

8. Zusammenfassung

Humane neutrophile Granulozyten töten *B. anthracis* mit einem α -Defensin abhängigen Mechanismus

Zusammenfassung

B. anthracis infiziert seinen Wirt durch intradermale sowie orale Aufnahme oder durch Inhalation von Sporen. Humane pulmonale und gastrointestinale Verlaufsformen weisen eine sehr hohe Mortalität auf. Im Gegensatz dazu ruft die dermale Form lokale Hautveränderungen hervor und heilt in 90% aller Fälle spontan. Interessanterweise werden bei der dermalen Form neutrophile Granulozyten an den Infektionsherd rekrutiert, während diese Infiltration in den zwei anderen klinischen Formen selten beschrieben wird. Dies eröffnet die Frage ob neutrophile Granulozyten *B. anthracis* töten und dadurch eine ungeahnte und drastische Auswirkung auf das Krankheitsgeschehen haben können. Während dieser Studie wurden neutrophile Granulozyten mit entweder *B. anthracis* Sporen oder vegetativen Bakterien infiziert, die einen der beiden Hauptvirulenzfaktoren exprimieren. Die humanen neutrophilen Granulozyten phagozytieren die *B. anthracis* Sporen, diese germinieren intrazellulär und werden von den neutrophilen Granulozyten getötet. Die Interaktion neutrophiler Granulozyten mit toxin- oder kapselproduzierenden vegetativen Bakterien wurde auch untersucht. Beide Stämme werden phagozytiert und effizient getötet. Der Tötungsmechanismus ist unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies, aber abhängig von einem aus humanen neutrophilen Granulozyten gewonnenem Granulaextrakt. Das Extrakt wurde mit High Performance Liquid Chromatography (HPLC) fraktioniert und α -Defensine als eine der zuständigen anti-*B. anthracis* Komponenten identifiziert. Unsere Daten, im Zusammenhang mit der Pathohistologie humaner Milzbrandfälle, implizieren, dass die rechtzeitige Einwanderung neutrophiler Granulozyten während des kutanen Milzbrand zur lokalen Eindämmung dieser Infektion führt. Diese These wird durch den Umstand unterstützt, dass die pulmonale Form bei Hunden und Schweinen mit massiver neutrophiler Granulozyteninfiltration einhergeht, welches zum Überleben dieser Wirte führt.

Einleitung

Die hochgradig umweltresistenten *B. anthracis* Sporen rufen natürliche Infektionen bei Mensch und Tier hervor (Swartz, 2001), sie können aber auch als biologische Waffen Verwendung finden. Das Gram-positive Bakterium *B. anthracis* infiziert den Wirtsorganismus auf intradermale Wege oder über orale Aufnahme von Sporen oder durch Inhalation (Dixon et al., 1999). In dem derzeit gängigen Modell des pulmonalen Infektionsgeschehens werden Sporen durch gewebständige Makrophagen aufgenommen. Dort germinieren sie und bilden vegetative Bakterien (Guidi-Rontani et al., 1999). Die Makrophagen transportieren die Bakterien zu den regionalen Lymphknoten (Guidi-Rontani and Mock, 2002). In diesen Organen verlassen die Bakterien die Makrophagen, verteilen sich auf lymphatischem Wege und über die Blutbahnen im Körper und induzieren eine Septikämie. Vegetative *B. anthracis* exprimieren zwei Hauptvirulenzfaktoren: das dreiteilige Toxin und die poly-D-Glutamat Kapsel (Mock and Fouet, 2001). Das Protektive Antigen des Toxins bindet an einen spezifischen Rezeptor und transloziert den Ödemfaktor (EF) und den Letalfaktor (LF) in das Wirtszellzytoplasma (Bradley et al., 2001). EF ist eine Adenylatzyklase welche Ödeme hervorruft (Leppala, 1982), LF ist eine Metalloprotease welche Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinasen inaktiviert und schließlich Zelltod hervorruft (Duesbery et al., 1998).

Neutrophile Granulozyten sind eine wichtige Komponente der akuten inflammatorischen Antwort und sie spielen eine Hauptrolle in der Auflösung von Infektionen. Diese Zellen nehmen Mikroorganismen in Phagosomen auf, welche mit intrazellulären Granula fusionieren. In diesen Phagolysosomen werden die Bakterien durch reaktive Sauerstoffradikale (Hampton et al., 1998) und durch sauerstoffunabhängige Mediatoren, wie Enzyme und antimikrobielle Peptide (Borregaard and Cowland, 1997) getötet. Antimikrobielle Peptide sind vorwiegend kationisch und permeabilisieren bakterielle Membranen und induzieren so Zellyse (Lehrer and Ganz, 1999). α -Defensine sind kleine antimikrobielle Peptide und sind Bestandteil der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten. Vor kurzem wurde gezeigt dass sie auch eine Rolle bei der Neutralisation des Milzbrand Letaltoxins spielen (Kim et al., 2005).

Die pulmonale und gastrointestinale Form der *B. anthracis* Infektion resultiert in Sepsis und Tod, während die kutane Form fast immer lokalisiert bleibt. Interessanterweise, in unbehandelten Fällen, umgeben neutrophile Granulozyten die nekrotischen, bakterien-beinhaltenen Läsionen (Lebowich et al., 1943). Im Gegensatz werden neutrophile Granulozyten während der pulmonalen Krankheitsform selten in der Lunge gefunden (Albrink et al., 1960). Desweiteren geht die pulmonale Form bei Hunden und Schweinen mit massiver neutrophiler Granulozyten Infiltrationen einher. Interessanterweise überleben diese Wirte außergewöhnlich hohe Infektionsdosen (Gleiser et al., 1968).

