

Forschungszentrum Borstel  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie  
Laborgruppe Biophysik

**Biophysikalische Charakterisierung  
der Wechselwirkung des antimikrobiellen  
humanen Cathelicidins hCAP18  
mit Modellmembranen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Alexander David  
aus Pfullendorf

Kiel  
2004



Referent: Prof. Dr. Ulrich Seydel

Koreferent: Prof. Dr. Ulf-Peter Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2004

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 8. November 2004

.....  
Der Dekan



# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<i>i</i>	<b>Abkürzungen</b>	<b>4</b>
<i>ii</i>	<b>Kurzdarstellung</b>	<b>5</b>
<i>iii</i>	<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>11</b>
3.1	Biologische Membranen	11
3.2	Bakterielle Zellhülle	13
3.3	Struktur der Membranlipide	16
3.3.1	Glycerophospholipide	16
3.3.2	Lipopolysaccharide	17
3.4	Physikochemische Grundlagen	19
3.4.1	Fluidität der Lipidmatrix	20
3.4.2	Elektrische Eigenschaften von Membranen	21
3.4.3	Potentiale an Grenzflächen	23
3.4.4	Transmembranes Potential	26
3.5	Natürliche Peptidantibiotika	26
3.5.1	Vorkommen und Eigenschaften von Antimikrobieller Peptide	27
3.5.2	hCAP18	30
3.5.3	Polymyxin B	34
<b>4</b>	<b>Methoden und Material</b>	<b>35</b>
4.1	Methoden zur Untersuchung des Keimwachstums	35
4.1.1	Koch'sches Plattengussverfahren	35
4.1.2	Mikrosuszeptibilitätstest	36
4.2	Lipid-Monolayer	38
4.2.1	Grenzflächenfilme	38

---

4.2.2	Filmpolymorphie	39
4.2.3	Monolayerpräparation und Einbaumessungen	42
4.2.4	Ca <sup>2+</sup> -Verdrängung aus Monolayern	43
4.3	Messungen an LPS-Aggregaten	45
4.3.1	Präparation der Aggregate	46
4.3.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	47
4.3.3	Bestimmung des Zetapotentials (elektrophoretische Mobilität)	50
4.3.4	Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie	53
4.3.5	Fluoreszenzpolarisationsmessungen	54
4.3.6	CD-Spektroskopie	56
4.3.7	Röntgenkleinwinkelstreuung	57
4.4	Planare Lipiddoppelschicht-Membranen	60
4.4.1	Methode nach Montal und Mueller	61
4.4.2	Mechanischer Meßaufbau	62
4.4.3	Elektrischer Aufbau	63
4.4.4	Präparation der Membranen	65
4.4.5	Bestimmung der Membrankapazität	66
4.5	Material	67
4.5.1	Lipide	67
4.5.2	Peptidsynthese	69
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>70</b>
5.1	Keimwachstum in Anwesenheit von LL32	70
5.1.1	Koch'sches Plattengußverfahren	70
5.1.2	Mikrosuszeptibilitätstests	73
5.1.3	Diskussion	81
5.2	Messungen an Lipid-Monolayern	83
5.2.1	Einbau von LL32 in LPS-Monolayer	83
5.2.2	Verdrängung von Calcium aus LPS-Monolayern	86
5.2.3	Diskussion	90
5.3	Messungen an LPS-Aggregaten	92
5.3.1	Kalorimetrische Studie zur LL32/LPS-Interaktion	92

---

5.3.2	Einfluß von LL32 auf das Oberflächenpotential von LPS-Aggregaten	98
5.3.3	Einfluss von LL32 auf die Fluidität der LPS	101
5.3.4	Einfluß von LPS auf die Struktur von LL32	103
5.3.5	Einfluß von LL32 auf die LPS-Aggregatstruktur (Kleinwinkelstreuung)	105
5.3.6	Diskussion	106
5.4	Untersuchungen an Planaren Membranen	109
5.4.1	Diskussion	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion und Ausblick</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>134</b>
7.1	Substitutionsmuster der <i>S. minnesota</i> sv. Minnesota LPS	134
7.2	Übersicht über die vorkommenden Lipid A-Strukturen	135
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>

## Abkürzungen

AMP	antimikrobielles Peptid
CFB	Cell Current Feedback
CD	Circulardichroismus
FTIR	Fourier Transform Infrarot
DPG	Diphosphatidylglycerol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gram <sup>-/+</sup>	Gram-negativ/-positiv
hCAP18	human Cationic Antibacterial Peptide 18 kDa
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylsulfonsäure
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
Kdo	2-Keto-3-deoxoktonat
LPS	Lipopolysaccharid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PL	Phospholipidmischung
PMB	Polymyxin B
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
rCAP18	rabbit Cationic Antibacterial Peptide 18 kDa
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
<i>S. minnesota</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota

## **i Kurzdarstellung**

Antimikrobielle Peptide stehen im Fokus intensiver Forschungen mit dem Ziel einer möglichen Verwendung als Leitstrukturen für eine neue Klasse von Antibiotika, als tumor- oder entzündungshemmende Therapeutika.

Erster Wechselwirkungsort antimikrobieller Peptide mit Mikroorganismen ist deren Zellmembran. Im Falle der Gram-negativen Bakterien ist dies ihre äußere Membran. Die äußere Membran wird durch eine asymmetrische Lipiddoppelschicht gebildet, mit Phospholipiden auf der Innen- und Lipopolysacchariden (LPS) auf der Außenseite. Ein Verständnis der Rolle der äußeren Membran ist Voraussetzung für die Aufklärung des Wechselwirkungsmechanismus der antimikrobiellen Peptide, da diese Peptide die äußere Membran entweder schädigen oder zumindest permeieren müssen, um ihre lethale Wirkung entfalten zu können.

In der vorliegenden Arbeit ist der Einfluß der LPS-Struktur auf die Eigenschaft der äußeren Membran als Barriere gegenüber dem antimikrobiellen Peptid LL32, eines aktiven Fragments des humanen Kathelizidins, untersucht worden. In biologischen Tests an verschiedenen Mutanten von *Salmonella enterica* serovar Minnesota, die sich in der Anzahl der Zucker und der Ladungen im Kernoligosaccharid des LPS unterscheiden, wurde gezeigt, daß die Stämme eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Wirkung des Peptids haben. Es wurde eine Abhängigkeit der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) von dem Parameter Ladung/Anzahl der Kernzucker des LPS gefunden.

Mit Hilfe von LPS-Monolayern, LPS-Aggregaten und insbesondere den planaren asymmetrischen Membranen als unterschiedlich systemnahe Rekonstitutionssysteme für die äußere Membran wurde die Interaktion zwischen dem Peptid und dem isolierten LPS der jeweiligen Stämme charakterisiert. Die verschiedenen biophysikalischen Meßparameter ergaben, daß die Interaktion zwischen LL32 und LPS von der Ladung und der Anzahl der Zucker abhängt. In Experimenten an planaren asymmetrischen Membranen wurde gezeigt, daß LL32 mit der Lipidmatrix der äußeren Membran interagiert und Läsionen in dieser induziert. Die Läsionsbildung ermöglicht den „self-promoted-uptake“ von LL32 und erklärt damit die antibakterielle Wirkung von LL32.

Die biophysikalischen Meßparameter korrelieren mit den biologischen Daten. Die gefundenen Ergebnisse zeigen, daß LL32 mit der äußeren Membran der Mutanten von *S. minnesota* interagiert und seine biologische Aktivität von der LPS-Struktur abhängt. Die hier gezeigten Untersuchungen geben Anlaß zu der berechtigten Hoffnung, Struktur-Wirkungsbeziehungen für antimikrobielle Peptide finden zu können.

## ii Abstract

Antimicrobial Peptides (AMPs) are part of the immune system of vertebrates. They are in the focus of research with the aim of exploring their possible use as lead structures for a new class of antibiotics.

The first locus of interaction of AMPs with microorganisms is the cell membrane of the latter. In the case of Gram-negative bacteria this is the outer membrane. The outer membrane is composed of an asymmetric lipid bilayer, with a mixture of phospholipids on the inner and lipopolysaccharides (LPS) on the outer leaflet. A thorough understanding of the role of the outer membrane with respect to the mechanisms of interaction with AMPs is indispensable, since the integrity of the outer membrane has to be disturbed or at least to be permeated by AMPs to allow them to reach the final locus of lethal action.

Here, the influence of the chemical structure of LPS on the barrier function of the outer membrane for the antimicrobial peptide LL32, a derivative of the human cathelicidin CAP18, is being investigated. Using *Salmonella enterica* serovar Minnesota rough mutants, which differ with respect to the length of the sugar moiety and the number of negative charges of their LPS, it was shown in biological killing assays that the rough mutants differed in their susceptibility towards LL32. The minimal inhibitory concentration (MIC) depended on the ratio of charges to the number of sugars in the LPS core region.

Using different reconstitution systems (LPS-monolayers, LPS-aggregates, and in particular asymmetric planar lipid bilayers as a reconstitution system of the lipid matrix of the outer membrane), which resemble the natural system to a different degree, the interaction between LL32 and the isolated LPS of the respective mutants was characterized. The biophysical data showed a clear dependence of the interaction between LL32 and LPS on LPS charge and the number of LPS core sugars. It could further be shown that LL32, added to the LPS side of asymmetric planar membranes, leads to the formation of lesions. This is in agreement with a self-promoted uptake of LL32 and accounts for the antibacterial action of LL32.

There is a clear correlation between the biophysical and the biological data. The presented results show that LL32 interacts with the outer membrane of *S. minnesota* rough mutants and that the activity of LL32 depends on the LPS-structure. In conclusion, from the presented data it might be speculated that biophysical techniques can be used to establish structure-activity relationships for the interaction of AMPs with microorganisms.

## 2 Einleitung und Zielsetzung

*Einleitung.* Seit der zufälligen Entdeckung des Penicillins durch A. Fleming im Jahr 1923 wurden viele neue Antibiotika gefunden, und die Medizin verfügt seither über Mittel, um eine bakterielle Infektion in der Regel wirksam bekämpfen zu können. Antibiotika kommen jedoch erst zum Einsatz, wenn die körpereigenen Schutzmechanismen des Organismus durch die Keime überwunden wurden. Einen Schutz gegen Mikroorganismen bietet den multizellulären Organismen ihr körpereigenes **Immunsystem**. Es wird unterschieden in die sogenannte **angeborene Immunität** (Zasloff, 2002a), deren Effektoren innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden induziert werden können. Die Effektoren der angeborenen Immunität wirken unspezifisch gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen und werden durch konservierte molekulare Strukturen der Pathogene induziert, wie z. B. bakterielles Lipopolysaccharid (s. weiter unten), welches ein Bestandteil der Membranen Gram-negativer ( $\text{Gram}^-$ ) Bakterien ist. Im Vergleich dazu benötigt die **erworbene Immunität** mehrere Tage, um auf eindringende Keime adäquat zu reagieren, da entsprechend instruierte B- und T-Abwehrzellen zunächst heranreifen müssen. Für bakterielle Infektionen bedeutet dies, daß die erworbene Immunität eine für den Ausbruch der Infektion untergeordnete Rolle spielt.

Seit der Entdeckung des Phagocytins in humanen Leukocyten vor 50 Jahren durch J. G. Hirsch (Hirsch, 1956) wurden viele endogene Peptide mit einer gegen Mikroben gerichteten Aktivität entdeckt. Lebende Organismen gleich welcher Art exprimieren antimikrobielle Peptide (AMP), die eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität besitzen und eine Abwehr der Keime an erster Front repräsentieren. Daher werden die AMP der höheren Organismen vornehmlich von Zellen der Haut bzw. Schleimhäute wie auch von phagozytierenden Zellen exprimiert (Piers et al., 1993; Boman, 1998; Hancock und Diamond, 2000; Kamysz et al., 2003; Ganz, 2004). Inzwischen sind über 800 Peptide, die das Wachstum potentiell pathogener Keime hemmen, entdeckt und beschrieben worden (Boman, 1995; Boman, 1998; Bals, 2000; Zasloff, 2002b; Bulet et al., 2004); unter der Internetadresse <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm> ist ein Überblick die AMP zu finden.

Die AMP besitzen ein breites Wirkungsspektrum mit Aktivitäten gegen verschiedene Mikroorganismen, wie z. B. Pilze, Parasiten, Gram-positive (Gram<sup>+</sup>) und Gram<sup>-</sup> Bakterien und sogar gegen Tumorzellen (Epanand und Vogel, 1999; Hancock und Scott, 2000; Lehrer und Ganz, 2002; Kamysz et al., 2003). Unabhängig von ihrer Herkunft oder ihrem Wirkungsspektrum weisen die AMP einige Gemeinsamkeiten auf. So setzen sie sich generell aus weniger als 100 Aminosäuren zusammen, die räumlich in einer amphipathischen Struktur angeordnet sind. Ihre Nettoladung ist meist positiv, und sie sind zu einem großen Teil membranaktiv, d. h. sie ändern z. B. die Permeabilität von Membranen (Sitaram und Nagaraj, 1999; Hancock und Rozek, 2002). Ausgehend von der Membranaktivität hat sich die allgemein verbreitete Vorstellung durchgesetzt, daß für die meisten AMP der Zelltod mechanistisch durch eine Wechselwirkung mit der Zielzellmembran mit einhergehender Permeabilisierung und schließlich dem Verlust des elektrochemischen Gradienten eingeleitet wird. Trotzdem können alternative Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. So wurden z. B. Peptide gefunden, die Membranen, ohne sie zu zerstören, passieren und mit Zielmolekülen innerhalb der Zelle interagieren (Hancock und Rozek, 2002). Aktuell wird die Rolle der AMP im Kontext der Immunabwehr neu diskutiert, da Erkenntnisse darüber vorliegen, daß sie neben der antibakteriellen Wirkung eine ganze Reihe anderer immunologisch komplementärer Funktionen, wie z. B. die Aktivierung von Immunzellen, wahrnehmen (Gallo et al., 2002; Elsbach, 2003).

In Folge einer massiven bakteriellen Invasion kann die Schranke der körpereigenen Abwehr überwunden werden. In einem solchen Fall kann es passieren, daß das Immunsystem mit der Abwehr der Infektion überlastet ist. Im Rahmen einer die Immunabwehr unterstützenden Therapie wird dann häufig auf die Verabreichung herkömmlicher Antibiotika zurückgegriffen. Jedoch stellt sich in diesem Zusammenhang das Problem mit dem immer häufigeren Auftreten multiresistenter Stämme, die gegen die potentesten bislang zur Verfügung stehenden therapeutisch verwendeten Antibiotika resistent sind und der Tatsache, daß praktisch seit den achtziger Jahren keine neue Substanzklasse als pharmakologisch wirksames antibakterielles Präparat mehr eingeführt wurde (Gräfe, 1992). AMP erscheinen als attraktive Alternative im Vergleich zu herkömmlichen Antibiotika, da die Strukturen der körpereigenen AMP evolutionär hoch konserviert sind und bislang ihre Wirkung noch nicht verloren haben

wird eine Resistenzbildung gegenüber AMP als eher unwahrscheinlich betrachtet (Hancock und Rozek, 2002).

*Rolle der äußeren Membran.* Um eine zytolytische Aktivität zu entfalten, muß das Peptid im Fall der Gram-positiven und der Gram-negativen Bakterien verschiedene Barrieren überwinden. Ohne beriets hier zu sehr ins Detail zu gehen, sei nur kurz der Aufbau der Gram-negativen Zellhülle skizziert: sie besteht aus einer Zytoplasmamembran, einer Peptidoglykanschicht und einer äußeren Membran (siehe auch 3.2). Während die Zytoplasmamembran aus einem Gemisch verschiedener Phospholipide gebildet wird, ist das Hauptmerkmal der äußeren Membran ihre Asymmetrie: die Außenseite wird von einem Glycolipid, generell einem Lipopolysaccharid (LPS), gebildet, die Innenseite hingegen besteht aus Phospholipiden. Bei Gram-positiven Bakterien fehlt die äußere Membran, dafür ist die Peptidoglykanschicht wesentlich dicker ausgeprägt. Hat das Peptid die Barrieren überwunden und ist zur Zytoplasmamembran gelangt, so wird vermutet, daß es dort durch eine Störung der Membranintegrität seine tödliche Wirkung entfaltet (Hancock, 1997).

Als Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien beeinflußt LPS das Permeationsvermögen der AMP und hat damit eine zusätzliche Schutzfunktion. Rana et al. (Rana et al., 1991) konnten zeigen, daß verschiedene Mutanten von *Salmonella typhimurium* die sich in der chemischen Struktur ihres LPS unterscheiden eine differentielle Suszeptibilität gegenüber der Wirkung eines AMP, dem sogenannten Magainin, aufweisen. Mit abnehmender Länge des LPS verloren die Mutanten zunehmend ihre Resistenz gegenüber dem AMP. Dennoch existiert nicht immer eine direkte Korrelation zwischen der Bindung der AMP an LPS und ihrer antimikrobiellen Aktivität (Kondejewski et al., 1999).

Die Störung der Integrität der äußeren Membran Gram Bakterien durch AMP kann dazu führen, daß LPS freigesetzt wird. Die LPS-Moleküle führen im Wirt zu zahlreichen immunstimulatorischen Reaktionen, die wie erwähnt den Schutz des Organismus vor bakteriellen Infektionen zum Ziel haben, aber auch zu pathophysiologischen Reaktionen, die im schlimmsten Fall den Tod des Wirts herbeiführen. Für viele AMP wurde gezeigt, daß sie die LPS-Moleküle binden und so eine unerwünschte physiologische Reaktion des Wirts verhindern. AMP besitzen also oft neben ihrer antimikrobiellen Funktion eine LPS-neutralisierende Funktion.

*Zielsetzung.* Impetus der vorliegenden Arbeit waren Vorarbeiten der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel mit dem antimikrobiellen Peptid rCAP18, welches in Kaninchen gefunden wird. Am Modell der rekonstituierten Lipidmatrix der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wurde gezeigt, daß eine Läsionsbildung und damit eine Permeabilisierung der Membran nur stattfand, wenn das LPS von rCAP18-sensitiven Stämmen zur Rekonstitution von Membranen verwendet wurde (Gutsmann et al., 1999). Entscheidend für die Resistenz der Spezies *Proteus mirabilis* war die Substitution mit einem positiv geladenen Zucker am LPS und die damit verbundene Reduktion der Nettoladung des LPS. Diese Befunde demonstrieren die Signifikanz der LPS-Struktur für die bakterielle Resistenz.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen stand in dieser Arbeit die Lipidspezifität bei der Wechselwirkung von LPS mit humanem CAP18 (hCAP18) im Mittelpunkt. Von zentralem Interesse war hierbei die Frage, welchen Einfluß die Struktur des Kernoligosaccharides des LPS auf die Interaktion mit hCAP18 hat, insbesondere die Anzahl der Kernzucker sowie die Nettoladung des LPS.

Die Wechselwirkung sollte unter Verwendung verschiedener Membranmodellsysteme beschrieben werden. Eine ausführliche Darstellung der eingesetzten Methoden und der daraus zu gewinnenden Informationen ist in (s. 4) zu finden. Die Rekonstitutionsmodelle unterscheiden sich im Grad ihrer Vereinfachung bezüglich der Nachbildung der äußeren Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien. Als einfachstes Modell wurde der Monolayer verwendet, der eine Seite der Lipiddoppelschicht nachahmt und Aussagen über eine Interkalation von Fremdstoffen ermöglicht. LPS-Aggregate stellen die nächsthöhere Stufe eines Modellsystems für die äußere Membran dar, sie zeichnen sich durch größtenteils geschlossene Lipiddoppelschichten aus, die zu beiden Seiten aus gleichen Molekülen bestehen (s. Bild 4-7). Damit fehlt ihnen ein wesentliches Merkmal der äußeren Membran, die Asymmetrie bezüglich der die beiden Seiten der Lipiddoppelschicht aufbauenden Moleküle. Diesem Umstand wird das Modellsystem der planaren asymmetrischen Membran gerecht, mit welchem gezielt die Zusammensetzung beider Seiten der Lipiddoppelschicht kontrolliert werden kann. Daher wurde dezidiert von der Methode der planaren asymmetrischen Membran für die Nachbildung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien Gebrauch gemacht, um daran die mögliche Permeabilisierung durch das humane CAP18 zu untersuchen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die weitgehende Beantwortung der folgenden Fragen:

- Können die biophysikalischen Meßparameter mit den Strukturparametern der LPS korreliert werden?
- Läßt sich eine Korrelation zwischen biologischen und biophysikalischen Meßparametern herstellen?
- Ist die Hypothese, daß die Lipidzusammensetzung der äußeren Membran entscheidend ist für die bakterielle Sensitivität respektive Resistenz gegenüber AMP, insbesondere gegenüber der Wirkung von hCAP18, valide?

## **3 Grundlagen**

### **3.1 Biologische Membranen**

Die Zelle stellt die kleinste autonome biologische Einheit dar. Biologisch gesehen existieren zwei Arten von Zelltypen, prokaryotische Zellen und eukaryotische Zellen. Eukaryonten wie z. B. Pflanzen und Tiere verfügen über einen komplexen inneren Zellaufbau, sie enthalten verschiedene von Membranen umschlossene Kompartimente, wie z. B. den Zellkern, der die DNA enthält. Prokaryotische Zellen, wie z. B. Bakterienzellen hingegen zeigen keine differenzierte innere Organisation. Trotz dieser fundamentalen Unterschiede weisen alle diese Zellen eine wesentliche strukturelle Gemeinsamkeit auf: jede Zelle ist von einer Plasmamembran umschlossen.

Diese Membran bestimmt damit sowohl die Dimension, als auch die stoffliche Zusammensetzung der Zelle, indem sie als selektiver Filter fungiert. Somit ist die Zellmembran ein integrativer Bestandteil jeder Zelle, deren Funktionen die Energiekonservierung, Signalaufnahme und -leitung, Transport von Ionen und Molekülen und

Barriereigenschaften gegenüber unerwünschten Stoffen sind. Die Zellmembran ist also für die Aufrechterhaltung des Fließgleichgewichts in der Zelle verantwortlich.

Gortel und Grendel schlugen aufgrund ihrer Untersuchungen im Jahre 1925 vor, daß alle Zellen von einer Lipiddoppelschicht als Membran umgeben sind (Gorter und Grendel, 1925). Sie stützten ihre Idee auf der Annahme von Bragg, daß die Moleküle dergestalt angeordnet sind, daß die Kohlenwasserstoffketten der amphiphilen Moleküle einander zugewandt und die hydrophilen, polaren Kopfgruppen nach außen, zur wäßrigen Phase hin orientiert sind. In den folgenden Jahren wurde intensiv an der Erforschung der Struktur von Zellmembranen sowie den Eigenschaften der die Membranen bildenden Moleküle gearbeitet. Mehrere Modelle wurden vorgeschlagen, die unter anderem berücksichtigten, daß beispielsweise Proteine bis zu 75% des Membrantrockengewichtes ausmachen können (Frömter, 1982). Generell läßt sich sagen, daß biologische Membranen was die Zusammensetzung ihrer Lipide betrifft, bezüglich beider Seiten der Doppelschicht asymmetrisch ausgebildet sind.

Derzeitige Vorstellungen zur Struktur von Membranen basieren auf dem Fluid-Mosaik-Modell, welches im Jahre 1972 von Singer und Nicholson vorgeschlagen wurde (Singer und Nicolson, 1972), siehe (Bild 3-1). Die Lipide bilden eine zweidimensionale „Quasi-Flüssigkeit“, welche eine laterale Beweglichkeit sowohl der Membranlipide als auch der die Membran durchspannenden oder auf der Membran aufliegenden Proteine gestattet. Diese Beweglichkeit, auch „Fluidität“ genannt, stellt eine der wichtigsten Eigenschaften der Membran dar (Harrison und Lunt, 1977). Neueste Forschungsergebnisse gaben Anlass zu einer Modifikation des Fluid-Mosaik-Modells, dahingehend, daß in Membranen sogenannte Mikrodomänen<sup>1</sup> vorliegen sollen, die den Membrankomponenten Beschränkungen in der lateralen Beweglichkeit auferlegen (Vereb et al., 2003).

---

<sup>1</sup> Lipid-Lipid-, Protein-Protein- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen führen zur Bildung von Molekülclustern, die für bestimmte Zellfunktionen essentiell sind.

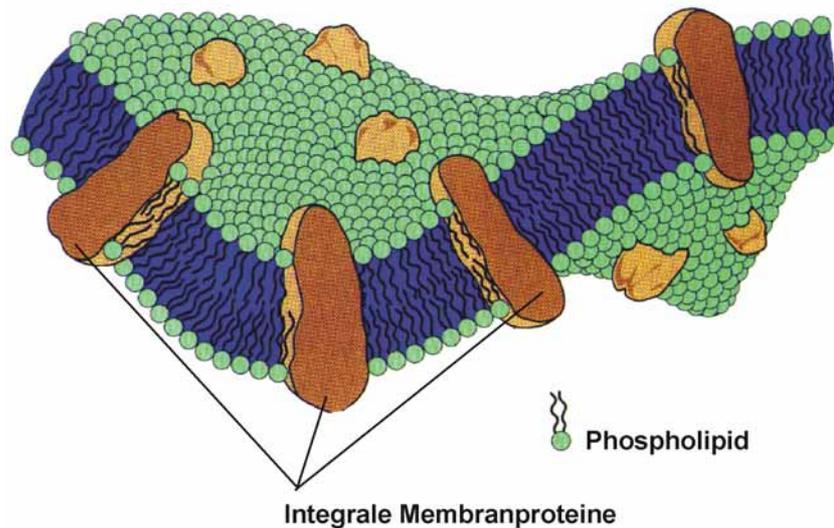


Bild 3-1: Fluid-Mosaik-Modell biologischer Membranen nach Singer und Nicholson. Die Proteine liegen entweder auf der Membran auf oder durchspannen diese.

### 3.2 Bakterielle Zellhülle

Bakterien lassen sich durch ein von dem dänischen Pharmakologen Gram im Jahre 1884 gefundenen Färbeverfahren in zwei große Gruppen einteilen, in die Klasse der Gram-positiven (Gram<sup>+</sup>), sowie die der Gram-negativen (Gram<sup>-</sup>) Bakterien (Singleton und Sainsbury, 1987; Lodish et al., 2000). Das ungleiche Färbeverhalten der Bakterien lässt sich auf eine unterschiedliche Architektur der Zellwand der entsprechenden Bakterien zurückführen<sup>1</sup>. Bakterien beider Klassen besitzen eine innere Membran (Zytoplasmamembran), der sich eine Mureinschicht (Peptidoglykanschicht) genannt anschließt. Die wesentlichen Unterschiede bestehen zum einen in einer um etwa den Faktor 10 dickeren Mureinschicht bei Gram<sup>+</sup> Bakterien, zum anderen besitzen die Gram<sup>-</sup> Bakterien eine weitere, der Mureinschicht vorgelagerte Membran (die äußere Membran) (Bild 3-2) (siehe auch (Seltmann und Holst, 2002)). Hier soll auf eine weiter-

<sup>1</sup> Die Gram-Färbung liefert nicht in allen Fällen ein klares, unzweifelhaftes Resultat. Gram-variable Bakterien, wie z. B. *Clostridium tetani*, verhalten sich mal Gram<sup>+</sup> und mal Gram<sup>-</sup>, je nach Kulturbedingungen unter denen sie herangezogen wurden. Desweiteren existieren auch „untypische“ Gram<sup>+</sup> sowie Gram<sup>-</sup> Bakterien, die Abweichungen in der Zellhüllarchitektur aufweisen (siehe hierzu auch (Seltmann und Holst, 2002)).

gehende Darstellung der Membran Gram<sup>+</sup> Bakterien verzichtet werden, da sie nicht Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit war.

Die äußere Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien ist hinsichtlich der chemischen Struktur und physikochemischen Parameter der Membranlipide asymmetrisch zusammengesetzt (Lugtenberg und Van Alphen, 1983; Seltmann und Holst, 2002). Chemische Analysen haben gezeigt, daß die Innenseite der äußeren Membran aus einem Gemisch der Phospholipide Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Diphosphatidylglycerol (DPG) besteht. Im Fall der Gram<sup>-</sup> Spezies *Salmonella enterica* serovar Typhimurium liegen diese Lipide in einem molaren Mischungsverhältnis von 81:17:2 vor<sup>1</sup> (Osborn et al., 1972). Die Außenseite der äußeren Membran hingegen wird nahezu ausschließlich von einem Glycolipid, dem Lipopolysaccharid (LPS), gebildet (Nikaido und Vaara, 1985). Es ist hervorzuheben, daß der hydrophobe Bereich, der von den Membranlipiden der äußeren Membran gebildet wird, eine zusätzliche effektive

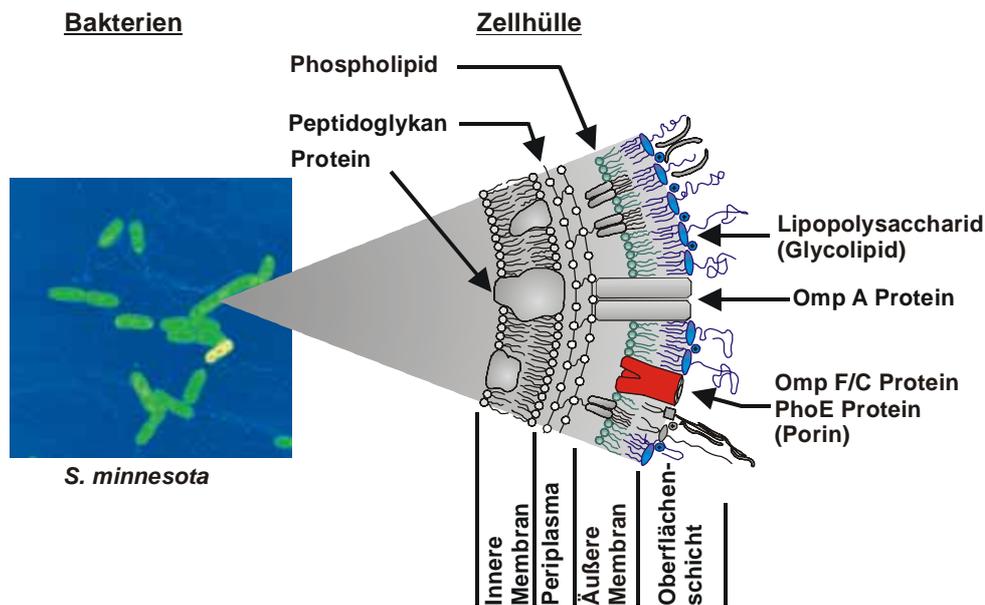


Bild 3-2: Die Zellhülle Gram<sup>-</sup> Bakterien setzt sich aus einer Zytoplasmamembran, dem Periplasma und der äußeren Membran zusammen.

<sup>1</sup> Eine entsprechende Mischung der genannten Phospholipide wurde als Darstellung der Innenseite der äußeren Membran im Rekonstitutionsmodell der planaren Membranen eingesetzt (s. 4.4).

Permeationsbarriere für hydrophile Substanzen darstellt. Desweiteren bewirken die hydrophilen Zuckerketten der LPS, daß auch hydrophobe Substanzen an der Überwindung der äußeren Membran gehindert werden. So können zum Beispiel Proteine oder Oligosaccharide bis zu einer Masse von 50 kDa die Mureinschicht Gram<sup>+</sup> Bakterien ungehindert passieren, während dies bei Gram<sup>-</sup> nur für Moleküle bis zu einer Masse von 600 Da möglich ist (Nikaido, 1994; Benz, 1994; Wiese und Seydel, 2000). Diese erheblich kleineren Moleküle durchqueren die äußere Membran durch transmembrane Protein-ausgekleidete Kanäle, die sog. Prine (Nikaido und Vaara, 1985).

Die die äußere Membran aufbauenden LPS stellen ferner Erkennungsstrukturen für das Immunsystem z. B. des Menschen dar. Auf verschiedenen Wegen kann LPS aus dem Membranverbund freigesetzt werden, etwa durch die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden. Freigesetztes LPS stellt einen sehr potenten Stimulus verschiedenster Zellen des Immunsystems dar und regt diese zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen an. Die so provozierte Immunantwort kann unter bestimmten Bedingungen zu einer schweren Septikämie bis hin zu einem septischen Schock führen, der mit einem Multiorganversagen einhergehen kann (Rietschel et al., 1999; Hotchkiss und Karl, 2003). Man bezeichnet das LPS daher auch als Endotoxin<sup>1</sup>. Die Behandlung einer schweren Septikämie stellt eine Herausforderung für die Intensivmedizin dar und fordert beispielsweise 210000 Todesopfer in den Vereinigten Staaten jährlich (Hotchkiss und Karl, 2003).

Die immunstimulatorische Aktivität des LPS ist abhängig von der supramolekularen Struktur der LPS-Aggregate (s. 4.3.7), die wiederum durch die molekulare LPS-Konformation bestimmt wird. Die molekulare Konformation des LPS wird durch das Verhältnis des Platzbedarfs der Kopfgruppe zum Platzbedarf der Acylketten bestimmt. LPS, die gemischt lamellar/nicht-lamellare Strukturen annehmen haben eine geringere immunstimulatorische Wirkung. LPS, mit einer starken Tendenz, nicht-lamellare, invertierte Strukturen zu formen, haben eine hohe immunstimulatorische Wirkung (Brandenburg et al., 1993).

---

<sup>1</sup> Die Bezeichnung geht auf R. Pfeiffer zurück, der diesen Begriff als erster im Jahre 1892 für einen von Bakterien freigesetzten und durch Hitze nicht zerstörbaren Pyrogenitätsfaktor verwendete (Heumann und Glauser, 1994).

### 3.3 Struktur der Membranlipide

Im folgenden wird die chemische Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Membranlipide<sup>1</sup> erläutert. Dies sind zum einen Phospholipide, als Bestandteile der Innenseite der äußeren Membran und zum anderen LPS als Hauptbestandteil der Außenseite der äußeren Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien (s. 3.2).

#### 3.3.1 Glycerophospholipide

Glycerophospholipide (Phospholipide) stellen die wichtigste Klasse von Membranlipiden dar, da sie nahezu in allen Zellmembranen zu finden sind. Sie bilden eine Klasse von fettähnlichen Triglyceriden, die zwei langkettige Fettsäuren und einen Phosphorsäurerest, an den noch eine Base<sup>2</sup> gebunden ist, enthalten (Darnell et al., 1986). Die chemischen Strukturen verschiedener Basen und das allen gemeinsame Grundgerüst<sup>3</sup> der Phosphatidsäure ist in Bild 3-3 dargestellt.

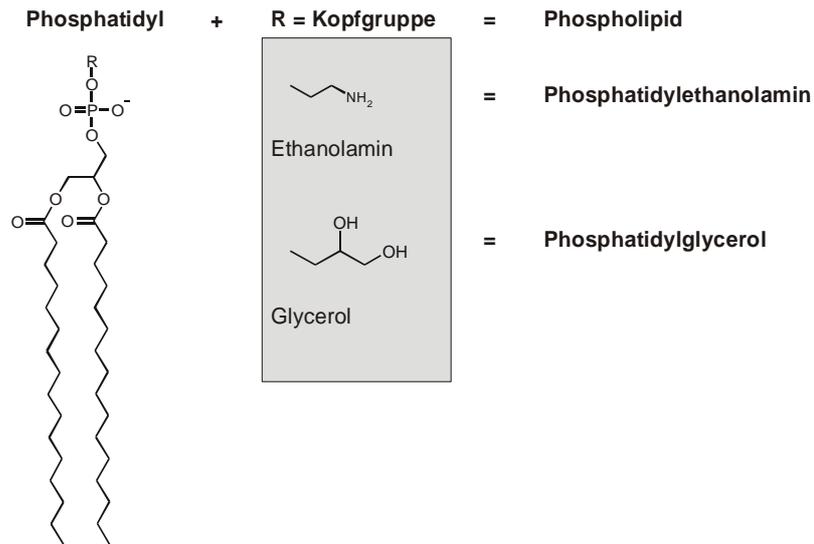
Natürlich gewonnene Phospholipidextrakte bestehen aus einem Gemisch von Phosphatiden, die verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren enthalten. Dabei können die Längen der vorhanden Fettsäuren in einem Bereich von C:12 bis C:24 variieren, der Anteil der ungesättigten Fettsäuren ist in der Regel kleiner als der der gesättigten (Baumann und Mueller, 1974). Unter physiologischen Bedingungen liegen die Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide im flüssig-kristallinen Zustand vor und gewährleisten somit eine ausreichend hohe Membranfluidität (siehe 3.4.1) (Darnell et al., 1986). Während in höheren Pflanzen und Tieren PC und PE anzutreffen sind, findet man für bakterielle Membranen hauptsächlich PE und PG (Lehninger, 1983).

---

<sup>1</sup> Richtiger wäre es hier von der Klasse der Membranlipide zu sprechen, da zu den Lipiden nur die Fette und Öle gerechnet werden (Beyer und Walter, 1991). Auf diese Unterscheidung wird in der vorliegenden Arbeit verzichtet und allgemein der Begriff Lipide verwendet.

<sup>2</sup> Die Namensgebung erfolgt in der Weise, daß die Phosphatidsäure dem Namen der Base als Substituent vorangestellt wird.

<sup>3</sup> Aus Gehirn oder Rückenmark lassen sich Sphingolipide isolieren, in denen das Glycerin durch ungesättigte Aminoalkohole ersetzt ist, z. B. Sphingosin. Entsprechend liegen hier als Derivate der Sphingosinphosphatidsäure die Sphingomyeline vor.




---

Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol, PG)

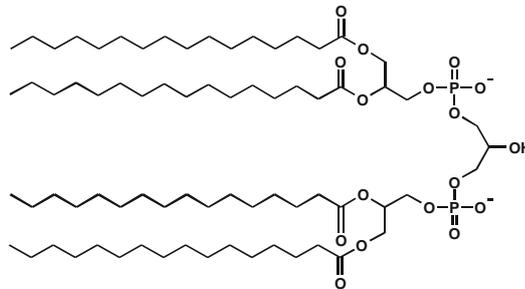
**B**

Bild 3-3: Chemische Struktur der verwendeten Phospholipide.

### 3.3.2 Lipopolysaccharide

LPS sind der Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien und können im Fall der Enterobakterien in zwei strukturelle Einheiten unterteilt werden, die den LPS amphiphilen Charakter verleihen. Die hydrophile Komponente, gebildet von einem Kohlenhydrat, wird unterteilt in das Kernoligosaccharid und das sogenannte O-Antigen und ist kovalent an Lipoid A gebunden (Bild 3-4), welches das LPS-Molekül in der membran verankert. Bei dem Lipoid A handelt es sich um ein  $\beta$ -Glucosaminyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glucosamindisaccharid, das in den Positionen 1 und 4' phosphoryliert ist und bei den

Enterobakterien in der Regel sechs oder sieben meist gesättigten Fettsäuren in Ester- und Amidbindung trägt (Rietschel et al., 1994).

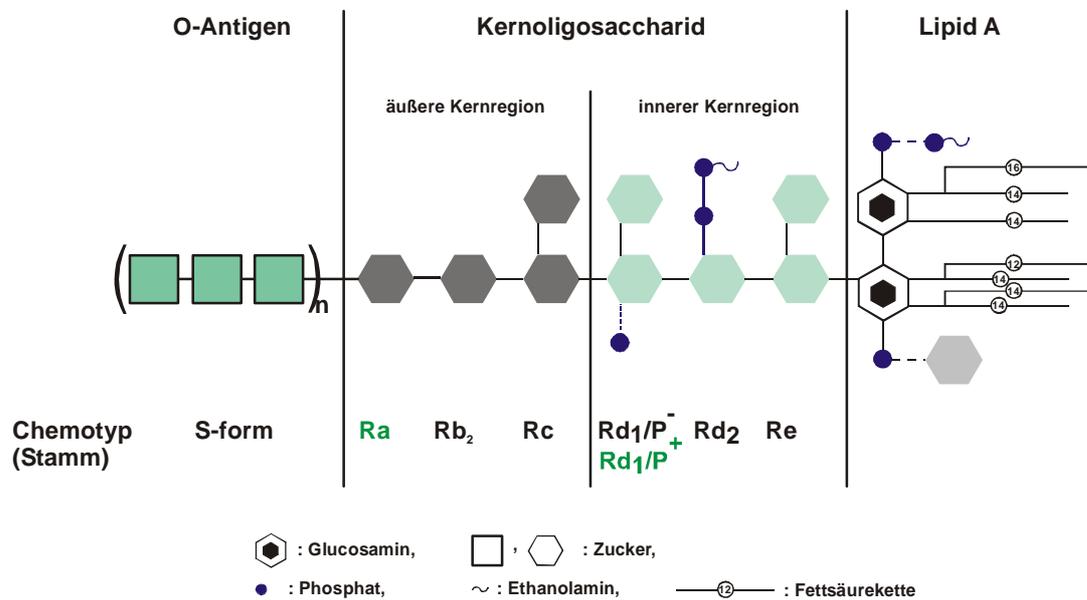


Bild 3-4: LPS der Rauhmутanten von *S. minnesota*. Die LPS-Struktur wird unterteilt in das O-Antigen, das Kernligosaccharid sowie das Lipid A.

