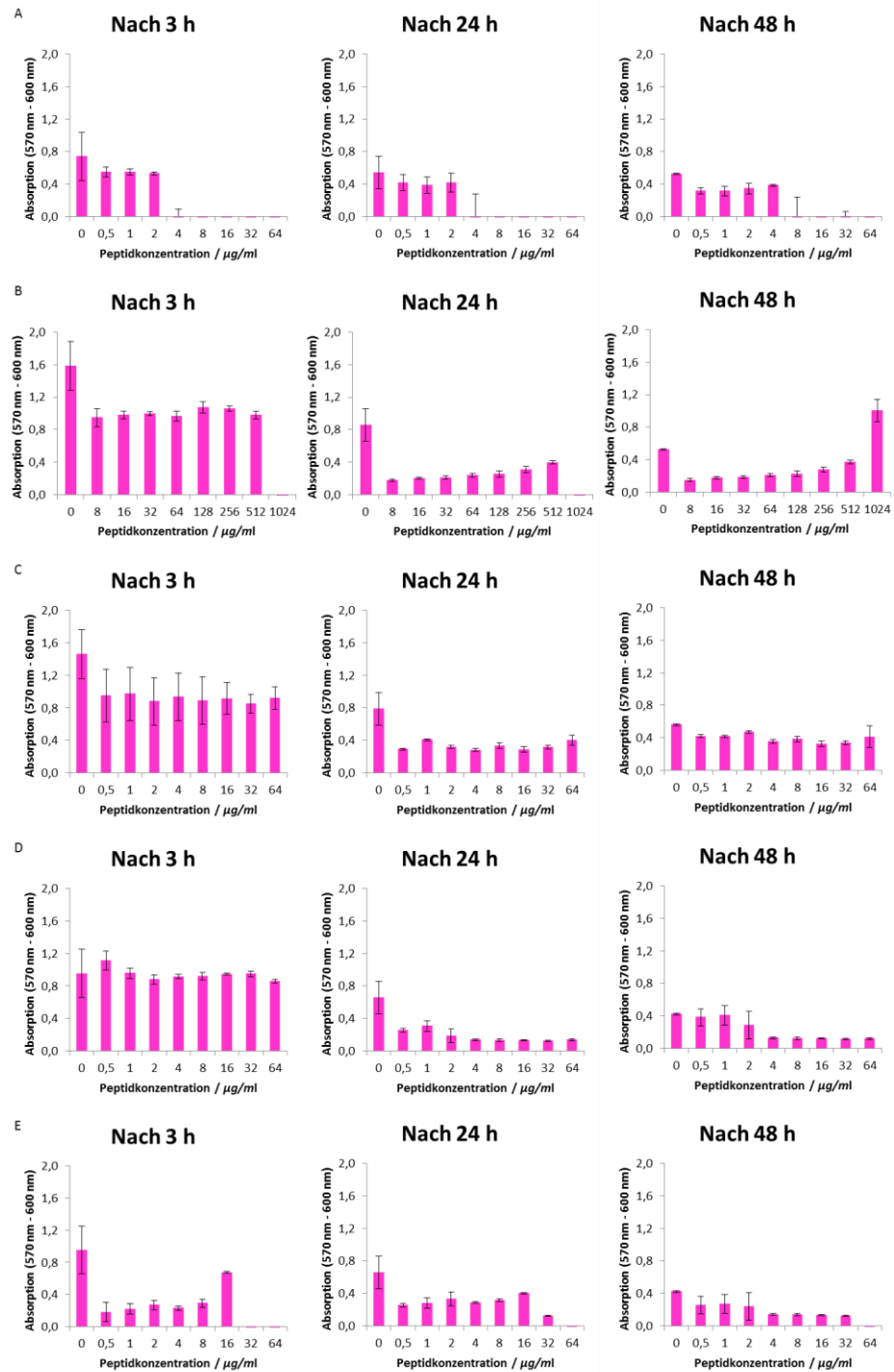
**Abbildung 83** Atmungsüberwachung von Bp100 und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 84** Atmungsüberwachung von KIGAKI und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

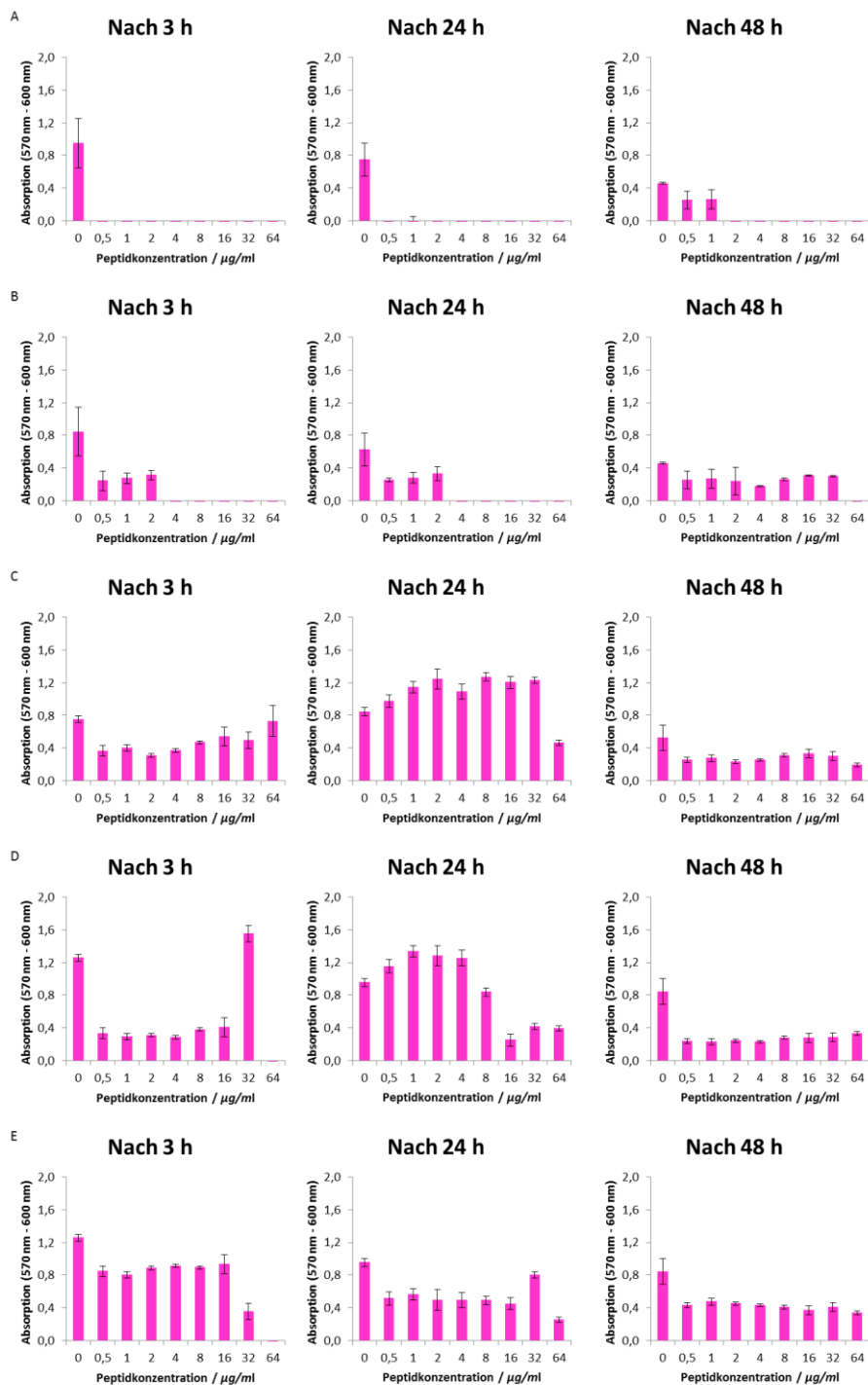
## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 85** Atmungsüberwachung von Vancomycin und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.



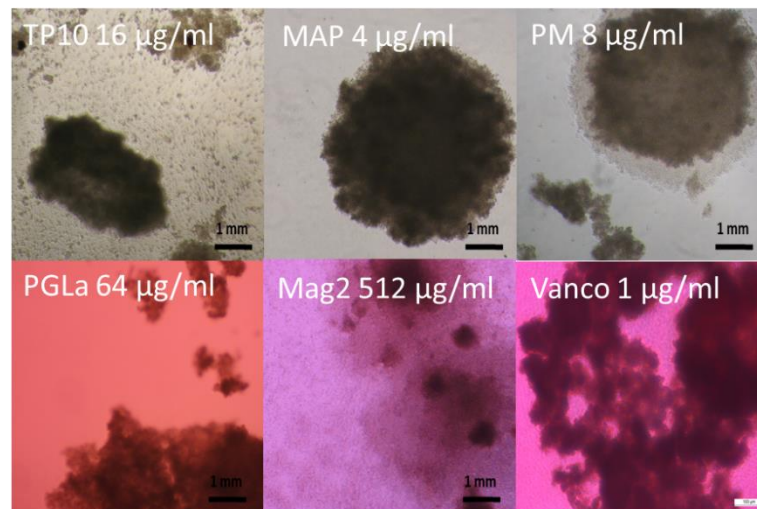
## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 86** Atmungsüberwachung von Demeclocyclin und (A) *S. aureus*, (B) *E. faecalis*, (C) MRSA 9, (D) MRSA SCV und (E) MRSA BP. Das Peptid wurde für 48 h bei 37°C mit den Bakterien inkubiert und nach 3, 24 und 48 h am Spektrophotometer bei 570 und 600 nm vermessen. Die Inokulationsdosis betrug  $5 \cdot 10^7$  KBE/ml und der Test wurde in MH Medium durchgeführt.