Deswegen wurde die Hypothese aufgestellt, dass humane neutrophile Granulozyten *B. anthracis* töten.

Material und Methoden

Isolierung neutrophiler Granulozyten. Heparinisiertes Blut wurde von gesunden Freiwilligen gewonnen. Neutrophile Granulozyten (> 95% Reinheit) wurden mit einer Dextran-Sedimentation gefolgt von Zentrifugationen mit Ficoll-Paque isoliert (Boyum, 1968). Erythrozyten wurden mit destilliertem Wasser für 30 s lysiert und die Zellen in HBSS-gewaschen und in RPMI/ 10mM HEPES mit oder ohne 10% FCS verdünnt.

Bakterienstämme. Alle Versuche wurden entweder mit einem Kapsel (Pasteur) oder Toxin (Sterne) produzierendem Stamm in einer BSL-3 Einrichtung durchgeführt. Die *B. anthracis* Stämme waren ein Geschenk von W. Beyer, Universität Hohenheim. Um die Toxinexpression zu fördern, wurden die Bakterien auf BHI Agar mit 0.8% Natriumbikarbonat bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Eine Kolonie wurde über Nacht in BHI mit 0.8% Natriumbikarbonat bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Kapsel produzierende Stamm wuchs auf BHI Agar mit 0.8% Natriumbikarbonat für 2 Tage und 20% CO₂ und wurde 12 h in RPMI mit 10% BHI, 10mM HEPES und 0.8% Natriumbikarbonat kultiviert.

Toxin- und Kapselexpression. Letal-, Ödemfaktor und Protektives Antigen Expression wurden mit Westen Blot des TCA präzipitierten bakteriellen Überstandes überwacht. Die Kapselexpression wurde mit chinesischer Tusche untersucht.

Präparation der *B. anthracis* Sporen. Die Stämme wurden in BHI bei 37°C übernacht kultiviert. Diese Kultur wurde auf Fleisch-Hefe-Agar angereichert mit Manganchlorid für 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Sporen wurden abgeschabt, mit PBS gewaschen und in PBS bei 4°C gelagert. Sporulation wurde unter dem Mikroskop und mittels Hitzebehandlung (45 min, 60°C) bestätigt.

Antimikrobielle Aktivität der neutrophilen Granulozyten. 2×10^6 /ml neutrophile Granulozyten konnten an den Bakterienkulturplatten für 15 min adherieren und wurden dann mit 25nM PMA (Underhill and Ozinsky, 2002) für 30min aktiviert. Bakterielle Suspensionen (vegetative Bakterien oder Sporen) wurden auf die Zellen zentrifugiert (1250 rpm, 10 min) und für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden von den Platten gekratzt, mit Pipetieren zerstört und eine Verdünnungsreihe auf BHI Agarplatten ausplattiert. Bakterienkolonien wurden nach 12h Inkubation (37°C, 5% CO₂) gezählt. Bakteriell Töten wurde als Prozent der Anzahl der Bakterien in der Kontrolle (Bakterien alleine ohne neutrophile Granulozyten) ermittelt. Um die antimikrobielle Aktivität in der Abwesenheit reaktiver Sauerstoffradikale zu testen, wurden neutrophile Granulozyten mit 10 µM des NADPH Inhibitors, DPI, (Cross and Jones, 1986) für 30 min behandelt. Hemmung der

Degranulation PMA aktivierter neutrophiler Granulozyten wurde mit Chemilumineszenz bestätigt (Dahlgren and Karlsson, 1999). Die Daten wurde in einem BD Pharmagen TM, Monolight 3096 Microplate Luminometer gelesen.

Chromatography. hNGE wurde mit einer C4 RP-HPLC Säule fraktioniert (Vydac Protein C4 Säule, 3.9 x 250mm, 5µm). Proteine wurden mit einem steigenden Acetonitril (mit 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, Fließrate 1 ml/min) Gradienten eluiert. Fraktionen wurden lyophilisiert, in 20mM Natriumazetatpuffer aufgenommen und auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Die antimikrobielle Aktivität wurde weiter mit einer zweiten C4 Säule (mobile Phase 100mM Ammoniumazetat, pH5) isoliert, gefolgt von einer C18 RP-HPLC Säule (X-terra RP18, 3.9 x 150mm, 3.5µm) mit einem Azetonitril/ 0.1% (v/v) Trifluoroessigsäure Gradienten (Fließrate 1 ml/min). Die HPLC wurde in einem Waters 626 LC System mit einer Water 996 Photodiode Array Detektor ausgeführt.

Bakterizide Aktivität. hNGE wurde wie in Referenz (Weiss et al., 1978) hergestellt. Die antibakterielle Aktivität des hNGE, der HPLC Fraktion oder des synthetischen humanen α -Defensins 2 wurde durch die Inkubation der Bakterien (10^7 Bakterien/ml) in einem Casaminosäurepuffer (0.3% Casaminosäure, 10mM HEPES pH7.4) bei 37°C, für 30min bei angegebenen Konzentrationen untersucht. Überlebende Bakterien wurden mit Hilfe einer Vrdünnungsreihe bestimmt. Antibakterielle Aktivität wurde als Prozent der Kontrolle (Bakterien mit Medium) gemessen.