Rauh<sup>1</sup>- bzw Defektmutanten fehlt das O-Antigen gänzlich, lediglich das Kernligosaccharid ist, je nach Mutante, in unterschiedlicher Länge vorhanden. Im Falle der Rauhmутanten von *Salmonella enterica* serovar Minnesota (*S. minnesota*) wird das Kernligosaccharid in die Chemotypen Ra bis Re eingeteilt (Bild 3-4). LPS des Chemotyps Re stellt die Minimalstruktur des LPS für die Lebensfähigkeit Gram<sup>-</sup> Bakterien dar. LPS Re besteht nur aus dem Lipoid A und zwei kovalent daran gebundenen 2-Keto-3-deoxyoctonat (Kdo) Monosacchariden (Holst, 1999). LPS verschiedener Rauhmутanten von *S. minnesota* unterscheiden sich im wesentlichen in der Anzahl der Zucker (Länge) des Kernligosaccharides, der Anzahl der Phosphate und weiterer Substituenten wie z. B. Aminoarabinosen (eine Übersicht über die Substitutionsmuster ist in Tabelle 7-1, im ausklappbaren Anhang zu finden).

<sup>1</sup> Die Bezeichnung Rauhmутanten leitet sich von der Morphologie der entsprechenden Bakterienkulturen ab.

Die *S. minnesota* LPS zeigen eine starke Tendenz zur Bildung nicht-lamellarer, invertierter Strukturen (s. 4.3.7), entsprechend weisen sie auch eine hohe immunstimulatorische Wirkung auf (Brandenburg et al., 1993).

Die sich aus den verschiedenen Substitutionsmustern ergebenden Differenzen der physikochemischen Parameter der jeweiligen LPS lassen ein unterschiedliches Verhalten entsprechender Membranen bzw. Bakterien, z. B. bei der Interaktion mit kationischen Substanzen, erwarten. LPS-spezifische Parameter sind: die mittlere Nettoladung, die mittlere Anzahl der Zucker, das mittlere Molekulargewicht, die Phasenübergangstemperatur sowie die lamellare Periodizität. Die Parameter weisen untereinander eine hohe Interkorrelation auf, so nimmt zum Beispiel die lamellare Periodizität mit der Anzahl der Kernzucker und damit natürlich auch die Molmasse zu. Im Ergebnisteil wird explizit auf LPS-spezifische Parameter, oder entsprechende Kombinationen hiervon, zurückgegriffen.

### 3.4 Physikochemische Grundlagen

Amphiphile Moleküle besitzen einen anisometrischen Aufbau (siehe 3.3): sie tragen eine lyophobe und eine lyophile Strukturkomponente<sup>1</sup> und sind in der Lage durch spontane Anordnung ihrer Komponenten hochgeordnete, supramolekulare Strukturen<sup>2</sup> zu bilden (Israelachvili et al., 1980). Die treibende Kraft dieser Selbstorganisation ist bei Raumtemperatur der Entropiegewinn des Wassers als dominante Größe der Freien Enthalpie. Prinzipiell lassen sich Biomembranen als solch übergeordnete Strukturen betrachten, die aus etwa 6 – 10 nm (Frömter, 1982) dicken Doppelschichten amphiphiler Teilchen (siehe 3.3) aufgebaut sind. Je nach Lipidzusammensetzung ergeben sich unterschiedliche elektrostatische sowie dynamische Eigenschaften der Membranen, und entsprechend kann z. B. auch die Interaktion von Membranen mit Proteinen moduliert sein. Darum soll im weiteren auf einige physikochemische Grundlagen eingegangen werden, die ein Fundament für das Verständnis der in dieser Arbeit verwendeten Methoden bilden.

---

<sup>1</sup> Im Falle von Wasser als Lösungsmittel werden die lyophoben Gruppen als hydrophob bezeichnet, entsprechend dann die lyophilen Gruppen als hydrophil.

<sup>2</sup> Häufig auch als Mesostrukturen bezeichnet. Für eine Übersicht und Grundlagen siehe (Dörfler, 1994).

### 3.4.1 Fluidität der Lipidmatrix

Eine wesentliche Eigenschaft biologischer Membranen ist die Fluidität der Lipidmatrix. Sie beeinflusst die Funktionen der Membran und ist durch den Phasenzustand, in dem sich die Kohlenwasserstoffketten der Lipide befinden, gekennzeichnet<sup>1</sup>. Eine Interaktion der Lipide mit Proteinen bzw. Peptiden kann die Fluidität der Membran und folglich den Phasenzustand der Acylketten verändern. Experimentell kann die Fluidität z. B. mit Hilfe der Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie (4.3.4) bestimmt werden. Prinzipiell werden zwei Phasenzustände, der  $\beta$ - oder Gelzustand und der  $\alpha$ - oder flüssig-kristalline Zustand der Acylketten unterschieden, zwischen denen bei einer lipidspezifischen Phasenübergangstemperatur  $T_c$  ein reversibler Phasenübergang 1. Ordnung stattfindet (Bild 3-5). Im Gelzustand befinden sich die Kohlenwasserstoffketten in der *all-trans* Konformation. Nähert sich die Temperatur der des Phasenübergangs, kommt es zum „Kettenschmelzen“, wobei die Anzahl an *gauche*-Konformeren zunimmt. Der Übergang in die flüssig-kristalline Phase ist mit einer Änderung der Symmetrie und der Gitterdimensionen verbunden, wobei die Umwandlung zu einer lateralen Expansion, einer Änderung der Packung und einer Fluiditätssteigerung der Lipide führt.

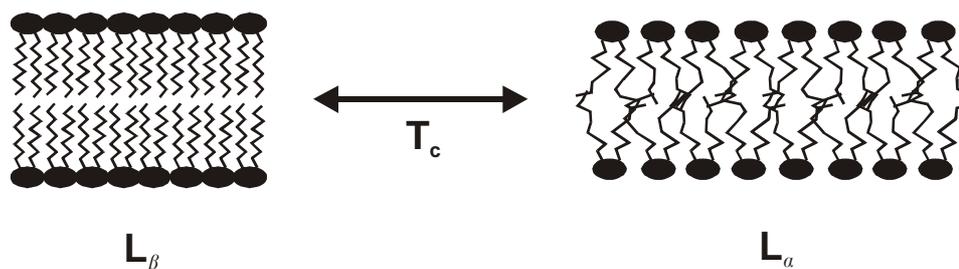


Bild 3-5: Bei Überschreiten der Temperatur  $T_c$  gehen die Lipide von der gelförmigen ( $L_\beta$ )- in die fluide flüssig-kristalline ( $L_\alpha$ ) Phase über. Dabei kommt es zum Kettenschmelzen und einer Änderung der Packungsdichte.

<sup>1</sup> Dabei befinden sich die Acylketten je nach Phasenzustand in anderen „Acylkettenrotationszuständen“.

Die Temperatur  $T_c$  des Phasenübergangs hängt sowohl von der Art der Kopfgruppe der Lipide als auch von der Länge und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten ab. Eine längere Kohlenwasserstoffkette führt, bei ansonsten gleicher Kopfgruppe, zu einem Anstieg von  $T_c$ , während die Einführung einer Doppelbindung eine drastische Absenkung von  $T_c$  verursacht (Silvius, 1982).

Findet z. B. ein Einbau von Proteinen in die Membran statt und nimmt dabei der den Acylketten zur Verfügung stehende Raum ab, so schränkt dies die Bewegungsmöglichkeiten der Fettsäureketten ein. Folglich wäre der Phasenübergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase zu höheren Temperaturen verschoben. Die Wirkung des Proteins könnte stattdessen auch genau umgekehrt sein und den Phasenübergang zu niedrigeren Temperaturen verschieben, wenn sich z. B. das Protein lediglich zwischen die Kopfgruppen schiebt. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die Kohlenwasserstoffketten in der Regel im flüssig-kristallinen Zustand, so daß die Membran ausreichend fluide ist. Einer Änderung z. B. der Umgebungstemperatur kann die Zelle durch den Einbau von mehr ungesättigten Fettsäuren in die Membran begegnen und so eine ausreichend hohe Membranfluidität gewährleisten (Lenaz und Castelli, 1985; Weber et al., 2001).

### 3.4.2 Elektrische Eigenschaften von Membranen

Beruhend auf dem zuvor entwickelten Modell einer bimolekularen Lipidschicht können die elektrischen Eigenschaften des Bilayers vereinfachend als Parallelschaltung eines Widerstandes und einer Kapazität betrachtet werden (Bild 3-6). Der hydrophobe Bereich des Bilayers stellt einen Isolator hohen Widerstandes dar, der zwei Elektrolytlösungen

räumlich voneinander separiert. In der Literatur finden sich Werte für den auf die Einheitsmembran bezogenen spezifischen Membranwiderstand von 1 bis  $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  für natürliche Membranen und etwa  $10^8 \Omega \cdot \text{cm}^2$  für künstliche Lipiddoppelschichten (Adam et al., 1977). Die Membran und die Elektrolytlösungen stellen außerdem einen Plattenkondensator der Kapazität  $C$  dar, mit dem Membraninneren als Dielektrikum und den Elektrolytlösungen als elektrisch leitende „Metallplatten“.

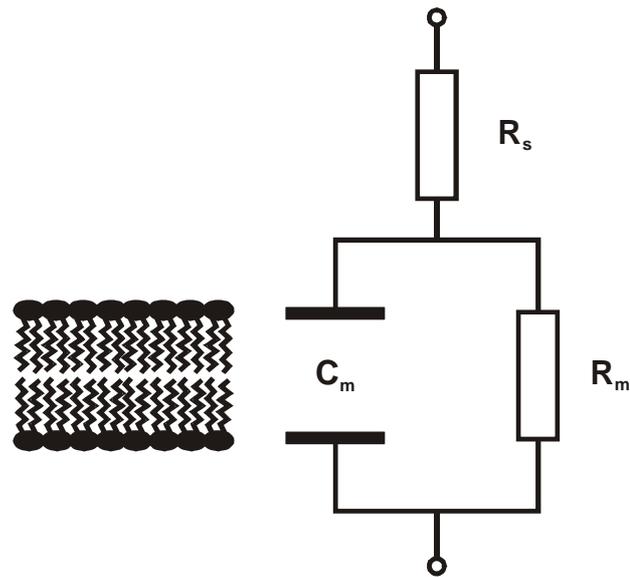


Bild 3-6: Die Membran kann elektrisch als Parallelschaltung eines Widerstandes und eines Kondensators aufgefasst werden ( $C_m$  - Membrankapazität,  $R_m$  - Membranwiderstand,  $R_s$  - Übergangswiderstand Elektrode-Elektrolytlösung).

Für Lipiddoppelschichten ergibt sich die Membrankapazität zu

$$C_m = \epsilon_m \epsilon_0 \frac{A}{d} \quad (3.1)$$

mit  $\epsilon_0 = 8,55 \cdot 10^{-12} \text{ A}\cdot\text{s}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$  der elektrischen Feldkonstante. Ferner ist  $A$  die Fläche der Membran,  $d$  deren Dicke und  $\epsilon$  die relative Dielektrizitätskonstante im Inneren der Membran. Legt man für die Membrandicke 4 nm und für die Dielektrizitätskonstante einen Wert von  $\epsilon \approx 2$  zugrunde (Hanke und Schlue, 1993), so ergibt sich eine auf die Flächeneinheit bezogene spezifische Membrankapazität von  $0,44 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die Membrankapazität ist keine Konstante sondern hängt von der transmembranen Spannung sowie dem intrinsischen Membranpotential ab (Alvarez und Latorre, 1978; White und Chang, 1981).

### 3.4.3 Potentiale an Grenzflächen

Geladene Gruppen der Lipide, wie z. B. Phosphat- oder Carboxylatgruppen, erzeugen an der Oberfläche von Membranen ein Potential. Insbesondere das LPS trägt einige negativ geladene Gruppen, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit polykationischen Peptiden wie z. B. den AMP spielen. Wegen der Oberflächenladungen kommt es aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zu einer Anreicherung von Gegenionen aus der Subphase. Die Gegenionen, die die Oberflächenladungen kompensieren, bilden eine diffuse Ionenschicht (Gouy-Chapman-Schicht) der Dicke  $1/\kappa$ , wobei  $\kappa$  der Hückel-Parameter ist (Hamann und Vielstich, 1985). Eine Beschreibung des Verlaufs des elektrostatischen Potentials und damit der Verteilung der Ionen in der

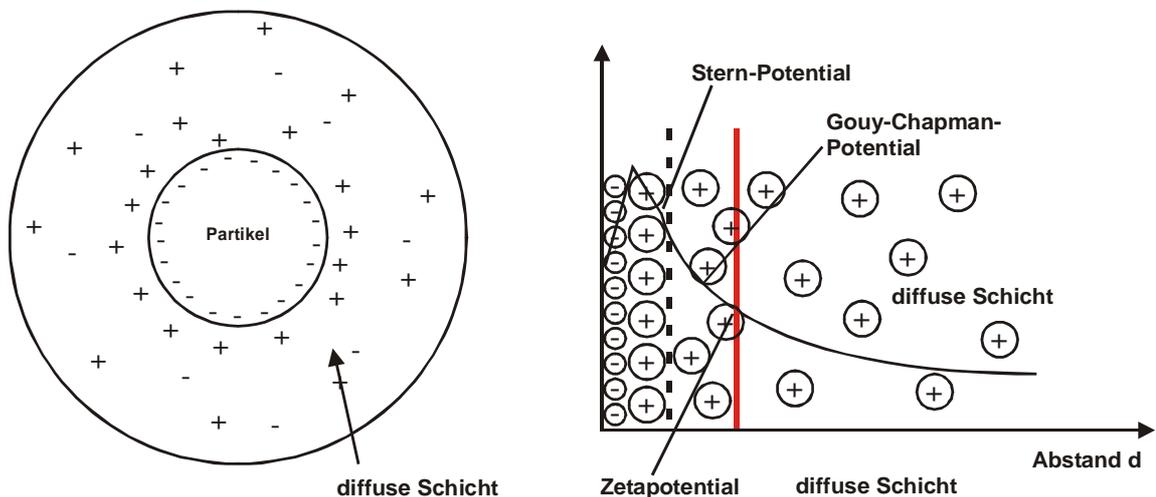


Bild 3-7: Gouy-Chapman Modell der diffusen Doppelschicht (links). Im rechten Diagramm ist der Verlauf des resultierenden Potentials skizziert.

diffusen Ionenwolke, wurde unabhängig von Gouy und Chapman angegeben<sup>1</sup> (Bild 3-7). Dabei gingen sie von folgenden Vereinfachungen aus:

- (1) die Ladungen sind  $\delta$ -funktionsartig an der Grenzfläche verteilt,

- (2) die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  der Subphase ist überall konstant,
- (3) es gibt keine Wechselwirkung zwischen den als punktförmig betrachteten Ionen,
- (4) die Ionenadsorption an der Grenzfläche wird vernachlässigt.

Neben der die Gegenionen anziehenden Wirkung des elektrischen Feldes der Grenzfläche berücksichtigt das Gouy-Chapman-Potential eine Ionenverteilung nach Boltzmann, die ihre Ursache in der thermischen Bewegung hat (Atkins, 1990). Es fällt exponentiell in die Lösung hinein ab, gemäß

$$U_{GC}(x) = U_{GC} \cdot e^{-\frac{x}{\lambda_D}} \quad (3.2)$$

wobei  $x$  der Abstand zur Grenzfläche ist und  $\lambda_D$  ( $\lambda_D$  = Debye-Länge) die Länge angibt, bei der das Gouy-Chapman-Potential ( $U_{GC}$ ) auf den  $e$ -ten Teil von  $U_{GC}$ , dem Maximalwert an der Oberfläche, abgefallen ist. Da das Potential asymptotisch gegen Null geht, ist mit  $\lambda_D$  die Dimension der diffusen Ionenschicht noch nicht ganz erfaßt; sie hat eine Dicke von etwa  $5 \cdot \lambda_D$  (hier ist das Potential auf unter 1 % seines ursprünglichen Werts gefallen).

$\lambda_D$  ist abhängig von der Elektrolytkonzentration  $c$  sowie der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$  und errechnet sich zu:

$$\lambda_D = \frac{1}{ze_0} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 kT}{2N_A c}} \quad (3.3)$$

Für eine wäßrige Lösung ( $\epsilon \approx 74$ ) eines einwertigen Elektrolyten (0,1 M) ergibt sich  $\lambda_D = 1,0$  nm, bei  $T = 37^\circ\text{C}$ .

Das Gouy-Chapman-Potential lautet explizit:

---

<sup>1</sup> Sie konnten damit einige Schwächen des bis dahin bekannten Helmholtz-Perrin-Modells erklären; heutige Vorstellungen gehen von einer Kombination aus dem Helmholtz-Perrin- und dem Gouy-

$$U_{GC} = \frac{2kT}{ze_0} \text{area} \sinh\left(\frac{\sigma}{\sqrt{8\varepsilon_0 \varepsilon k T N_A c}}\right) \quad (3.4)$$

mit  $\sigma$  der Oberflächenladungsdichte und  $z$  der Wertigkeit der Gegenionen.

Eine wichtige Rolle spielt das Oberflächenpotential für Prozesse, die in unmittelbarer Nähe der Membran stattfinden und die ihrerseits das Oberflächenpotential beeinflussen können, wie z. B. bei der Anreicherung und anschließenden Bindung polykationischer Substanzen an die Membran. Jedoch ist das Oberflächenpotential einer direkten Messung nicht zugänglich, statt dessen bestimmt man das effektive Oberflächenpotential, das Zetapotential ( $\zeta$ -Potential)<sup>1</sup>, welches ein Maß für die Ausdehnung der elektrischen Schicht darstellt.

Das  $\zeta$ -Potential kann aus elektrokinetischen Messungen an suspendierten Partikeln erhalten werden. Bewegt sich ein Partikel, z. B. ein LPS-Aggregat, durch die Suspension so führt es die diffuse Schicht mit sich. Jedoch wird ein Teil jener Schicht bei der Vorwärtsbewegung abgestreift, und das Potential an der Scherebene wird als  $\zeta$ -Potential bezeichnet (Bild 3-7). Grundsätzlich ist das  $\zeta$ -Potential proportional zum Oberflächenpotential und stets kleiner als dieses ( $\zeta < U_{GC}$ ). Messungen des  $\zeta$ -Potential sind von hoher Aussagekraft für elektrostatisch stabilisierte Dispersionen. Aus diesem Grund wird industriell die Messung des Zetapotentials dazu genutzt, Erkenntnisse über die Stabilität kolloidaler Systeme, wie z. B. Hautcremes oder Tonmineraldispersionen, in Abhängigkeit verschiedenster Zusätze zu gewinnen.

Darüber hinaus existieren noch das Dipol- und das Born-Potential, die zusammen mit dem Gouy-Chapman-Potential das Profil des intrinsischen Membranpotentials ergeben, jedoch wird im folgenden nicht weiter darauf eingegangen und daher auf eine Darstellung verzichtet (eine Beschreibung findet sich in (Hagge et al., 2004)).

---

Chapman-Modell aus.

<sup>1</sup> Prinzipiell kann aus dem Zetapotential das Oberflächenpotential berechnet werden, allerdings wurde das Modell auf der Grundlage einer ebenen (Metall-) Oberfläche entwickelt und kann nicht ohne weiteres auf Membranen z. B. bestehend aus LPS übertragen werden.

### 3.4.4 Transmembranes Potential

Ferner besteht über vielen biologischen Membranen ein transmembranes Potential, das unter anderem von den physikochemischen Eigenschaften wie z. B. der Semi-permeabilität der Membran mitbestimmt wird. Ursächlich hierfür sind Konzentrationsunterschiede beiderseits der Membran bezüglich physiologisch so wichtiger Ionen wie Kalium, Natrium und Chlorid. Für diese Ionen berechnet sich das Potential nach der Goldman-Gleichung zu:

$$U_{\text{Goldmann}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_a + P_{Na} [Na^+]_a + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_a} \quad (3.5)$$

wobei  $P_v$  den Permeabilitätskoeffizienten der Ionensorte  $v$ ,  $[v]$  deren Konzentration,  $i$  den Intrazellularraum und  $a$  den Extrazellularraum bedeuten. Menschliche Zellen besitzen ein transmembranes Potential von etwa 60 mV (intrazellulär negativ), während man in Experimenten für das transmembrane Potential über der äußeren Membran von *E. coli* einen Wert von 26 mV (intrazellulär negativ) (Sen et al., 1988) bestimmt hat. Für die innere Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien diskutiert man Werte im Bereich von 100 – 150 mV (intrazellulär negativ) (Bakker und Mangerich, 1981). Eine Beteiligung des transmembranen Potentials bei dem Wirkmechanismus antibakteriell aktiver Peptide konnte bereits gezeigt werden (Gutsmann et al., 2001).

## 3.5 Natürliche Peptidantibiotika

Dieser Abschnitt soll eine kurze Einführung über die natürlich vorkommenden antibiotisch wirkenden Peptide geben. Nach einem kleinen Überblick über einige natürlich vorkommende Peptide und deren wesentlichen Eigenschaften, werden die in dieser Arbeit verwendeten Peptide vorgestellt.

### 3.5.1 Vorkommen und Eigenschaften von Antimikrobieller Peptide

Multizelluläre Organismen sowohl aus Pflanzen- und Tierwelt exprimieren eine Reihe antimikrobieller Peptide (AMP), die ein Bestandteil der angeborenen Immunität sind, die sie gegenüber in der Umwelt vorkommenden Keimen schützt (Lehrer und Ganz, 1999; Bals, 2000; Kamysz et al., 2003; Bulet et al., 2004). Die AMP besitzen häufig ein breites Wirkungsspektrum nicht nur gegen Bakterien sondern auch gegenüber Pilzen (Fehlbaum et al., 1996; Kieffer et al., 2003), Protozoen (Arrighi et al., 2002), Tumorzellen (Lindholm et al., 2002) und sogar umhüllte Viren, wie z. B. HIV (Robinson, Jr. et al., 1998).

Viele AMP entfalten trotz unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung, Größe, Ladung oder dem Gehalt an L- oder D-Aminosäuren eine antimikrobielle Wirkung im mikromolaren Konzentrationsbereich, und eine Involvierung eines Rezeptors in den Wirkmechanismus ist als unwahrscheinlich zu betrachten. Dennoch weisen die meisten AMP eine Zellspezifität ihrer Wirkung auf. Sie sind sehr aktiv gegenüber Mikroben aber zum großen Teil inaktiv gegenüber eukaryotischen Zellen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die meisten AMP bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind und präferentiell an negativ geladene Zielstrukturen auf Bakterienmembranen binden (Sitaram und Nagaraj, 1999; Hancock und Scott, 2000). Eukaryotische Zellen haben im Vergleich zu Bakterienzellen weniger anionische, dafür mehr zwitterionische Lipide auf der Außenseite ihrer Membran (Dathe et al., 1996; Matsuzaki, 1999; Dathe und Wieprecht, 1999). Demzufolge binden die AMP weniger gut an eukaryotische Zellmembranen (Matsuzaki, 1999; Dathe und Wieprecht, 1999).

Alle bislang entdeckten AMP weisen generelle Gemeinsamkeiten untereinander auf, so sind sie z. B. alle Gen-kodiert. Die AMP werden als Präpropeptide synthetisiert, aus denen die eigentlich aktiven Peptide proteolytisch freigesetzt werden. Die aktive Sequenz liegt in der Regel am C-Terminus. Ein fundamentales Prinzip aller AMP ist die dreidimensionale Orientierung der Aminosäuren in einer amphipathischen Struktur. Die meisten AMP sind bei physiologischen pH-Werten kationisch, jedoch wurden kürzlich auch anionische Peptide beschrieben (Tang et al., 1999; Tran et al., 2002). Typischerweise sind sie aus nicht mehr als 100 Aminosäuren aufgebaut. Gewöhnlich unterteilt man die AMP nach strukturellen Gesichtspunkten in vier Gruppen, wie es 1995 zuerst von Boman vorgeschlagen wurde (Boman, 1995):

In Tabelle 3-1 sind für die verschiedenen Gruppen Beispiele aufgeführt, wobei ausschließlich Säugetier-AMP aufgeführt sind. Eine Klassifikation der AMP im Hinblick auf ihre Nukleotidsequenz ergibt, daß der Großteil der bei Säugetieren gefundenen AMP in zwei Kategorien eingeteilt werden kann: die Klasse der Defensine und die Klasse der Kathelizidine.

*Defensine.* Die Defensine umfassen mehr als 80 bislang entdeckte Peptide und sind prinzipiell durch das Vorhandensein von drei intramolekularen Disulfidbrücken charakterisiert (Lehrer et al., 1993; Martin et al., 1995; Diamond und Bevins, 1998). Aufgrund der Verknüpfung der Disulfidbrücken und der chromosomalen Gen-Position wird weiter in die  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\theta$ -Defensine unterteilt (Tang und Selsted, 1993). Untereinander weisen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine Ähnlichkeit bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur und ihrer antimikrobiellen Aktivitäten auf (Zimmermann et al., 1995). Sie besitzen eine ausgeprägte  $\beta$ -Faltblattstruktur (White et al., 1995; Zimmermann et al., 1995). Sie wurden zuerst in Leukozyten entdeckt (Lehrer et al., 1983; Ganz et al., 1985) und konnten später im Gewebe des Verdauungstrakts und der Fortpflanzungsorgane nachgewiesen werden (Ouellette et al., 1994; Ouellette und Selsted, 1996; Diamond und Bevins, 1998; Quayle et al., 1998). Die  $\theta$ -Defensine wurden erst kürzlich bei Rhesus-Affen entdeckt (Tang et al., 1999; Tran et al., 2002).

*Kathelizidine.* Es sind zur Zeit 35 Kathelizidine bekannt (Yang et al., 2004), sie werden als Präpropeptide synthetisiert und zeichnen sich durch eine hohe Sequenzhomologie ihrer Präprosequenzen (etwa 100 Aminosäuren) aus (Ganz, 2004; Bulet et al., 2004). Die Präprosequenzen sind homolog zu dem bei Schweinen gefundenen Cathelin (Cystein Protease Inhibitor), welches der Gruppe den Namen gegeben hat (Zanetti et al., 1995; Zanetti, 2003). Die Prä-Region hat eine Signalfunktion, und die Speicherung

Kategorie	Beispiel	Aminosäuresequenz	Quelle
<b>I</b> $\alpha$ -Helix	Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQGGPR	Schwein
	CRAMP	ISRLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPOPE	Maus
	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLLVPRTES	Mensch
<b>II</b> $\beta$ -Faltblatt	Protegrin-1	RGGRLCYCRRRFCVCGR (1-4, 2-3)	Schwein
	HNP-1 ( $\alpha$ -Defensin)	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRWAFCC (1 -6, 2-4, 3-5)	Mensch
	TAP ( $\beta$ -Defensin)	NVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQITCVGRAVKCCRKK (1-5, 2-4, 3-6)	Rind
	RTD-1 (Defensin)	-GFCRCLCRRGVCRICITR- (Makrocyclisch) (1-6, 2-5, 3-4)	Macaque
<b>III</b> ungewöhnliche Aminosäure- zusammensetzung	Bac-5	RFRPPRRPPRPPFYPPFRPPRPPRPPRPPRPPRPPRFP	Rind
	Histatin-1	DSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHKEFPFYGDDYGSNYLYDN	Mensch
	PR-39	RRRPPPYLPRRPPPPPPRRLPPRIPPPGPPRFP	Schwein
<b>IV</b> Loop-Struktur	Bac-1	RLC <sub>1</sub> RIVVIRVC <sub>1</sub> R	Rind
	lactoferricin	FKC <sub>1</sub> RRWQWRMKKLGAPSITC <sub>1</sub> VRRRAF	Kuhmilch

Tabelle 3-1: Übersicht über die Klassierung antimikrobieller Peptide nach strukturellen Merkmalen.

erfolgt in Proform, d. h. einer Vorläuferform aus der das aktive Peptid proteolytisch freigesetzt werden muß. Über die Funktion der Prosequenz als reine Speicherform hinaus ist wenig bekannt, erste Untersuchungen zeigten jedoch ebenfalls eine antibakterielle Aktivität (Zaiou et al., 2003). Die aktive Form des Peptides ist am C-Terminus zu finden und hat eine Länge im Bereich von 12 bis 80 Aminosäuren. Bezüglich der Struktur der aktiven Peptide sind Kathelizidine bemerkenswert divers. Kathelizidine wurden unter anderem bei Schafen, Schweinen, Rindern, Mäusen und Kaninchen gefunden. Beim Menschen hat man bislang einen Vertreter der Kathelizidine identifizieren können, das sogenannte hCAP18 (von „Human Catioinic Antibacterial Peptide 18 kDa“) (Larrick et al., 1995a; Yang et al., 2004). Auf das hCAP18 soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden, da es eine zentrale Stellung im Rahmen dieser Arbeit hat.

### 3.5.2 hCAP18

*Allgemeines.* Die Aminosäuresequenz des einzigen humanen Kathelizidins wurde ursprünglich aus einem cDNA Klon abgeleitet (Larrick et al., 1995a), bevor es schließlich aus myeloiden Knochenmarkzellen isoliert werden konnte (Cowland et al., 1995; Agerberth et al., 1995; Gudmundsson et al., 1996). Das aktive 37 Aminosäuren lange C-terminale Fragment wird als LL37 bezeichnet. LL37/hCAP18 ist in den Granula der neutrophilen Granulozyten zu finden, darüber hinaus wurde es in epithelialen Zellen des Hodens (Frohm et al., 1996; Frohm et al., 1997), des Gastrointestinaltrakts (Bals et al., 1998) und der Atemwege (Bals et al., 1998) aufgefunden. Kürzlich wurde LL37/hCAP18 in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), T-Helferzellen, B-Zellen, Makrophagen sowie Alveolarmakrophagen nachgewiesen (Agerberth et al., 2000). Der Gehalt an LL37/hCAP18 wurde in verschiedenen Körperflüssigkeiten bestimmt und kann im Serum, den Atemwegsflüssigkeiten oder in Wundflüssigkeiten während einer Entzündung Konzentrationen im Bereich von 1 bis 5 µg/ml erreichen (Frohm et al., 1996; Sorensen et al., 1997; Agerberth et al., 1999; Bals et al., 1999a; Schaller-Bals et al., 2002). Durch verschiedene Entzündungsmediatoren wie z. B. Interleukin (IL)-6 kann die Expression von LL37/hCAP18 hochreguliert werden (Frohm et al., 1997). Ferner kann die Expression von LL37/hCAP18 in Keratinozyten stimuliert werden (Frohm et al., 1997). Eine Sequenzanalyse der Vorläuferregion im Genom weist auf

mehrere mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- $\kappa$ B oder IL-6 (s. oben) hin. Das Gen welches für LL37/hCAP18 kodiert konnte auf Chromosom 3 lokalisiert werden, jedoch ist wenig bekannt über das Maß der konstitutiven Expression von LL37/hCAP18 und auf welchem Wege die Expression reguliert wird (Gudmundsson et al., 1996).

LL37/hCAP18 ist im mikromolaren Bereich aktiv gegen Gram<sup>+</sup> und Gram<sup>-</sup> Keime. Die antimikrobielle Aktivität korreliert mit der  $\alpha$ -helikalen Ausprägung (Johansson et al., 1998; Oren et al., 1999), sie hängt ferner vom pH-Wert und der ionalen Zusammensetzung des Mediums ab (Bals et al., 1998). Zytotoxizität tritt erst bei Konzentrationen auf, die etwa dreimal so hoch sind wie die der antimikrobiellen Aktivität. Serum inaktiviert die antimikrobielle wie auch zytotoxische Aktivität, da es an Apolipoprotein-A1 gebunden vorliegt und dieses die Aktivität des Peptides inhibiert. Im Mausmodell der zystischen Fibrose konnte der Abwehrdefekt durch die Einführung einer endogenen Überexpression von LL37/hCAP18 korrigiert werden (Bals et al., 1999a). Desweiteren konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, daß die endogene Überproduktion des Peptids gegen Lungeninfektion und Sepsis schützt, sowie eine protektive Wirkung vor den Folgen einer LPS-Applikation hat (Bals et al., 1999b).

*Wirkungsweise.* Viele AMP binden in ähnlicher Weise an negativ geladene Membranstrukturen und bewirken eine Störung der Membranintegrität, die den Durchtritt von Ionen und anderen gelösten Substanzen ermöglicht. Für die Membranpermeabilisierung durch AMP wurden primär drei Mechanismen vorgeschlagen: der „barrel-stave“- , der „carpet“- und der „detergent-like“-Mechanismus (Oren und Shai, 1998; Epanand und Vogel, 1999; Shai, 1999; Huang, 2000).

Im Falle Gram<sup>-</sup> Organismen interagieren die AMP zunächst mit der äußeren Membran und verschaffen sich durch ihre Permeabilisierung Durchtritt durch diese. Haben die AMP die äußere Membran passiert, so können sie, bei der Zytoplasmamembran angekommen, ihre tödliche Wirkung durch eine Depolarisation der Membran entfalten oder durch diese hindurch gelangen und im Innern der Zelle tödliche Prozesse auslösen (Matsuzaki, 1999). Hancock beschrieb diesen Prozeß als „self-promoted uptake“ der AMP bezüglich Gram<sup>-</sup> Keime (Hancock, 1997).

LL37/hCAP18 gehört zu der Gruppe der amphipathischen,  $\alpha$ -helikalen Peptide mit einer Nettoladung von +6 (es weist insgesamt 16 geladene Aminosäurereste auf). Dies

begünstigt eine Wechselwirkung mit negativ geladenen Lipiden. Die  $\alpha$ -helikale Struktur ist über einen großen pH vorhanden, sie hängt von der Anionen- sowie der Peptidkonzentration ab (Johansson et al., 1998) und ist besonders in Anwesenheit von Lipiden ausgeprägt (Oren et al., 1999; Nagaoka et al., 2000). Im mikromolaren Konzentrationsbereich ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) aggregiert LL37 einhergehend mit der Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix. Das Vorliegen einer aggregierten helikalen Struktur unterscheidet LL37 von anderen  $\alpha$ -helikalen Peptiden, die monomer vorliegen und erst bei Assoziation mit Membranen eine  $\alpha$ -Helix ausbilden. Eine Sequenzanalyse ergab, daß die amphipathische Helix von den Aminosäuren in Position 11 bis Position 32 gebildet wird (Agerberth et al., 1995).

Untersuchungen am Rekonstitutionsmodell der planaren Membranen mit verschiedenen CAP18-Derivaten (Gutsmann et al., 1999; Gutsmann et al., 2000; Gutsmann et al., 2001) führten zu einem Modell für den Wirkmechanismus von CAP18, welches im wesentlichen zwei Stufen umfasst. Zunächst kommt es zur Assoziation und Akkumulation von CAP18 an der Membranoberfläche. Bei Überschreiten einer Schwellkonzentration kommt es, unter dem Einfluß einer LPS-spezifischen transmembranen Spannung, zu einer Umorientierung der Peptide von einer Oberflächen- in eine transmembrane Konfiguration. Die transmembrane Konfiguration repräsentiert den leitenden Zustand, der durch begrenzte Lebensdauern der heterogen auftretenden Läsionen charakterisiert ist. Das vorgeschlagene Modell steht im Einklang mit dem „self-promoted uptake“: CAP18 permeabilisiert die äußere Membran und ebnet sich dabei den Zugang zur Zytoplasmamembran.

Eine jüngere Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, daß LL37/hCAP18 an der Membranoberfläche assoziiert und dort in einer Orientierung parallel zur Membranoberfläche verbleibt (Henzler Wildman et al., 2003). LL37/hCAP18 nimmt dabei eine Position im Kopfgruppenbereich nahe der Kohlenwasserstoffphase ein. Diese Lage hängt nicht von der Peptidkonzentration ab, sie verändert sich nicht mit der Temperatur, der Ladung des Lipids und auch nicht mit der Anwesenheit von Ionen in der Subphase. Desweiteren übt LL37/hCAP18 einen positiven Krümmungsstreß auf die Membran aus. Daher kommen die Autoren dieser Untersuchung zu dem Resultat, daß LL37/hCAP18 in einem ersten Schritt die Membranoberfläche wie ein „carpet“ bedeckt und schließlich Undichtigkeiten der Membran durch Bildung einer toroidalen Pore bzw. weniger definierten Defekten verursacht.

*Verwendungsform.* Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ein 32 Aminosäuren langes Fragment von LL37/hCAP18 eingesetzt, welches auch in oben genannter Studie (Gutsmann et al., 2001) verwendet wurde. Es wurde mittels Festphasensynthese (s. 4.5.2) hergestellt, wobei bezüglich der Primärstruktur die letzten fünf Aminosäuren von LL37/hCAP18 (vom C-terminus betrachtet) ausgelassen wurden. Das Peptid wird entweder als hCAP18<sub>104-132</sub> oder als LL32 bezeichnet. Eine Darstellung der Struktur von LL32 ist in Bild 3-8 zu sehen. LL32 besitzt bei neutralem pH-Wert eine Nettoladung von +6. Bislang wurde eine antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* Stamm J5 nachgewiesen (Gutsmann et al., 2001).

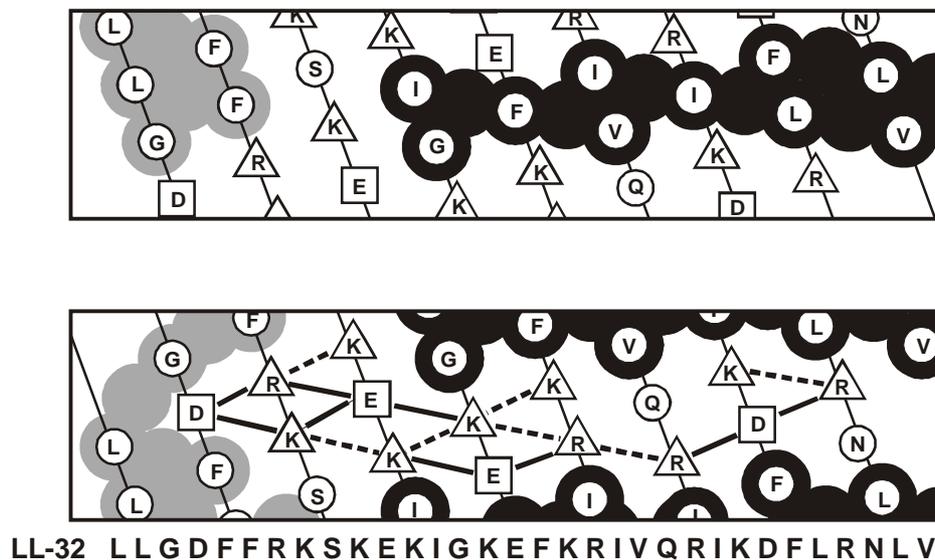


Bild 3-8: Helikales Netzdiagramm und Aminosäuresequenz von LL32. Dreiecke stellen basische Aminosäuren, Quadrate saure und Kreise neutrale Aminosäuren dar. Komplementäre und repulsive Ionenpaare, die durch die Aminosäurereste in den Positionen  $i$ ,  $i+3/i+4$  ( $i$  Nummer der Aminosäure in der Sequenz) gebildet werden, sind als durchgezogene bzw. gestrichelte Linien gekennzeichnet (unteres Diagramm). Das obere Netzdiagramm zeigt die Helix in einer anderen Orientierung. Gut zu sehen ist der kontinuierliche nichtpolare Bereich (schwarze Kreise) der amphipatischen Helix, der sich über die Aminosäuren in den Positionen 11 – 31 erstreckt. Nichtpolare Aminosäurereste, die nicht Teil der amphipatischen Helix sind, sind in grau dargestellt. Sie bilden am N-Terminus einen hydrophoben Bereich, der sich über etwas mehr als eine Windung der Helix erstreckt.

### 3.5.3 Polymyxin B

Da zur Wechselwirkung von Polymyxin B (PMB) mit Membranen in der eigenen aber auch in anderen Arbeitsgruppen viele Daten vorliegen, ist es in dieser Arbeit zu Vergleichszwecken (als „Goldstandard“) verwendet worden. Auf eine ausführliche Erläuterung der Eigenschaften des Peptids wird verzichtet und nur kurz das Wesentliche dargestellt.