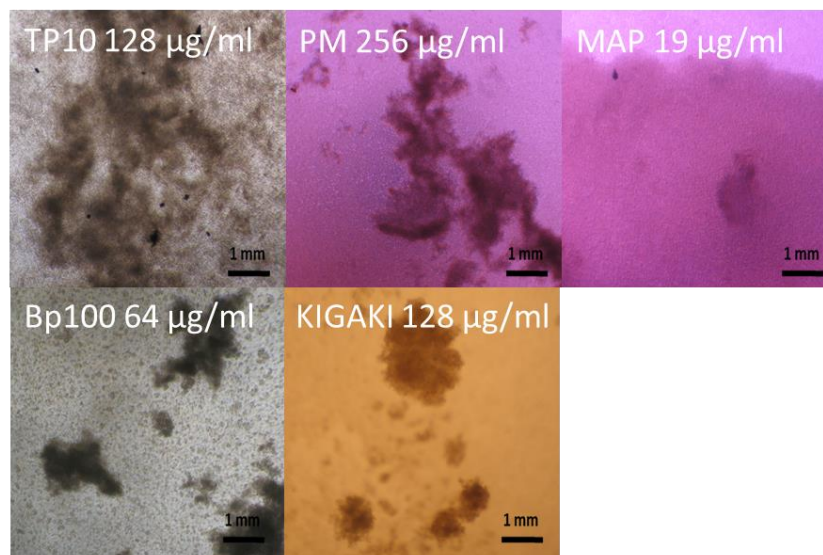
## 2. Beobachtete Biofilmkolonien aus der Atmungsüberwachung

### a) *S. aureus* DSM 1104



**Abbildung 87** Induzierte Biofilme von *S. aureus* und diverser AMPs/Antibiotika. Die Namen der Wirkstoffe sind in den Bildern mit ihrer verwendeten Konzentration angegeben. Aufgenommen mit dem Inversmikroskop und einer 40-fachen Vergrößerung direkt aus den Mikrotiterplatten der Atmungsüberwachung nach 48 h Inkubation bei 37 °C (Das Bild von Vancomycin wurde mit der Kamera von Leica aufgenommen im Gegensatz zu den anderen die mit der Canon Kamera aufgenommen wurden, siehe Materialliste).

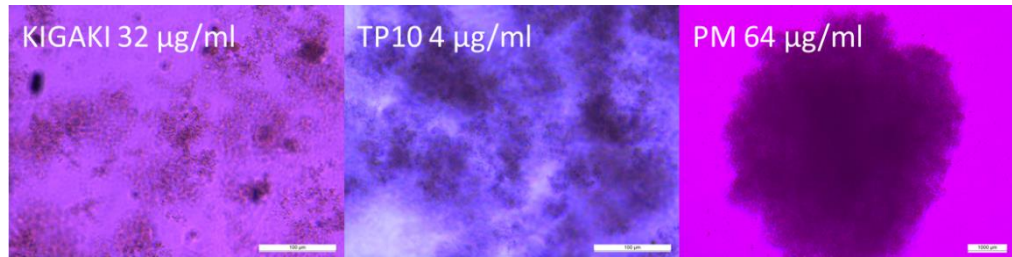
### b) *E. faecalis* DSM 2570



**Abbildung 88** Induzierte Biofilme von *E. faecalis* und diverser AMPs/Antibiotika. Die Namen der Wirkstoffe sind in den Bildern mit ihrer verwendeten Konzentration angegeben. Aufgenommen mit dem Inversmikroskop und der Canon Kamera und einer 40-fachen Vergrößerung direkt aus den Mikrotiterplatten der Atmungsüberwachung nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

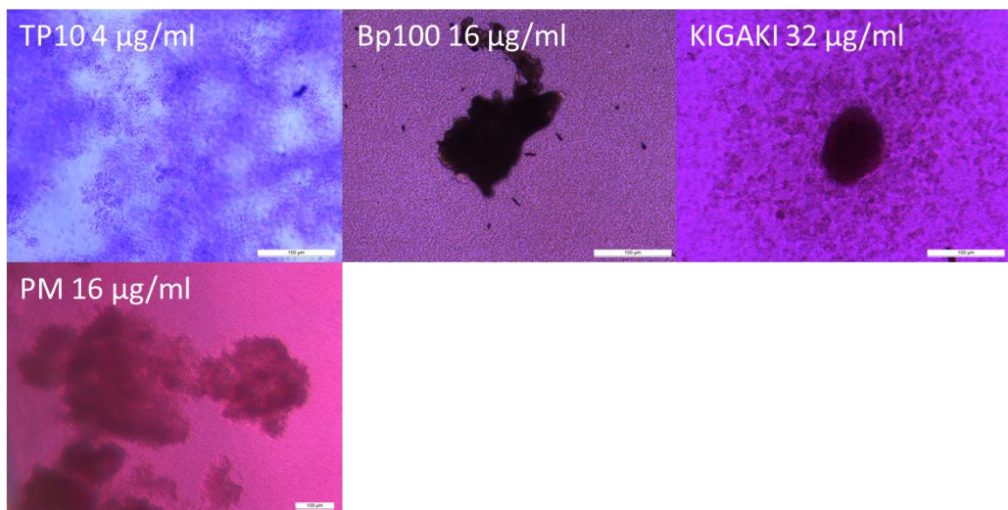
## D Antimikrobielle Peptide

### c) MRSA 9



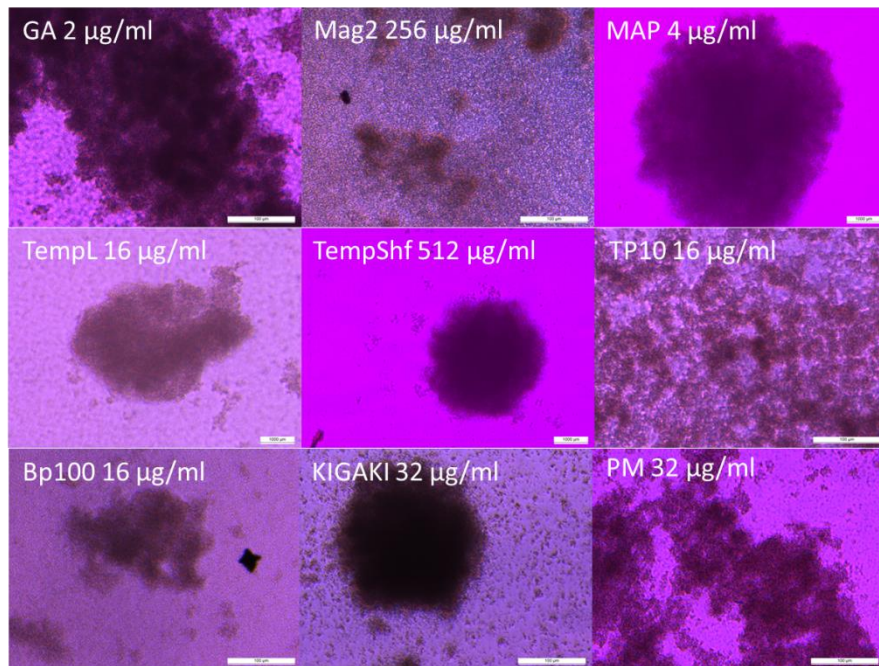
**Abbildung 89** Induzierte Biofilme von *E. faecalis* und diverser AMPs/Antibiotika. Die Namen der Wirkstoffe sind in den Bildern mit ihrer verwendeten Konzentration angegeben. Aufgenommen mit dem Inversmikroskop und der Leica Kamera und einer 40-fachen Vergrößerung direkt aus den Mikrotiterplatten der Atmungsüberwachung nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

### d) MRSA SCV



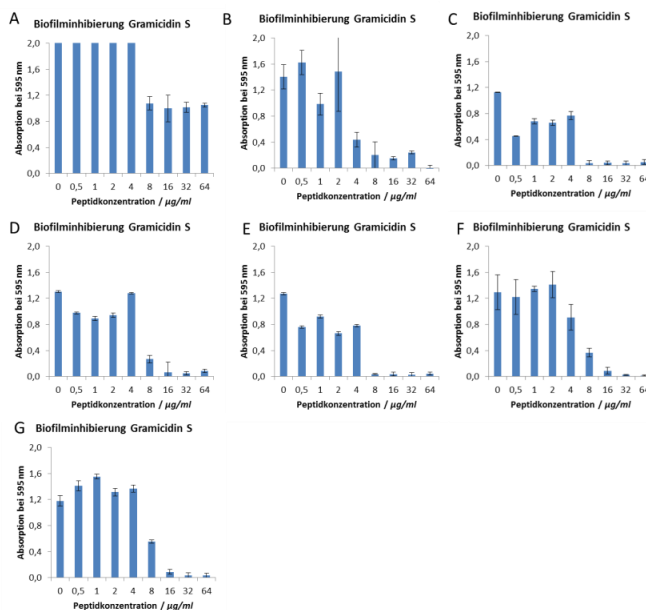
**Abbildung 90** Induzierte Biofilme von MRSA SCV und diverser AMPs/Antibiotika. Die Namen der Wirkstoffe sind in den Bildern mit ihrer verwendeten Konzentration angegeben. Aufgenommen mit dem Inversmikroskop und der Leica Kamera und einer 40-fachen Vergrößerung direkt aus den Mikrotiterplatten der Atmungsüberwachung nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