Elektronenmikroskopie. Für Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Zellen mit 2.5% Glutaraldehyd fixiert, mit 1% Osmiumtetroxide behandelt, mit Uranylazetat und Tanninsäure kontrastiert, dehydriert und in Spurr's (Ted Pella, Redding, CA) eingebettet. Nach der Polymerisation wurden die Proben in 60nm dicke Scheiben geschnitten und mit Bleizitrat überzogen. Proben wurden in einem Leo 906E Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Rasterelektronenmikroskopie: Zellen wurden mit 2.5% Glutaraldehyd fixiert, mehrmals mit 1% Osmiumtetroxide/ 1% Tanninsäure behandelt, mit einer Äthanolserie dehydriert, zum Kritischenpunkt getrocknet und mit 2nm Platin überzogen. Nach weiterer Dehydratation und Kritischerpunkttrocknung wurden die Proben mit einer 5nm Platinschicht überzogen und in einem Leo 1550 Rasterelektronenmikroskop analysiert.

Massenspektrometrie. Die Identität und die Reinheit der HPLC Fraktion wurde mit Hilfe der MALDI Massenspektrometrie (Proteomics 4700 Workstation, Applied Biosystems), Peptide mass fingerprinting, MS/MS Analyse und Massenanalyse der ungespaltenen Proteine ermittelt. Die lyophilisierte Probe wurde mit 50mM NH_4HCO_3 , 5% Azetonitril, 2% (w/v) Trypsin (Sequenzierungsqualität, Promega) und 0.15M DTT für 4h bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde mit 0.2% TFA gestoppt und mit 5mg/ml matrix-alpha-cyano-4-hydroxycinnamicsäure (CHCA) gelöst in 50% Azetonitril/ 0,3% TFA gemischt.

Die Analyse der Peptide Mass Fingerprinting wurde mit folgenden Parametern ausgeführt: Reflektion Modus, 20kV beschleunigende Spannung und eine geringe Masse von 800 Da. MS/MS Spektren wurden ohne Kollisionsgas ermittelt. Parameter für die Datenbanksuche (MASCOT, <http://www.matrixscience.com>) waren: 30 ppm Peptidmassentoleranz für Peptide mass fingerprints und 0.3 Da für die MS/MS Spektren. Das unverdaute Protein wurde im linearen Modus mit CHCA als Matrix und mit einem internen Marker (Mr 2465.21) analysiert.

Ergebnisse/ Diskussion

Humane neutrophile Granulozyten töten *B. anthracis* Sporen unabhängig von reaktiven Sauerstoffradikalen

Wir haben kapsel- und toxinproduzierende *B. anthracis* untersucht. Neutrophile Granulozyten wurden mit dem toxin- oder dem kapselproduzierenden Stamm bei einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 1:1 inkubiert, und die bakterielle Überlebensrate bei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Aktivierte neutrophile Granulozyten töteten 50% der Sporen beider Stämme nach 2.5h und nach 4h überlebten nur 35% aller Sporen (Abbildung 1A). Die Sporen beider Stämme wurden von aktivierten neutrophilen Granulozyten phagozytiert (Abbildung 1B). Ohne Serum wurden ungefähr 50% aller Sporen intrazellulär gefunden, wie durch Zählen der Sporen in elektronenmikroskopischen Bildern bestimmt wurde. Um zu gewährleisten dass vegetative Zellen und nicht Sporen phagozytiert wurden, war die Sporenqualität durch Erhitzen der Sporen bestimmt worden (Daten nicht gezeigt). Der Versuch wurde unter serumfreien Bedingungen gemacht, da manche Seren Germination induzieren (Ireland and Hanna, 2002).

Neutrophile Granulozyten töten Mikroorganismen durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen. Reaktive Sauerstoffradikale werden mit Hilfe der NADPH Oxidase produziert und spielen eine große Rolle bei manchen Infektionen. Um die Relevanz der reaktiven Sauerstoffradikale in einer *B. anthracis* Infektion zu untersuchen, wurde die NADPH Oxidase mit Diphenyleneiodonium (DPI) inaktiviert (Cross and Jones, 1986) (Daten nicht gezeigt). Es wurde festgestellt, dass die antimikrobielle Aktivität unabhängig von reaktiven Sauerstoffradikalen ist. Desweiteren wurde untersucht, ob die bakteriziden Proteine der neutrophilen Granula effektiv gegenüber *B. anthracis* sind. Sporen wurden mit sehr hohen Konzentrationen eines neutrophile Granulozyten-Granulaextrakts inkubiert; eine Behandlung, der die Sporen über 4h widerstanden (Abbildung 1D). Während dieser Zeit wurde keine Germination ausgelöst (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse führten dazu, dass wir die Hypothese untersucht haben, ob Sporen in den neutrophilen Granulozyten germinieren und ob die entstandenen vegetativen Bakterien anfällig gegenüber neutrophilen Tötungsmechanismen sind.