Polymyxine sind Stoffwechselprodukte verschiedener Stämme von *Bacillus polymyxa*. PMB wurde erstmals 1947 isoliert. Seine antibakterielle Aktivität ist hauptsächlich gegen Gram<sup>-</sup> Bakterien gerichtet, unter denen es jedoch einige resistente Stämme, wie z. B. *Proteus mirabilis* und *S. paucimobilis* gibt. Neben seiner antibakteriellen Wirkung hat PMB die Eigenschaft, in starkem Maße LPS zu binden und dessen entzündungsfördernde Eigenschaften zu unterbinden. Ein therapeutischer Einsatz von PMB ist wegen seiner Zytotoxizität stark eingeschränkt, jedoch wird PMB vielfach als Modellsubstanz genutzt, um die Mechanismen, die bei der Bekämpfung der Krankheitserreger eine Rolle spielen, zu studieren.

PMB ist ein basisches zyklisches Heptapeptid mit einer Peptidseitenkette, an die kovalent Isopelargonsäure gebunden ist (Bild 3-9). Es hat eine „loop“-Struktur und gehört somit in die Kategorie **IV** (Tabelle 3-1). Durch die Diaminobuttersäure weist PMB maximal fünf positive Ladungen auf. Im Bereich des Peptidringes beträgt der Durchmesser eines PMB-Moleküls 1,23 nm. Wegen seines geladenen Oligopeptidringes und der hydrophoben Fettsäurekette hat PMB einen amphiphilen Charakter und bildet oberhalb einer kritischen Konzentration von etwa 10 mM Aggregate. Daraus ergibt sich eine gewisse Ähnlichkeit zu Detergenzien.

Für die Wirkung von PMB wurde ein zweiphasiger Mechanismus vorgeschlagen (Hancock, 1984; Wiese et al., 1998): In einem ersten Schritt bindet PMB zunächst an die äußere Membran, aggregiert dort nach Aufkonzentration und erhöht die Membranpermeabilität. Auf diese Weise schafft es sich selbständig den Zugang zum Periplasma und zur Zytoplasmamembran. Hier entfaltet es in einem zweiten Schritt seine lethale Wirkung.

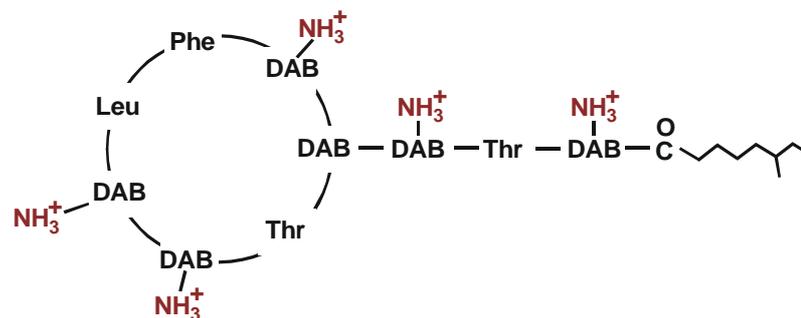


Bild 3-9: Chemische Struktur von Polymyxin B (PMB). DAB: Diaminobuttersäure, Leu: Leucin, Phe : Phenylalanin, Thr: Threonin.

## 4 Methoden und Material

### 4.1 Methoden zur Untersuchung des Keimwachstums

Der Einfluß der Zuckerstruktur des LPS der verschiedenen *S. minnesota* Rauhmутanten auf die antibakterielle Wirksamkeit von LL32 wurde in bakteriellen Viabilitätstests untersucht. Demgemäß wurden die Keime in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Peptids herangezogen und untersucht, welchen Einfluß das Peptid auf das bakterielle Wachstum besitzt. Es wurden zwei Testsysteme verwendet, die näher erläutert werden sollen.

#### 4.1.1 Koch'sches Plattengussverfahren

Zunächst wurde eine Vorkultur in Standard I-Nährbouillon (St. I) (Merck KgA, Darmstadt, Deutschland) angesetzt und über Nacht auf einem Certomat-Schüttler (Braun Biotech International, Göttingen, Deutschland) mit einer konstanten Frequenz von  $160 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Diese Vorkultur wurde am folgenden Tag 1 : 1000 verdünnt und wieder über Nacht inkubiert. Am kommenden Tag wurde die Hauptkultur angesetzt, dazu wurde die 2.te Übernacht-Kultur 1 : 100 in St. I verdünnt und für

weitere 4 h inkubiert. Schließlich wurde die Keimzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Bakteriensuspension auf  $1 \times 10^6$  Bakterien/ml eingestellt. Die Suspension wurde auf mehrere Röhren zu je 2 ml aufgeteilt, anschließend erfolgte die Wirkstoffzugabe in definierter Menge, und die Suspensionen wurden weitere 15 min bei  $160 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  und  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Dann wurden die Proben auf Eis gestellt und von jedem Röhren eine Verdünnungsreihe erstellt. Die 100- bis 10000-fachen Verdünnungen wurden in eine Petrischale gegeben. Mit flüssigem St. I-Nähragar aufgefüllt und für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Durch Multiplikation der Koloniezahl mit dem Verdünnungsfaktor wurde die Gesamtkoloniezahl ermittelt. Bestimmt wurde der Mittelwert aus drei Parallelproben. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien in Abwesenheit von Wirkstoff (Negativprobe) wurde als 100% Bakterienwachstum definiert. Das eben erläuterte Verfahren wird auch als Koch'sches Plattengußverfahren (Pichhardt, 1998) bezeichnet.

Für die Datenauswertung wurden die auf die Negativprobe bezogenen Koloniezahlen gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und die Meßpunkte mit einer exponentiell abklingenden Funktion erster Ordnung angefüttet. Aus der gefitteten Kurve wurde dann die Konzentration bestimmt, bei der das Keimwachstum zu 50% gehindert ist. Diese Konzentration wird auch  $\text{IC}_{50}$  genannt, von „50% Inhibitory Concentration“.

#### **4.1.2 Mikrosuszeptibilitätstest**

Zunächst wurde eine Vorkultur des entsprechenden Bakterien-Stamms in einer LB-Bouillon nach Miller (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angelegt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Certomat-Schüttler (Braun Biotech International, Göttingen, Deutschland) bei  $160 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  inkubiert. Die LB-Bouillon wurde in destilliertem Wasser angesetzt und 15 min bei  $121^\circ\text{C}$  autoklaviert, sie enthält 10 g/l Pepton aus Casein, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl bei  $\text{pH} = 7$ . Am nächsten Tag wurde die Vorkultur auf 1:100 verdünnt und für weitere 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  und  $160 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  inkubiert. Danach wurde die Gesamtkeimzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (0,05 mm Tiefe) bestimmt und die Bakteriensuspension auf  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt, indem mit LB-Medium aufgefüllt wurde.

Das Peptid wurde in Puffer (20 mM HEPES,  $\text{pH} = 7$ ) auf eine Konzentration von  $62 \mu\text{M}$  eingestellt und  $180 \mu\text{l}$  der Peptidlösung in den ersten Napf („Well“) einer 96-

Well-Flachboden Mikrotiterplatte (Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark) gegeben. Für die serielle Verdünnung wurden 90 µl der Peptidlösung in das nächste Well transferiert und mit 90 µl Puffer aufgefüllt und somit die Peptidkonzentration halbiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt bis die gewünschte Konzentrationsreihe erstellt war; zusätzlich wurden zur Kontrolle einige Wells mit reinem Puffer (20 mM HEPES, pH = 7) befüllt. Anschließend wurden 10 µl der vorab auf 10<sup>6</sup> Bakterien/ml eingestellten Bakterienkultur in die Wells pipettiert, wobei darauf geachtet, wurde einige Wells auszulassen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer unter konstantem Schütteln bei 160 U·min<sup>-1</sup> inkubiert. Am kommenden Tag wurde das bakterielle Wachstum über eine Trübungsmeßung ermittelt. Dazu wurde die Extinktion (bei 620 nm) mit Hilfe eines Rainbow Mikrotiterplatten-Photometers (Tecan, Crailshaim, Deutschland) gemessen. Die relative Extinktion  $E_{rel}$  wurde mittels der Gleichung

$$E_{rel} = \frac{E - E_K}{E_{100} - E_K} \quad (4.6)$$

berechnet, mit E der Extinktion,  $E_{100}$  der Extinktion der Bakterienkultur ohne Wirkstoff,  $E_K$  der Korrektur für die Extinktion durch die Platte und das Lösungsmittel. Da die relative Extinktion auf die Extinktion bei ungehindertem Bakterienwachstum bezogen wird, stellt sie ein Maß für die Suszeptibilität der Bakterien gegenüber dem Wirkstoff dar; die Auftragung von  $E_{rel}$  gegen die eingesetzte Peptidkonzentration lieferte die „Hemmkurve“ des bakteriellen Wachstums.

Aus den erhaltenen Daten wurde die Minimale Hemmkonzentration (MHK; auch Minimal Inhibitory Concentration, MIC) bestimmt, sie ist definiert als die Wirkstoffkonzentration bei der das bakterielle Wachstum zu mehr als 99% gehemmt ist. Praktisch ist dies die Konzentration bei der  $E_{rel} < 0,01$  ist.

## 4.2 Lipid-Monolayer

Aufgrund ihrer molekularen Struktur können amphiphile Moleküle zweidimensionale Filme (Monolayer) an der Grenzfläche Wasser-Luft bilden. Im Film sind die Moleküle dergestalt angeordnet, daß die hydrophilen Kopfgruppen in die wäßrige Phase eintauchen und die hydrophoben Fettsäureketten weg von der wäßrigen hin zur gasförmigen Phase orientiert sind (Bild 4-1), eine direkte Folge des thermodynamischen Energieminimierungsprinzips. Grenzflächenfilme besitzen Eigenschaften, die denen biologischer Membranen ähneln, daher werden sie in großem Umfang als Modellsystem zur Untersuchung von Membranprozessen verwendet (Maget-Dana, 1999), z. B. kann die Interkalation eines Fremdmoleküles in den Lipidfilm, die „Mischfilmbildung“, untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente an Monolayern umfassen den Einbau eines polykationischen Peptides (LL32, siehe 3.5.2) in einen Monolayer und die peptidinduzierte Verdrängung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Grenzschicht.

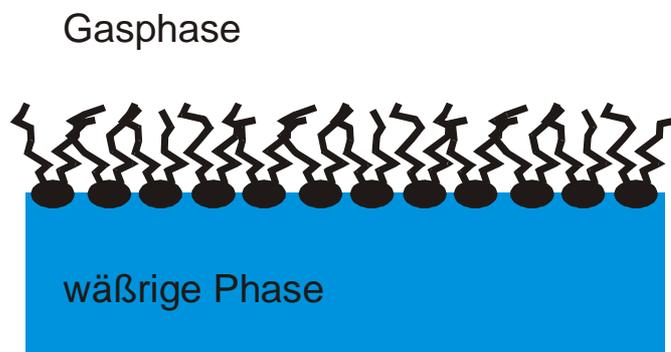


Bild 4-1: Orientierung amphiphiler Moleküle an der Grenzfläche Wasser - Luft

### 4.2.1 Grenzflächenfilme

Monomolekulare Grenzflächenfilme können durch Spreitung (s. unten) der Moleküle auf einer flüssigen Oberfläche erzeugt werden. Dies ist möglich, da die gespreiteten

Moleküle in der darunterliegenden Flüssigkeit praktisch nicht löslich sind<sup>1</sup>. Energetisch betrachtet reicht, die Hydratationsenergie der Kopfgruppe nicht aus, um den hydrophoben Teil in der polaren Umgebung zu halten, und die Wasseroberfläche ist für die Teilchen energetisch die günstigere Lage (Dörfler, 1994). Eine Anreicherung amphiphiler Substanzen führt zu einer Änderung der Oberflächenspannung der wäßrigen Phase, sie sinkt mit zunehmender Teilchenzahldichte in der Oberfläche und kann durch die Messung des Filmdruckes

$$\pi = \sigma_0 - \sigma_1 \quad (4.1)$$

charakterisiert werden, mit  $\pi$  dem Filmdruck (lateraler Druck). Dabei ist  $\sigma_0$  die Oberflächenspannung für die wäßrige Phase ohne und  $\sigma_1$  die Oberflächenspannung der wäßrigen Phase mit einem Monolayer auf der Oberfläche.

#### 4.2.2 Filmpolymorphie

Die Oberflächenspannung<sup>2</sup> hängt wie erwähnt von der Oberflächenkonzentration

$$\Gamma_i = \frac{n_i}{A} \quad (4.2)$$

mit  $n_i$  der Teilchenzahl und  $A$  der Filmfläche, also vom Kompressionszustand der Monoschicht ab. Beschrieben wird das Kompressionsverhalten des Grenzflächenfilmes durch die sogenannte Druck-Flächen-Isotherme ( $\pi/A$ -Isotherme). Grundsätzlich können vier verschiedene Bereiche identifiziert werden (Bild 4-2). Im Bereich niedrigen Filmdrucks steht den filmbildenden Molekülen eine große Fläche zur Verfügung. In diesem

---

<sup>1</sup> Hiervon gibt es jedoch Ausnahmen, z. B. findet eine Desorption in die Subphase, deren Ausmaß und Kinetik vom Verhältnis der Hydrophilie zur Lipophilie, vom pH-Wert, der Temperatur u. a. abhängt.

<sup>2</sup> Die Oberflächenspannung (allg. Grenzflächenspannung) ist eine Zustandsfunktion und hängt damit unter anderem von der Temperatur, Druck, Konzentration und den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen ab.

Zustand weisen die Fettsäureketten eine geringe Ordnung und eine große Beweglichkeit auf, daher wird dieser Zustand auch als gasanaloger Zustand bezeichnet. Daran schließt sich der flüssig-expandierte Bereich an, der sich durch eine deutlich geringere isotherme Kompressibilität auszeichnet. Aufgrund der zur Verfügung stehenden kleineren Fläche ist die Beweglichkeit der Acylketten eingeschränkt und ein Teil der Acylketten ist bereits aufgerichtet. Auf den flüssig-kondensierten Bereich folgt ein Phasenübergang erster Ordnung, der Filmdruck bleibt trotz kontinuierlicher Kompression konstant. Während des Phasenüberganges findet eine weitere Ausrichtung der Fettsäureketten<sup>1</sup> statt, bis anschließend ein dicht gepackter Zustand, der flüssig-kondensierte Zustand erreicht wird. Bei weiterer Kompression kann ein Übergang in den kondensiert-festen Phasenzustand des Filmes erfolgen, der durch das Auftreten einer Diskontinuität gekennzeichnet ist, bis schließlich der Film kollabiert, einhergehend mit Schollen- und Polyschichtenbildung.

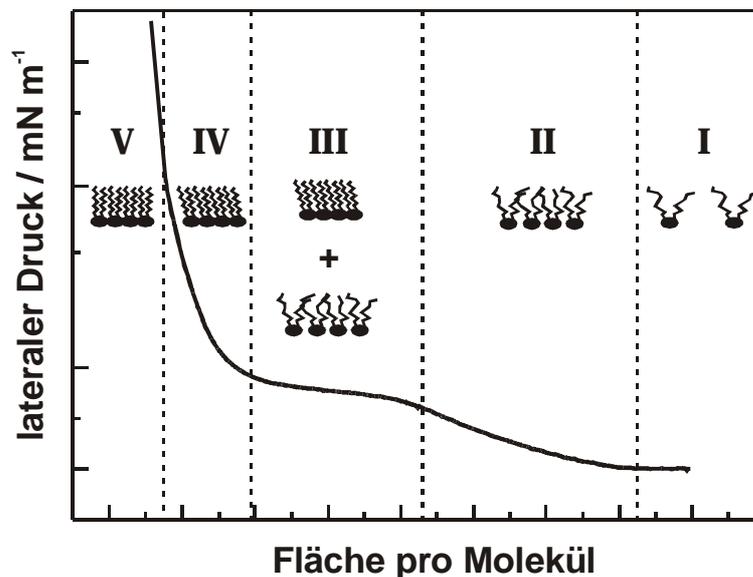


Bild 4-2: Isotherme für einen Langmuirfilm: I) gasanaloger Zustand, II) flüssig-expandiert, III) Koexistenzbereich, IV) flüssig-kondensiert, V) fest-kondensiert

<sup>1</sup> Entspricht einem Übergang lamellarer Strukturen in einem Lipid-Wasser System von  $L_{\alpha}$  zu  $L_{\beta}$ .

Analog zu dreidimensionalen Systemen (Gase) kann das zweidimensionale System durch eine modifizierte van-der-Waals Gleichung beschrieben werden:

$$\left( \pi + \frac{\alpha_V}{A_m^2} \right) (A_m - \beta_V) = k_B T, \quad (4.3)$$

wobei  $\alpha_V$  und  $\beta_V$  Stoffkonstanten (Dörfler, 1994) darstellen.

$\pi/A$ -Isothermen werden mit Hilfe der Filmwaagenteknik aufgezeichnet, dabei kann grundsätzlich zwischen zwei Meßverfahren unterschieden werden: die Langmuir-Methode und die Wilhelmy-Methode. Alle in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen sind an einer Filmwaage mit einem Meßaufbau nach Wilhelmy angefertigt worden, daher wird das Prinzip dieser Meßmethode kurz beschrieben.

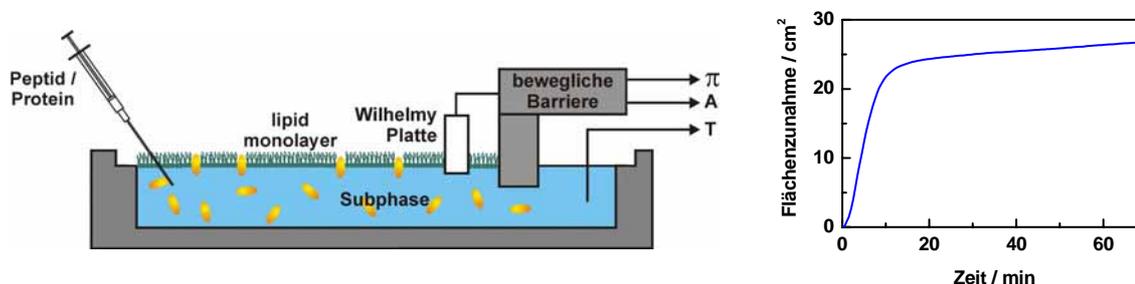


Bild 4-3: Filmwaage nach Wilhelmy. Der laterale Druck wird über die Kraft, mit der das Wilhelmy-Plättchen angezogen wird, gemessen. Mittels der beweglichen Barriere kann der Monolayer auf die gewünschte Fläche bzw. Druck komprimiert bzw. expandiert werden. Unter Zuhilfenahme einer Spritze kann z. B. Peptid unter den Monolayer injiziert und die stattfindende Interkalation über z. B. die Änderung der Monolayerfläche bei konstantem Druck (s. rechte Graphik) verfolgt werden. In der rechten Graphik ist der Einbau einer Substanz in einen Lipidmonolayer gezeigt, der Einbau führt zu einer Flächenzunahme. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden die Substanz unter den Monolayer injiziert.

*Meßprinzip und Meßaufbau.* Der Aufbau der Filmwaage (Munitech, München, Deutschland) ist in Bild 4-3 schematisch wiedergegeben. Eine bewegliche Barriere teilt die Oberfläche der wäßrigen Phase in zwei Kompartimente, wobei ein mit Teflon

überzogener, temperierbarer Trog zur Aufnahme der Subphase dient, auf der der Monolayer gespreitet wird. Der Filmdruck wird mit Hilfe des sogenannten Wilhelmy-Plättchens bestimmt, dabei handelt es sich um ein rechteckiges Filterpapier definierter Größe, das in die Subphasenoberfläche eintaucht. Aufgrund der am Plättchen angreifenden Oberflächenspannung wird das Plättchen in die Subphase hineingezogen und die Kraft (Petty, 1996), mit der dies geschieht, mittels eines induktiven Druckaufnehmers gemessen und mit einem speziellen Programm (Munitech, München, Deutschland) per Computer ausgelesen. Als Nulllinie wird die Kraft, die man ohne Film mißt, angenommen. Die Empfindlichkeit wird mit Hilfe der Eicosansäure als Referenzsubstanz justiert. Eine isotherme Kompression verkleinert die Monolayerfläche, dabei ändert sich (siehe oben) der Phasenzustand der Lipidmoleküle, der laterale Druck steigt an, und es werden die gewünschten  $\pi/A$ -Isothermen erhalten. Desweiteren kann im „Konstant-Druck-Modus“ der Lateraldruck konstant gehalten werden, hierbei wird die Barriere bei Druckänderung nachgeführt, man erhält die Isobaren. Mit dem „Konstant-Druck-Modus“ kann der für die äußere Membran diskutierte Lateraldruck von 25 mN/m eingestellt werden und so der Einbau von Substanzen aus der Subphase untersucht werden. Bei einem Einbau von Substanzen aus der Subphase führt dies zu einer Vergrößerung der Monolayerfläche. Die Größe des Einbaus und damit der Flächenänderung wird durch die Interaktion zwischen Substanz und Lipidkopfgruppen bestimmt. Die Meßdaten werden in einem ASCII-File gespeichert und mit Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA) ausgewertet und graphisch aufgearbeitet.

### 4.2.3 Monolayerpräparation und Einbaumessungen

Der Teflontrog wird mit Subphase befüllt, 10 Minuten auf  $T = 20^\circ\text{C}$  temperiert und die gemessene Kraft als Nullpunkt definiert (dies geschieht mittels der Menüfunktion „Zero“ der Steuersoftware). Die Temperatur von  $T = 20^\circ\text{C}$  wurde gewählt, da bei höheren Temperaturen ( $37^\circ\text{C}$ ) der Verlust an Subphase die Messungen beeinträchtigt. Anschließend wird eine definierte Menge des Lipids in chloroformischer Lösung (Eicosansäure) oder chloroformisch/methanolischer Lösung (LPS) auf der Oberfläche der Subphase gespreitet. Nach fünf Minuten ist das Lösungsmittel abgedampft, und der monomolekulare Film wird mit einer Schubgeschwindigkeit der Barriere von

$100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  auf einen zuvor bestimmten lateralen Druck komprimiert. Beispielsweise wurde für LPS - sofern nicht anders genannt - immer ein Enddruck von  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  gewählt, da dieser Wert demjenigen entspricht, der für biologische Membranen diskutiert wird (Seelig und Niederberger, 1974; Chapman, 1975a). Ist der gewählte Enddruck erreicht; wird die Änderung der Monolayerfläche bei konstantem Druck und konstanter Temperatur für mindestens 60 Minuten aufgezeichnet („Area-Time-Scan“ auch „Konstant-Druck-Modus“), um den Film zu äquilibrieren. Anschließend wird der Area-Time-Scan neu gestartet und nach 20 Minuten eine wäßrige Lösung von LL32 (0,25 oder 0,025 mM) unter den Monolayer gespritzt (Bild 4-3) und für weitere 160 Minuten die einsetzende Flächenänderung aufgezeichnet. Eine Anlagerung bzw. eine Interkalation der Substanz an bzw. in den Monolayer führt zu einer Zunahme der Monolayerfläche.

#### 4.2.4 $\text{Ca}^{2+}$ -Verdrängung aus Monolayern

Der Verdrängung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus einem Monolayer liegt ein anderer Versuchsaufbau zugrunde, der kurz skizziert werden soll. Hierfür wird ein Trog aus Plexiglas verwendet (Bild 4-4). In den Trog sind vier Bohrungen eingelassen, die dazu dienen vier Spritzen aufzunehmen. Auf diesen Trog wird ein Großflächendurchflußzähler (MZ 220/300, Laboratorium Berthold, Wildbad, Deutschland), der mit Methan als Zählgas betrieben wird, aufgesetzt. Verbunden ist der MZ 220/300 mit einem Alpha-Beta-Kontaminationsmonitor (LB1240, Laboratorium Berthold, Wildbad, Deutschland), der über Ausgänge für einen Schreiber bzw. eine Alarmeinheit verfügt. Über eine Analog-Input-Karte werden die Spannungen an den Ausgängen in einen PC eingelesen. Als Steuersoftware für die Datenerfassung diente Visual Designer 4.0 (Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen), für die Auswertung und graphische Aufarbeitung der Meßdaten wurde Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA) verwendet.

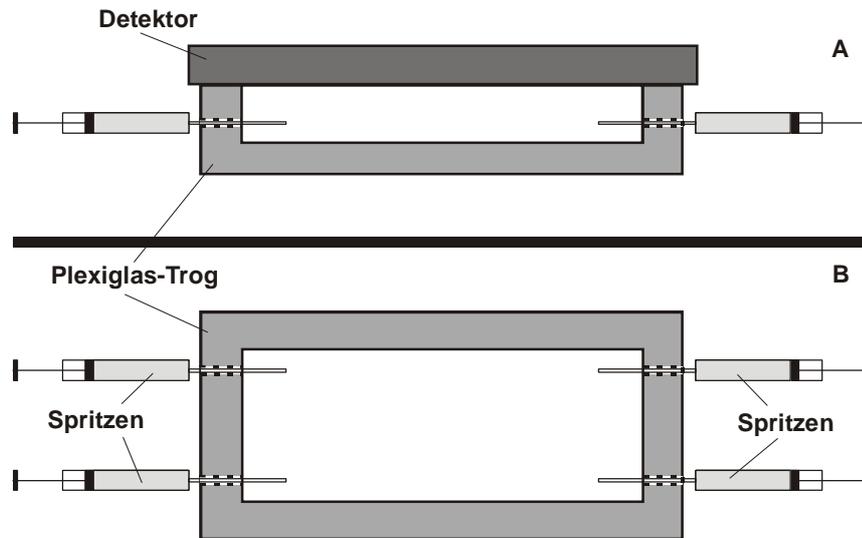


Bild 4-4: Versuchsaufbau für die Calciumverdrängungsexperimente. A: Seitenansicht, B: Draufsicht

Für die Messung werden 60 ml einer Calcium ( $12 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) enthaltenden Subphase in den Kunststofftrog gefüllt und mit radioaktivem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland; 162 Tage Halbwertszeit) auf eine Aktivität von 960 Bq/ml eingestellt. Anschließend wird der Monolayer auf die im vorigen Abschnitt beschriebene Art und Weise präpariert und unter Zuhilfenahme eines Ringtensiometers die Ausbildung des Monolayers kontrolliert. Aufgrund der negativen Ladungen der LPS kommt es zu einer Anreicherung der positiv geladenen Calciumionen in der Grenzfläche Wasser/Monolayer und damit auch zu einer detektierbaren Erhöhung der  $\beta$ -Strahlungsintensität aus der Oberfläche, da ein Teil der radioaktiven Calciumionen bei der Bindung an LPS nicht mehr vom Wasser abgeschirmt werden. Über eine Spritze wird ein definiertes Volumen einer das Peptid enthaltenden Lösung unter den Monolayer gespritzt und mit den verbleibenden zwei Spritzen gut durchmischt. Adsorbiert das Peptid am Monolayer, so verdrängt es einen Teil der gebundenen Calciumionen und ein Rückgang der gemessenen  $\beta$ -Strahlungsintensität wird gemessen. Die relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration der Grenzfläche Subphase/Monolayer wird mittels der Gleichung

$$I_{\text{rel}} = \frac{I_{\text{Peptid}} - I_{\text{Sub}}}{I_{\text{Mono}} - I_{\text{Sub}}} \quad (4.4)$$

berechnet, mit den  $\beta$ -Strahlungsintensitäten  $I_{\text{Sub}}$  der reinen Subphase,  $I_{\text{Mono}}$  nach Aufbringen des Monolayers und  $I_{\text{Peptid}}$  nach Peptidzugabe. In Bild 4-5 ist der Ablauf einer Messung mit einer Beispielmessung gezeigt.

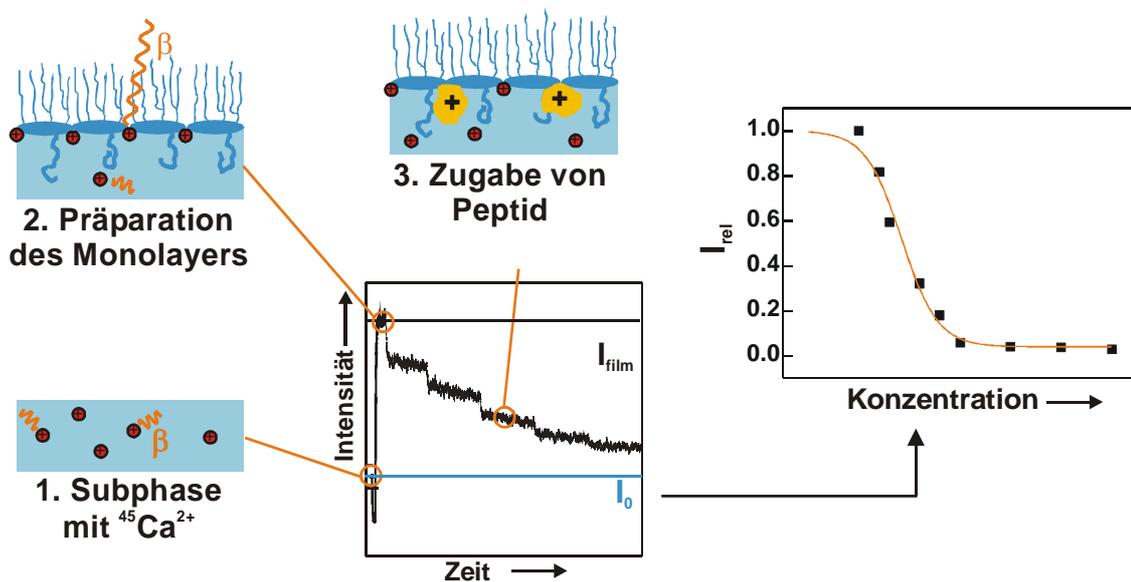


Bild 4-5: Schema zum Meßablauf einer Calciumverdrängung aus einem Monolayer.

### 4.3 Messungen an LPS-Aggregaten

LPS bilden unter bestimmten Voraussetzungen in wässriger Phase strukturell unterschiedlich organisierte Aggregate aus (Dörfler, 1994). Prinzipiell können zwei dreidimensionale Überstrukturen angeführt werden, eine mit lamellarem Ordnungsprinzip sowie eine nichtlamellare (kubische oder hexagonale) Phase (Seydel et al., 1993b). Welche der beiden Überstrukturen ausgebildet wird ist unter anderem vom Wassergehalt, der Konzentration an Ionen (hier sind vor allem die zweiwertigen Ionen zu

nennen) und der Temperatur abhängig. Im Allgemeinen bilden LPS nichtlamellare und Phospholipide lamellare (z. B. Liposomen) Aggregatstrukturen (s. Bild 4-7).

Aggregate stellen ein weiteres Rekonstitutionsmodell für biologische Membranen dar an denen verschiedene Untersuchungen möglich sind. Sie unterscheiden sich insofern von den Monolayern dadurch, daß sie ein dreidimensionales Gefüge haben und geschlossene Lipiddoppelschichten in Wechselwirkung mit dem Peptid treten. Im Vergleich zu der Methode der planaren Membranen ist anzuführen, daß beide Seiten der Lipiddoppelschichten der Aggregate bezüglich ihrer Lipidkomposition symmetrisch ausgebildet sind. Im folgenden sollen die verwendeten Untersuchungsmethoden dargestellt werden.

Experimente mit Liposomen spielen eine wichtige Rolle für das Verständnis verschiedener an der Membran stattfindenden und durch die Membran vermittelten Prozesse und sind heute aus der pharmakologischen Wirkstoffentwicklung nicht wegzudenken.

#### **4.3.1 Präparation der Aggregate**

Suspensionen von LPS-Aggregaten wurden in verschiedenen Rekonstitutionssystemen für biologische Membranen verwendet, und im Folgenden soll kurz die Darstellung skizziert werden. Für die Präparation wird zunächst das LPS eingewogen und anschließend der gewünschte Puffer in der entsprechenden Menge hinzugefügt, die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer richtet sich nach den jeweiligen Experimenten und sind in der vorliegenden Arbeit im experimentellen Teil in entsprechenden Abschnitten zu finden. Nach Zugabe des Puffers wird gut geschüttelt („gevortext“) und die Suspension danach für 20 min in einem Ultraschallbad Sonorex RK100 (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) bei 60°C beschallt. Danach läßt man die Suspension für 30 min auf Zimmertemperatur herunterkühlen, erhitzt schließlich für weitere 30 min auf 65°C im Blockthermostaten BT2000 (Kleinfeld Labortechnik, Deutschland) und läßt die Suspension wieder für 30 min auf Zimmertemperatur abkühlen. Die beiden letzten Schritte werden zweimal wiederholt und die Suspension für 24 h bei 4°C gelagert, bevor sie verwendet wird.

### 4.3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) mißt die bei Reaktionen freigesetzte bzw. absorbierte Wärme als universelle Meßgröße (Langerman und Biltonen, 1979; Ladbury und Chowdhry, 1996), insbesondere eignet sie sich dazu, biologisch relevante Makromolekül-Ligand-Interaktionen, wie z. B. die Protein-Lipid-Interaktion, zu untersuchen. Vorteilhaft bei dieser Methode ist dabei, daß die Probe weder homogen noch optisch klar sein muß, desweiteren ist keine Probenmarkierung und auch keine Immobilisierung erforderlich. Aus einer Meßung kann grundsätzlich ein komplettes thermodynamisches Profil der Reaktion erstellt werden (Wiseman et al., 1989).

*Kalorimeterbeschreibung.* Die Kalorimereinheit (MCS-ITC, MicroCal Inc. Northampton, USA) setzt sich aus einer Referenz-, einer Reaktionszelle und der Titrationsspritze zusammen (für eine genauere Beschreibung siehe (Wiseman et al., 1989; Livingstone, 1996)). Beide Zellen bestehen aus einer Nickel-Molybdän-Chrom-Legierung (hastelloy alloy C-276) mit sehr guter Wärmeleitfähigkeit. Sie haben ein Zellvolumen von je 1,3 ml und sind von einer isothermen Ummantelung umgeben. Sowohl die Ummantelung als auch die beiden Zellen verfügen über Wärmesensoren und Heizelemente zur Temperaturregelung. Dieser Aufbau ist in einem adiabatischen Schutzschild untergebracht. Über zwei lange Röhren können den Zellen die Referenz- sowie Probenflüssigkeit zugeführt werden.

Die Titrationsvorrichtung besteht aus einer Halterung für die Spritze und einer Schrittmotorsteuerung, die den Stempel der Spritze entsprechend dem gewählten Einspritzvolumen hinunterdrückt. Die Spritzen sind lang ausgezogen und die Enden als Paddel geformt, so daß durch kontinuierliches Drehen der Spritze eine gute Durchmischung der Reaktanten gewährleistet ist. Über eine von der Herstellerfirma mitgelieferte Software (MCS-Observer) wird das Kalorimeter über einen PC gesteuert.

*Meßprinzip.* Das Meßprinzip des Gerätes beruht darauf, daß die Temperaturdifferenz zwischen Probenzelle und Meßzelle ständig überprüft wird. Kommt es zu einer Auslenkung aus dem thermischen Gleichgewicht der beiden Zellen (d. h. findet eine Reaktion in der Probenzelle statt), wird der Probenzelle ein zur Temperaturdifferenz proportionaler Heizstrom (Regelstrom) zugeführt. Die Regelleistung (Cell current feedback, CFB) wird zeitabhängig gemessen und stellt die Wärmeänderung der

Reaktion dar. Eine exotherme Reaktion bewirkt eine Verringerung des CFB, während bei einem endothermen Verlauf der kompensierende Strom hochreguliert wird. Um eine Kompensation von sowohl exo- als auch endothermen Reaktionen zu ermöglichen, wird daher der Referenzzelle ein permanenter Heizstrom zugeführt (s Bild 4-6).

*Experimentdurchführung.* Für eine Messung wird die Referenzzelle mit 1,5 ml sterilfiltriertem und entgastem Reinstwasser und die Probenzelle mit 1,5 ml der wässrigen LPS-Dispersion (sofern nicht anders erwähnt 0,05 mM LPS, 20 mM HEPES, pH = 7) befüllt. Dann wird gewartet bis die kalorimetrische Einheit im thermischen Gleichgewicht, erkennbar an einem konstanten CFB, ist. Anschließend wird die mit 100 bis 110  $\mu\text{l}$  wässrige Peptidlösung (1,5 mM LL32, 20 mM HEPES, pH = 7) gefüllte Spritze in die Probenzelle eingeführt. Wieder wird bis zum Erreichen des thermischen Gleichgewichtes gewartet und die Reaktion gestartet. Die Peptidzugabe erfolgt in 30 Aliquots zu je 3  $\mu\text{l}$ , und nach jedem Titrationsschritt wird der entsprechende CFB

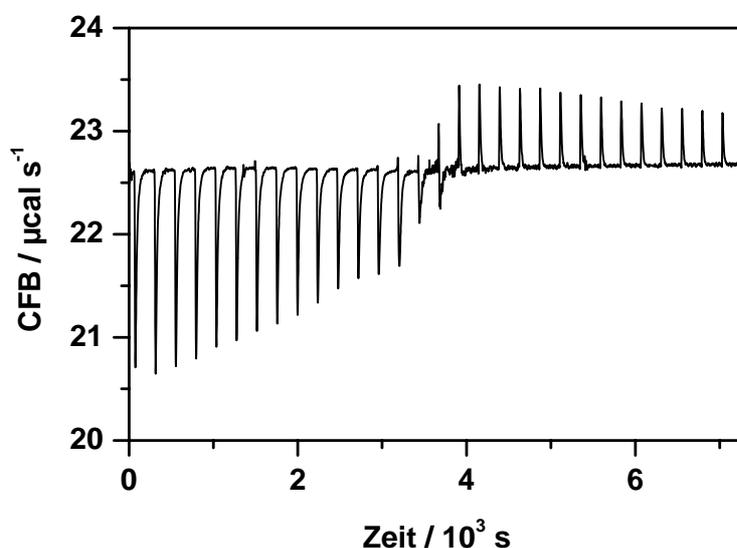


Bild 4-6: Zeitlicher Verlauf einer ITC-Messung. Gezeigt ist die Leistung des Heizstroms, die aufgrund der ablaufenden Reaktion zugeführt (respektive heruntergeregelt) wird. Im gezeigten Beispiel wird während der ersten Titrationen die Regelleistung runtergefahren, die Reaktion ist also exotherm. Nach etwa der 16. Titration kehrt sich die gemessene Leistung um, entsprechend einer endothermen Reaktion.

registriert (für den typischen Verlauf eines solches Experimentes siehe Bild 4-6). Nach einer wenige Minuten dauernden Relaxationszeit wird die Titration wiederholt, bis alles an Peptidlösung verbraucht ist. Zur Kontrolle wurde erstens die Peptidlösung in reinen Puffer und zweitens reiner Puffer in die LPS-Dispersionen titriert. Die Kontrollmessungen dienten zur Korrektur der Experimente bezüglich der Verdünnungs- sowie Mischungsenthalpien. Die gemessenen Wärmesignale werden mit Hilfe des Programmes Origin 6.0 integriert und können graphisch als Bindungsisotherme dargestellt werden.

*Auswertung.* Für die Interaktion zwischen zwei Reaktionspartnern A und B



mit A, B und AB den Konzentrationen der entsprechenden Spezies und n der Anzahl unabhängiger (nicht kooperativer) Bindungsmöglichkeiten gilt das Massenwirkungsgesetz mit der Gleichgewichtskonstante  $K_a$ , und es folgt:

$$K_a = \frac{AB_n}{A \cdot B^n} = \frac{AB_n}{(A_t - AB_n) \cdot (B_t - n AB_n)^n} \quad (4.6)$$

Bekannt sind die Totalkonzentrationen  $A_t$  und  $B_t$  (experimentelle Parameter), weiterhin gilt stets  $A_t = AB_n + A$  und  $B_t = n \cdot AB_n + cB$ . Unbekannte sind  $K_a$  und n (Anzahl Bindungsstellen von B pro Molekül A).

Die Messungen mit dem Mikrokalorimeter liefern die differentielle Wärmemenge q, die bei der Bindung von B an A bzw. an  $AB_n$  umgesetzt wird. Es ergibt sich:

$$\Delta q = V_0 \Delta H_b B_{\text{gebunden}} = V_0 \Delta H_b \Delta AB_n, \quad (4.7)$$

wobei  $V_0$  das Volumen der Meßzelle und  $\Delta H_b$  die molare Bildungsenthalpie der Verbindung AB darstellt.  $\Delta q$  ist die integrale Wärmemenge. Gleichung (4.6) kann nach  $AB_n$  aufgelöst werden (quadratische Gleichung), und man erhält für  $\Delta q$  schließlich:

$$\Delta q = \frac{n A_t V_0 \Delta H_b}{2} \left[ \left( 1 + \frac{1}{n A_t K_a} + \frac{B_t}{n A_t} \right) - \sqrt{\left\{ \left( 1 + \frac{1}{n A_t K_a} + \frac{B_t}{n A_t} \right)^2 - 4 n A_t B_t \right\}} \right]. \quad (4.8)$$

$A_t$  ist bekannt, und  $\Delta q$  wird als Funktion der zugegebenen Menge an  $B_t$  gemessen. Folglich lassen sich  $n$ ,  $H_b$  und  $K_a$  durch einen Fit der Funktion (4.8) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an die experimentell ermittelten Werte  $\Delta q = f(B_t)$  bestimmen.