e) MRSA BP

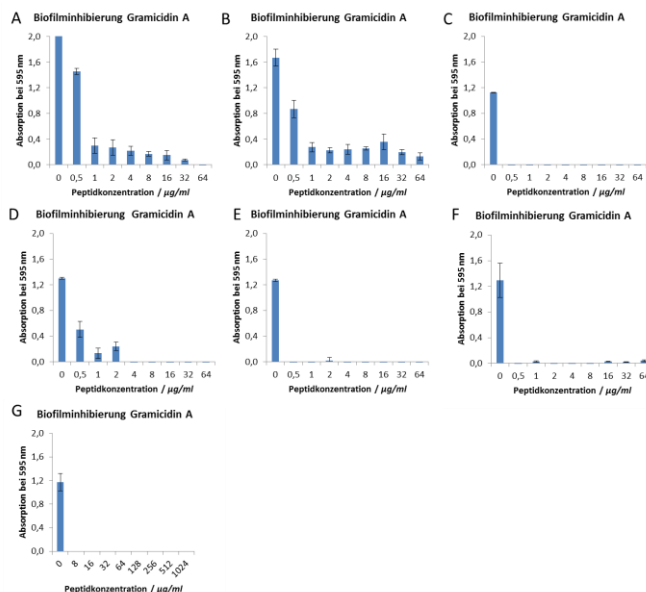


**Abbildung 91** Induzierte Biofilme von MRSA BP und diverser AMPs/Antibiotika. Die Namen der Wirkstoffe sind in den Bildern mit ihrer verwendeten Konzentration angegeben. Aufgenommen mit dem Inversmikroskop und der Leica Kamera und einer 40-fachen Vergrößerung direkt aus den Mikrotiterplatten der Atmungsüberwachung nach 48 h Inkubation bei 37 °C.

### 3. Auswertung biofilmhemmende Konzentration (MBHK)



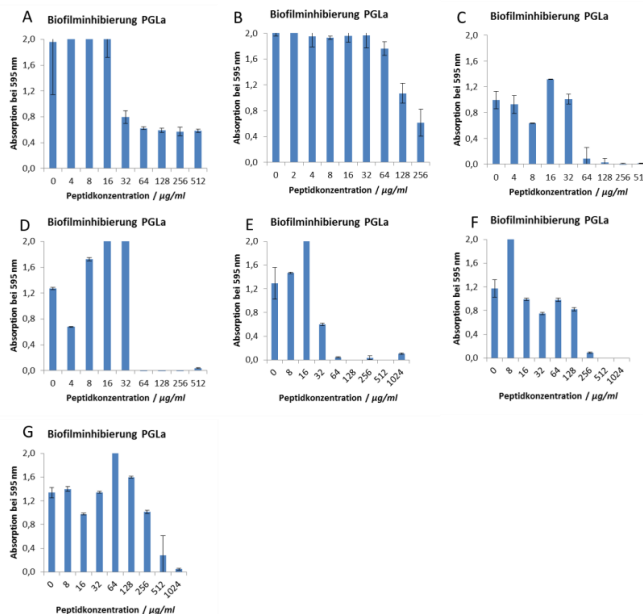
**Abbildung 92** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Gramicidin S und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.



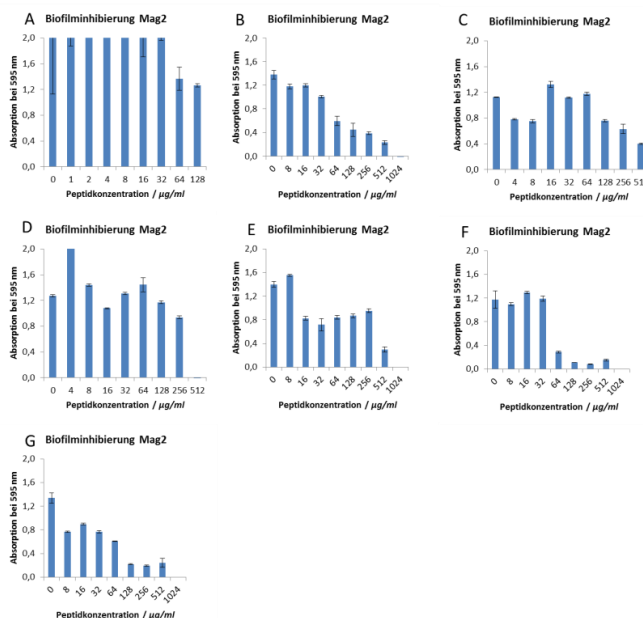
**Abbildung 93** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Gramicidin A und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.



## D Antimikrobielle Peptide

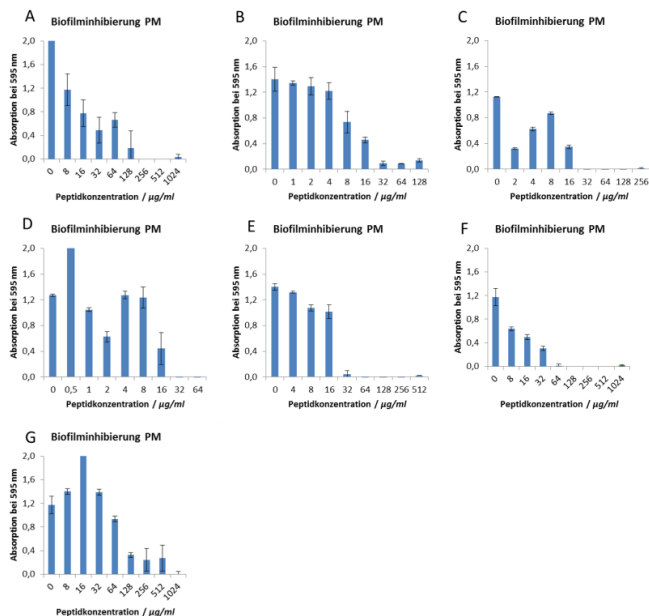


**Abbildung 94** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für PGLa und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

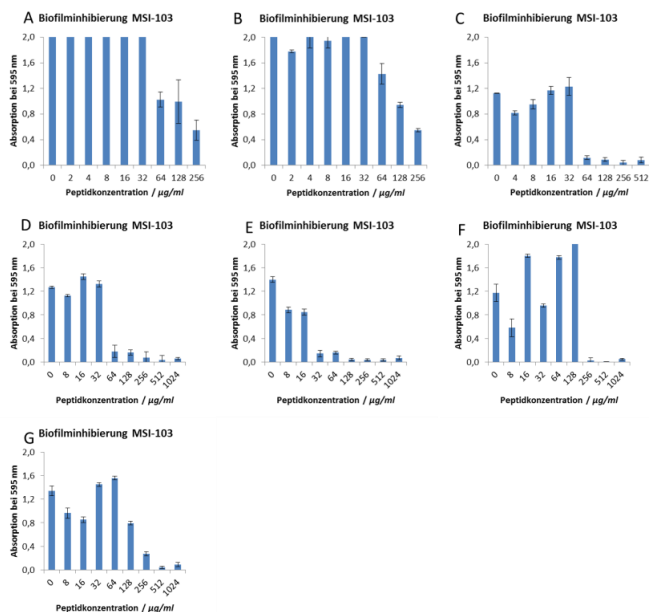


**Abbildung 95** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Magainin 2 und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse

## D Antimikrobielle Peptide

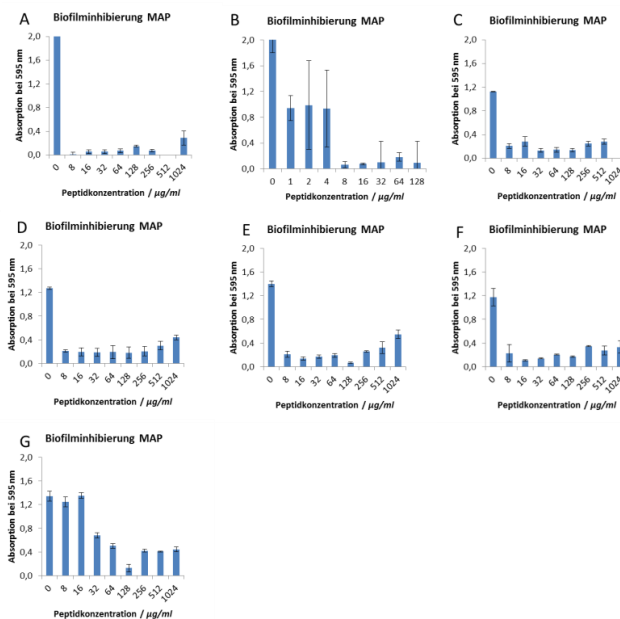


**Abbildung 96** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für PGLa/Mag2 (1:1) und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

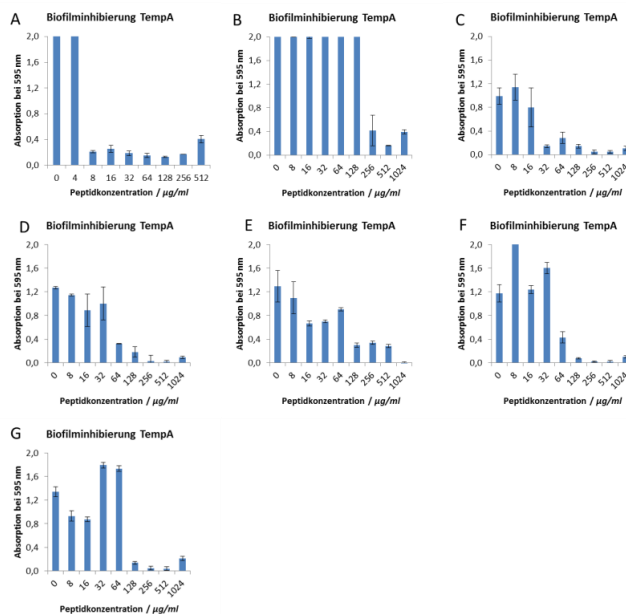


**Abbildung 97** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für MSI-103 und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