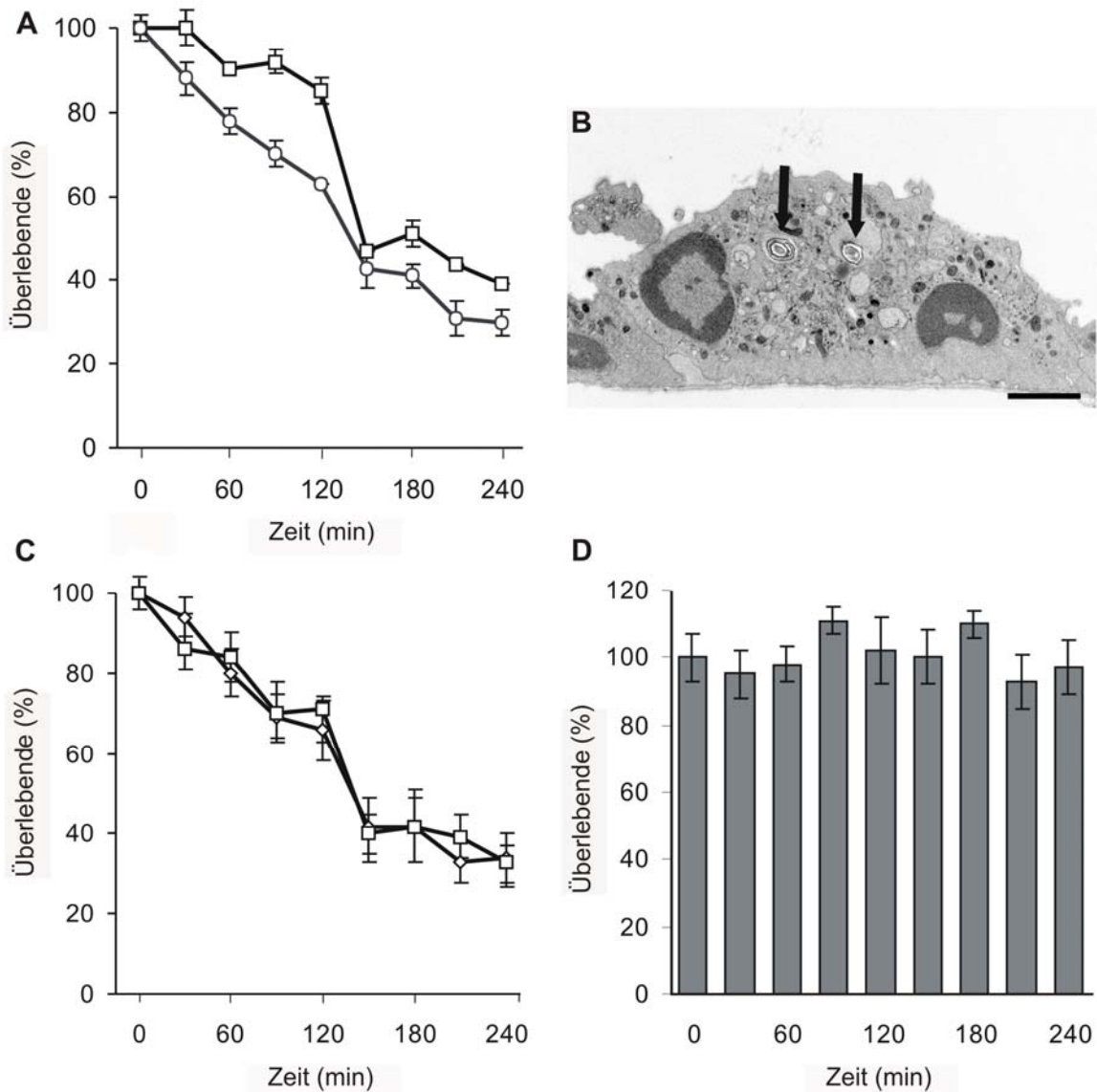


Abbildung 1: Humane neutrophile Granulozyten töten *B. anthracis* Sporen unabhängig von reaktiven Sauerstoffradikalen. **A:** Humane neutrophile Granulozyten töten *B. anthracis* Sporen. Aktivierte neutrophile Granulozyten wurden mit Sporen infiziert (MOI 1:1), die entweder aus dem toxinproduzierenden (O) oder dem kapselproduzierenden (□) Stamm hergestellt wurden. Keimbildende Einheiten wurden an den angegebenen Zeitpunkten ermittelt. **B:** Transmissionselektronenmikroskopie aktivierter neutrophiler Granulozyten, welche mit Sporen des toxinproduzierenden Stammes (Pfeil) infiziert und 30 min inkubiert wurden. Balken zeigen 10 µm. **C:** Reaktive Sauerstoffradikale werden nicht für das Töten von *B. anthracis* Sporen benötigt. Aktivierte neutrophile Granulozyten wurden mit Sporen (kapselproduzierender Stamm) und mit (□) oder ohne (◇) den NADPH Oxidase Inhibitor, DPI, inkubiert. **D:** Humanes neutrophiles Granulozyten-Granulaextrakt (hNGE) tötet *B. anthracis* Sporen nicht. Sporen des toxinproduzierenden Stammes wurden mit 50% hNGE oder mit Puffer für die gezeigten Zeitintervalle inkubiert. Keimbildende Einheiten wurden durch Verdünnungsreihen bestimmt. Einhundertprozentiges Überleben bezieht sich auf die Anzahl der Bakterien im Puffer. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von drei Versuchen.

***B. anthracis* Sporen keimen in menschlichen neutrophilen Granulozyten.**

Neutrophile Granulozyten wurden mit Sporen infiziert und die Keimung innerhalb der Zellen analysiert. Nach 90 min *post infectionem* konnten neugekeimte vegetative Bakterien identifiziert werden (Abbildung 2A). Nach 180 min enthielten die neutrophile Granulozyten vorwiegend keimierte Bakterien (Abbildung 2B). Sporen und vegetative Bakterien waren in membranverbundenen Vakuolen, wahrscheinlich Phagosomen, zu finden.

Interessanterweise, scheint der Keimungsprozess nicht synchron, da Sporen während des gesamten Infektionsprozesses zu finden waren. Ob manche Sporen resistent gegenüber zellspezifischen Keimungsmolekülen sind, bleibt zu untersuchen.