Aus den experimentell bestimmten Kurven  $\Delta q = f(B_t)$  wurden in oben beschriebener Weise  $n$ ,  $H$  und  $K$  bestimmt. Weiter wurde aus diesen Daten die Gibb'sche Freie Enthalpie sowie  $T\Delta S$  nach den Beziehungen

$$\begin{aligned} \Delta G &= -n R T \ln K_a = \Delta H_b - T \Delta S_b \\ T \Delta S &= \Delta H_b + n R T \ln K_a \end{aligned} \quad (4.9)$$

berechnet.

### 4.3.3 Bestimmung des Zetapotentials (elektrophoretische Mobilität)

Die Bestimmung des Zetapotentials eignet sich dazu, Änderungen der Oberflächenladungsdichte und damit des Oberflächenpotentials von z. B. Lipidaggregaten in Abhängigkeit vom pH-Wert, dem Ionengehalt, oder dem Gehalt an Fremdschubstanz zu untersuchen. Das Verfahren findet in der Industrie breite Anwendung, um Aussagen über elektrostatisch stabilisierte Kolloide zu treffen

*Meßprinzip.* Bei der elektrophoretischen Mobilität wird die Wanderungsgeschwindigkeit elektrisch geladener Teilchen, wie z. B. LPS-Aggregate in Lösung, im

elektrischen Feld gemessen. Den Quotienten von Wanderungsgeschwindigkeit zu angelegtem Feld

$$B = \frac{u}{E} \quad (4.10)$$

bezeichnet man als elektrophoretische Mobilität mit der Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  und dem elektrischen Feld  $E$ . Aus der gemessenen Mobilität kann das Zetapotential, d. h. das effektive Oberflächenpotential, berechnet werden (siehe 3.4.3). Eine Überlagerung von vier Kräften bestimmt dabei die Bewegung der Teilchen:

- (1) *Elektrische Kraft*. Durch das angelegte elektrische Feld kommt es zu einer gleichförmigen Bewegung der dispergierten Teilchen, die Geschwindigkeit dieser Bewegung ist proportional zur angelegten Feldstärke und der Oberflächenladungsdichte der Partikel.
- (2) *Stokessche Reibungskraft*. Durch Reibung wird die Bewegung der Teilchen in der Lösung abgebremst, die Reibungskraft ist abhängig von der Viskosität des Lösungsmittels ( $\mu_{\text{H}_2\text{O}} = 89 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}\cdot\text{s}$  bei  $T = 25^\circ\text{C}$ ) sowie der Teilchenoberfläche und der Geschwindigkeit, mit der sich die Teilchen bewegen.
- (3) *Elektrophoretische Bremskraft*. Im angelegten elektrischen Feld bewegen sich auch die Gegenionen, die sich mit im Dispersionsmittel befinden und die entgegengesetzt zu den dispergierten Teilchen fließen. Bewegen sich die Teilchen aneinander vorbei, so behindern die mitgeführten Hydrathüllen der Gegenionen die Partikelbewegung und umgekehrt.
- (4) *Relaxationseffekt*. Für den Relaxationseffekt ist eine Störung der Ladungssymmetrie in der diffusen Schicht bei der Bewegung der Teilchen ursächlich. Dabei entsteht ein zusätzliches inneres Feld, welches dem angelegten äußeren entgegengerichtet ist und die effektive Feldstärke am Teilchenort herabsetzt.

Für den Fall geringer Ionenkonzentrationen können die beiden letztgenannten Kräfte vernachlässigt werden (Dörfler, 1994; Spanos et al., 2002). Somit ergibt sich bei einer

angelegten Wechselspannung der Feldstärke  $E = E_0 \sin(\omega t)$  die Wanderungsgeschwindigkeit zu (Dörfler, 1994):

$$u_\omega = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} f_H(r_T \kappa) E_0 \sin(\omega t). \quad (4.11)$$

Hierbei ist  $f_H(r_T \kappa)$  die Henry-Funktion und  $r_T$  der Teilchenradius.

*Beschreibung des Zetasizers.* Die Messungen zur elektrophoretischen Mobilität bzw. zum Zetapotential wurden mit dem ZetaSizer 4 (Malvern Instruments GmbH, Herrsching, Deutschland) durchgeführt und beruhen auf dem Meßprinzip der Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Hierbei wird ein Laserstrahl über einen Strahlteiler in zwei Teilstrahlen aufgeteilt und diese über eine Optik in einem Strömungsrohr unter einem Winkel von  $12,7^\circ$  gekreuzt. Es entsteht ein Interferenzfeld mit nahezu parallelen Hell-Dunkel-Interferenzstreifen, das sogenannte LDA-Meßvolumen. An beiden Enden des Strömungsrohres tauchen Elektroden in die Teilchendispersion ein, über die eine Wechselspannung angelegt wird<sup>1</sup>.

Unter dem Einfluß des elektrischen Feldes beginnen die Teilchen entsprechend ihres Oberflächenpotentials entlang der Feldlinien (parallel zur Hauptachse des Strömungsrohres) zu wandern und erzeugen bei dem Durchgang durch das Meßvolumen ein mit der Dopplerfrequenz moduliertes Streulicht. Aus der Anzahl der pro Zeiteinheit durchlaufenen Interferenzstreifen ergibt sich die elektrophoretische Mobilität (Müller, 1996). Um das Vorzeichen des Oberflächenpotentials zu bestimmen, wird einer der beiden Spiegel mit einer bestimmten Frequenz auf einer Strecke hin und her gefahren, damit ergibt sich eine modulierte Bewegung des Interferenzfeldes. Da die Teilchen sich entweder mit oder aber gegen das Interferenzmuster bewegen, ist die Richtung der Teilchen und damit das Vorzeichen der Ladung eindeutig.

Die Detektion des Streulichtes erfolgt mit einem Photomultiplier senkrecht zur Bewegungsrichtung der Teilchen, das Meßsignal wird mit einem von der Herstellerfirma (Malvern Instruments GmbH, Herrsching, Deutschland) mitgelieferten Programm mit Hilfe eines PC ausgelesen und ausgewertet.

---

<sup>1</sup> Dient dazu eine Polarisation der Elektroden zu verhindern.

*Experimentdurchführung.* Für eine Meßung der Abhängigkeit des Zetapotentials in Anwesenheit von Wirkstoff wurden 2 ml der jeweiligen LPS-Dispersion (0,01 mM LPS, 2 mM CsCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH = 7) in die Meßkammer gegeben und zunächst das Zetapotential ohne Wirkstoff gemessen. Anschließend wurde der Wirkstoff in Aliquots zu 2 oder 4 µl (1 mM, 2 mM CsCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH = 7) zutitriert und das resultierende Zetapotential bestimmt. Dies wurde solange wiederholt, bis keine Änderung des Zetapotentials mehr festzustellen war (maximal wurden 40 µl der Wirkstofflösung zugegeben). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 4.3.4 Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

Die Fluidität der Lipide (s. 3.4.1) entspricht der Beweglichkeit ihrer Kohlenwasserstoffketten. Zwischen Zuständen unterschiedlicher Fluidität (Phasen) erfolgt ein Phasenübergang bei einer charakteristischen Temperatur  $T_c$  (abhängig z. B. von Länge und Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten) und kann durch Interaktion mit z. B. Peptiden beeinflusst werden. Eine Möglichkeit, den Phasenübergang von Lipiden und den Einfluss applizierter Substanzen auf diesen zu bestimmen, ist die FTIR-Spektroskopie.

*Meßprinzip.* Die FTIR-Spektroskopie nutzt die Tatsache aus, daß Atome bzw. Atomgruppen in Molekülen relativ zueinander Schwingungsbewegungen ausführen und verschiedene Schwingungsmodi existieren. Anregungen der Schwingungszustände lassen sich allgemein durch Strahlungsabsorption im infraroten Bereich ( $200 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) des elektromagnetischen Spektrums bewirken. Funktionelle Gruppen zeigen charakteristische Schwingungen, denen Absorptionsbanden in definierten Bereichen des IR-Spektrums entsprechen. So ist die Lage der Absorptionsbande der symmetrischen CH<sub>2</sub>-Streckschwingung ( $\nu_s(\text{CH}_2)$ ) ein Maß für die Fluidität der Kohlenwasserstoffketten (Brandenburg und Seydel, 1990). Während das Maximum der  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande im gelförmigen Zustand bei etwa  $2850 \text{ cm}^{-1}$  liegt, ist es in der flüssig-kristallinen bei  $2852 - 2853 \text{ cm}^{-1}$  zu finden. Deshalb kann durch Auftragung der Bandlage der symmetrischen Streckschwingung der Methylengruppen gegen die Temperatur der Phasenübergang aus der erhaltenen Kurve ermittelt werden (Brandenburg, 1994; Brandenburg und Seydel, 1996).

*Spektrometer.* Für die Messungen der Spektren wurde ein Bruker FTIR-Spektrometer IFS55 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) benutzt. Die Proben temperierung erfolgte mit einem Umwälzthermostat Haake Q3 (Haake, Karlsruhe, Deutschland). Die Messungen erfolgten in Transmission. Infolge der Wechselwirkung der Analytmoleküle mit der IR-Strahlung kommt es zur Absorption, für die das Lambert-Beersche Gesetz gültig ist. Für die Transmissionsmessung wurden optisch polierte IR-Fenster aus  $\text{CaF}_2$  (K. Korth Monokristalle, Kiel, Deutschland) verwendet, zwischen denen sich die Probe befand. Als Abstandhalter zwischen den IR-Fenstern diente eine 12.5  $\mu\text{m}$  dicke Teflonfolie.

Die Steuerung des Spektrometers sowie die Probenauswertung erfolgten mit einer vom Hersteller (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) mitgelieferten Software.

*Experimentdurchführung.* Die Lipidproben wurden als wäßrige Suspensionen 20 mM in 5 mM HEPES-Puffer (pH = 7) auf die  $\text{CaF}_2$ -Fenster aufgebracht. Für die Wirkstoffzugabe wurde die Suspension zuvor auf 37°C aufgeheizt, der Wirkstoff zugegeben, 10 min inkubiert und bevor Aufbringen der Probe zwischen die  $\text{CaF}_2$ -Fenster abgekühlt. Vor jeder Messung wurde ein Untergrundspektrum mit den eingesetzten  $\text{CaF}_2$ -Fenstern aufgezeichnet und von den erhaltenen Spektren subtrahiert. Die Probe wurde mit einer Heizrate von 3°C / 5 min erwärmt und alle 5 min 50 Spektren aufgezeichnet, die um den Untergrund korrigiert und schließlich gemittelt wurden. Die Messungen zur Fluidität der LPS-Aggregate am FTIR-Spektrometer wurden jeweils einmal durchgeführt. Sie haben daher einen rein qualitativen Charakter der dazu dienen soll den grundsätzlichen Einfluß von LL32 auf die Fluidität der LPS zu untersuchen.

#### **4.3.5 Fluoreszenzpolarisationsmessungen**

Als weitere Methode zur Bestimmung des Einflusses von LL32 auf den Ordnungszustand der Kohlenwasserstoffketten der LPS wurden Fluoreszenzpolarisationsmessungen durchgeführt, sie dienten zur Überprüfung der in FTIR-Experimenten gemachten Untersuchungen und ebenfalls rein qualitativ zu betrachten, da auf Mehrfachmessungen verzichtet wurde.

Wie im Grundlagenteil beschrieben wurde, können aus dem Ordnungszustand der Acalketten Aussagen bezüglich der Fluidität der Lipide und damit auf die Phasenübergangstemperatur gemacht werden. Im Folgenden soll kurz die Methode und anschließend das Spektrometer vorgestellt werden.

*Polarisationsmessungen.* Der Fluoreszenzfarbstoff 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) eignet sich dazu, den Phasenzustand der Kohlenwasserstoffketten zu charakterisieren. Für eine Markierung wird der Farbstoff den Lipiden bei der Aggregatpräparation zu einem Mol-% zugesetzt. Aufgrund seiner Struktur lagert sich das DPH im hydrophoben Bereich der Aggregate parallel zu den Kohlenwasserstoffketten ein (Pottel et al., 1983). Durch Einstrahlung von linear polarisiertem monochromatischem Licht ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) werden die DPH-Moleküle elektronisch angeregt. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für eine Anregung maximal, wenn das Dipolmoment des DPH-Moleküls parallel zur Richtung des elektrischen Feldvektors des anregenden Lichtes liegt. Nach erfolgreicher Anregung deaktivieren die DPH-Moleküle zeitverzögert mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit emissiv, und die beobachtete Strahlung ist zu höheren Wellenlängen verschoben. Der elektrische Feldvektor des von den Molekülen emittierten Lichts liegt wiederum parallel zum Dipolmoment des Moleküls. Mit einer erhöhten Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten geht nun ebenfalls eine erhöhte Beweglichkeit der Farbstoffmoleküle einher, und die Einheitlichkeit der Polarisation der emittierten Strahlung nimmt ab, da sich in der Zeit von Anregung zur Emission das DPH-Molekül und mit ihm der Dipolmomentvektor aus der Polarisationsrichtung der Anregungsstrahlung herausdreht. Entsprechend findet man bei maximalem Ordnungszustand eine maximale Fluoreszenzintensität. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur und gleichzeitiger Aufnahme der parallelen und senkrechten Polarisation (relativ zur Anregungsstrahlung) kann somit der Übergang von der gelförmigen in die flüssig-kristalline Phase der Kohlenwasserstoffketten bestimmt werden.

*Spektrometer.* Die Messungen wurden an einem Spektralphotometer Modell Fluorolog F1 T11 (Spex Industries GmbH, Grasbrunn, Deutschland) durchgeführt. Es ist als Zwei-strahl-T-Anordnung ausgeführt und ermöglicht so die gleichzeitige Messung der parallelen und senkrechten Komponente des Fluoreszenzlichtes (relativ zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts). Als Strahlungsquelle wird eine Xenon-Bogenlampe verwendet, die Wellenlängenselektion erfolgt über Spiegelgitter-monochromatoren, Schlitzblenden dienen der Einstellung der Strahlintensitäten, und mittels Glan-Thomson-Prismen kann die Polarisation eingestellt bzw. analysiert werden. Die Detektion erfolgt mit Photomultipliern, die bei Bedarf mit Peltier-

Elementen gekühlt werden können. Mit Hilfe der Software DM3000 (Spex Industries GmbH, Grasbrunn, Deutschland) wird das Spektrometer gesteuert sowie die Fluoreszenzintensitäten ausgelesen und verarbeitet.

#### 4.3.6 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie gehört zu den Verfahren der Absorptionsspektroskopie, die die Chiralität von Molekülen, d. h. optisch aktive Verbindungen, ausnutzen. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann z. B. die Sekundärstruktur von Proteinen untersucht werden. So zeigen Proteinbereiche mit  $\alpha$ -helikalen Strukturen eine optische Aktivität aufgrund der asymmetrischen  $\alpha$ -Kohlenstoffatome sowie durch Kopplung mit benachbarten Bindungen.

*Circularer Dichroismus.* Optisch aktive Verbindungen besitzen sowohl unterschiedliche Brechungsindizes als auch unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für rechts- bzw. linkspolarisiertes Licht. So erhält man bei der Transmission von linear polarisiertem Licht durch eine optisch aktive Substanz elliptisch polarisiertes Licht, da sich die beiden Vektoren des elektrischen Feldes unterschiedlich schnell durch die Probe bewegen und die Amplituden verschieden stark verändert werden. Beide Effekte sind nicht nur von der Menge der Substanz, sondern auch von der durchstrahlten Weglänge abhängig. Der Unterschied in den Extinktionskoeffizienten ist die Meßgröße, die man bei der CD-Spektroskopie erhält und wird praktisch als Elliptizität

$$\tan \theta_{\lambda} = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad (4.12)$$

gemessen, mit  $I_R$  und  $I_L$  den Intensitäten für rechts bzw. links polarisiertes Licht nach Durchgang durch die Probe.

*Spektrometer.* Die CD-Messungen wurden mit einem Jasco-720 Spektropolarimeter (JASCO Labor-und Datentechnik GmbH Deutschland, Gross-Umstadt) durchgeführt. Bei diesem Gerät wird der zirkular polarisierte Lichtstrahl aus einem linear polarisierten Strahl erzeugt, indem man diesen durch einen Quarzkristall schickt, an dem eine hochfrequente Wechselspannung anliegt, die eine Strukturänderung des Kristalls bewirkt. Für die Messungen wurden verschiedene Quarzglasbüchsen verwendet, eine

Tandemküvette (Schichtdicke  $2 \times 4,375$  mm) und eine Rundküvette (Schichtdicke 1 mm). Die Tandemküvette besitzt gegenüber der Rundküvette den Vorteil, daß sie über zwei getrennte Kammern verfügt, die je einen Reaktionspartner aufnehmen, so daß CD-Spektren vor und nach der Bindung jeweils in Anwesenheit beider Bindungspartner aufgezeichnet werden können. Die Rundküvette wurde benötigt, um den Konzentrationsbereich in dem gemessen werden konnte zu bestimmen.

*Experimentdurchführung.* Um einen Vergleich des Einflusses der LPS auf die Struktur des LL32 zu bekommen, wurden CD-spektroskopische Messungen des Proteins in Ab- und Anwesenheit von LPS-Aggregaten durchgeführt. Dafür wurde zunächst der für die Messungen optimale Konzentrationsbereich für sowohl LPS als auch Peptid bestimmt. Dazu wurde zunächst mit der Rundküvette gemessen und verschiedene Konzentrationen von Peptid (1 bis 10  $\mu\text{M}$ ) und LPS (1 bis 10  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Es wurden sowohl für Peptid als auch LPS optimale Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  gefunden. Anschließend wurden die Kammern der Tandemküvette mit gleichen Volumina an Peptid- und LPS-Suspension befüllt und die Elliptizität bestimmt. Schließlich wurde der Inhalt beider Kammern durch kräftiges Schütteln gemischt und erneut die Elliptizität gemessen. Die Meßdaten wurden mit einem von der Herstellerfirma mitgelieferten Programm ausgelesen, als ASCII-Files abgespeichert und mittels Origin 6 ausgewertet und graphisch aufgearbeitet.

#### 4.3.7 Röntgenkleinwinkelstreuung

Dreidimensionale Strukturen lassen sich mit Hilfe der Röntgenbeugung untersuchen und aufklären. Mit den in den letzten Jahrzehnten gemachten Fortschritten auf dem Gebiet der Röntgenkleinwinkelstreuung ist es inzwischen möglich, Strukturuntersuchungen an biologischen Präparaten, wie z. B. Lipidaggregaten in wäßriger Lösung, vorzunehmen, die keine Einkristalle bilden. Eine ausführliche Übersicht über die Röntgenbeugung an biologischen Makromolekülen findet sich in (Makowski und Li, 1984). Im folgenden soll kurz auf das Wesentliche der Methode der Kleinwinkelstreuung eingegangen werden.

*Meßprinzip.* Gemäß der Bragg'schen Streuformel

$$2 \cdot d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (4.13)$$

findet unter dem Winkel  $\theta$  (Einfallswinkel- respektive Ausfallswinkel) eine Beugung von Röntgenstrahlung an den Netzebenen eines Kristalls statt, mit  $d$  = Netzebenenabstand,  $\lambda$  = Wellenlänge der verwendeten Strahlung und der Ordnung  $n = 1, 2, 3, \dots$  der beobachteten Reflexe. Für Einkristalle erhält man für jede Netzebenenchar punktförmige Reflexe, hingegen weisen reale biologische Systeme nur sehr kleine kristalline Domänen auf, und in größeren Bereichen sind die Streuzentren mehr oder minder isotrop angeordnet, so daß statt scharfer Reflexe ein Debye-Scherrer-Streubild auftritt. Aus der Analyse der Beugungsdiagramme kann auf die vorliegende Aggregatstruktur geschlossen werden. Hierbei interessiert in erster Linie der Beugungsbereich von  $0 < s < 0,8 \text{ nm}^{-1}$  ( $s$  ist der Streuvektor, es gilt  $|s| = 1/d$ ), da dieser die Fernordnung der Lipidaggregate enthält, d. h. die Gitterkonstanten, die gewöhnlich im Bereich zwischen 5 und 20 nm liegen. Es seien kurz die Strukturen dargestellt, die spezifische Reflexe verursachen.

*Lamellare Strukturen.* Äquidistante Reflexe bei  $d_L, d_L/2, d_L/3, d_L/4, \dots$  deuten auf das Vorhandensein lamellarer Strukturen hin ( $d_L$  Länge der lamellaren Elementarzelle, s. Bild 4-7). Dies gilt in erster Linie für multilamellare Anordnungen, bei der die lamellare

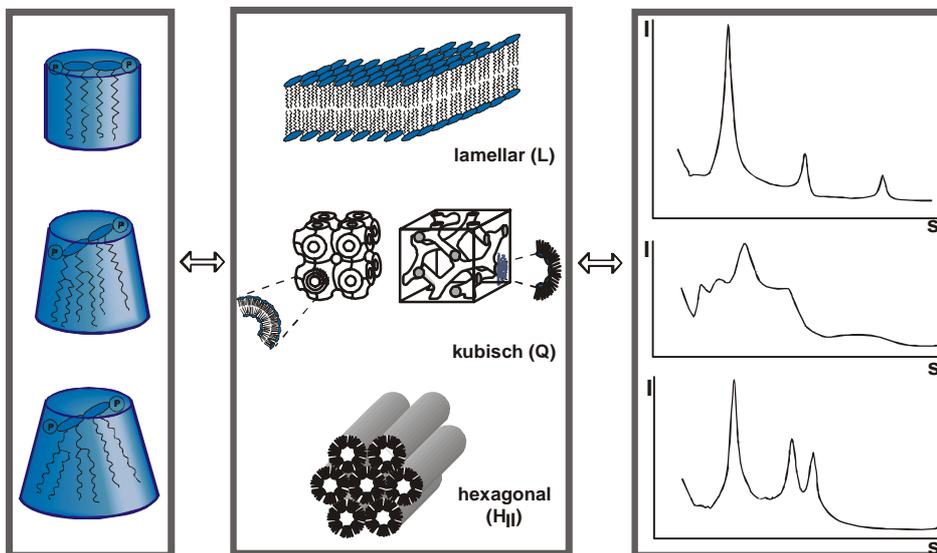


Bild 4-7: Molekülkonformationen verschiedener Lipid A-Monomere (links), die daraus resultierenden dreidimensionalen Aggregatstrukturen in wässriger Lösung (Mitte) und die zugehörigen Röntgenbeugungsmuster (rechts).

Periodizität  $d_L$  eine Lipiddoppelschicht und die zwischen den Lamellen liegende Wasserschicht umfaßt. Bei unilamellaren Strukturen hingegen treten sehr breite Reflexionen auf, die keine oder nur eine geringe Anzahl höherer Ordnungen aufweisen und eine Identifizierung erschweren oder auch zunichte machen.

*Kubische Strukturen.* Die Beziehung zwischen Netzebenenabstand  $d$  und Gitterkonstante  $a$  lautet für kubische Strukturen

$$d = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (4.14)$$

mit  $h$ ,  $k$ ,  $l$  den sogenannten Millerschen Indizes der Netzebene (Henry und Lonsdale, 1969).

Die kubischen Strukturen können durch ihr unterschiedliches Röntgen-Diffraktogramm unterschieden werden. So kann man z. B. für die kubische Raumgruppe  $Q^{224}$  folgende Verhältnisse für die Reflexpositionen finden:  $1, \sqrt{2}, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{6}, \sqrt{8}, \sqrt{9}, \sqrt{10}, \dots$ . Die zweidimensionale Geometrie der hexagonalen Struktur gibt Anlaß zu Reflexen bei den Positionen  $1, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{7}, \sqrt{9}, \sqrt{12}, \sqrt{13}, \dots$ . Für weitere Informationen siehe: International Tables (Lindblom und Rilfors, 1989).

*Experimentdurchführung.* Die Lipidsuspension wird in eine speziell konstruierte Küvette eingefüllt, die ein Volumen von ca. 100  $\mu\text{l}$  und eine Weglänge von 1 mm haben. Relativ hohe erforderliche Konzentrationen an Lipid (Größenordnung 5 bis 10 mg, je nach Wassergehalt) stellen eine Limitierung der Methode dar. Die grundlegende Vorrichtung für die Röntgenkleinwinkelstreuung (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) ist in (Koch und Bordas, 1983) beschrieben und steht an der Außenstation des Europäischen Molekularbiologischen Labors (EMBL) am Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB (c/o DESY). Die Intensitäten herkömmlicher Röntgenquellen reichen nicht aus, da die Proben mit einem Wassergehalt von 85% eingesetzt wurden, aus diesem Grund wurden die Streuexperimente mit Synchrotronstrahlung durchgeführt. Gemessen wird mit der doppelt-fokussierenden Monochromator-Spiegel Kamera X33 (Koch, 1988) im Temperaturbereich von 20 bis 80°C in Intervallen von 10°C. Die Röntgenbeugungsmuster werden mit Expositionszeiten von 2 bis 3 min mit einem linearen Detektor aufgenommen. Vor jeder Meßperiode wird eine

Wellenlängenkalibrierung mit trockenem Kollagen aus dem Rattenschwanz, das eine Periodizität von 65 nm hat, durchgeführt. Zu den Details der Datenaquisition siehe (Boulin et al., 1986), die in ASCII-Form vorliegenden Daten wurden schließlich mit Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) ausgewertet und graphisch aufgearbeitet.

#### 4.4 Planare Lipiddoppelschicht-Membranen

Grundsätzlich existieren zwei Methoden, die sich für die Präparation planarer Lipiddoppelschichten eignen. Zum einen ist dies die Methode nach Mueller und Rudin aus dem Jahre 1962 (Mueller et al., 1962) und zum anderen die 1972 publizierte Montal-Mueller Methode (Montal und Mueller, 1972). Entsprechend ihrer Präparationsmethode werden die nach der Mueller-Rudin Methode hergestellten Membranen auch „Painted Bilayers“ genannt: mittels eines Pinsels oder einer Drahtöse wird die membranbildende Lipidlösung (typischerweise dient Hexadekan als Lösungsmittel) direkt auf eine Apertur ( $\varnothing \approx 1$  mm) in einer dünnen Wand zwischen zwei mit wäßriger Lösung gefüllten Kompartimenten gepinselt (Tien, 1974). Die so aufgebraute Lipid-Alkan-Schicht dünnt im Laufe weniger Minuten aus, und im mittleren Bereich der Apertur bildet sich eine Lipiddoppelschicht aus. Betrachtet man den Ausdünnungsprozeß im reflektierten Licht, so zeigt sich das Entstehen der Doppelschicht als Schwarzfärbung, daher auch die Bezeichnung „Black Lipid Membrane“. Nachteilig bei dieser Methode ist jedoch, daß sich bezüglich der Lipidverteilung nur symmetrische Membranen präparieren lassen, die zudem über einen sehr hohen Restgehalt an Lösungsmittel verfügen. Die Methode nach Montal-Mueller gestattet hingegen die Präparation von asymmetrischen Membranen, wie z. B. Membranen die auf der einen Seite aus einem LPS und auf der anderen Seite aus einem Phospholipidgemisch (wie es für Gram<sup>-</sup> Bakterien gefunden wird, siehe 3.2) bestehen. Sie ist damit hervorragend geeignet zur Präparation rekonstituierter Lipidmatrizes der äußeren Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien. Außerdem haben die so hergestellten Membranen einen wesentlich geringeren Restgehalt an Lösungsmittel, aufgrund der Verdunstung des für die Lipide verwendeten leicht flüchtigen Lösungsmittels. Da ausschließlich Membranen nach der Montal-Mueller Methode verwendet wurden, soll die Methode im Folgenden näher erläutert werden.

#### 4.4.1 Methode nach Montal und Mueller

Die Membranpräparation nach Montal-Mueller erfolgt in drei Schritten (siehe Bild 4-8). Zunächst wird in zwei Meßkammern auf einer wäßrigen Phase je ein Lipidmonolayer

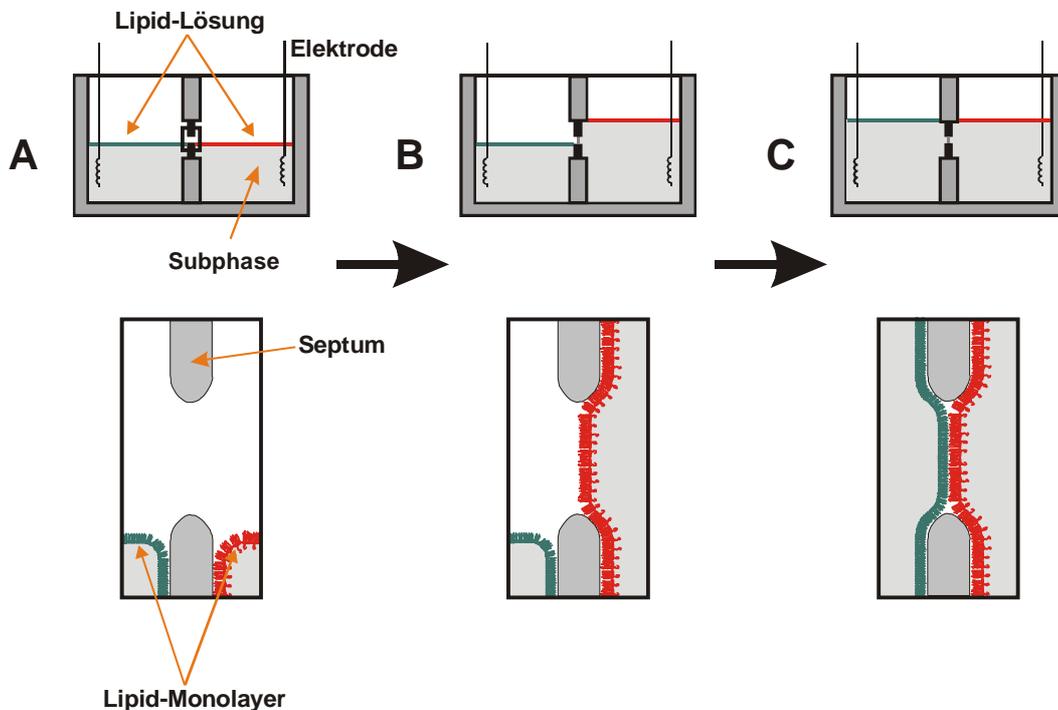


Bild 4-8: Membranpräparation nach Montal und Müller. Zuerst werden zwei Monolayer präpariert (A), dann durch Auffüllen von Subphase zunächst ein Monolayer über die Apertur gezogen (B) und schließlich entsprechend der zweite Monolayer aufgezogen (C), es entsteht der Bilayer.

präpariert (Schritt A). Hierfür wird eine Lösung des entsprechenden Lipids in einem leichtflüchtigen organischen Lösungsmittel ( $\text{CHCl}_3$ ) auf die Oberfläche der wässrigen Lösung aufgebracht und dem Lösungsmittel Zeit gegeben zu verdampfen. Zwischen den beiden Meßkammern (Kompartimente) befindet sich eine dünne mit einem kleinen Loch ( $\varnothing = 100 - 150 \mu\text{m}$ ) versehene Teflonfolie, das Septum. Im zweiten Schritt (B) wird durch das Nachfüllen von Subphase in einem Kompartiment der Flüssigkeitsspiegel angehoben und so ein Monolayer über der Apertur aufgespannt. Schließlich wird im dritten und letzten Schritt (C) der Subphasenspiegel der zweiten Meßkammer ebenfalls auf vorgenannte Weise angehoben und der zweite Monolayer von der anderen Seite über die Apertur gezogen, und es bildet sich der Bilayer aus.

Durch die Verwendung verschiedener Lipide in beiden Kompartimenten lassen sich so asymmetrische Lipiddoppelschichten herstellen, die nahezu lösungsmittelfrei sind, da das Lösungsmittel fast vollständig abdampft. Aufgrund der geringen Membranstabilität der auf diese Art hergestellten Lipiddoppelschichten und den damit verbundenen Präparationsproblemen ist die Methode nicht so weit verbreitet wie die Mueller-Rudin Methode<sup>1</sup>.

#### 4.4.2 Mechanischer Meßaufbau

Eine schematische Darstellung des mechanischen Versuchsaufbaus zur Präparation planarer Lipiddoppelschichten nach der Montal-Mueller Methode ist in Bild 4-9 gegeben. Von zentraler Bedeutung sind zwei halbkreisförmige Teflonkompartimente, die zusammengefügt die Form eines Kegelstumpfs bilden und durch einen konisch ausgebohrten Metallring zusammengepreßt werden. Die Kompartimente besitzen verschiedene Bohrungen, die größte dient der Aufnahme der Subphase und stellt die eigentliche Präparationszelle dar. Weitere Bohrungen, die über horizontale Verbindungsbohrungen mit der Präparationskammer verbunden sind, dienen der Einführung von Elektroden, sowie von Schläuchen, die mit Spritzen verbunden sind, über die das Niveau der Subphase reguliert werden kann. Je zwei Kompartimente besitzen gegenüberliegend eine horizontale Bohrung, von der größten Bohrung zur planen Seite verlaufend, zwischen denen das Septum eingespannt wird. Der Zwischenraum der Kompartimente wird mit Hilfe von Silikonfett abgedichtet.

Die Septen setzen sich aus drei Folien zusammen, zwei je 30 µm dicken Stützfolien aus PFE (Breitenborn GmbH, Wuppertal) sowie einer inneren 12 µm dicken PTFE-Folie (Breitenborn GmbH, Wuppertal), dem eigentlichen Septum. Zwischen zwei plangeschliffenen Metallplatten eingespannt, werden die drei Folien, nachdem sie von anhaftendem Fett gereinigt wurden, für zwei Minuten bei 600 °C miteinander versintert. Mittels einer Funkenentladung wird in der Mitte des Septums ein 100 – 150 µm großes Loch (die Apertur) erzeugt.

---

<sup>1</sup> Die Mueller-Rudin Methode ist nicht dazu geeignet, die Wechselwirkung von Peptiden mit asymmetrischen Lipiddoppelschichten, wie z. B. der äußeren Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien, zu untersuchen.

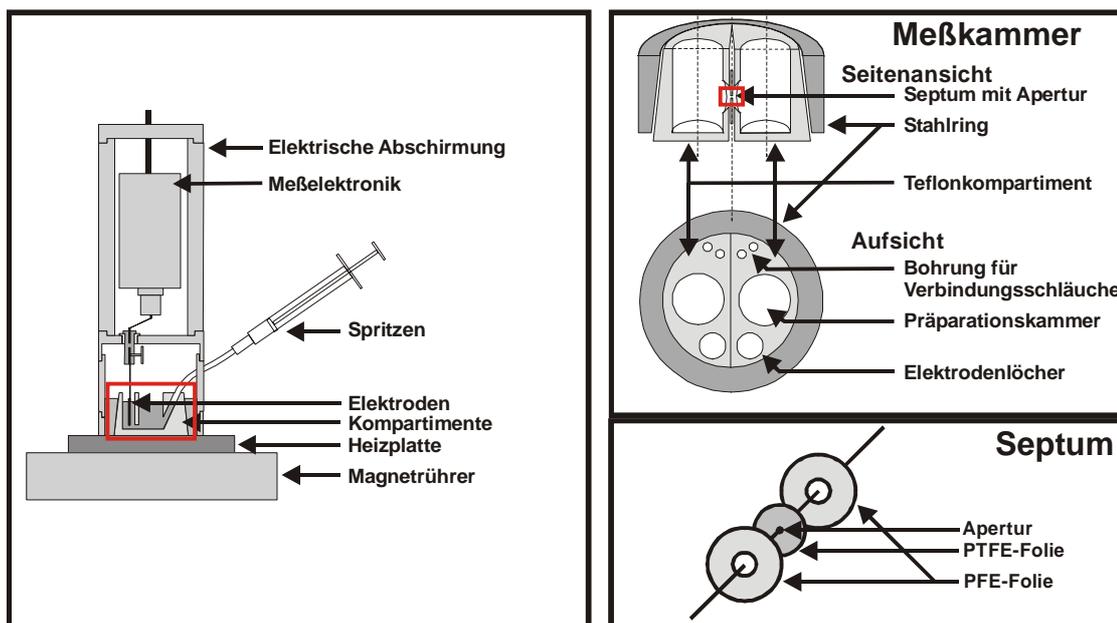


Bild 4-9: Aufbau der Apparatur zur Präparation planarer Lipiddoppelschichten.

Die Meßkammer steht auf einem Meßingblock, der durch eine elektrisch geregelte Heizfolie auf eine konstante Temperatur gebracht werden kann. Darauf wird ein Metallzylinder mit dem Meßkopf aufgesteckt, so daß ein die Meßanordnung umgebender Faradayscher Käfig entsteht. In die Metallabschirmung sind zwei Öffnungen eingelassen, durch die hintere wird über eine Kaltlichtquelle (Typ KL1500-Z, Schott, Wiesbaden) die Apertur beleuchtet und durch die vordere kann sie mit einer Stereolupe (Leitz, Wetzlar) betrachtet werden. Zum Zweck der Eliminierung von mechanischen Störeinflüssen ist die gesamte Apparatur auf einer auf Luftkissen gelagerten 200 kg schweren Granitplatte aufgebaut.

#### 4.4.3 Elektrischer Aufbau

In Bild 4-10 ist der elektrische Aufbau der Meßapparatur als Blockdiagramm dargestellt. Der Vorverstärker ist mit der Controller-Einheit eines Patch-clamp Verstärkers (List-Medical, Darmstadt) verbunden. Der Controller umfasst die Spannungsquelle sowie die Signalverstärkung. Es kann zwischen verschiedenen Verstärkungsfaktoren (von 0,5 mV/pA bis 1000 mV/pA) gewählt werden. Mit Hilfe

eines integrierten 6-Pol Bessel Tiefpaßfilters wird das Ausgangssignal mit 10kHz

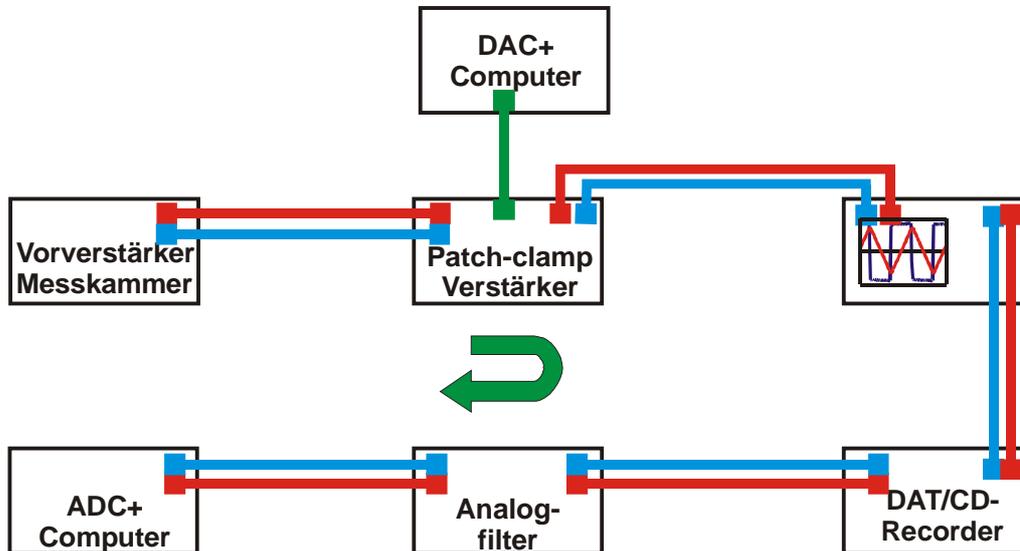


Bild 4-10: Elektrischer Versuchsaufbau zur Bestimmung der Membrankapazität und des Membranstroms.

Tiefpaß-gefiltert. Die an die Elektroden angelegte Spannung kann entweder von der internen Spannungsquelle oder einer mit dem Controller verbundenen Analog-Output Karte (PCI 20428W-1, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen) eines Personal-Computers bereit gestellt werden. So ist es möglich, spezielle computergesteuerte Spannungsprotokolle an die Membran anzulegen. Strom- und Spannungssignal können auf dem Oszilloskop (TDS 220, Tektronix, Wilsonville, OR, USA) betrachtet werden. Die Datenspeicherung erfolgt mittels eines Digital-Tape Recorders (DTR 1205, Biologic, Claix, Frankreich).

