

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Antimikrobielle Aktivität des Kinozidins Interleukin 26

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

vorgelegt von

Björn-Thore Leonhard Hansen
aus Hamburg

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Regine Gläser

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.05.2023

gez.: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung.....	1
1.1	Interleukin 26.....	1
1.2	Untersuchte mikrobielle Spezies	4
1.2.1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4
1.2.2	<i>Candida albicans</i>	5
1.2.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	5
1.2.4	<i>Enterococcus faecium</i>	6
1.2.5	<i>Escherichia coli</i>	6
1.2.6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
1.2.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.2.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.3	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.2	Methoden.....	14
2.2.1	Produktion rekombinannten Proteins.....	14
2.2.2	Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie.....	14
2.2.3	Dialyse	15
2.2.4	Densitometrische Konzentrationsbestimmung.....	15
2.2.5	Zellkultur und Immunblot	15
2.2.6	Mikrobielle Kulturen.....	16
2.2.7	Testung der antimikrobiellen Aktivität	16
2.3	Statistische Auswertung	17
3	Ergebnisse.....	18
3.1	Hochkonzentriertes, rekombinantes IL-26	18
3.2	Biologische Aktivität des hergestellten, rekombinanten IL-26	19
3.3	Antimikrobielle Aktivität auf Gram-positive Bakterien.....	20
3.3.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	20
3.3.2	Vancomycin-resistente Patientenisolat von <i>Enterococcus faecalis</i>	24
3.3.3	<i>Enterococcus faecium</i>	27
3.3.4	Vancomycin-resistenter Stamm von <i>Enterococcus faecium</i>	30
3.3.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.3.6	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	36

3.4 Antimikrobielle Aktivität auf Gram-negative Bakterien	40
3.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	40
3.4.2 Multiresistente <i>Acinetobacter-baumannii</i> -Isolat von 2014	43
3.4.3 Multiresistente <i>Acinetobacter-baumannii</i> -Isolat von 2018	46
3.4.4 <i>Escherichia coli</i>	49
3.4.5 O-Antigen-negativer Stamm von <i>Escherichia coli</i>	52
3.4.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
3.4.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
3.5 Antimikrobielle Wirkung auf <i>Candida albicans</i>	61
4 Diskussion.....	64
4.1 Bakterizidie durch IL-26 auf Gram-positive Bakterien.....	65
4.2 Bakterizidie durch IL-26 auf spezifische Gram-negative Spezies	66
4.2.1 Bakterizidie durch IL-26 auf <i>Acinetobacter baumannii</i>	67
4.3 Schwache Fungizidie durch IL-26 auf <i>Candida albicans</i>	69
4.4 Antimikrobielle Aktivität von IL-26 im Vergleich mit bisherigen Publikationen	69
4.7 IL-26 im Vergleich mit anderen antimikrobiellen Peptiden	71
4.8 Die Rolle des Kinozidins IL-26 im Immunsystem	73
4.9 IL-26 als mögliches antimikrobielles Therapeutikum.....	74
5 Zusammenfassung.....	77
6 Summary.....	78
7 Literaturverzeichnis	79
8 Tagungsbeiträge, Veröffentlichungen und Stipendien.....	90
Tagungsbeiträge	90
Veröffentlichungen.....	91
Stipendien und finanzielle Förderungen.....	91
9 Danksagung.....	92

II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU	koloniebildende Einheiten, <i>colony-forming units</i>
COLSB	Columbia-Agar mit Schafblut
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EWR	Europäischer Wirtschaftsraum
FKS	Fetales Kälberserum
Gln	Glutamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-26R	Interleukin-26-Rezeptor
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	<i>lysogeny broth, Luria broth</i>
LD ₉₀	Letale Dosis 90 %
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBK ₉₀	Minimale bakterizide Konzentration 90 %
MFK ₉₀	Minimale fungizide Konzentration 90 %
MHE	Müller-Hinton-E (Agar)
MHK ₅₀	Minimale Hemmkonzentration 50 %
MRGN	Multiresistenter Gram-negativer Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NFAT-C1	<i>nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
rpm	Umdrehungen pro min, <i>rounds per min</i>

Abkürzung	Bezeichnung
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

1 Einleitung

1.1 Interleukin 26

Im Jahr 2000 konnte in viral transformierten T-Lymphozyten ein Gen identifiziert werden, das für ein bis dahin unbekanntes Protein kodiert. Der Genlokus 12q15 liegt zwischen den Genabschnitten von Interleukin (IL) 22 und Interferon (IFN) γ . Dieses zunächst AK155, später IL-26 genannte, stark basische Protein zeigt zu 24,7 % Identität und 47 % Ähnlichkeit mit IL-10 und wird zu der IL-10-Familie gezählt (Fickenscher et al., 2002; Knappe et al., 2000).

In der Folge wurde die IL-26-Expression auch für weitere Zelltypen wie naive und aktivierte T-Zellen aus Nabelschnurblut, $T_{H}1$ -, $T_{H}17$ - und $T_{H}22$ -Zellen, NK-Zellen und entzündlichen Fibroblasten- und Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten (Braum et al., 2013; Corvaisier et al., 2012) nachgewiesen. Insbesondere nach Kontakt mit Lipopolysaccharid (LPS) produzieren auch Alveolarmakrophagen IL-26 und Bronchialepithezelzen exprimieren nach viraler Stimulation vermehrt IL-26 (Che et al., 2014 und 2017). Ferner konnten Zusammenhänge mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis (Corvaisier et al., 2012), Spondyloarthritis (Heftdal et al., 2017), Morbus Crohn (Dambacher et al., 2009; Fujii et al., 2017) und Colitis ulcerosa (Fujii et al., 2017), Hepatitis B (Luo et al., 2020), Hepatitis C (Miot et al., 2014), mit antinukleären zytoplasmatischen Antikörpern assoziierter Vaskulitis (Poli et al., 2017), Psoriasis (Meller et al., 2015), Hidradenitis suppurativa (Scala et al., 2019) und Asthma (Konradsen et al., 2016; Louhaichi et al., 2020) hergestellt werden, bei denen besonders in den entzündeten Geweben und teils auch im Plasma erhöhte IL-26-Konzentrationen nachweisbar sind. Auch bei der allergischen Kontaktdermatitis kommt IL-26 wohl eine wichtige Rolle zu (Caiazzo et al., 2018) und bei malignen Erkrankungen wie dem Magenkarzinom und dem hepatzellulären Karzinom lassen sich erhöhte IL-26 Spiegel feststellen (Xi et al., 2019; Xue et al., 2019). Ferner sind auch bei Patienten mit Sepsis erhöhte IL-26 Spiegel nachgewiesen worden, deren Höhe eine Korrelation zum Schweregrad, der 28 Tage Mortalität und zur Höhe der etablierten Biomarker C-reaktives Protein und Procalcitonin aufweisen (Tu et al., 2019).

Rekombinant hergestelltes IL-26 weist eine Molekulmasse von 19 kDa auf, wobei Dimere, Oligomere und Multimere beschrieben wurden. IL-26 ist ein stark kationisches Protein mit amphiphilen Helices, die typisch für kationische Zell-penetrierende Peptide sind (Copolovici et al., 2014; Knappe et al., 2000; Meller et al., 2015).

IL-26 nutzt einen heterodimeren Rezeptor (IL-26R), der aus der ubiquitär exprimierten IL-10R2-Kette und der auf bestimmten Epithelzellen exprimierten IL-20R1-Kette besteht. Über die Aktivierung der *signal transducer and activator of transcription* (STAT) STAT1 und STAT3 führt IL-26 zu gesteigerter Expression von IL-8, IL-10, TNF α und dem Glycoprotein CD54

(Dambacher et al., 2009; Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004). Wesentliche weitere Effekte von IL-26 sind aber unabhängig von diesem Rezeptor. Werden plasmazytoide dendritische Zellen durch Komplexe aus *self*-DNA und IL-26 oder bakterieller DNA und IL-26 stimuliert, führt dies über den endosomal lokalisierten *toll-like receptor 9* (TLR9) zu einer vermehrten Produktion und Ausschüttung von IFN- α (Meller et al., 2015). Die Inkubation von NK-Zellen mit IL-26 führt zu einer gesteigerten Produktion von IFN- β , IFN- γ , IL-1 β , dem Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α) und dem membranständigen *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL; Miot et al., 2014). Bei Monozyten und Makrophagen führt der Kontakt mit IL-26 zur erhöhten Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α . Des Weiteren kann die Umwandlung von CD4 $^{+}$ T-Gedächtniszellen in IL-26 produzierende T H 17-Zellen von aktivierte Makrophagen rezeptorunabhängig getriggert werden, sodass hier sogar die Möglichkeit einer kreisenden Aktivierung besteht (Corvaisier et al., 2012). Ebenfalls unabhängig von IL-26R kann IL-26 sich sowohl hemmend als auch fördernd auf die virale Replikation auswirken. Einerseits fördert IL-26 die Replikation des Virus der vesikulären Stomatitis, andererseits hemmt es die Replikation des Cytomegalovirus und des Hepatitis-C-Virus (Beaumont et al., 2021, Braum et al., 2013; Miot et al., 2014). Abseits immunologischer Prozesse ist auch eine Wirkung auf den Knochenstoffwechsel beschrieben: Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten sind IL-26-sensibel und fördern durch Hemmung der Osteoklastogenese über Hemmung der Expression von *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL)-induziertem NF- κ B und NFATc1 und Aktivierung von Osteoblasten die Knochenmineralisation (Abb. 1; Heftdal et al., 2017; Peng et al., 2016). IL-26 bindet auf Grund seiner amphiphilen Struktur an Zelloberflächen, insbesondere an Glykosaminoglykane (Hör er al., 2004). Die F-Helix von IL-26 weist einen sogenannten *inplane membrane motif anchor* auf, der für die Bindung an Zellmembranen wesentlich ist (Poli et al., 2017).

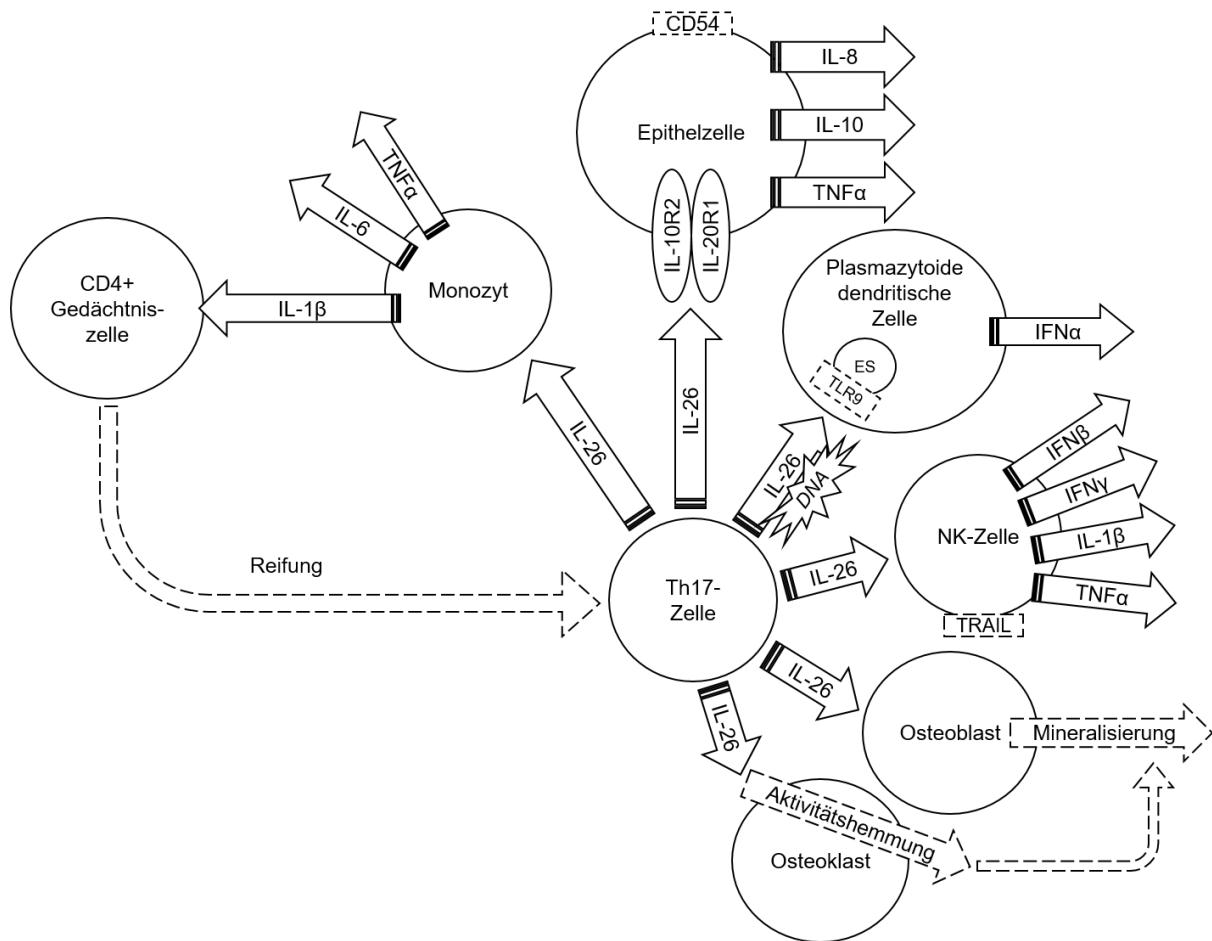


Abb. 1: Vorbeschriebene Zellinteraktionen, die durch IL-26 vermittelt werden. ES: Endosom, DNA: hier *self*-DNA oder bakterielle DNA.

Vor dieser Arbeit publizierte Ergebnisse zeigten eine bakteriostatische Wirkung auf Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538; Agak et al., 2018; Meller et al., 2015; Scala et al., 2019; Woetmann et al., 2018) und Gram-negative Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Klebsiella pneumoniae* O1:K2; Meller et al., 2015). Hinsichtlich Mykobakterien konnte eine bakteriostatische Wirkung gegenüber *Mycobacterium (M.) leprae* und *M. tuberculosis*; Dang et al., 2019; Hawerkamp et al., 2020) nachgewiesen werden. Eine Wirkung auf das Gram-positive Bakterium *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 und den Hefepilz *Candida albicans* ATCC 24433 konnte vorher nicht festgestellt werden (Meller et al., 2015).

Bei IL-26 handelt es sich somit um ein Zytokin mit direkten antimikrobiellen Eigenschaften und es zählt daher zu den Kinozidinen (Larochette et al., 2019; Yeaman et al., 2007; Yount et al., 2004).

1.2 Untersuchte mikrobielle Spezies

1.2.1 *Acinetobacter baumannii*

Bei *Acinetobacter (A.) baumannii* handelt es sich um ein Gram-negatives, nicht sporenbildendes, strikt aerobes Bakterium mit stäbchenförmiger Morphologie und gehört zur Familie der *Moraxellaceae*. Es ist nichtfermentierend, unbeweglich, Katalase-positiv, Oxidase-negativ und stellt geringe Ansprüche an die Kulturbedingungen (Bouvet et al., 1986; Peleg et al., 2008; Rossau et al., 1991). *A. baumannii* ist nach aktuellem Kenntnisstand nicht in der Lage, vollständiges LPS zu produzieren, da die für die O-Antigen-Produktion benötigten Enzyme bei *Acinetobacter*-Spezies nicht nachweisbar sind (Weber et al., 2016).

Das natürliche Reservoir von *A. baumannii* ist noch nicht abschließend geklärt, dürfte aber im Darm liegen. Im Gegensatz zu anderen *Acinetobacter*-Spezies ist die menschliche Haut eher selten besiedelt (Seifert et al., 1997). *A. baumannii* ist ein besonders auf Intensivstationen verbreiteter, nosokomialer Erreger, der bei Patienten, die maschinell beatmet werden oder an offenen Wunden oder Brandverletzungen leiden, zu Komplikationen führen kann. Die Nachweisfrequenz variiert in beträchtlichem Ausmaß. Die besonders hohe Tenazität des Erregers begünstigt die nosokomiale Ausbreitung.

Die am häufigsten mit *A. baumannii* assoziierte Erkrankung ist die Beatmungs-assozierte Pneumonie, bei der *A. baumannii* für bis zu 7 % der Erkrankungen verantwortlich sein kann, wobei der durch *A. baumannii* verursachte Anteil in den letzten Jahrzehnten signifikant zugenommen hat (Gaynes & Edwards, 2005). Außerdem kann *A. baumannii* zu Haut-, Weichgewebe- und Wundinfektionen, Harnwegsinfekten, Sepsis und Meningitis führen (Peleg et al., 2008).

Die zunehmende Häufigkeit antibiotikaresistenter Stämme stellt ein Problem dar. So sind Aminopenicilline, Acylaminopenicilline, Cephalosporine und Chinolone häufig nicht wirksam (Van Looveren & Goossens, 2004). Daher hat sich die Therapie mit Carbapenemen etabliert, mit der Folge, dass der Anteil der Carbapenem-resistenten Stämme in letzter Zeit stark zugenommen hat. Im Europäischen Wirtschaftsraum (EWR) wiesen im Jahr 2019 53,4 % aller untersuchten *Acinetobacter*-Isolate ($n = 2652$) mindestens eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen, Aminoglykosiden und/oder Carbapenemen auf, wobei Resistenzen gegen alle drei Gruppen häufiger waren (43,6 %) als Resistenzen gegen zwei Gruppen (5 %) bzw. gegen nur ein Antibiotikum (4,8 %). Hierbei zeigten sich starke Unterschiede mit nahezu fehlenden Resistenzen in Nordeuropa und besonders vielen resistenten Isolaten in Süd- und Osteuropa (ECDC, 2020). Als Reserveantibiotikum für diese multiresistenten Isolate steht Colistin zur Verfügung (Karageorgopoulos et al., 2008). Auch antibiogrammgerechte Kombinationstherapien können noch wirksam sein (Poirel et al., 2006; Towner et al., 2009).

1.2.2 *Candida albicans*

Candida (C.) albicans ist ein diploider Hefepilz, der als fakultativ pathogener Erreger Teil der Schleimhautflora insbesondere von Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstrakt ist. Bei immunkompetenten Patienten kommt es zu oberflächlichen, mukokutanen Infektionen, vor allem vaginal und oral (Dadar et al., 2018). Bei Immundefizienz kann die Kolonisierung in eine opportunistische, invasive Candidiasis umschlagen, die eine Letalitätsrate von bis zu 54 % aufweisen und alle Organsysteme, insbesondere Leber, Niere, Peritoneum und Endokard, betreffen kann (Bassetti et al., 2014; Gunsalus et al., 2016). Hauptrisikofaktoren sind neben Immundefizienz eine andauernde antibiotische Therapie, ein Harnwegskatheter oder ein zentralvenöser Gefäßzugang (Canela et al., 2017), parenterale Ernährung, abdominelle Operationen und Malignome. Resistenzen werden eher selten und dann meist bei Patienten mit chronischer mukokutanöser Candidiasis beschrieben (Nami et al., 2019). Die Resistenzraten betragen 1,4 % (Fluconazol, n = 123.625) bzw. 1,2 % (Voriconazol, n = 125.965), wobei die Resistenzraten im zeitlichen Verlauf (1997 bis 2007) konstant waren (Pfaller et al., 2010).

1.2.3 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus (E.) faecalis gehört zur Familie der Enterococcaceae und ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, unbewegliches und nicht-sporenbildendes Bakterium. *E. faecalis* ist Katalase- und Oxidase-negativ. Wie andere Enterokokken verfügt *E. faecalis* über eine hohe Tenazität; Hitze bis zu 60° C, alkalische Bedingungen bis pH 9,6 und Salzkonzentrationen bis 9,6 % NaCl werden ohne Weiteres vertragen (Moreno et al., 2006). *E. faecalis* kommt in der physiologischen Darmflora von Menschen und Tieren regelhaft vor. Auf Grund seiner Unempfindlichkeit gegenüber Hitze sind Lebensmittelkontaminationen, insbesondere von Fleisch- und Milchprodukten, keine Seltenheit (Moreno et al., 2006).

E. faecalis verursacht 90 % aller durch Enterokokken bedingten Erkrankungen. Hospitalisierte und/oder immunsupprimierte Patienten sind besonders anfällig. Ferner sind intravenöser Drogenabusus und vorgeschädigte Herzklappen Risikofaktoren für eine Infektion (Fisher et al., 2009). Typische Krankheitsbilder, die durch *E. faecalis* ausgelöst werden, sind Harnwegsinfektionen und Endokarditiden mit teilweise septischen Verläufen. Wurden Enterokokken lange Zeit als eher bedeutungslos erachtet, stieg deren Anteil als Auslöser der oben genannten Erkrankungen in letzter Zeit, sodass inzwischen davon ausgegangen wird, dass sie der zweithäufigste Auslöser postoperativer Wundinfektionen und nosokomialen Harnwegsinfektionen und der dritthäufigste Auslöser von Bakteriämien sind (Klein et al., 1998). Bei den Endokarditiden (insbesondere der Endokarditis lenta) lassen sich in 5 bis 15 % der Fälle Enterokokken als Auslöser feststellen.

Enterokokken weisen eine intrinsische Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotikagruppen auf. Dazu gehören Cephalosporine, Sulfonamide und Aminoglykoside. Vancomycin-Resistenzen sind bei *E. faecalis* eher selten (ECDC, 2020).

1.2.4 *Enterococcus faecium*

Wie *E. faecalis* handelt es sich bei *E. faecium* um Gram-positive, fakultativ anaerobe, unbewegliche und nicht-sporenbildende Kettenkokken, die ebenfalls Katalase- und Oxidase-negativ sind. Auch *E. faecium* kommt regelhaft in der Darmflora von Menschen und Nutztieren vor (Fisher et al., 2009).

E. faecium kann die gleichen Krankheitsbilder wie *E. faecalis* auslösen, ist insgesamt aber nur für ca. 10 % aller durch Enterokokken verursachten Erkrankungen verantwortlich. Durch die weitaus höheren Resistenzraten von *E. faecium* sind die Verläufe allerdings oft kritischer und schwerer zu therapieren. Im Jahr 2019 lag die Vancomycin-Resistenzrate im EWR bei 18,3 % aller geprüften Isolate ($n = 16.432$). Dies bedeutet eine signifikante Zunahme im Verlauf der letzten Jahre (2014 10,4 %, 2015 10,5 %, 2016 12,3 %, 2017 14,9 %, 2018 17,3 %). Die Verteilung innerhalb Europas ist dabei mit < 1 % (Belgien, Finnland, Frankreich, Island, Malta, Niederlande) bis 50 % (Zypern) sehr unterschiedlich. Insbesondere in Süd- und Osteuropa zeigt sich eine Zunahme an Vancomycin-resistenten *E. faecium* Stämmen (ECDC, 2020).

1.2.5 *Escherichia coli*

Escherichia (E.) coli ist ein zur Familie der *Enterobacterales* gehörendes, Gram-negatives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges und begeißeltes Bakterium, das keine Sporen bildet, Katalase-positiv und Oxidase-negativ ist. Die Spezies umfasst apathogene, fakultativ pathogene und obligat pathogene Stämme, wobei die beiden erstgenannten zur physiologischen Darmflora gehören.

Die Pathogenität der einzelnen Stämme ist vom Besitz entsprechender Pathogenitätsfaktoren abhängig. Fakultativ pathogene Stämme finden sich oft in der normalen Darmflora und lösen in aller Regel Infektionen außerhalb des Intestinums aus (Russo et al., 2003). Die häufigsten von extraintestinal-pathogenen *E. coli* (ExPEC) ausgelösten Infektionserkrankungen sind Harnwegsinfektionen, gefolgt von Infektionen im Bauch- und Beckenraum, wie Appendizitiden, Divertikulitiden, Peritonitiden und Cholangitiden (Mellata 2013; Russo et al., 2003). Einer Studie zufolge war *E. coli* im Zeitraum 1997/1998 für ca. 8 % aller nosokomialen Pneumonien verantwortlich und lag damit hinter *Staphylococcus aureus* (23,6 %) und *Pseudomonas aeruginosa* (22,9 %) (Fluit et al., 2003). ExPEC-Stämme können außerdem auch Sepsis und Neugeborenenmeningitis hervorrufen (Russo et al., 2003).

Die obligat pathogenen Stämme werden in fünf Untergruppen gegliedert: Der enteropathogene *E. coli* (EPEC) löst vor allem breiig-wässrige, nichtblutige Diarrhöen bei Neugeborenen und

Säuglingen aus. Der enterotoxikogene *E. coli* (ETEC) löst wässrige Diarrhöen bei Kindern und Reisenden in Entwicklungsländern aus. Der enteroaggregative *E. coli* (EAEC) ist häufiger Auslöser langanhaltender Diarrhöen bei Kindern und Erwachsenen (Kaper et al., 2004). Der enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ähnelt *Shigella spp.* und kann entsprechend der Shigellenruhr ähnliche wässrige bis blutig-schleimige Durchfälle mit Fieber auslösen. Der enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) löst je nach Schweregrad des Verlaufs wässrige oder blutige Diarrhöen aus. Eine Besonderheit ist hier das hämolytisch-urämische Symptom, das bei den Shiga-Toxinproduzierenden EHEC als Komplikation auftreten kann (Kaper et al., 2004; Weintraub, 2007).

Seit den späten 1990er Jahren ist eine Zunahme der Resistzenzen gegenüber Antibiotika festzustellen (Pitout, 2012). Dabei zeigte sich für die letzten Jahre stets ein Nord-Süd-Gefälle mit höheren Resistenzraten im südeuropäischen Raum. Resistzenzen gegen Aminoglykoside sind inzwischen europaweit verbreitet. Im Bereich des europäischen Wirtschaftsraumes zeigten 2019 mehr als 57,1 % (n = 163.005) eine Resistenz gegenüber mindestens einer der beobachteten Antibiotikagruppen (Aminopenicilline, Fluorchinolone, Cephalosporine der dritten Generation, Aminoglykoside und Carbapeneme). In Bezug auf Aminopenicilline wiesen 2019 57,1 % aller untersuchten Isolate eine Resistenz aus (Tendenz gleichbleibend). Für Fluorchinolone zeigte sich eine Resistenzrate von 23,8 %. Die Resistenzlage hinsichtlich Dritt-Generations-Cephalosporinen war weiterhin stabil bei 15,1 % (ECDC, 2020). Eine Aminoglykosidresistenz bestand in 10,1 % der Fälle. Für die Resistzenzen sind *extended-spectrum β-lactamases* (ESBL), die Plasmid-vermittelte AmpC-β-Laktamase und Carbapenemasen verantwortlich (Pitout, 2012).

1.2.6 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella (K.) pneumoniae ist ein zu den *Enterobacteriales* gehörendes Gram-negatives, fakultativ anaerobes, nicht-sporenbildendes unbewegliches Stäbchenbakterium, das Katalase-positiv und Oxidase-negativ ist. Ein Großteil der Stämme bildet Fimbrien und eine dicke Polysaccharidkapsel aus. Klebsiellen kommen ubiquitär vor und gehören bei ca. 30 % der Allgemeinbevölkerung zur Standortflora von oberem Respirationstrakt und Darm.

K. pneumoniae kann eine Vielzahl von Erkrankungen verursachen. Neben der in Europa eher seltenen Friedländer-Pneumonie bei Immunkompetenten, sind Erkrankungen bei immuninkompetenten Personen häufiger. Im ambulanten Bereich ist der Alkoholabusus ein Risikofaktor. Bei hospitalisierten Patienten, insbesondere immunkompromittierten Patienten, Patienten mit Diabetes mellitus, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung oder onkologischen Krankheitsbildern, sind Harnwegsinfektionen, Pneumonien, schwere Gewebeinfektionen und Sepsis die häufigsten Manifestationen einer nosokomialen Infektion. In der Pädiatrie stellt die Neuge-

borenensepsis ein gefährliches Krankheitsbild dar. Klebsiellen werden meist durch Krankenhauspersonal, aber auch durch kontaminierte Blutprodukte oder Instrumente oder kontaminierte Lebensmittel übertragen (Guo et al., 2016; Podschun et al., 1998).

K. pneumoniae weist eine intrinsische Resistenz gegen Aminopenicilline auf. Problematischer ist jedoch die Plasmid-kodierte Ausbildung verschiedener ESBL. Auch gegen Carbapeneme haben sich Resistenzen ausgebildet. Vor allem in Süd- und Osteuropa treten vermehrt multi-resistente Isolate auf. Der 2019 häufigste multiresistente Phänotyp wies Resistenzen gegen Fluorchinolone, Dritt-Generations-Cephalosporine und Aminoglykoside auf. Damit kamen Stämme mit Resistenzen gegen Wirkstoffe aus drei der vier Antibiotikaklassen Acylaminope-nicilline, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Chinolone (Multiresis-tente Gram-negative Erreger, 3MRGN) häufiger vor als Stämme mit nur einer oder zwei Re-sistenzen. 4MRGN-Stämme kamen 2019 bei 4,9 % aller untersuchten Isolate ($n = 24.738$) vor. Dabei waren aber 63,4 % aller Stämme vollsensibel (ECDC, 2020).

1.2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas (P.) aeruginosa ist ein zur Familie der *Pseudomonaceae* gehörendes Gram-negatives, begeißeltes und nicht-fermentierendes Stäbchenbakterium. *P. aeruginosa* bildet ty-pischerweise das Polysaccharid Alginat und verschiedene Pigmente aus, die zu mukösen, blaugrünen bis silbrig-glänzenden Kolonieformen führen. *P. aeruginosa* ist ubiquitär im Boden und auf Pflanzen nachweisbar, bevorzugt in feuchter Umgebung wie Gewässern, Pfützen, Blumenvasen, Wasch- und Toilettenbereichen von Krankenhäusern, aber auch in Flüssigkei-ten wie Seifen, Lebensmitteln oder Desinfektionsmitteln (Ayliffe et al., 1974; Grobe et al., 2001).

Nosokomiale Infektionen mit *P. aeruginosa* sind vor allem die hochletale beatmungsassoziierte Pneumonie, Harnwegsinfekte bei Patienten mit Harnwegsobstruktionen oder Blasenkatheter oder Infektionen von Brandwunden (Mittal et al., 2009; Ramírez-Estrada et al., 2016). Ambu-lante Infektionen finden sich nach Aufenthalt in kontaminiertem (Bade-) Wasser oberflächlich an Haut („*whirl pool dermatitis*“), Nägeln, äußerem Gehörgang („*swimmers ear*“) oder insbe-sondere bei Kontaktlinsenträgern an der Hornhaut (Lutz et al., 2011; Stapleton et al., 2012; Sundström et al., 1996).

Als klinische Besonderheit sind chronische Infektionen bei Mukoviszidose-Patienten zu nennen. Aufgrund der Hyperviskosität des Bronchialsekrets mit Abflussstörungen entsteht ein für Pseudomonaden ideales Milieu. Nach initial meist erfolgreicher Eradikation kommt es im Ver-lauf sehr häufig zur Ausbildung einer chronischen Infektion mit Inflammation, fortschreitenden Gewebefekten und zunehmenden respiratorischen Problemen, die mit Antibiotika nur

schwer bis gar nicht zu therapieren sind. Vielmehr kommt es durch die Vielzahl der Therapieversuche mit verschiedenen Wirkstoffen zur Ausbildung verschiedener multiresistenter, Biofilm-bildender Morphotypen, was die Therapie weiter verkompliziert (Williams et al., 2012).

P. aeruginosa weist eine intrinsische Resistenz gegen einen Großteil der β-Laktam-Antibiotika, Makrolide und Folsäureantagonisten auf. Unter Therapie kommt es häufig zu einer schnellen Resistenzentwicklung. Im Jahr 2019 waren im EWR ca. 10 % aller Isolate (n = 12.735) gegen mehr als drei und 3,4 % gegen fünf Antibiotikagruppen resistent, wobei Isolate aus Osteuropa deutlich höhere Resistenzraten aufweisen als Isolate aus dem restlichen Europa. Nach initialer Zunahme der Resistenzen gegen die häufig eingesetzte Kombination aus Piperacillin und Tazobactam von 2012 16,7 % auf 2015 19,9 % (Island, Luxemburg: 0 %, Rumänien: 59 %) zeigte sich in den letzten Jahren eine Reduktion auf 18,3 % (2017) und 16,9 % (2019). Die Resistenzraten gegenüber Fluorchinolonen lagen 2019 bei 18,9 %. Auch bei den Aminoglykosiden kam es zwischen 2014 und 2019 zu einer Abnahme der resistenten Isolate von 16,1 % auf 11,5 % (ECDC, 2020).

1.2.8 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus (S.) *aureus* ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, fermentatives, nicht sporenbildendes, unbewegliches Kugelbakterium aus der Familie der *Staphylococcaceae*. Die Kokken sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ und Koagulase-positiv. *S. aureus* gilt als eines der am stärksten umweltresistenten, fakultativ pathogenen Bakterien. Hitze bis 60 °C, Magensäure aber auch Austrocknung beeinträchtigen diesen Erreger nur unwesentlich, sodass sich *S. aureus* sehr gut im nosokomialen Umfeld ausbreiten kann. Bei bis zu 50 % der gesunden Bevölkerung kolonisiert *S. aureus* die Haut vor allem von Nasenvorhof (ca. 20 %) und Perineum, wobei die Kolonisierungsrate mit zunehmender Entwicklung eines Landes zunimmt (Lowy, 1998; Rasigade et al., 2014; Sivaraman et al., 2009). Hauptausbreitungsweg ist die Schmierinfektion.

S. aureus kann verschiedene Erkrankungen auslösen. Er ist für 70 bis 80 % der Wundinfektionen, 50 bis 60 % der Osteomyelitiden, 15 bis 40 % der Gefäßprotheseninfektionen, 10 % der Pneumonien (insbesondere als Superinfektion oder nach Trauma, Aspiration oder bei Immun-suppression) und bis zu 30 % aller Endokarditiden und Sepsis-Fälle verantwortlich. Hautinfektionen mit Abszessbildung wie Furunkel oder Karbunkel sind typisch (Dayan et al., 2016; Josse et al., 2015).

Die in der Stillzeit auftretende Mastitis puerperalis der Milchgänge ist zu 90 % von *S. aureus* verursacht. Von ihr geht auf Grund des raschen Abszedierens und der möglichen Infektion des Säuglings eine besondere Gefahr aus, insbesondere bei Frühgeborenen (Rogmans, 2003). Weitere typische Infektionen sind die eitrige Parotitis, die Dakrozystitis und das Hordeolum.

Das *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS), das von Exfoliatin-bildenden Stämmen ausgelöst wird, ist eine besondere Form der Infektion mit *S. aureus*. Sie tritt vor allem bei Säuglingen, deutlich seltener auch bei Kindern und (immunsupprimierten) Erwachsenen auf. Nach einer Infektion kommt es zu einem scharlachartigen Exanthem mit Blasenbildung und nach dem Platzen der Blasen zur Ablösung der Haut (Epidermolysis acuta toxica; Dayan et al., 2016). Die Letalität bei Kindern liegt bei 3,6 bis 11 % (Handler et al., 2014).

Eine weitere mögliche Folge einer Infektion mit *S. aureus* ist das sogenannte *toxic shock syndrome*, bei dem es bei Infektion mit TSST1-Toxin bildenden Stämmen zu schweren Krankheitsbildern mit hohem Fieber, diffusem makulösem Exanthem, Hypotonie und diffuser Beteiligung verschiedener Organsysteme kommt. Ursachen können eine Vermehrung von Toxin bildendem *S. aureus* in besonders saugfähigen Tampons oder Infektionen insbesondere nach Operationen oder Geburten sein (Dayan et al., 2016; Lowy, 1998).