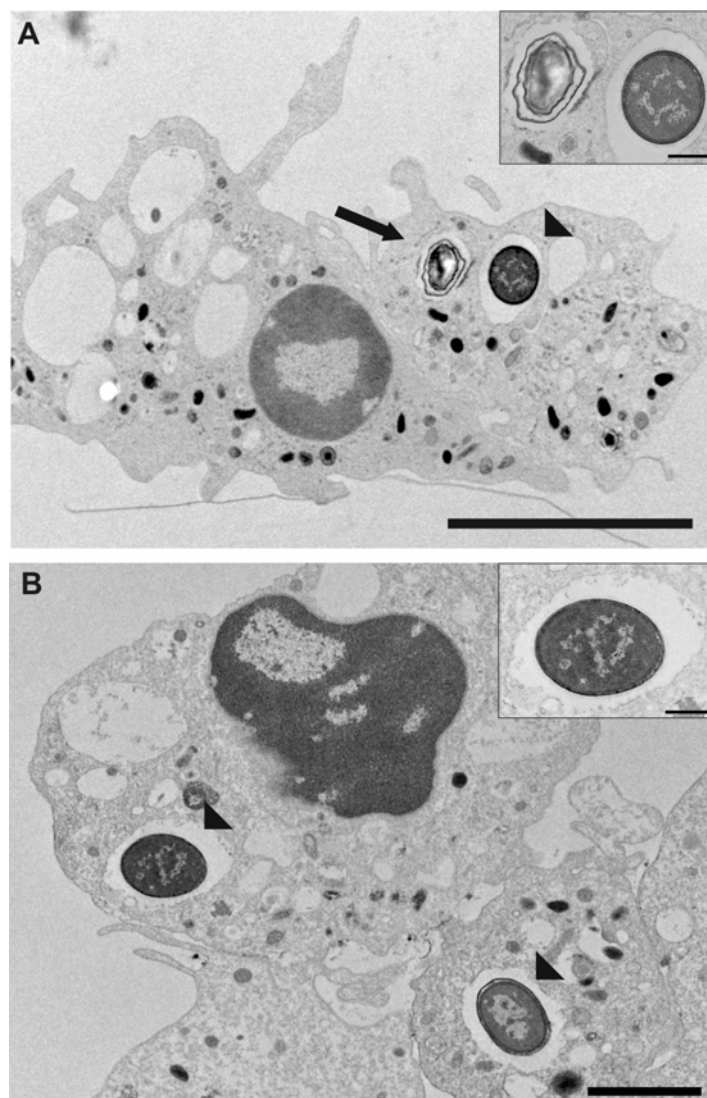


Abbildung 2: *Bacillus anthracis* Sporen keimen in menschlichen neutrophilen Granulozyten. **A:** TEM Aufnahme von neutrophilen Granulozyten, die mit Sporen des toxinproduzierenden Stammes für 90 min bei einer MOI von 1:1 infiziert wurden. Bei diesem Zeitpunkt waren sowohl Sporen (Pfeil), wie auch keimierte Bakterien (Pfeilkopf) in den neutrophilen Granulozyten sichtbar (Vergrößerung oben rechts). **B:** Neutrophile Granulozyten nach 180 min Infektion. Zu diesem Zeitpunkt beinhalten die neutrophile Granulozyten vorwiegend keimierte Bakterien (Pfeilkopf). Balken in A zeigen 5µm, in B 2µm und in den Einfügungen 500nm.

Humane neutrophile Granulozyten töten vegetative *B. anthracis*

Um festzustellen ob vegetative *B. anthracis* von neutrophilen Granulozyten getötet werden, wurden aktivierte neutrophile Granulozyten mit toxin- oder kapselproduzierenden *B. anthracis* Stämmen infiziert. Sporen sind ovoid mit einer rauhen Oberfläche, während vegetative Bakterien stäbchenförmig und lang sind (Abbildung 3A). Bei einer MOI von 10:1, wurden beide Stämme trotz ihrer relativen Größe (~ 5µm) phagozytiert (Abbildung 3B). Drei Stunden *post infectionem* töten aktivierte neutrophile Granulozyten mehr als 90% aller toxinproduzierenden Stämme, und 80% aller kapsulierten Stämme (Abbildung 3C). Diese Daten zeigen, dass weder das Toxin noch die Kapsel einen Einfluß auf die Tötungsaktivität der neutrophilen Granulozyten hat. Diese Daten stimmen mit O'Brien et al. (1985) überein, der zeigte, dass das Letaltoxin, wenn gleichzeitig mit den neutrophilen Granulozyten inkubiert, die Phagozytose nicht unterbindet. Die Rolle, die die Kapsel bei der Interaktion von *B. anthracis* mit den Wirtszellen spielt, ist unzureichend untersucht (Keppie et al., 1963; Makino et al., 2002), und Informationen werden oft von anderen bekapselten Bakterien übernommen.

Um die intrazellulär getöteten Bakterien zu quantifizieren, wurden neutrophilen Granulozyten mit Cytochalasin D behandelt, welches Depolymerisation des Aktinzytoskeletts induziert und folglich Phagozytose inhibiert (Cross and Jones, 1986). PMA oder IL-8 aktivierte neutrophile Granulozyten wurden mit vegetativen Bakterien bei einer MOI von 1:1 für 30 min inkubiert. Bei Cytochalasin D behandelten neutrophilen Granulozyten wurden nur 20% aller Bakterien von PMA aktivierten neutrophilen Granulozyten getötet, aber 40% in den IL-8 aktivierten Zellen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass PMA eine potentere Aktivierung mit verstärkter Granulaausschüttung in den extrazellulären Raum verursacht (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise hatte die Opsonisierung der vegetativen Bakterien keine Auswirkung auf das Töten beider Bakterienstämme (Abbildung 3D), welches darauf hindeuten könnte, dass neutrophile Granulozyten *B. anthracis* direkt erkennen. Andererseits könnten die neutrophilen Granulozyten durch das PMA so aktiviert sein, dass die Zellen keines weiteren Stimulus bedürfen.

