

Abstract

The dramatic increase in antibiotic resistance has caused bacterial infections to once again become a serious global health threat. Moreover, the stagnating development of novel antibiotics urges for alternative antimicrobial agents. Particularly promising alternatives to conventional antibiotics are antimicrobial peptides (AMPs), which are part of the innate immune system. The cartilage-specific C-type lectin domain family 3 member A (CLEC3A) exhibits structural similarities to AMPs, which prompted us to investigate its antimicrobial activity. By viable count assays, we could show that peptides of CLEC3A kill common cartilage pathogens *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, exhibiting potencies in the range of the well-described AMP LL-37. Moreover, using FITC-uptake assays and electron microscopy, we could show that CLEC3A-derived peptides bound lipopolysaccharide and lipoteichoic acid on Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, leading to the permeabilization of their bacterial membranes. To examine CLEC3A's physiological relevance, we used immunoblot to analyze cartilage extracts and incubated cartilage extracts and recombinant CLEC3A with bacterial supernatants. We could detect AMP-like peptides of CLEC3A in cartilage and show that the peptides are generated *in vitro* and *ex vivo* during the course of a bacterial infection. An especially severe condition affecting joints and thereby cartilage is septic arthritis, an inflammatory disease leading to rapid joint destruction. One of the most common risk factors for septic arthritis is joint replacement surgery (arthroplasty). To address the problem of arthroplasty-associated infections, we coated CLEC3A-derived chimeric peptides on titanium, a common joint prostheses material, and incubated it with bacteria. Coating titanium substrates with CLEC3A-derived chimeric peptides significantly reduced bacterial adhesion. Moreover, microbicidal concentrations of CLEC3A-derived peptides showed no cytotoxicity against primary human chondrocytes. Taken together, we here identify novel AMPs derived from cartilage-specific CLEC3A, elucidate their molecular mechanism of action, give evidence for the physiological relevance of CLEC3A in cartilage immunity and assess the translational potential of CLEC3A-derived AMPs in the prevention and treatment of septic arthritis. We therefore propose the use of CLEC3A-derived AMPs as an alternative treatment of infections and suggest a novel approach in the prevention of arthroplasty- and other biomaterial-associated infections.

Zusammenfassung

Der dramatische Anstieg an Antibiotika-Resistenzen lässt bakterielle Infektionen wieder zu einer globalen Bedrohung der Menschheit werden. Zusätzlich führt die stagnierende Entwicklung neuer Antibiotika zu einem dringenden Bedarf an alternativen antimikrobiellen Wirkstoffen. Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind Teil des angeborenen Immunsystems und zählen zu den erfolgsversprechenden Alternativen konventioneller Antibiotika. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des knorpelspezifischen C-Typ Lektins CLEC3A (C-type lectin domain family 3 member A) zu AMPs haben wir seine antimikrobielle Aktivität untersucht. Mittels modifiziertem Hemmstofftest (Viable count assay) konnten wir eine antimikrobielle Wirkung von CLEC3A-abstammenden Peptiden gegen die typischen Knorpelpathogene *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* nachweisen. Die antimikrobielle Aktivität ist ähnlich wirkungsvoll wie die antimikrobielle Aktivität des umfangreich untersuchten AMPs LL-37. Durch die Bestimmung der Aufnahme von FITC (FITC-uptake assay) und mittels Elektronenmikroskopie konnten wir eine Bindung der CLEC3A-abstammenden Peptide an Lipopolysaccharid und Lipoteichonsäure sowie eine Membranpermeabilisierung Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien zeigen und damit den molekularen Wirkungsmechanismus aufklären. Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz haben wir Knorpelextrakte auf die Anwesenheit von CLEC3A-Peptiden untersucht und rekombinantes CLEC3A sowie Knorpelextrakt mit Überständen von Bakterien inkubiert. Mittels Immunoblot konnten wir AMP-ähnliche Peptide von CLEC3A im Knorpel nachweisen und zeigen, dass AMP-ähnliche Peptide von CLEC3A auch *in vitro* und *ex vivo* im Rahmen von bakteriellen Infektionen entstehen. Die septische Arthritis ist eine besonders schwere infektiöse Erkrankung der Gelenke. Ein wichtiger Risikofaktor zur Entwicklung einer septischen Arthritis ist die Prozedur einer Gelenkersatzoperation (Totalendoprothetik, TEP). Als neuen Ansatz zur Verhinderung von TEP-assoziierten Infektionen haben wir kleine Titanplatten mit chimären CLEC3A-abstammenden Peptiden beschichtet und mit Bakterien inkubiert. Durch die Beschichtung kam es zu einer deutlich verminderten Adhäsion von Bakterien. Weiterhin konnten wir zeigen, dass CLEC3A-abstammende Peptide in antimikrobiell wirksamen Konzentrationen keine zytotoxische Wirkung auf primäre humane Chondrozyten entfalten. Zusammengefasst haben wir im Rahmen dieser Arbeit neue knorpelspezifische AMPs identifiziert, den molekularen Wirkungsmechanismus aufgeklärt, die physiologische Relevanz der

CLEC3A-basierenden AMPs im Rahmen der knorpelspezifischen Immunantwort dargestellt und erste positive Ergebnisse zum Einsatz der Peptide zur Prävention und zur Behandlung der septischen Arthritis geliefert. Als Ergebnis unserer Studie schlagen wir die Verwendung von CLEC3A-basierenden AMPs als alternative Behandlungsmöglichkeit von Infektionen vor und empfehlen einen neuen Ansatz zur Prävention von TEP- oder anderen Biomaterial-assoziierten Infektionen.