Das von einigen *S.-aureus*-Stämmen produzierte hitzestabile Enterotoxin A ist Auslöser von Nahrungsmittelvergiftungen mit 24 bis 48 Stunden andauernden Symptomen wie Erbrechen, Diarröh und Magenkrämpfen, die ca. drei bis fünf Stunden nach Aufnahme der mit Toxinen kontaminierten Lebensmittel auftreten (Kadariya et al., 2014).

S. aureus ist primär gegenüber β-Laktam-Antibiotika, Makroliden, Clindamycin, Fosfomycin, Glykopeptiden, Rifampicin, Fusidinsäure und Linezolid sensibel. Vor allem im nosokomialen Umfeld finden sich überwiegend Penicillinase-bildende Stämme, die zu einer Penicillinresistenz führen, mit Ausnahme der Isoxazolypenicilline. Da sich dieser Resistenzmechanismus durch Gabe eines β-Lactamase-Inhibitors wie Clavulansäure, Tazobactam oder Sulbactam umgehen lässt, stellen Penicillininasen ein eher untergeordnetes Problem dar. Relevanter ist der Resistenzmechanismus der Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämme: Durch Bildung des Typ 2a des Penicillin-bindenden Proteins (PBP2a) sind β-Laktam-Antibiotika wirkungslos, zu denen neben Penicillinen auch Cephalosporine und Carbapeneme zählen. Im Jahr 2019 waren im EWR 12,9 % aller getesteten *S.-aureus*-Isolate ($n = 43.469$) vom MRSA-Typ. Bei MRSA-Stämmen werden häufig weitere Resistzenzen beschrieben (Rasigade et al., 2014), sodass im Jahr 2019 die Methicillin-Fluorchinolon-Koresistenzen im EWR mit 9,6 % häufiger waren als reine Methicillin-Resistenzen (2,7%). Wie auch bei anderen Erregern zeigt sich auch bei *S. aureus* ein starkes Nord-Süd-Gefälle und zudem eine Divergenz zwischen Mitteleuropa und West-/Ost-Europa (ECDC, 2020).

1.3 Zielsetzung

Den bisher veröffentlichten Ergebnissen zur antibakteriellen Aktivität von IL-26 kann aus mikrobiologischer Sicht nur begrenzte Aussagekraft zugesprochen werden, da normbasierte Effizienzkriterien, wie beispielsweise die Angaben minimaler bakterizider Konzentrationen oder letaler Dosen bzw. Konzentrationen, nicht vorliegen. Daher sollte IL-26 in ausreichend hoher Konzentration und bestmöglicher Qualität rekombinant hergestellt werden, damit für die Untersuchungen die vollständige Qualitätskontrolle über alle Schritte gewährleistet werden kann. Ziel dieser Arbeit war es, die antimikrobielle Aktivität von IL-26 auf verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedlicher Antibiotikasensibilität, also auch multiresistenter Stämme, sowie Hefepilze unter klar definierten Kultur- und Umgebungsbedingungen zu untersuchen und die Wirksamkeit zu quantifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 1: Mikroorganismen und Zelllinie

Spezies/Zelllinie	ATCC/DSM	Anmerkung
Bakterienstamm zur IL-26-Produktion		
<i>E. coli</i> XL1blue		pQE39AK155-P3C Klon2
Mikroorganismen zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von IL-26		
<i>A. baumannii</i>	ATCC 19606	
<i>A. baumannii</i>		4MRGN-Patientenisolat 2014, OXA-23
<i>A. baumannii</i>		4MRGN-Patientenisolat 2018, OXA-23
<i>C. albicans</i>	ATCC 24433	
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	
<i>E. faecalis</i>		VRE-Patientenisolat
<i>E. faecium</i>	ATCC 6057	
<i>E. faecium</i>	DSM 17050	VRE
<i>E. coli</i>	ATCC 11775	
<i>E. coli</i> DH5α		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 4352	
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	
<i>S. aureus</i>	ATCC 33593	MRSA
Eukaryonte Zelllinie		
Colo-205	ATCC CCL-222	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie

Tab. 2: Reagenzien und Materialien

Methode	Bezeichnung	Hersteller, Zusammensetzung
Bakterienkultur	Tryptic Soy Broth (TSB), 10 mM NaCl	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
	Müller Hinton E Agar (MHE)	bioMérieux, Marcy-l'Étoile Frankreich
	Columbia-Agar mit Schafblut (COLSB)	Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Lysogeny Broth Agar (LB)	10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 15 g Agar; ad 1 l; pH 7,0
	Lysogeny Broth Agar (LB)	medco Diagnostika GmbH, Ottobrunn, Deutschland: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; 15 g Agar; ad 1 l; pH 7,0
Dialyse	Dialysepuffer	20 mM HEPES; 1 mM MgCl ₂ ; 20 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 200 ml 10 % Glycerin; 1 mM Glutathion oxidiert; 5 mM Glutathion reduziert; ad 2 l H ₂ O; pH 8,0
Expressionsinduktion	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (#I6758)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	Ni Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
	Puffer A100	6 M Guanidiniumchlorid; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; 100 mM beta-Mercaptoethanol; ad 50 ml H ₂ O; pH 8,0
	Puffer A10	6 M Guanidiniumchlorid; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; 10 mM beta-Mercaptoethanol; ad 100 ml H ₂ O; pH 8,0
	Puffer B	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; 10 mM beta-Mercaptoethanol; ad 300 ml H ₂ O; pH 8,0

Methode	Bezeichnung	Hersteller, Zusammensetzung
Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (Fortsetzung)	Puffer C40	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; 10 mM β-Mercaptoethanol; 40 mM Imidazol; ad 240 ml H ₂ O; pH 6,3
	Puffer C500	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; 10 mM β-Mercaptoethanol; 500 mM Imidazol; ad 60 ml H ₂ O; pH 6,3
	Puffer C600	8 M Harnstoff; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,01 M Tris; 10 mM β-Mercaptoethanol; 600 mM Imidazol; ad 60 ml H ₂ O; pH 6,3
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)	Laemmli-Probenpuffer (5x)	39,98 % H ₂ O; 50 % Glycerin; 5 % SDS; 5 % β-Mercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau Reinheitsgrad II (>90%) für die Biotechnologie, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Benzonase® Endonuklease	
	Proteinlaufpuffer (10x)	288 g Glycin; 60,6 g Tris; 200 ml 10 % SDS; ad 2 l H ₂ O
	Sammelgel-Lösung (5 %)	6,8 ml H ₂ O; 1,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1 ml 10 % SDS; 0,1 ml 10 % APS; 10 µl TEMED
	Trenngel-Lösung (10 %)	7,9 ml H ₂ O; 6,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; 5,0 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,2 ml 10 % SDS; 0,2 ml 10 % APS; 8 µl TEMED
	Trenngel-Lösung (15 %)	4,6 ml H ₂ O; 10 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; 5,0 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,2 ml 10 % SDS; 0,2 ml 10 % APS; 8 µl TEMED
	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa #26619	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	PageRuler™ Unstained Protein Ladder #26614	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Quick Start Bovine Serum Albumin Standard #5000206	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Westernblot	Coomassie-Färbelösung	1 g Coomassie Brilliant Blau R-250; 160 ml dH ₂ O; 40 ml Eisessig, 200 ml Methanol
	Coomassie-Entfärbelösung	500 ml Methanol; 400 ml dH ₂ O, 100 ml Eisessig
	Blockierpuffer	5 % Magermilchpulver, in TBS-T-Puffer
	Stripping-Puffer	6 M Guanidiniumchlorid, 0,2 % Nonidet P-40; 0,1 M β-Mercaptoethanol; 20 mM Tris/HCl pH 7,8
	TBS-T-Puffer	600 ml 5 M NaCl; 100 ml Tris pH 7,5; 100 ml 10 % Tween 20; ad 20 l H ₂ O
	Transferpuffer (10x)	116,3 g Tris; 45 g Glycin; 80 ml 10 % SDS; ad 2 l H ₂ O
	Immobilon-P: 0,45 µm Polyvinylidenfluorid-Membran	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
	SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Anti-Phospho-STAT3, phospho-Tyr705 (#9131) (Primärantikörper, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Zellkultur	Anti-STAT3 (#9132) (Primärantikörper, Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugierter Anti-körper (#7074) (Sekundärantikörper, Ziege)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
	SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland: DMEM Flüssigmedium ohne Na-Pyruvat mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , mit 4,5 g/l D-Glukose, ohne L-Glutamin
	Fetales Rinderserum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Methode	Bezeichnung	Hersteller, Zusammensetzung
Zellkultur (Fortsetzung)	L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
	PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
	PBS-Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	
	Penicillin-Streptomycin (10x) Trypsin (1:250)/EDTA-Lösung (0,5 %/0,2 %)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
		Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

Tab. 3: Software

Bezeichnung	Hersteller
GraphPad PRISM Version 8	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Image J	Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
IMAGE Reader LAS-3000	Fujifilm, Tokio, Japan
Wolfram Alpha Web	Wolfram Research, Inc., Champaign, IL, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Produktion rekombinanter Proteins

Der *E. coli* Stamm XL1blue pQE39AK155-P3C Klon2 (Hör et al., 2004; Knappe et al., 2000), der humanes IL-26 produziert, wurde in Flüssigkulturen mit Ampicillin (100 mg/ml) inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm erfolgte die Induktion der IL-26-Proteinsynthese durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid. Nach 6 h wurde die Kultur bei 4 °C für 20 min mit 5.000 rpm (3.829 × g) zentrifugiert (Heraeus Multifuge 4KR, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Bakterien bei -20 °C gelagert. Vor und nach Induktion wurden Proben entnommen, der Überstand wurde nach Zentrifugation für 15 min bei 1.500 rpm (405 × g) (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) entfernt und das Sediment bei -20 °C eingefroren (Knappe et al., 2000).

2.2.2 Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie

Nach chemisch-mechanischem Zellaufschluss der in Puffer A100 resuspendierten Bakterien erfolgte zunächst eine Zentrifugation für 30 min mit 8.000 rpm (8.873 × g) bei 4 °C (Heraeus Multifuge 4KR). Der Überstand wurde zum Entfernen von Bakterienfragmenten sterilfiltriert. Zur Isolierung des rekombinanten IL-26 mit Histidin-Fusionsanteil wurde eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Je 3 ml des Säulenmaterials (Ni Sepharose 6 Fast Flow) wurden dreimal mit 6 ml destillierten Wasser gewaschen und somit das enthaltene Ethanol entfernt. Anschließend erfolgte die Äquilibrierung mit 6 ml Puffer A10. Zwischen den Wasch- und Äquilibrierschritten wurde das Material für 5 min mit 1.200 rpm (301 × g) bei 4 °C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific Inc.) und anschließend der Überstand entfernt.

Das sterilfiltrierte Bakterienlysat (15 ml) wurde der Sepharose hinzugegeben und die entstandene Suspension auf 25 ml mit Puffer A10 aufgefüllt und über Nacht im Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die ungebundenen Proteine mittels Puffer A10 und Puffer B vom Säulenmaterial gewaschen. Anschließend wurde das gebundene IL-26 mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (40 mM, 500 mM, 600 mM) von der Sepharose eluiert und die Fraktionen bei 4 °C gekühlt. Nach Abschluss der Elution wurden die Fraktionen durch Natrium-Dodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) qualitativ auf ihren Gehalt an IL-26 untersucht. Dazu wurden jeweils 50 µl des Eluats mit 50 µl eines zweifachen Laemmli-Probenpuffers 10 min bei 95 °C denaturiert und durch SDS-PAGE (Sammelgelkonzentration 5 %, Trengelkonzentration 15 %) aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung analysiert. Waren Banden im Bereich von 19 kDa zu erkennen, galt die Fraktion als IL-26-haltig.

2.2.3 Dialyse

Die Elutionsfraktionen, die im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel eine Bande im Bereich von 19 kDa zeigten, wurden zum Austausch des Puffers für 48 h einer Dialyse unterzogen. Hierzu wurden unter ständigem Rühren durch einen Magnetrührer je 10 ml der Fraktion in einem Dialyseschlauch (Porengröße 2,5 nm, Cut-off 12 - 16 kDa, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) in einem Liter des Dialysepuffers bei 4 °C dialysiert. Nach 24 h erfolgte die Erneuerung des Dialysepuffers. Bei der Dialyse ausgefallenes Protein wurde bei 4 °C mit 1.500 rpm (470 × g) zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R) und der IL-26 haltige Überstand bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4 Densitometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der IL-26 Konzentration in den einzelnen Fraktionen wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetztes bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 25 µg/ml und ebenfalls mit Probenpuffer versetzte Dialysatproben (im Verhältnis 20 % Puffer, 80 % Probe) auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (Sammelgelkonzentration 5 %, Trengelkonzentration 15 %) aufgetragen. Nach Elektrophorese, Coomassiefärbung und Entfärbung wurden die Gele mit einer *charge-coupled device* (CCD) Kamera (LAS-3000, Fujifilm, Tokio, Japan) fotografiert und digital gespeichert. Anschließend erfolgte die densitometrische Konzentrationsbestimmung der Dialysate im Vergleich zu den BSA-Proteinstandards mit Hilfe der Software Image J (Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA).

2.2.5 Zellkultur und Immunblot

Zur Überprüfung der Wirkung des hergestellten humanen IL-26 auf IL-26-Rezeptor-exprimierende Zielzellen wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie Colo-205 kultiviert. In 6-Well-Platten ausgesäte Colo-205 Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums für 45 min einer

IL-26 Konzentration von 5 µg/ml bei 37 °C ausgesetzt. Hierbei wurde ein Well pro IL-26 Fraktion verwendet. Eine Negativkontrolle (Kulturmedium) wurde mitgeführt. Nach Inkubation erfolgte die Zelllyse mittels 400 µl zweifachen Laemmli-Probenpuffers und 2 µl Benzonase pro Well. Die Zelllysate wurden bei 95 °C für 10 min hitzedenaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel-Konzentration: 5 %, Trenngel-Konzentration: 10 %) aufgetragen.

Die Proteine wurden durch das sogenannte halbtrockene (*semidry*) Westernblot-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran bei 20 V für 30 min übertragen. Anschließend erfolgte die Inkubation in Blockierpuffer für mindestens 1 h. Nach Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer für 10 min erfolgte die Zugabe der Primärantikörper. Nach 1 h Exposition bei Raumtemperatur wurde die Polyvinylidenfluorid-Membran dreimalig über insgesamt 30 min mit TBS-T-Puffer gespült und anschließend mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Spülen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran mit Chemolumineszenz-Reagenz beschichtet und die Chemolumineszenz mit einer *charge-coupled device* (CCD) Kamera (LAS-3000) detektiert. Zur Entfernung gebundener Antikörper wurde die Polyvinylidenfluorid-Membran mit einem Guanidiumchlorid-haltigen Waschpuffer behandelt und bis zur nächsten Antikörperinkubation bei 4 °C in Blockierpuffer gelagert.

2.2.6 Mikrobielle Kulturen

Die für die antimikrobiellen Aktivitätstestungen verwendeten Bakterien und *C. albicans* wurden zunächst über Nacht bei 37 °C auf Columbia-Schafblutagar angezüchtet. Hiervon wurden fünf bis zehn Einzelkolonien in 10 ml *tryptic soy broth* (TSB) Flüssigmedium mit 110 mM NaCl überführt. Nach Inkubation für 20 h bei 37 °C wurden 50 µl der Flüssigmutter in eine neue 10 ml Flüssigmutter (TSB mit 110 mM NaCl) überführt und für 2,5 bis 3 h bei 37 °C inkubiert, um die logarithmische Phase des mikrobiellen Wachstums zu erreichen.

2.2.7 Testung der antimikrobiellen Aktivität

Nach Inkubation für 2,5 bis 3 h erfolgte zur Abschätzung der Bakterienkonzentration in der Flüssigmutter die Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit anschließender Verdünnung mit einer 10 mM NaCl-Lösung auf ca. 1×10^5 bis 1×10^6 koloniebildende Einheiten pro ml. In einer unbeschichteten Mikrotiterplatte wurden 100 µl dieser Bakteriensuspension 100 µl einer IL-26-Lösung zugesetzt. Hierzu wurden die Dialysate mit Dialysepuffer auf gewünschte IL-26 Konzentration verdünnt. Die Versuche wurden in parallelen Ansätzen mit Lösungen zu 100 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml, 3 µg/ml und 1 µg/ml durchgeführt, entsprechend Konzentrationen von 50 µg/ml, 15 µg/ml, 5 µg/ml, 1,5 µg/ml und 0,5 µg/ml in den Mikrotiterplatten. Als Negativkontrolle wurde immer ein Ansatz mit Dialysepuffer mitgeführt. Bei der Untersuchung bestimmter Spezies (u.a. *A. baumannii* und *C. albicans*) wurde der Stamm *E. faecium* ATCC 6057 als Positivkontrolle mitgeführt, der in Vorexperimenten als IL-26-sensibel eingeordnet worden war.

Sofort nach Zugabe der IL-26-Lösung, dann nach 1, 2, 3 und 4 h wurden je 20 µl pro Ansatz entnommen, in 0,85 % NaCl-Lösung verdünnt und dann davon je 100 µl auf zwei LB-Agarplatten ausgestrichen. In einigen Fällen wurde auf Grund der starken Wirkung des IL-26 insbesondere beim Einsatz hoher Konzentrationen auf eine weitere Verdünnung verzichtet und je 20 µl direkt auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonien am folgenden Tag mit Hilfe eines Koloniezählstifts (Colony Counter, Bio Plastics Inc., Japan) gezählt. Die Berechnung der Zahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter erfolgte nach Mittelwertbildung aus den Zählergebnissen der zwei Agarplatten unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen. Insgesamt erfolgten im Rahmen dieser Arbeit ca. 15.000 händische Ausstriche auf LB-Agarplatten für 66 voneinander unabhängige Experimente.

2.3 Statistische Auswertung

Die statische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2016, GraphPad PRISM 8 und dem Webservice Wolfram Alpha. Zur Signifikanzbestimmung wurde der p-Wert mit dem ungepaarten Zweistichproben-t-Test ermittelt. Die Bestimmung der minimalen bakteriziden oder fungiziden Konzentrationen für die 90-prozentige Bakterizidie oder Fungizidie (MBK_{90} oder MFK_{90}) bzw. der letalen Dosis/Konzentration, bei der 90 % der untersuchten Kultur abgetötet wurden (LD_{90}/LC_{90}), erfolgte durch lineare Regression. Werte über 50 µg/ml wurden hierbei extrapoliert. In dieser Arbeit werden die Daten nur in der Form der MBK_{90}/MFK_{90} angegeben, auch wenn im Kontext antimikrobieller Peptide (AMP) häufig auch die Angabe einer LD_{90} oder LC_{90} statt einer MBK_{90}/MFK_{90} erfolgt, da aus mikrobiologischer Sicht die Bezeichnung MBK/MFK präziser ist.

Ergebnisse mit p-Werten $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Sind die p-Werte in Abbildungen dieser Arbeit nicht als Zahlen angegeben, so sind sie nach folgendem Schema gekennzeichnet: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ und ****: $p \leq 0,0001$.

3 Ergebnisse

3.1 Hochkonzentriertes, rekombinantes IL-26

IL-26 wurde in *E. coli* nach Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid exprimiert und durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach anschließender Dialyse wurden die Konzentrationen der IL-26-Fraktionen nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im Vergleich zu einem Proteinstandard (Bovines Serumalbumin, BSA) densitometrisch ermittelt (Abb. 2, Abb. 3).

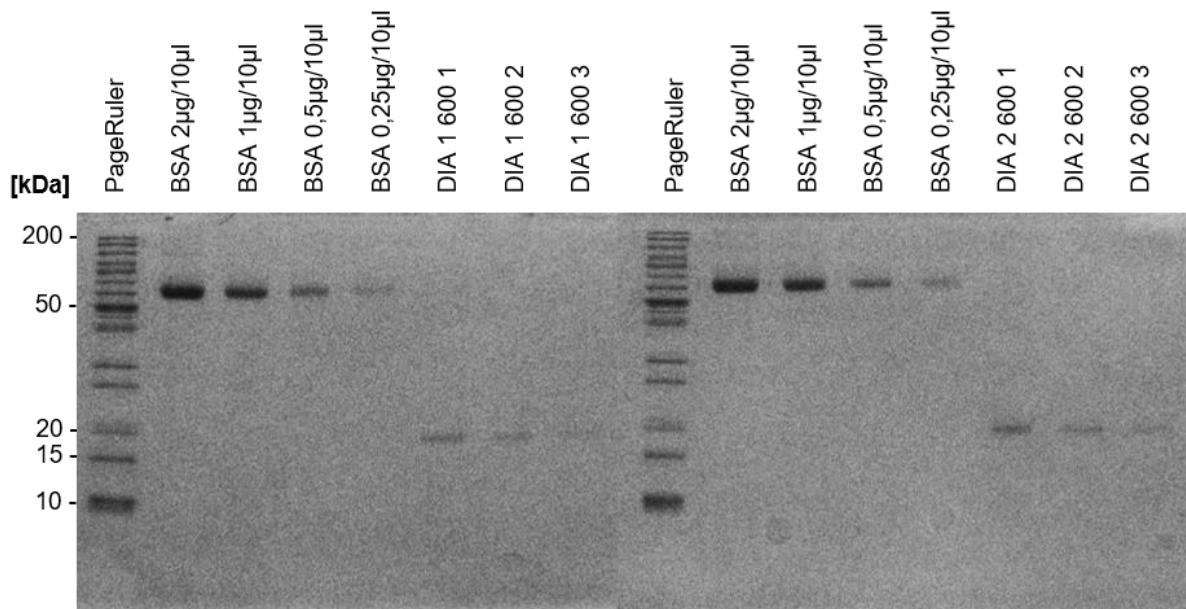


Abb. 2: SDS-PAGE-Gel für die Konzentrationsanalyse mit bovinem Serumalbumin (BSA) in standardisierten Konzentrationen und Dialysaten der IL-26-Fraktionen 1 und 2. PageRuler (Proteinstandard), DIA, Dialysat.

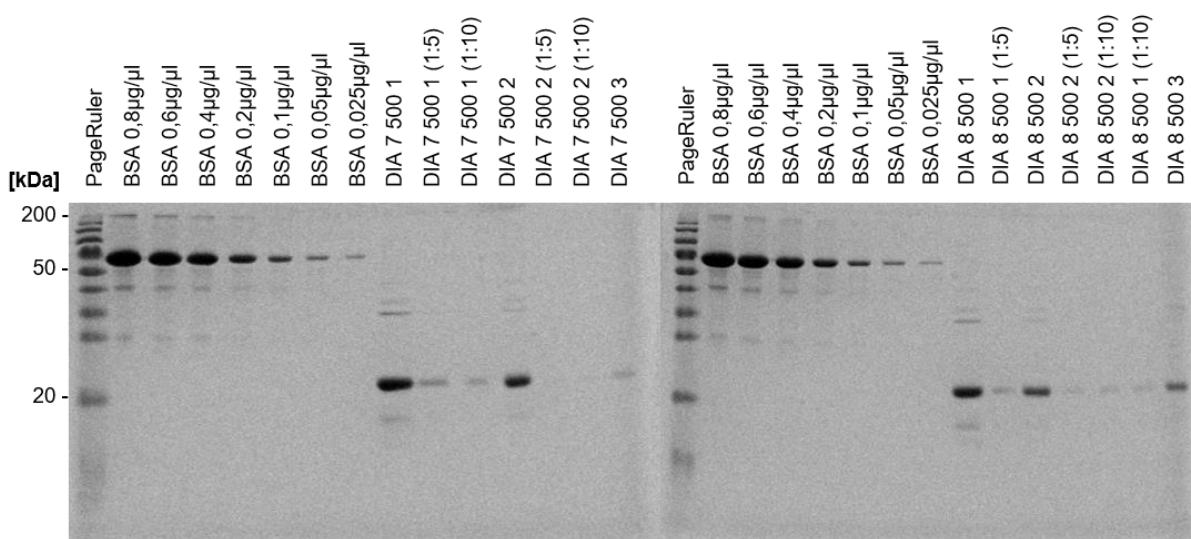


Abb. 3: SDS-PAGE-Gel für die Konzentrationsanalyse mit bovinem Serumalbumin (BSA) in standardisierten Konzentrationen und Dialysaten der IL-26-Fraktionen 7 und 8. PageRuler (Proteinstandard), DIA, Dialysat.

Tab. 4: Ergebnisse der densitometrischen Konzentrationsbestimmung für die dialysierten IL-26-Fraktionen 1, 2, 7 und 8. Bei den mit Auslassungsstrich versehenen Fraktionen konnte keine Konzentration ermittelt werden.

Fraktion	µg/ml
1 600 1	36,60
1 600 2	18,26
1 600 3	12,99
2 600 1	27,98
2 600 2	10,69
2 600 3	-
7 500 1	762,24
7 500 2	415,11
7 500 3	-
8 500 1	559,68
8 500 2	304,80
8 500 3	140,56

3.2 Biologische Aktivität des hergestellten, rekombinanten IL-26

Zur Überprüfung der Aktivität des rekombinant hergestellten IL-26 auf IL-26R-positive Epithelzellen wurde, wie unter 2.2.5 beschrieben, die STAT3-Phosphorylierung nach Inkubation von Colo-205-Zellen mit IL-26 über 45 min getestet. Zeigten sich im Westernblot Banden bei 92 kDa (pSTAT3) wurde die untersuchte IL-26-Fraktion als biologisch aktiv eingestuft. Positiv- und Negativkontrollen wurden stets mitgeführt (Abb. 4).

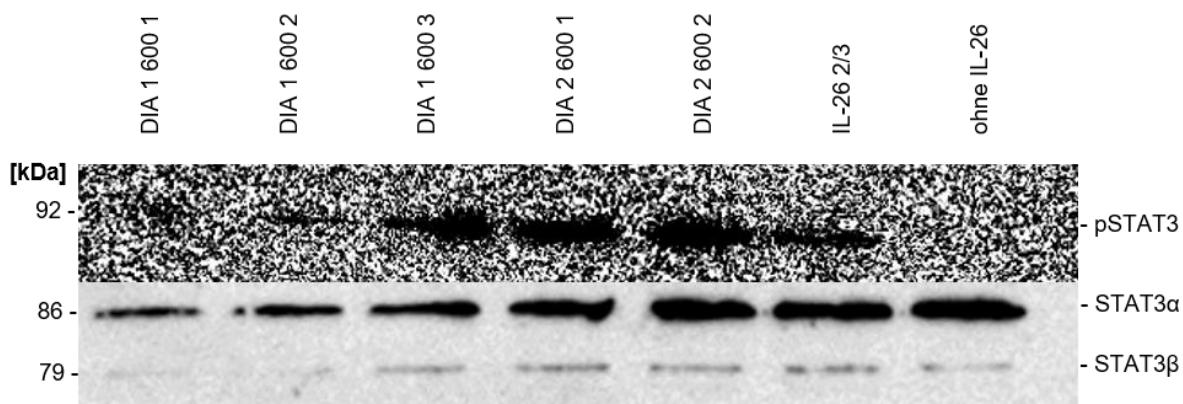


Abb. 4: Beispielhafte Ergebnisse der Westernblot-Analyse verschiedener IL-26-Dialysate, einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle. IL-26 2/3: Positivkontrolle; ohne IL-26: Negativkontrolle.

3.3 Antimikrobielle Aktivität auf Gram-positive Bakterien

IL-26 wurde in Flüssigkultur auf seine bakterizide Aktivität auf drei Gram-positive Bakterienspezies und multiresistente Varianten getestet.

3.3.1 *Enterococcus faecalis*

Bei Inkubation von *E. faecalis* ATCC 29212 mit einer hohen Konzentration (50 µg/ml) von IL-26 zeigte sich eine sofortige, hochsignifikante ($p \leq 0,0001$) Reduktion der Zahl der koloniebildenden Einheiten um den Faktor 61, entsprechend einer Reduktion um 98,4 % (Abb. 5).

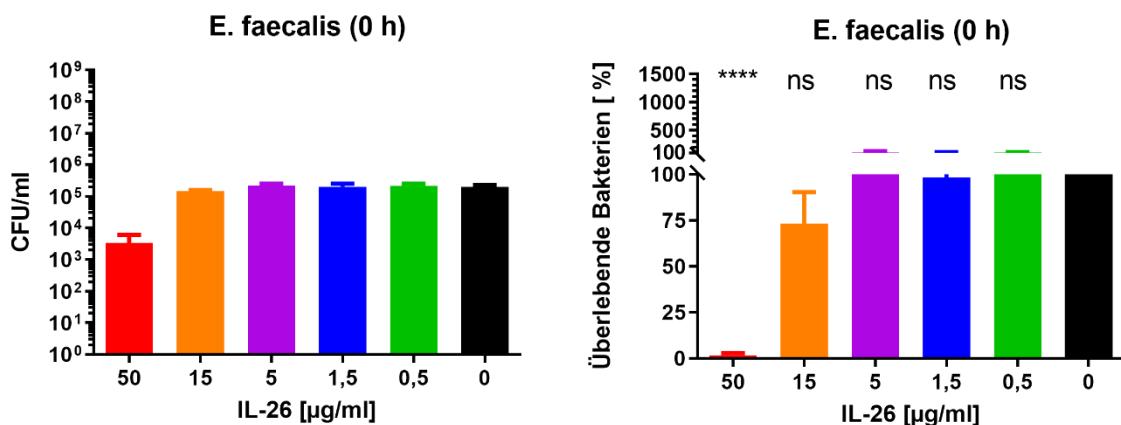


Abb. 5: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecalis* ATCC 29212 direkt nach Zugabe von IL-26 (0 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach einstündiger Inkubation waren bereits signifikante Effekte ab Konzentrationen von 5 µg/ml IL-26 nachweisbar: Reduktion um 24,5 % bei 5 µg/ml, Reduktion um 87,1 % bei 15 µg/ml und komplette Abtötung aller Bakterien bei 50 µg/ml (Abb. 6).

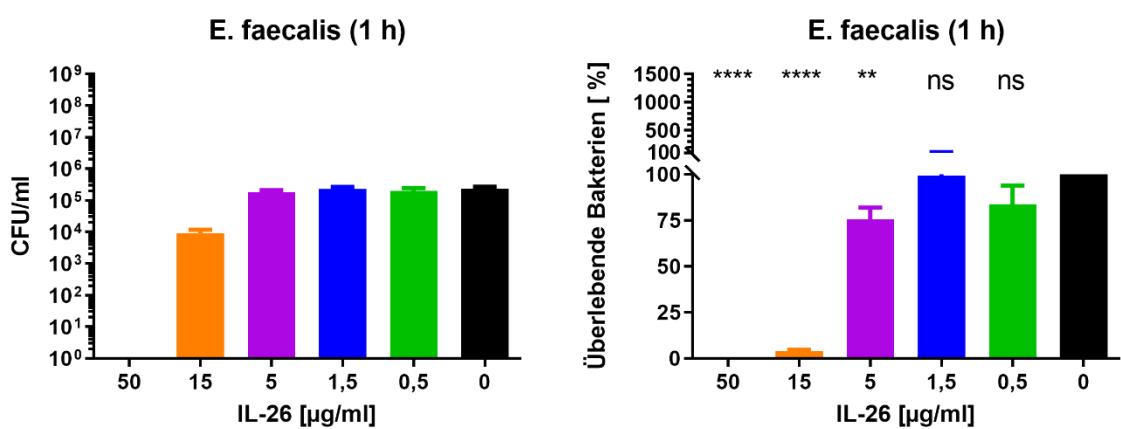


Abb. 6: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecalis* ATCC 29212 eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (1 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach zweistündiger Inkubation war die Keimzahlreduktion bei 5 µg/ml nicht mehr signifikant, aber die Reduktion bei 15 µg/ml um das 40-fache mit 97,3 % ausgeprägter als bei einstündiger Inkubation. Weiterhin war bei 50 µg/ml eine Reduktion um 100 % festzustellen (Abb. 7).

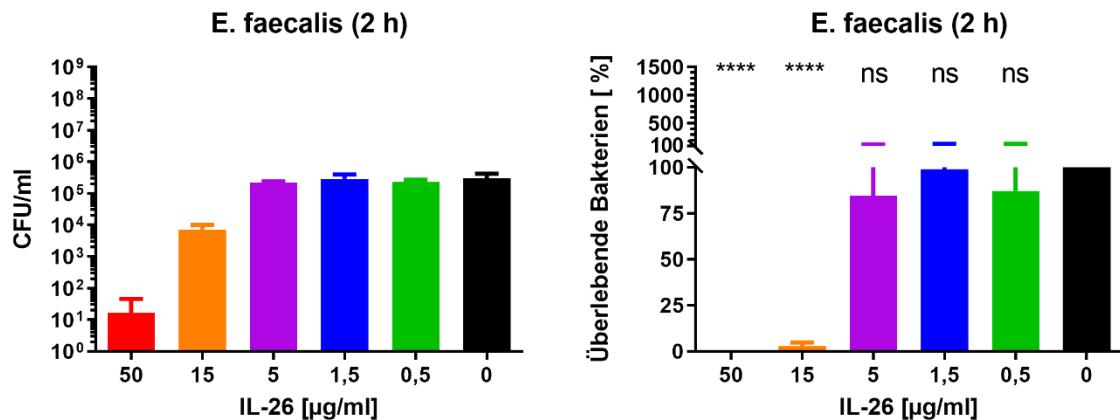


Abb. 7: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecalis* ATCC 29212 zwei Stunden nach Zugabe von IL-26 (2 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Ähnliches gilt für die Inkubation über drei und vier Stunden. Fortwährend zeigten sich signifikante Reduktionen um eine Zehnerpotenz bei 15 µg/ml (92,3 % bei 3 h bzw. 96,1 % bei 4 h) und um den Faktor 6000 bzw. 2500 bei 50 µg/ml, entsprechend einer Reduktion um 100 % (Abb. 8).