Wie die Sporen wurden vegetative *B. anthracis* unabhängig von reaktiven Sauerstoffradikalen getötet (Abbildung 3E). Dies steht im Kontrast zu einem anderen Gram-positiven Bakterium, *Staphylococcus aureus*, welches durch einen reaktiven sauerstoffradikaleabhängigen Mechanismus getötet wird (Kristian et al., 2003). Deweiteren wurde untersucht, ob *B. anthracis* durch Granulakomponenten getötet wird. Beide *B. anthracis* Stämme erwiesen sich als erstaunlich anfällig für geringe Konzentrationen humanen neutrophilen Granulozyten-Granulaextraktes (Abbildung 3F). Im Vergleich, 10% hNGE tötet nur 50% einer *S. aureus* Kultur (Daten nicht gezeigt).

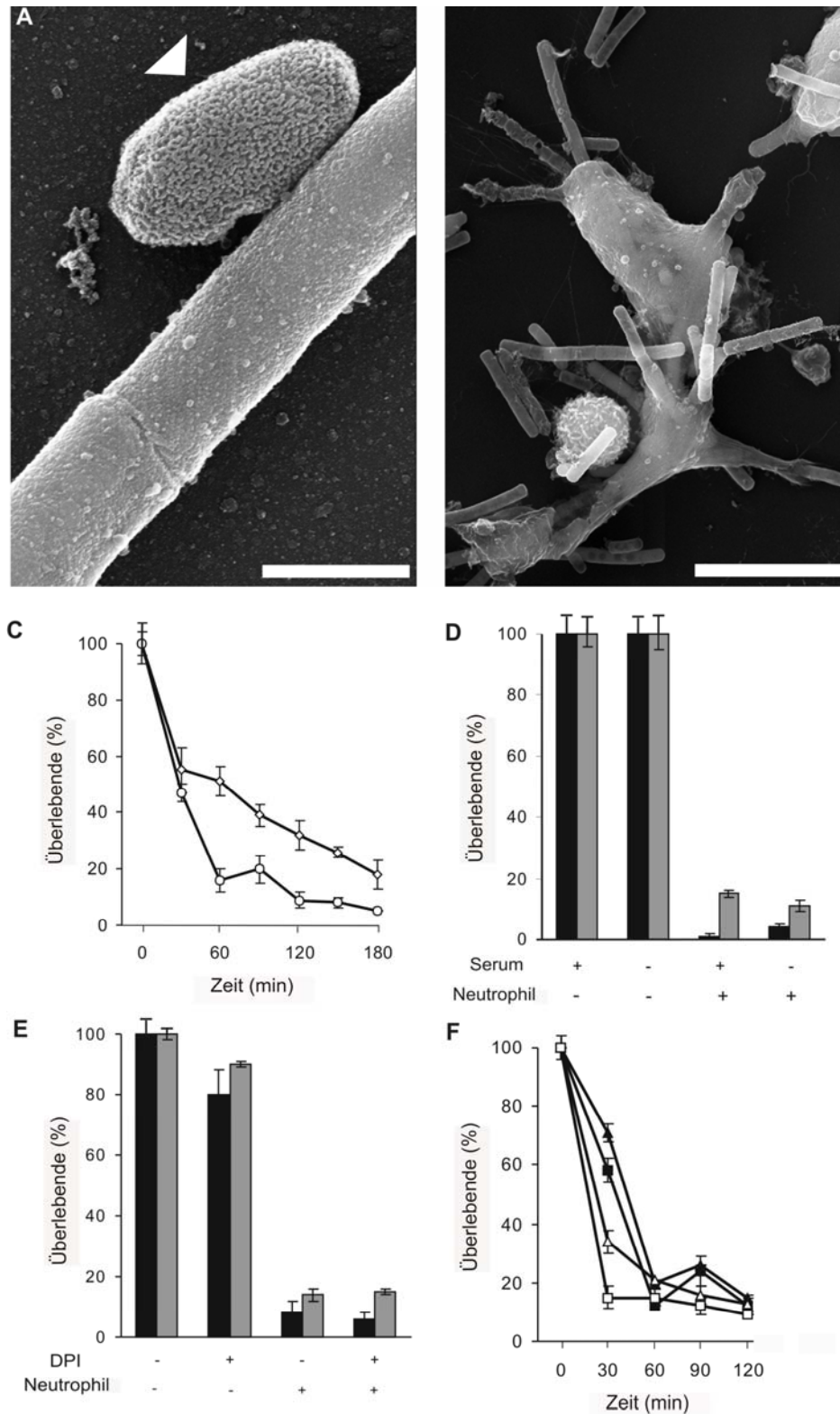


Abbildung 3: Humane neutrophile Granulozyten töten vegetative *B. anthracis* unabhängig von reaktiven Sauerstoffradikalen. **A:** Rasterelektronenmikroskopie (REM) einer Spore (Pfeilkopf) und vegetativen *B. anthracis*. Balken = 1µm. **B:** REM von neutrophilen Granulozyten infiziert für 30 min mit der vegetativen Form des toxinproduzierenden Stammes. Neutrophile Granulozyten phagozytieren *B. anthracis* trotz ihrer Größe. Balken = 5µm. **C:** Neutrophile Granulozyten töten beide *B. anthracis* Stämme effizient. Aktivierte neutrophile Granulozyten wurden mit kapsel-(◇) oder toxin-(○)