## D Antimikrobielle Peptide



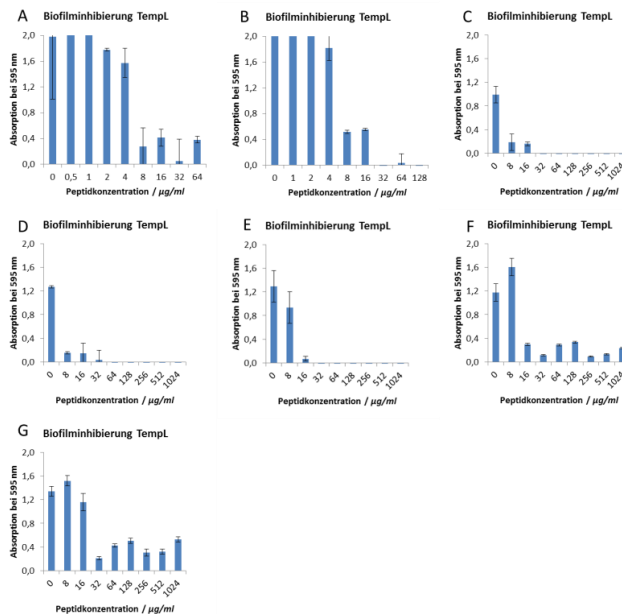
**Abbildung 98** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für MAP und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.



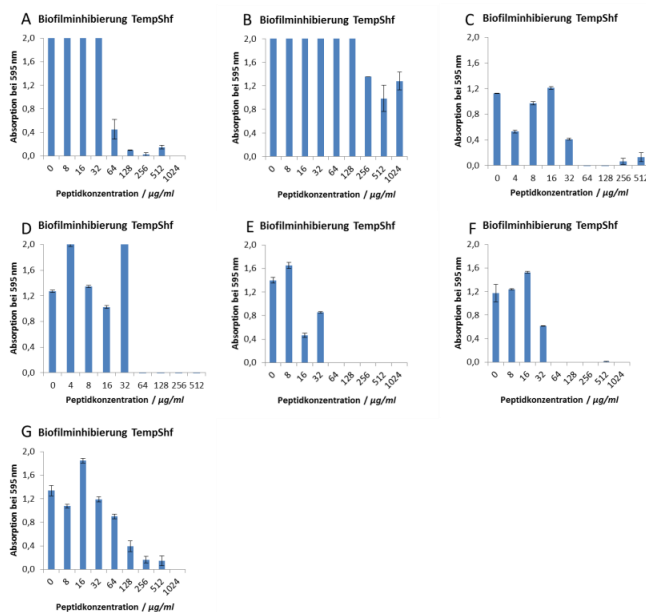
**Abbildung 99** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für TemporinA und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.



## D Antimikrobielle Peptide

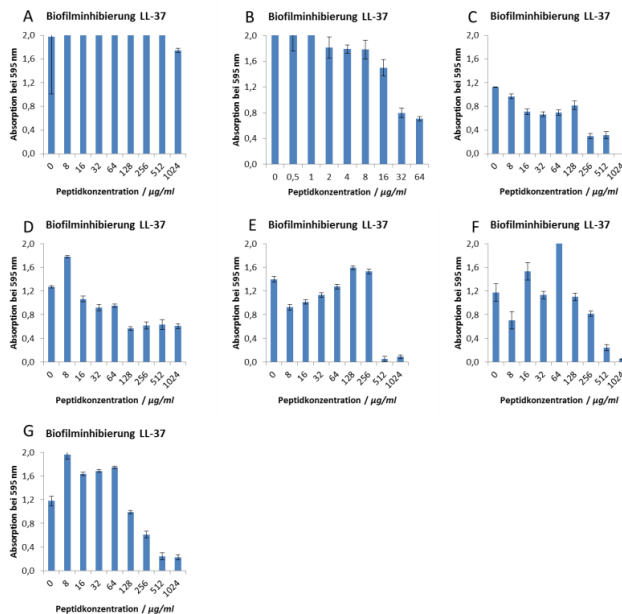


**Abbildung 100** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für TemporinL und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

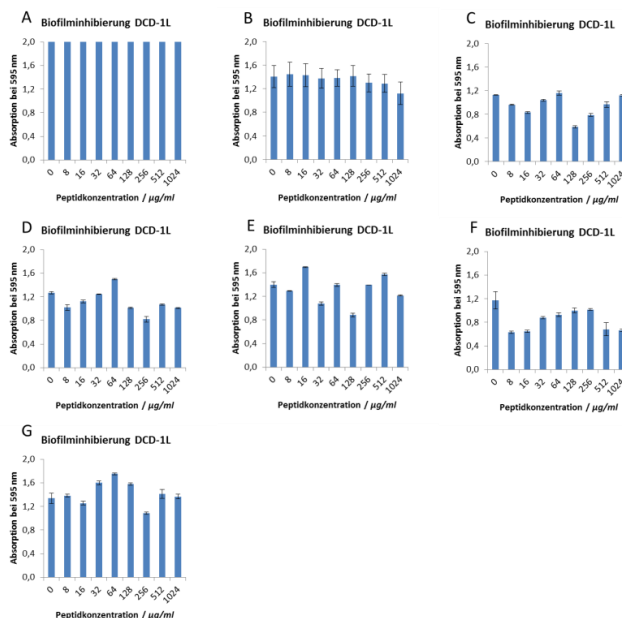


**Abbildung 101** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für TemporinShf und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

## D Antimikrobielle Peptide

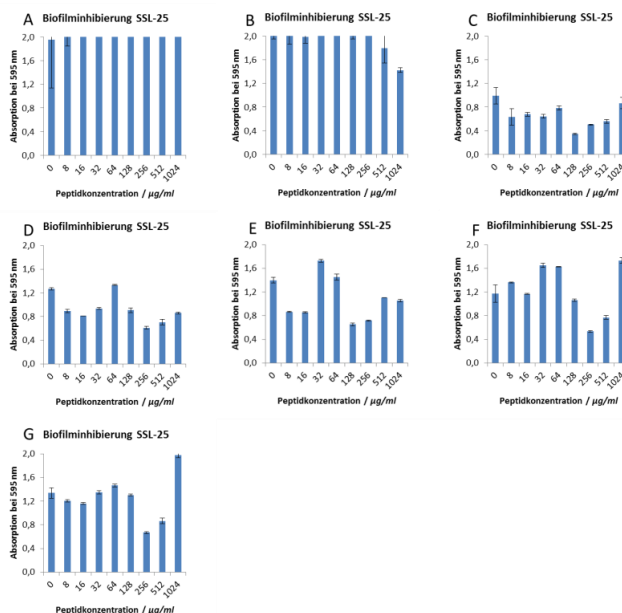


**Abbildung 102** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für LL-37 und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

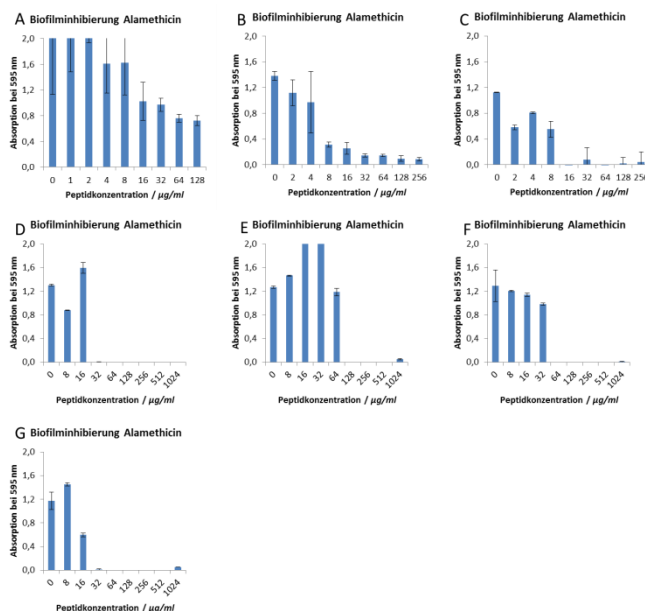


**Abbildung 103** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für DCD-1L und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

## D Antimikrobielle Peptide

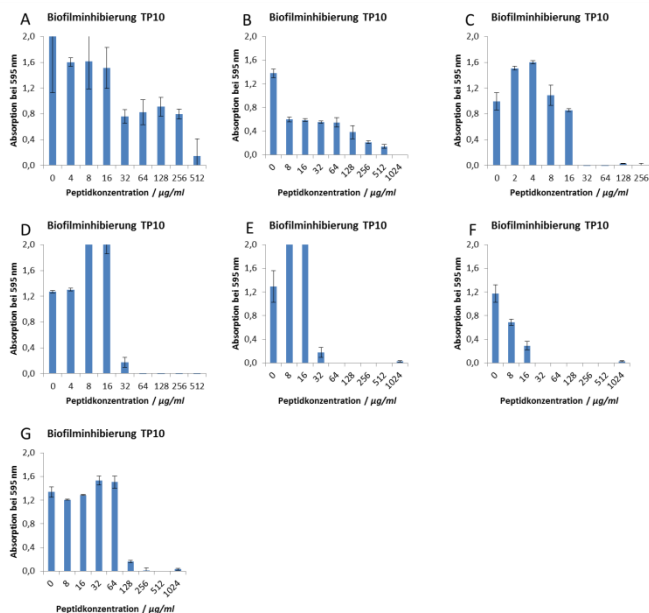


**Abbildung 104** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für SSL-25 und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