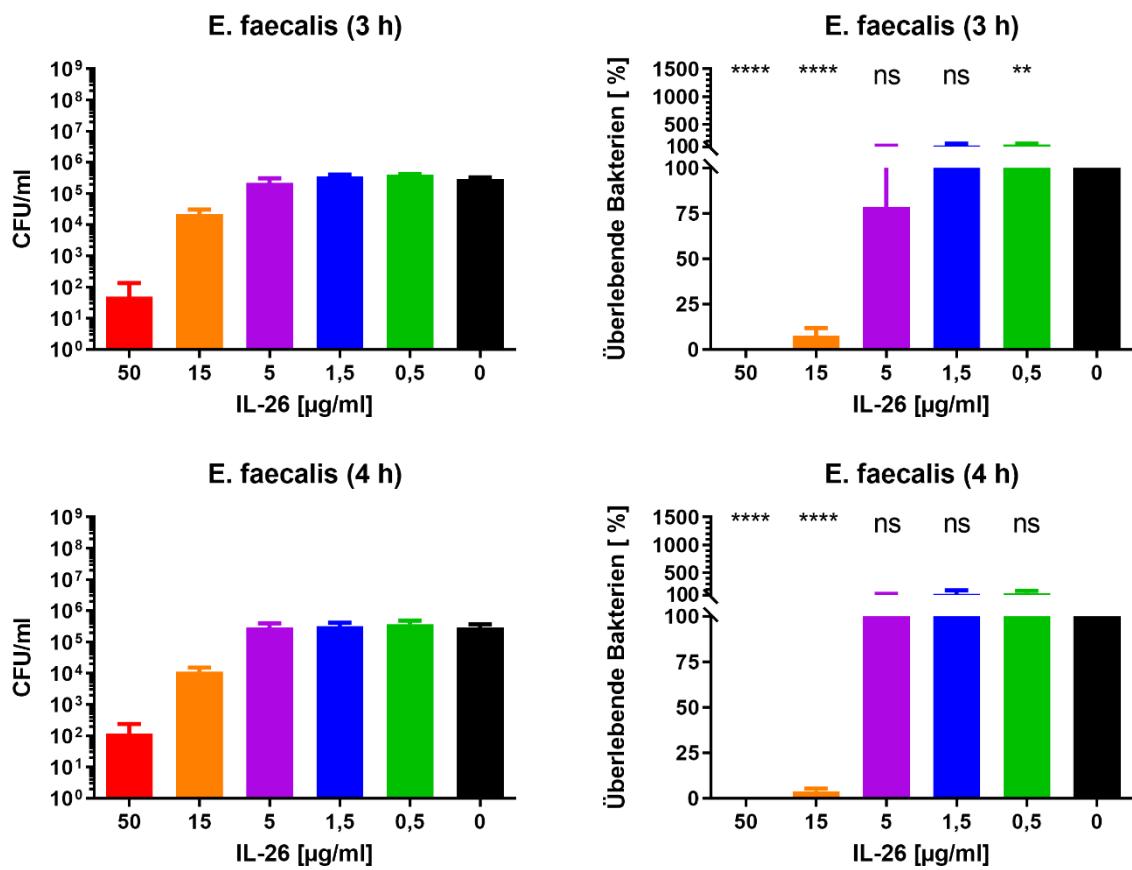


Abb. 8: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecalis* ATCC 29212 drei bzw. vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (3 h, 4 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

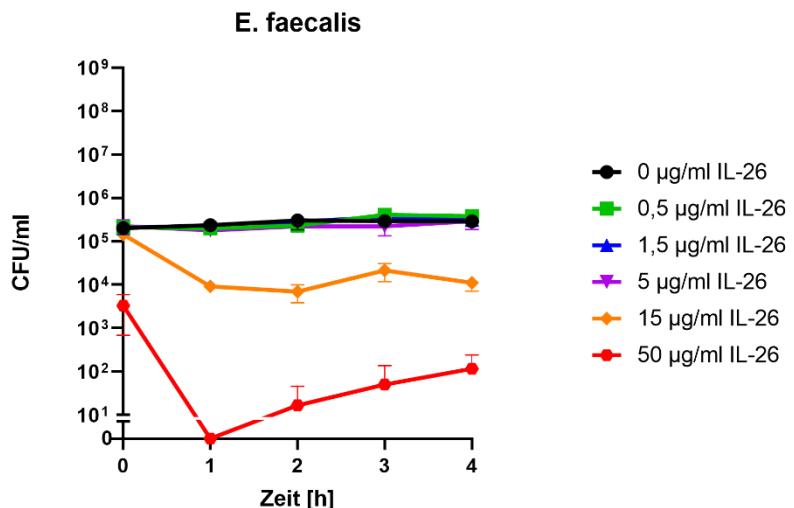


Abb. 9: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *E. faecalis* ATCC 29212 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 5).

Tab. 5: MBK₉₀ Werte für *E. faecalis* ATCC 29212 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀				Einheit
	0	1	2	3	4 h
<i>E. faecalis</i>	0	1	2	3	
ATCC 29212	45,58	14,16	14,23	14,40	14,51 µg/ml

3.3.2 Vancomycin-resistente Patientenisolat von *Enterococcus faecalis*

Bei der Untersuchung eines aus einer Patientenprobe gewonnenen Vancomycin-resistenten *E. faecalis* wurde direkt zu Beginn eine signifikante Reduktion der Keimzahl um das Fünffache bei Konzentrationen von 50 µg/ml IL-26 festgestellt (Abb. 10). Nach einstündiger Inkubation zeigte sich schwach bis hochsignifikante Reduktionen der Keimzahlen ab 0,5 µg/ml, wobei die am stärksten ausgeprägten Ergebnisse bei 15 µg/ml (Reduktion um 72,5 %) und 50 µg/ml (Reduktion um 99,6 %) zu finden waren (Abb. 10).

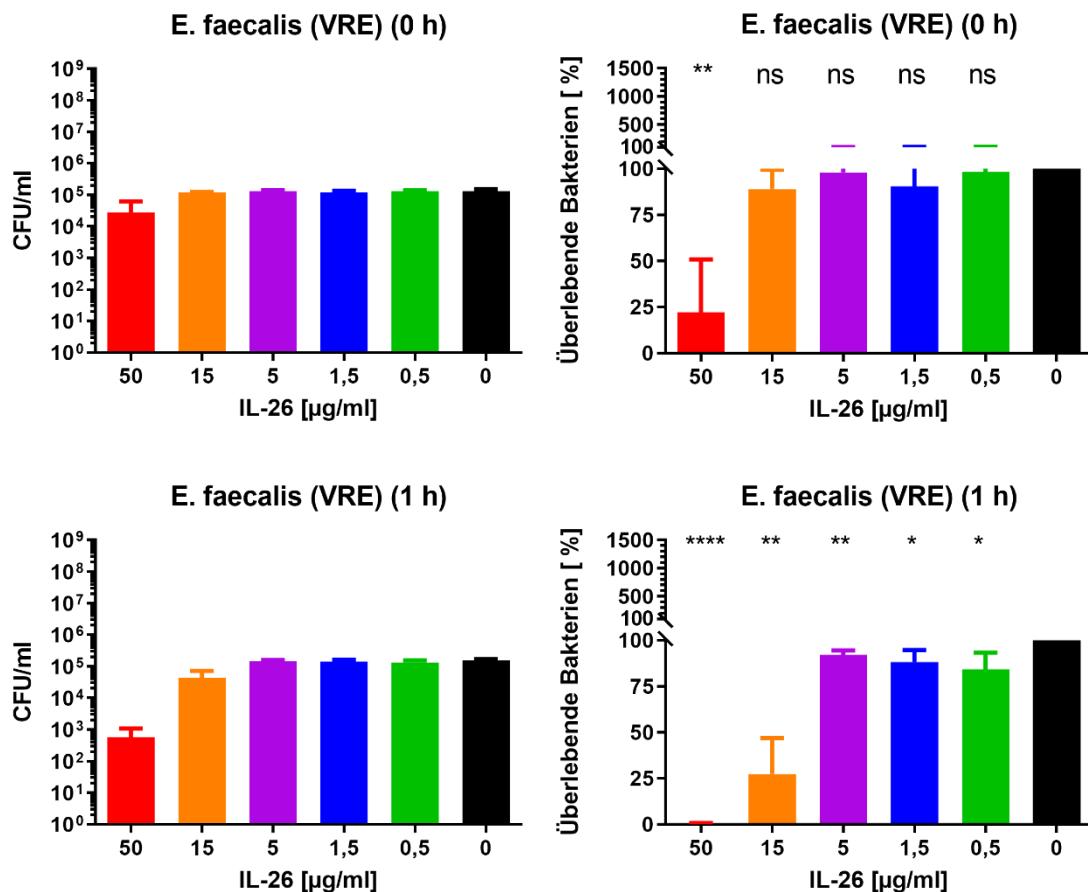


Abb. 10: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für einen Vancomycin-resistenten *E. faecalis* direkt und eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (0 h, 1 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Bei der weitergehenden Inkubation über zwei und drei Stunden (Abb. 11) blieben nur die Wirkungen bei 15 µg/ml und 50 µg/ml signifikant. Messbar waren Reduktionen um 68 % und 99,85 % (2 h) bzw. 70,3 % und 99,94 % (3 h). Nach vier Stunden (Abb. 11) war nur noch die Reduktion bei der höchsten IL-26-Konzentration signifikant (Reduktion um 99,95 %).

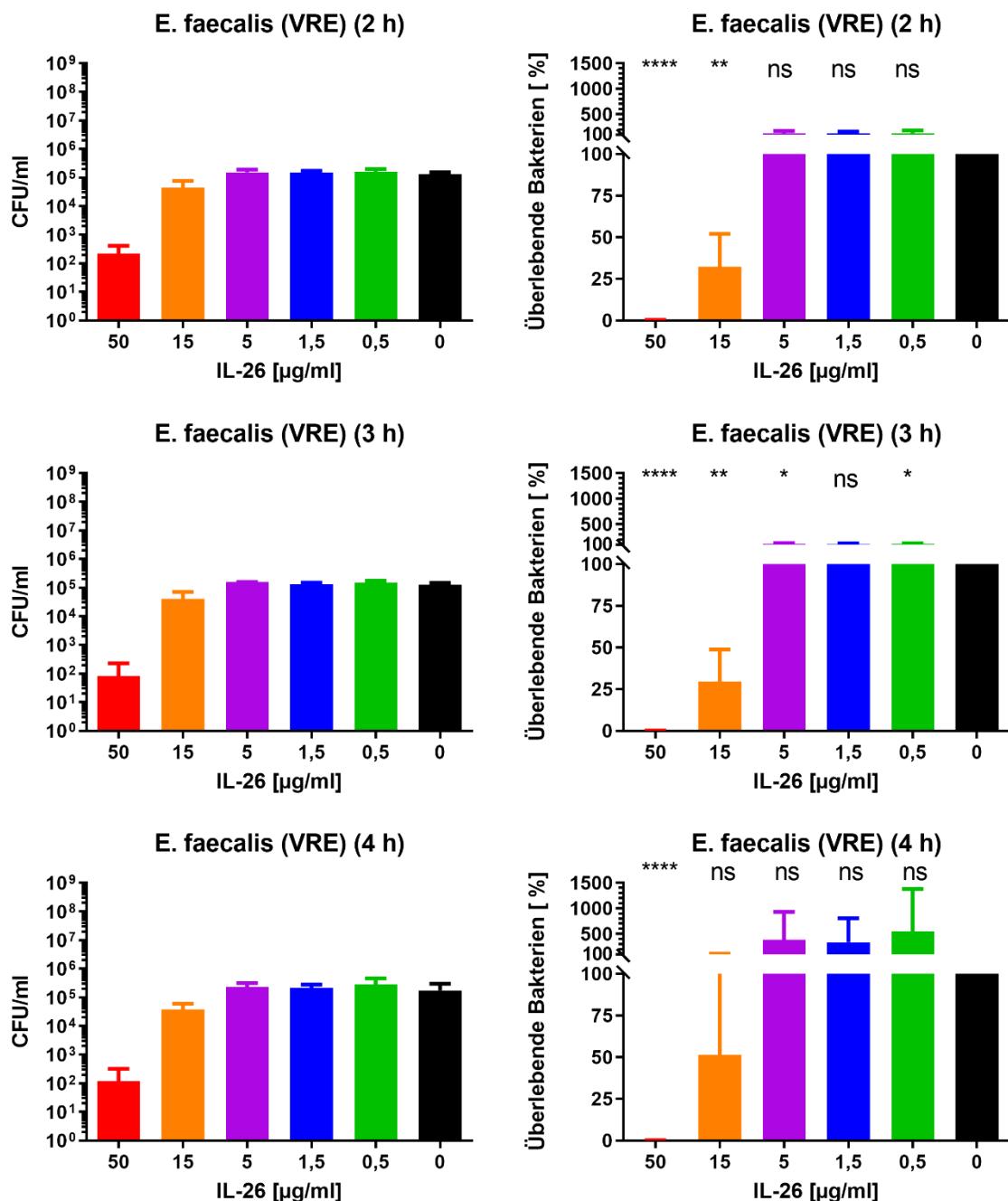


Abb. 11: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für einen Vancomycin-resistenten *E. faecalis* 2, 3 und 4 h nach Zugabe von IL-26 (2 h, 3 h, 4 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

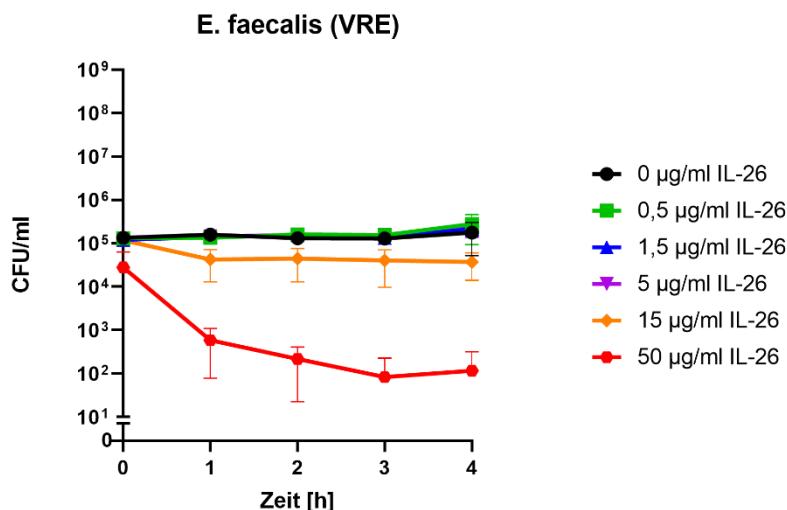


Abb. 12: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für das Vancomycin-resistente Patientenisolat eines *E. faecalis* (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 6).

Tab. 6: MBK₉₀ Werte für *E. faecalis* (VRE) in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀				Einheit
	0	1	2	3	4 h
<i>E. faecalis</i> (VRE)	57,48	40,04	41,59	40,67	42,38 µg/ml

3.3.3 *Enterococcus faecium*

Auch bei *E. faecium* ATCC 6057 war eine sofortige signifikante Keimzahlreduktion um 70,6 % (Faktor 3) bei 15 µg/ml IL-26 und um 99,5 % bei 50 µg/ml nachweisbar, gleichbedeutend einer Abnahme der Zahl koloniebildender Einheiten um das 200-fache (Abb. 13).

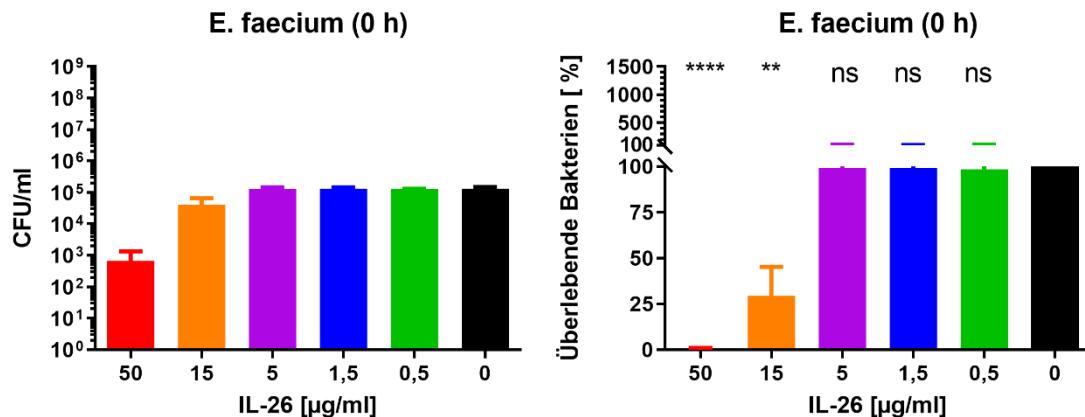


Abb. 13: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecium* ATCC 6057 direkt nach Zugabe von IL-26 (0 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach einstündiger Inkubation erfolgte eine Reduktion der Keimzahl um das Fünffache (81,3 %) bei 5 µg/ml IL-26, um 99,96 % bei 15 µg/ml und eine komplette Abtötung aller Bakterien bei 50 µg/ml (Abb. 14).

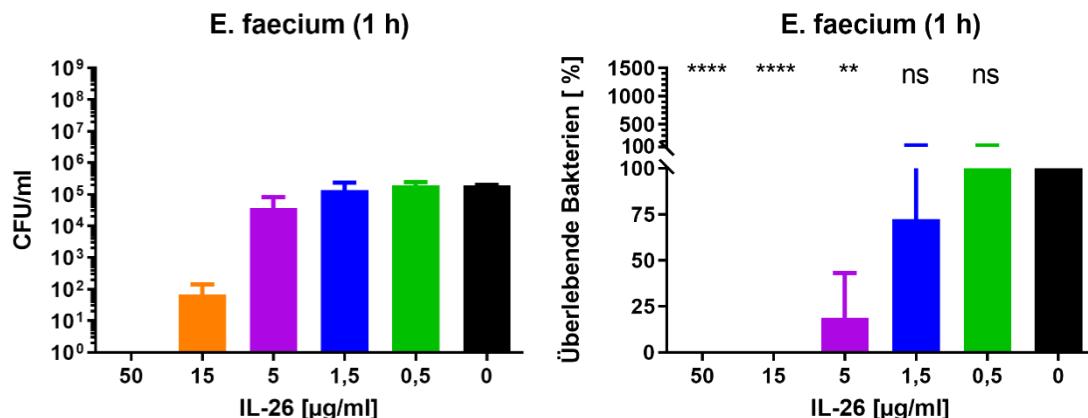


Abb. 14: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecium* ATCC 6057 1 h nach Zugabe von IL-26 (1 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Wurde die Inkubation für eine weitere Stunde durchgeführt, zeigten sich analog zu den Ergebnissen bei *E. faecalis* nur noch signifikante Reduktionen bei 15 und 50 µg/ml. Diese waren aber gleichbleibend hoch, entsprechend einer kompletten Eradikation (Abb. 15).

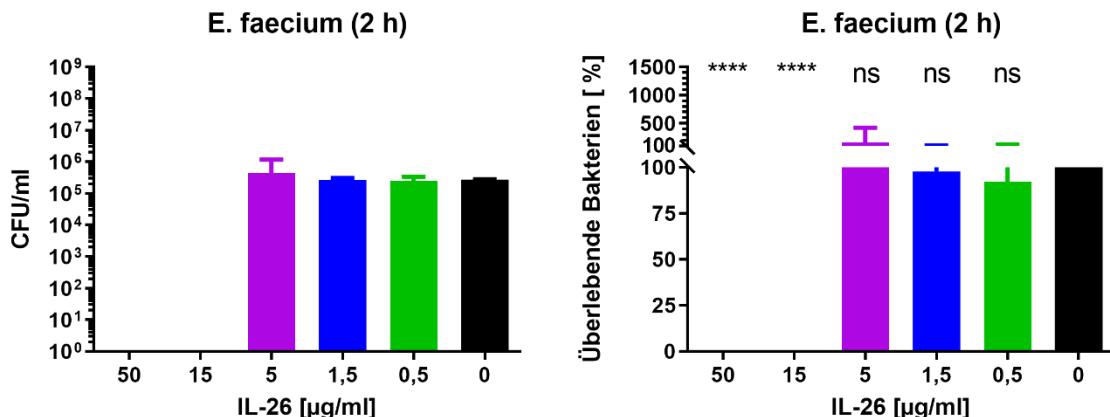


Abb. 15: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden für *E. faecium* ATCC 6057 zwei Stunden nach Zugabe von IL-26 (2 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Gleiches galt für Inkubationen über vier Stunden. Bei drei Stunden zeigte sich bei 15 µg/ml nur eine Reduktion um Faktor 5000, entsprechend einer Abnahme um 99,98 %, bei 50 µg/ml war weiterhin eine komplette Abtötung festzustellen (Abb. 16).

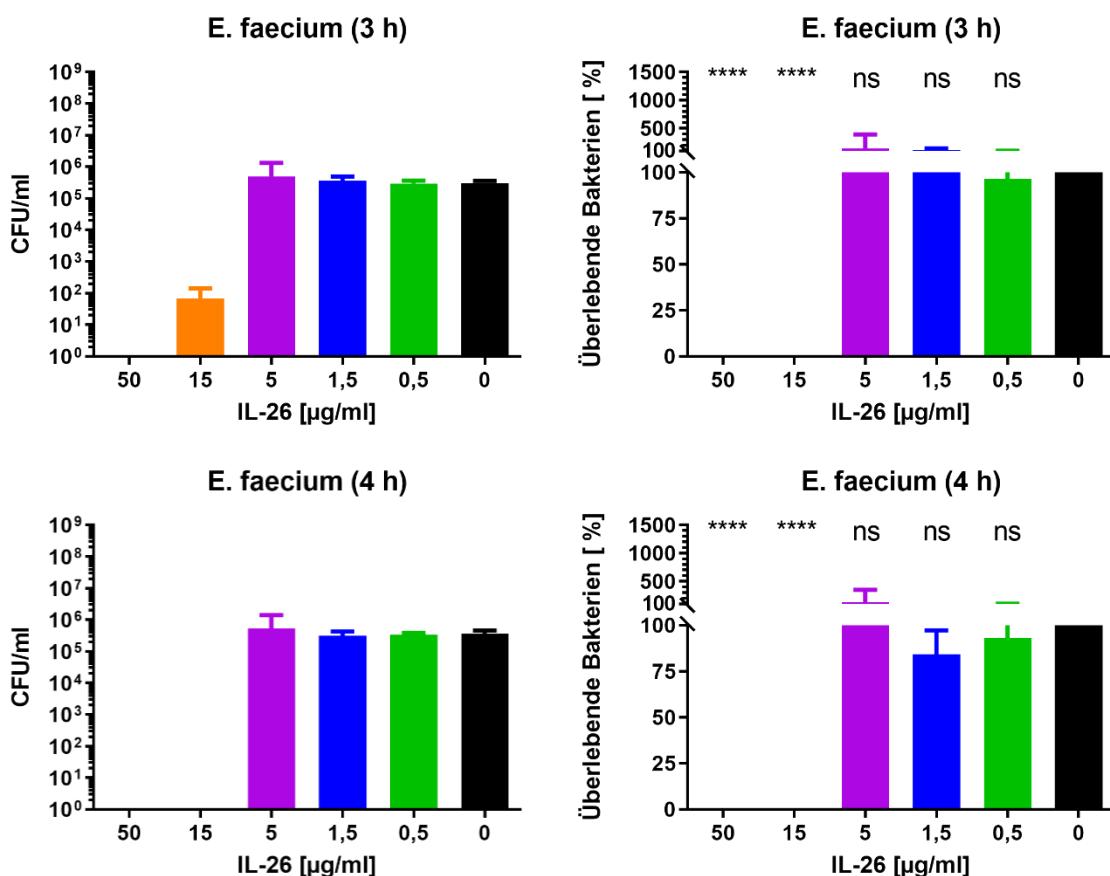


Abb. 16: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. faecium* ATCC 6057 drei und vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (3 h, 4 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

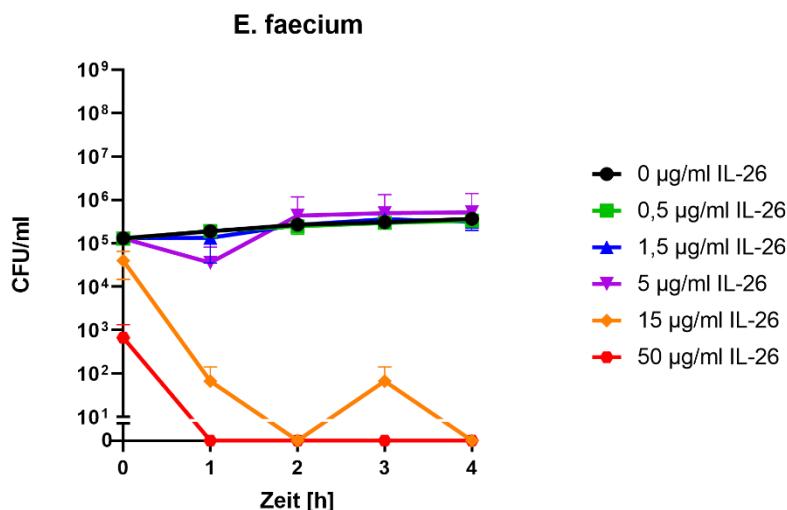


Abb. 17: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *E. faecium* ATCC 6057 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 7).

Tab. 7: MBK₉₀ Werte für *E. faecium* ATCC 6057 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀					Einheit
	0	1	2	3	4 h	
<i>E. faecium</i>	0	1	2	3	4 h	
ATCC 6057	64,75	11,72	13,58	13,79	13,41	µg/ml

3.3.4 Vancomycin-resistenter Stamm von *Enterococcus faecium*

Nach erfolgreichem Nachweis der Sensibilität von *E. faecium* gegenüber IL-26 wurde der Vancomycin-resistente Stamm DSM 17050 auf IL-26-Sensibilität geprüft.

Direkt nach Zugabe von 50 µg/ml IL-26 wurde eine hochsignifikante Reduktion der Koloniezahl um das 120-fache (99,1 %) erreicht. Auch bei einer IL-26 Konzentration von 15 µg/ml zeigte sich eine signifikante Reduktion, die allerdings mit 52,37 % schwächer ausfiel (Abb. 18). Diese Konzentration von 50 µg/ml führte nach einstündiger Inkubation zu einer kompletten Eradikation aller Bakterien in der Kultur. Ferner war eine Reduktion um das 1000-fache schon bei 15 µg/ml IL-26 zu beobachten (Abb. 18).

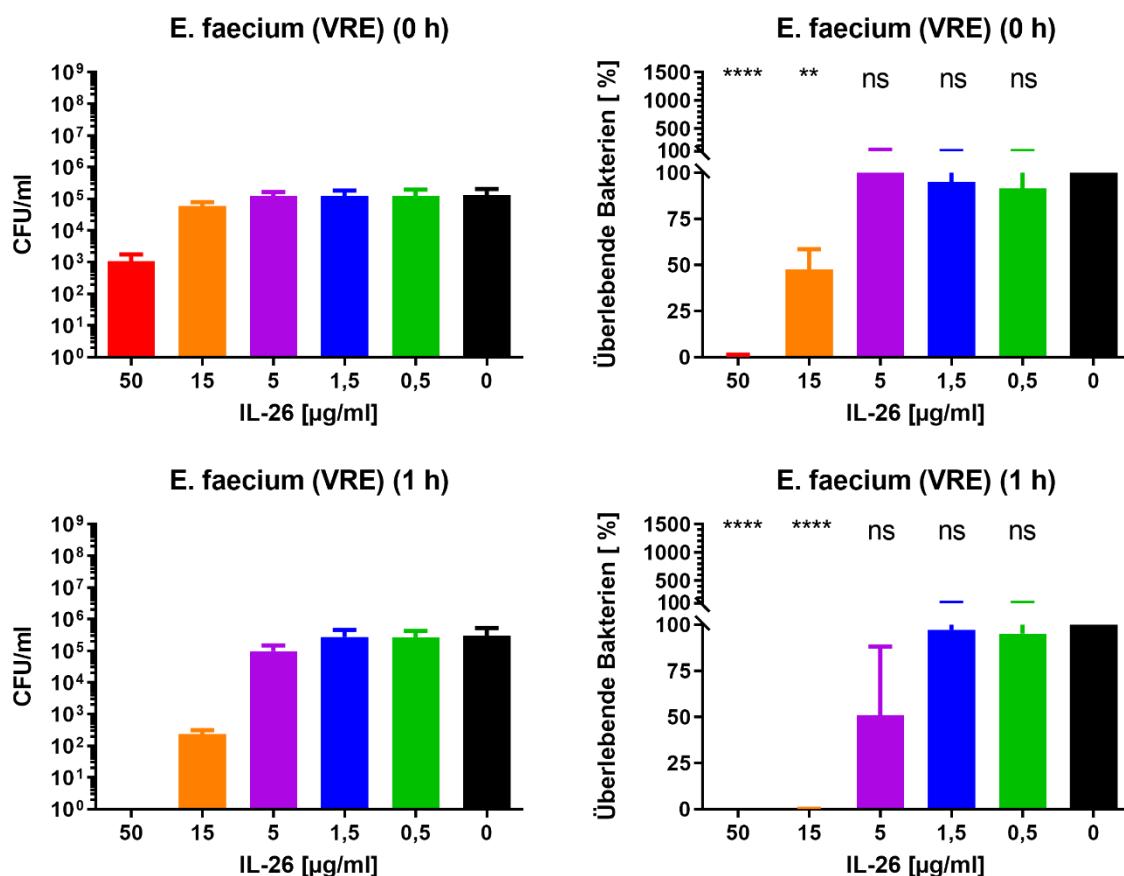


Abb. 18: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für Vancomycin-resistenten *E. faecium* DSM 17050 direkt und nach einer Stunde nach Zugabe von IL-26 (0 h, 1 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Bei Inkubation über zwei Stunden war nach wie vor eine komplette Abtötung aller Bakterien bei 50 µg/ml und eine Keimzahlreduktion um 99,8 % bei 15 µg/ml IL-26 zu ermitteln (Abb. 19).

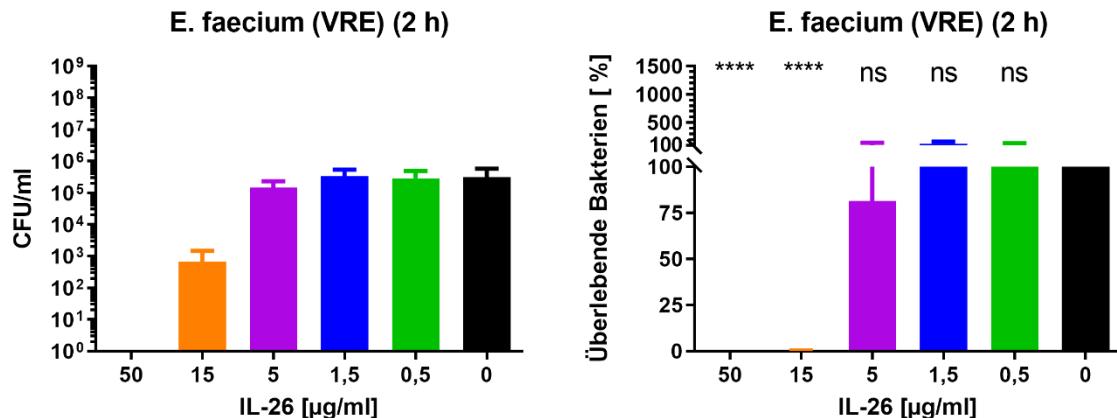


Abb. 19: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für Vancomycin-resistenten *E. faecium* DSM 17050 zwei Stunden nach Zugabe von IL-26 (2 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Wurden die Vancomycin-resistenten *E.-faecium*-Kulturen über drei Stunden mit IL-26 inkubiert, zeigte sich bereits bei 5 µg/ml eine signifikante Reduktion von 40,6 %, die bei 15 µg/ml 99,7 % betrug, entsprechend einer Reduktion um das 300-fache. Weiterhin war eine komplette Eradikation bei 50 µg/ml festzustellen (Abb. 20).

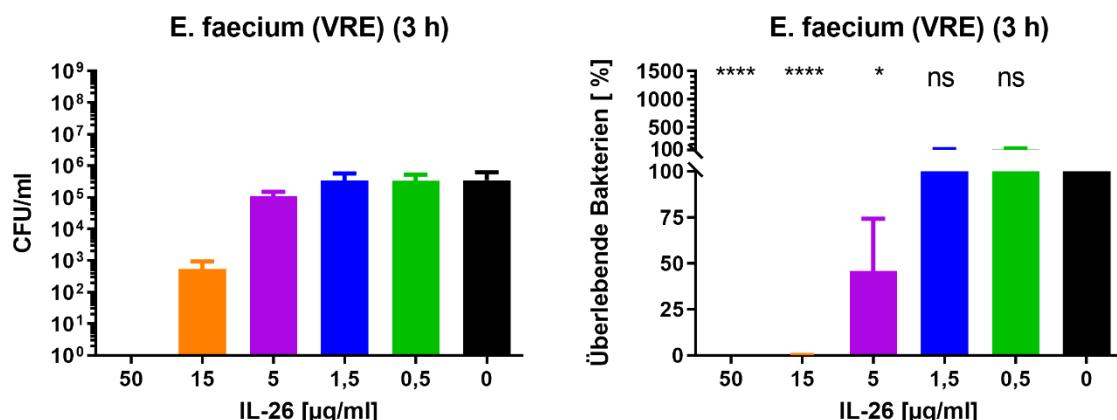


Abb. 20: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für Vancomycin-resistenten *E. faecium* DSM 17050 drei Stunden nach Zugabe von IL-26 (3 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Bei vierstündiger Inkubation war eine nicht signifikante Reduktion bei 5 µg/ml, dafür aber eine hochsignifikante Reduktion um das 500-fache bei 15 µg/ml (99,9 %) und weiterhin kein Nachweis lebender Bakterien bei 50 µg/ml (100 %) zu registrieren (Abb. 21).

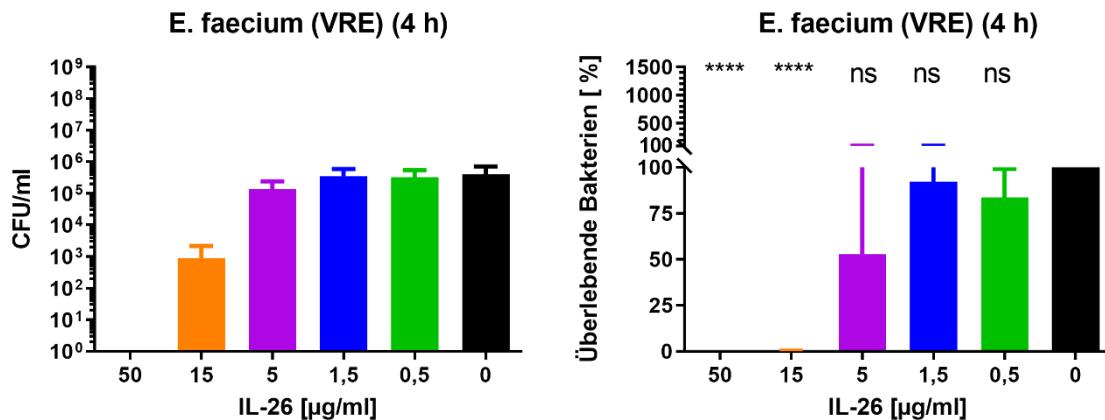


Abb. 21: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für Vancomycin-resistenten *E. faecium* DSM 17050 vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (4 h, n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

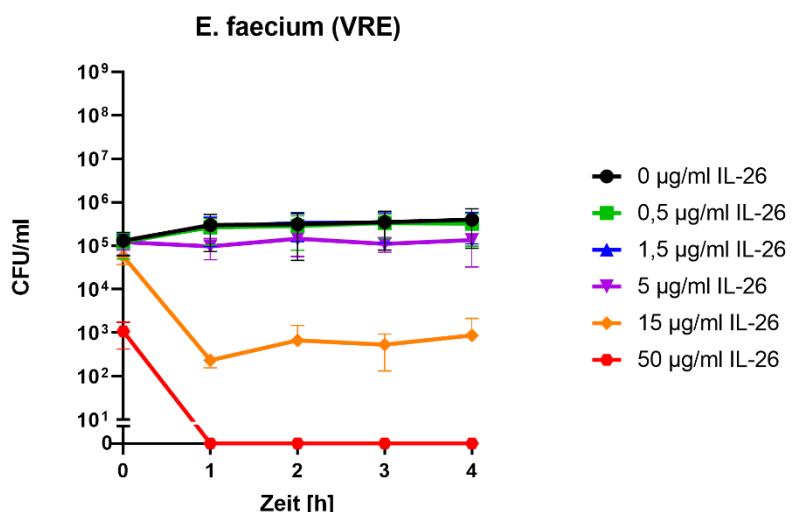


Abb. 22: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für Vancomycin-resistenter *E. faecium* DSM 17050 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 8).