Zur Auswertung werden die Signale mittels eines elektronischen Filters (Ithaco Scientific Instrumentation, Ithaca, NY, USA) mit einer Frequenz von 1 kHz Tiefpaß-gefiltert und ggfs. um den Faktor 10 weiter verstärkt. Über eine Analog-Input Karte (PCI 20438W-1, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen) werden die Daten in einen PC eingelesen. Als Steuersoftware für Datenausgabe und -erfassung diente Visual Designer 4.0 (Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen), für

die Auswertung und graphische Aufarbeitung der Meßdaten wurde Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, MA, USA) verwendet.

#### 4.4.4 Präparation der Membranen

Vorab wird die Oberfläche des Septums in einer Mischung aus Pentan und Hexadekan (15:1 v/v) hydrophobisiert, um die Bildung eines Monolayers am Septum zu ermöglichen. Dann wird die Meßkammer, wie in Bild 4-9 gezeigt, zusammengesetzt, im unteren Teil des Aufbaus platziert und über Schläuche mit den Spritzen verbunden. Die Kompartimente werden mit 1,5 ml Subphase (100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH = 7) befüllt und auf 37°C aufgeheizt. Danach wird Lipid in chloroform/methanolischer (LPS) oder chloroformischer (Phospholipide) Lösung auf die Subphase aufgebracht. Binnen weniger Minuten ist das Lösungsmittel abgedampft, und es werden nacheinander beide Subphasenspiegel und damit die darauf befindlichen Monolayer über die Apertur im Septum angehoben. Es bildet sich wie in Bild 4-8 gezeigt der Bilayer aus. Für die Rekonstitution der äußeren Membran wurde auf der vorderen Seite LPS und auf der gegenüberliegenden Seite eine Phospholipidmischung<sup>1</sup> verwendet.

Die Membranbildung kann über eine Strom- und Kapazitätsmessung kontrolliert werden, intakte Membranen stellen einen guten Isolator darstellen und zeigen bei einer angelegten Spannung von 100 mV keinen Stromfluß. Desweiteren gibt eine Messung der Membrankapazität Aufschluß darüber, ob tatsächlich eine Lipiddoppelschicht erzeugt wurde. Bei einem Aperturdurchmeßer von etwa 140 µm sollten die Membranen eine Doppelschichtkapazität von etwa 70 pF aufweisen, jedoch steht nicht die volle Fläche der Apertur zur Membranbildung zur Verfügung. Die Teflonfolie ist grob um den Faktor 1000 dicker als die Membran, so daß ein Übergangsbereich zwischen Folie und Membran besteht. Deswegen wurden nur Membranen mit einer Kapazität größer als 60 pF verwendet (empirisch ermittelt). Vor Zugabe des Peptides, zur LPS-Seite der Membran, wurde der Membran mindestens fünf Minuten Zeit für die Stabilisierung gelassen. Im Folgenden wird die Seite der Peptidzugabe als erste genannt, also z. B. LPS/PL, wenn die Zugabe auf der LPS-Seite geschah.

---

<sup>1</sup> Mischung der Phospholipide PE, PG und CL im molaren Verhältnis von 81:17:2 (siehe 3.2).

#### 4.4.5 Bestimmung der Membrankapazität

Die Messung der Membrankapazität bietet den Vorteil, daß die Bindung von Peptiden an die Membran gemessen werden kann, ohne eine Änderung des Widerstandes der Membran hervorzurufen, da nur eine sehr geringe Spannung angelegt wird.

Wie bereits in 3.4.2 erläutert kann die Membran in einfacher Näherung elektrisch als Plattenkondensator aufgefaßt werden. In Bild 3-6 ist das entsprechende Ersatzschaltbild des Meßobjektes (Membran, Subphase und Elektroden) gezeichnet. Aus den Messungen der Kapazität lassen sich Aussagen über die Fläche  $A$  sowie die Dicke  $d$  der Membran treffen, jedoch muß stets vergegenwärtigt werden, daß die Interaktion mit Fremdmolekülen auch einen Einfluß auf die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  haben kann.

Prinzipiell erfolgte die Kapazitätsmessung nach der Spannungssprung-Methode (Alvarez und Latorre, 1978). Wird an die Membran ein Spannungssprung angelegt, so kann aus dem Ladestrom (oder Entladestrom), durch den der Kondensator  $C$  geladen (entladen) wird, die Membrankapazität ermittelt werden, da die Amplitude des auf den Einschaltvorgang (Ausschaltvorgang) folgenden Relaxationsstroms proportional der Kapazität der Lipiddoppelschicht ist. Die bit-weise Spannungsänderung der Analog-Output Karte wurde ausgenutzt, um an der Membran schnelle Spannungspulse mit einer sehr kleinen Amplitude ( $4.9 \mu\text{V}$ ) anzulegen. Dazu wurde eine Dreiecksspannung mit einer Frequenz von 50 Hz und einer Amplitude von 1 mV, deren Spannungsrampen aus 409 einzelnen Stufen bestehen, an die Membran angelegt. Zur Bestimmung der Kapazität wurde die aus den einzelnen Strompulsen bestehende Stromantwort mit einer Frequenz von 1 kHz Tiefpaß-gefiltert und das Ausgangssignal zur Kapazitätsbestimmung herangezogen (Bild 4-11). Die Apparatur wurde mit einer Reihe verschiedener Kondensatoren bekannter Kapazität kalibriert. Dieser Aufbau ermöglicht die zeitaufgelöste Erfassung der Membrankapazität mit einer Samplingrate von 1 Hz (Gutsmann et al., 1999).

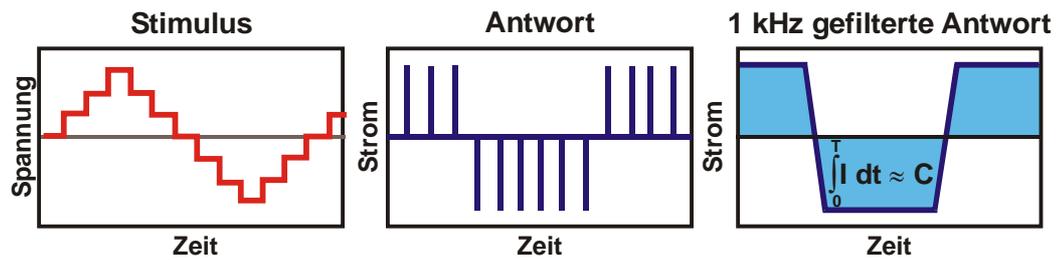


Bild 4-11: Spannungssprungmethode zur Bestimmung der Membrankapazität.

## 4.5 Material

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit dies nicht anders erwähnt wird, von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Radioaktives  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  wurde von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig Deutschland) bezogen.

Es wurden bei den Methoden z. T. unterschiedliche Puffer verwendet. Die durchgängige Verwendung ein und desselben Puffers war nicht immer möglich. Zum einen sollte der Störeinfluß zusätzlicher Ionen möglichst gering gehalten werden, zum anderen erforderte die Methode die Zugabe eines speziellen Puffers. So ist es z. B. bei den planaren Membranen für die Messung eines Stromes erforderlich, der Subphase Kaliumionen zuzufügen. Ebenso richtete sich die Wahl des Puffermediums nach bereits gemachten Experimenten, um eine Vergleichbarkeit herzustellen. Die Puffer sind bei den einzelnen Methoden sowie im Ergebnisteil aufgeführt.

### 4.5.1 Lipide

*LPS*. In den Messungen wurden LPS der Rauhmutanten von *Salmonella enterica* serovar Minnesota verwendet (s Bild 4-12). Die Extraktion der LPS wurde nach der Phenol/Chloroform/Petrolether Methode durchgeführt (Galanos et al., 1969) und so die LPS in ihrer natürlichen Salzform gewonnen. Anschließend wurden die LPS aufgereinigt, in die Triethylamin-(TEN)-Salzform überführt und lyophilisiert.

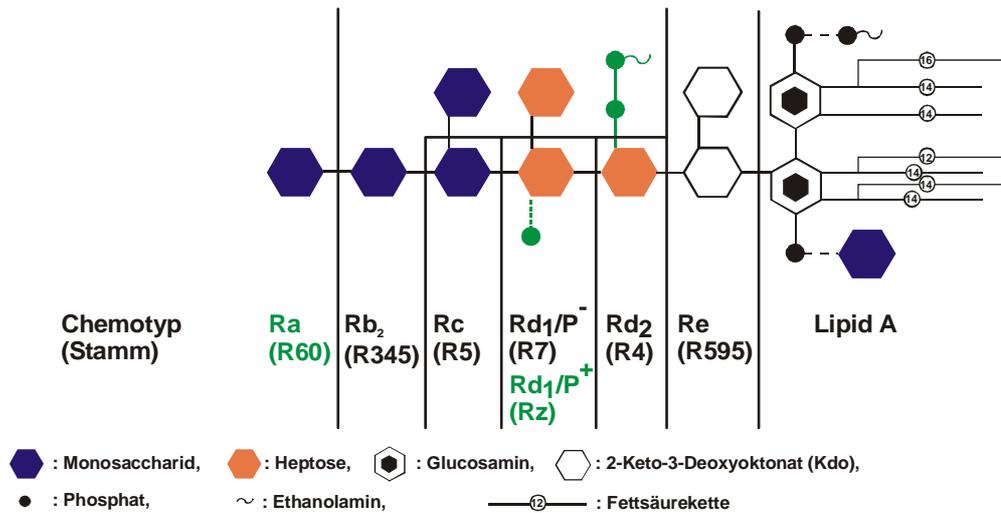


Bild 4-12: LPS-Struktur der Raummutanten von *S. minnesota*. Wesentliche Unterschiede bestehen in der Anzahl der Zucker (also der Länge) und der Anzahl an Ladungen. Für eine Übersicht über die Substitutionsmuster siehe Tabelle 7-1, im Anhang.

Für die Messungen an den planaren Membranen oder den Monolayern wurden die LPS in einem Gemisch aus Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) und Methanol (MeOH) im Volumenverhältnis 10:1 (LPS R595, R4, R7 und Rz; 2,5 mg/ml) oder 10:3 (LPS R5, R345 und R60; 1 mg/ml) gelöst. Sofern sich die LPS nicht lösten, wurde die Dispersion für zwei Minuten auf 96°C erhitzt, hierzu wurde zuvor das Reaktionsgefäß druckdicht verplombt. Für die Messungen an Aggregaten wurden die LPS, wie oben bereits beschrieben (siehe 4.3.1), in wässrigen Pufferlösungen dispergiert und bei 4°C gelagert.

*Glycerophospholipide.* Die verwendeten Glycerophospholipide wurden von der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) bezogen und ohne weitere Aufreinigung in einer Konzentration von 2.5 mg/ml in CHCl<sub>3</sub> gelöst und ebenfalls bei 4°C gelagert. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über Herkunft, rel. Molekularmasse M<sub>r</sub> und Nettoladung Q der benutzten Phospholipide

<b>Lipid</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>M<sub>r</sub> / g·mol<sup>-1</sup></b>	<b>Q / e<sub>0</sub></b>
Phosphatidylethanolamin	PE	<i>E. coli</i>	871,6	0
Phosphatidylglycerol	PG	Eigelb	770,5	-1
Diphosphatidylglycerol	DPG	Rinderherz	1501	-2

Tabelle 4-1: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Phospholipide.

### 4.5.2 Peptidsynthese

Das in den präsentierten biophysikalischen Untersuchungen verwendete Peptid LL32 wurde im Forschungszentrum Borstel mittels Festphasensynthese mit einem automatischen Peptidsynthesizer Model 433 A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit amidiertem C-Terminus hergestellt. Die Synthese wurde nach einem Syntheseprotokoll des Herstellers („fastmoc synthesis protocol“, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) an einem Standard 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Harz durchgeführt. Entfernung der Schutzgruppe und Abspaltung des Peptids vom Harz geschah durch eine dreistündige Behandlung mit 90% Trifluoressigsäure (TFA), 5% Anisol, 2% Thioanisol und 3% Dithiothreitol bei Raumtemperatur. Die erhaltene Suspension wurde filtriert und bei 37°C das Peptid durch Zugabe von Diethylether aus dem Eluat präzipitiert. Anschließend wurde zentrifugiert und mehrfach mit Diethylether gewaschen. Das Peptid wurde durch eine RP-HPLC an einer Aqua-C<sub>18</sub> Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgereinigt, wobei ein Gradient von 0 bis 70% Acetonitril in 0.1% Trifluoressigsäure gewählt wurde. Im Anschluß daran wurde das Peptid lyophilisiert und die Reinheit des Produkts durch die Aufnahme eines Massenspektrums mittels MALDI-TOF kontrolliert. Das Peptid wurde bei -20°C gelagert.

Für die Verwendung in Experimenten an planaren Membranen oder an den Monolayern wurde eine Stammlösung des Peptids in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,01%iger Essigsäure hergestellt und diese je nach Bedarf weiter verdünnt. Gelagert wurden die Lösungen bei -20°C (sechs Monate) bzw 4°C (1 Woche). Das Peptid wurde für die ITC-Experimente in 20mM HEPES (pH = 7) gelöst und direkt eingesetzt. Für

Messungen am ZetaSizer 4 wurde das Peptid in einer Konzentration von 1 mM in 10 mM Tris, 2 mM CsCl<sub>2</sub> (pH = 7) gelöst und ebenfalls bei –20°C gelagert.

## 5 Ergebnisse

Die Interaktion von LL32 mit *S. minnesota* Bakterien und rekonstituierten Mono- und Bilayern aus den entsprechenden aufgereinigten LPS wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse vorgestellt und erläutert. Ferner wird untersucht, ob die experimentellen Daten mit den LPS-spezifischen Parametern mittlere Nettoladung, Anzahl der Zucker sowie der Hilfsgröße Ladung/Anzahl Kernzucker korreliert werden können und welche Schlüsse hieraus zu ziehen sind.

### 5.1 Keimwachstum in Anwesenheit von LL32

*LL32 inhibiert das Wachstum von S. minnesota* *Rauhmutanten*. Um die Frage zu klären, ob die Rauhmutanten von *S. minnesota*, deren LPS sich im wesentlichen in der Länge der Zuckerkette und der Nettoladung unterscheiden, Unterschiede in ihrer Suszeptibilität gegenüber der antibakteriellen Aktivität von LL32 aufweisen, wurde das Keimwachstum in Anwesenheit von LL32 untersucht.

#### 5.1.1 Koch'sches Plattengußverfahren

Die Wirkung von LL32 auf das bakterielle Wachstum ist beispielhaft für die beiden Rauhmutanten R595 und R345 von *S. minnesota* in Bild 5-1 dargestellt.

Bei der höchsten verwendeten Konzentration an LL32 von 333 µg/ml (85 µM) ist in den gezeigten Beispielmessungen praktisch kein bakterielles Wachstum mehr zu erkennen. Jedoch zeigt sich ein deutlicher Unterschied in den Empfindlichkeiten der beiden Stämme gegenüber der Wirkung von LL32 (umgekehrt kann dieses auch im Sinne einer

differenzierten Aktivität des Peptids gegenüber den verschiedenen Rauhmutanten auf-

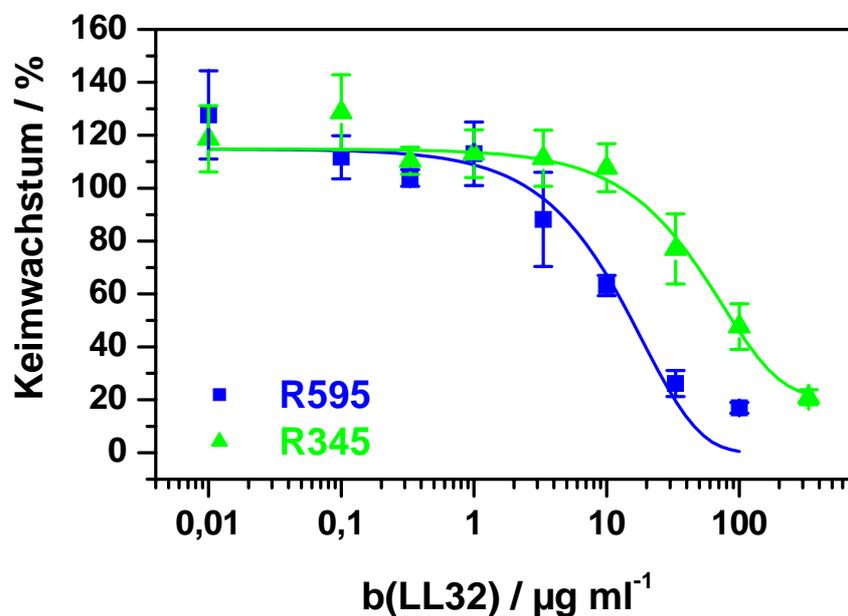


Bild 5-1: Koch'sches Plattengußverfahren: Vergleich der Hemmung des bakteriellen Wachstums der Rauhmutanten R595 und R345 in Abhängigkeit vom Gehalt an LL32. Die Kurven wurden über Anpassung an die Messwerte mit einem standardsigmoidalen Fit (Origin 6.0) erhalten. (Wachstumsbedingungen: 100% LB-Medium,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , Inkubationszeit 30 min. Danach wurde ausplattiert, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag die Koloniezahl bestimmt).

gefasst werden). Bei dem Stamm R345 tritt die Hemmung des Koloniewachstums im Vergleich zum Stamm R595 erst bei höheren Peptidkonzentrationen auf. Die Auswertung der erhaltenen Hemmkurven wurde wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben vorgenommen, und es wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt.

Qualitativ ähnelten sich die gemessenen Hemmkurven aller Stämme in ihrem Verlauf, sie unterschieden sich aber in den Konzentrationen an LL32, die nötig waren, um das Wachstum zu hemmen. In Bild 5-2 sind die für die verschiedenen Rauhmutanten von *S. minnesota* bestimmten  $\text{IC}_{50}$ -Werte zur besseren Vergleichbarkeit als Säulendiagramm dargestellt, in Tabelle 5-1 sind diese noch einmal gesondert aufgelistet. Für alle verwendeten Stämme konnte bei den verwendeten Peptidkonzentrationen bis auf zwei Ausnahmen, R60 und S-Form, eine Inhibierung des Keimwachstums beobachtet

werden. Die Stämme R5 und R345 weisen im Kontrast zu den Stämmen R595, R4, R7 und Rz deutlich höhere  $IC_{50}$ -Werte auf, wobei beim Stamm R5 im Vergleich zu R345 die Hemmung erst bei etwa der doppelten LL32-Konzentration auftritt. Der Stamm Rz zeichnet sich gegenüber den restlichen dadurch aus, daß er am sensitivsten auf das Peptid reagiert.

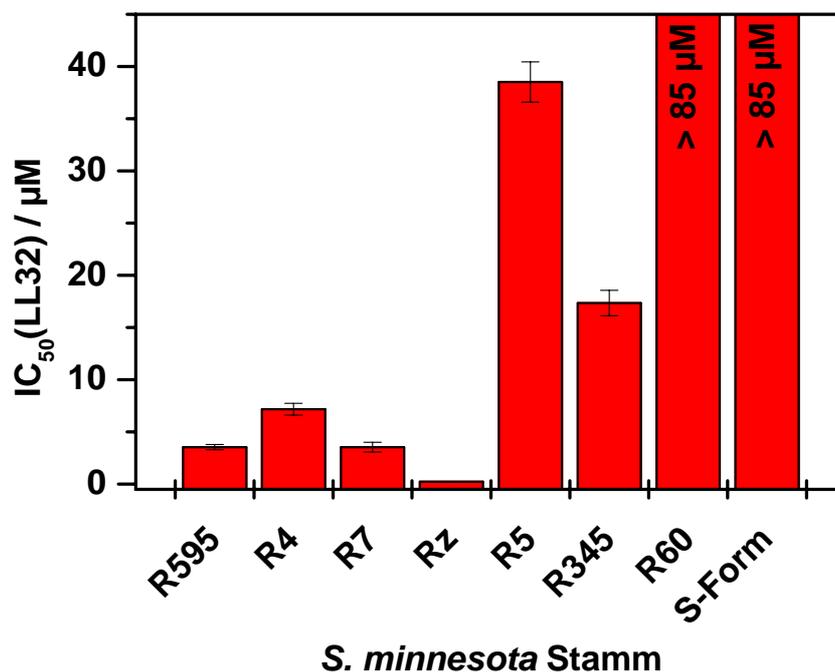


Bild 5-2: Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte von LL32 gegenüber den verschiedenen Rauhmütanten von *S. minnesota*. Die Werte wurden mit dem Koch'schen Plattengußverfahren bestimmt. Für die Stämme R60 und S-Form war bei den eingesetzten Peptidkonzentrationen keine Wachstumshemmung und damit kein  $IC_{50}$ -Wert bestimmbar. (Wachstumsbedingungen: 100% LB-Medium, T = 37°C, Inkubationszeit 30 min. Danach wurde ausplattiert, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag die Koloniezahl bestimmt).

Von der Verwendung höherer Peptidkonzentration wurde abgesehen, da LL32 bei einer Konzentration von 85  $\mu$ M bereits präzipitierte und das Peptid auch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

### 5.1.2 Mikrosuszeptibilitätstests

Im Vergleich zum Koch'schen Plattengußverfahren, daß sehr zeitaufwendig und materialintensiv ist, kommen die Mikrosuszeptibilitätstests (s. 4.1.2) mit geringeren Substanzmengen aus und können schneller durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden in Mikrosuszeptibilitätstests die Hemmung des Keimwachstums durch LL32 weiter untersucht. Die Hemmtests für LL32 wurden zunächst in 100% LB-Medium durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Qualitativ ergaben sie die gleichen Ergebnisse (MHK-Werte s. Tabelle 5-1), die auch im Koch'schen Plattenguß gefunden wurden. Für die Stämme R60 und S-Form und darüberhinaus auch für den Stamm R345 war keine Hemmung des bakteriellen Wachstums zu beobachten. Versuche bei höheren Peptidkonzentration waren wiederum nicht möglich, da auch hier eine Präzipitation des Peptides eintrat.

Um zu Vergleichswerten auch der weniger sensitiven Stämme zu gelangen und das Problem der Präzipitation des Peptids zu vermeiden wurden die Hemmtests schließlich in einem Minimalmedium durchgeführt (10%LB-Medium, 90% 20 mM HEPES (pH = 7)). So war es dann auch möglich für alle Stämme der *S. minnesota* Rauhmutanten einen MHK-Wert zu bestimmen. Dies war insofern wichtig, da die MHK-Werte später in Beziehung zu den biophysikalischen Meßparametern zu setzen waren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der im Minimalmedium durchgeführten Hemmtests präsentiert.

Bild 5-3 zeigt beispielhaft einige Hemmkurven wie sie mit dem Mikrosuszeptibilitätstest erhalten wurden.

In Bild 5-3 sind als Beispiele die Hemmkurven für die gleichen Stämme - wie zuvor beim Koch'schen Plattengußverfahren - sowie die Hemmkurve eines Vergleichsstamms (*Proteus mirabilis* R45) gezeigt. Die äußere Schicht der äußeren Membran von *Proteus mirabilis* R45 wird von einem LPS gebildet, das in seiner Struktur dem LPS R595 ähnelt, wobei am Lipid A-Teil und an einem der Kdo-Zucker zu einem bestimmten Prozentsatz eine positiv geladene Aminoarabinose als Substituent gefunden wird. Die Aminoarabinose erniedrigt die Nettoladung des LPS und ist verantwortlich für die Resistenz gegenüber dem bei Kaninchen gefundenen Kathelizidin rCAP18 (Gutsmann et al., 2000). Ein Wert der rel. Extinktion von eins entspricht einem ungehinderten

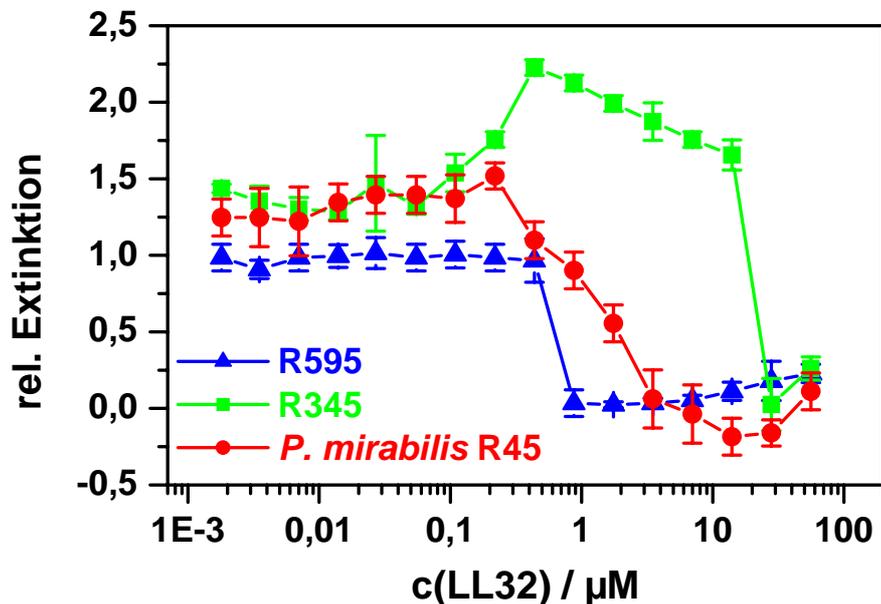


Bild 5-3: Mikrosuszeptibilitätstest: Vergleich der Hemmung des Wachstums für die Stämme R595 und R345 sowie des Bakterienstamms *P. mirabilis* R45 durch LL32. Eine rel. Extinktion von 1 entspricht ungehemmtem Wachstum. (Wachstumsbedingungen: 10% LB-Medium, 90% 20 mM HEPES (pH = 7), T = 37°C, Inkubationszeit 24 h).

Wachstum, während ein Wert von unter 0,01 der Hemmung des Keimwachstums entspricht. Die Konzentration, bei der das Keimwachstum unter eine rel. Extinktion von 0,01 gefallen ist, wird als MHK (minimale Hemmkonzentration) definiert. Deutlich sind in den Beispielmessungen Unterschiede in den MHK zu erkennen, wobei die Suszeptibilität der Stämme folgende Reihenfolge aufweist: R595 < R45 < R345. Das bakterielle Wachstum kann bei Konzentrationen unterhalb der Hemmkonzentration stimuliert werden (erkennbar an einer rel. Extinktion > 1). Der Effekt wurde mehrfach beobachtet, ist jedoch schwer zu reproduzieren und daher nicht quantifizierbar. Dies wurde bereits für andere Peptide beobachtet und beschrieben (Andrä et al., 2004).

Eine Gegenüberstellung der im Minimalmedium bestimmten MHK für die Rauhmutanten von *S. minnesota* und *P. mirabilis* gibt Bild 5-4, der Vollständigkeit wegen sind die Werte in Tabelle 5-1 extra aufgeführt. Die getesteten Stämme lassen sich in zwei Gruppen einteilen, eine Kategorie deren MHK bezüglich LL32 um 1 μM

des Peptids liegt, und eine zweite Kategorie mit MHK-Werten um die 10  $\mu\text{M}$  (gestrichelte Linie).

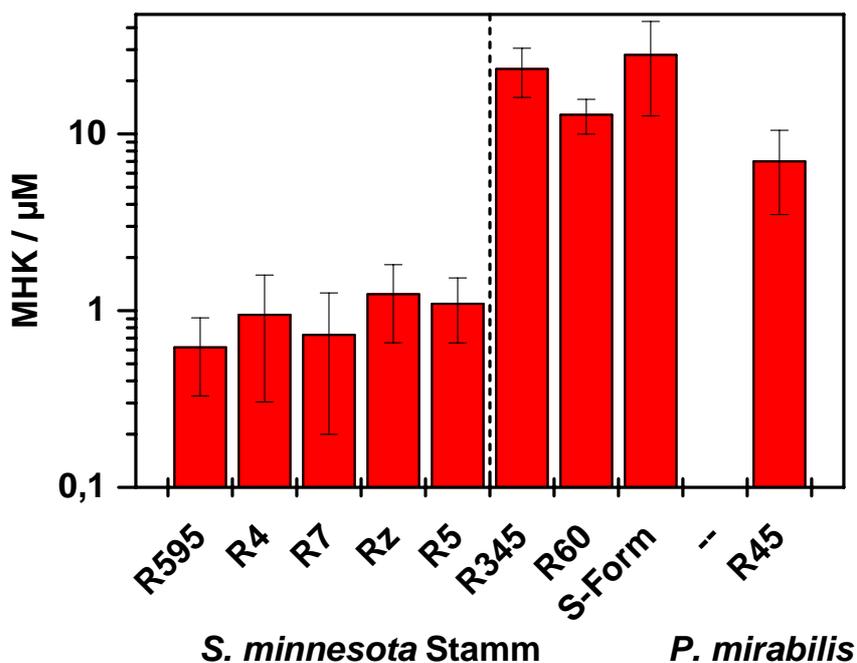


Bild 5-4: Vergleich der MHK-Werte von LL32 gegenüber den Rauhmütanten von *S. minnesota* und dem Stamm *P. mirabilis* R45. Die getesteten Stämme lassen sich in zwei Gruppen unterscheiden (s. gestrichelte Linie); eine Gruppe mit MHK-Werten um 1  $\mu\text{M}$  und eine mit MHK-Werten um 10  $\mu\text{M}$ . (Wachstumsbedingungen: 10% LB-Medium, 90% 20 mM HEPES (pH = 7), T = 37°C, Inkubationszeit 24 h).

In Bild 5-5 sind die für LL32 ermittelten MHK-Werte (im Minimalmedium) gegen verschiedene LPS-spezifische Parameter aufgetragen (auf eine entsprechende Auftragung der IC50-Werte aus den Koch'schen Plattentests wurde verzichtet, da keine Werte für R345 und R60 bestimmt werden konnten, s. 5.1.1). Die Auftragung der MHK-Werte gegen die Nettoladung des LPS weist eine geringe Korrelation auf, während eine Auftragung der MHK-Werte gegen die Anzahl der Kernzucker bereits eine deutlich bessere Korrelation erkennen läßt: je länger der Kernzucker

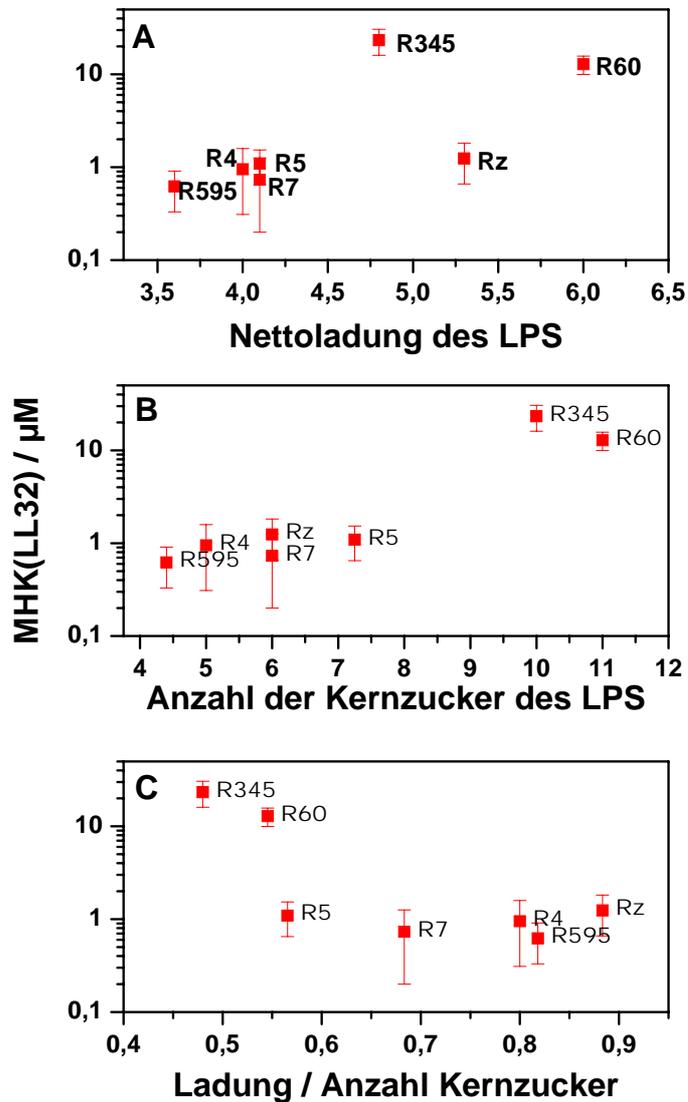


Bild 5-5: Auftragung der experimentell bestimmten MHK-Werte für LL32 gegen die LPS-Deskriptoren Nettoladung (A), Anzahl der Kernzucker (B) sowie der Hilfsgröße Ladung/Anzahl Kernzucker (C). **Bild A:** Eine Beziehung der MHK-Werte zur Ladung ist erkennbar. **Bild B:** Die Auftragung gegen die Anzahl der Kernzucker läßt bereits einen Zusammenhang mit der Länge des LPS vermuten. **Bild C:** Eine deutliche Abhängigkeit der MHK-Werte von dem Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker ist zu erkennen. (Wachstumsbedingungen: 10% LB-Medium, 90% 20 mM HEPES (pH = 7), T = 37°C, Inkubationszeit 24 h).

des LPS, desto größer der MHK-Wert. Eine deutliche Abhängigkeit der MHK-Werte ist jedoch für die Hilfsgröße Ladung/Anzahl Kernzucker des LPS erkennen (Bild 5-5, C). Die Rahmutanten R345 und R60 mit MHK-Werten um 10  $\mu\text{M}$  finden sich am linken

Ende der Skala, also bei Verhältnissen von Ladung/Anzahl Kernzucker  $< 0,55$ . Die restlichen Rauhmutanten, für die MHK-Werte um  $1 \mu\text{M}$  gefunden wurden, haben Verhältnisse von Ladung/Anzahl Kernzucker  $> 0,55$ .

Zum Vergleich wurde die Wachstumshemmung der *S. minnesota* Rauhmutanten durch PMB mittels des Mikrosuszeptibilitätstests untersucht. Die Ergebnisse sind in Bild 5-6 als Säulendiagramm gezeigt, und die MHK-Werte sind in Tabelle 5-1 zu finden. Es ergibt sich folgende Ordnung der Suszeptibilitäten der *S. minnesota* Rauhmutanten gegenüber PMB:  $R7 \approx R5 < R595 \approx R4 \approx R_z < R60 < R345$ . Ein erster Vergleich der für PMB und LL32 gefundenen MHK-Werte läßt zunächst keine Gemeinsamkeiten in der Wachstumshemmung durch LL32 und PMB erkennen.

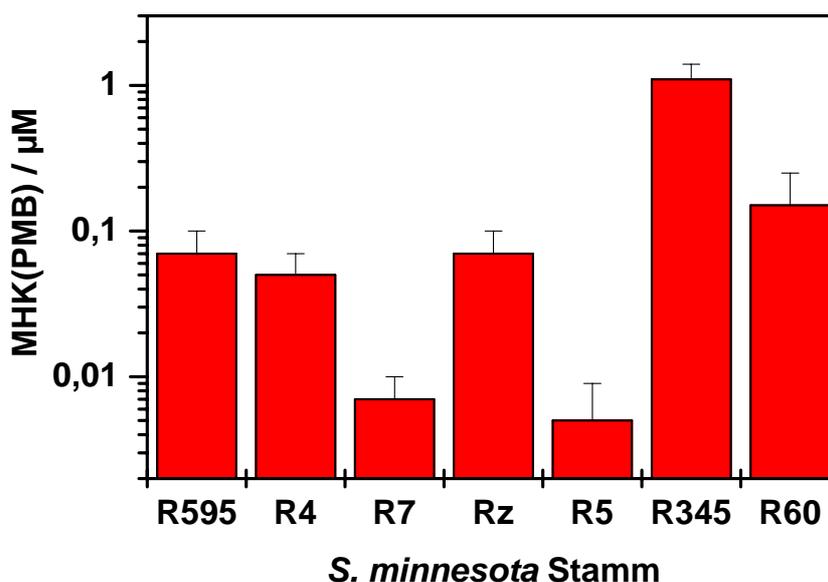


Bild 5-6: Hemmung des Keimwachstums der *S. minnesota* Rauhmutanten durch das Peptid PMB. (Wachstumsbedingungen: 10% LB-Medium, 90% 20 mM HEPES (pH = 7), T = 37°C, Inkubationszeit 24 h).

Die für PMB bestimmten MHK-Werte der Rauhmutanten von *S. minnesota* wurden ebenfalls mit den LPS-Deskriptoren Nettoladung, Anzahl Kernzucker und dem

Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker in Beziehung gesetzt (s. Bild 5-7). Es ist kein einfacher Zusammenhang zwischen der Nettoladung oder der Anzahl der Kernzucker des LPS und den MHK-Werten für PMB erkennbar. Jedoch ist wie auch bei LL32 eine

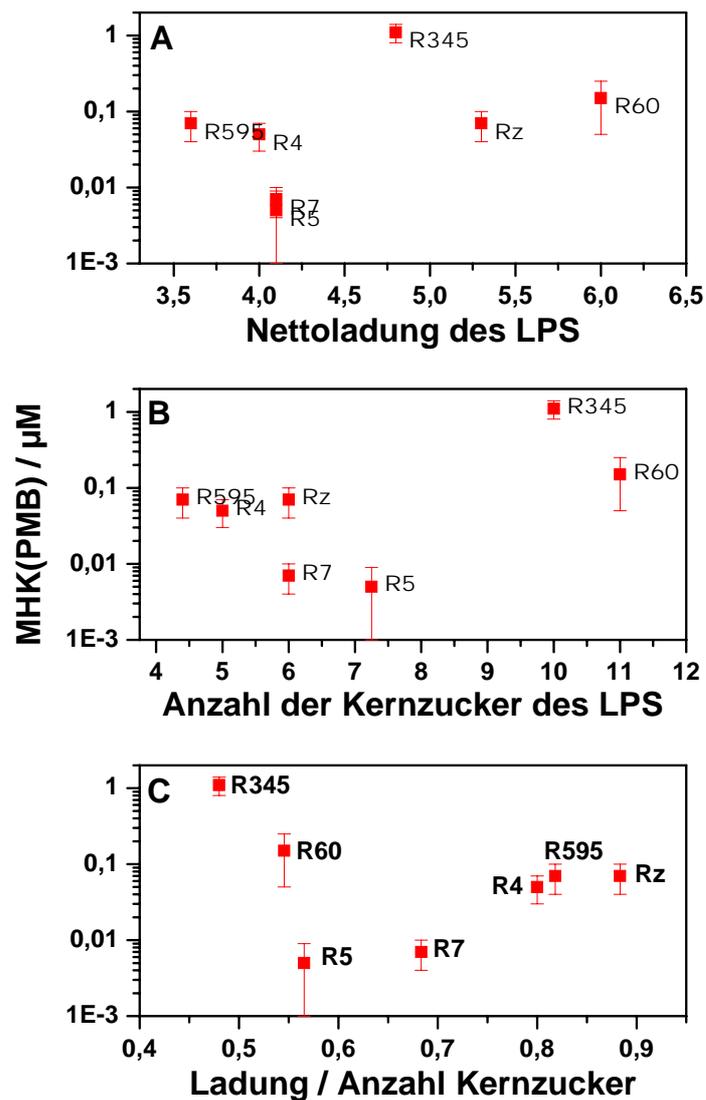


Bild 5-7: Auftragung der experimentell bestimmten MHK-Werte für PMB gegen die LPS-Deskriptoren Nettoladung (A), Anzahl der Kernzucker (B) sowie den Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker (C). **Bild A:** Die Korrelation mit der Ladung folgt keinem einfachen Zusammenhang. **Bild B:** Die Auftragung gegen die Anzahl der Kernzucker zeigt keine Korrelation mit der Länge des LPS. **Bild C:** Eine deutliche Abhängigkeit der MHK-Werte von dem Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker ist zu erkennen.

Beziehung zu dem kombinierten Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker deutlich zu sehen. In Bild 5-8 sind die MHK-Werte für LL32 und PMB vergleichend gegen den Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker aufgetragen. Der Verlauf der MHK-Werte für beide Peptide ist vergleichbar. PMB ist aktiver gegenüber den Rauhmutanten von *S. minnesota*. Die MHK-Werte für LL32 erstrecken sich über eine log-Stufe, während das Intervall bei PMB mehr als zwei log-Stufen beträgt.