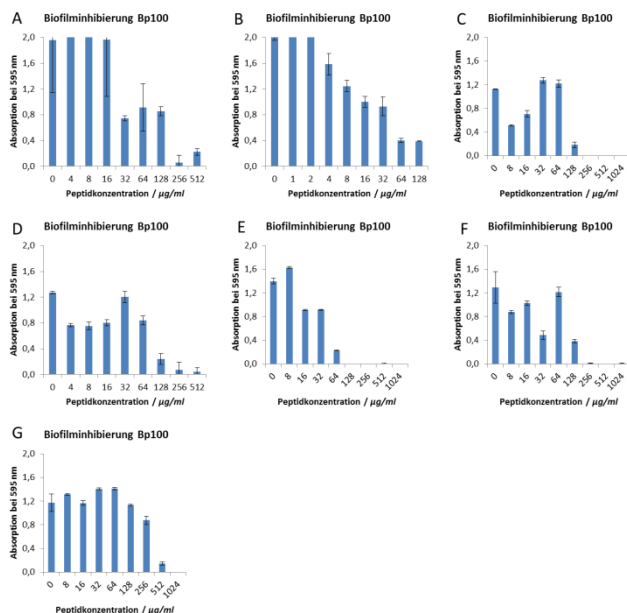


**Abbildung 105** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Alamethicin und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

## D Antimikrobielle Peptide

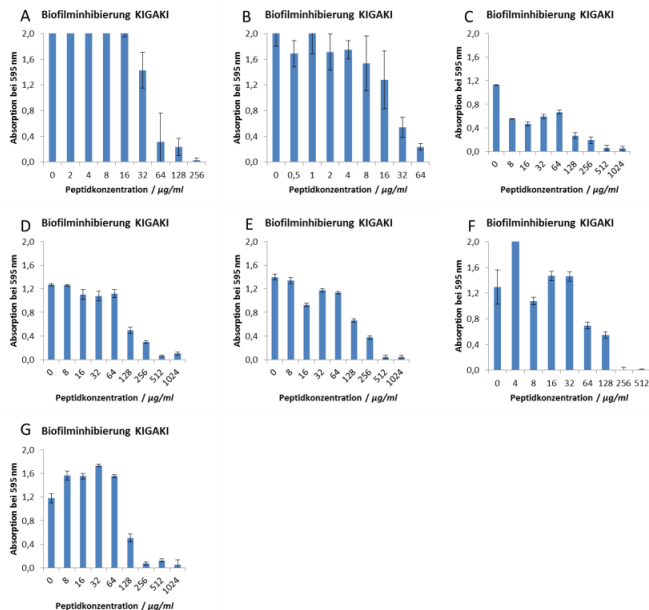


**Abbildung 106** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für TP10 und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

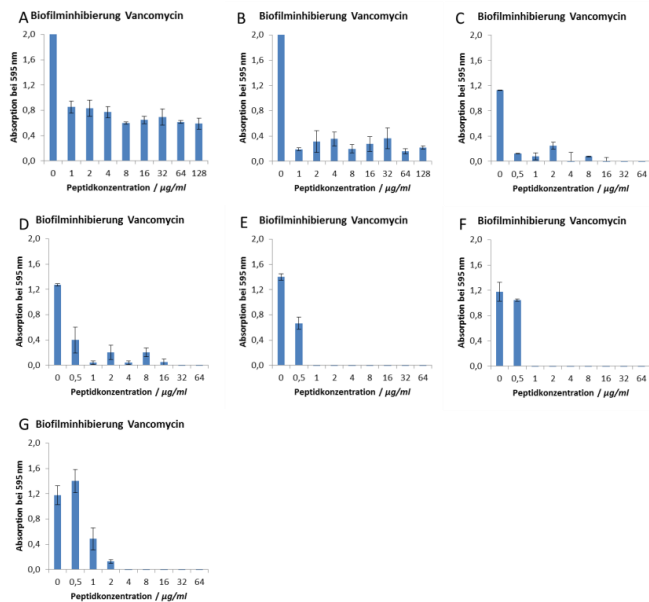


**Abbildung 107** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Bp100 und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

## D Antimikrobielle Peptide

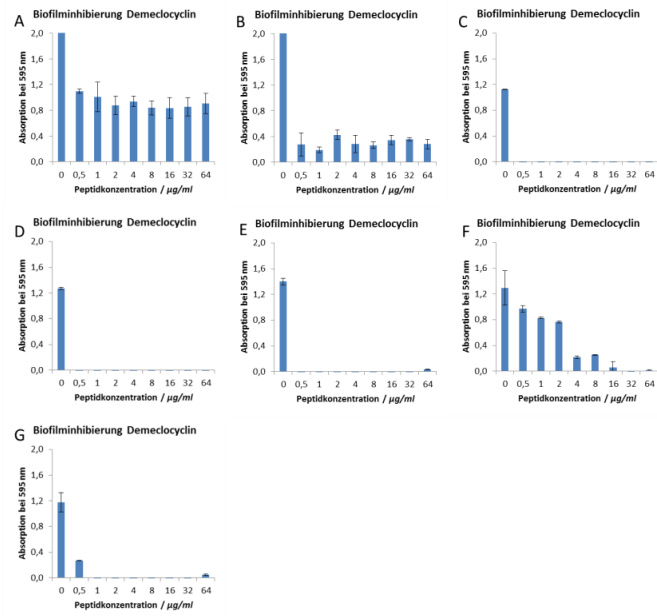


**Abbildung 108** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für KIGAKI und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.



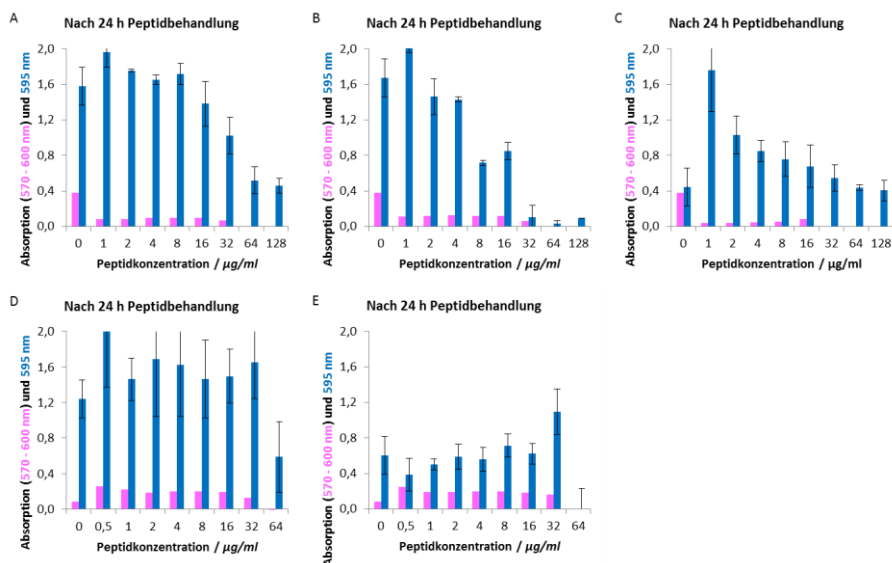
**Abbildung 109** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Vancomycin und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

## D Antimikrobielle Peptide

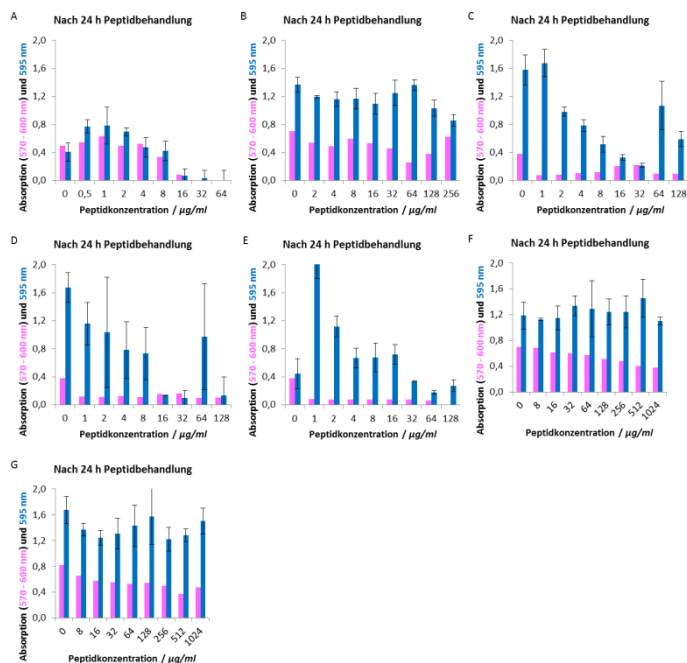


**Abbildung 110** Auswertung der biofilmhemmenden Konzentration (MBHK) für Demeclocyclin und *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G). Die Bakterien wurden direkt mit den Peptiden/Antibiotika inokuliert und nach 24 h Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Der MBIK-Wert entspricht einer mindestens 50%igen Verminderung der Biofilmmasse.