Tab. 8: MBK₉₀ Werte für den Vancomycin-resistenter Stamm von *E. faecium* DSM 17050 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀					Einheit
	0	1	2	3	4 h	
<i>E. faecium</i> (VRE)	0	1	2	3	4 h	
DSM 17050	42,84	12,94	14,02	12,75	13,02	µg/ml

3.3.5 *Staphylococcus aureus*

Bei Untersuchungen mit *S. aureus* ATCC 6538 konnte zwar eine sofortige Reduktion der Zahl der koloniebildenden Einheiten von 23,2 % bei 50 µg/ml festgestellt werden; diese erwies sich allerdings als statistisch nicht signifikant ($p = 0,37$; Abb. 23).

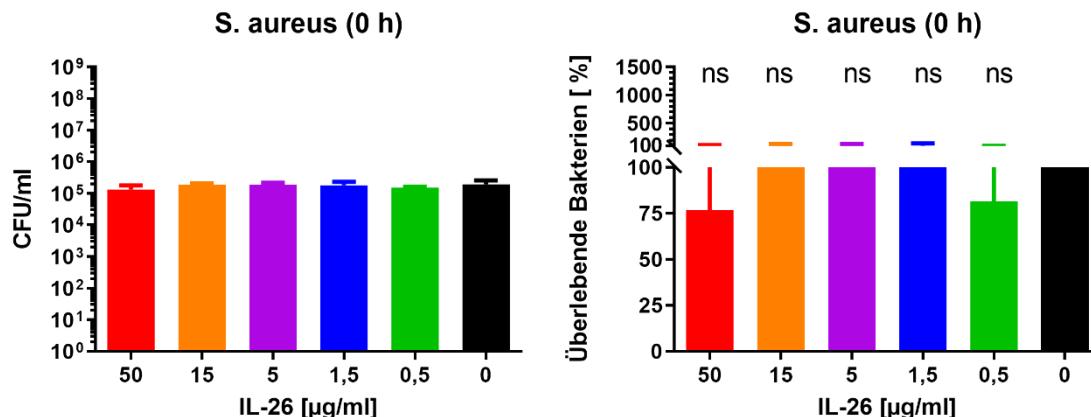


Abb. 23: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien *S. aureus* ATCC 6538 direkt nach Zugabe von IL-26 (0 h, $n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Proben, die nach einer Stunde entnommen wurden, zeigten dann aber bei Zugabe von 50 µg/ml IL-26 eine hochsignifikante Reduktion um den Faktor 21, also um 94,6 % (Abb. 24).

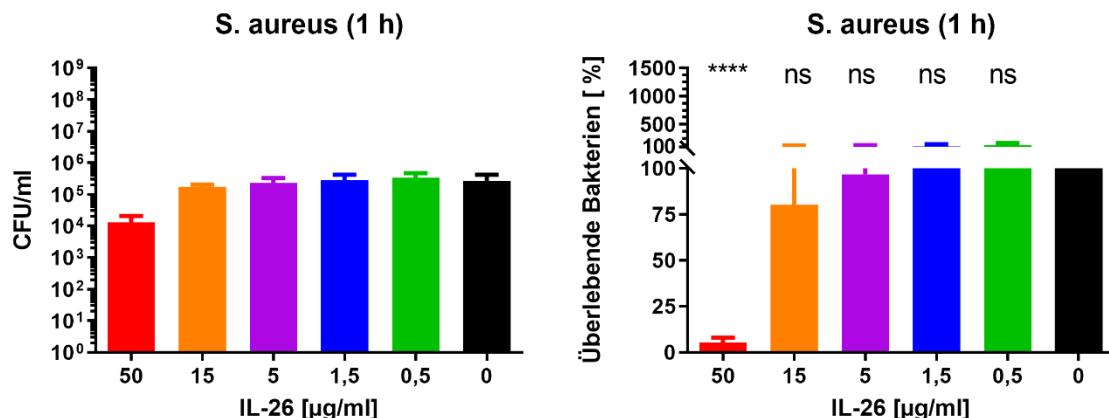


Abb. 24: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *S. aureus* ATCC 6538 eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (1 h, $n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Dieser Effekt konnte bei zweistündiger Inkubation weiterhin beobachtet werden, erneut mit einer 21-fachen Reduktion (95,6 %). Ferner ließ sich eine signifikante Reduktion um das 1,5-fache (36,2 %) bei einer Konzentration bei 15 µg/ml feststellen (Abb. 25). Nach Inkubation über drei Stunden waren signifikante Reduktionen um den Faktor 1,3 von 20,8 % bei 15 µg/ml und um das 40-fache, also um 98 %, bei 50 µg/ml nachweisbar (Abb. 25).

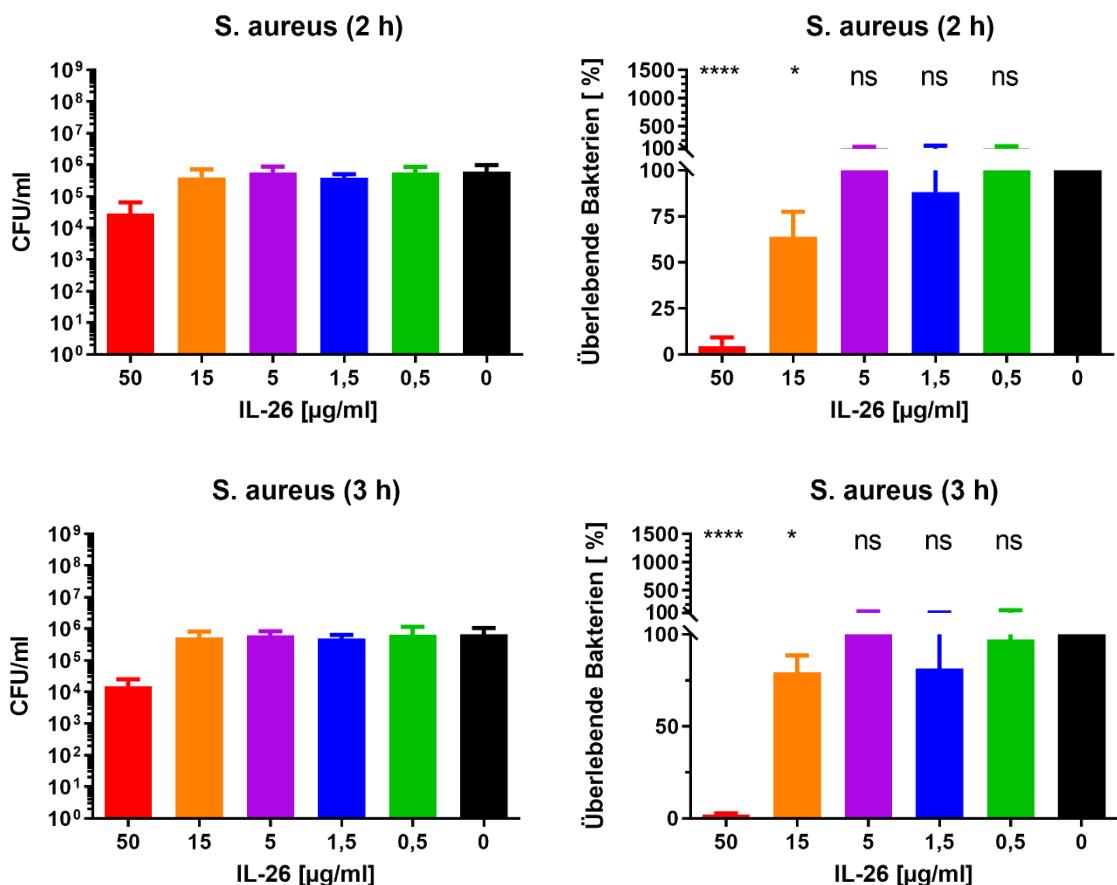


Abb. 25: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *S. aureus* ATCC 6538 zwei und drei Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Bei vierstündiger Inkubation war nur noch bei einer Konzentration von 50 µg/ml ein signifikantes Ergebnis mit Reduktion um 93,4 % zu ermitteln (Abb. 26).

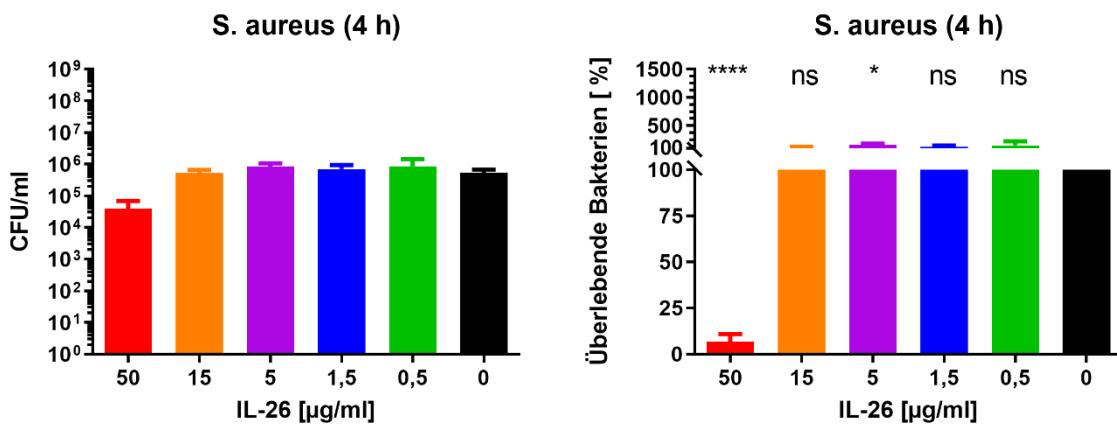


Abb. 26: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *S. aureus* ATCC 6538 vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

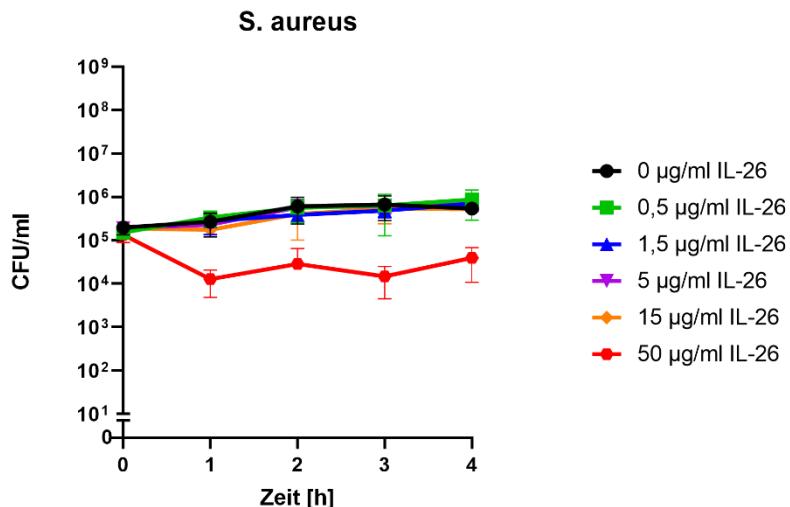


Abb. 27: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *S. aureus* ATCC 6538 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 9).

Tab. 9: MBK₉₀-Werte für *S. aureus* ATCC 6538 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀				Einheit
	0	1	2	3	4 h
<i>S. aureus</i>	0	1	2	3	
ATCC 6538	136,00	47,31	46,19	47,15	48,54 µg/ml

3.3.6 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

Nachdem für ein Wildtyp-Isolat von *S. aureus* die Empfindlichkeit gegenüber IL-26 ermittelt war, wurde der MRSA-Stamm ATCC 33593 getestet. Hierbei konnte für Konzentrationen ab 15 µg/ml eine signifikante sofortige Reduktion um 90,1 %, also um das Achtfache bei 15 µg/ml, bzw. um 99,3 %, also um den Faktor 117 bei 50 µg/ml ermittelt werden (Abb. 28).

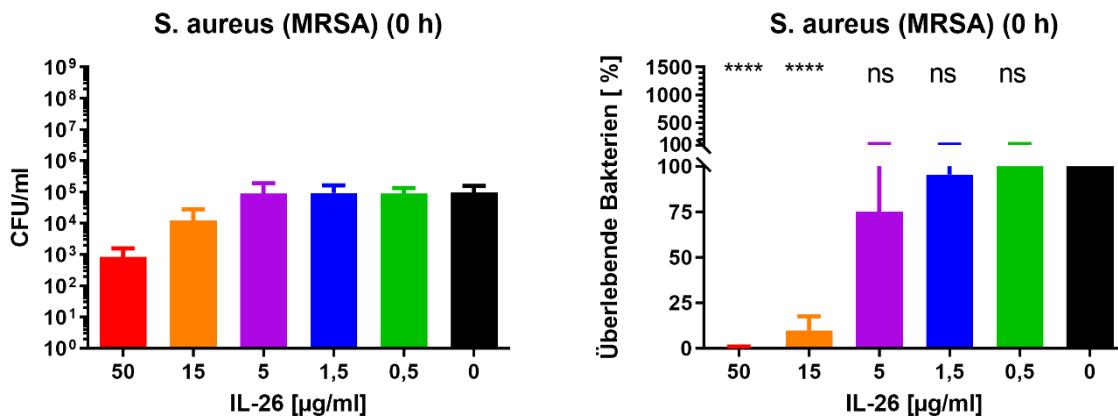


Abb. 28: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für den MRSA-Stamm ATCC 33593 direkt nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Bei einstündiger Inkubation zeigte sich eine signifikante Reduktion bereits ab Konzentrationen von 1,5 µg/ml mit den Faktoren 1,5 bzw. 53,3 %. Für 5 µg/ml lag eine Reduktion um das Vierfache, entsprechend 81,4 % vor. Wurde eine Konzentration von 15 µg/ml IL-26 eingesetzt, war eine Keimzahlreduktion um das 852-fache, gleichbedeutend einer Reduktion um 99,8 % feststellbar. Eine komplette Eradikation konnte bei 50 µg/ml nachgewiesen werden (Abb. 29).

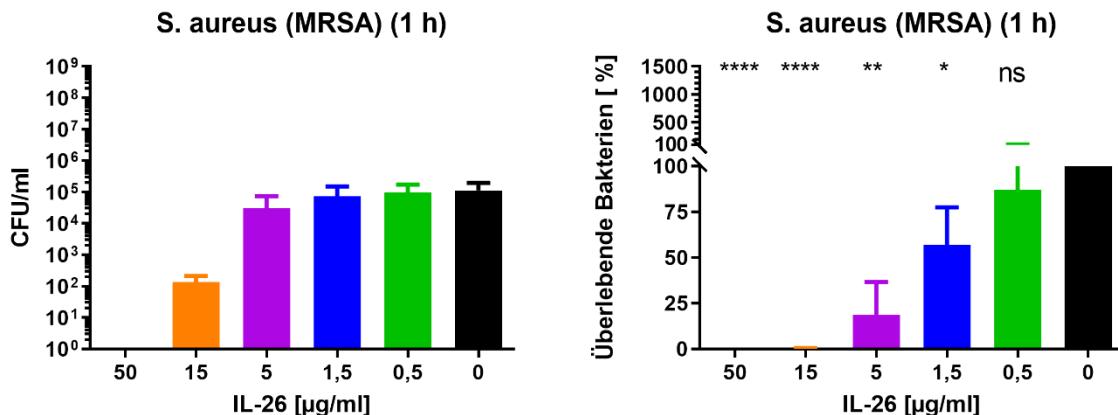


Abb. 29: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für den MRSA-Stamm ATCC 33593 eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach zweistündiger Inkubation war eine 3,5-fache Reduktion (81,3 %) bei 5 µg/ml und eine Reduktion um das 550-fache (99,9 %) bei 15 µg/ml nachweisbar. Bei 50 µg/ml konnte weiterhin eine komplette Abtötung der Bakterien in Kultur nachgewiesen werden (Abb. 30).

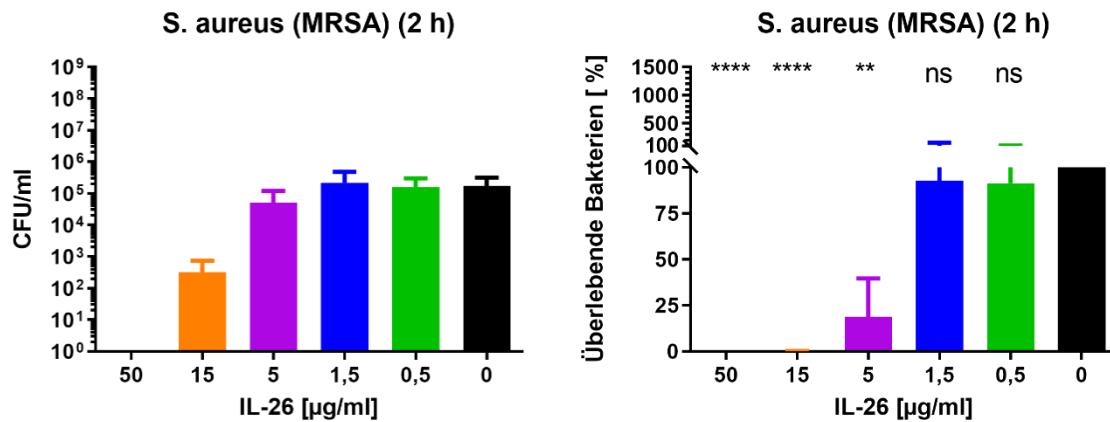


Abb. 30: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden für den MRSA-Stamm ATCC 33593 zwei Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach dreistündiger Inkubation zeigten sich Keimzahlreduktionen ab 0,5 µg/ml, wobei nur diejenigen bei 0,5 µg/ml (33,5 %, Faktor 1,7), 5 µg/ml (83,9 %, Faktor 3,6), 15 µg/ml (99,8 %, Faktor 651) und 50 µg/ml (100 %, weiterhin komplette Abtötung) statistisch als signifikant betrachtet werden können (Abb. 31).

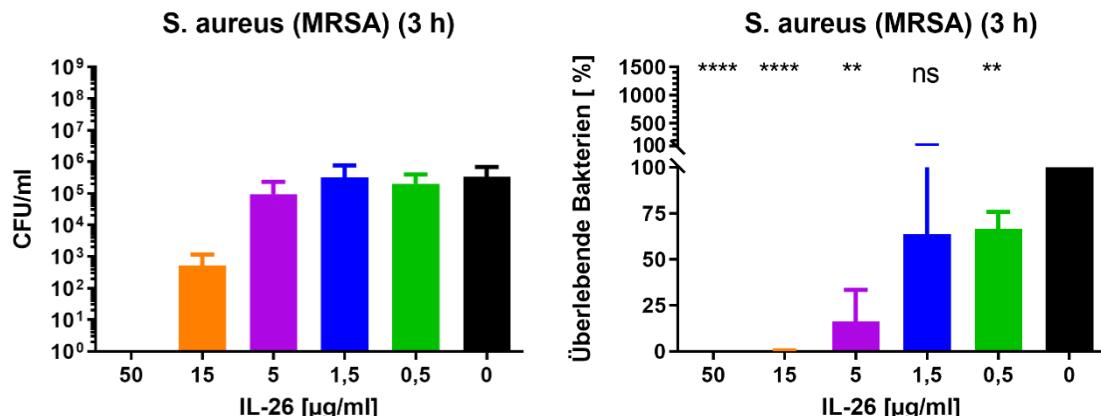


Abb. 31: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für den MRSA-Stamm ATCC 33593 drei Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Die Ergebnisse für eine vierstündige Inkubation mit IL-26 ließen signifikante Reduktionen bei Konzentrationen von 5 µg/ml um 63,6 % und bei 15 µg/ml um das 262-fache (98,6 %) erkennen. Bei 50 µg/ml konnten weiterhin keine lebenden Bakterien mehr nachgewiesen werden (Abb. 32).

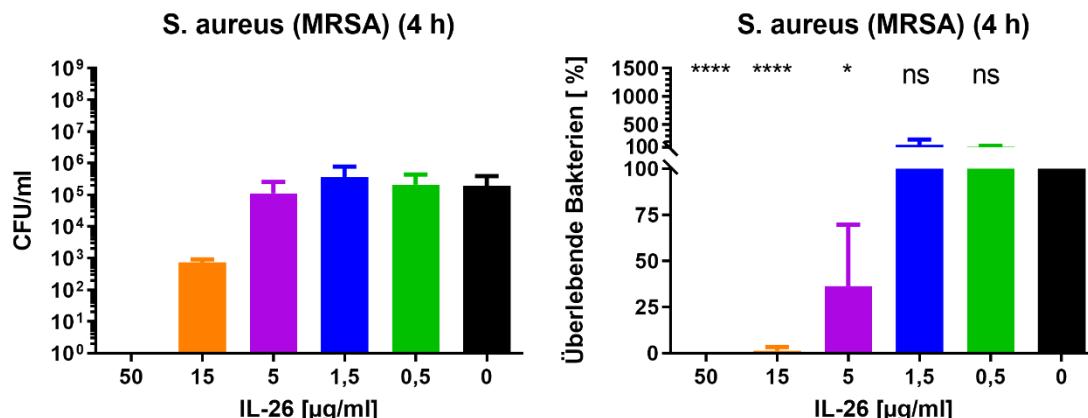


Abb. 32: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für den MRSA-Stamm ATCC 33593 vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

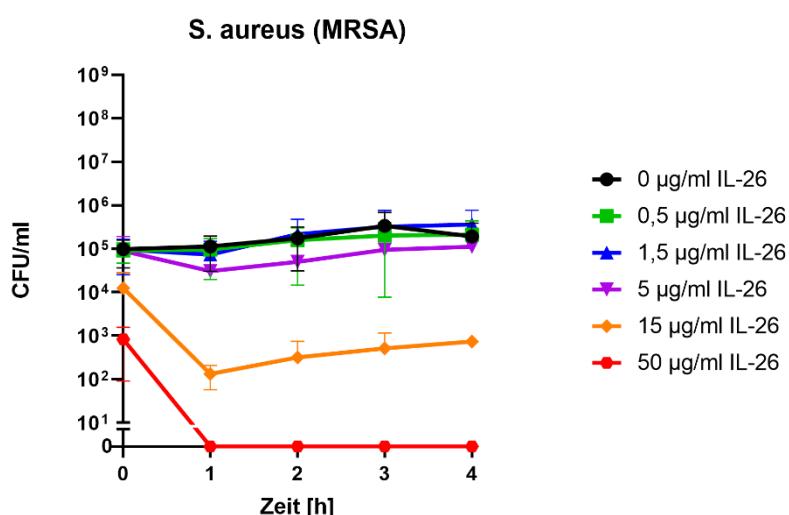


Abb. 33: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für den MRSA-Stamm ATCC 33593 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 10).

Tab. 10: MBK₉₀ Werte für den MRSA-Stamm ATCC 33593 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀				Einheit
	0	1	2	3	4 h
S. aureus (MRSA)	0	1	2	3	
ATCC 33593	38,48	11,51	11,87	11,42	36,20 µg/ml

In dieser Arbeit konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass IL-26 auf unterschiedliche Spezies und Stämme Gram-positiver Bakterien hoch effizient wirkt. Diese Bakterizidie bleibt unabhängig von Antibiotikaresistenzen, da multiresistente Stämme von *S. aureus*, *E. faecalis* und *E. faecium* für IL-26 ähnlich empfindlich und zum Teil sogar empfindlicher waren als normal sensible Stämme der gleichen Spezies.

3.4 Antimikrobielle Aktivität auf Gram-negative Bakterien

Insgesamt wurden sieben Gram-negative Spezies auf Empfindlichkeit gegenüber IL-26 untersucht. Hierbei konnten nur Stämme der Spezies *A. baumannii* als hochsignifikant sensitiv ermittelt werden.

3.4.1 *Acinetobacter baumannii*

Bei der Untersuchung von *A. baumannii* ATCC 19606 konnte zwar eine initiale Reduktion der Keimzahl um 17 % beobachtet werden, diese erwies sich jedoch nicht als signifikant ($p = 0,64$; Abb. 34).

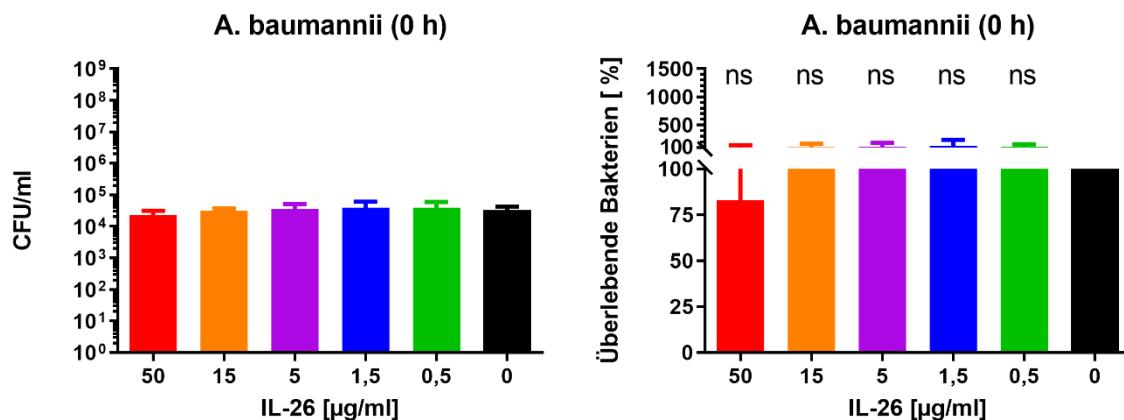


Abb. 34: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *A. baumannii* ATCC 19606 direkt nach Zugabe von IL-26 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Erst nach einer Stunde Inkubation zeigte sich eine signifikante Keimzahlreduktion um das 670-fache (99,8 %) bei einer Konzentration von 50 µg/ml (Abb. 35), die auch bei weiterer Inkubation stabil blieb (um Faktor 167 (99,5 %) nach zwei, um Faktor 405 (99,9 %) nach drei und um Faktor 185 (99,7 %) nach vier Stunden (Abb. 36). Für 15 µg/ml zeigte sich nach vier Stunden ebenfalls eine Reduktion um 50 %, die jedoch nicht ausreichend signifikant war (Abb. 36).

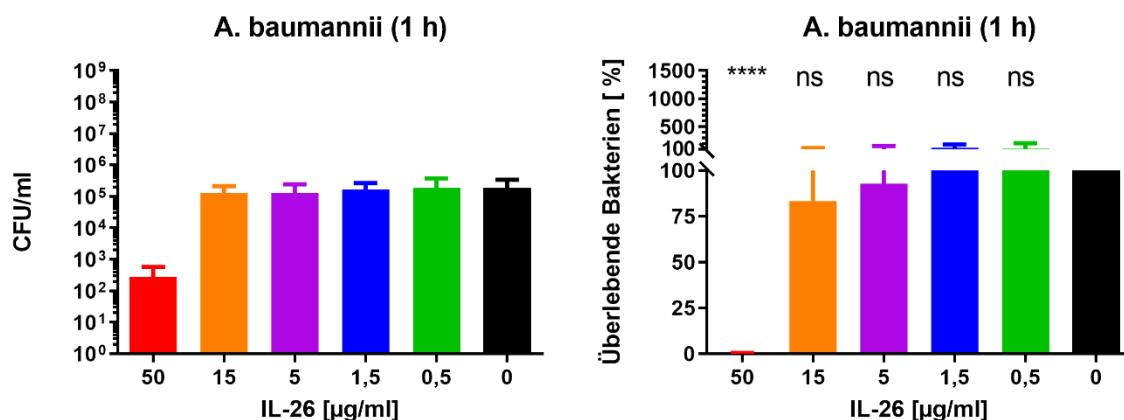


Abb. 35: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden für *A. baumannii* ATCC 19606 eine Stunde nach Zugabe von IL-26 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

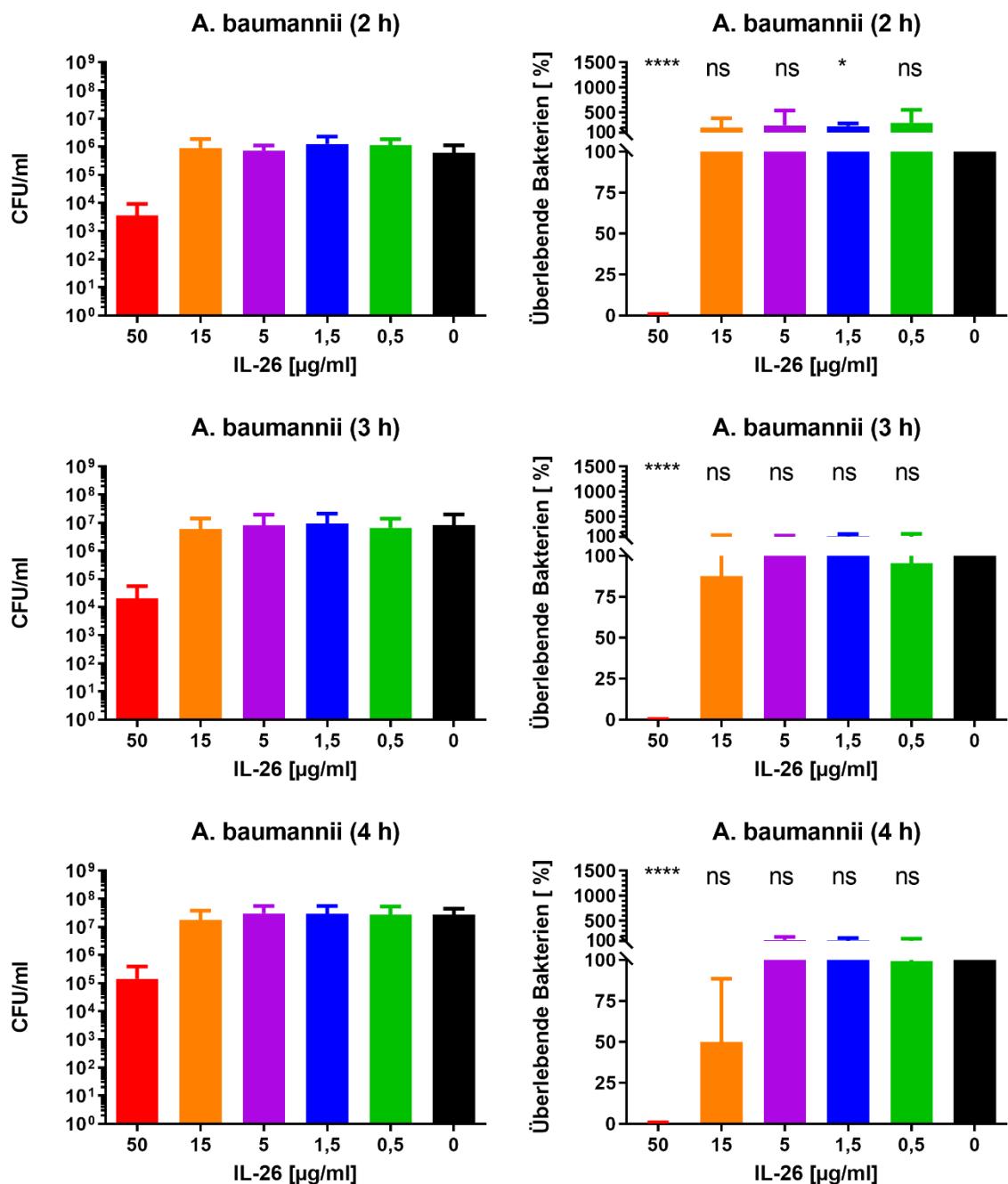


Abb. 36: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *A. baumannii* ATCC 19606 zwei, drei bzw. vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

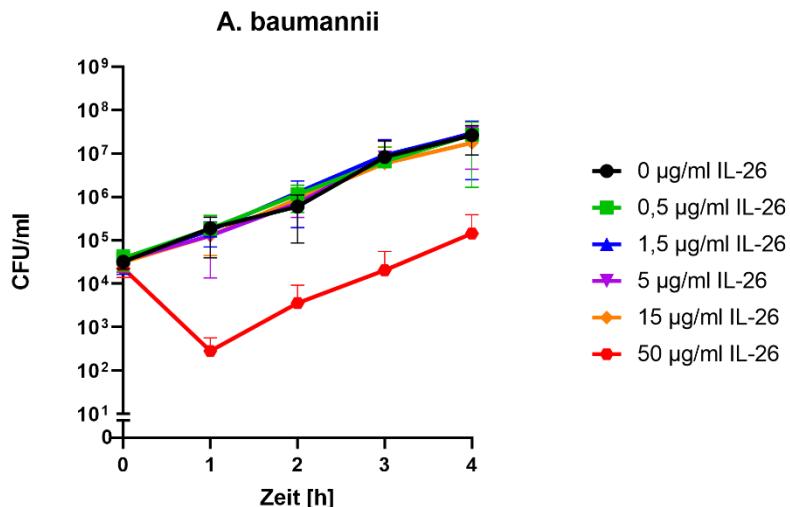


Abb. 37: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *A. baumannii* ATCC 19606 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 11).

Tab. 11: MBK₉₀ Werte für *A. baumannii* ATCC 19606 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀					Einheit
	0	1	2	3	4 h	
<i>A. baumannii</i>	0	1	2	3	4 h	
ATCC 11775	149,40	46,12	48,42	46,21	43,36	µg/ml

3.4.2 Multiresistente *Acinetobacter-baumannii*-Isolat von 2014

Nachdem für den Typstamm von *A. baumannii* eine IL-26-Empfindlichkeit nachgewiesen werden konnte, wurde die gleiche Untersuchung mit einem multiresistenten 4MRGN-*A.-baumannii*-Stamm (resistant gegen: Imipenem, Meropenem, Ciprofloxacin, Amikacin, Gentamicin, Tobramycin, Cotrimoxazol; sensitiv auf: Colistin) durchgeführt, der 2014 bei einem lokalen, nosokomialen Ausbruch am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, isoliert werden konnte.

Ein signifikant messbarer Effekt, eine Reduktion der Keimzahl um 99,4 %, konnte hierbei wie auch bei Antibiotika-sensitiven Stamm erst nach einstündiger Inkubation und nur bei hohen IL-26 Konzentrationen (50 µg/ml) nachgewiesen werden (Abb. 38).

