

**Investigations into the innate and acquired immune system
in the context of viral (SARS-CoV-2) and bacterial infections,
with a particular focus on
the action of antimicrobial peptides**

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Denise Meinberger

aus Köln, Deutschland

Hundt Druck GmbH, Köln

2024

Betreuer/in: Prof. Dr. Andreas Klatt

Referenten/in: Prof. Dr. Olaf Utermöhlen

Prof. Dr. Karsten Niefind

Datum der mündlichen Prüfung: 17.06.2024

Zusammenfassung

Durch den Ausbruch der Coronavirus-Pandemie im Jahr 2019 starben über 6,9 Millionen Menschen weltweit [1]. Um den Verlauf und die Schwere einer SARS-CoV-2-Infektion frühzeitig beurteilen zu können, habe ich mittels Immunoblot die Antikörperantwort von COVID-19 Patienten untersucht. Überraschenderweise zeigten meine Untersuchungen, dass die alleinige Präsenz von Antikörpern gegen das SARS-CoV-2 S-Protein und ORF8 in meiner Patientengruppe nicht mit dem weiteren Verlauf und der Schwere der Krankheit korreliert. Weiterhin konnte ich zeigen, dass im Serum von gesunden Personen Antikörper gegen SARS-CoV-2-Proteine vorliegen. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um Antikörper, die im Rahmen früherer Infektionen mit anderen Coronaviren entstanden sind und mit SARS-CoV-2-Proteinen kreuzreagieren. Die Untersuchung verschiedener Laborparameter zeigte eine direkte Korrelation von LDH mit der Schwere von COVID-19 und eine inverse Korrelation von CRP und IL-6 mit der Anzahl der Lymphozyten und der Reaktivität der Antikörper. LDH eignet sich daher als Prognoseparameter.

Die Zahl an Antibiotika-resistenten Pathogenen ist in den vergangenen Jahren bedrohlich gestiegen, während die Zahl der neu zugelassenen Antibiotika deutlich rückläufig ist. Eine mögliche Alternative zu konventionellen Antibiotika sind antimikrobielle Peptide (AMP). Für die beiden vom Protein CLEC3A-abstammenden Peptide HT-16 und HT-47 wurde eine antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen. Die antimikrobielle Aktivität, die Zytotoxizität und die Biostabilität sind für einen therapeutischen Einsatz von AMPs entscheidend. Zur Optimierung dieser Eigenschaften habe ich die beiden AMPs HT-16 und HT-47 modifiziert und die Wirksamkeit der Modifikationen untersucht. Bei den Modifikationen handelt es sich um Sequenzkürzungen, die Einführung eines Glycin-Linkers, die N-terminale Addition eines Tryptophans und den Austausch von L- gegen D-Aminosäuren. Von den sieben neuen, modifizierten CLEC3A-abstammenden Peptiden zeigte *in vitro* besonders das Peptid WRK-30 eine stärkere antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. aureus* und *MRSA* sowie eine geringere Zytotoxizität gegenüber eukaryontischen Zellen.

Häufig kann die antimikrobielle Aktivität von AMPs unter komplexeren Bedingungen *in vivo* nicht bestätigt werden. Daher habe ich die antimikrobielle Aktivität von HT-47 und WRK-30 *in vivo* in einem murinen Biomaterial-assoziierten Infektionsmodell untersucht (unpublizierte Daten). Beide AMPs zeigen *in vivo* eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber *S. aureus* und sind geeignete Kandidaten für die Entwicklung therapeutisch einsetzbarer AMPs (unpublizierte Daten).

1. Summary

More than 6.9 million people died worldwide through the emergence of the COVID-19 pandemic in 2019 [1]. To assess the future course of the disease and its severity I analyzed the antibody response of COVID-19 patients via immunoblot. Surprisingly, my results show that the sole presence of antibodies directed against SARS-CoV-2 proteins S-protein and ORF8 did not correlate with the future course of the disease and its severity in the selected patient group. Furthermore, I demonstrated the presence of antibodies directed against SARS-CoV-2 proteins in the serum of healthy donors. These antibodies probably stem from previous infections with other coronaviruses and can cross-react with SARS-CoV-2 proteins. My investigation of different clinical parameters shows that the concentration of LDH correlated positively with disease severity while CRP and IL 6 showed an inverse correlation with lymphocyte count and antibody reactivity. Thus, LDH is a suitable parameter for prognosis.

The number of antibiotic resistant bacteria has risen dramatically in the past years while the number of newly approved antibiotics is dwindling. Possible alternatives to conventional antibiotics are antimicrobial peptides (AMPs). The CLEC3A-derived peptides HT-16 and HT-47 have been shown to possess an antimicrobial activity. The antimicrobial activity, cytotoxicity, and biostability of AMPs are decisive for their use as therapeutic agents. To optimize these properties, I modified the two AMPs HT-16 and HT-47 and analyzed the effect of the used modifications. The modifications include sequence truncations, the insertion of a triple-glycine linker, the N-terminal addition of tryptophan residue, and the substitution of L- to D-amino acids. Of seven novel, modified CLEC3A-derived peptides WRK-30 showed an enhanced antimicrobial activity against *S. aureus* and *MRSA* as well as a decreased cytotoxicity against eucaryotic cells *in vitro*.

Frequently the antimicrobial activity of AMPs cannot be reproduced under complex conditions *in vivo*. Therefore, I investigated the *in vivo* performance of HT-47 and WRK-30 in a murine biomaterial-associated infection model (unpublished data). Both AMPs show a potent antimicrobial activity against *S. aureus* *in vivo* and are therefore suitable candidates for the development of therapeutical AMPs (unpublished data).