exprimierenden vegetativen Bakterien für unterschiedliche Zeitintervalle bei einer MOI von 10:1 inkubiert. **D:** Opsonisierung ist nicht erforderlich für neutrophile Granulozyten anti-*B. anthracis* Aktivität. Neutrophile Granulozyten wurden mit kapsel- (graue Symbole) oder toxin- (schwarze Symbole) exprimierenden Bakterien mit oder ohne Serum für 30 min bei einer MOI von 1:1 infiziert. **E:** Neutrophile Granulozyten töten kapsel- (graue Symbole) und toxin- (schwarze Symbole) produzierende Bakterien unabhängig der NADPH Oxidase Aktivität. Aktivierte neutrophile Granulozyten wurden vor der Infektion mit DPI (10 μ M) inkubiert. Infektionsperiode war 30 min (MOI 1:1). **F:** hNGE tötet beide *B. anthracis* Stämme. Toxin- (offene Symbole) und kapsel- (geschlossene Symbole) produzierende Stämme wurden mit 1 (Δ) und 3 (\square) % hNGE inkubiert. Bei den angegebenen Zeitpunkten wurden die keimbildenden Einheiten ermittelt und zu der Anzahl Bakterien der Kontrollen (Bakterien in Puffer) in Bezug gesetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier Versuche.

Neutrophile Granulozyten töten *B. anthracis* durch einen α -Defensin abhängigen Mechanismus

Um die Komponenten des Granulaextrakts, welche für die anti- *B. anthracis* Aktivität zuständig ist, zu identifizieren, wurde das Extrakt mit einer C4 Reverse Phase HPLC (RP-HPLC) Säule fraktioniert. Die Fraktion der ersten Säule, welche die höchste antimikrobielle Aktivität aufwies, wurde auf eine zweite C4 Säule mit unterschiedlicher mobiler Phase gegeben. Die aktivste Fraktion wiederum mit einer C18 Säule aufgetrennt. Nach der Aufreinigung zeigte eine Tricine SDS PAGE Gel Analyse die Migration einer einzigen Bande bei 3.4 kDa (Daten nicht gezeigt). Die aktive Komponente wurde mit Hilfe von MALDI MS peptide mass fingerprinting und den MS/MS Daten von fünf Peptiden als humanes α -Defensin identifiziert (Abbildung 4B). In dem MS Spektrum der nicht verdauten Probe wurden nur einfach und doppelt geladene Moleküle entdeckt, welches auf eine hohe Reinheit der Probe hindeutet.

α -Defensine sind eine Gruppe kleiner antimikrobieller Peptide, die in den neutrophilen Granulozytengranula gespeichert sind (Ganz, 2003). Die drei wichtigsten neutrophilen α -Defensine unterscheiden sich nur in einer Aminosäure und können Bakterien effektiv töten (Ganz and Lehrer, 1995), obwohl manche Gram-positive Pathogene wie *S. aureus* relativ resistent sind (Peschel and Collins, 2001). Um zu verifizieren, dass α -Defensine verantwortlich für das Töten von *B. anthracis* sind, wurde die isolierte Fraktion mit einem synthetischen α -Defensin verglichen (Abbildung 4C). Diese zwei Proben wiesen eine vergleichbare spezifische Aktivität auf. Dies war die Bestätigung, dass α -Defensine für das Töten des kapsulierten (Daten nicht gezeigt) wie des toxinexprimierenden *B. anthracis* Stammes verantwortlich sind.