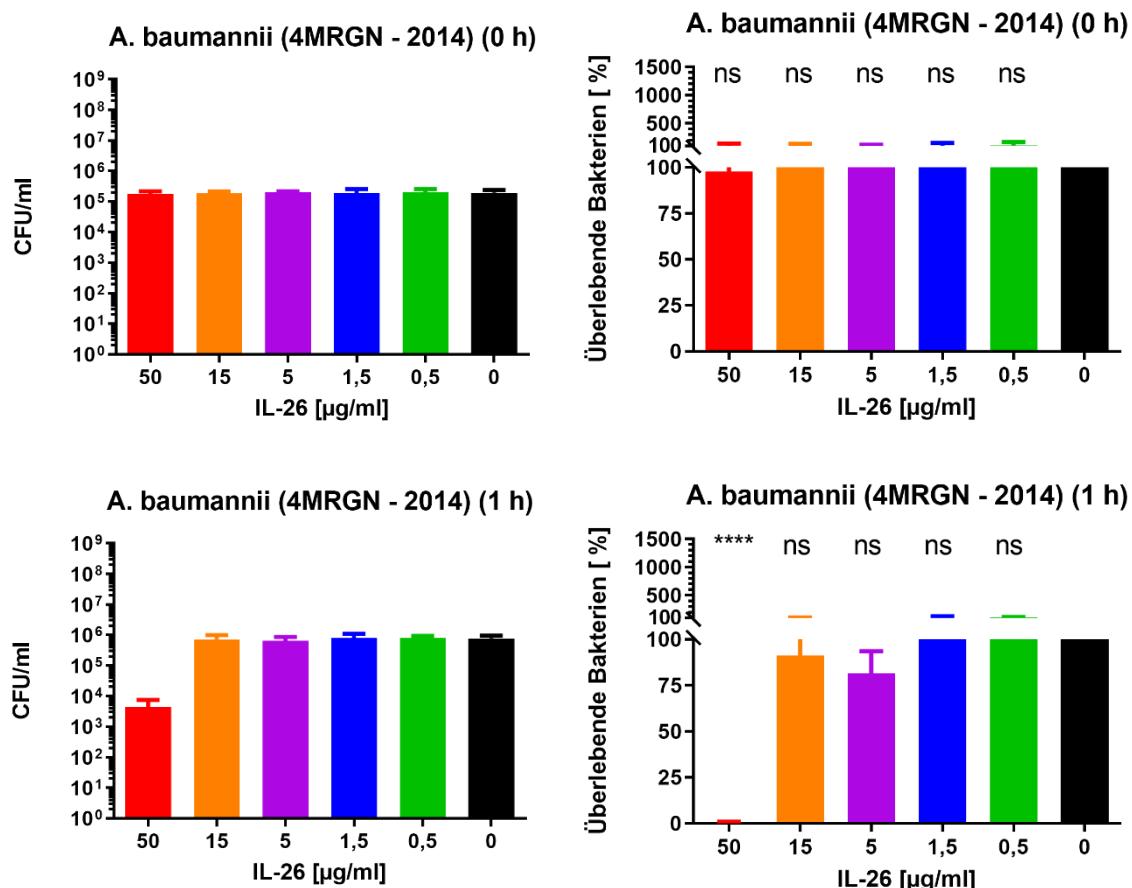


Abb. 38: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für das 2014 gewonnenen Patientenisolat eines 4MRGN *A. baumannii* direkt und eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Dieses Ergebnis konnte auch im weiteren Inkubationsverlauf gezeigt werden. So ergaben die Messungen für IL-26 Konzentrationen von 50 µg/ml nach zwei Stunden eine Reduktion um 99,3 % und nach drei und vier Stunden von 99,7 % (Abb. 39). Eine vollständige Eradikation wurde allerdings wie auch beim Antibiotika-sensiblen Stamm nicht erreicht (Abb. 39).

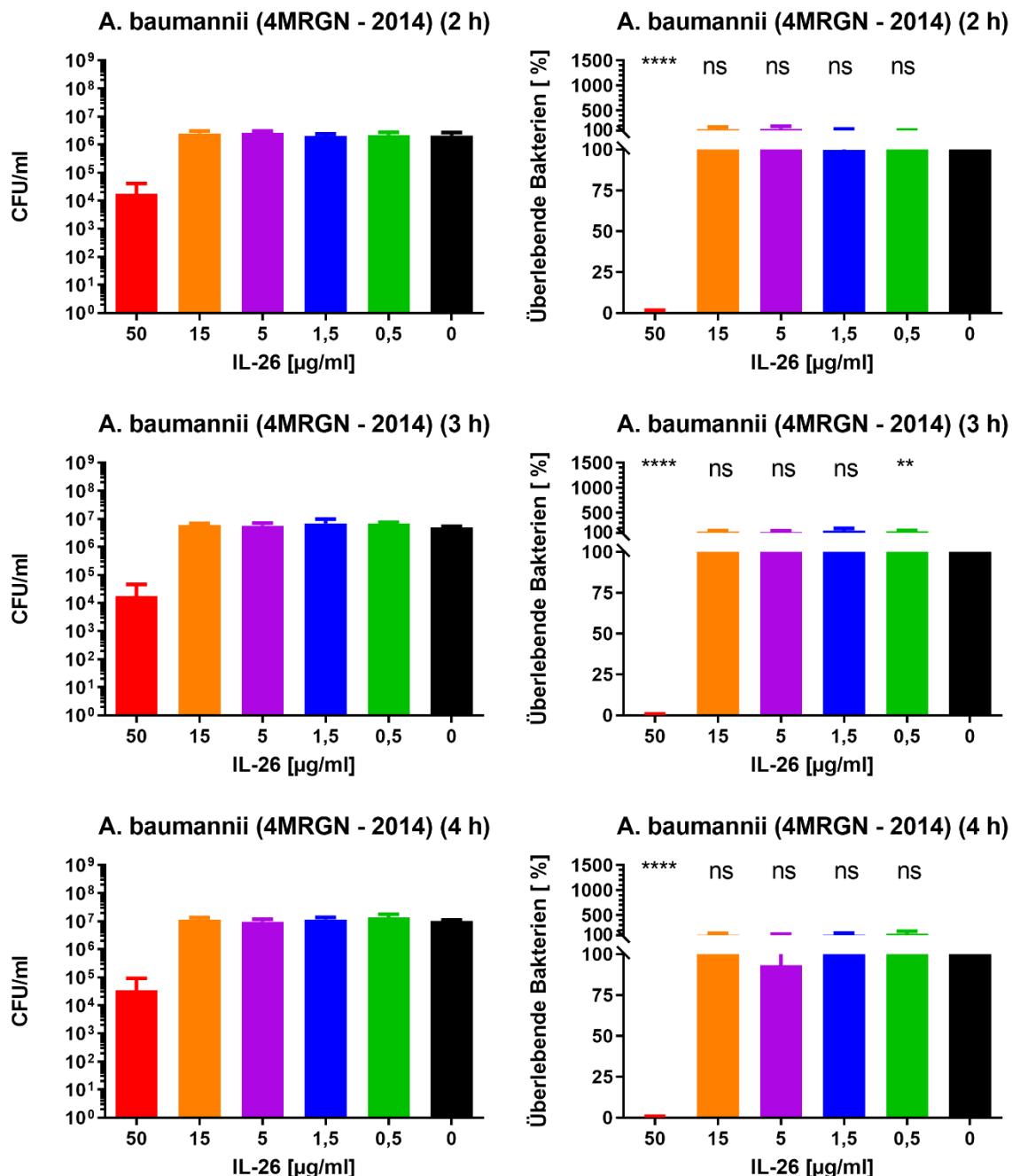


Abb. 39: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für das 2014 gewonnen Patientenisolat eines 4MRGN *A. baumannii* zwei, drei und vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

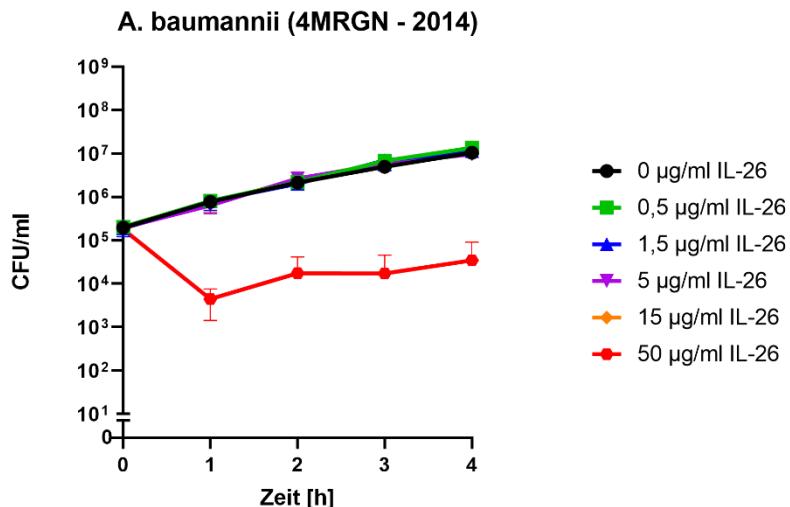


Abb. 40: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für das 2014 gewonnenen Patientenisolat eines 4MRGN *A. baumannii* ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab.12).

Tab. 12: MBK₉₀ Werte für das 2014 gewonnene 4MRGN-*A. baumannii*-Patientenisolat in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀				Einheit
	0	1	2	3	4 h
<i>A. baumannii</i> (4MRGN)	0	1	2	3	
Patientenisolat 2014	832,1	47,15	47,90	48,18	49,97 µg/ml

3.4.3 Multiresistente *Acinetobacter-baumannii*-Isolat von 2018

Ein multiresistenter 4MRGN-*A.-baumannii*-Isolat eines Patienten mit vorherigem Klinikaufenthalt in einer Hochprävalenzregion aus dem Jahr 2018 wurde ebenfalls auf Empfindlichkeit gegenüber IL-26 geprüft. Bereits direkt nach Zugabe des IL-26 zeigte sich eine signifikante Reduktion um 31,7 % bei 50 µg/ml ($p = 0,0015$), weitere allerdings nichtsignifikante Reduktionen waren bei 0,5 µg/ml, 5 µg/ml und 15 µg/ml ($p = 0,3; 0,11; 0,13$) nachweisbar. Nach einer Stunde lag bei 50 µg/ml eine hochsignifikante Keimzahl-Reduktion um 98,7 % und nach zwei Stunden um 99,4 % vor (Abb. 41).

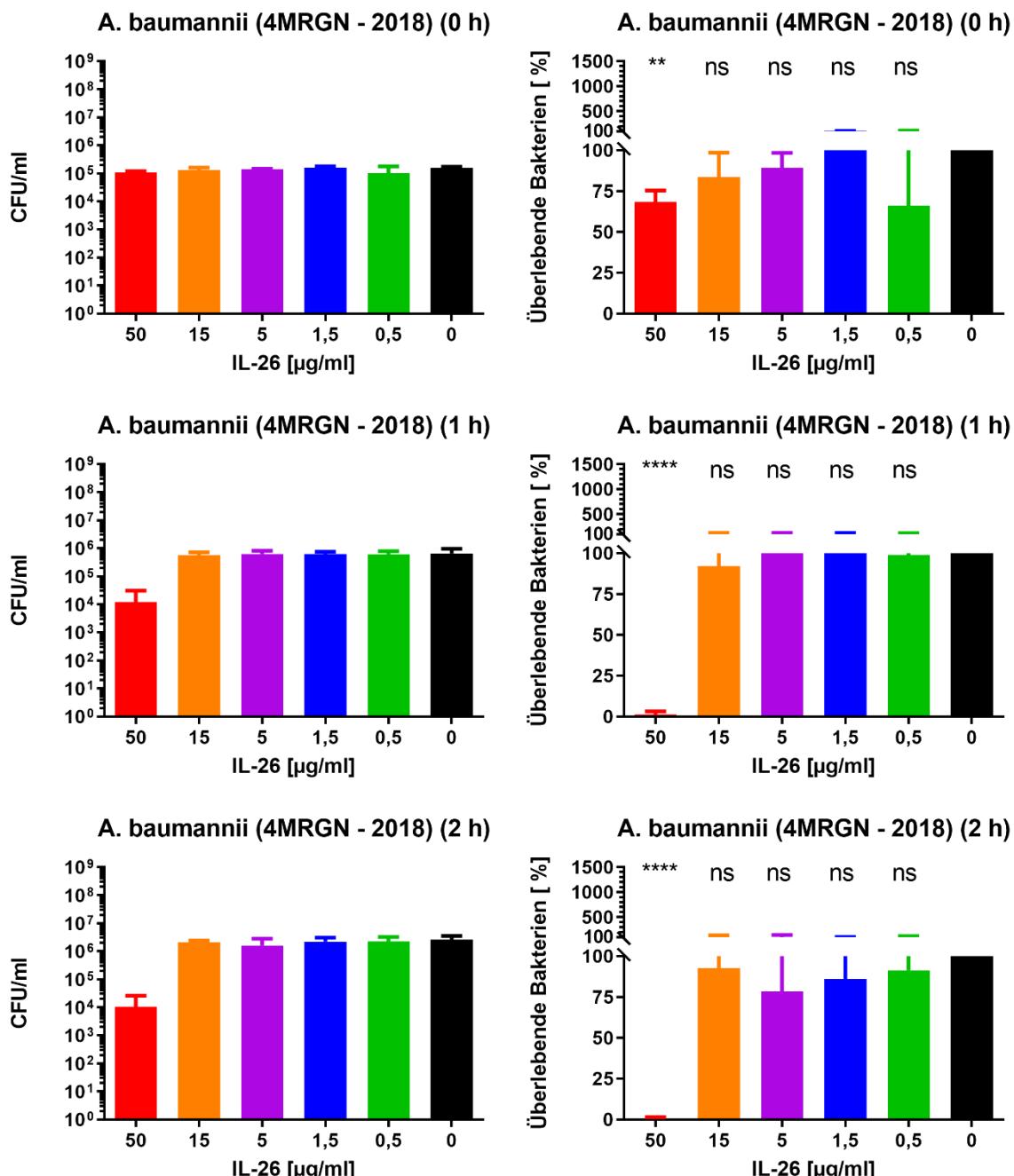


Abb. 41: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für das 2018 gewonnen Patientenisolat eines *A. baumannii* direkt und ein und zwei nach Zugabe von IL-26 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach drei- und vierstündiger Inkubation war der Effekt bei höchster getesteter Konzentration (50 µg/ml) weiterhin als Reduktion um 99,8 % (3 h) bzw. 99,6 % (4 h) feststellbar (Abb. 42).

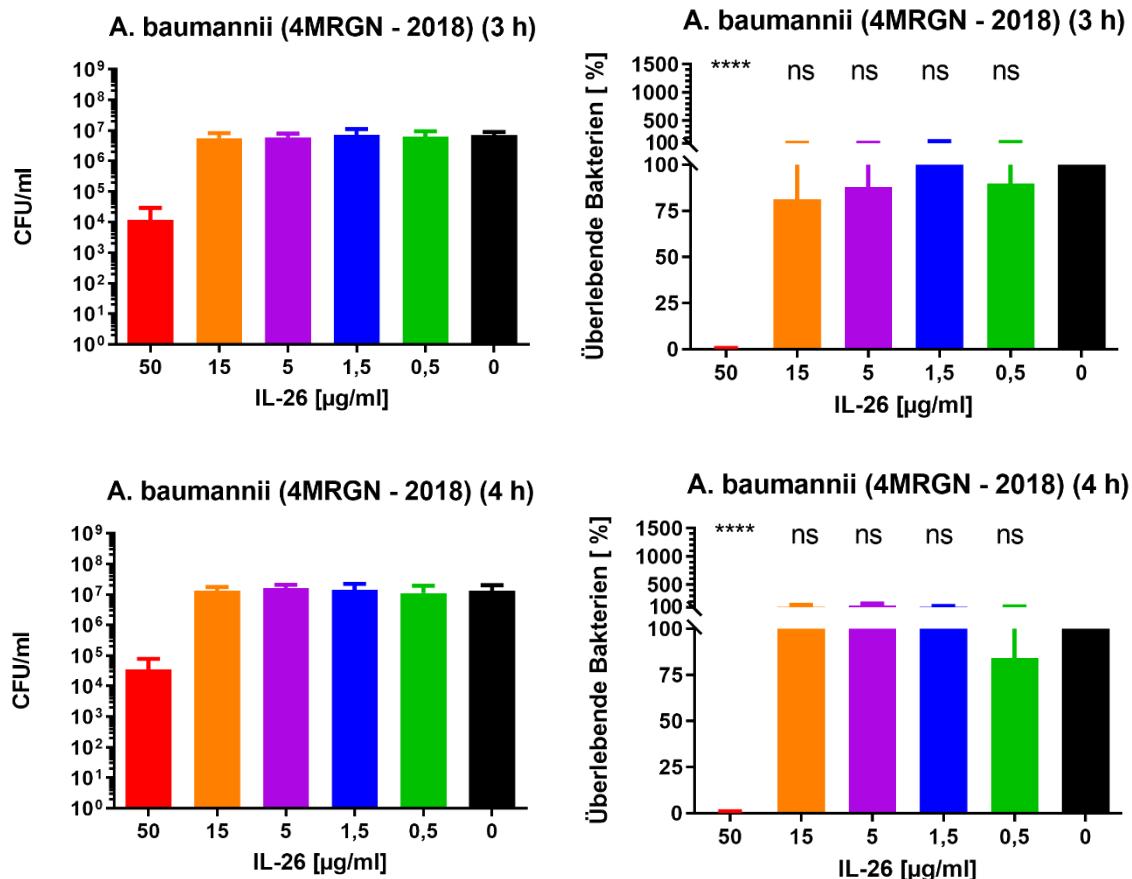


Abb. 42: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für das 2018 gewonnenen Patientenisolat eines 4MRGN *A. baumannii* drei und vier nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

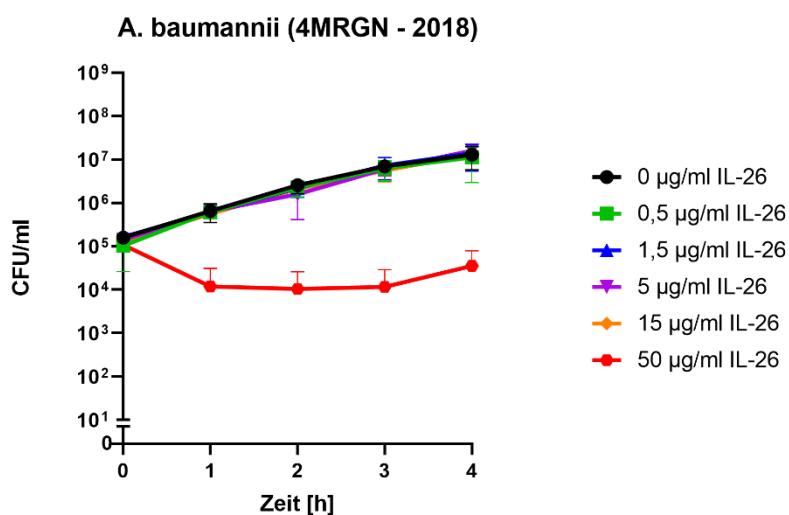


Abb. 43: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für das 2018 gewonnenen Patientenisolat eines 4MRGN *A. baumannii* (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 13).

Tab. 13: MBK₉₀ Werte für das 2018 gewonnene 4MRGN-*A.-baumannii*-Patientenisolat in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀				Einheit
	0	1	2	3	4 h
<i>A. baumannii</i> (4MRGN)	0	1	2	3	
Patientenisolat 2018	142,3	47,46	47,96	46,02	48,32 µg/ml

3.4.4 *Escherichia coli*

Für *E. coli* ATCC 11775 konnten keine signifikanten Keimzahlreduktionen beobachtet werden, deren mikrobiologische Erklärung über Artefakte hinausgehen würde. Die (schwach) signifikante Reduktion ($p = 0,016$) bei 0,5 µg/ml IL-26 direkt nach Zugabe entspricht einer absoluten Abnahme um das 1,3-fache von 1×10^6 auf $7,7 \times 10^5$, ist also mikrobiologisch wohl nicht von Bedeutung. Ähnliches gilt für die schwach signifikante Reduktion nach zwei Stunden ($6,4 \times 10^7$ auf $4,1 \times 10^7$; $p = 0,016$; Abb. 44).

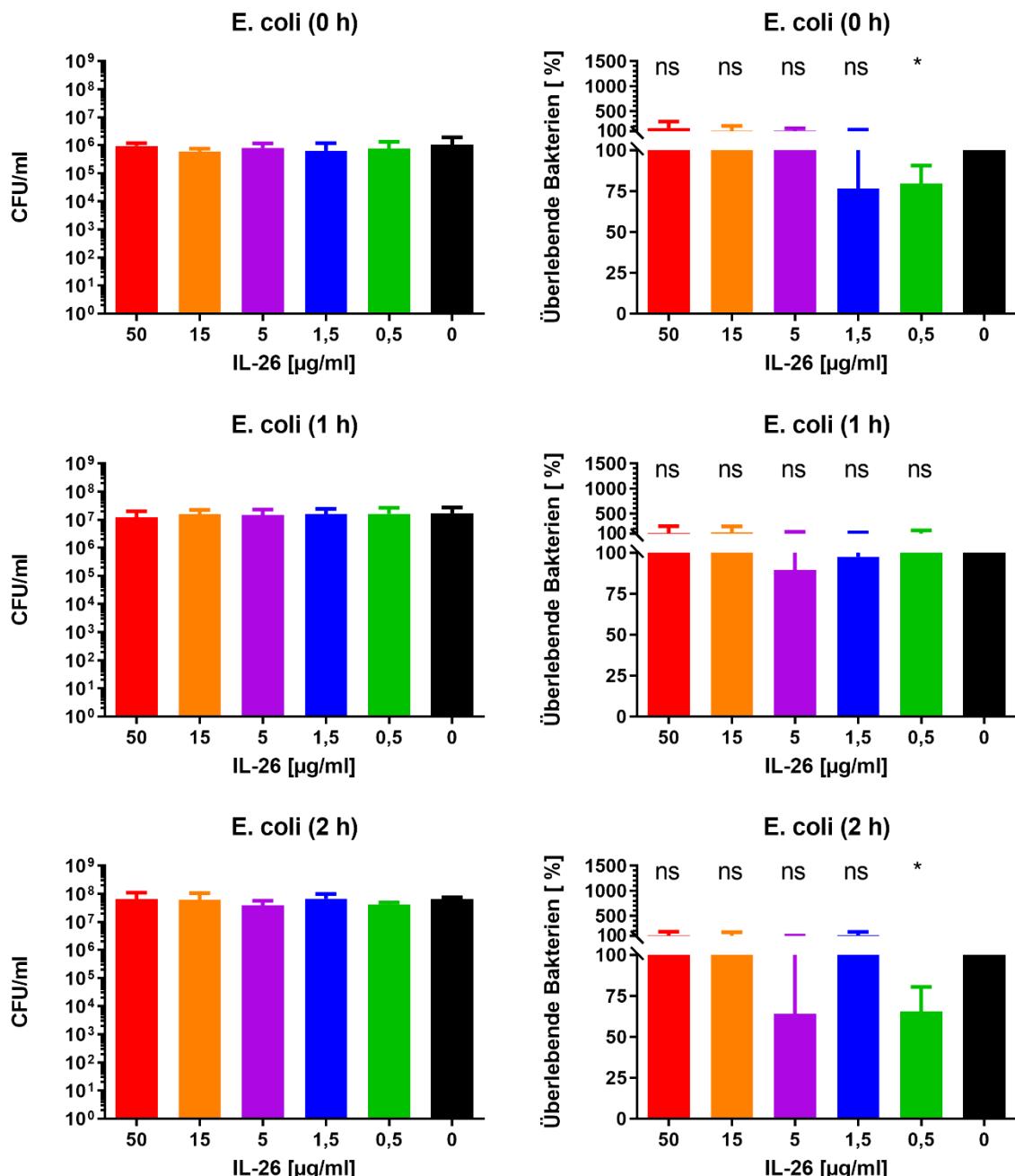


Abb. 44: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. coli* ATCC 11775 direkt nach bzw. eine und zwei Stunden nach Zugabe von IL-26. (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Die Reduktionen zum Zeitpunkt drei Stunden nach Zugabe des IL-26 bei 1,5 µg/ml und 5 µg/ml entsprechen vergleichsweise wenig aussagekräftigen Reduktionen um Faktor 1,7 ($1,5 \times 10^8$ auf $1,3 \times 10^8$; $p = 0,047$) bei 3 µg/ml und um Faktor 2 ($1,5 \times 10^8$ auf $7,3 \times 10^7$; $p = 0,006$; Abb. 45). Die Tatsache, dass sich dieser Effekt nur bei niedrigen und nicht auch bei höheren Konzentrationen zeigt, unterstreicht vielmehr die Deutung als Artefakt, zumal sich insgesamt auch eine stetige Zunahme der Keimzahl im Laufe der Inkubationszeit zeigte (Abb. 46). Entsprechend wurde hier keine MBK₉₀ ermittelt.

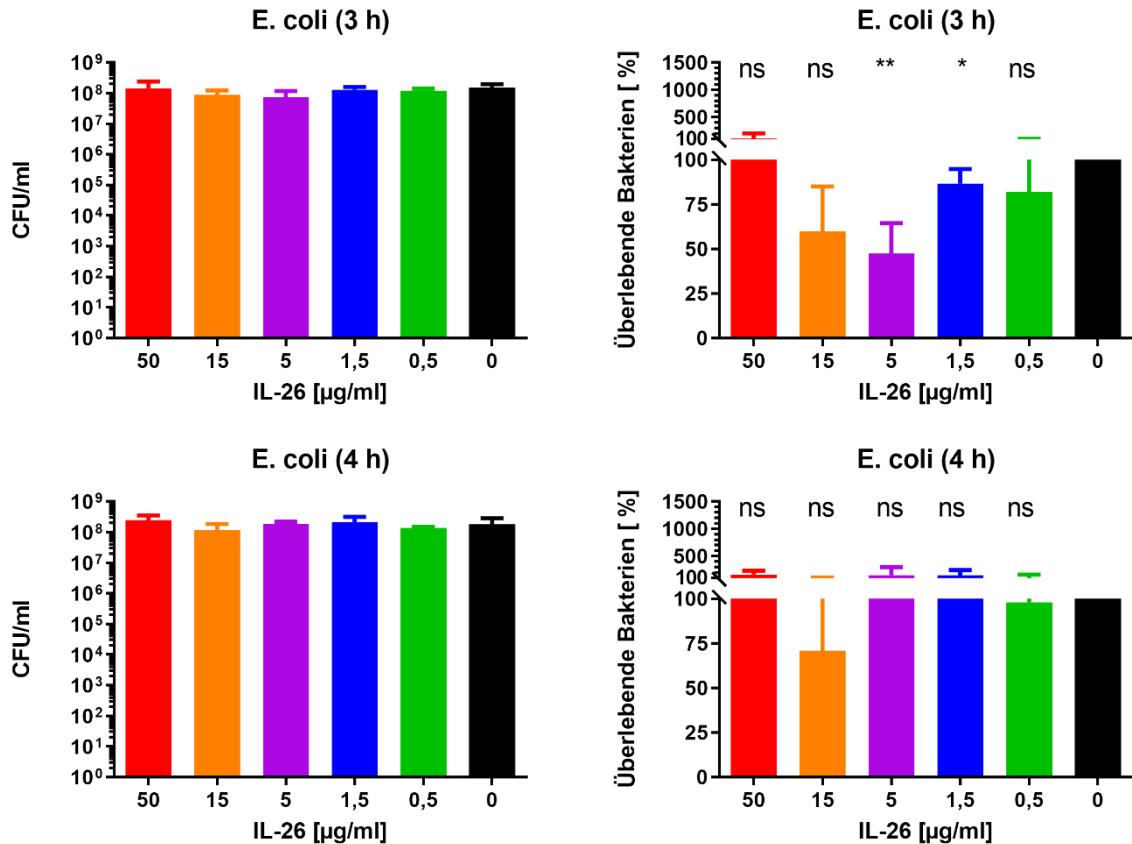


Abb. 45: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. coli* ATCC 11775 drei und vier Stunden nach Zugabe von IL-26 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

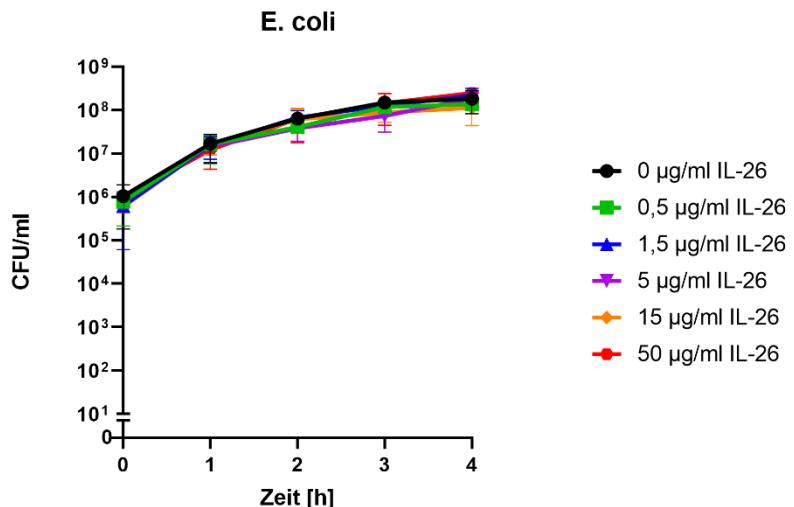


Abb. 46: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *E. coli* ATCC 11775 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

3.4.5 O-Antigen-negativer Stamm von *Escherichia coli*

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen an *A. baumannii* im Vergleich zu den anderen untersuchten Gram-negativen Bakterien wurde nach Literaturrecherche die Hypothese aufgestellt, dass die Empfindlichkeit von *A. baumannii* in nicht vollständig ausgebildetem LPS begründet sein könnte (vgl. 4.2.1; Weber et al., 2016). Sodann wurde ein O-Antigen defizienter Laborstamm von *E. coli*, DH5 α , auf IL-26-Sensibilität getestet, wobei zu keinem Zeitpunkt eine Empfindlichkeit bei Konzentrationen bis 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ festgestellt werden konnte (Abb. 47, Abb. 48). Entsprechend konnte hier keine MBK₉₀ ermittelt werden.

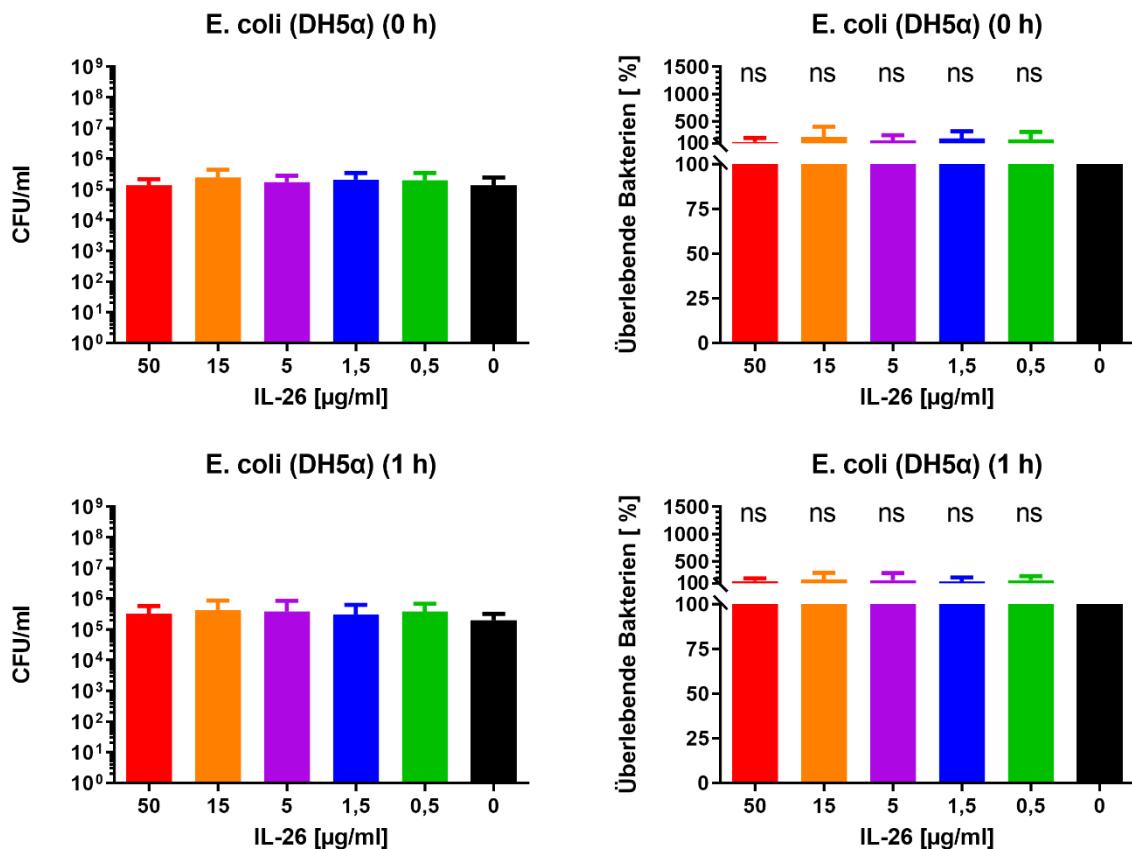


Abb. 47: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. coli* DH5 α direkt und eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

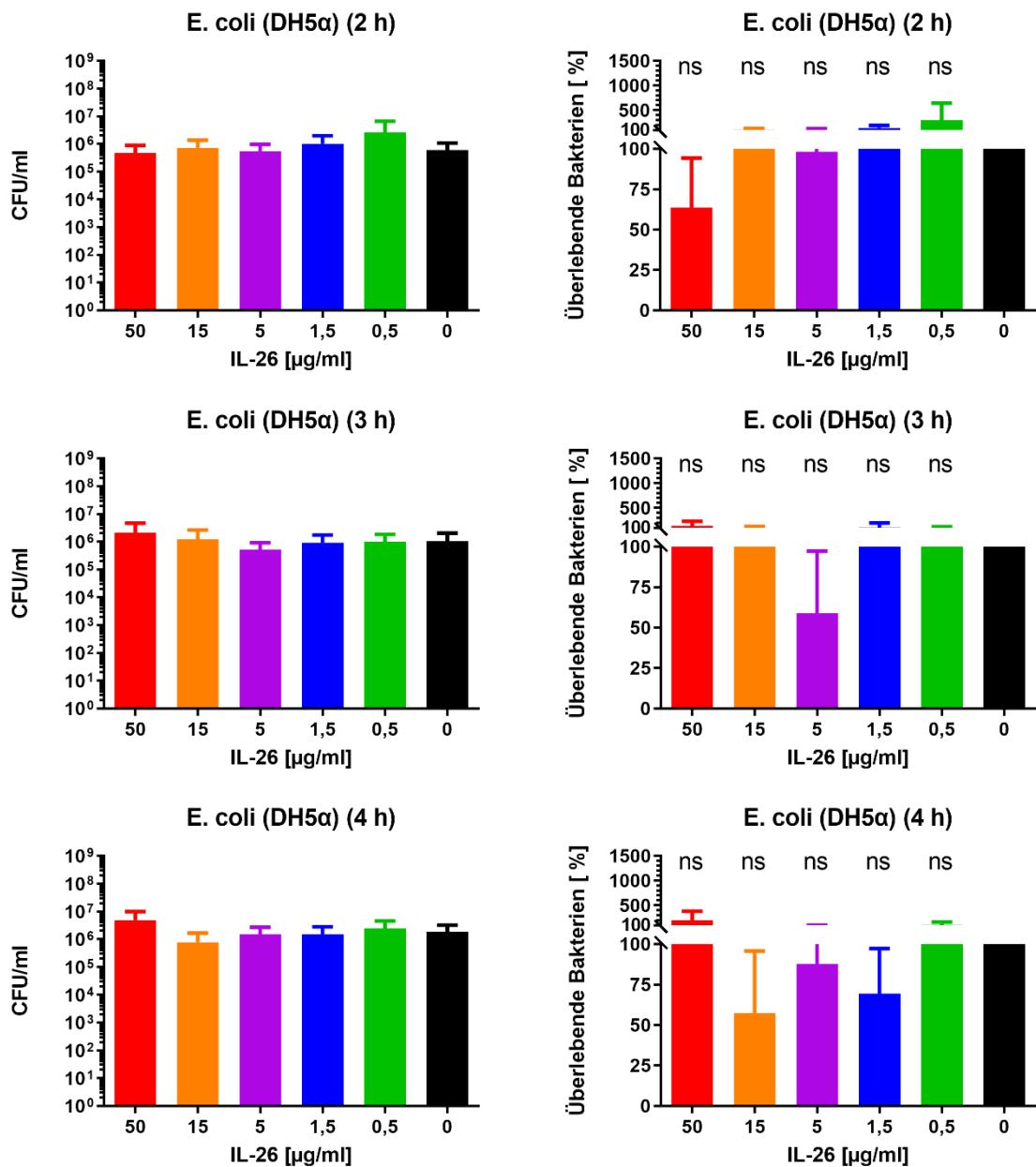


Abb. 48: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *E. coli* DH5α zwei, drei und vier Stunde nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

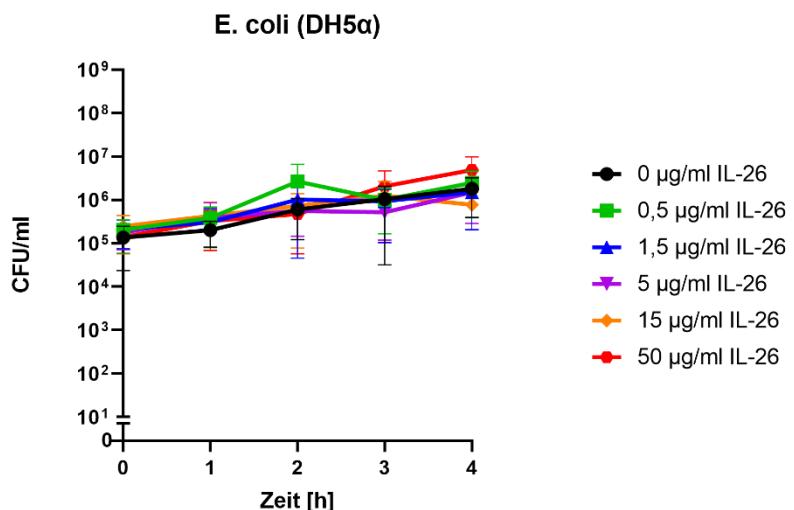


Abb. 49: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *E. coli* DH5α (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

3.4.6 *Klebsiella pneumoniae*

Bei der Untersuchung von *K. pneumoniae* ATCC 4352 zeigten sich ebenfalls zwar signifikante Ergebnisse, die allerdings ähnlich wie bei *E. coli* auf Grund der absoluten Keimzahlreduktion eher als Artefakt als als tatsächlich antibakterieller Effekt des IL-26 zu werten sind. Bei Inkubation über eine Stunde war eine schwach signifikante ($p = 0,026$) Reduktion um Faktor 2 nachweisbar ($1,2 \times 10^6$ auf $5,5 \times 10^5$; Abb. 50). Bei Inkubation über drei Stunden ließen sich rechnerisch signifikante Ergebnisse bei Konzentrationen vom 1,5 µg/ml (Faktor 1,3: $9,2 \times 10^6$ auf $6,4 \times 10^6$, $p = 0,029$), 5 µg/ml (Faktor 1,7: $9,2 \times 10^6$ auf $5,3 \times 10^6$, $p = 0,032$) und 50 µg/ml (Faktor 2,6: $9,2 \times 10^6$ auf $3,5 \times 10^6$, $p = 0,012$), nicht jedoch bei 15 µg/ml ($p = 0,357$; Abb. 51), feststellen. Zu den Zeitpunkten null, zwei und vier Stunden zeigten sich keine signifikanten Reduktionen (Abb. 50, Abb. 51).