#### 4. Biofilm atmungsinhibierende – und biofilmeliminierende Konzentrationen

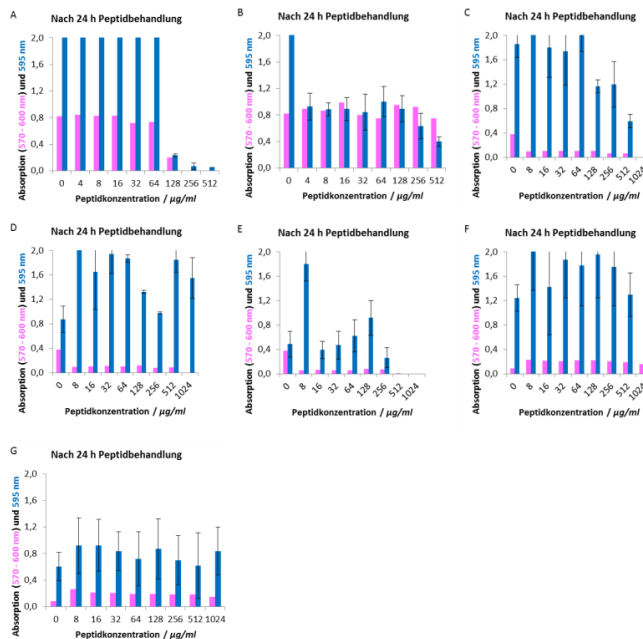


**Abbildung 111** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Gramicidin S. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit MRSA 9 (A), MRSA SCV (B), MRSA BP (C), *E. faecalis* WW4 (D) und *E. faecalis* WW6 (E) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

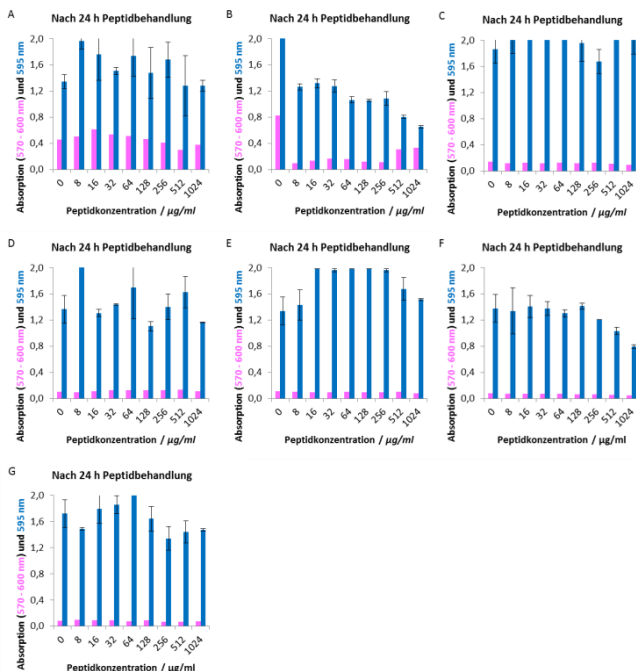


**Abbildung 112** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Gramicidin A. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



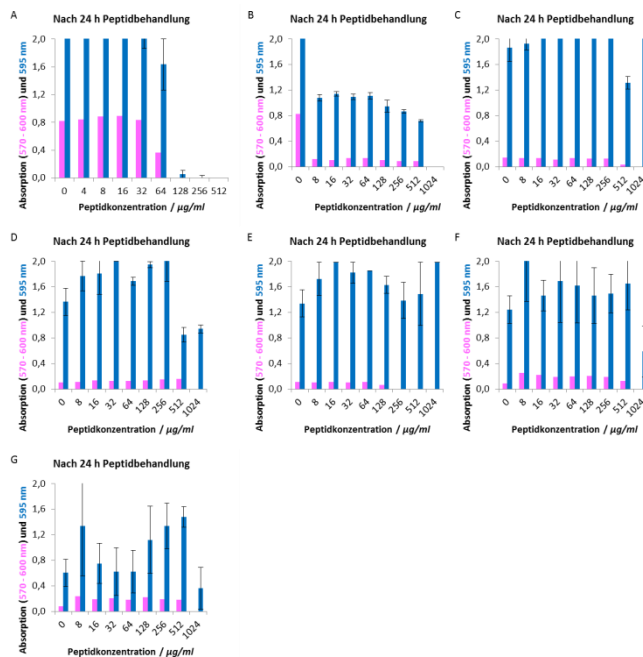
**Abbildung 113** Bestimmung der MBAHK und MBEK von PGLa. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.



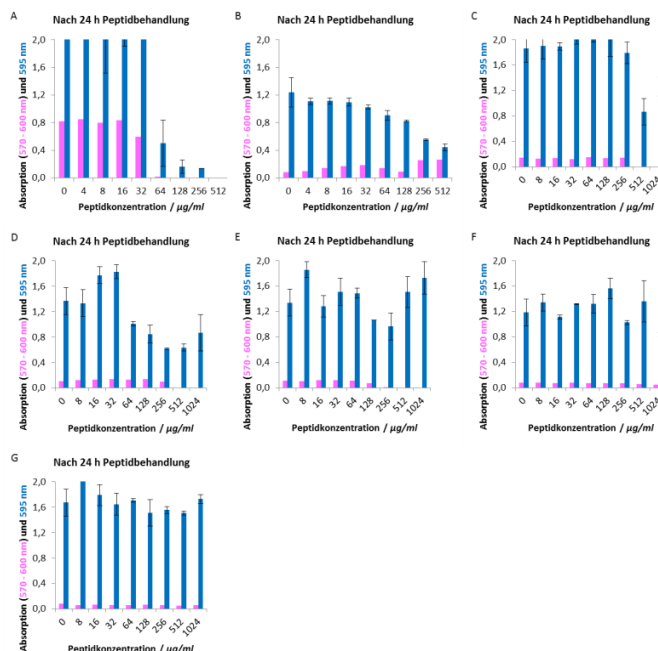
**Abbildung 114** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Mag2. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.



## D Antimikrobielle Peptide

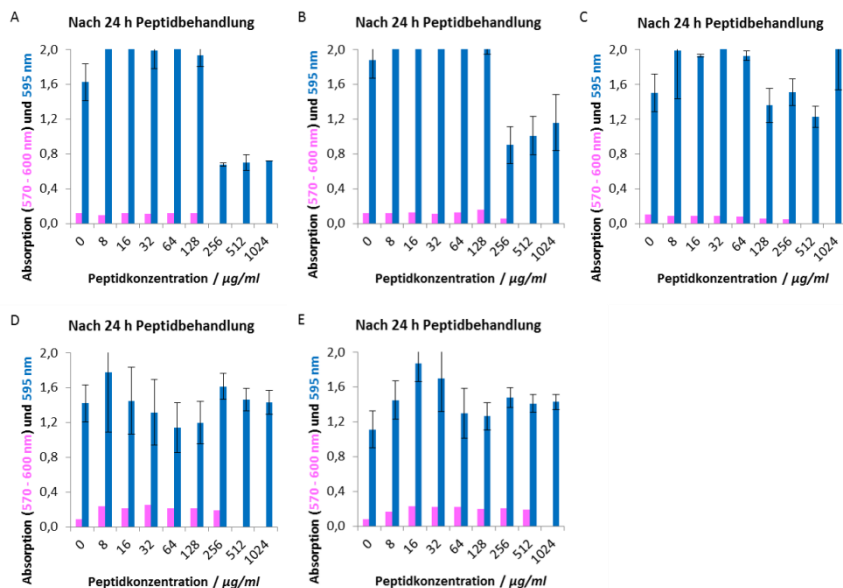


**Abbildung 115** Bestimmung der MBAHK und MBEK von PGLa/Mag2 (1:1). Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

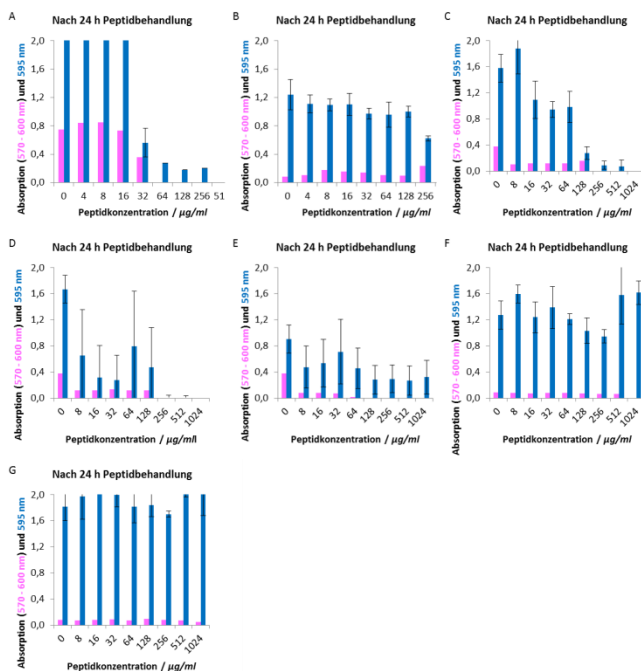


**Abbildung 116** Bestimmung der MBAHK und MBEK von MSI-103. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide

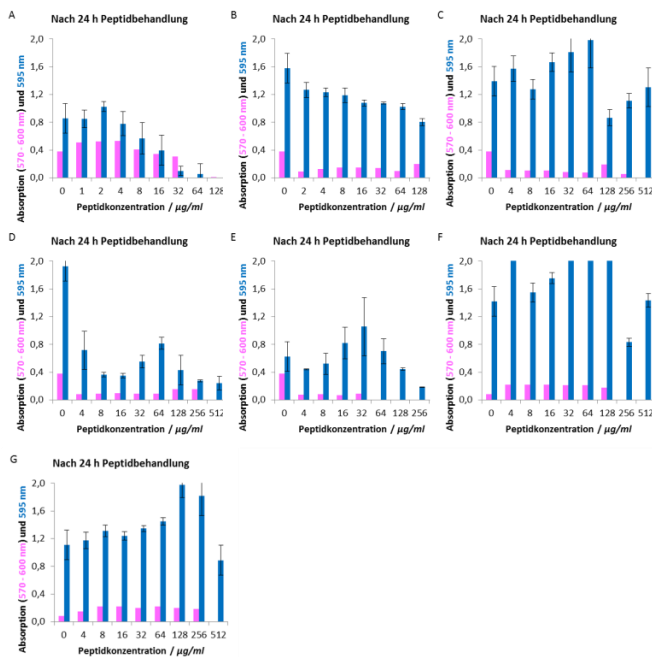


**Abbildung 117** Bestimmung der MBAHK und MBEK von MAP. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit MRSA 9 (A), MRSA SCV (B), MRSA BP (C), *E. faecalis* WW4 (D) und *E. faecalis* WW6 (E) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