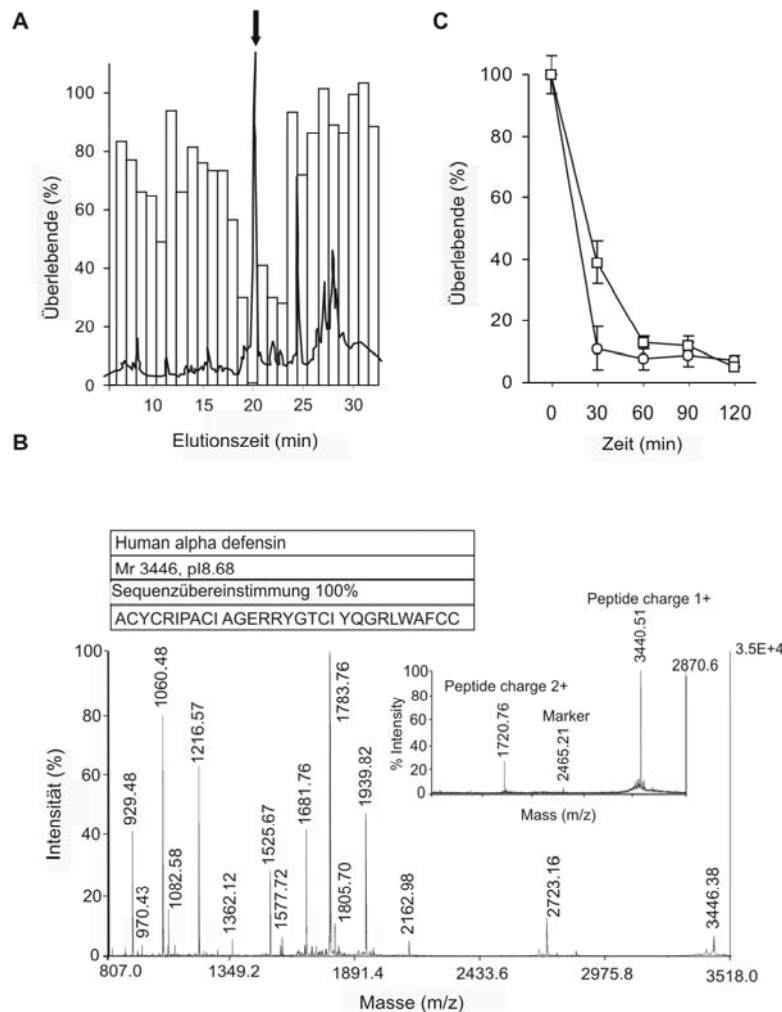


Abbildung 4: Neutrophile Granulozyten töten *B. anthracis* mit einem α -Defensin abhängigen Mechanismus. Isolierung der anti-*B. anthracis* Aktivität aus hNGE: hNGE wurde in einer C4 RP-HPLC Säule aufgetrennt (**A**) und die Fraktionen auf anti-*B. anthracis* Aktivität gemessen (Balken). Der Hauptzacken des Chromatogramms deckt sich mit der anti-*B. anthracis* Aktivität (Pfeil). **B**: Die aktive Komponente wurde mit MALDI MS peptide fingerprinting als humanes α -Defensin identifiziert. Die Reinheit der Probe wurde durch die Analyse einer unverdauten Probe verifiziert. **C**: Die isolierte Fraktion und ein synthetisches α -Defensin zeigen vergleichbare spezifische Aktivität. Vegetative toxinproduzierende Bakterien wurden für verschiedene Zeitintervalle mit 8 $\mu\text{g/ml}$ synthetischem (\square) oder isoliertem (O) Peptid inkubiert und Überlebende Bakterien auf die Anzahl der Bakterien im Puffer bezogen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dreier Versuche.

Die Daten dieser Studie zeigen, dass humane neutrophile Granulozyten *B. anthracis* Sporen phagozytieren und danach Germination induzieren. Schließlich töten neutrophile Granulozyten die vegetativen Bakterien unabhängig der Kapsel- oder Toxinexpression. Die rechtzeitige Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten an den Ort der Infektion könnte erklären warum die kutane Form der Infektion spontan heilt und die Patienten überleben. In der pulmonalen und gastrointestinalen Form kommt es zu keiner Granulozyten Infiltration, die Infektion breitet sich ungehindert aus und führt zu Sepsis und Tod. Wir zeigen auch dass

α -Defensine für die anti-*B. anthracis* Aktivität der neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind, welches die Möglichkeit einer therapeutischen Nutzung eröffnet.

Referenzen

- Albrink, W.S., Brooks, S.M., Biron, R.E., Kopel, M., 1960, Human inhalation anthrax. A report of three fatal cases. *Am J Pathol* 36, 147-471.
- Borregaard, N., Cowland, J.B., 1997, Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503-3521.
- Boyum, A., 1968, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77-89.
- Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., Young, J.A., 2001, Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414, 225-229.
- Cross, A.R., Jones, O.T., 1986, The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* 237, 111-116.
- Dahlgren, C., Karlsson, A., 1999, Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232, 3-14.
- Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., Hanna, P.C., 1999, Anthrax. *N Engl J Med* 341, 815-826.
- Duesbery, N.S., Webb, C.P., Leppla, S.H., Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Copeland, T.D., Ahn, N.G., Oskarsson, M.K., Fukasawa, K., Paull, K.D., Vande Woude, G.F., 1998, Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734-737.
- Ganz, T., 2003, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710-720.
- Ganz, T., Lehrer, R.I., 1995, Defensins. *Pharmacol Ther* 66, 191-205.
- Gleiser, C.A., Gochenour, W.S., Jr., Ward, M.K., 1968, Pulmonary lesions in dogs and pigs exposed to a cloud of anthrax spores. *J Comp Pathol* 78, 445-448.
- Guidi-Rontani, C., Mock, M., 2002, Macrophage interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 271, 115-141.
- Guidi-Rontani, C., Weber-Levy, M., Labruyere, E., Mock, M., 1999, Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol Microbiol* 31, 9-17.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998, Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.
- Ireland, J.A., Hanna, P.C., 2002, Macrophage-enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires *gerS*. *Infect Immun* 70, 5870-5872.
- Keppie, J., Harris-Smith, P.W., Smith, H., 1963, The Chemical Basis of the Virulence of *Bacillus Anthracis*. Ix. Its Aggressins and Their Mode of Action. *Br J Exp Pathol* 44, 446-453.
- Kim, C., Gajendran, N., Mittrucker, H.W., Weiwad, M., Song, Y.H., Hurwitz, R., Wilmanns, M., Fischer, G., Kaufmann, S.H., 2005, Human alpha-defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4830-4835.
- Kristian, S.A., Durr, M., Van Strijp, J.A., Neumeister, B., Peschel, A., 2003, MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Staphylococcus aureus* leads to protection against oxygen-independent neutrophil killing. *Infect Immun* 71, 546-549.
- Lebowich, R.J., McKillip, B.G., Conboy, J.R., 1943, Cutaneous Anthrax: a pathological study with clinical correlation. *Am J Clin Pathol* 13, 505-515.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., 1999, Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11, 23-27.

- Leppla, S.H., 1982, Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3162-3166.
- Makino, S., Watarai, M., Cheun, H.I., Shirahata, T., Uchida, I., 2002, Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis* 186, 227-233.
- Mock, M., Fouet, A., 2001, Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55, 647-671.
- O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J., Leppla, S., 1985, Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun* 47, 306-310.
- Peschel, A., Collins, L.V., 2001, Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* 22, 1651-1659.
- Swartz, M.N., 2001, Recognition and management of anthrax--an update. *N Engl J Med* 345, 1621-1626.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002, Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20, 825-852.
- Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I., Odeberg, H., 1978, Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 253, 2664-2672.