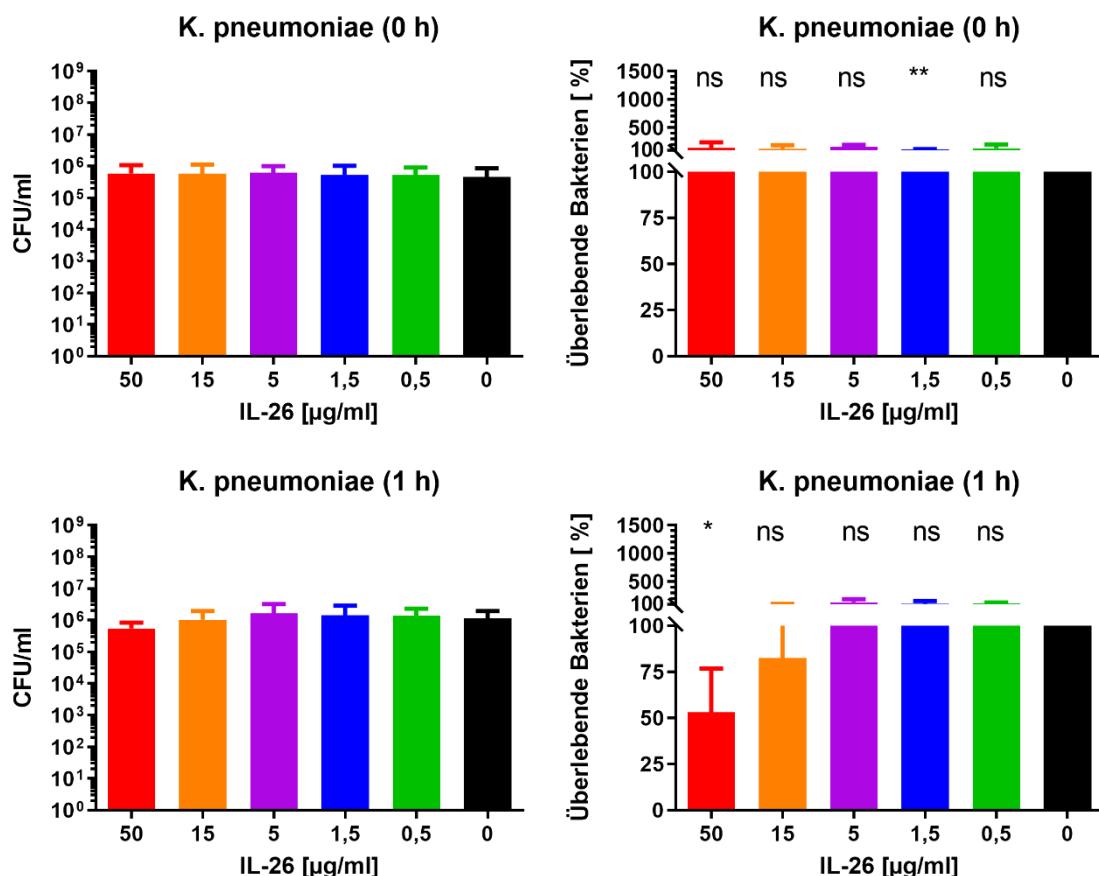


Abb. 50: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *K. pneumoniae* ATCC 4352 direkt und eine Stunde nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

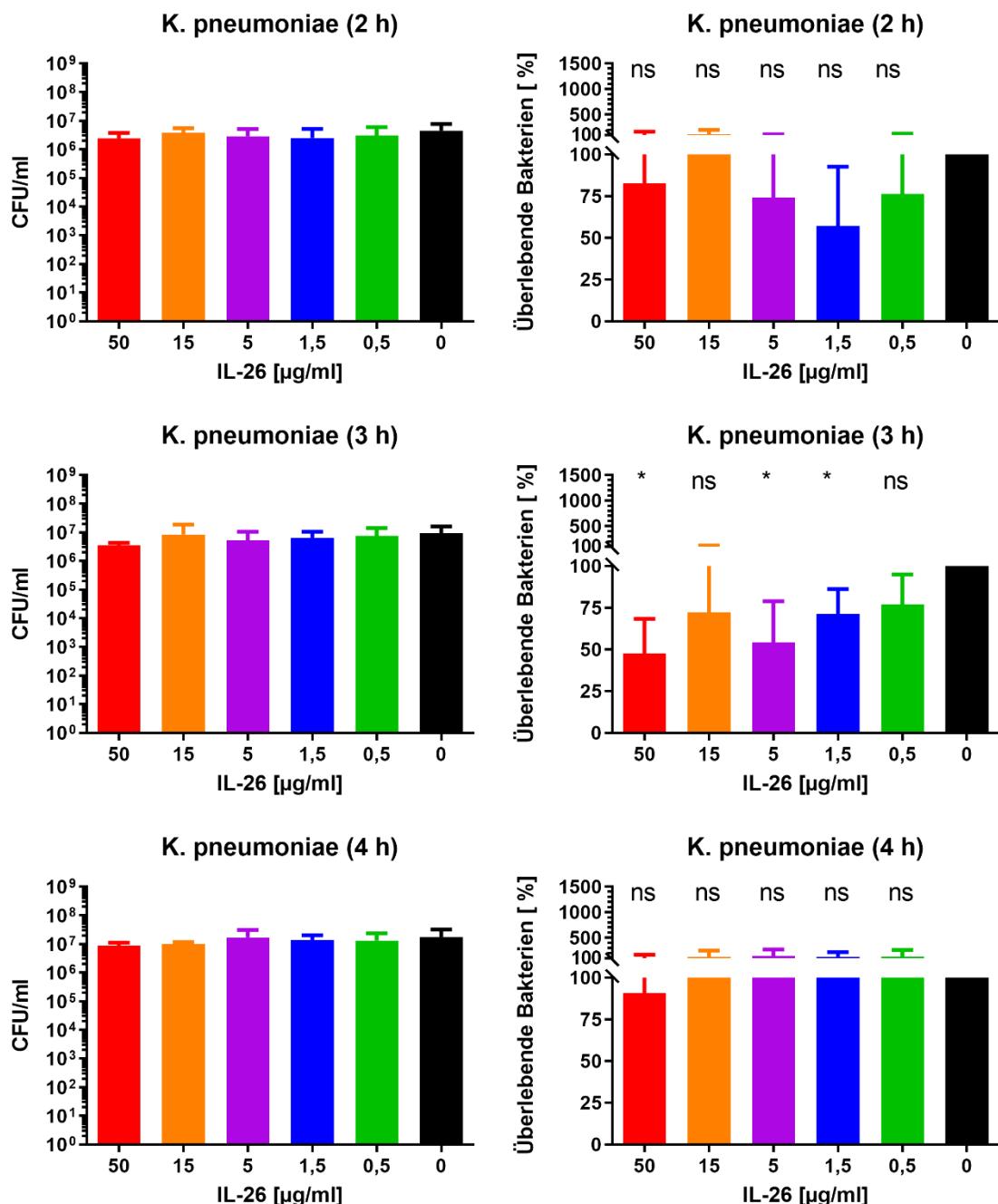


Abb. 51: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *K. pneumoniae* ATCC 4352 zwei, drei und vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

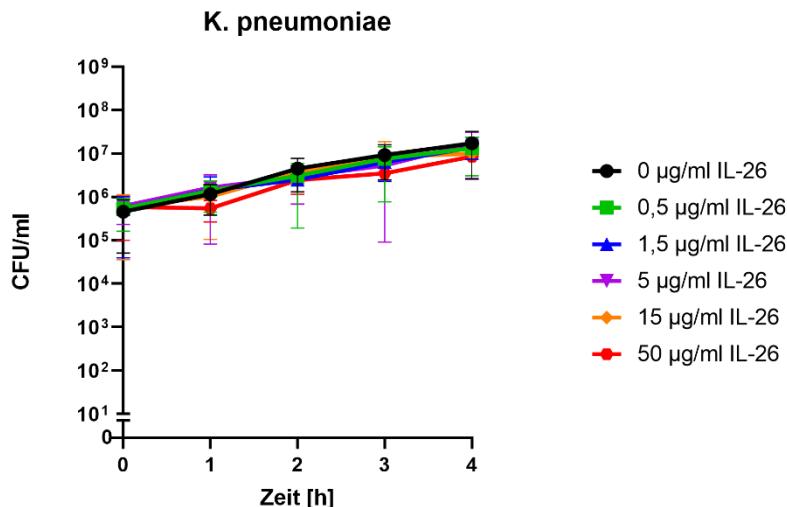


Abb. 52: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *K. pneumoniae* ATCC 4352 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Aus Gründen der Vollständigkeit und zur genaueren Quantifizierung der antibakteriellen Aktivität wurden durch Regressionsanalyse folgende MBK₉₀ Werte ermittelt (Tab. 14). Für den Zeitpunkt „0 h“ kann aufgrund der vollständig ausgebliebenen Reduktion kein Wert ermittelt werden. Die mikrobiologische Aussagekraft der anderen Werte ist aber wie eingangs erwähnt fraglich.

Tab. 14: MBK₉₀ Werte für *K. pneumoniae* ATCC 4352 in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀					Einheit
	0	1	2	3	4 h	
<i>K. pneumonia</i>	0					
ATCC 4352	-	82,83	132,80	106,10	153,30	µg/ml

3.4.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Für *P. aeruginosa* 27853 konnten keine signifikanten Keimzahlreduktionen beobachtet werden (Abb. 53, Abb. 54). Die niedrige absolute Keimzahlreduktion (3 h: bei 15 µg/ml um Faktor 1,39 von $3,3 \times 10^7$ auf $2,4 \times 10^7$ und 4 h: bei 0,5 µg/ml um Faktor 1,3 von $4,9 \times 10^7$ auf $3,7 \times 10^7$; bei 1,5 µg/ml um Faktor 1,4 von $4,9 \times 10^7$ auf $3,5 \times 10^7$ und bei 5 µg/ml um Faktor 1,5 von $4,9 \times 10^7$ auf $3,2 \times 10^7$) spricht in Zusammenshau mit der ferner erneut nicht zu beobachtenden Erhalt der Wirkung bei höheren Konzentrationen für eine nicht vorhandene antimikrobielle Wirkung gegenüber *P. aeruginosa* (Abb. 54). Entsprechend wurde keine MBK₉₀ ermittelt.

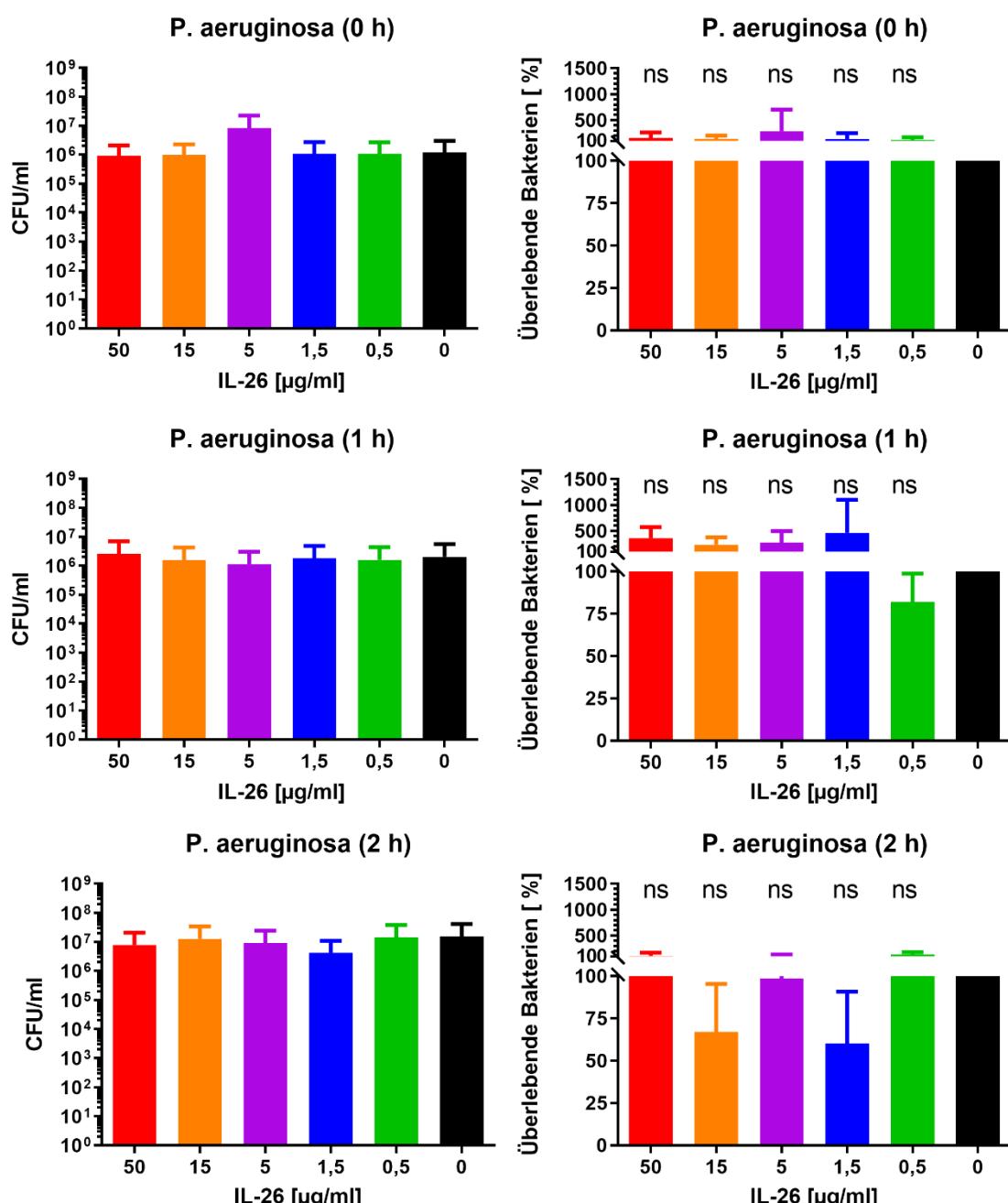


Abb. 53: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *P. aeruginosa* ATCC 27853 direkt und ein bzw. zwei Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

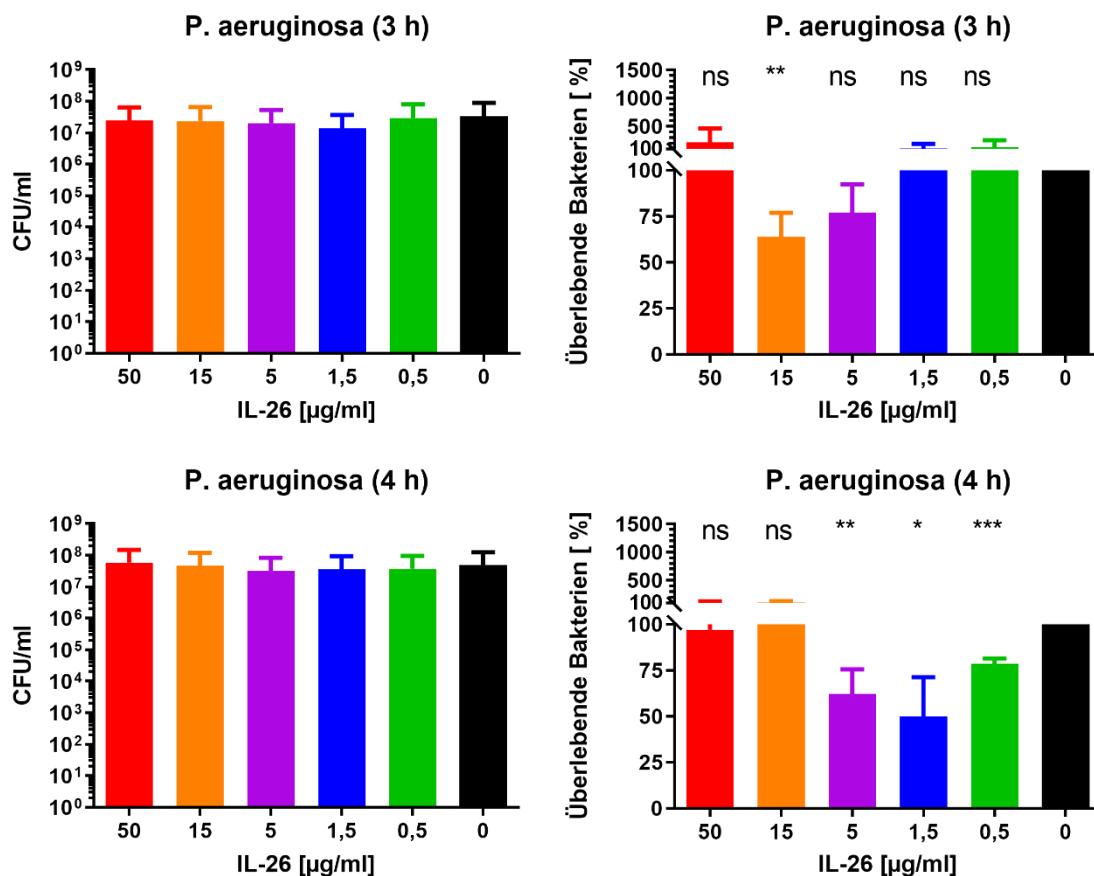


Abb. 54: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Bakterien für *P. aeruginosa* ATCC 27853 drei und vier Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

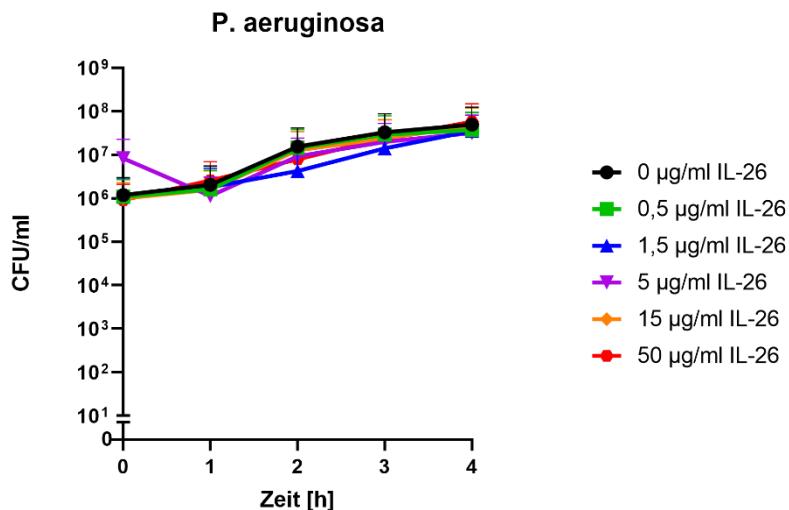


Abb. 55: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *P. aeruginosa* ATCC 27853 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

In dieser Arbeit zeigte IL-26 also auch in Konzentrationen von bis zu 50 µg/ml keine antimikrobielle Wirkung auf *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa*. IL-26 wies jedoch auf *A. baumannii* Stämme unterschiedlicher Antibiotikaresistenzlage eine hoch signifikante Bakterizidie auf, die im zeitlichen Verlauf bei 50 µg/ml IL-26 zu einer nahezu vollständigen Eradikation der Bakterien führte.

3.5 Antimikrobielle Wirkung auf *Candida albicans*

Ergänzend zur Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von IL-26, sollte IL-26 auf eine mögliche Fungizidie gegenüber *C. albicans* ATCC 24433 getestet werden. Bei der Auswertung der Ergebnisse war zunächst eine im zeitlichen Verlauf durchgängige Reduktion der Keimzahl sowohl bei allen Konzentrationen von IL-26 und als auch in der Negativkontrolle festzustellen (Abb. 59). In den Proben, die direkt nach Zugabe des IL-26 entnommen wurden, zeigte sich keine konzentrationsabhängige Reduktion der Zahl koloniebildender Einheiten. Nach einer Stunde Inkubation war zwar eine Abnahme der Keimzahl um 29 % nachweisbar, diese war jedoch aufgrund der Streuung der entsprechenden Ergebnisse nicht signifikant ($p = 0,12$; Abb. 56).

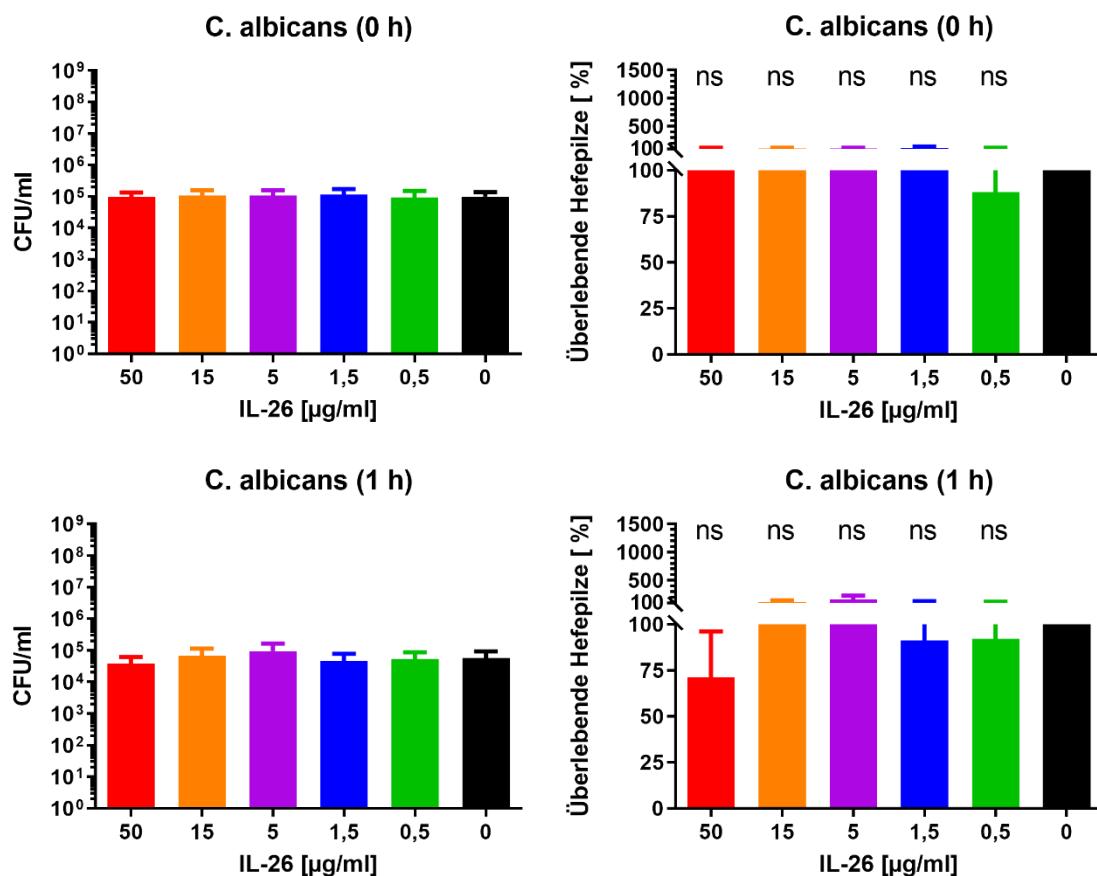


Abb. 56: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Hefepilze für *C. albicans* ATCC 24433 direkt und eine Stunde nach Zugabe von IL-26 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Nach zweistündiger Inkubation waren signifikante Reduktionen bei Konzentrationen von 5 µg/ml und 50 µg/ml ermittelbar. Diese lagen aber weit unter denen bei denen bei Gram-positiven Bakterien und *A. baumannii* festgestellten Werten. So lag die Reduktion bei 5 µg/ml bei 31,4 %, entsprechend einer Abnahme von $1,9 \times 10^4$ auf $1,3 \times 10^4$, $p = 0,0014$, bei 50 µg/ml bei 67,5 % ($1,9 \times 10^4$ zu $7,9 \times 10^3$, $p = 0,0006$). Bei 15 µg/ml konnte keine Reduktion nachgewiesen werden. Dieses Signifikanzmuster zeigte sich eine Stunde später weiterhin, allerdings mit reduzierter Signifikanz. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml wurde eine Reduktion von $1,3 \times 10^4$ auf 1×10^4 ($p = 0,0394$) bei 50 µg/ml von $1,3 \times 10^4$ auf $5,2 \times 10^3$ ($p = 0,0015$) erreicht. Bei 15 µg/ml war weiterhin kein Effekt zu ermitteln (Abb. 57).

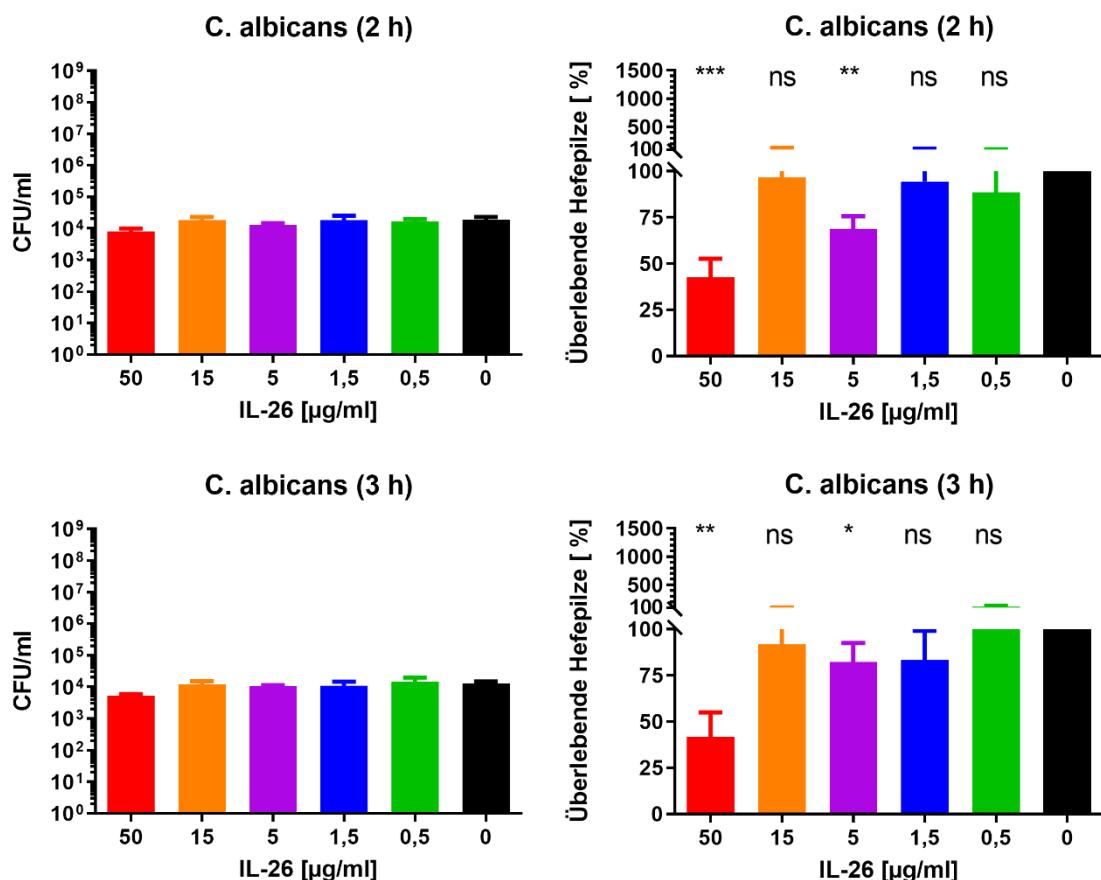


Abb. 57: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Hefepilze für *C. albicans* ATCC 24433 zwei und drei Stunden nach Zugabe von IL-26 (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Bei vierstündiger Inkubation zeigten sich Abnahmen der Koloniezahl bei Konzentrationen von 5 µg/ml, 15 µg/ml und 50 µg/ml, wobei nur die beiden letztgenannten über eine vergleichsweise mäßige Signifikanz verfügen. So ergab sich bei 15 µg/ml eine Reduktion von 1×10^4 auf $4,7 \times 10^3$ (50,3 %, $p = 0,0041$) und bei 50 µg/ml eine Abnahme von 1×10^4 auf $1,7 \times 10^3$ (78,5 %, $p = 0,0025$; Abb. 58).

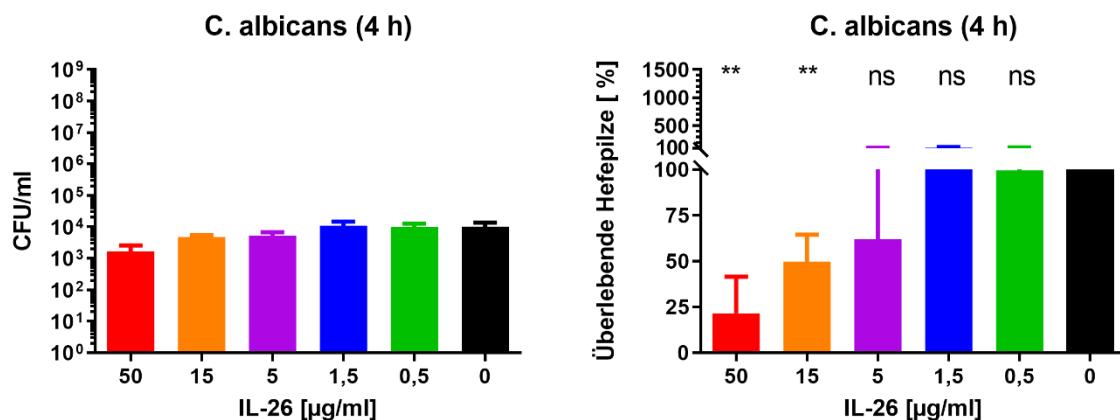


Abb. 58: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) und prozentuale Angabe der überlebenden Hefepilze für *C. albicans* ATCC 24433 vier Stunden nach Zugabe von IL-26 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

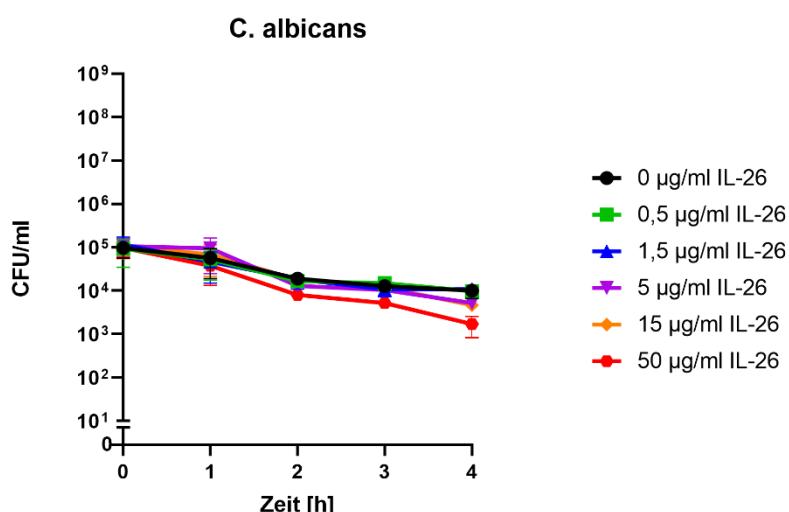


Abb. 59: Zahl koloniebildender Einheiten (CFU/ml) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für verschiedene Konzentrationen von IL-26 für *C. albicans* ATCC 24433 ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung).

Trotz der unklaren Aussagekraft der oben genannten Ergebnisse wurden MFK₉₀ Werte durch lineare Regression ermittelt (Tab. 15).

Tab. 15: MFK₉₀ Werte für *C. albicans* ATCC 24433 µg/ml IL-26.