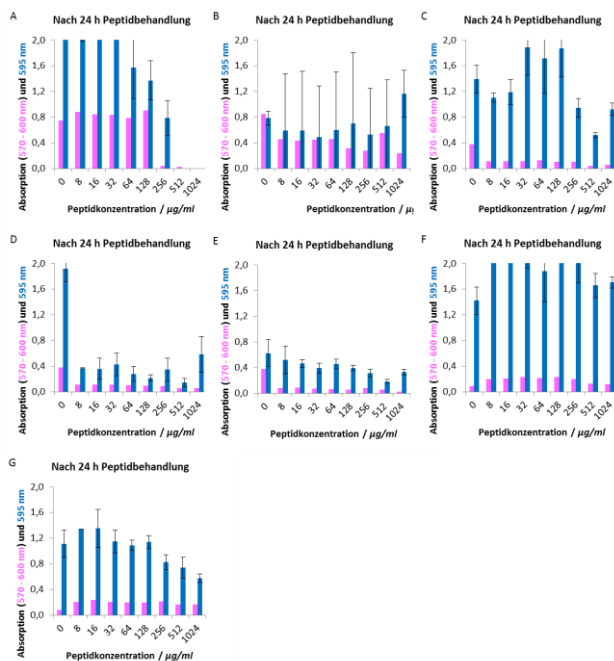


**Abbildung 118** Bestimmung der MBAHK und MBEK von TempA. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide

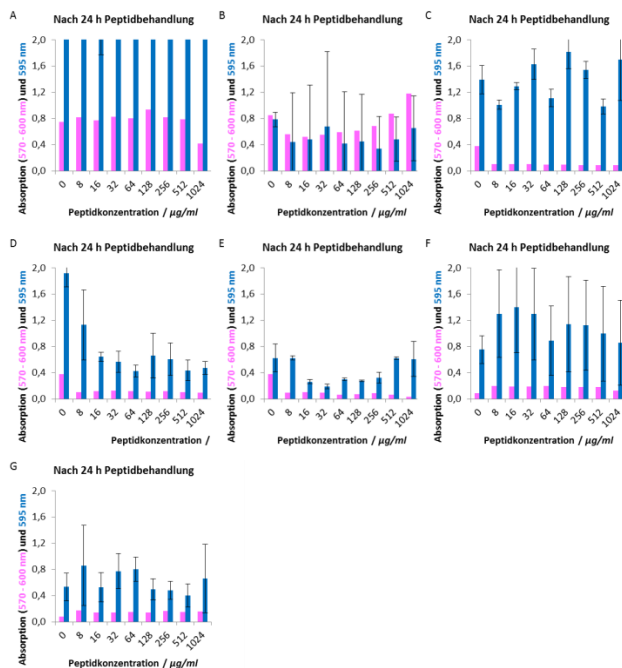


**Abbildung 119** Bestimmung der MBAHK und MBEK von TempL. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

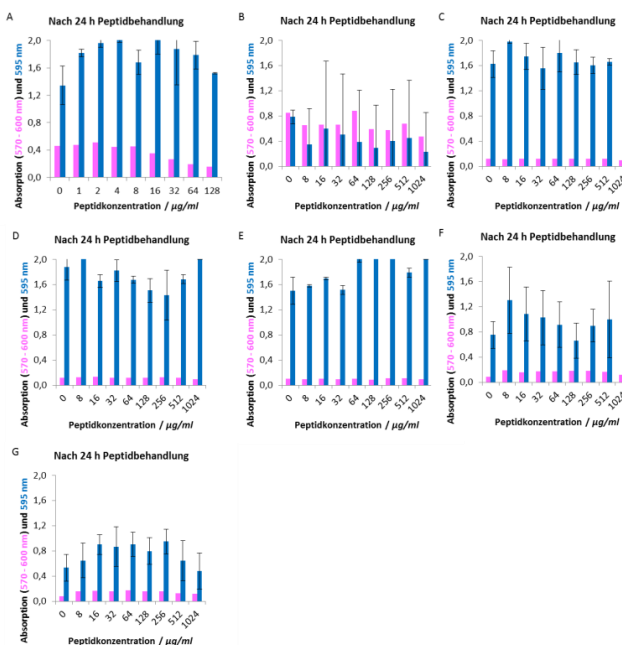


**Abbildung 120** Bestimmung der MBAHK und MBEK von TempShf. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide

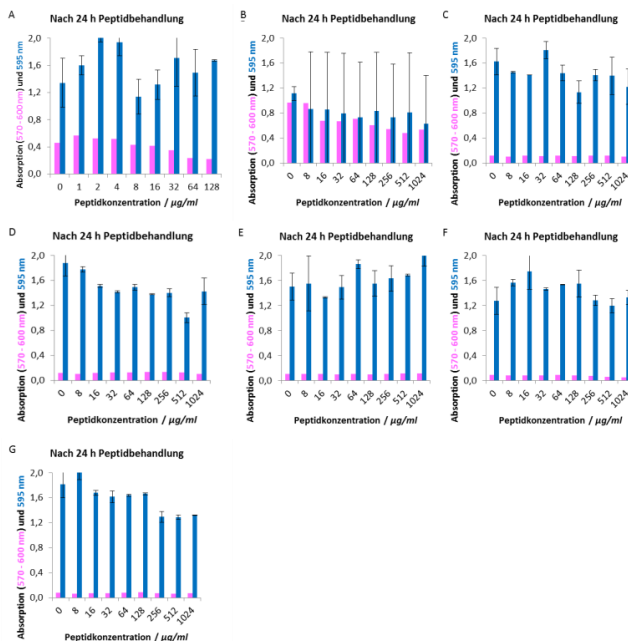


**Abbildung 121** Bestimmung der MBAHK und MBEK von LL-37. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

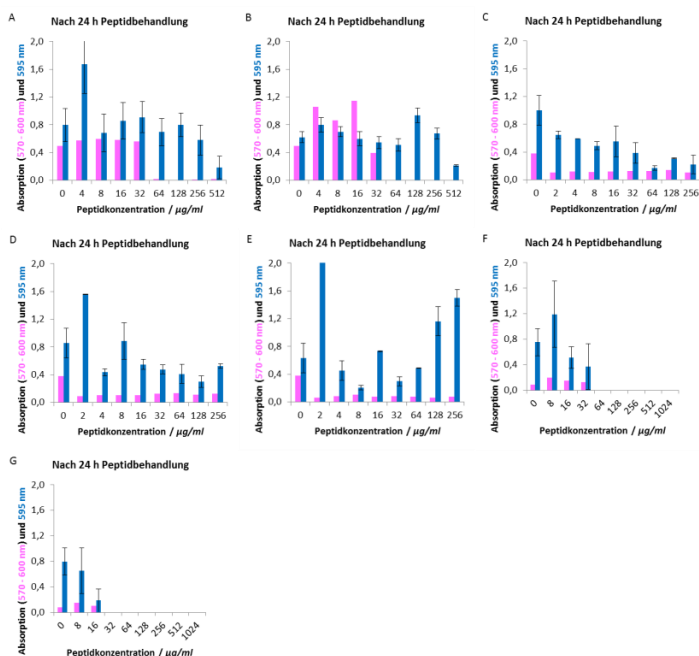


**Abbildung 122** Bestimmung der MBAHK und MBEK von DCD-1L. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide

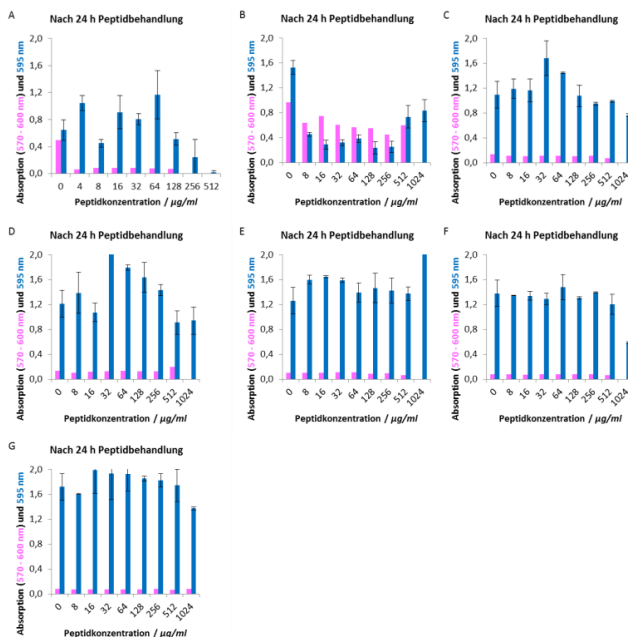


**Abbildung 123** Bestimmung der MBAHK und MBEK von SSL-25. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

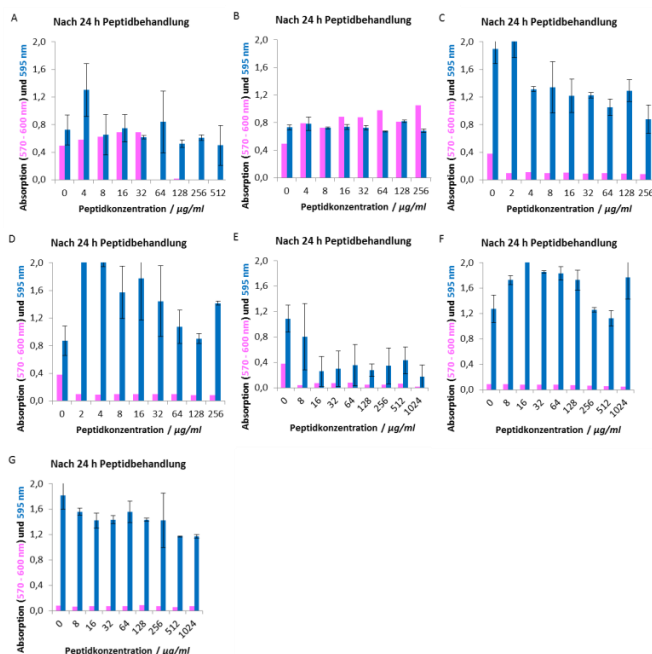


**Abbildung 124** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Alamethicin. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide

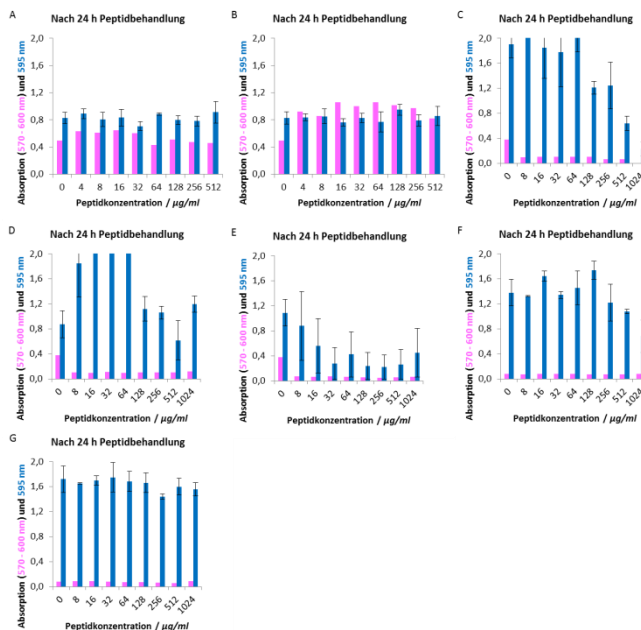


**Abbildung 125** Bestimmung der MBAHK und MBEK von TP10. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

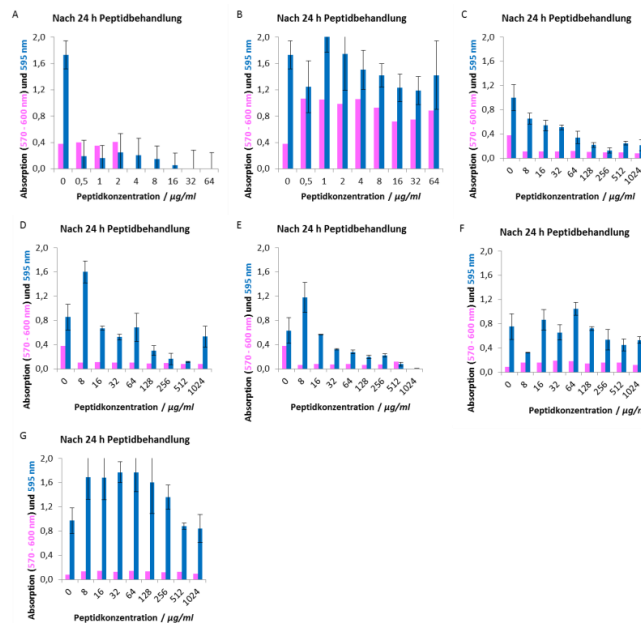


**Abbildung 126** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Bp100. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide

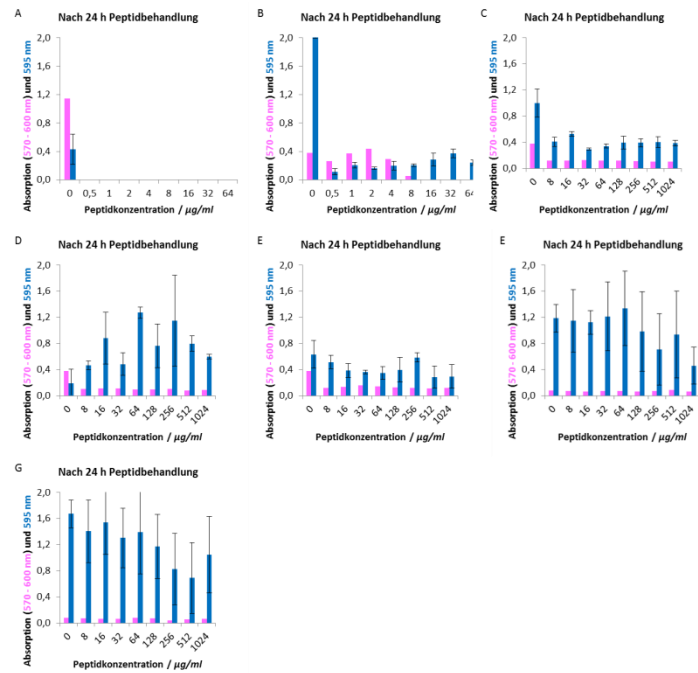


**Abbildung 127** Bestimmung der MBAHK und MBEK von KIGAKI. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.



**Abbildung 128** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Vancomycin. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

## D Antimikrobielle Peptide



**Abbildung 129** Bestimmung der MBAHK und MBEK von Demeclocyclin. Es wurde der Effekt des Peptids auf bereits bestehende Biofilme nach 24 h Inkubation mit *S. aureus* (A), *E. faecalis* (B), MRSA 9 (C), MRSA SCV (D), MRSA BP (E), *E. faecalis* WW4 (F) und *E. faecalis* WW6 (G) untersucht. Zuvor wurden die Biofilme für 24 h angezogen. Die Inkubationen wurden jeweils bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.



## E Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Papia Stephanie Sanyal  
Geburtsdatum: 11. November 1986 in Rastatt, Deutschland  