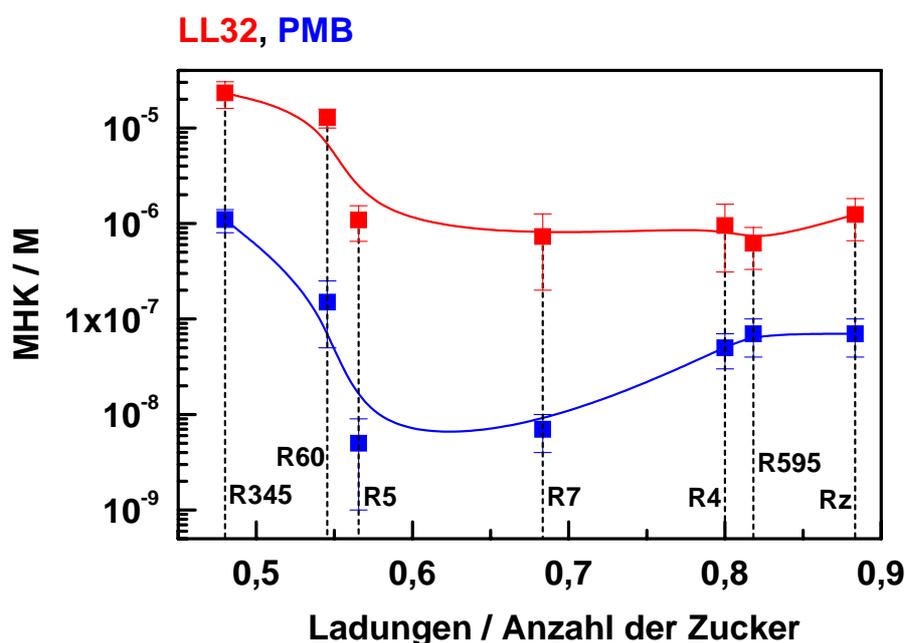


Bild 5-8: Vergleich der Hemmung des Keimwachstums verschiedener *S. minnesota* Rauhmutantenstämme durch LL32 und PMB. Der Parameter (Ladung/Anzahl Kernzucker) führt zu einer qualitativ vergleichbaren Ordnung der MHK-Werte für LL32 und PMB. Deutlich ist zu sehen, daß beim Übergang von Stamm R5 nach Stamm R60 mehr LL32 als auch PMB zur Wachstumshemmung der Keime nötig ist. Für PMB ist aus der Auftragung eine ausgeprägte Minimumkurve der MHK-Werte zu vermuten.

Es ist also ganz allgemein festzuhalten, daß LL32 eine Aktivität gegen die verschiedenen Rauhmutanten von *S. minnesota* sowie den Stamm *P. mirabilis* R45 besitzt. Die MHK-Werte steigen mit der Anzahl der Kernzucker sowie der Nettoladung des LPS. Eine positive Ladung am Lipid A-Teil hat ebenfalls einen größeren MHK-Wert zur Folge (*P. mirabilis* R45). Offensichtlich hat das Medium einen Einfluß auf die

Aktivität von LL32 gegen die Keime. Der Vergleich der MHK-Werte für LL32 und PMB zeigt, daß *S. minnesota* Rauhmутanten resistenter gegenüber der Wirkung eines AMP sind, je kleiner das Verhältnis der Hilfsgröße Ladung/Anzahl Kernzucker des entsprechenden LPS in der äußeren Membran ist. Aus der Auftragung in Bild 5-8 kann vermutet werden, daß bei der bakteriellen Suszeptibilität bezüglich AMP sowohl die Ladung als auch die Größe des Kernoligosaccharides eine Rolle spielt. Es gibt Unterschiede in den Suszeptibilitäten der Stämme gegenüber der Wirkung der Peptide.

Stamm	Koch'sches Plattenguß- verfahren	Mikrosuszeptibilitätstest		
	IC <sub>50</sub> (LL32) / $\mu\text{M}$ Medium: 100% LB	MHK(LL32) / $\mu\text{M}$ Medium: 100% LB	MHK(LL32) / $\mu\text{M}$ Medium: 10% LB 90% 20 mM HEPES	MHK(PMB) / $\mu\text{M}$ Medium: 10% LB, 90% 20 mM HEPES
<b>R595</b>	3,54 $\pm$ 0,25	2,45 $\pm$ 0,96	0,62 $\pm$ 0,29	0,07 $\pm$ 0,03
<b>R4</b>	7,17 $\pm$ 0,57	5,95 $\pm$ 2,35	0,95 $\pm$ 0,64	0,05 $\pm$ 0,02
<b>R7</b>	3,54 $\pm$ 0,46	37,33 $\pm$ 16,17	0,73 $\pm$ 0,53	0,007 $\pm$ 0,003
<b>Rz</b>	0,23 $\pm$ 0,02	16,8 $\pm$ 6,26	1,24 $\pm$ 0,58	0,07 $\pm$ 0,03
<b>R5</b>	38,5 $\pm$ 1,93	28 $\pm$ 12	1,09 $\pm$ 0,44	0,005 $\pm$ 0,004
<b>R345</b>	17,3 $\pm$ 1,22	> 65	23,3 $\pm$ 7,23	1,1 $\pm$ 0,3
<b>R60</b>	> 85	> 65	12,83 $\pm$ 2,86	0,15 $\pm$ 0,1
<b>S-Form</b>	> 85	> 65	22,4 $\pm$ 7,67	-

Tabelle 5-1: Übersicht über die aus den verschiedenen Bakterientests gewonnenen Daten. In der zweiten Spalte sind die IC<sub>50</sub>-Werte aufgelistet, die mit den Koch'schen Plattentests erzielt wurden. In den Spalten drei bis fünf sind die MHK-Werte aufgelistet, die aus den Mikrosuszeptibilitätstests erhalten wurden. Über den Spalten sind noch einmal die Medien, in denen die Bakterientests durchgeführt wurden angegeben.

### 5.1.3 Diskussion

Wie dargelegt, hemmen LL32 und PMB das Wachstum der *S. minnesota* Rauhmutanten. Die für LL32 bestimmten  $IC_{50}$ - bzw. MHK-Werte stehen im Einklang mit in der Literatur dokumentierten Hemmkonzentrationen für LL32 (Larrick et al., 1995b; Gutschmann et al., 2001).

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß das verwendete Kulturmedium einen Einfluß auf die Testergebnisse hat. In 100% LB-Medium (Spalten 2 und 3 Tabelle 5-1) wurde im Vergleich zu dem Medium, welches nur 10% LB-Medium (Spalten 4 und 5 Tabelle 5-1) enthielt, deutlich mehr an Peptid benötigt, um das bakterielle Wachstum der *S. minnesota* Rauhmutanten zu inhibieren. Folgenden Einfluß kann das Medium haben:

- (a) das LB-Medium bietet den Bakterien optimale Wachstumsvoraussetzungen, während die Nährlösung, welche sich aus 90% HEPES-Puffer (20 mM, pH = 7) und 10% LB-Medium zusammensetzt, den Bakterien minimal notwendige Wachstumsvoraussetzungen bietet. Die Bakterien im Minimalmedium sind bereits von vornherein einem „Wachstumsstreß“ ausgesetzt, weisen damit eine unterschiedliche Vitalität auf und sind weniger sensitiv je vitaler sie sind.
- (b) In wäßriger Lösung erfolgte keine Präzipitation von LL32 bis zu Konzentrationen von 250  $\mu$ M. In den Bakterientests betrug die höchsten verwendeten Peptidkonzentrationen 84  $\mu$ M (Koch'scher Plattenguß) und 56  $\mu$ M (Mikrosuszeptibilitätstest). Die Präzipitation, durch einen Mediumbestandteil hervorgerufen, erniedrigt damit die wirksame Peptidmenge und deutlich höhere MHK-Werte werden beobachtet.
- (c) die Membran-Peptid Wechselwirkung könnte durch den größeren Ionengehalt in 100% LB-Medium herabgesetzt sein. Der große Anteil an Ionen kann die Anziehung zwischen den negativ geladenen Membrankomponenten (LPS) und dem kationischen LL32 herabsetzen.

In jedem Falle ist Vorsicht bei der Übertragung der gefundenen Hemmkonzentrationen auf die Verhältnisse im menschlichen Organismus geboten. Beide Testmethoden, der Koch'sche Plattenguß wie auch der Mikrosuszeptibilitätstest, stellen eine Labormethode zur Überprüfung der Aktivität einer antimikrobiell wirksamen Substanz dar und

unterscheiden sich damit schon einmal generell von der *in vivo*-Situation. Die verwendeten Nährmedien boten zum einen optimale und zum anderen minimale Wachstumsvoraussetzungen, wie sie so natürlich nicht im humanen Serum vorliegen. Letztlich ist es wahrscheinlich, daß die *in vivo* Hemmkonzentrationen sich zwischen den für die beiden Kulturmedien gefundenen bewegen wird.

Für die verschiedenen Rauhmутanten von *S. minnesota* wurden Unterschiede in den für eine Hemmung des bakteriellen Wachstums nötigen Peptidkonzentrationen gefunden (Bild 5-4 und Bild 5-6). Sowohl LL32 als auch PMB weisen eine ähnliche Abhängigkeit von dem Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker auf (Bild 5-8). Aus dem Vergleich des Verlaufs der MHK-Werte für LL32 und PMB kann vermutet werden, daß bei der bakteriellen Suszeptibilität bezüglich dieser AMP sowohl die Ladung als auch die Größe des Kernoligosaccharides eine Rolle spielen. Das Kernoligosaccharid bietet mit zunehmender Länge mehr Bindungsmöglichkeiten für geladene Peptide, hier sind vor allen Dingen auch Phosphate im Kernzucker zu nennen. Zusätzlich hindert ein größeres Kernoligosaccharid sterisch eine Annäherung der Peptide an die Membran, besonders die Substitutionen mit zusätzlichen Zuckern in der Seitenkette sind hervorzuheben. So findet man für die Stämme R345 und R60 mit einer hohen Nettoladung des LPS (6 bzw.4,8) bei gleichzeitig sehr langem Kernzucker sowie zusätzlichen Zuckern in der Seitenkette deutlich höhere MHK-Werte (Bild 5-8). Für den Stamm Rz, dessen LPS im Vergleich zu LPS R595 zwei zusätzliche Heptosen im Kernzucker aufweist, die aber deutlich unterschiedliche Nettoladungen tragen (5,3 bzw. 3,6), sind die MHK-Werte etwa gleich groß. Hier kann also geschlossen werden, daß der abschirmende Effekt des Zuckers durch die höhere Nettoladung wieder aufgehoben wird.

Es bleibt weiterhin unklar, warum im Fall von LL32 die anderen Stämme keine Unterschiede in den MHK-Werten aufweisen. Vom Stamm R595 über R4 bis zum Stamm R7 nimmt die Ladung des LPS kaum zu (R595: 3,6, R4:4, R7: 4,1), aber die Anzahl der Heptosen im Kern steigt um jeweils eine an, dennoch ist kein signifikanter Unterschied in den MHK-Werten zu beobachten. Für PMB scheint das Verhalten noch etwas komplizierter zu sein, ist doch für die Stämme R7 und R5 ein „Minimum“ im Verlauf der MHK-Werte zu sehen. Eventuell sind diese Unterschiede auf einen

grundsätzlich anderen Wirkmechanismus des PMB im Vergleich zu LL32 zurückzuführen.

Rana et al. berichten von ähnlichen Hinweisen bezüglich der Abhängigkeit der Resistenz Gram<sup>-</sup> Bakterien von der Struktur ihres Lipopolysaccharides (Rana und Blazyk, 1989; Rana et al., 1991). Sie fanden eine differentielle Suszeptibilität verschiedener Rauhmuranten von *S. typhimurium* gegenüber der Wirkung von Magainin 2, einem ebenfalls helikalen antimikrobiellen Peptid. Die Autoren berichten, daß die Sensitivität der Bakterien umso geringer ist je größer das Kernoligosaccharid ist. Desweiteren vermuten sie eine Beteiligung der Nettoladung des jeweiligen LPS.

Neuere Studien berichten ebenfalls einen ähnlichen Trend, so berichten Andrä et al., daß die Suszeptibilität der *S. minnesota* Stämme gegenüber NK-2 (einem Derivat des Peptides NK-Lysin, aus natürlichen Killerzellen des Schweins) in der Reihenfolge R595 < R60 < S-Form abnimmt (Andrä et al., 2004). Die Untersuchung beschränkte sich jedoch auf diese drei Stämme, und eine systematische Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der LPS-Struktur auf die bakterielle Resistenz war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Grundsätzlich ist anzumerken, daß prinzipiell auch andere, bislang nicht bekannte, Mechanismen für den beobachteten Verlauf der MHK-Werte verantwortlich sein können.

## **5.2 Messungen an Lipid-Monolayern**

### **5.2.1 Einbau von LL32 in LPS-Monolayer**

Monomolekulare Schichten, die aus Lipiden an der Grenzfläche Wasser-Luft präpariert wurden, stellen ein stark vereinfachtes Modellsystem für Zellmembranen dar, da sie nur aus einer Hälfte der biologischen Membran bestehen. So fehlt bei Monolayern ein Teil des intrinsischen Membranpotentials, für welches eine Beteiligung bei der Wechselwirkung mit antibakteriellen Peptiden diskutiert wird (Hagge et al., 2004). Desweiteren sind die Fluiditätseigenschaften des Monolayers verschieden von denen des Bilayers (Hagge, 2003). Der Monolayer kann mit der Filmwaage leicht manipuliert werden, z. B. kann ein konstanter lateraler Druck eingestellt oder die Zusammensetzung der Subphase

geändert werden (s. 4.2.3). Auch sind die Messungen an Monolayern gut reproduzierbar, da über eine große Fläche gemittelt wird, und die Ergebnisse sind gut vergleichbar mit Ergebnissen anderer Methoden (Gutsmann et al., 2000). Daher werden Monolayer oft eingesetzt, um die Wechselwirkung von AMP mit Lipiden zu untersuchen (Maget-Dana, 1999).

Mit Hilfe der Filmwaage wurde die Interkalation von LL32 in verschiedene LPS-Monolayer untersucht. Die Monolayer wurden bei  $T = 20^\circ\text{C}$  auf einen biologisch relevanten lateralen Druck von  $25 \text{ mN/m}$  (Chapman, 1975b) komprimiert, dann mindestens eine Stunde äquilibriert, bevor schließlich Peptid unter den Monolayer injiziert wurde. Zunächst wurden Einbaumessungen mit verschiedenen Mengen LL32 an Monolayern aus LPS R595 mit dem kürzesten und LPS R60 mit dem längsten Core-Zucker vorgenommen (s. Bild 5-9). Die Monolayer wurden mit je  $3 \text{ nmol}$  LPS auf einer

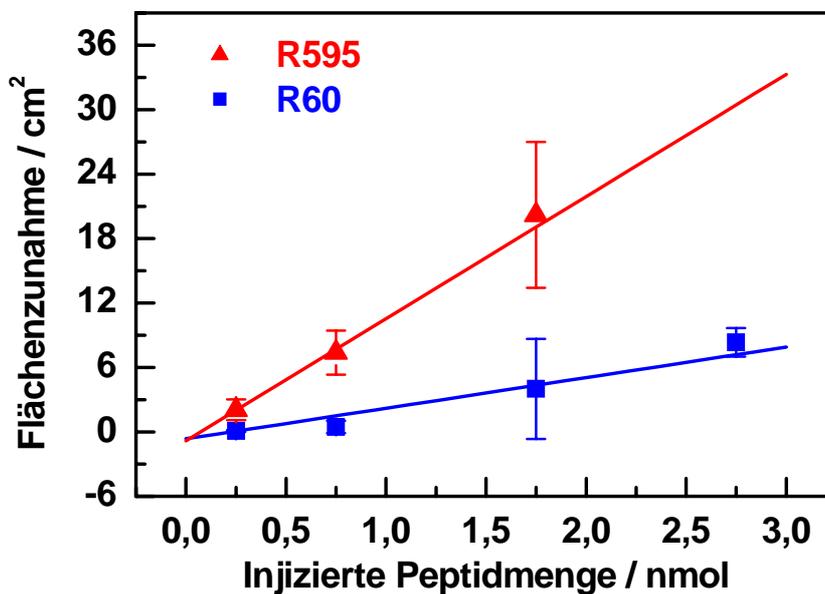


Bild 5-9: Vergleich der durch LL32 induzierten Flächenänderung von Monolayern, die aus LPS R595 und R60 präpariert wurden, in Abhängigkeit von der injizierten Peptidmenge. Die Monolayer wurden durch Auftropfen von jeweils  $3 \text{ nmol}$  LPS auf eine wässrige Phase präpariert. ( $100 \text{ mM KCl}$ ,  $5 \text{ mM HEPES}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ).

wäßrigen Phase (100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7) präpariert. Bei den verwendeten LL32-Konzentrationen ist noch keine Sättigung des Peptideinbaus zu erkennen, d. h. die Konzentration, bei der eine Sättigung der an der Oberfläche zur Verfügung stehenden Bindungsplätze eintritt, ist noch nicht erreicht. In Bild 5-9 ist die absolute Flächenzunahme dargestellt. Dies ist insofern zulässig, als der molekulare Platzbedarf an der Grenzfläche im Monolayer von LPS R595,  $(1,21 \pm 0,07) \text{ nm}^2/\text{Molekül}$ , zu LPS R60,  $(1,23 \pm 0,05) \text{ nm}^2/\text{Molekül}$ , kaum ansteigt und es für die Ergebnissbetrachtung keinen Unterschied macht, ob relative oder absolute Flächenänderungen betrachtet werden. Aus den Steigungen kann der molekulare Platzbedarf von LL32 im jeweiligen Monolayer berechnet werden. Hierfür wird die Flächezunahme in  $\text{nm}^2$  und die LL32 Stoffmenge in die Zahl an Molekülen umgerechnet. Der molekulare Platzbedarf von LL32 im LPS R595-Monolayer zu  $(1,9 \pm 0,1) \text{ nm}^2$ . In Monolayern aus LPS R60 hat LL32 einen molekularen Platzbedarf von  $(0,5 \pm 0,1) \text{ nm}^2$ .

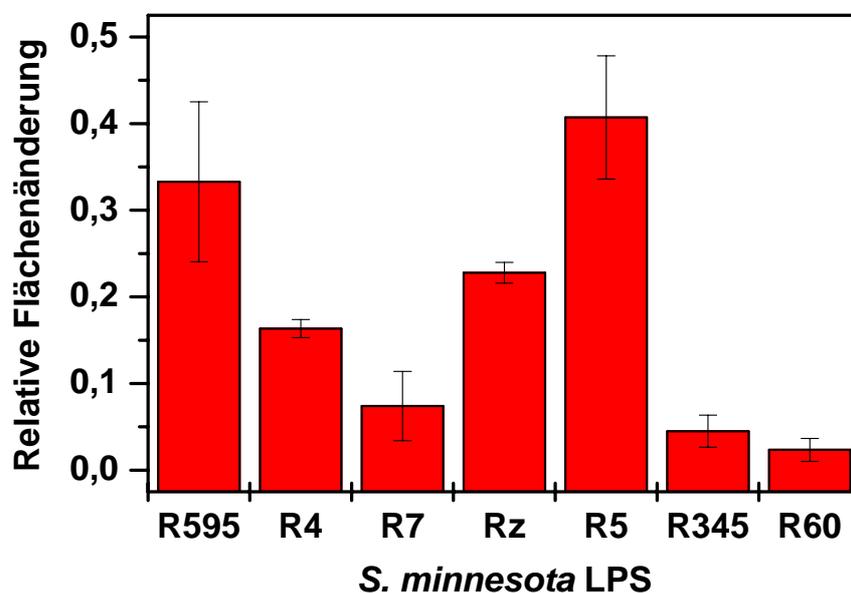


Bild 5-10: Vergleich der relativen Flächenänderung die durch Injektion von 0,75 nmol LL32 unter die entsprechenden Monolayer induziert wurde. Die Monolayer wurden auf wäßriger Subphase präpariert. (100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 20°C).

Für die weiteren Messungen mit LPS-Monolayern wurden wieder jeweils 3 nmol LPS sowie die Menge von 0,75 nmol LL32 eingesetzt. In Bild 5-10 sind die Flächenänderungen dargestellt, die durch die Injektion des Peptids unter die entsprechenden Monolayer induziert wurden.

LL32 interkaliert in alle LPS-Monolayern und führt zu einer Zunahme der Monolayerfläche. Die Reihenfolge der LPS nach der durch LL32 induzierten Flächenzunahme ist  $R5 \approx R595 > R_z > R4 > R7 > R345 \approx R60$ . Die Unterschiede zwischen LPS R5 und LPS R595 sowie zwischen LPS R345 und LPS R60 sind praktisch zu vernachlässigen.

Insgesamt ist festzustellen, daß LL32 unterschiedlich stark mit Monolayern aller verwendeten *S. minnesota* LPS interagiert und in diese interkaliert.

### 5.2.2 Verdrängung von Calcium aus LPS-Monolayern

Die Anreicherung grenzflächenaktiver Substanzen, beispielsweise von AMP, an Membranen kann zu einer Verdrängung der an die geladenen Kopfgruppen der Lipide gebundenen Ionen führen. Diesen Umstand nutzt man bei der Calciumverdrängung aus. Dazu wird ein Monolayer auf einer  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthaltenden Subphase präpariert und die Verdrängung durch das Peptid gemessen.

Mittels der Calciumverdrängung wurde die Anlagerung von LL32 an Monolayer verschiedener *S. minnesota* LPS untersucht. In Bild 5-11 ist beispielhaft eine Meßkurve für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Verdrängung aus einem LPS R4-Monolayer durch LL32 gezeigt. Eingezeichnet sind die Größen  $I_{\text{Sub}}$ ,  $I_{\text{Mono}}$  und  $I_{\text{Peptid}}$ , aus denen die relative  $\beta$ -Intensität berechnet wird (s. 4.2.4). Die Meßkurve wurde bereits geglättet (100 Punkte-gleitender Durchschnitt). Desweiteren wurden an den durch die Pfeile gekennzeichneten Zeitpunkten jeweils 200  $\mu\text{l}$  LL32-Lösung (0,05 mM) zugegeben. Deutlich erkennbar ist die durch Zugabe von LL32 induzierte Abnahme der detektierten  $\beta$ -Strahlung aus der Oberfläche. Kontrollmessungen ergaben eine stabile detektierbare  $\beta$ -Intensität

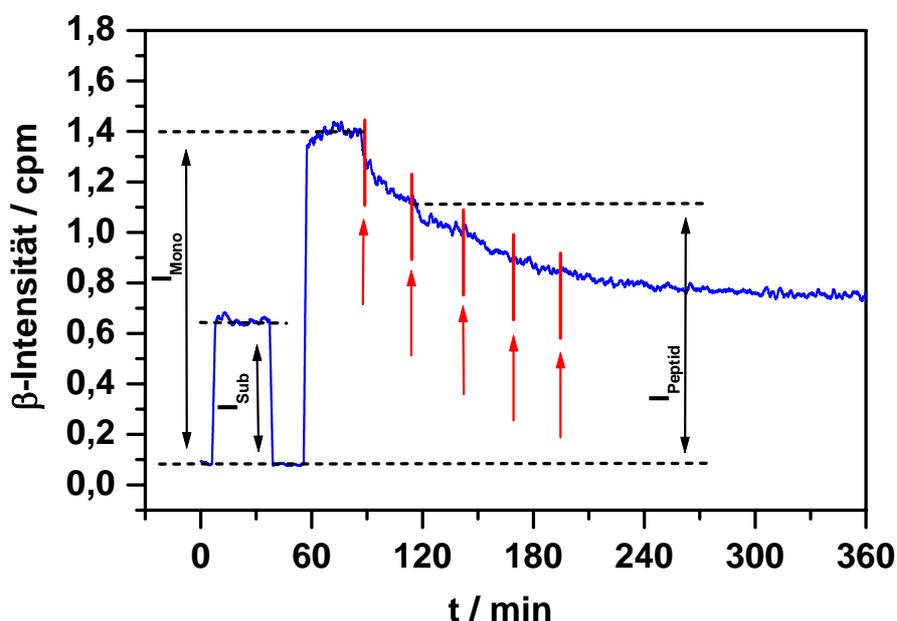


Bild 5-11: Calciumverdrängung an einem LPS R4-Monolayer durch LL32. Gezeigt ist die Rohdatenkurve. Der Anstieg der  $\beta$ -Intensität, der  $I_{\text{Sub}}$  entspricht, resultiert aus der Zugabe des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  zur Subphase. Dann wird der Detektor von der Meßzelle genommen ( $t \approx 40$  min), um den Monolayer zu präparieren. Die anschließend detektierte  $\beta$ -Intensität ist als Folge der an den Monolayer angelagerten  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen deutlich erhöht. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Zugabe von jeweils 2 nmol LL32 zur Subphase unter den Monolayer. (Subphase: 12  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität: 80 kBq/ $\mu\text{mol}$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ).

eines präparierten Monolayers über 24 h (Daten nicht gezeigt). Eine Auftragung der relativen  $\beta$ -Intensitäten, die jeweils 30 min nach der Peptidzugabe erreicht war, gegen die zugesetzte Stoffmenge LL32 ergibt die in Bild 5-12 gezeigte Kurve.

Die zugesetzte Menge an LL32 verteilt sich auf 60 ml, dies entspricht bei einer Stoffmenge von 50 nmol LL32 einer Konzentration von 0,8  $\mu\text{M}$  LL32. Nach Zugabe von 50 nmol LL32 verbleibt ein Rest  $\beta$ -Intensität von  $< 20\%$  (wie man der Kurve in Bild 5-11 entnimmt, bleibt dieser Wert auch unverändert). Da die gemessene  $\beta$ -Intensität proportional zu der im Kopfgruppenbereich der LPS gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist, wurde durch das LL32 also etwas über 80% der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Monolayer verdrängt.

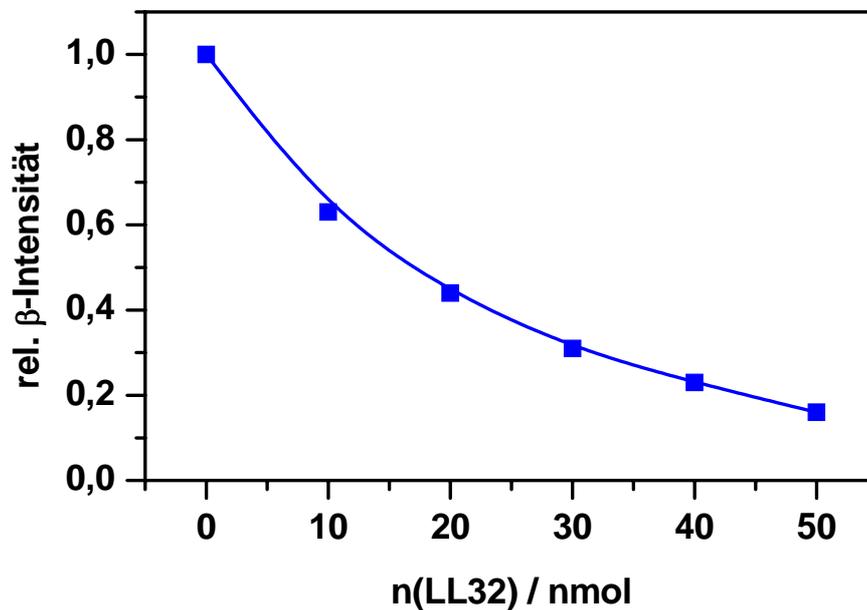


Bild 5-12: Auftragung der relativen  $\beta$ -Intensität gegen die Peptidkonzentration (für die Messung aus Bild 5-11.) Die relativen  $\beta$ -Intensitäten wurden jeweils 30 min nach der Zugabe von je 2 nmol LL32 bestimmt. Durch die Zugabe von LL32 kommt es zu einer Verdrängung der gebundenen Calciumionen. Nach Zugabe von insgesamt 10 nmol LL32 wurden etwas mehr als 80% der Calciumionen aus dem Kopfgruppenbereich der den Monolayer bildenden LPS R4-Moleküle verdrängt. (Subphase: 12  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität: 80 kBq/ $\mu$ mol  $\text{Ca}^{2+}$ , T = 20°C)

Die Calciumverdrängungsexperimente wurden außer für LPS R5 für alle *S. minnesota* LPS durchgeführt. Für Experimente an LPS R5-Monolayern stand LL32 nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung. Als Parameter für die Auswertung wurde die Stoffmenge LL32 gewählt, die zu einer 50%igen Reduktion der Strahlungsintensität, entsprechend einer 50%igen Verdrängung der Calciumionen aus dem Monolayer, führte (s. Bild 5-13).

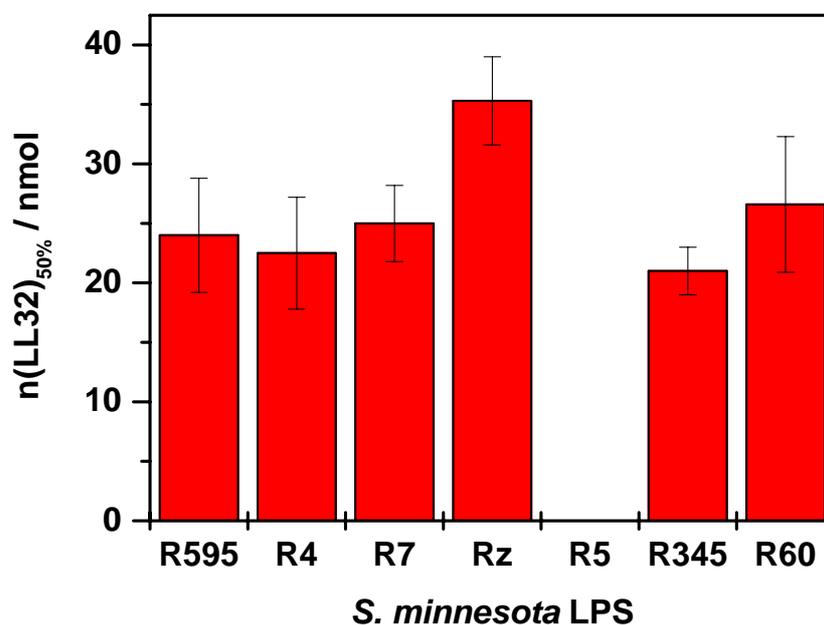


Bild 5-13: Vergleich der LL32 Stoffmengen, die zu einer 50%igen Reduktion der detektierten  $\beta$ -Strahlung aus den jeweiligen Monolayern führten. Die Monolayer wurden jeweils aus 10 nmol des entsprechenden LPS präpariert. (Subphase: 12  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität: 80 kBq/ $\mu$ mol  $\text{Ca}^{2+}$ , T = 20°C).

In Bild 5-13 ist deutlich zu erkennen, daß es zwischen den untersuchten LPS praktisch keinen Unterschied hinsichtlich der für eine 50%ige Strahlungsreduktion benötigten Menge LL32 gibt. Eine Ausnahme bildet wiederum LPS Rz mit etwa 35 nmol LPS.

Die verbleibende Reststrahlung, die bei der höchsten LL32-Konzentration noch detektiert werden kann, zeigt, daß diese praktisch für alle LPS gleich groß ist (25 - 30% Reststrahlung).

In allen Experimenten wurden 10 nmol LPS eingesetzt. Der molekulare Platzbedarf der verschiedenen LPS im Monolayer unterscheidet sich praktisch nicht. Dies bedeutet, daß die Versuche unter gleichen lateralen Druckbedingungen ( $\sim 10$  mN/m) durchgeführt wurden. LL32 besitzt jedoch die Fähigkeit, in einen Monolayer zu interkalieren und eine Flächenzunahme des Monolayers bei Lateraldrucken von 25 mN/m zu induzieren (s. 5.2.1). Weiter bedeutet dies aber, daß bei den Verdrängungsmessungen mit einem

Anstieg des lateralen Drucks zu rechnen ist. Darum wurden zusätzlich die lateralen Drucke am Ende der Messungen bestimmt. Dabei ergab sich, daß die Enddrucke aller Monolayer im Bereich von 23 – 25 mN/m lagen.

### 5.2.3 Diskussion

Es ist ein ausdrücklicher Trend in der Abnahme der durch LL32 induzierten Flächenänderung von Monolayern aus den verschiedenen Mutanten-LPS festgestellt worden. Zunächst nimmt die induzierte Flächenzunahme von LPS R595 über LPS R4 nach LPS R7 ab. Diese LPS unterscheiden sich durch jeweils eine weitere Heptose, d. h. LPS R4 besitzt prinzipiell die gleiche Struktur wie LPS R595 plus einer zusätzlichen Heptose. LPS R7 besitzt im Vergleich zu LPS R4 wiederum eine Heptose mehr. Die Nettoladungen der LPS unterscheiden sich hingegen nicht wesentlich voneinander: 3,6 (LPS R595), 4 (LPS R4) und 4,1 (LPS R7). Die Unterschiede in den induzierten Flächenänderungen lassen sich also nicht alleine durch die Nettoladungen erklären. Denn wäre die Interkalation einzig von der Nettoladung des LPS abhängig, so sollten LPS R4 und LPS R7 in etwa die gleichen Flächenänderungen aufweisen, während bei einem LPS R595-Monolayer eine geringere Flächenänderung zu beobachten wäre. Die Meßergebnisse lassen vielmehr einen Einfluß der Kernzucker vermuten. Für LPS R595, LPS R4 und LPS R7 sind geladene Molekülteile nur am Lipid A-Teil, sowie den Kdo zu finden (s. Tabelle 7-1, Anhang), dadurch haben die Ladungen bei LPS R595 eine exponierte Lage und werden schrittweise durch die hinzukommenden Zucker bei LPS R4 und LPS R7 verdeckt und sind nicht mehr so zugänglich für das Peptid. Durch die „abgeschirmten“ Ladungen kommt es zu einer geringeren Anlagerung und Interkalation von LL32 in die Monolayer bei LPS R4 und LPS R7. Prinzipiell ist es auch denkbar, daß LL32 in den äußeren Kernzuckern gebunden wird und somit nicht weiter vordringt, so daß die induzierte Flächenänderung geringer ausfällt. Für kurze Kernzucker scheint dies eher unwahrscheinlich, könnte aber mit steigender Zuckerlänge an Bedeutung gewinnen.

Vergleicht man die Flächenänderungen von LPS R7 und LPS Rz, so fällt die deutliche Zunahme der induzierten Flächenänderung bei LPS Rz auf. Zwischen LPS R7 und LPS Rz besteht bezüglich der Lipid A Struktur sowie der Anzahl der Kernzucker kein Unterschied, jedoch steigt die mittlere Nettoladung von 4,1 (LPS R7) auf 5,3 (LPS Rz)

an, und die geladenen Molekülteile sitzen am letzten Kernzucker und haben wieder eine exponierte Position. Somit ist hier wieder eine deutlich größere Flächenzunahme zu erwarten, und diese wurde auch beobachtet.

Mit der Ausnahme von LPS R5 ist Bild 5-10 zu entnehmen, daß die Flächenänderungen mit steigender Zuckerzahl von LPS Rz nach LPS R345 drastisch abnimmt. Hier macht sich möglicherweise die Substitution mit weiteren Zuckern in der Seitenkette bemerkbar (s. Tabelle 7-1, Anhang), die zusätzlich zu dem längeren Core-Oligosaccharid hinzukommen. Damit nimmt die Anzahl potentieller Bindungsplätze, die weiter entfernt vom Lipid A-Teil liegen, für LL32 zu. Zwischen LPS R345 und LPS R60 schließlich sind die Unterschiede in den bestimmten Flächenänderungen nicht mehr so deutlich. Dies kann wieder daran liegen, daß bei prinzipiell gleicher Struktur wie bei LPS R345 nur ein das Core-Oligosaccharid verlängernder Zucker hinzukommt. Auffällig ist aber der Unterschied in den Nettoladungen, 4,8 (LPS R345) und 6 (LPS R60).

Die durch die Interkalation von LL32 verursachten Flächenänderungen liegen in dem Bereich, der für den Einbau von LL32 in Monolayer aus Phospholipiden und *E. coli* LPS F515 berichtet wurde (Gutsmann et al., 2001). Ferner wird die molekulare Fläche von LL32 im LPS F515 Monolayer mit  $1,1 \text{ nm}^2$  (100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C) und  $2,0 \text{ nm}^2$  (100 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7, T = 37°C) bestimmt und ist somit zu den bestimmten Werten von  $1,9 \text{ nm}^2$  (LPS R595) vergleichbar (100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 20°C).

Es ist bemerkenswert, daß bei der Calciumverdrängung keine Unterschiede zwischen den verschiedenen LPS-Monolayern beobachtet wurden. Aus den Meßdaten folgt, daß unabhängig vom verwendeten LPS die Verdrängung der Calciumionen in gleichem Maße stattfindet, daß weder eine Ladungsabhängigkeit noch eine Abhängigkeit von der Anzahl der Zucker vermutet werden kann.

Die Ergebnisse des Einbaus von LL32 in LPS-Monolayer bei konstantem Lateraldruck sollten nicht mit den Ergebnissen bei der Calciumverdrängung verglichen werden. Bedingt durch den bestehenden Meßaufbau konnten die Calciumverdrängungsexperimente nur unter der Bedingung einer konstanten Fläche durchgeführt werden. So wurde für die Verdrängungsexperimente der niedrige Druck von 10 mN/m gewählt, um die Interkalation von LL32 durch einen zu stark ansteigenden Druck nicht zu behindern.

Die Einbaumessungen an der Filmwaage konnten unter der Bedingung eines konstanten Lateraldrucks von 25 mN/m durchgeführt werden. Bei 25 mN/m ist aber die Packungsdichte der LPS deutlich höher als bei 10 mN/m und es kann angenommen werden, daß das Peptid bei 25 mN/m einen größeren Widerstand beim Einbau in den Monolayer erfährt.

In diesem Zusammenhang erscheint eine neuere Arbeit erwähnenswert (Bucki et al., 2004). Die Autoren untersuchten den Einbau von LL37 in Monolayer, die aus verschiedenen Lipiden präpariert wurden. Dabei wurden die Monolayerflächen konstant gehalten und die Druckänderung, die durch das Peptid verursacht wurden, aufgezeichnet. Die induzierten Druckanstiege waren, unabhängig vom verwendeten Lipid (ob geladen oder ungeladen) immer gleich, hingen jedoch vom Anfangsdruck ab. Bei etwa 10 mN/m stieg der Druck um etwa 22 mN/m an, bei einem Anfangsdruck von 40 mN/m war LL37 nicht mehr in der Lage, einen Druckanstieg hervorzurufen. Insofern erklärt dies möglicherweise den Umstand, daß der beobachtete Druckanstieg bei den Calciumverdrängungsexperimenten unabhängig vom verwendeten LPS immer gleich ausfiel. Die Einbauexperimente sollten also nur mit Vorbehalt mit den Verdrängungsexperimenten verglichen werden, solange keine weiteren experimentellen Untersuchungen, z. B. Verdrängung mit einem Anfangsdruck des Monolayers bei 25mN/m, stattgefunden haben

### **5.3 Messungen an LPS-Aggregaten**

#### **5.3.1 Kalorimetrische Studie zur LL32/LPS-Interaktion**

Für ein besseres Verständnis intermolekularer Wechselwirkungen ist eine thermodynamische Charakterisierung von großer Bedeutung. Eine Möglichkeit hierzu bietet die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Beinahe jede chemische Reaktion ist mit einem Wärmeumsatz verbunden, und dieser läßt sich mit Hilfe der ITC über einen Leistungskompensationmechanismus messen (s. 4.3.2). So lassen sich viele biologisch relevante Wechselwirkungen untersuchen, wie z. B. Enzym-Substrat, Enzym-Arzneistoff oder auch Protein-Lipid.