Spezies	MFK ₉₀				Einheit
<i>C. albicans</i>	0	1	2	3	4 h
ATCC 24433	–	–	81,41	77,77	54,74 µg/ml

Also konnte so für *C. albicans* eine signifikante, aber schwache Fungizidie für IL-26 ab 15 µg/ml bei vierstündiger Inkubation bzw. 50 µg/ml bei mindestens zweistündiger Inkubation nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Bei IL-26 handelt es sich um ein stark kationisches, proinflammatorisches T-Zell-Zytokin (Hör et al., 2004; Knappe et al., 2000), für das unter anderem eine vermehrte Expression bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie Morbus Crohn (Dambacher et al., 2009; Fujii et al., 2017), Colitis ulcerosa (Fujii et al., 2017), Rheumatoide Arthritis (Corvaisier et al., 2012), Spondyloarthritiden (Heftdal et al., 2017), mit antinukleären zytoplasmatischen Antikörpern assoziierter Vaskulitis (Poli et al., 2017), Psoriasis (Meller et al., 2015), kindlichem Asthma (Korradsen et al., 2016), Hepatitis B (Luo et al., 2020) und Hepatitis C (Miot et al., 2014) beschrieben wurden.

Ferner weist IL-26 virostatiche Eigenschaften gegenüber dem Cytomegalovirus (Braum et al., 2013) und dem Hepatitis-C-Virus (Beaumont et al., 2021; Miot et al., 2014) auf. Ein gegenteiliger Effekt, also eine proreplikative Wirkung, zeigte sich für das Virus der Vesikulären Stomatitis (Braum et al., 2013). Im Rahmen von Untersuchungen bezüglich der DNA-Bindungseigenschaften von IL-26 wurden erstmals bakteriostatische Effekte auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien beschrieben (Meller et al., 2015). In dieser Veröffentlichung wurden die antibakteriellen Aktivitäten von IL-26 allerdings ausschließlich als minimale Hemmkonzentration für 50 % (MHK_{50}) bei ausgewählten Typstämmen dargestellt. Dieses Kriterium unterscheidet aber nicht zwischen Wachstumshemmung und Abtötung. Außerdem ist die Schwelle von 50 % sehr niedrig angesetzt, so dass es nicht den für Antibiotika üblichen Dimensionen entspricht. Deshalb wurden hier die Wirkstoffkonzentrationen für eine 90-prozentige Bakterizidie oder Fungizidie (MBK_{90} oder MFK_{90}) bestimmt und somit die antibakterielle Aktivität von IL-26 unter klar definierten Kultur- und Umgebungsbedingungen auf verschiedene Gram-positive und -negative Bakterien mit antibiotikasensitivem oder multiresistentem Phänotyp und auf *C. albicans* quantifiziert.

Da IL-26 Schwankungen der Umgebungsbedingungen wenig toleriert, ist die Herstellung des rekombinanten IL-26 erschwert. Das Originalprotokoll zur Herstellung von IL-26 wurde in mehrstufigen Versuchen überarbeitet und optimiert, so dass der Verlust durch Präzipitation während der Dialyse minimiert werden konnte. Dadurch konnten deutlich größere Mengen deutlich höher konzentrierter IL-26-Lösungen isoliert werden, die in ihrer Aktivität auf humane IL-26R-positive Zelllinien und auch antimikrobiell mindestens genauso aktiv sind wie das nach der ursprünglichen Methode produzierte IL-26. Erst durch diese Optimierung wurden die hier berichteten Experimente möglich.

4.1 Bakterizidie durch IL-26 auf Gram-positive Bakterien

Bei Inkubation der getesteten Gram-positiven Bakterien mit 50 µg/ml IL-26 zeigte sich durchweg eine stark bakterizide Aktivität, die mit Ausnahme von *S. aureus* ATCC 6538, zu einer sofortigen, signifikanten Reduktion der Zahl koloniebildender Einheiten und nach nur einstündiger Inkubation zu einer nahezu vollständigen Eradikation führte. Bei Inkubation mit einer Konzentration von 15 µg/ml über mindestens eine Stunde waren hochsignifikante Reduktionen auf weniger als 20 % im Vergleich zur Negativkontrolle nachweisbar, bei zweistündiger Inkubation von *E. faecium* ATCC 6057 wurde auch schon bei 15 µg/ml IL-26 eine komplett Abtötung aller Bakterien in der Kultur erreicht. Auch der MRSA-Stamm ATCC 33593 war hochsensitiv gegenüber IL-26 mit einer kompletten Eradikation bei 50 µg/ml und einer Reduktion um 99,8 % bei 15 µg/ml IL-26 bei einstündiger Inkubation. Auch wenn er nicht so empfindlich war wie alle anderen getesteten Gram-positiven Stämme, ließ sich auch nach einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 bei *S. aureus* ATCC 6538 eine hochsignifikante Reduktion um 94,6 % feststellen. Effekte bei Konzentrationen von 15 µg/ml IL-26 zeigten sich bei zwei- und dreistündiger Inkubation. Ferner wurden zwei VRE-Spezies untersucht: Bei dem Vancomycin-resistenten *E. faecalis* kam es bereits nach einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 zu einer Reduktion der Zahl koloniebildender Einheiten um 99,6 %, die sich im zeitlichen Verlauf auf eine nahezu komplett Eradikation auf 0,05 % überlebender Bakterien im Vergleich zur Negativkontrolle steigerte. Untersuchungen mit dem Vancomycin-resistenten *E. faecium* DSM 17050 ergaben eine noch stärkere Empfindlichkeit gegenüber IL-26. Schon nach einstündiger Inkubation waren keine lebenden Bakterien mehr in der Kultur nachweisbar, die mit 50 µg/ml IL-26 inkubiert wurde. Auch bei Konzentrationen von 15 µg/ml war eine nahezu vollständige Eradikation feststellbar.

In Hinblick auf die MBK₉₀ konnte für die Gram-positiven Spezies gezeigt werden, dass die MBK₉₀ für die sofortige Wirkung in einem Bereich zwischen 38,5 µg/ml (MRSA ATCC 33593) und 57,5 µg/ml (Vancomycin-resistenter *E. faecalis*) liegt, mit Ausnahme des Methicillin-sensiblen *S. aureus* ATCC 6538 (136,0 µg/ml). Im weiteren zeitlichen Verlauf spalteten sich die MBK₉₀-Werte in zwei Gruppen auf. Für die Gruppe aus *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 6057, Vancomycin-resistentem *E. faecium* ATCC 17050 und MRSA ATCC 33593 lagen sie für ein bis drei Stunden im Mittel bei Werten zwischen 12,5 µg/ml und 13,4 µg/ml. Für vier Stunden lagen sie bei 19,3 µg/ml. In der zweiten Gruppe bestehend aus Vancomycin-resistentem *E. faecalis* und Methicillin-sensiblem *S. aureus* ATCC 6538 lagen die MBK₉₀-Werte für die Zeitpunkte ein bis vier Stunden im Mittel zwischen 43,7 und 45,5 µg/ml (Tab. 16).

Tab. 16: MBK₉₀ Werte für alle untersuchten Gram-positiven Stämme in µg/ml IL-26

Spezies	MBK ₉₀					Einheit
	0	1	2	3	4 h	
<i>E. faecalis</i> , ATCC 29212	45,58	14,16	14,23	14,40	14,51	µg/ml
<i>E. faecalis</i> (VRE)	54,48	40,04	41,59	40,67	42,38	µg/ml
<i>E. faecium</i> , ATCC 6057	46,75	11,72	13,58	13,79	13,41	µg/ml
<i>E. faecium</i> (VRE), DSM 17050	42,84	12,94	14,02	12,75	13,02	µg/ml
<i>S. aureus</i> , ATCC 6538	136,00	47,31	46,19	47,15	48,54	µg/ml
<i>S. aureus</i> (MRSA), ATCC 33593	38,48	11,51	11,87	11,42	36,20	µg/ml

Der genaue Wirkmechanismus bleibt derzeit ungeklärt. Wie bei anderen kationischen antimikrobiellen Peptiden (Patel & Akhtar, 2017) erscheint eine direkte Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran mit Porenbildung auch bei IL-26 wahrscheinlich. Bislang ist beschrieben, dass IL-26 auf Grund seiner besonders kationischen Ladung stark an Glykosaminoglykanen auf den Oberflächen eukaryonter Zellen (Hör et al., 2004) sowie an LPS und Lipoteichonsäuren auf bakteriellen Oberflächen bindet (Meller et al., 2015). Anhand einzelner elektronenmikroskopischer Aufnahmen von *P. aeruginosa* ATCC 27853 und *M. tuberculosis* H37Rv wurde beschrieben, dass IL-26 zur Bildung von Zellmembranbläschen mit anschließender Membranruptur führt (Hawerkamp et al., 2020; Meller et al., 2015). Ferner wurde durch konfokale Mikroskopie gezeigt, dass sich IL-26 an die Oberfläche von *M. leprae* anlagert und dies zu einer Volumenzunahme der Bakterien, passend zu einer osmotischen Lyse, führt (Dang et al., 2019). Auch wenn dies derzeit eine führende Hypothese zum bakteriziden Wirkmechanismus von IL-26 darstellt, muss sie mit Vorsicht interpretiert werden, da sich genau der elektronenmikroskopisch begutachtete *P. aeruginosa* Stamm in der vorliegenden Arbeit und einer weiteren Publikation (Scala et al., 2019) als unempfindlich gegenüber IL-26 dargestellt hat.

4.2 Bakterizidie durch IL-26 auf spezifische Gram-negative Spezies

Mit Ausnahme von *A. baumannii* zeigten die untersuchten Gram-negativen Spezies keine Sensibilität gegenüber IL-26. Bei *E. coli* lag zwar eine signifikante Reduktion der Keimzahl vor, aber nur direkt nach Zugabe von IL-26 und nur bei 0,5 µg/ml IL-26. Bei höheren Konzentrationen konnte zum selben Zeitpunkt keine Wirkung nachgewiesen werden. Da dies nicht plausibel zu erklären ist, ist hier von einem Artefakt auszugehen. Dasselbe gilt für die Reduktion bei dreistündiger Inkubation, die nur bei Konzentrationen von 1,5 µg/ml und 5 µg/ml zu finden war. Ferner erscheinen die Ergebnisse bei Betrachtung der absoluten Keimzahlreduktionen geringfügig: Bei der maximalen Reduktion von *E. coli* handelte es sich um eine Abnahme von $2,9 \times 10^8$ auf $1,5 \times 10^8$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter. Dies ist im Vergleich zu den Ergebnissen bei den Gram-positiven Erregern, bei denen Reduktionen größer als 90 % bis zur kompletten Eradikation die Regel waren, wenig.

Ähnliches gilt auch für die Ergebnisse bei der Sensibilitätstestung von *K. pneumoniae*. Hier zeigten sich nur bei einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml statistisch schwach signifikante ($p = 0,026$) Reduktionen, die allerdings bei zweistündiger Inkubation nicht mehr zu ermitteln waren. Erst bei Inkubation über drei Stunden wurden schwach signifikante Ergebnisse mit Keimzahlreduktionen bei Konzentrationen von 1,5 µg/ml, 5 µg/ml und 50 µg/ml erzielt, nicht aber bei 15 µg/ml. Im weiteren Verlauf, also bei vierstündiger Inkubation, war dieser Effekt nicht mehr zu sehen. Auch hier kann auf Grund des unbeständigen und schwachen Effektes und der ausbleibenden Wirkung bei anderen Konzentrationen von Artefakten ausgegangen werden.

Bei der Untersuchung von *P. aeruginosa* zeigten sich schwach bis mäßig signifikante Ergebnisse, die mit der gleichen Argumentation, wie bei den zuletzt genannten Gram-negativen Stämmen, nur als Artefakt unklarer Genese zu deuten sind: Bei dreistündiger Inkubation mit 15 µg/ml IL-26 war eine Reduktion von $3,3 \times 10^7$ auf $2,4 \times 10^7$ koloniebildende Einheiten pro Milliliter feststellbar, die bei höheren Konzentrationen nicht mehr nachzuweisen war. Wurde die Inkubation eine Stunde länger durchgeführt, zeigten sich signifikante Reduktionen bei 0,5 µg/ml, 1,5 µg/ml und 5 µg/ml, nicht jedoch bei 15 µg/ml und 50 µg/ml IL-26.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass IL-26 in Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 50 µg/ml keine antimikrobielle Wirkung auf *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* hat.

4.2.1 Bakterizidie durch IL-26 auf *Acinetobacter baumannii*

Im Vergleich zu den Ergebnissen oben genannter Gram-negativer Spezies zeigte aber *A. baumannii* ATCC 19606 ein gänzlich anderes Verhalten: Auch wenn im Gegensatz zu den meisten Gram-positiven Stämmen keine sofortige bakterizide Wirkung detektiert werden konnte, war bereits nach einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 eine hochsignifikante Keimzahlreduktion um 99,8 % nachweisbar. Diese nahezu vollständige Bakterizidie blieb im weiteren Zeitverlauf konstant. Nach diesen überraschenden Ergebnissen wurden multiresistente *A. baumannii* Stämme auf ihre Empfindlichkeit untersucht. Sowohl der bei einem lokalen Ausbruch am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, gewonnene Stamm, als auch ein 2018 von einem Patienten mit vorherigem Klinikaufenthalt in einer Hochprävalenzregion isolierter Stamm, zeigten ähnliche Eigenschaften. So wurde bei dem Isolat aus dem Jahr 2014 nach einstündiger Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 eine Reduktion um 99,4 % erzielt, die auch im weiteren Verlauf konstant blieb. Bei dem im Jahr 2018 gewonnenen Stamm konnte sogar eine initiale Reduktion der Keimzahl um 31,7 % bei Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 festgestellt werden, die sich im weiteren Verlauf auf 99,8 % steigerte.

Es konnte also gezeigt werden, dass IL-26 bakterizid auf *A. baumannii* Stämme unterschiedlicher Antibiotikaresistenzlage wirkt. Die Wirkung ist insbesondere in der Anfangsphase schwächer ausgeprägt als bei Gram-positiven Bakterien, führt aber im Verlauf bei Konzentrationen von 50 µg/ml IL-26 zu einer nahezu vollständigen Abtötung der Bakterien.

Tab. 17: MBK₉₀ Werte für alle untersuchten *A. baumannii* Stämme in µg/ml IL-26.

Spezies	MBK ₉₀					Einheit
	0	1	2	3	4 h	
<i>A. baumannii</i> , ATCC 11775	149,40	46,12	48,42	46,21	43,36	µg/ml
<i>A. baumannii</i> (4MRGN), 2014	832,10	47,15	47,90	48,18	49,97	µg/ml
<i>A. baumannii</i> (4MRGN), 2018	142,30	47,46	47,96	46,02	48,32	µg/ml
Mittelwert	374,60	46,91	48,09	46,80	47,22	µg/ml

Diese Ergebnisse warfen mehrere Fragen auf: Zum einen stellte sich die Frage, warum IL-26 keinen Effekt auf die meisten der hier getesteten Gram-negativen Spezies hat, und zum anderen, was der für die Sensibilität entscheidende Faktor bei *A. baumannii* ist. Sowohl das LPS als Ganzes, aber vor allem die äußerste Polysaccharidkette, das O-Antigen, werden in der Literatur als natürlicher Schutzfaktor Gram-negativer Bakterien gegenüber kationischen AMP genannt (Joo et al., 2016; Silhavy et al., 2010). *Acinetobacter spp.* hingegen verfügt über keine O-Antigen-Ligase-Aktivität, sodass *A. baumannii* kein vollständiges LPS, sondern nur Lipooligosaccharide ohne O-Antigene produziert. Vor allem bleibt der Lipooligosaccharid-Kern, das Oligosaccharid Lipid A, übrig, das ebenfalls Schutz vor antimikrobiellen Substanzen bietet (Weber et al., 2016). Zusammenfassend ließe sich also schlussfolgern, dass das O-Antigen auf der Oberfläche der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ursächlich für die Resistenz gegenüber IL-26 ist. Das Lipid A ist möglicherweise verantwortlich dafür, dass die Wirkung von IL-26 auf *A. baumannii* geringer ist als auf Gram-positive Bakterien. Zur Klärung dieser Hypothese wurde der Laborstamm DH5α von *E. coli* verwendet, der auf dem K12-Stamm basiert und keine vollständigen O-Antigene produzieren kann (Liu & Reeves, 1994; Ghosh et al., 2006). Bei Untersuchungen mit diesem Stamm konnte allerdings keine Empfindlichkeit gegenüber IL-26 bei bis zu 50 µg/ml IL-26 nachgewiesen werden.

Da sich die O-Antigene bzw. die verkürzten Reste dieser Lipooligosaccharide von *E. coli* K12 und *Acinetobacter spp.* aber in Aufbau und Ausprägung der verbleibenden O-Antigenbestandteile unterscheiden, bleibt die abschließende Klärung noch offen, ob die O-Antigene in der IL-26-Resistenz Gram-negativer Bakterien eine tragende Rolle haben und bei *E. coli* DH5α möglicherweise noch eine gewisse Restaktivität besteht.

4.3 Schwache Fungizidie durch IL-26 auf *Candida albicans*

Mit Hinblick auf die antibakteriellen Eigenschaften von IL-26 wurden auch Experimente hinsichtlich antimykotischer Effekte gegenüber *C. albicans* ATCC 24433 durchgeführt. Hierbei ließ sich feststellen, dass es unabhängig von IL-26 zu einer stetigen Abnahme der Zahl koloniebildender Einheiten kam. Bei zweistündiger Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 zeigte sich eine im Vergleich zur Negativkontrolle stärkere Reduktion auf 32,5 % der Negativkontrolle. Dieser Effekt blieb im weiteren Inkubationsverlauf konstant. Nach vier Stunden zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle bei 50 µg/ml eine um 78,5 %, bei 15 µg/ml eine um 50,3 % reduzierte Koloniezahl. Auch wenn sich diese Ergebnisse von denen für Gram-positive Bakterien bzw. *A. baumannii* unterscheiden und die Wirksamkeit des IL-26 in Hinblick auf die konstante Abnahme der Zahl koloniebildender Einheiten in allen Ansätzen nur schwer zu beurteilen ist, ist hier eine signifikante, schwache Fungizidie bei Konzentrationen ab 15 µg/ml IL-26 zu beschreiben. Für eine Wirkung spricht auch die für andere kationische AMP wie LL-37 und α- und β-Defensine nachgewiesene zum Teil sehr hohe Wirksamkeit gegenüber *C. albicans* (den Hertog et al., 2005; Edgerton et al., 2000; Joly et al., 2004; Krishnakumari et al., 2008; Swidergall et al., 2014; Vylkova S et al., 2006).

4.4 Antimikrobielle Aktivität von IL-26 im Vergleich mit bisherigen Publikationen

In der initialen Publikation zu antibakteriellen Aktivitäten von IL-26 wurden bakteriostatische Effekte von 5 bis 10 µM IL-26 auf *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 11775, *K. pneumoniae* O1:K2 und *S. aureus* ATCC 6538 beschrieben, während bei *E. faecalis* ATCC 29212 oder *C. albicans* ATCC 24433 keine Wirkung erzielt wurde (Meller et al., 2015).

Dies widerspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, in der in reproduzierten und voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt wurde, dass IL-26 bakterizid auf alle getesteten Gram-positiven Stämme, namentlich *E. faecalis* ATCC 29212, Vancomycin-resistenter *E. faecalis* (Patientenisolat), *E. faecium* ATCC 6057, Vancomycin-resistenter *E. faecium* DSM 17050, *S. aureus* ATCC 6538 und MRSA ATCC 33593 wirkt. Ferner konnte eine Wirkung auf den von Natur aus O-Antigen defizienten Gram-negativen Stamm *A. baumannii* ATCC 19606 sowie zwei multiresistente Patientenisolate von *A. baumannii* nachgewiesen werden. Für *C. albicans* ATCC 24433 konnte nach Inkubation über mindestens zwei Stunden ein signifikanter, schwach fungizider Effekt nachgewiesen werden. Eine Wirkung von IL-26 in Konzentrationen bis 50 µg/ml konnte bei Versuchen mit den LPS-exprimierenden Gram-negativen Stämmen *E. coli* ATCC 11775, *K. pneumoniae* ATCC 4352 und *P. aeruginosa* ATCC 27853, sowie dem O-Antigen defizienten Stamm *E. coli* DH5α im Gegensatz zu der vorherigen Publikation (Meller et al., 2015) sicher ausgeschlossen werden. Dies deckt sich mit einer Publikation in der eine bakteriostatische Wirkung von IL-26 auf *S. aureus* ATCC 6538 nachgewiesen wurde, aber kein

Einfluss auf *P. aeruginosa* ATCC 27853 festgestellt wurde (Scala et al., 2019). Auf dieser Basis sind außerdem die elektronenmikroskopische Darstellung der Lyse von *P. aeruginosa* durch IL-26 sowie die berichteten Tierversuche mit *K. pneumoniae* wenig nachvollziehbar.

Eine weitere Publikation (Agak et al., 2018) untersuchte den Effekt von rekombinantem und von T_H17-Lymphozyten sezerniertem IL-26 auf das anaerobe Bakterium *Cutibacterium acnes* (früher *Propionibacterium acnes*). Dort wurde zwar in Anwesenheit von T_H17-Lymphozyten ein bakterizider Effekt festgestellt, dieser war allerdings nicht auf IL-26 zurückzuführen. Außerdem wurden dort Untersuchungen an *E. coli* und *S. aureus* durchgeführt. Bei 24-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml IL-26 wurden Effekte auf *S. aureus* und *E. coli* nachgewiesen. Diese waren schwächer ausgeprägt, traten später auf und schlossen *E. coli* ein, bei dem die Wirksamkeit von IL-26 in dieser Dissertationsarbeit ausgeschlossen werden konnte. Soforteffekte konnten dort nicht nachgewiesen werden.

Eine weitere Publikation (Woetmann et al., 2018) konnte nachweisen, dass IL-26 bereits in geringen Konzentrationen die Ausbildung von Biofilmen von *S. aureus* besser inhibiert als das AMP LL-37 und in höheren Konzentrationen bakterizid auf *S. aureus* wirkt.

In einer Publikation in der die Wirkung von IL-26 auf Mykobakterien untersucht wurde konnte gezeigt werden, dass IL-26 über verschiedene Mechanismen antibakteriell auf *M. leprae* und *M. tuberculosis* wirkt (Dang et al., 2019). Zum einen wurde für extrazellulär lokalisierte *M. leprae* gezeigt, dass sich IL-26 direkt an die bakterielle Zelloberfläche anlagert und zur osmotischen Zelllyse führt. Außerdem induziert IL-26 nach Aufnahme in mit *M. leprae* und *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen die Autophagie. Diese Annahmen wurden von einer weiteren Arbeit untermauert, in der nach eintägiger Inkubation von *M. tuberculosis* mit IL-26 eine Zellmembranbläschenbildung mit Zelllyse elektronenmikroskopisch beobachtet werden könnte (Hawerkamp et al., 2020).

Für die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse kommen mehrere Aspekte in Betracht. Zum einen arbeitete die erstbeschreibende Arbeitsgruppe (Meller et al., 2015) mit einem IL-26 unklaren Ursprungs, wobei auf Grund der Marktlage nur das Produkt der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) in Frage kommt. Die Arbeitsgruppe um Agak arbeitete nachweislich mit den Produkten der Firma R&D Systems (Agak et al., 2018). Vergangene, vor allem virologische Experimente der eigenen Arbeitsgruppe mit dem IL-26 dieser Firma zeigten deutlich weniger aussagekräftigere, widersprüchliche und schlechter reproduzierbare Ergebnisse als die mit selbstproduziertem IL-26 (Knappe et al., 2000).

Ein weiterer Punkt, der zur unzureichenden Reproduzierbarkeit der Versuche von Meller et al. beitragen könnte, ist die Angabe der IL-26 Konzentrationen als Stoffmengenkonzentration (µM). Auf Grund der Eigenschaft von IL-26 sowohl als Monomer, als auch als Dimer oder

Oligomer aufzutreten (Knappe et al., 2000; Meller et al., 2015) und der fehlenden Angabe, welche Form in den Untersuchungen der fremden Arbeitsgruppe verwendet wurde, lässt sich dies nur schwerlich vergleichen.

Im Widerspruch zu den Publikationen von Meller et al. und Agak et al. konnten keine Effekte von IL-26 auf die Gram-negativen Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der von anderen Arbeitsgruppen bisher veröffentlichten Literatur wurde in dieser Arbeit aber erstmalig die Bakterizidie von IL-26 gegen sämtliche untersuchten Gram-positive Erreger und gegen *A. baumannii* unterschiedlicher Antibiotikaresistenzlage, sowie die schwache Fungizidie gegen *C. albicans* nachgewiesen, und zwar in standardisierten und mehrfach reproduzierten Experimenten.

4.7 IL-26 im Vergleich mit anderen antimikrobiellen Peptiden

IL-26 ist ein kationisches und amphiphiles Zytokin, womit es zwei wichtige Eigenschaften mit AMP teilt. AMP sind in allen Lebewesen vorkommende Moleküle, die meist durch Porenbildung, Aufhebung der Membranintegrität oder Translokationen innerhalb der Membran eine Lyse bakterieller Zellen herbeiführen können, wobei auch intrazelluläre Mechanismen diskutiert werden. Für den Menschen wichtige AMP sind beispielsweise Defensine und Cathelicidine (Ebbensgaard et al., 2015; Patel & Akhtar, 2017).

Humane Defensine, unterteilt in α - und β -Defensine wirken je nach Subtyp breit gegen eine Vielzahl pathogener Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen und werden von unterschiedlichen Zelltypen, wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Keratinozyten oder Enterozyten exprimiert (Gallo & Hooper, 2012). Ihr Wirkmechanismus auf Bakterien besteht in der Interaktion kationischer Strukturen des Peptids mit den anionischen Phospholipiden, was zu Porenbildung und Zelltlyse führt (Gallo & Hooper, 2012; Kagan et al., 1990), sowie zur Chemotaxis von Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und T-Zellen. Ähnliches gilt für Cathelicidine wie LL-37, deren Produktion durch Mastzellen, Drüsenzellen und Keratinozyten bei Entzündung hochreguliert werden kann. Hier kommt es zum Einbau der kationischen, α -helikalen Peptide in die Membran mit daraus resultierender Zelltlyse. Chemotaktische Funktionen sind ebenfalls bekannt (Gallo & Hooper, 2012). Für diese AMP wurden verschiedene Resistenzmechanismen beschrieben. Beispielhaft sind hier die bakterielle Sekretion von Proteasen wie V8 von Staphylokokken (wirksam gegen LL-37), SpeB von Streptokokken (wirksam gegen LL-37 und β -Defensine) oder die Ompin-Proteasen Gram-negativer Bakterien wie *E. coli*, *Salmonella typhimurium* oder *Yersinia pestis* (wirksam gegen LL-37) zu nennen. Ferner schützen sich Gram-negative Bakterien durch Sekretion von Metalloproteasen. Der Einbau auswärts gerichteter ABC-Transporter dient der Exkretion von intrazellulär aktiven AMP (Joo et al., 2016).

Ein weiterer Faktor Gram-positiver Bakterien ist die Produktion nicht enzymatisch wirksamer Proteine wie der Staphylokinase, die kationische AMP bindet und so zu deren Wirkverlust führt (Bokarewa et al., 2006). Ausbildung von Biofilmen und Kapseln sind ein anderer grundlegender bakterieller Schutzfaktor gegenüber AMP.

In Untersuchungen an *Bacillus subtilis* mit dem AMP LL-37 konnte eine konzentrationsabhängige Resistenz gezeigt werden. So konnten sich die Bakterien bei zweifacher MHK nach einer gewissen Zeit wieder erholen und Membranschäden reparieren. Bei Inkubation bei vierfacher MHK waren diese Reparaturvorgänge nicht mehr möglich (Barns et al., 2016). Ähnliche Effekte konnten auch in dieser Arbeit beispielsweise bei *E. faecalis* ATCC 29212 bei Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 (Abb. 9), *S. aureus* ATCC 33593 bei Inkubation mit 15 µg/ml IL-26 (Abb. 33) sowie bei allen untersuchten *A. baumannii* Stämmen bei Inkubation mit 50 µg/ml IL-26 (Abb. 37; Abb. 40 und Abb. 43) beobachtet werden. Möglicherweise führt aber auch zusätzlich die starke Oberflächenadhärenz zur irreversiblen Bindung des IL-26 an die Bakterienoberfläche, sodass bei niedrigeren Konzentrationen nicht alle Bakterien in Kontakt mit dem Peptid kommen. In Folge können sich die überlebenden Bakterien wieder vermehren.

In Bezug auf Schutzmechanismen auf den Bakterienoberflächen nutzen Gram-positive und -negative Bakterien unterschiedliche Wege: Gram-positive Bakterien bilden in der Zellwand negativ geladene Teichonsäuren aus (Silhavy et al., 2010). Die Aktivierung des *dltABCD*-Operons, das bei Staphylokokken, Streptokokken und der Gattung *Bacillus* vorkommt, führt zur Veresterung der Teichonsäuren mit D-Alanin und somit netto zu einer positiven Ladung der Teichonsäure. Dies führt wiederum zu einer elektrostatischen Abstoßung von kationischen AMP, insbesondere LL-37, HNPs und Polymyxin B (Abi Khattar et al., 2009; Fabretti et al., 2006; Joo et al., 2016; Kovács et al., 2006; Kristian et al., 2005; Peschel et al., 1999; Saar-Dover et al., 2012).

Ähnlich den Gram-positiven Bakterien können auch Gram-negative Bakterien ihr eigentlich negativ geladenes, oberflächliches LPS durch Einbau Aminogruppen-haltiger Moleküle oder Entfernung von Phosphatresten im Lipid A mittels Phosphatasen in Richtung positiver Ladung verschieben (Joo et al., 2016; Moskowitz et al., 2003; Pelletier et al., 2013; Shah et al., 2014). Ein anderer, oben bereits diskutierter Schutzmechanismus Gram-negativer Bakterien ist das O-Antigen, welches den längsten Teil des LPS ausmacht (Joo et al., 2016; Raetz & Whitfield, 2001; Silhavy et al., 2010). Für *Brucella abortus* konnte nachgewiesen werden, dass O-Antigene essenziell für die Resistenz gegenüber AMP sind (Allen et al., 1998). Diese Ergebnisse konnten inzwischen für viele unterschiedliche AMP für LPS-defektive *E. coli* Stämme nachgewiesen werden (Ebbensgaard et al., 2015). Für in Insekten, im Speziellen in der Krümmführerwanze *Riptortus pedestris*, symbiotisch lebende Bakterien der Gattung *Burkholderia* konnte nachgewiesen werden, dass diese im Rahmen der symbiotischen Kolonisation

ihre O-Antigene verlieren und danach eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber AMP zeigen (Kim et al., 2015).

In Hinblick auf immunologische Eigenschaften sind nahezu identische Aktivierungswege für LL-37 und IL-26 beschrieben. Beide AMP können nach Komplexbildung mit bakterieller DNA oder self-DNA plasmazytoide dendritische Zellen über den TLR9 zur vermehrten Produktion und IFN- α stimulieren (Lande et al., 2007; Meller et al., 2015).

IL-26 nimmt trotz der strukturellen Ähnlichkeit im Vergleich zu anderen kationischen AMP, die in der Regel ein sehr breites Wirkspktrum auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Protozoen und Pilze haben (Ebbensgaard et al., 2015), eine Sonderstellung ein. Insbesondere die Resistenz nahezu aller Gram-negativer Erreger gegenüber IL-26 ist auffällig und so für andere AMP nicht beschrieben. IL-26 lässt sich also als erstes AMP bezeichnen, das neben den in dieser Arbeit erstmals nachgewiesenen Aktivitäten gegen *A. baumannii* und *C. albicans*, in Hinblick auf die Bakterizidie nahezu selektiv gegen Gram-positive Bakterien wirksam ist.

4.8 Die Rolle des Kinozidins IL-26 im Immunsystem

Neben direkt antibakteriellen Mechanismen haben AMP auch andere Funktionen innerhalb des Immunsystems, indem sie chemotaktisch auf unterschiedlichste Immunzellen wirken oder mit TLR-Liganden wie Endotoxinen, Nukleinsäuren, aber auch self-DNA interagieren (Gallo & Hooper, 2012). So ist beschrieben, dass das Cathelicidin LL-37 nach Komplexbildung mit self-DNA von plasmazytoiden dendritischen Zellen in Endosomen aufgenommen werden kann. Dieser Komplex stimuliert TLR9 und dies führt zur vermehrten Produktion und Ausschüttung von IFN- α (Lande et al., 2007). Ähnliches ist auch für Komplexe aus self-DNA und IL-26 oder bakterieller DNA und IL-26 beschrieben, die in der Lage sind, über TLR9 die Produktion von IFN- α zu induzieren (Meller et al., 2015). Aufgrund dieser immunmodulatorischen Eigenschaften ist es nicht verwunderlich, dass inzwischen auch Verknüpfungen von übermäßiger AMP-Produktion und chronisch-entzündlichen Erkrankungen hergestellt werden konnten. Allele der Gene TCF4, LRP6 und NOD2, die mit verminderter Produktion oder Sekretion von α -Defensinen im Magen-Darm-Trakt assoziiert sind, gelten als Risikoallele für die Entwicklung eines Morbus Crohn (Gallo & Hooper, 2012; Hugot et al., 2001; Koslowski et al., 2009, 2012; Ogura et al., 2001; van Es et al., 2005; Wehkamp et al., 2005). Allerdings konnte experimentell für Mäuse gezeigt werden, dass ein alleiniger Mangel an AMP nicht zum Auslösen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung führt, und somit der Mangel nur einen Teil einer möglichen Kausalkette darstellt (Gallo & Hooper, 2012; Garabedian et al., 1997; Vaishnava et al., 2011). Bei Patienten mit atopischer Dermatitis bleibt die erhöhte Expression von AMP wie LL-37 oder β -Defensinen bei Hautinfektionen aus, sodass es zu der typischen Infektionsneigung atopischer Haut kommt (de Jongh et al., 2005; Hata et al., 2010; Kisich et al., 2008; Ong et al., 2002). Ein gegenteiliges Phänomen zeigt sich bei der Psoriasis oder der Rosazea. Hier

ist die Überexpression von AMP mit Cathelicidin-vermittelten proinflammatorischen Effekten beschrieben (de Jongh et al., 2005; Howell et al., 2006; Yamasaki et al., 2007).

IL-26 wurde in der Vergangenheit bereits oft mit immunologischen Aspekten in Zusammenhang gebracht. Neben der Wirkung auf epitheliale Zelllinien mit vermehrter Produktion von IL-8, IL-10, TNF α und dem Glycoprotein CD54 (Abb. 1; Dambacher et al., 2009; Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004) sind auch Wirkungen auf Zellen des Immunsystems beschrieben. Monozyten produzieren nach Kontakt mit IL-26 vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α und sind in der Lage, CD4+ T-Gedächtniszellen in IL-26 produzierende T_H17-Zellen umzuwandeln, mit der daraus entstehenden Möglichkeit einer kreisenden proinflammatorischen Aktivierung (Abb. 1; Corvaisier et al., 2012). Bei NK-Zellen kommt es zu einer vermehrten Produktion von IL-1 β , TNF α , IFN- β , IFN- γ sowie von TRAIL (Abb. 1; Miot et al., 2014). Wie oben bereits erwähnt führt die Inkubation plasmazytoider dendritischer Zellen mit Komplexen aus IL-26 und self-DNA oder bakterieller DNA zu einer gesteigerten Ausschüttung von IFN- α (Abb. 1; Meller et al., 2015). Die Expressionsmuster der mRNAs für IL-26 und für IL-8 als Standardmarker der Entzündung mRNA sind bei Morbus Crohn im Vergleich zu nicht entzündeter Mukosa signifikant erhöht und korrelieren miteinander. Auch die Serumkonzentrationen von IL-26 waren bei Patienten mit Morbus Crohn signifikant erhöht (Dambacher et al., 2008). Ähnliches konnte auch für Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden. Dort zeigten sich sowohl erhöhte Serumspiegel als auch stark erhöhte IL-26 Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke (Corvaisier et al., 2012). Bei chronischer Hepatitis C wurden erhöhte Serumspiegel und die IL-26-Anreicherung in geschädigten Leberanteilen beschrieben (Miot et al., 2014). Weitergehende Experimente wiesen eine direkte Hemmung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase von Hepatitis-C-Virus nach (Beaumont et al., 2021). Ein weiterer antiviraler Effekt wurde auch für das humane Cytomegalovirus beobachtet (Braum et al., 2013). Auch bei Patienten mit malignen Erkrankungen oder Sepsis zeigen sich erhöhte IL-26 Spiegel, die konzentrationsabhängig mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Tu et al., 2019; Xi et al., 2019; Xue et al., 2019).