Nationalität: Deutsch  
Email: papia.sanyal@kit.edu

### Bildungsweg

---

Seit 2012 bis April 2015 *Karlsruher Institut für Technologie*, Promotion in Biochemie, Mitglied in der Graduiertenschule des BioInterfaces Programms der Helmholtz-Gemeinschaft

2006-2012 *Karlsruher Institut für Technologie*, Chemiestudium (Diplom 2,0)

1997-2006 *Gymnasium Neuenbürg* in Neuenbürg (Württemberg)

2006 Abitur mit den Kernkompetenzfächern Mathe, Deutsch, Englisch, Profillfach Biologie und Neigungsfach Geschichte (1,7)

### Vorträge

---

- “Methods on studying biofilms”, BIF Seminar, KIT, 2012
- “Structure function analysis of cell-penetrating peptide LMTP and studying AMP-induced biofilms using CBD”, Klausurtagung AK Ulrich, Bad Honnef, 2012
- “The effect of antimicrobial peptides on biofilm-forming bacteria”, First Thesis Advisory Committee for BIF Graduate School, KIT, 2012
- “Wanted and unwanted transition of planktonic bacteria into biofilms”, BIF Graduate School summer school, Herrenberg, 2013

## Tagungen/Konferenzen

- “Promotion, Inhibition and Killing of biofilms: the triathlon of AMPs”, Seminarvortrag AK Ulrich, KIT, 2014
- “The effect of biofilm-inducing and biofilm-killing peptides”, Second Thesis Advisory Committee for BIF Graduate School, KIT, 2014
- “Bio-Imaging”, Klausurtagung AK Ulrich, Bad Honnef, 2014
- “Der Effekt membranaktiver Peptide auf biofilmbildende Bakterien”, Third Thesis Advisory Committee of BIF Graduate Scholl, KIT, 2014

## Tagungen/Konferenzen

---

- „The effect of antimicrobial peptide on biofilm-forming bacteria“, BIF Graduate School summer school, Herrenberg, 2012 (Posterpräsentation)
- “Antimicrobial peptides can trigger the transition of planktonic bacteria into biofilms”, How Dead is Dead III- Life cycles, Berlin, 2013 (Posterpräsentation)
- “Evaluation of dangerous biofilm-promoting effect of antimicrobial peptides”, FEMS 2013, 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, Leipzig, 2013 (Posterpräsentation)
- “Biofilm-inducing and biofilm-eradicating activity of antimicrobial peptides”, 4<sup>th</sup> International Symposium on Antimicrobial Peptides, Lorient, France, 2014 (Posterpräsentation)