Es wurde die Bindung von LL32 an LPS-Aggregate in mikrokalorimetrischen Experimenten untersucht. Typische Ergebnisse aus kalorimetrischen Titrationsen, wie sie für

die Interaktion von LL32 mit verschiedenen *S. minnesota* LPS erhalten wurden, sind beispielhaft in Bild 5-14 wiedergegeben. Alle Titrations wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, die Konzentration der LPS-Dispersionen betrug jeweils 0,05 mM (20 mM HEPES, pH = 7), LL32 wurde in einer Konzentration von 1,5 mM (20 mM HEPES, pH = 7) eingesetzt. Die Titrations wurden alle bei 40°C durchgeführt, damit lag die Temperatur in allen Fällen über den Phasenübergangstemperaturen der LPS, so daß ein Beitrag der Phasenumwandlung ausgeschlossen werden konnte. Insgesamt wurden 30 Aliquots von LL32 von je 3 µl zur LPS-Lösung titriert. Bedingt durch die Zugabe von 30 × 3 µl Peptidlösung zu 1,5 ml der LPS-Dispersion nimmt das Gesamtreaktionsvolumen um 6% zu. Dementsprechend findet eine Verdünnung der Reaktanten statt, und es tritt eine Wärmetönung auf, die in der gemessenen Enthalpie mit enthalten ist. Daher wurden die Messungen um den entsprechenden Anteil der Verdünnungswärme korrigiert. Der Korrekturterm für die Verdünnung von LL32 wurde

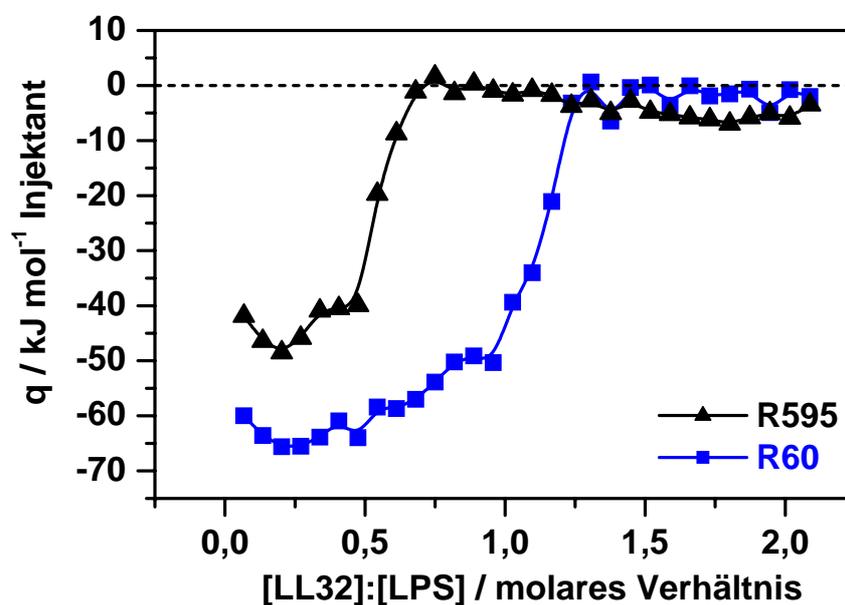


Bild 5-14: Vergleich der kalorimetrischen Titration von LPS R4 und LPS R60-Aggregaten. Es wurden 30 Injektionen von jeweils 3 µl LL32 (1,5 mM) in die vorgelegte LPS-Dispersion (je 0,05 mM) durchgeführt. (Subphase: 20 mM HEPES, pH = 7; T = 40°C).

durch Titration des Peptids in reinen Puffer bestimmt, er ergab sich zu  $(16,7 \pm 2,9)$  kJ/mol. Die Titration von reinem Puffer in die LPS-Lösung ergab im Rahmen der Messgenauigkeit keinen messbaren Wärmeumsatz, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Verdünnungswärme von LPS vernachlässigbar klein ist (Daten nicht gezeigt).

Die Bindung von LL32 an die verschiedenen *S. minnesota* LPS zeigten alle eine ähnlich sigmoidale Charakteristik, wie sie in Bild 5-14 gut zu erkennen ist. Zu Beginn wird eine unterschiedlich starke exotherme Reaktion beobachtet, die sich im Laufe der Titration abschwächt, bis schließlich keine Wärmetönung mehr zu messen ist. Wie man weiterhin sieht, unterscheiden sich LPS R4 und R60 in dem Sättigungswert des molaren Verhältnisses von Peptid und LPS, dies gilt ebenfalls für die restlichen LPS (s. unten).

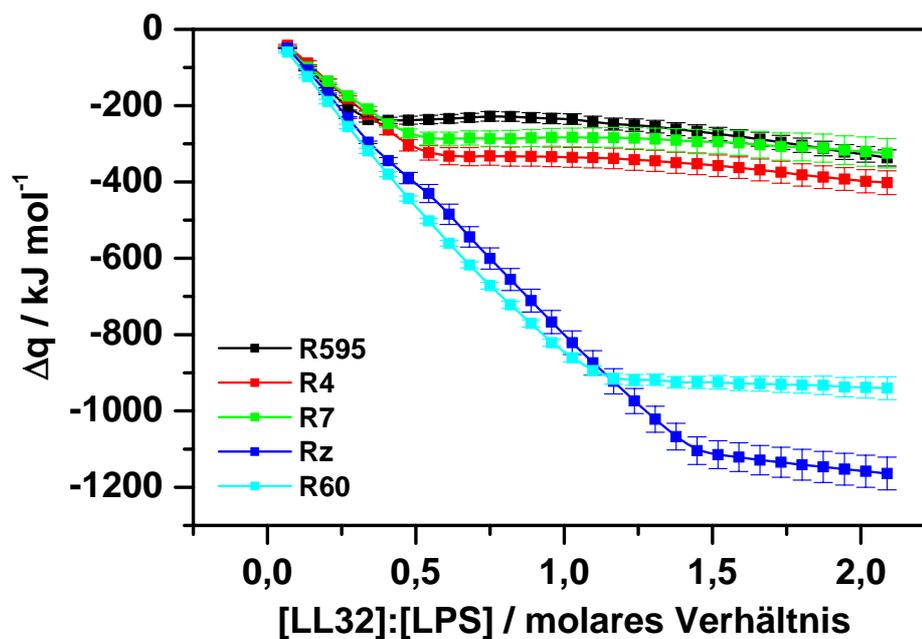


Bild 5-15: Integrale Wärmetönung für die Titration verschiedener LPS-Aggregate (s. Legende) mit LL32. Gut zu erkennen sind zwei unterschiedliche Gruppen von LPS: eine Gruppe, bei der die Titration bei molaren Verhältnissen von  $[LL32]:[LPS] < 1$  in die Sättigung geht, während die LPS der anderen Gruppe bei Werten von  $[LL32]:[LPS] > 1$  in die Sättigung gehen. (Subphase: 20 mM HEPES, pH = 7; T = 40°C)

Für die weitere Auswertung wurde aus der differentiell gemessenen die integrale Wärmetönung  $\Delta q = f(B_t)$  berechnet; in Bild 5-15 ist  $\Delta q$  beispielhaft für eine Auswahl

verschiedener LPS dargestellt. Der Darstellung entnimmt man, daß die LPS in zwei Gruppen aufgeteilt werden können: LPS R595, R4 und R7 auf der einen Seite und LPS R60 und Rz auf der anderen Seite, mit deutlich höheren Nettoladungen der letzteren. Wie in 4.3.2 beschrieben, wurde die Funktion (4.8) an den Verlauf der integralen Wärmetönung  $\Delta q = f(B_i)$  angefitet und daraus n, H und K erhalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-2 aufgeführt. Für R595 ist keine Bindungskonstante angegeben, da hier die Fitprozedur versagte. Mit verschiedenen Anfangsbedingungen lieferte der Fit mit Werten im Bereich von  $10^8 - 10^{21} \text{ l mol}^{-1}$  keine eindeutigen Ergebnisse, so daß hier auf die Angabe eines Wertes verzichtet wurde.

Eine Auftragung der Molekularität n gegen LPS-spezifische Parameter, wie die Anzahl der Zucker, die Nettoladung des LPS und den Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker ist in Bild 5-16 zu sehen. Je mehr Zucker das Kernoligosaccharid besitzt, desto ausgeprägter ist beispielsweise die Fähigkeit, LL32 zu binden, d. h. desto größer ist also

	<b>R595</b>	<b>R4</b>	<b>R7</b>	<b>Rz</b>	<b>R5</b>	<b>R345</b>	<b>R60</b>
<b>n</b>	0,31 ± 0,06	0,51 ± 0,02	0,44 ± 0,03	1,43 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,95 ± 0,03	1,01 ± 0,01
<b><math>\Delta H_b /</math> <b>kJ mol<sup>-1</sup></b></b>	-52,1 ± 1	-46,8 ± 0,3	-46,1 ± 1,1	-56,9 ± 0,3	-47,7 ± 0,3	-45,3 ± 2,3	-65,1 ± 0,7
<b>K / l <math>\mu\text{mol}^{-1}</math></b>		9 ± 2	5 ± 2	3 ± 0,6	4 ± 1	0,2 ± 0,1	2 ± 0,3
<b><math>\Delta q /</math> <b>kJ mol<sup>-1</sup></b></b>	-238 ± 21	-332 ± 31	-286 ± 39	-1114 ± 43	-129 ± 33	-396 ± 121	-915 ± 30

Tabelle 5-2: Übersicht über die verschiedenen thermodynamischen Parameter, die die Interaktion zwischen LPS-Aggregaten und LL32 charakterisieren. Die Werte wurden durch Anpassung der Gleichung (4.8) an die experimentell bestimmten Wärmetönungen erhalten.

die Molekularität n, die Anzahl gebundener LL32 Moleküle pro Molekül LPS (Bild 5-16 A). Folglich steigt dann ebenso mit der molekularen Masse auch das Bindungsvermögen für LL32, da die Masse natürlich mit der Anzahl der Zucker steigt (Daten

nicht gezeigt). Das Bindungsvermögen der LPS für LL32 steigt ebenfalls mit steigender Nettoladung der LPS (Bild 5-16 **B**). Desweiteren sinkt die Molekularität mit steigendem Wert des Verhältnis von Ladung/Anzahl Kernzucker. Rz ist nicht in den Trend einzuordnen.

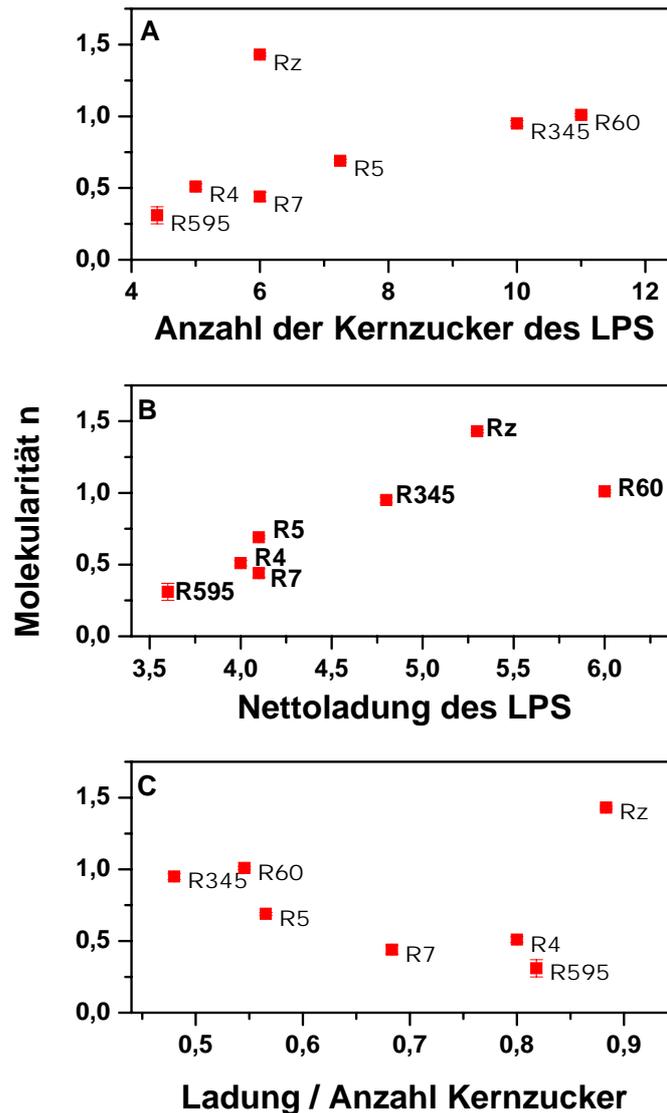


Bild 5-16: Zusammenhang zwischen der Molekularität  $n$  und den LPS-spezifischen Parametern: Anzahl der Kernzucker (**A**), Nettoladung (**B**) und Ladung/Anzahl Kernzucker (**C**) des LPS. (Subphase: 20 mM HEPES, pH = 7; T = 40°C).

Außerdem wurden sowohl die Gibb'sche Freie Enthalpie wie auch die Entropie (genauer  $T\Delta S$ ) aus den erhaltenen Daten bestimmt. Es ist jedoch anzumerken, daß alle Bindungskonstanten bei  $10^6 \text{ l mol}^{-1}$  liegen, es kommt also in allen Fällen zu einer starken Bindung von LL32 an LPS. Gerätetechnische Beschränkungen gestatten in diesem Bereich keine zuverlässige Bestimmung der Bindungskonstante (eine Analyse der apparativen Beschränkungen ist in (Wiseman et al., 1989) zu finden). Verlässliche Aussagen können damit prinzipiell nur noch für  $n$  und  $\Delta H_b$  getroffen werden. Gleichwohl soll aber nicht auf einen Vergleich zwischen den kalorischen Größen (Bild 5-17) verzichtet werden, da hieraus generell die Reaktion bestimmende Größe hervorgeht. Auf die Angabe eines Fehlers wird aber aus oben genannten Gründen verzichtet. Die Freie Enthalpie  $\Delta G$  der Wechselwirkung von LL32 mit den verschiedenen LPS ist in etwa gleich groß. Der entropische Beitrag ( $T\Delta S$ ) für die Bindung von LL32 an die verschiedenen LPS-Aggregate ist negativ, in allen Fällen nimmt also bei der Bindung von

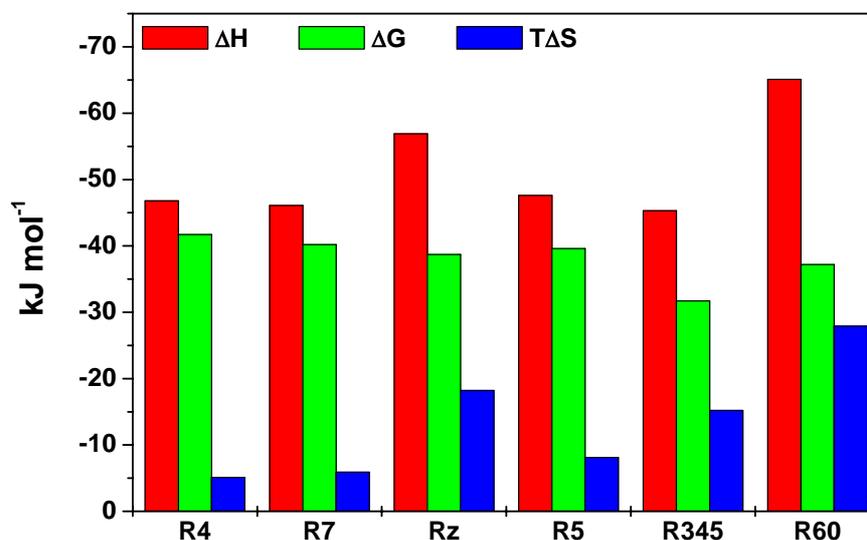


Bild 5-17: Vergleich der kalorischen Zustandsgrößen für die Interaktion von LL32 mit den Aggregaten verschiedener LPS. In allen Fällen ist die Reaktionsentropie negativ und entspricht somit einer Zunahme der Ordnung durch die Bindung von LL32. (Subphase: 20 mM HEPES, pH = 7; T = 40°C).

LL32 an die Aggregate die Ordnung des Systems zu. Der Verlauf der Reaktionsenthalpien ( $\Delta H$ ) weist keine Systematik auf. Aufgrund der negativen Reaktionsentropie stellt  $\Delta H$  die treibende Kraft ( $\Delta G < 0$ ) der Bindung von LL32 an die LPS-Aggregate dar.

### 5.3.2 Einfluß von LL32 auf das Oberflächenpotential von LPS-Aggregaten

Das Oberflächenpotential und die Oberflächenladungsdichte von Membranoberflächen bestimmen die Wechselwirkung mit geladenen Substanzen. Die negativen Ladungen im Core-Oligosaccharid der LPS führen zu einem negativen Oberflächenpotential im hydrophilen Kopfgruppenbereich der LPS-Aggregate. Die Anlagerung membranaktiver kationischer Substanzen, wie z. B. LL32, an die negativ geladene Oberfläche der LPS-Aggregate kann in einer Abschirmung des Oberflächenpotentials resultieren.

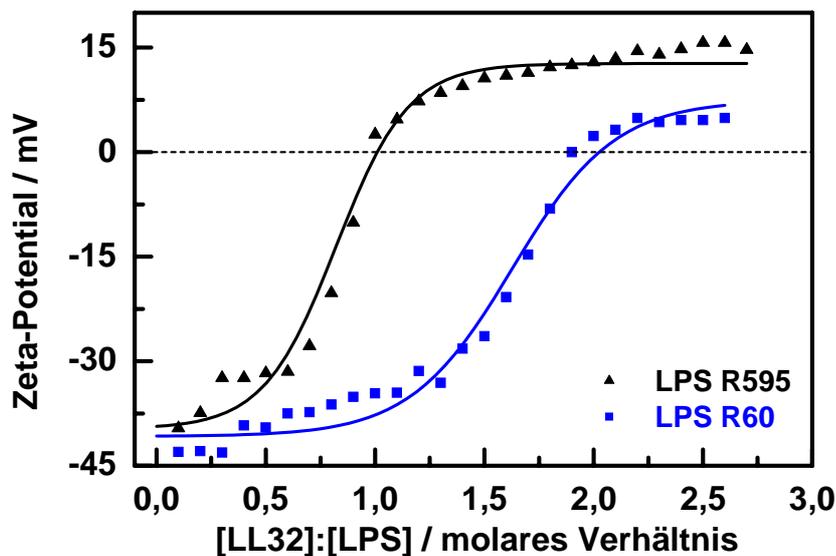


Bild 5-18: Zetapotential von LPS R595- und R60-Aggregaten in Abhängigkeit von dem molaren Verhältnis von LL32 zu LPS. (Subphase: 2 mM CsCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH = 7, T = 20°C).

Der Einfluß von LL32 auf das Oberflächenpotential verschiedener LPS wurde durch Messung des Zetapotentials in Abhängigkeit von der LL32-Konzentration untersucht (s.

4.3.3). Repräsentative Messungen für die Abhängigkeit des Zetapotentials von der Menge an LL32 sind in Bild 5-18 für LPS R595 und LPS R60 gezeigt.

In den Beispielmessungen ist in beiden Fällen deutlich die starke Änderung des Zetapotentials der LPS-Aggregate durch LL32 zu erkennen. Bei LPS R595 tritt sie jedoch im Vergleich zu LPS R60 bereits bei deutlich geringeren LL32-Konzentrationen auf. Die Messkurven weisen eine sigmoidale Charakteristik auf: zunächst ändert sich das Zetapotential wenig mit steigendem Gehalt an LL32, dann folgt ein Bereich mit einer sehr starken Änderung, bis schließlich am Ende die Sättigung erreicht wird. Die Messungen mit den anderen LPS verliefen analog. Bei allen Messungen wurde eine Überkompensation, d. h. eine Umkehr im Vorzeichen des Zetapotentials durch LL32 beobachtet. Ausgewertet wurden die Daten über die Anpassung eines standard-sigmoidalen Fit (Origin 6.0) an die Meßpunkte (siehe die durchgezogenen Kurven in

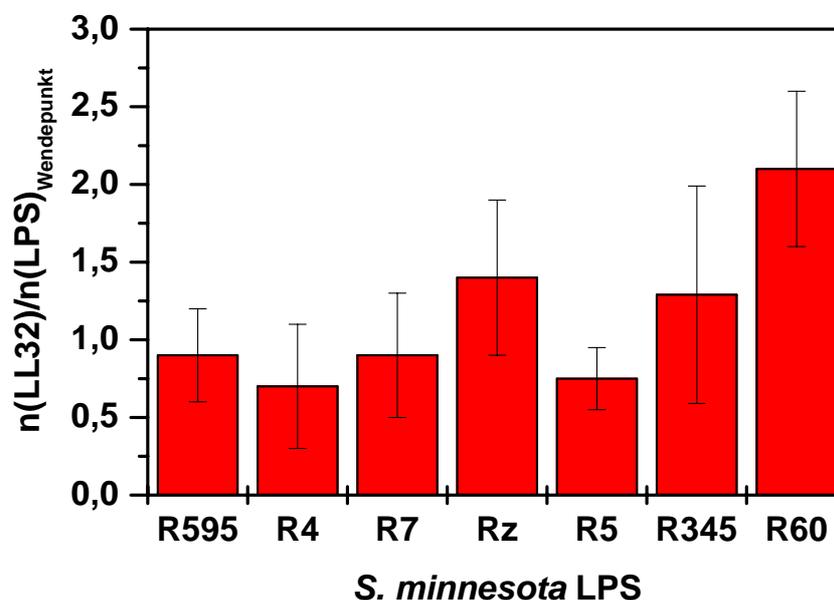


Bild 5-19: Vergleich der molaren Verhältnisse von LL32 zu LPS am Wendepunkt der jeweiligen Titration. (Subphase: 2 mM CsCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH = 7, T = 20°C).

Bild 5-18). Die angefitteten Kurven wurden schließlich differenziert und daraus die molaren Verhältnisse am Wendepunkt bestimmt, (Bild 5-19). Zwischen LPS R595, LPS R4, LPS R7 und LPS R5 bestehen praktisch kaum bzw. keine Unterschiede hinsichtlich der für eine Abschirmung des Zetapotentials der LPS-Aggregate benötigten Menge an LL32.

Für LPS Rz und LPS R345-Aggregate ist die für eine Abschirmung des Zetapotentials notwendige Peptidmenge größer und für LPS R60-Aggregate deutlich am größten. Es ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der Nettoladung des LPS und der Menge an LL32, die zur Potentialabschirmung notwendig ist (Bild 5-20). Je größer die Nettoladung des LPS ist, um so mehr LL32 muß für eine Abschirmung des Oberflächen- respektive Zetapotentials verwendet werden.

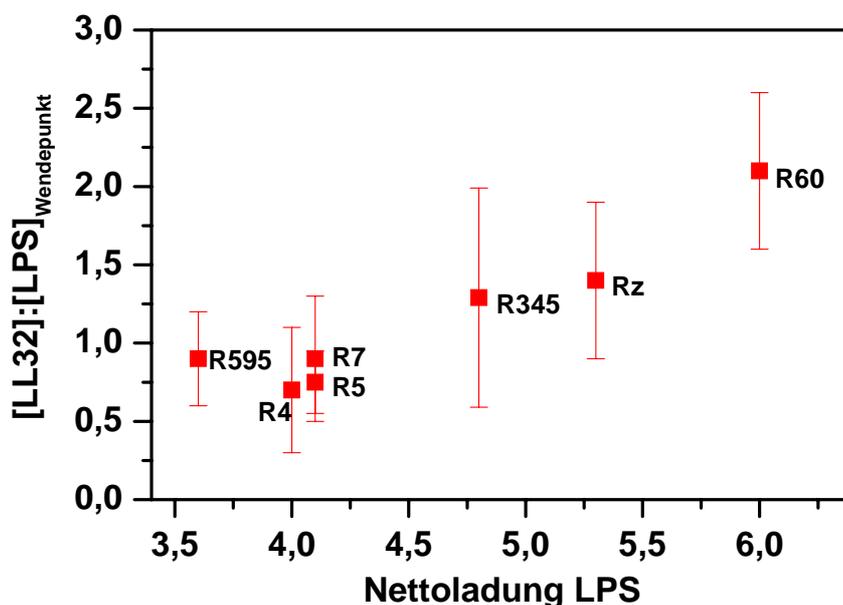


Bild 5-20: Einfluß von LL32 auf die Zetapotentiale von Aggregaten verschiedener *S. minnesota* LPS. Aufgetragen ist das molare Verhältnis von LL32 zu LPS am Wendepunkt der jeweiligen Titration gegen die Nettoladung des entsprechenden LPS. Je höher die Nettoladung des LPS, desto mehr LL32 ist erforderlich, um das Zetapotential abzuschirmen (Subphase: 2 mM CsCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, pH = 7, T = 20°C).

Eine Korrelation zwischen der für die Potentialabschirmung benötigten Menge an LL32 und der Anzahl der Kernzucker bzw. des Quotienten Ladung/Anzahl Kernzucker wurde nicht gefunden und daher auf eine Darstellung verzichtet.

### 5.3.3 Einfluss von LL32 auf die Fluidität der LPS

Die Interaktion von AMP mit Lipidmembranen kann wie in 3.4.1 dargelegt sowohl zu einer Fluidisierung als auch zu einer Rigidisierung der Membran führen. Dies kann sich in einer Verschiebung der Phasenübergangstemperatur  $T_c$  zwischen der gelförmigen  $L_\beta$ - und der flüssigkristallinen  $L_\alpha$ -Phase ausdrücken. Für die Bestimmung der Fluidität von Lipidmembranen eignen sich sowohl die FTIR-Spektroskopie (s. 4.3.4), als auch Fluoreszenzpolarisationsmessungen (s. 4.3.5).

Mittels FTIR-Spektroskopie an LPS-Aggregaten wurde zunächst die Fluidität der reinen LPS-Aggregate untersucht. An Mischungen von LPS und LL32 wurde schließlich der Einfluß von LL32 auf die Fluidität des LPS untersucht. Zum Vergleich wurden Fluoreszenzpolarisationsmessungen an LPS-Aggregaten unter Zugabe von LL32 durchgeführt. In der Darstellung der Ergebnisse sind stets molare Verhältnisse von LPS : Peptid angegeben.

*FTIR-Spektroskopie.* In Bild 5-21 sind Messungen der  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bandlage für LPS R595, LPS Rz und LPS R60 in Abhängigkeit vom Gehalt an LL32 gezeigt. Die molaren Verhältnisse sind in der Legende angegeben. Bei der Körpertemperatur eines Menschen bei  $T = 37^\circ\text{C}$  ist eine vertikale Linie eingezeichnet. LL32 wirkt auf LPS R595- und LPS Rz-Aggregate (Bild 5-21 **A**, **B**) in geringem Maße fluidisierend, erkennbar an einer höheren Wellenzahl der  $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande. Bei LPS R60 (Bild 5-21 **C**) führt die Anwesenheit von LL32 zu einer Verschiebung der Phasenübergangstemperatur  $T_c$  von  $37^\circ\text{C}$  (1 : 0) über  $32^\circ\text{C}$  (1 : 0,1) auf etwa  $21^\circ\text{C}$  (1 : 0,2), wie auch zu einer Abnahme des Ordnungszustandes der Acylketten. Für LPS R4- und LPS R7-Aggregate wurde ein vergleichbarer Effekt von LL32 auf den Ordnungszustand der Acylketten wie bei LPS R595-Aggregaten gefunden (Daten nicht gezeigt).

Zu Vergleichszwecken wurde der Einfluß von LL32 auf die Fluidität der LPS-Aggregate mit der Fluoreszenzpolarisationspektroskopie untersucht. Es wurden Aggregate aus LPS R595, LPS R7, LPS Rz und LPS R60 verwendet. Es wurde eine für

alle LPS-Aggregate vergleichbare fluidisierende Wirkung durch LL32 festgestellt (Daten nicht gezeigt).

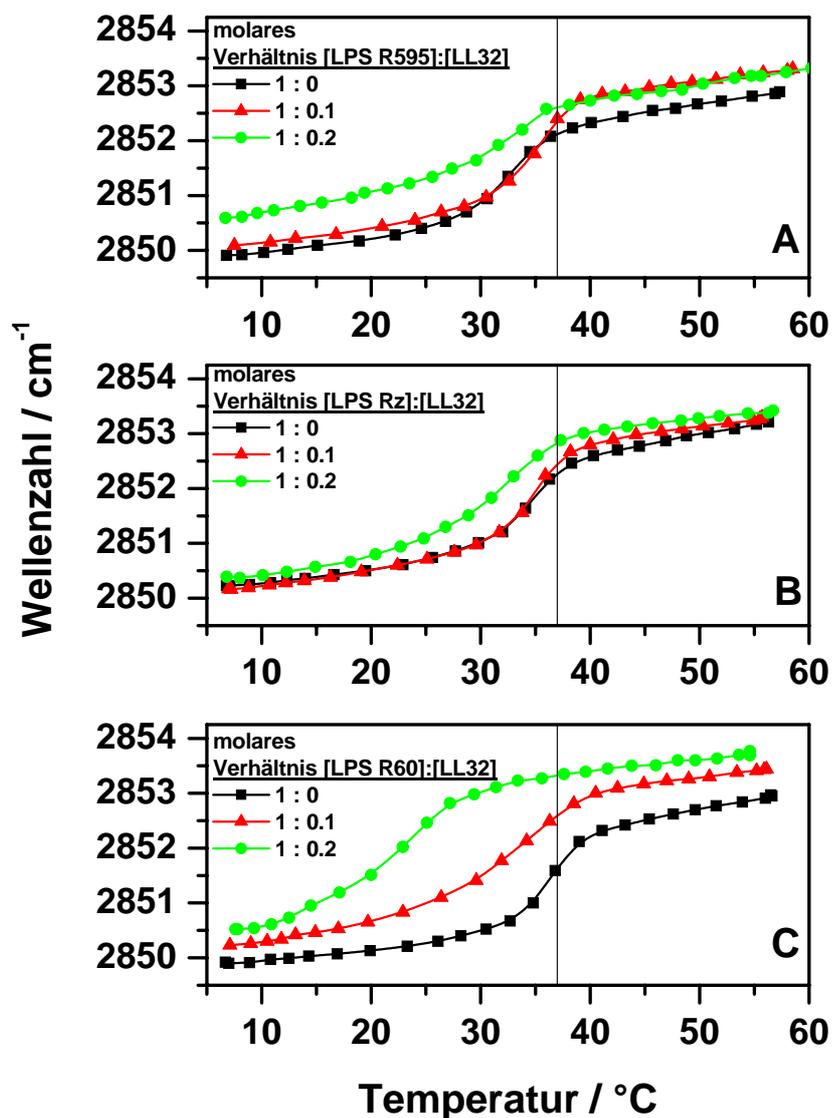


Bild 5-21: FTIR-spektrometrische Untersuchungen zum Phasenverhalten von LPS R595 (A), Rz (B) und LPS R60 (C). Dargestellt ist die Bandlage der symmetrischen Streckschwingung der Methylengruppen in Abhängigkeit von der Temperatur für verschiedene molare Verhältnisse von LPS zu LL32 ( $c(\text{LPS}) = 20 \text{ mM}$ ; Subphase: 20 mM HEPES,  $\text{pH} = 7$ ).

Das Ergebnis beider Methoden ist also, daß LL32 fluidisierend auf die Aggregate verschiedener LPS wirkt. Hinsichtlich der Wirkung von LL32 auf die Fluidität der LPS R60-Aggregate war der drastische Effekt, der mit der FTIR-Spektroskopie zu beobachten war, mit der Fluoreszenzpolarisationspektroskopie nicht zu bestätigen.

Beide Meßmethoden zeigen unabhängig voneinander eine Fluidisierung der LPS-Aggregate durch LL32 an. Im Falle der IR-Messungen sind diese nicht immer deutlich zu erkennen, wurden jedoch durch die Polarisationsmessungen bestätigt.

#### 5.3.4 Einfluß von LPS auf die Struktur von LL32

Mit der CD-Spektroskopie kann die Konformation von Peptiden untersucht werden. Das erzeugte CD-Spektrum ermöglicht Aussagen über die integrale Peptidstruktur, die durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen oder Coulombwechselwirkungen bedingt ist. Konformationsänderungen von Peptiden resultieren in einem veränderten CD-Spektrum. Methoden zur Strukturbestimmung aus CD-Spektren von Proteinen sind bereits seit Jahrzehnten etabliert (Greenfield, 1996). Jedoch sind die Verfahren zur Strukturbestimmung für kleine Peptide nur eingeschränkt geeignet. Daher wird anhand der CD-Spektren lediglich qualitativ überprüft, ob die Interaktion zwischen LL32 und LPS-Aggregaten zu einer strukturellen Änderung des Peptids relativ zum ungebundenen Zustand führt.

Es wurden CD-Spektren von reinem LL32 und LL32 in Gegenwart von LPS R595, LPS R7 bzw. LPS R60 aufgezeichnet.

Die CD-Spektren des reinen Puffers zeigten keinen Einfluss auf die Polarisationsrichtung der Strahlung (Daten nicht gezeigt). In wäßriger Lösung ist das CD-Spektrum von LL32 indikativ für das Vorliegen eines  $\alpha$ -helikalen Peptids (Bild 5-22 **A**) mit Absorptionsbanden bei 208 und 223 nm.

In Gegenwart von LPS (Bild 5-22, **B**) finden im wesentlichen zwei Veränderungen im CD-Spektrum des Peptids statt. Die Absorptionsbanden sind um etwa 2 nm bathochrom verschoben, wobei die Absorptionsbande um 208 nm schwach (LPS R595) bzw. nicht (LPS R7 und LPS R60) ausgeprägt ist. Desweiteren ändert sich das Intensitätsverhältnis der Absorptionsbanden zueinander. Die Bande bei höheren Wellenlängen dominiert das CD-Spektrum. Im CD-Spektrum des reinen Peptids dominierte die Bande bei der

kürzeren Wellenlänge. Die CD-Spektren in Anwesenheit der verschiedenen LPS-Aggregate ähneln sich recht stark mit der Ausnahme, daß bei Anwesenheit von LPS R595 die Bande bei  $\sim 210$  nm deutlich zu erkennen ist.

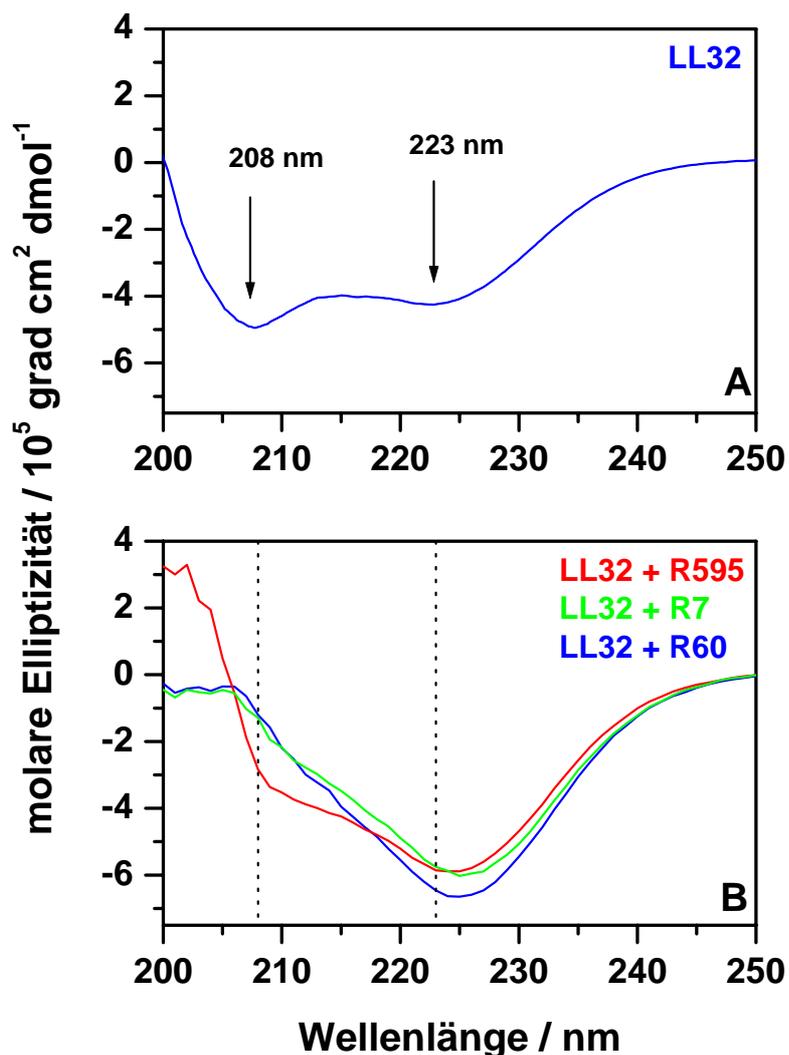


Bild 5-22: CD-Spektren von LL32. Es sind die molaren Elliptizitäten gegen die Wellenlänge aufgetragen. **Bild A:** Bei Abwesenheit von LPS weist das CD-Spektrum für LL32 die für  $\alpha$ -helikale Peptide typischen Banden bei 208 und 223 nm auf. **Bild B:** Die Interaktion von LL32 mit LPS führt zu einer bathochromen Verschiebung sowie einer Umkehr des Intensitätsverhältnisses der Banden. Die Spektren sind um den Anteil des LPS korrigiert. (Subphase: 5 mM HEPES, pH = 7, RT).

Die Änderung der CD-Spektren zeigen eine offensichtliche Bindung von LL32 an die LPS-Aggregate und eine daraus folgende konformationelle Änderung des Peptids.

### 5.3.5 Einfluß von LL32 auf die LPS-Aggregatstruktur (Kleinwinkelstreuung)

Eine wichtige Analysemethode der supramolekularen Physik ist die Röntgenkleinwinkelstreuung. Sie bietet die Möglichkeit, die Struktur aggregierter Teilchen, wie z. B. von LPS-Aggregaten, zu bestimmen. Die Methode kann dazu beitragen, Aussagen über z. B. wirkstoffinduzierte Änderungen der supramolekularen Struktur in aggregierten Phasen zu treffen. Sie stellt damit eine zur CD-Spektroskopie komplementäre Methode dar, da hier strukturelle Änderungen der LPS-Aggregate beleuchtet werden. Da LPS immunstimulatorische Fähigkeit besitzt (die zu einer schweren Sepsis führen kann) und

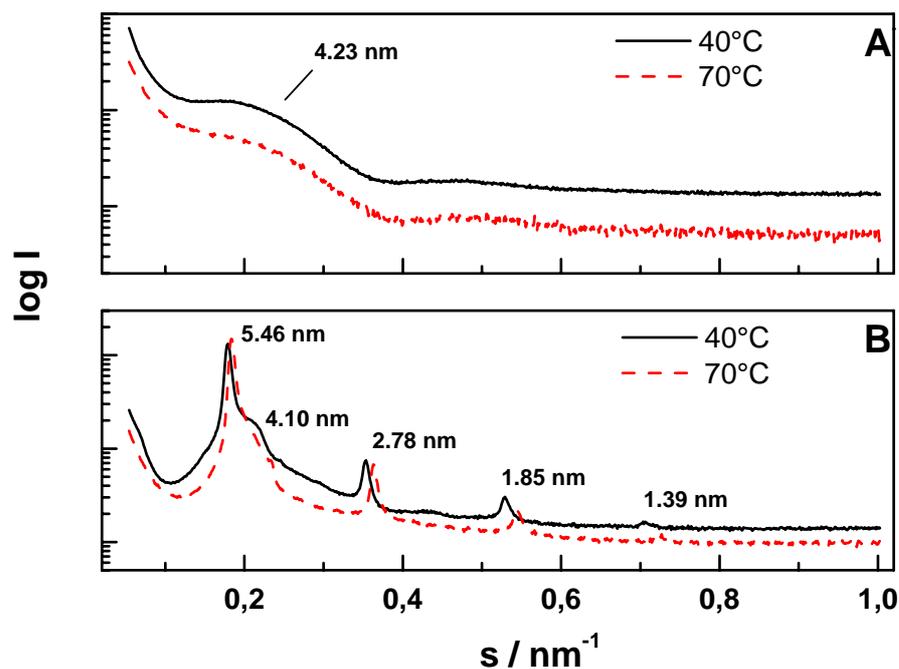


Bild 5-23: Beugungsmuster der Kleinwinkelstreuung an LPS R595-Aggregaten für zwei Temperaturen. (A): In Abwesenheit von LL32 liegt eine gemischt kubisch-lamellare Struktur vor. (B): In Anwesenheit von LL32 deuten die Peakpositionen auf eine multilamellare Struktur hin. (20 mM HEPES, pH = 7; molares Verhältnis [LPS R595] : [LL32] = 6 : 1).

diese mit der dreidimensionalen Aggregatstruktur korreliert (s. 3.3.2), wurde untersucht welchen Einfluß LL32 auf die Aggregatstruktur ausgewählter LPS hat.

Die Untersuchung des Peptideinflusses auf die LPS-Aggregate mittels der Röntgenkleinwinkelstreuung wurde in wäßriger Phase vorgenommen, das molare Verhältnis LPS : Peptid betrug 6 : 1, wobei die LPS-Konzentration 3mM betrug. Einen Vergleich der Beugungsdiagramme für LPS R595 ohne (**A**) und in Gegenwart von LL32 (**B**) bei verschiedenen Temperaturen ist in Bild 5-23 zu sehen. In reinem Puffer (20 mM HEPES, pH = 7) nehmen LPS R595-Aggregate eine gemischt kubisch-unilamellare Struktur an, wohingegen bei Anwesenheit von LL32 die Positionen der Peaks auf eine multilamellare Struktur hinweisen (äquidistante Verhältnisse der Reflexpositionen). Es ist allerdings festzuhalten, daß in dem gezeigten Beispiel ohne Peptid das Röntgenspektrum nicht gut aufgelöst ist (Seydel et al., 1993a).

Desweiteren wurde der Einfluß von LL32 auf die Aggregatstruktur von LPS R60, dem LPS mit dem längsten Core-Oligosaccharid, untersucht (Daten nicht gezeigt). LL32 hat auf die LPS R60-Aggregate den gleichen Einfluß, es wirkt lamellarisierend, jedoch ist der Effekt geringer ausgeprägt.

Es ist festzuhalten, daß LL32 mit den LPS-Aggregaten in Wechselwirkung tritt und dabei strukturelle Änderungen der LPS-Aggregatstruktur bewirkt, die in einer Lamellarisierung resultiert.