Insgesamt wird IL-26 daher als proinflammatorisches Zytokin mit antimikrobiellen, konkret bakteriziden, antiviralen und antimykotischen Eigenschaften bezeichnet. IL-26 ist also der 2004 erstmals beschriebenen Gruppe der Kinozidine zuzuordnen, die Zytokine mit direkten antimikrobiellen Eigenschaften, wie beispielsweise auch *human mammalian platelet factor 4* (hPF-4), umfasst (Larochette et al., 2019; Yeaman et al., 2007; Yount et al., 2004).

4.9 IL-26 als mögliches antimikrobielles Therapeutikum

In Hinblick steigender Relevanz antibiotikaresistenter Bakterien bestehen schon seit langer Zeit Bemühungen, AMP als Therapeutika einzusetzen (Gallo & Hooper, 2012). Dies ist insbesondere auf Grund der Tatsache interessant, dass es im Vergleich zu Antibiotika kaum zu

Resistenzentwicklungen kommt obwohl AMP im Laufe der Evolution ubiquitär vorhanden waren (Gallo & Hooper, 2012; Zasloff, 2002). Die Modifikation der AMP-Zielstruktur der Zellwand oder Zellmembran wäre mit funktionalen Einschränkungen der Bakterien verbunden und könnte somit Ursache der fehlenden Resistenzentwicklung sein (Gallo & Hooper, 2012).

Bei Überlegungen, AMP als Therapeutika zu verwenden, steht das Problem im Raum, dass die meisten AMP hochkomplexe, oft nur unter optimalen Bedingungen stabile und nur aufwendig herzustellende Moleküle sind, über deren toxikologische Eigenschaften in der Regel wenn überhaupt nur wenig bekannt ist (Hancock & Sahl, 2006). So musste auch bei dieser Arbeit das Verfahren für die Gewinnung von IL-26 mehrfach verändert und angepasst werden, damit das recht instabile Kinozidin in ausreichender Menge, Konzentration und Qualität produziert werden konnte. Die Schwankungen in der Qualität können auch für die bereits in dieser Arbeit besprochenen Abweichungen der Ergebnisse dieser Arbeit von denen vorher veröffentlichter Arbeiten ursächlich sein. Somit wäre also zu prüfen, ob IL-26 in hoher Qualität und Quantität standardisiert produzierbar und in eine geeignete Galenik überführbar ist. Abseits dieser eher praktischen Gedankengänge muss dringend berücksichtigt werden, dass es sich bei IL-26 um ein mit verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiertes, proinflammatorisches Zytokin handelt, das in verschiedene, noch nicht vollständig verstandene Regulationswege eingreift.

Meller und Kollegen führten im Rahmen der 2015 publizierten Arbeit tierexperimentelle Studien durch, bei auf die nasale Applikation von Bakterien die nasale Applikation von IL-26 bzw. LL-37 folgte. Hier zeigte sich eine gewisse Reduktion der Zahl koloniebildender Einheiten um den Faktor 10 bis 100. Diese Experimente wurden allerdings mit dem in dieser Arbeit als unempfindlich eingestuften *K. pneumoniae* durchgeführt. Derartige Tierexperimente mit Gram-positiven Erregern und nach dem optimierten Verfahren der Arbeitsgruppe hergestellten IL-26 könnten mehr Aufschluss über eine Wirksamkeit *in vivo* geben. Allerdings bleibt dabei unklar, ob IL-26 bei der Maus physiologische Funktionen haben kann, da das entsprechende Gen im murinen Genom fehlt (Knappe et al., 2000). Entsprechend ist es auch problematisch, die proinflammatorischen Wirkungen und die Toxizität von IL-26 im Mausversuch zu untersuchen.

In Untersuchungen einer weiteren Arbeitsgruppe (Tu et al., 2019) zeigte sich bei Mäusen, bei denen IL-26 direkt nach Induktion einer Sepsis injiziert wurde, eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Negativkontrolle, obwohl es zu einer Reduktion der Zahl koloniebildender Einheiten kam. Möglicherweise kam es hier zu einer proinflammatorischen Kaskade mit konsekutivem Zytokinfreisetzungssyndrom.

Ferner stellt sich die Frage, ob die hier *in vitro* getesteten Konzentrationen überhaupt realistisch *in vivo* zustande kommen können. IL-26 ist wie bereits ausgeführt stark kationisch und neigt dazu, sich an Oberflächen anzulagern (Hör et al., 2004). Trotz der auf Grund dieser

hohen Oberflächenadhärenz bestehenden erschwerten Quantifizierbarkeit sind in der Literatur bereits deutlich erhöhte Spiegel von IL-26 in chronisch entzündeten Geweben nachgewiesen worden (Corvaisier et al., 2012; Dambacher et al., 2009; Fujii et al., 2017; Heftdal et al., 2017; Miot et al., 2014). Entsprechend ist damit zu rechnen, dass lokal im Bereich der Entzündung sehr hohe Konzentrationen an Membran-gebundenem IL-26 erreicht werden können.

Die Verbesserung der Stabilität und die Optimierung der aufwändigen Produktion natürlicher AMP besonders durch chemische Synthese und durch strukturelle Veränderungen hat zu neuen Wirkstoffen geführt, die teilweise bereits in klinischen Studien erprobt werden (Fjell et al., 2012; Giles et al., 2004; Lipsky et al., 2008). Das seit langem klinisch für die Therapie von Infektionen mit multiresistenten Bakterien eingesetzte Colistin ist strukturell ebenfalls mit AMP verwandt.

Die Erkenntnisse dieser und vorheriger Arbeiten sprechen also in Zusammenschau für eine antimikrobielle *in vivo* Wirksamkeit von IL-26. Auch wenn über mögliche Einsatzgebiete im Zusammenhang der Osteoporose außerhalb infektiologischer Fragestellungen diskutiert wurde (Peng et al., 2016), erscheint der therapeutische Einsatz von IL-26 wegen seiner proinflammatorischen Funktionen mittelfristig eher unwahrscheinlich, insbesondere bei Berücksichtigung der erhöhten Mortalität nach IL-26 Gabe im Sepsis-Mausmodell (Tu et al., 2019). Viele immunologische, toxikologische, pharmakologische und galenische Fragestellungen gilt es noch zu klären und die Zukunft antimikrobieller Wirkstoffe dürfte am ehesten im Einsatz synthetischer AMP liegen, bei denen infolge von Modifikationen unerwünschte Funktionen vermieden und erwünschte Funktionen optimiert werden können.

5 Zusammenfassung

Das Kinozidin Interleukin 26 (IL-26) ist ein stark kationisches proinflammatorisches Zytokin mit direkt antimikrobiellen Eigenschaften. IL-26 wird von verschiedenen Zelltypen wie T-Zellen und Makrophagen produziert und kann epitheliale Zellen, Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und nach Komplexbindung mit freier DNA auch plasmazytoide dendritische Zellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine stimulieren. Der proinflammatorischen Aktivität entsprechend konnten Assoziationen von IL-26 mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Spondyloarthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Hepatitis B, Hepatitis C, Vaskulitis, Psoriasis und Asthma hergestellt werden, bei denen in entzündeten Geweben und auch im Plasma erhöhte IL-26 Konzentrationen nachweisbar sind. Außerdem ist IL-26 auch in der Lage, die Virusreplikation insbesondere bei Cytomegalovirus und Hepatitis-C-Virus zu hemmen.

Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu antimikrobiellen Peptiden wurde IL-26 durch eine andere Arbeitsgruppe auf mögliche antimikrobielle Aktivität untersucht. Dabei wurde eine bakteriostatische Wirkung auf *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* beschrieben. *Enterococcus faecalis* und *Candida albicans* waren dabei nicht sensibel. Diese Studie war aber durch ihre Beschränkung auf Antibiotika-sensible Typstämme und durch die Untersuchung der IL-26-Konzentration limitiert, bei der das bakterielle Wachstum der untersuchten Kulturen auf 50 % reduziert wurde. Deshalb sollte in dieser Arbeit die antiinfektive Aktivität von IL-26 auf verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme unterschiedlicher Antibiotikasensibilität sowie auf *Candida albicans* unter klar definierten Bedingungen untersucht und die quantitative Bakterizidie oder Fungizidie für 90 % der untersuchten Kulturen ermittelt werden.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Bakterizidie von IL-26 gegen *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* und *Acinetobacter baumannii* durch standardisierte, reproduzierte Experimente nachgewiesen und quantifiziert werden. Diese IL-26-Sensibilität war auch bei Vancomycin-resistenten *Enterococcus*-Spezies, einem Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-Stamm sowie multiresistenten Patientenisolaten von *Acinetobacter baumannii* vorhanden. Des Weiteren konnte eine signifikante, aber schwache Fungizidie gegenüber *Candida albicans* festgestellt werden. Eine Wirkung auf *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* konnte ausgeschlossen werden.

Insgesamt handelt es sich bei IL-26 also um ein proinflammatorisches Kinozidin mit bakteriziden, antiviralen und antimykotischen Eigenschaften, das neben seiner Wirkung gegen *Acinetobacter baumannii* und *Candida albicans* nahezu selektiv Gram-positive Erreger abtötet.

6 Summary

The kinocidine Interleukin 26 (IL-26) is a highly cationic proinflammatory cytokine with direct antimicrobial properties. IL-26 is produced by different cell types, such as T cells and macrophages and is capable of stimulating the production of other proinflammatory cytokines in epithelial cells, monocytes, macrophages, NK cells and, after complex formation with free DNA, plasmacytoid dendritic cells. According to the proinflammatory activity, IL-26 was found associated with chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, spondylarthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, hepatitis B, hepatitis C, vasculitis, psoriasis, and asthma, all in which elevated concentrations of IL-26 have been found in inflamed tissues and plasma. Moreover, IL-26 is capable of inhibiting viral replication especially in cytomegalovirus and hepatitis C virus.

Based on its structural similarity with antimicrobial peptides, IL-26 was tested for possible antimicrobial activities by another research group. Bacteriostatic activities against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were described. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* were not sensitive to IL-26. However, this study was limited due to its restriction to antibiotic-sensitive type strains and due to the determination of the IL-26 concentration for a 50 % inhibition of bacterial growth. Therefore, this project aimed at determining the anti-infective activities of IL-26 on various Gram-positive and Gram-negative bacterial strains of different antibiotic sensitivity, as well as on *Candida albicans*, under well-defined conditions. The anti-infective activities were studied quantitatively for the 90 % bactericidal or fungicidal effects.

In this study, the bactericidal activities of IL-26 against *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* were shown and quantified for the first time, by standardized and reproducible experiments. IL-26 sensitivity was also detectable in vancomycin-resistant *Enterococcus* species, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Additionally, a significant but weak fungicidal activity against *Candida albicans* was found. Effects against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* could be ruled out.

In summary, IL-26 is a proinflammatory kinocidine with bactericidal, antiviral and antimycotic activities, which is active against *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans* and kills Gram-positive bacteria almost selectively.

7 Literaturverzeichnis

- Abi Khattar Z, Rejasse A, Destoumieux-Garzón D, Escoubas J, Sanchis V, Lereclus D, Givaudan A, Kallassy M, Nielsen-Leroux C, Gaudriault S (2009) The dlt operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J. Bacteriol.* 191: 7063-7073.
- Agak G, Kao S, Ouyang K, Qin M, Moon D, Butt A, Kim J (2018) Phenotype and antimicrobial activity of Th17 cells induced by *Propionibacterium acnes* strains associated with healthy and acne skin. *J. Invest. Dermatol.* 138: 316-324.
- Allen C, Adams L, Ficht T (1998) Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.* 66: 1008-1016.
- Allocati N, Masulli M, Alexeyev M, Di Ilio C (2013) *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10: 6235-6254.
- Ayliffe G, Babb J, Collins B, Lowbury E, Newsom S (1974) *Pseudomonas aeruginosa* in hospital sinks. *Lancet* 2: 578-581.
- Barns K, Weisshaar J (2013) Real-time attack of LL-37 on single *Bacillus subtilis* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1828: 1511-1520.
- Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Cecilia T, De Pascale G, Diaz-Martin A, Luzzati R, Rosin C, Lagunes L, Trecarichi E, Sanguinetti M, Posteraro B, Garnacho-Montero J, Sartor A, Rello J, Della Rocca G, Antonelli M, Tumbarello M (2014) A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med.* 40: 839-845.
- Berlau J, Aucken H, Houang E, Pitt T (1999) Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 42: 201-204.
- Bokarewa M, Jin T, Tarkowski A (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 504-509.
- Bouvet J, Grimont P (1986) Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 228-240.
- Braum O, Klages M, Fickenscher H (2013) The cationic cytokine IL-26 differentially modulates virus infection in culture. *PLoS ONE* 8: e70281.
- Caiazzo G, Di Caprio R, Lembo S, Raimondo A, Scala E, Patruno C, Balato A (2018) IL-26 in allergic contact dermatitis: Ressource in a state of readiness. *Exp. Dermatol.* 27: 681-684.

Canela H, Cardosa B, Vitali L, Coelho H, Martinez R, Ferreira M (2017) Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses* 61: 11-21.

Che KF, Tengvall S, Levänen B, Silverpil E, Smith ME, Awad M, Vikström M, Palmberg L, Qvarfordt I, Sköld M, Lindén A (2014) Interleukin-26 in antibacterial host defense of human lungs. Effects on neutrophil mobilization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190: 1022-1031.

Che KF, Kaarteenaho R, Lappi-Blaco E, Levänen B, Sun J, Wheelock A, Palmberg L, Sköld CM, Lindén A (2017) Interleukin-26 production in human primary bronchial epithelial cells in response to viral stimulation: modulation by Th17 cytokines. *Mol. Med.* 23: 247-257.

Copolovici D, Langel K, Eriste E, Langel Ü (2014) Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano* 8: 1972-1994.

Corvaisier M, Delneste Y, Jeanvoine H, Preisser L, Blanchard S, Garo E, Hoppe E, Barré B, Audran M, Bouvard B, Saint-André J, Jeannin P (2012) IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation. *PLoS Biol.* 10: e1001395.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K (2018) *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb. Pathog.* 117: 128-138.

Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, de Toni E, Göke B, Diepolder H, Auernhammer C, Brand S (2008) The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58: 1207-1217.

Dang A, Teles R, Weiss D, Parvatiyar K, Sarno E, Ochoa M, Cheng G, Gilliet M, Bloom B, Modlin R (2019) IL-26 contributes to host defense against intracellular bacteria. *J. Clin. Invest.* 129: 1926-1939.

Dayan G, Naglaa M, Scully I, Cooper D, Begier E, Eiden J, Jansen KU, Gurtmann A, Anderson A (2016) *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Rev. Vaccines* 15: 1373-1392.

De Jongh G, Zeeuwen P, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk P, Blokx W, Dogan A, Hiemstra P, van de Kerkhof P, Schalkwijk J (2005) High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 125: 1163-1173.

Den Hertog A, van Marle J, van Veen H, van't Hof W, Bolscher J, Veerman E, Nieuw Amerongen A (2005) Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defect, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem. J.* 388: 689-695.

Ebbensgaard A, Mordhorst H, Overgaard M, Nielsen C, Arestrup F, Hansen E (2015) Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PLoS One* 10: e0144611.

Edgerton M, Koshlukova S, Araujo M, Patel R, Dong J, Bruenn J (2000) Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3310-3316.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2020) Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. *ECDC, Stockholm*.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J (2006) Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 74: 4164-4171.

Fickenscher H, Hör S, Küpers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H (2002) The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol.* 23: 89-96.

Fisher K, Phillips C (2009) The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology* 155: 1749-1757.

Fjell C, Hiss J, Hancock R, Schneider G (2011) Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11: 37-51.

Fluit A, Schmitz F, Verhoef J, European SENTRY Participant Group (2001) Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 188-191.

Fujii M, Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Nishino K, Sakai S, Inatomi O, Bamba S, Kawahara M, Shimizu T, Andoh A (2017) Expression of Interleukin-26 is upregulated in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 23: 5519-5529.

Gallo R, Hooper L (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 503-516.

Garabedian E, Roberts L, McNevin M, Gordon J (1997) Examining the role of paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 272: 23729-23740.

Gaynes R, Edwards J (2005) Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative Bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 41: 848-854.

Ghosh A, Melquist A, Young K (2006) Loss of O-antigen increases cell shape abnormalities in penicillin-binding protein mutants of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263: 252-257.

Giles F, Rodriguez R, Weisdorf D, Wingard J, Martin P, Fleming T, Goldberg S, Anaissie E, Bolwell B, Chao N, Shea T, Brunvand M, Vaughan W, Petersen F, Schubert M, Lazarus H, Maziarz R, Silverman M, Beveridge R, Redman R, Pulliam J, Devitt-Risse P, Fuchs H, Hurd D (2004) A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, study of iseganan for the reduction of stomatitis in patients receiving stomatotoxic chemotherapy. *Leuk. Res.* 28: 559-565.

Grobe S, Wingender J, Flemming H (2001) Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204: 139-142.

Gunsalus K, Tornberg-Belanger S, Matthan N, Lichtenstein A, Kumamoto C (2016) Manipulation of host diet to reduce gastrointestinal colonization by the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *mSphere* 1: e00020-15.

Guo Y, Haijian Z, Qin L, Pang Z, Qin T, Ren H, Pan Z, Zhou J (2016) Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. *PLoS One* 11: e0153561.

Hancock R, Sahl H (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24: 1551-1557.

Handler M, Schwartz R (2014) Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 28: 1418-1423.

Hawerkamp H, van Geelen L, Korte J, Di Domizio J, Swidergall M, Momin AA, Guzmán-Vega FJ, Arold ST, Ernst J, Gilliet M, Kalscheuer R, Homey B, Meller S (2020) Interleukin-26 activates macrophages and facilitates killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.* 10: 17178.

Heftdal LD, Andersen T, Jæhger D, Woetmann A, Østgård R, Kenngott EE, Syrbe U, Sieper J, Hvid M, Deleuran B, Kragstrup TW (2017) Synovial cell production of IL-26 induces bone mineralization in spondyloarthritis. *J. Mol. Med.* 95: 779-787.

Hör S, Pirzer H, Dumoutier L, Bauer F, Wittmann S, Sticht H, Renauld J, de Waal Malefy R, Fickenscher H (2004) The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J. Biol. Chem.* 279: 33343-33351.

Howell M, Gallo R, Boguniewicz M, Jones J, Wong C, Streib J, Leung D (2006) Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity* 24: 341-348.

- Hugot J, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard J, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel J, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603.
- Joo H, Fu C, Otto M (2016) Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 371: 20150292.
- Joly S, Maze C, McCray P, Gutmiller J (2004) Human β -defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1024-1029.
- Josse J, Velard F, Gangloff S (2015) Staphylococcus aureus vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5: 85.
- Kadariya J, Smith T, Thapaliya D (2014) Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed. Res. Int.* 2014: 827965.
- Kagan B, Selsted M, Ganz T, Lehrer R (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 210-214.
- Kaper J, Nataro J, Mobley H (2004) Pathogenic Escherichia coli. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140.
- Karageorgopoulos D, Falagas M (2008) Current control and treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. *Lancet Infect. Dis.* 8: 751-762.
- Kim J, Son D, Kim C, Cho J, Marchetti R, Silipo A, Sturiale L, Park H, Huh Y, Nakayama H, Fukatsu T, Molinaro A, Lee B (2015) Insect gut symbiont susceptibility to host antimicrobial peptides caused by alteration of the bacterial cell envelope. *J. Biol. Chem.* 290: 21042-21053.
- Kisich K, Carspecken C, Fiéve S, Boguniewicz M, Leung D (2008) Defective killing of Staphylococcus aureus in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta-defensin-3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 62-68.
- Klein G, Pack A, Reuter G (1998) Antibiotic resistance patterns of Enterococci and occurrence of vancomycin-resistant Enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1825-1830.
- Knappe A, Hör S, Wittmann S, Fickenscher H (2000) Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 74: 3881-3887.
- Konradsen J, Nordlund B, Levänen B, Hedlin G, Linden A (2016) The cytokine interleukin-26 as a biomarker in pediatric asthma. *Respir. Res.* 17: 32.

Koslowski M, Kübler I, Chamaillard M, Schaeffeler E, Reinisch W, Wang G, Beisner J, Teml A, Peyrin-Birolet L, Winter S, Herrlinger K, Rutgeerts P, Vermeire S, Cooney R, Fellermann K, Jewell D, Bevins C, Schwab M, Stange E, Wehkamp J (2009) Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One* 4: e4496.

Koslowski M, Teltschik Z, Beisner J, Schaeffeler E, Wang G, Kübler I, Gersemann M, Cooney R, Jewell D, Reinisch W, Vermeire S, Rutgeerts P, Schwab M, Stange E, Wehkamp J (2012) Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet* 8: e1002523.

Kovács M, Halfmann A, Fedtke I, Heintz M, Oeschel A, Vollmer W, Hakenbeck R, Brückner R (2006) A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in Gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188: 5797-5805.

Krishnakumari V, Rangaraj N, Nagaraj R (2009) Antifungal activities of human beta-defensins HBD-1 to HBD-3 and their C-terminal analogs Phd1 to Phd3. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53: 256-260.

Kristian S, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo R, Nizet V (2005) d-alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J. Bacteriol.* 187: 6719-6725.

Lande R, Gergorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y, Homey B, Cao W, Wang Y, Su B, Nestle F, Zal T, Mellmann I, Schröder J, Liu Y, Gilliet M (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449: 564-569.

Larochette V, Miot C, Poli C, Beaumont E, Roingeard P, Fickenscher H, Jeannin P, Delneste Y (2019) IL-26, a cytokine with roles in extracellular DNA-induced inflammation and microbial defense. *Front. Immunol.* 10: 204.

Lipsky B, Holroyd K, Zasloff M (2008) Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin. Infect. Dis.* 47: 1537-1545.

Liu D, Reeves P (1994) *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology* 140: 49-57.

Louhaichi S, Mlika M, Hamdi B, Hamzaoui K, Hamzaoui A (2020) Sputum IL-26 Is Overexpressed in Severe Asthma and Induces Proinflammatory Cytokine Production and Th17 Cell Generation: A Case-Control Study of Women. *J. Asthma Allergy* 13: 95-107.

Lowy F (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-532.

Luo L, Jiang L, Tian Z, Zhang X (2020) The serum interleukin-26 level is a potential biomarker for chronic hepatitis B. *Medicine* 99: e18462.

Lutz J, Lee J (2011) Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 8: 554-564.

Mellata M (2013) Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10: 916-932.

Meller S, Di Domizio J, Voo K, Friedrich H, Chamilos G, Ganguly D, Conrad C, Gregorio J, Le Roy D, Roger T, Ladbury J, Homey B, Watowich S, Modlin R, Kontoyiannis D, Liu Y, Arold S, Gilliet M (2015) T_H17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* 16: 970-979.

Menne J, Kielstein J, Wenzel U, Stahl R (2012) Therapie des typischen hämolytisch-urämischen Syndroms. *Internist* 53: 1420-1430.

Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K (2009) Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J. Infect. Public Health* 2: 101-111.

Miot C, Beaumont E, Duluc D, Le Guillou-Guillemette H, Preisser L, Garo E, Blanchard S, Hubert Fouchard I, Crémion C, Lamourette P, Fremaux I, Calès P, Lunel-Fabiani F, Boursier J, Braum O, Fickenscher H, Roingeard P, Delneste Y, Jeannin P (2014) IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* 64: 1466-1475.

Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1-24.

Moskowitz S, Ernst R, Miller S (2003) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* 186: 575-579.

Nami S, Aghebati-Malek A, Morovati H, Aghebati-Maleki L (2019) Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. *Bio-med. Pharmacother.* 110: 857-868.

Ogura Y, Bonen D, Inohara N, Nicolae D, Chen F, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr R, Achkar J, Brant S, Bayless T, Kirschner B, Haunauer S, Nuñez G, Cho J (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606.

Ong P, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo R, Leung D (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347: 1151-1160.

- Patel S, Akhtar N (2017) Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. *Biomed. Pharmacother.* 95: 1276-1283.
- Peleg A, Seifert H, Paterson D (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 538-582.
- Pelletier M, Casella L, Jones J, Adams M, Zurawski D, Hazlett K, Doi Y, Ernst R (2013) Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 4831-4840.
- Peng YJ, Wang CY, Lin YH, Lin GJ, Huang SH, Shyu JF, Sytwu HK, Cheng CP (2016) Interleukin 26 suppresses receptor activator of nuclear factor κB ligand induced osteoclastogenesis via down-regulation of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 and nuclear factor κB activity. *Rheumatology* 55: 2074-2083.
- Peschel A, Otto M, Jack R, Kalbacher H, Jung G, Götz F (1999) Inactivation of the dlt Operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274: 8405-8410.
- Pfaller M, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling T (2010) Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1366-1377.
- Pitout J (2012) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3: 9.
- Podschun R, Ullmann U (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 589-603.
- Poirel L, Nordmann P (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 826-836.
- Poli C, Augusto J, Dauve J, Adam C, Preisser L, Larochette V, Pignon P, Savina A, Blanchard S, Subra J, Cevailler A, Procaccio V, Croué A, Crémillon C, Morel A, Delneste Y, Fickenscher H, Jeannin P (2017) IL-26 confers proinflammatory properties to extracellular DNA. *J. Immunol.* 198: 3650-3661.
- Raetz C, Whitfield C (2001) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 635-700.
- Ramírez-Estrada S, Borgatta B, Rello J (2016) *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect. Drug. Resist.* 9: 7-18.
- Rasigade J, Vandenesch F (2014) *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infect. Genet. Evol.* 21: 510-514.

- Rogmans G (2003) Mastitis puerperalis. *Zentralbl. Gynakol.* 125: 35-37.
- Rossau R, Van Landschoot A, Gillis M, De Ley J (1991) Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera Moraxella, Acinetobacter, and Psychrobacter and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 310–319.
- Russo T, Johanson J (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5: 449-456.
- Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, Trieu-Cuot P, Shai Y (2012) D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B Streptococcus by increasing the cell wall density. *PLoS Pathog.* 8: e1002891
- Scala E, Di Caprio R, Cacciapuoti S, Caiazzo G, Fusco A, Tortorella E, Fabbrocini G, Balato A (2019) A new T helper 17 cytokine in hidradenitis suppurativa: antimicrobial and proinflammatory role of interleukin-26. *Br. J. Dermatol.* 181: 1038-1045.
- Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg J, Vaneechoutte M (1997) Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2819-2825.
- Shah N, Hancock R, Fernandez R (2014) Bordetella pertussis lipid A glucosamine modification confers resistance to cationic antimicrobial peptides and increases resistance to outer membrane perturbation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 4931-4934.
- Sheik F, Baurin V, Lewis-Antes, Shak N, Smirnov S, Anantha S, Dickensheets H, Dumoutier L, Renaud J, Zdanov A, Donnelly R, Kotenko S (2004) Cutting edge: IL-26 Signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J. Immunol.* 172: 2006-2010.
- Silhavy T, Kahne D, Walker S (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a000414.
- Sivaraman K, Venkataraman N, Cole A (2009) Staphylococcus aureus nasal carriage and its contributing factors. *Future Microbiol.* 4: 999-1008.
- Stapleton F, Carnt N (2012) Contact lens-related microbial keratitis: how have epidemiology and genetics helped us with pathogenesis and prophylaxis. *Eye* 26: 185-193.
- Sundström J, Jacobsen K, Munck-Wikland E, Ringertz S (1996) Pseudomonas aeruginosa in otitis externa. A particular variety of the bacteria? *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122: 833-836.
- Swidergall M, Ernst J (2014) Interplay between Candida albicans and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryot. Cell* 13: 950-957.

- Towner KJ (2009) Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* 73: 355-63.
- Tu H, Lai X, Li J, Huang L, Liu Y, Cao J (2019) Interleukin-26 is overexpressed in human sepsis and contributes to inflammation, organ injury, and mortality in murine sepsis. *Crit. Care* 23: 290.
- Vaishnava S, Yamamoto M, Severson K, Ruhn K, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland E, Hooper L (2011) The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334: 255-258.
- Van Es, Jay P, Gregorieff A, van Gijn M, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo M, Clevers H (2005) Wnt signalling induces maturation of paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell. Biol.* 7: 381-386.
- Van Looveren M, Goossens H (2004) Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 684-704.
- Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M (2006) Human β -defensins kill Candida albicans in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 154-161.
- Weber BS, Harding CM, Feldmann MF (2016) Pathogenic Acinetobacter: from the cell surface to infinity and beyond. *J. Bacteriol.* 198: 880-887.
- Wehkamp J, Salzman N, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras R, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers R, Chu H, Lima H, Fellermann K, Ganz T, Stange E, Bevins C (2005) Reduced paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 18129-18134.
- Weintraub A (2007) Enteropathogenic Escherichia coli: epidemiology, virulence and detection. *J. Med. Microbiol.* 56: 4-8.
- Williams H, Davies J (2012) Basic science for the chest physician: Pseudomonas aeruginosa and the cystic fibrosis airway. *Thorax* 67: 465-467.
- Woetmann A, Alhede M, Dabelsteen S, Bjarnsholt T, Rybtke M, Nastasi C, Krejsgaard T, Andersen M, Bonefeld C, Geisler C, Givskov M, Odum N (2018) Interleukin-26 (IL-26) is a novel anti-microbial peptide produced by T cells in response to staphylococcal enterotoxin. *Oncotarget* 9: 19481-19489.
- Xi Z, Jeong S, Wang C, Li H, Guo H, Cai J, Li J, Kong X, Tong Y, Xia Q (2019) Expression of IL-26 predicts prognosis of patients with hepatocellular carcinoma after surgical resection. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 18: 242-248.
- Xue T, Yang J, Song P, Zhou G (2019) Investigations on correlations of serum IL-26 with diagnosis and staging of gastric cancer. *J. Biomed.* 24: 215-220.

- Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner R, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn V, Gallo R (2007) Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat. Med.* 13: 975-980.
- Yeaman M, Yount N, Waring A, Gank K, Kupferwasser D, Wiese R, Bayer A, Welch W (2007) Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 609-619.
- Yount N, Gank K, Xiong Y, Bayer A, Pender T, Welch W, Yeaman M (2004) Platelet microbicidal protein 1: structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4395-4404.
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

8 Tagungsbeiträge, Veröffentlichungen und Stipendien

Tagungsbeiträge

Hansen BT, Maschkowitz G, Podschun R, Fickenscher H (2018) Interleukin 26 shows immediate bactericidal effects even to multi-resistant isolates. *70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Bochum*.

Beaumont É, Larochette V, Preisser L, Pignon P, Blanchard S, **Hansen BT**, Dauv  J, Poranen M, Morel A, Fickenscher H, Jeannin P, Roingeard P, Delneste Y (2018) IL-26 inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *25th international symposium on Hepatitis C Virus and related viruses, Dublin, Ireland*.

Hansen BT, Bastian L, Franke A, Baldus CD (2020) Evolution of oncogenic signaling in acute lymphoblastic leukemia. *Annual meeting of the Clinician Scientist Program in Evolutionary Medicine, Kiel*.

Hansen BT, Bastian L, Franke A, Brüggemann M, Baldus CD (2021) Evolution of oncogenic signaling in acute lymphoblastic leukemia. *Evolution by the Sea: Joint meeting of the Clinician Scientist Program in Evolutionary Medicine, the Leibniz Science Campus Evolutionary Medicine of the Lung and the DFG Research Training Group in Translational Evolutionary Research, Kiel*.

Hansen BT, Bacher P, Eiz-Vesper B, Heckl SM, Klapper W, Koch K, Maecker-Kolhoff B, Baldus CD, Fransecky L (2021) Adoptiver Zelltransfer allogener Epstein-Barr-Virus-spezifischer T-Lymphozyten als Therapie für therapierefraktäre EBV-assoziierte glattmuskuläre Tumore nach Herztransplantation: Ein Fallbericht. *Jahrestagung der Deutschen,  sterreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Berlin*.

Veröffentlichungen

Hansen BT, Maschkowitz G, Podschun R, Fickenscher H (2018) Interleukin 26 shows immediate bactericidal effects even to multi-resistant isolates. *Abstract im Kongressband der 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Bochum.*

Hansen BT, Maschkowitz G, Podschun R, Fickenscher H (2021) The kinocidine IL-26 shows immediate antimicrobial effects even to multi-resistant isolates. *Front Microbiol.* 12: 757215.

Hansen BT, Bacher P, Eiz-Vesper B, Heckl SM, Klapper W, Koch K, Maecker-Kolhoff B, Balduz CD, Franseky L (2021) Adoptive cell transfer of allogeneic Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes for treatment of refractory EBV-associated post-transplant smooth muscle tumors: A case report. *Front. Immunol.* 12: 727814.

Beaumont É, Larochette V, Preisser L, Pignon P, Blanchard S, **Hansen BT**, Dauv  J, Poranen M, Morel A, Fickenscher H, Jeannin P, Roingeard P, Delneste Y (2021) IL-26 inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *J Hepatol.* S0168-8278(21)02253-4.

Stipendien und finanzielle Förderungen

- 2016 Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 2016 Reisestipendium der gemeinnützigen Gesellschaft zur Förderung der Forschung der Infektionsmedizin in Kiel (GFFI gGmbH)
- 2018 Reisekostenstipendium der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
- 2018 Reisestipendium der gemeinnützigen Gesellschaft zur Förderung der Forschung der Infektionsmedizin in Kiel (GFFI gGmbH)
- 2020 Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Clinician Scientist Program in Evolutionary Medicine – Projektnummer: 413490537.

9 Danksagung

Bei Herrn Professor Helmut Fickenscher möchte ich mich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen, die gute Betreuung und die Möglichkeit, Probleme jederzeit ansprechen zu können, bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Gregor Maschkowitz für seine Hilfsbereitschaft bedanken. Er stand mir jederzeit als Betreuer mit Rat und Tat bei Seite und konnte mich auch in schwierigen Phasen immer motivieren. Außerdem danke ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Andrea Hölzgen und Petra Krüger für ihre Unterstützung im Labor.

Herrn Professor Rainer Podschun danke ich für das Einbringen seiner Erfahrungen im Bereich der antimikrobiellen Peptide und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Sarah Thies und Ruben Rose möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor und im Büro sowie die notwendige Zerstreuung bedanken.

Mein Dank gilt außerdem der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Gewährung des Promotionsstipendiums sowie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und der gemeinnützigen Gesellschaft zur Förderung der Forschung der Infektionsmedizin in Kiel für die Übernahme von Reise- und Kongresskosten im Rahmen von Stipendien.

Schließlich möchte ich allen anderen danken, die mich während der Zeit der Promotion unterstützt, bestärkt und motiviert haben. Insbesondere danke ich meinem verstorbenen Vater Dr. Hans-Jürgen Hansen, meiner Mutter Roswitha Hansen und meiner Freundin Mona Malek.