### 5.3.6 Diskussion

Die Bindung von LL32 an die LPS-Aggregate wird durch die Nettoladung und die Anzahl der Kernzucker des LPS bestimmt (s. Bild 5-16). Je mehr Kernzucker das LPS besitzt desto größer ist die Zahl potentieller Bindungsmöglichkeiten und damit steigt die Kapazität sowie die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung von LL32. Eine höhere Nettoladung des LPS bedeuteten eine stärkere ionische Wechselwirkung zwischen LPS und dem kationischen LL32 und folglich eine stärkere Aufkonzentrierung des Peptids an der Oberfläche der LPS-Aggregate. Unklar bleibt, weshalb LPS Rz hiervon eine Ausnahme bildet. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß LPS Rz neben einer hohen Nettoladung (5,3) wenige Kernzucker (6) aufweist und die Ladungen zum Teil eine exponierte Lage besitzen. Beide Umstände würden eine Wechselwirkung zwischen LL32 und LPS deutlich begünstigen und so zu der hohen Molekularität führen.

Die Reaktionsentropien für die Interaktion von LL32 mit LPS-Aggregaten sind, unabhängig vom LPS, stets negativ. Dies entspricht einer Zunahme der Ordnung des Systems und ist damit einer Bindung von LL32 an die LPS-Aggregate entgegen gerichtet. Die Interaktion zwischen LL32 und den verschiedenen LPS-Aggregaten ist exotherm ( $\Delta H \sim -45$  kJ/mol bis  $-65$  kJ/mol). Die Reaktion zwischen LL32 und LPS-Aggregaten ist enthalpisch ( $\Delta H$ ) begünstigt, da die Entropie zunimmt ( $T\Delta S < 0$ ).

Eine stark exotherme Reaktionsenthalpie neben einer negativen Reaktionsentropie bei der Bindung an negativ geladene sowie neutrale Membranen wurde bereits für das antibakterielle Peptid Magainin beobachtet (Wieprecht et al., 1999; Wieprecht et al., 2000).

Die exotherme Wärmetönung, welche die Bindung von LL32 an LPS-Aggregate begleitet, kommt z. T. durch ionische Wechselwirkung sowie Wasserstoffbrücken zwischen dem kationischen LL32 und den anionischen Kopfgruppen der LPS zustande. Dafür sprechen die ebenfalls hohen Assoziationskonstanten. Während LL32 an die LPS-Aggregate adsorbiert, findet eine strukturelle Änderung des Peptids statt (siehe CD-Daten). Die Ausbildung einer Helix aus einer ungeordneten Struktur ist mit rund 4,2 kJ/mol Aminosäurerest ein exothermer Prozeß (Chou und Scheraga, 1971; Massey et al., 1979). Eine grobe Abschätzung liefert für LL32 ein Zunahme von etwa 20% der helikalen Struktur (CD-Daten) in Anwesenheit von LPS. Dies würde die beobachteten Reaktionsenthalpien zur Hälfte ausmachen. Die Betrachtung ist jedoch vorläufig und muß weiter abgesichert werden. Das Eintauchen der hydrophoben Aminosäurereste in die Kohlenwasserstoffphase als Folge der Anlagerung des Peptids im Kopfgruppenbereich, der sogenannte nichtklassische hydrophobe Effekt, ist ein ebenfalls exothermer Prozeß und würde zu einer exothermen Reaktion beitragen (Seelig et al., 1993).

Ausgehend von der Annahme, daß LL32 ausschließlich an der Aggregatoberfläche gebunden wird und nicht die äußere Lipiddoppelschicht passiert, läßt sich die negative Reaktionsentropie erklären. Die Anlagerung von LL32 vermindert die Oberflächenladungsdichte und damit die Interaktion mit weiterem LL32. Die bereits angelagerten LL32-Moleküle würden weitere LL32-Moleküle abstoßen (repulsive Ioneninteraktion) und die angelagerte Schicht würde eine große Ordnung aufweisen.

Die Messungen zum Einfluß von LL32 auf das Zetapotential stehen im Einklang mit einer primär ionischen Interaktion sowie einer Verminderung der Oberflächen-

ladungsdichte stehen. Die Zugabe von LL32 setzt das Zetapotential herab, bis schließlich eine Umladung der Oberfläche stattgefunden hat. Desweiteren wird mehr LL32 für eine Abschirmung des Zetapotentials der LPS-Aggregate benötigt je höher die Ladung des entsprechenden LPS ist (s. Bild 5-19). Dies spricht für eine Aufkonzentration von LL32 an der äußeren Schicht der LPS-Aggregate. Ein Einfluß der Anzahl der Kernzucker konnte bei den Messungen zum Zetapotential nicht ausdrücklich festgestellt werden. Dies verwundert insofern vielleicht nicht, da daß Zetapotential im wesentlichen durch die Ladungen der LPS verursacht wird.

FTIR-spektroskopische Messungen und Polarisationsmessungen an LPS-Aggregaten in An- und Abwesenheit liefern vergleichbare Aussagen: LL32 wirkt prinzipiell fluidisierend auf LPS-Aggregate wirkt. Dies kann dadurch erklärt werden, daß LL32 an der Grenzfläche zwischen der LPS-Kopfgruppe und dem hydrophoben Bereich interkaliert und so eine Aufweitung der lateralen Organisation der LPS-Moleküle bewirkt mit der Folge, daß die Acylketten mehr Bewegungsfreiheit erhalten. Weshalb sich die FTIR-spektroskopische Messung an LPS R60-Aggregaten so deutlich von den Messungen an andern LPS-Aggregaten unterscheidet bleibt unklar.

Durch die Bindung von LL32 an LPS-Aggregate kommt es zu einer bathochromen Verschiebung der CD-Banden (Bild 5-22). Bathochromie wird in der Regel bei einem Übergang von einem polaren zu einem nicht-polaren Solvenz beobachtet, mit anderen Worten die Verschiebung der Banden spricht für eine hydrophobere Umgebung, in der sich das Peptid befindet. Dies spricht für eine Position von LL32 nahe den Acylketten in den LPS-Aggregaten. Für LL37 konnte bereits nachgewiesen werden, daß es sich in Phospholipidmembranen durch Verdrängung der Moleküle in die Grenzfläche Kopfgruppe/hydrophobe Phase parallel zur Membran einlagert (Henzler Wildman et al., 2003).

Berechnungen anhand der CD-Daten ergaben eine Zunahme des  $\alpha$ -helikalen Anteils, jedoch variierten die Werte je nach Berechnungsmethode zwischen 20 – 80% Zunahme. Deshalb sind diese Werte auch nicht in den Ergebnissen aufgeführt. Die Änderung des Verhältnisses der Absorptionsbanden zueinander deutet also auf eine verstärkte Ausprägung der  $\alpha$ -helikalen Struktur des Peptids in Gegenwart von LPS hin. Die Ähnlichkeit der CD-Spektren von LL32 in Gegenwart verschiedener LPS läßt vermuten, daß sich das Peptid in allen LPS-Aggregaten in grundsätzlich ähnlichen Um-

gebungen befindet. Es ist zu vermuten, daß es sich vornehmlich in der Grenzfläche nahe der Kohlenwasserstoffketten befindet.

Die Beugungsdaten, die an LPS-Aggregaten in Ab- und Anwesenheit von LL32 beobachtet wurden, deuten auf eine starke Interaktion von LL32 mit LPS R595-Aggregaten hin, LL32 wirkt lamellarisierend. Bei LPS R60-Aggregaten ist prinzipiell der gleiche Einfluß zu erkennen, aber geringer ausgeprägt, da das reine LPS R60 bereits eine stärkere Tendenz hat lamellare Strukturen zu bilden (wegen des längeren Core-Zuckers). Die Messungen zeigen, daß LL32 die Membrankrümmung der LPS-Aggregate ändert. Die Änderung der supramolekularen Struktur der LPS-Aggregate durch LL32, von kubisch unilamellar zu multilamellaren Strukturen könnte bedeuten, daß sich die Konformation des Lipid A-Teils ändert, von einer konischen (der Platzbedarf der Acylketten ist größer als der Platz, den die Kopfgruppe beansprucht) zu einer zylindrischen Konformation, mit gleichem Platzbedarf der Acylketten und der Kopfgruppe. Die Lamellarisierung der LPS-Aggregate kann aber auch durch die Einlagerung von LL32 in den Kopfgruppenbereich der LPS-Moleküle und die damit verbundene „Aufweitung“ der Aggregatstruktur bedingt sein. Für eine dieser beiden Alternativen kann zumindest aus den Messungen nicht entschieden werden, obwohl letztere zu vermuten ist.

Die supramolekulare Struktur der LPS-Aggregate ist korreliert zu den immunstimulatorischen Eigenschaften des LPS. LPS mit einer Präferenz invertierte unilamellare LPS-Aggregate zu bilden besitzen eine große biologische Aktivität. LPS mit einer gemischt lamellar/nicht-lamellaren Struktur besitzen eine geringe biologische Aktivität. Die durch LL32 induzierte Änderung der LPS-Aggregatstrukturen von einer kubisch unilamellaren zu multilamellaren Strukturen weist auf eine Neutralisierung der biologischen Aktivität des LPS durch LL32 hin. Dies konnte in Vorversuchen in vitro an humanen Zellen bestätigt werden. Die LPS-neutralisierende Wirkung von AMP ist wünschenswert, da daß durch die Wirkung der AMP freigesetzte LPS gleichzeitig biologisch unwirksam gemacht wird und so keine Sepsis (s. 3.2) hervorrufen kann.

## **5.4 Untersuchungen an Planaren Membranen**

Gram<sup>-</sup> Bakterien besitzen eine äußere Membran, deren Lipidverteilung asymmetrisch ist bezüglich der beiden Seiten der Lipiddoppelschicht. Mit Hilfe des planaren

Rekonstitutionssystem für asymmetrische Membranen ist es möglich die äußere Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien nachzubilden und damit dem natürlichen System so nahe wie möglich zu kommen.

Die Montal-Mueller Methode (4.4.1) wurde eingesetzt, um die asymmetrisch aufgebaute äußere Membran der Gram<sup>-</sup> Bakterien nachzubauen. Dafür wurden Bilayer präpariert, die auf einer Seite aus einem der LPS der Rauhmutanten von *S. minnesota* und auf der anderen Seite aus einem Phospholipidgemisch (PL) (3.1) bestanden. Anhand elektrischer Messungen wurde der Einfluß von LL32 auf eine mögliche Permeabilisierung der asymmetrischen planaren Membranen untersucht.

Anhand elektrischer Messungen wurde der Einfluß von LL32 auf eine mögliche Permeabilisierung der asymmetrischen planaren Membranen untersucht. Durch Variation des für die Membranpräparation verwendeten LPS sollte der Effekt der Lipidmatrix auf die Wechselwirkung mit LL32 untersucht werden.

In allen Messungen wurde der gleiche Puffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C) verwendet.

*Kapazitätsmessungen.* Eine Anlagerung von membranaktiven Substanzen verändert die Membrankapazität. Aus dem zeitlichen Verlauf können Aussagen zum Prozeß der Anlagerung gemacht werden. In Bild 5-24 ist eine Beispielmessung dargestellt (gezeigt sind die direkt ermittelten Rohdaten) von einer Membran, die auf einer Seite aus LPS R4 und auf der anderen Seite aus dem Phospholipidgemisch PL besteht. Es ist nicht gezeigt, daß vor Aufzeichnung des Meßprotokolls die Membrankapazität, nach Präparation der Membran, über einen Zeitraum von 5 - 10 min kontrolliert wurde (sie war über diesen Zeitraum stabil, so daß mit der Messung begonnen werden konnte). Gezeigt ist der Stromverlauf, der Verlauf der Membrankapazität und die angelegte Spannung. Für die Prüfung der Membranstabilität wurde zunächst für jeweils 30 s eine Spannung von  $\pm 100$  mV an die Membran angelegt, um diese auf ihre „Dichtigkeit“ zu prüfen (etwa 30 bis 100 s). Bei Instabilität des Bilayers oder bei Vorliegen von Verunreinigungen kommt es infolge der anliegenden Spannung zu einem Stromfluß und das Experiment muß abgebrochen und die Membran von neuem präpariert werden.

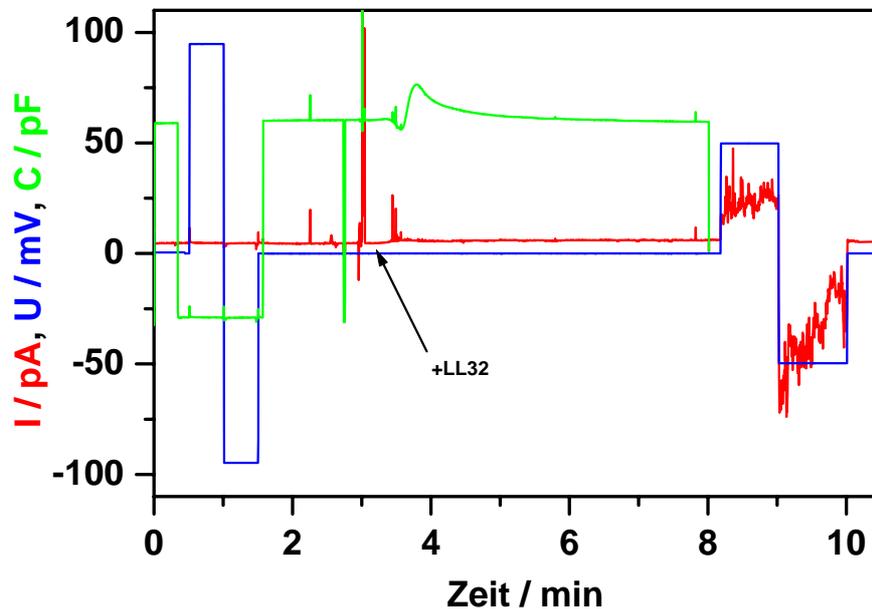


Bild 5-24: Rohdaten für eine Messung an einer LPS R4/PL-Membran. Die Kurven ergeben sich wie folgt: rot: Strom, blau: Spannung und grün: Membrankapazität. Die Zugabe von LL32 auf die LPS-Seite ist gut an der durch mechanische Erschütterung ausgelösten Störung der Strom- und Kapazitätskurven zu erkennen. Die Zugabe von LL32 führt zu einer Änderung der Membrankapazität. Das Anlegen einer Spannung führt zu einem Stromfluß durch die Membran. (Subphase: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C).

Die Elektrode auf der PL-Seite war geerdet und die auf der LPS-Seite je nach angelegter Spannung positiv oder negativ geschaltet. Im biologischen System besteht über der äußeren Membran, vom Außen- zum Innenmedium, eine Potentialdifferenz von  $\approx -20$  bis  $-30$  mV. Dies bedeutet für LPS/PL-Membranen, daß eine positive Spannung auf der LPS-Seite den Verhältnissen im biologischen System entspricht.

In der gezeigten Messung (Bild 5-24) wurden nach etwa 180 s 0,38 nmol LL32 auf der LPS-Seite zugegeben, damit betrug die LL32-Konzentration auf der LPS-Seite 0,25  $\mu$ M. Die Zugabe von LL32 verursachte eine Störung im Verlauf der Meßkurve (s. Pfeil). Deutlich ist die nach der Peptidzugabe erfolgende Änderung der Membrankapazität zu erkennen. Der zeitliche Verlauf der relativen Membrankapazität ist in Bild 5-25 dargestellt. Nach der Zugabe von LL32 kommt es infolge einer Anlagerung von

LL32 an die Membran zu einem raschen Anstieg der Membrankapazität und einem langsamen Abfall auf das Ausgangsniveau. Nachdem sich die Membrankapazität zeitlich nicht mehr änderte wurde eine Spannung angelegt (etwa 8 min), im vorliegenden Beispiel kommt es bei einer Spannung von 50 mV zu einem Stromfluß durch die Membran (Bild 5-24).

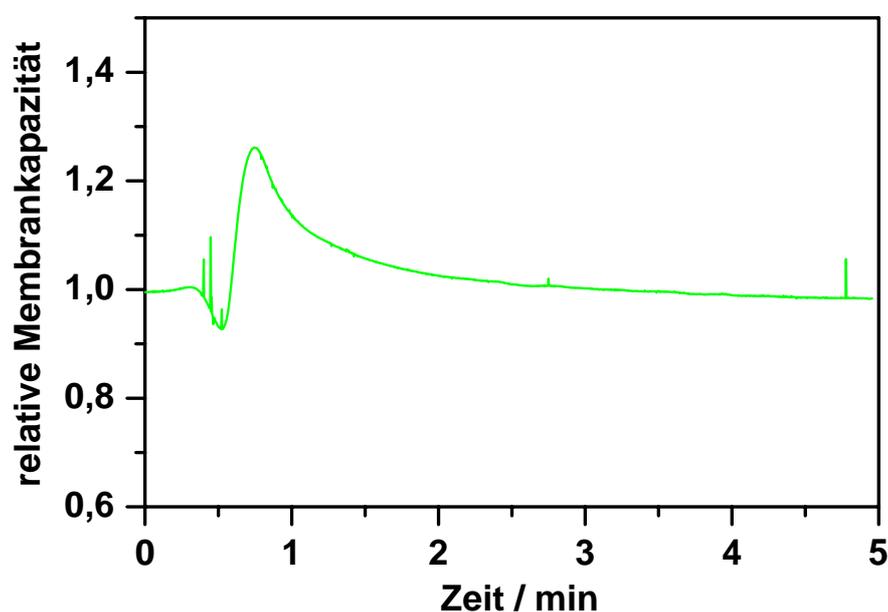


Bild 5-25: Zeitlicher Verlauf der relativen Membrankapazität  $C/C_0$  der Beispielmessung aus Bild 5-24. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden 0,38 nmol LL32 auf die LPS-Seite zugegeben. (Subphase: 100 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM HEPES, pH = 7,  $T = 37^\circ C$ ).

Untersucht wurde die Wirkung von LL32 auf asymmetrische Membranen, die mit LPS R45 von *P. mirabilis* sowie mit allen LPS von *S. minnesota* (außer LPS R345) präpariert waren. In allen Fällen kam es zu Kapazitätsänderungen. Die durch LL32 verursachten Membrankapazitätsänderungen waren jedoch sehr heterogen und ließen sich nicht auf reproduzierbare Meßgrößen reduzieren. Desweiteren kam es nach der Zugabe von LL32 auf die LPS-Seite der LPS/PL-Membranen häufig zur Ruptur der Membranen, auch ohne vorherige Anzeichen für eine Wechselwirkung zwischen LL32

und den Membranen. Erschwerend war die zum Teil geringe Membranstabilität die dazu führte, daß die Membranen häufig ohne erkennbares Muster auch ohne eine Applikation von LL32 zusammenbrachen und so die Anzahl verwertbarer Messungen stark reduzierte.

In Bild 5-26 ist die beobachtete Varianz in der Kapazitätsänderung dargestellt. Dafür sind vergleichend vier Messungen aufgetragen, die an LPS R60/PL-Membranen durchgeführt wurden. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden jeweils 0,38 nmol LL32 zur LPS-Seite zugegeben. Eindeutig ist die sehr unterschiedlich verlaufende Änderung der

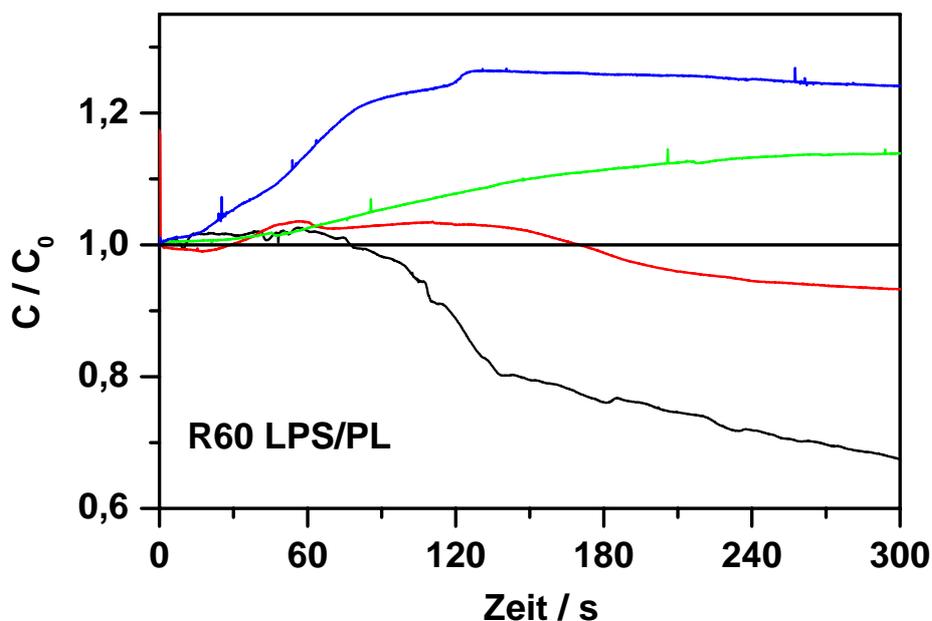


Bild 5-26: Vergleich der Änderung der relativen Kapazität für verschiedene Messungen an LPS R60/PL-Membranen. Die Messungen erfolgten unter gleichen Bedingungen, es wurde stets 0,38 nmol LL32 auf die LPS-Seite zugegeben. (Subphase: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C).

Membrankapazität zu erkennen. Ähnlich heterogen war für alle LPS/PL-Membranen der gefundene Verlauf der Membrankapazitäten nach Applikation von gleichen Mengen LL32. Für LPS R595/PL-, LPS R4/PL- sowie LPS Rz/PL-Membranen führte der

Verlauf der relativen Kapazität nach Zugabe von LL32 sowohl zu Werten oberhalb als auch unterhalb der Ausgangskapazität. Für LPS R5/PL-Membranen waren Anstiege der Kapazität im Bereich von 5 - 16% und für LPS R7/PL-Membranen Anstiege von 3 – 30% zu verzeichnen. Desweiteren wurden Kapazitätsmessungen an LPS R45/PL-Membranen durchgeführt. LPS R45 ist das Glycolipid der äußeren Membran des Gram<sup>-</sup> Stamms *P. mirabilis*, welcher resistent gegenüber der Wirkung des bei Kaninchen gefundenen Kathelizidins rCAP18 ist. Die an LPS R45/PL-Membranen durch LL32 verursachten Kapazitätsverläufe waren ebenfalls heterogen mit Werten sowohl oberhalb als auch unterhalb der Ausgangskapazität.

Die Zugabe von 0,76 nmol LL32 statt 0,38 nmol zur LPS-Seite führte dazu, daß die Membranen sofort nach dem Einbringen des Peptids platzten, jedoch wurde dies nicht systematisch für alle LPS untersucht.

Nach der Zugabe von LL32 zu den verschiedenen LPS/PL-Membranen konnte bei ausreichender Membranstabilität durch Anlegen einer Spannung (mit Werten im Bereich von 10 bis 50 mV waren diese für eine gegebene LPS/PL-Membran ebenfalls sehr heterogen) ein Stromfluß induziert werden. Der detektierte Stromfluß war, wie die Änderung der Membrankapazität, ebenfalls sehr uneinheitlich.

*Messungen mit konstanter Klemmenspannung.* Es konnte bereits gezeigt werden, daß die über der Membran anliegende Spannung einen Einfluß auf die Aktivität von CAP18-Derivaten hat (Gutsmann et al., 2001). Aus diesem Grund wurden Messungen an planaren LPS/PL-Membranen durchgeführt, über denen ein konstantes Potential von 30 mV angelegt war.

Die Zugabe von LL32 (0,25  $\mu$ M) in die Subphase auf der Seite des LPS führte zu Änderungen der Membranleitfähigkeit. Es war jedoch auch hier ein sehr unterschiedliches, schwer reproduzierbares Verhalten nach Zugabe von LL32 zu den jeweiligen LPS/PL-Membranen bezüglich der induzierten Läsionen festzustellen.

Beispielhaft ist dies an LPS R60 demonstriert, dargestellt ist eine makroskopische Stromspur (Bild 5-27). Zum Zeitpunkt  $t \approx 10$  s wurden 0,38 nmol LL32 zur LPS-Seite zugegeben. Deutlich zu erkennen ist, daß es nach etwa 30 s zu einem Anstieg des Stroms auf etwa 26 pA kommt. Der Anstieg in der Leitfähigkeit kann der Wirkung von LL32 in der Membran zugerechnet werden, und sie ist darauf zurückzuführen, daß

Ionen der Subphase die Membran passieren. Es ist vorstellbar, daß das LL32 Poren bildet bzw. weniger definierte Läsionen in der Membran verursacht. Um die Läsion näher zu charakterisieren, wurde die auf DAT-Band gespeicherte Strommessung noch einmal mit einer hohen Auflösung abgetastet und ausgewertet. Die mikroskopische Stromspur ist für den Bereich um 49 s in Bild 5-28 aufgetragen, der eingefügte Kasten zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des Leitfähigkeitssprungs nach etwa 49 s (s. gelber Rahmen). Deutlich ist zu sehen, daß es vor dem Sprung zu einer Vielzahl von sehr

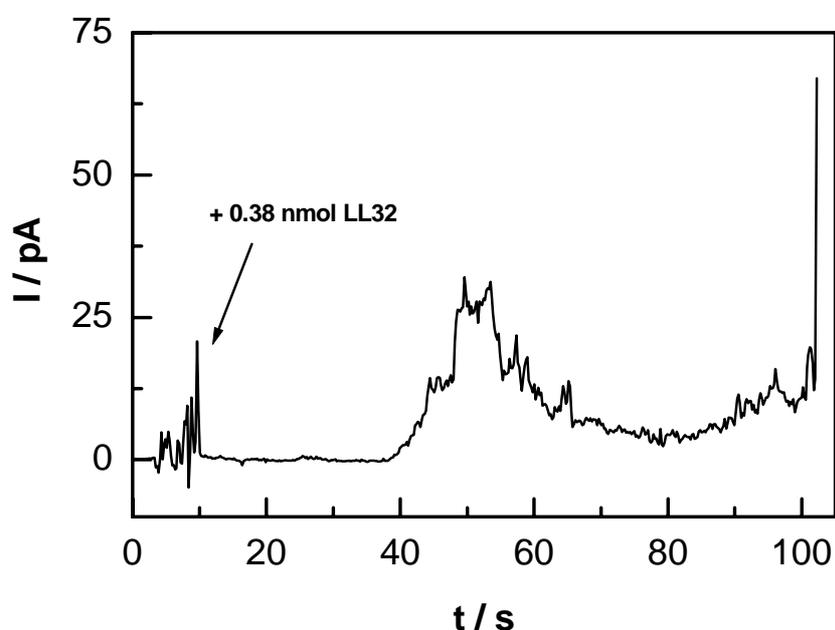


Bild 5-27: Makroskopischer Strom durch eine LPS R60/PL-Membran, die Klemmspannung betrug 30 mV. Nach etwa 10 s wurden 0,38 nmol LL32 auf die LPS-Seite zugegeben. Nach ca. 40 s kommt es zu einem Anstieg des detektierten Stromes auf über 25 pA. Der Strom fällt anschließend auf ein Niveau unter 10 pA ab und nach etwa 100 s bricht die Membran zusammen. (Subphase: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C).

schnellen Fluktuationen mit Lebensdauern unterhalb von 20 ms kommt, die 20 pA nicht überstiegen. Nach etwa 49 s springt der Strom auf einen Maximalwert von etwa 36 pA, um danach wieder abzufallen (s. makroskopische Stromspur). Der Sprung geschieht

zwar in weniger als 20 ms, dennoch kann dieses nicht als Einbau einer einzelnen Läsion/Pore gewertet werden. Es sind im erreichten Niveau nämlich weiterhin deutliche Fluktuationen zu erkennen.

Der makroskopisch beobachtete Stromverlauf ergibt sich offenkundig aus einer Überlagerung einer Vielzahl von Stromfluktuationen. Zusätzlich wurde ein Amplitudenhistogramm für den Bereich von 40 – 100 s der Messung angefertigt (Bild 5-29). Das Histogramm deutet auf mehrere bevorzugte Zustände für Defekte hin, jedoch traten diese makroskopisch beobachtbaren Niveaus zufällig auf und zeigten eine geringe Reproduzierbarkeit.

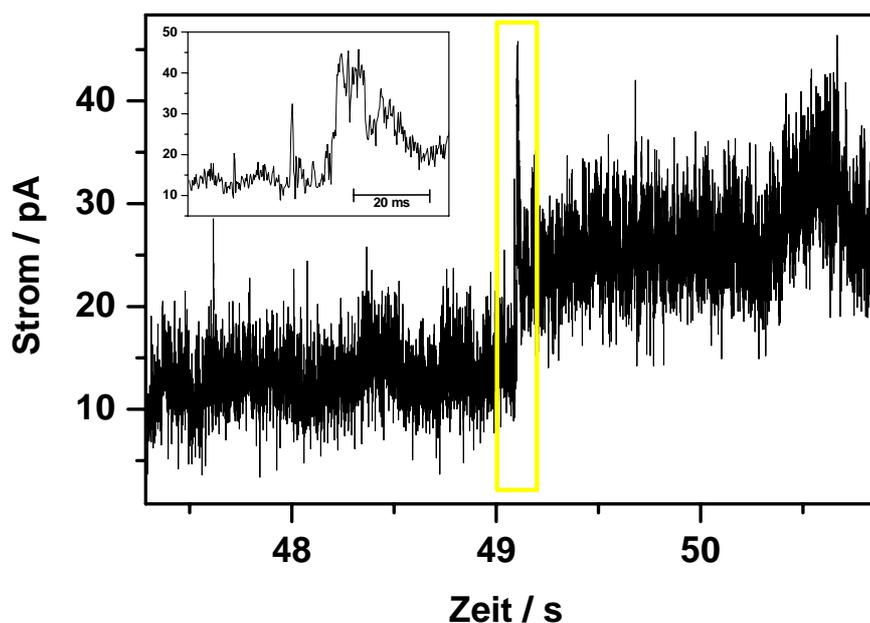


Bild 5-28: Mikroskopischer Stromverlauf für die Messung aus Bild 5-27. Der Ausschnitt zeigt den Stromverlauf um den Sprung um 49 s herum. (Subphase: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C).

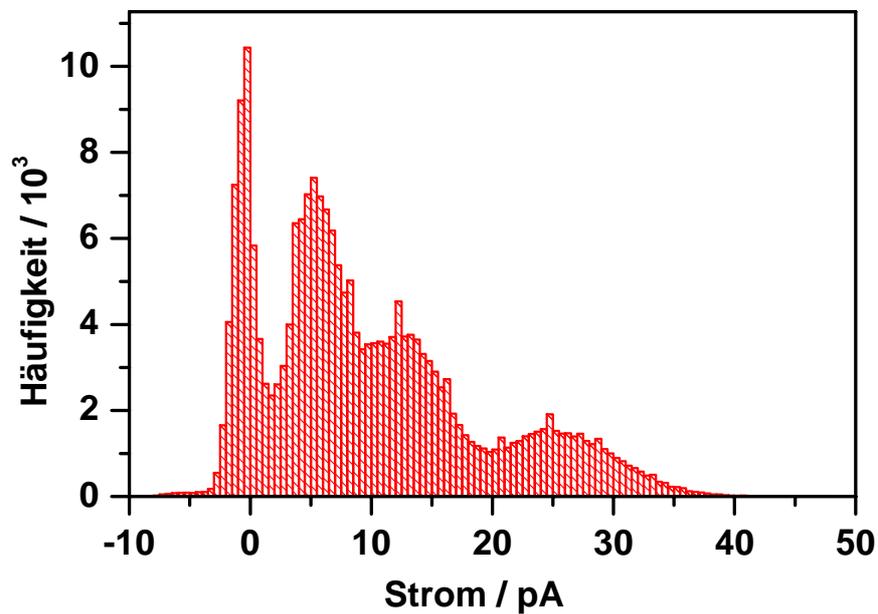


Bild 5-29: Amplitudenhistogramm der Messung aus Bild 5-27.

Zwei weitere Beispiele für Messungen an LPS R60/PL-Membran sind in Bild 5-30 gezeigt. Die Ordinatenachsen sind gleich skaliert, jedoch muß ausdrücklich auf die unterschiedliche Skalierung der beiden Abszissen hingewiesen werden. Gut zu erkennen ist der unterschiedliche Verlauf beider Messungen (auch bezüglich der bereits ausführlich dargelegten Messung aus Bild 5-27). Es wurde jeweils zum Zeitpunkt  $t = 0$  0,38 nmol LL32 zur LPS-Seite zugegeben, die Klemmenspannung betrug in beiden Experimenten 30 mV. In der rechts gezeigten Messung (B) ist deutlich zu erkennen, daß wenige Sekunden nach Peptidzugabe die Leitfähigkeit der Membran stark ansteigt, bis diese schließlich nach etwa 70 s gerissen ist. Ein anderes Bild bietet die links gezeigte Messung (A), bei der es nach etwa 2 min zu einem Leitfähigkeitssprung kommt und für mehrere Minuten ein konstantes Stromniveau gehalten wird. Dieses Verhalten wurde mehrfach beobachtet. Eindeutige Läsionsgrößen ließen sich nicht bestimmen. Die Analyse bei höherer Auflösung zeigte, daß die auftretenden Fluktuationen stets gleichartig waren und denen in Bild 5-28 gleichen. Die bisherigen Ergebnisse ermöglichen insofern keine Charakterisierung definierter Läsionen.

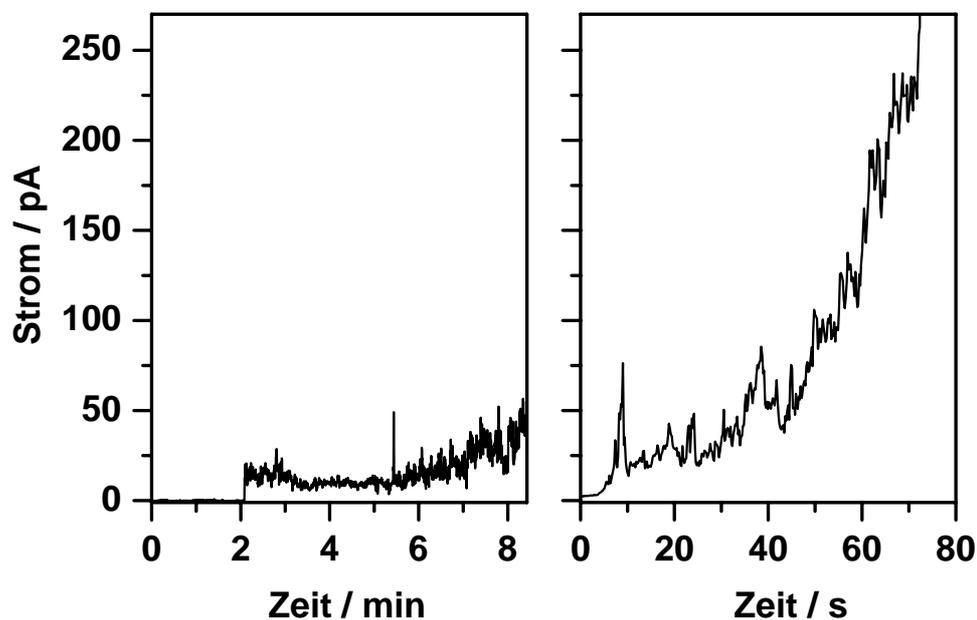


Bild 5-30: Vergleich von Stromkurven aus zwei Experimenten mit LPS R60/PL-Membranen bei konstanter Klemmspannung (30 mV) nach Zugabe von 0,38 nmol LL32 zum Zeitpunkt  $t = 0$ . (Subphase: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C).

In Bild 5-31 sind die Stromspuren verschiedener LPS/PL-Membranen vergleichend gezeigt. Gezeigt sind die Stromfluktuationen, die etwa 2 min nach Zugabe von LL32 beobachtet werden können. Wie zu erkennen ist, ist hinsichtlich des mikroskopischen Erscheinungsbildes der Fluktuationen zwischen den verschiedenen LPS/PL-Membranen kein Unterschied festzustellen. Wie bereits an LPS R60/PL-Membranen demonstriert, waren die makroskopischen Stromverläufe recht heterogen. Es traten verschiedene makroskopische Niveaus geringer Reproduzierbarkeit auf.

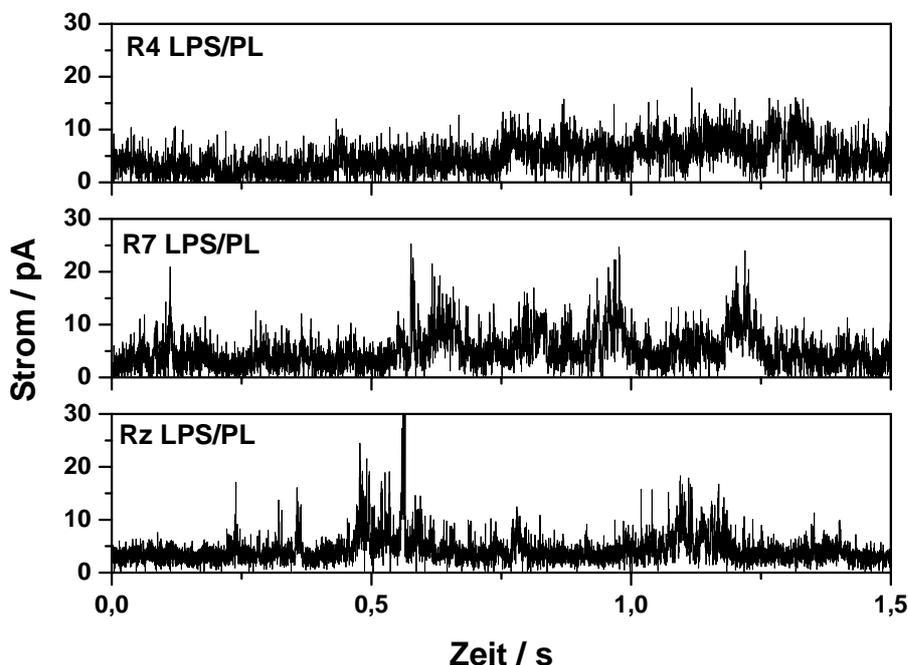


Bild 5-31: Vergleich der durch LL32 induzierten Stromfluktuationen in verschiedenen LPS/PL-Membranen. Das LL32 wurde stets auf der LPS-Seite zugegeben. (0,38 nmol LL32,  $U_{\text{Klemm}} = 30$  mV, Subphase: 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, pH = 7, T = 37°C).

Die Zugabe von LL32 zur LPS-Seite einer LPS/PL-Membran führt zu einer Änderung der Membrankapazität und zeigt damit eine Interaktion zwischen LL32 und der Membran an. Die beobachteten Änderungen der Membrankapazität sind heterogen. Die Membranstabilität wird durch die Zugabe von LL32 deutlich herabgesetzt. Bei einer Klemmspannung von 30 mV führt LL32 in allen LPS/PL-Membranen, die mit Rauhmutanten LPS von *S. minnesota* präpariert wurden zur Induktion von Läsionen. Membranen die mit dem LPS der Spezies *P. mirabilis* präpariert wurden von LL32 ebenfalls permeabilisiert. Der Stamm *P. mirabilis* ist R45 gegenüber der Wirkung mancher AMP, wie z. B. rCAP18 (dem Kathelizidin, welches bei Kaninchen gefunden wird). Die Resistenz des Stammes *P. mirabilis* R45 gegen rCAP18 findet seine Entsprechung in der Tatsache, daß rCAP18 auch keine Läsionen im Rekonstitutions-system der planaren Membran an LPS R45/PL-Membranen induziert.

Hinsichtlich Läsionsgröße und Lebensdauer waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen LPS/PL-Membranen festzustellen. Die Läsionen treten statistisch auf und können sich zu einem makroskopischen über einen längeren Zeitraum stabilen Zustand überlagern.

#### 5.4.1 Diskussion

Der Wechselwirkung zwischen LL32 und LPS geht die Zugabe des Peptids voraus, welches dann zur Membran diffundieren muß. Die Diffusion bewirkt eine zeitliche und örtliche Variation der Konzentration des Peptids.

Unabhängig von der chemischen Struktur des LPS war LL32 in der Lage, mit allen diesen Membranen zu interagieren und Läsionen zu induzieren. Es ist in aller Deutlichkeit hervorzuheben, daß dies im Rahmen der gängigen Vorstellungen zum Wirkmechanismus der CAP18-Peptide (Gutsmann et al., 2001) den Befund erklärt, daß sich LL32 in den Bakterientests gegenüber allen getesteten Stämmen als aktiv erweist. Die MHK-Werte der *S. minnesota* Rauhmutanten unterscheiden sich zwischen sensitiven und weniger sensitiven Mutanten um knapp eine Größenordnung. Darin ist eine der Ursache dafür zu sehen, daß sich das Auffinden reproduzierbarer Unterschiede in den Meßgrößen als problematisch erwies. Eine Überschlagsrechnung soll dies erläutern. In den Mikrosuszeptibilitätstests werden in einem Versuch jeweils  $10^5$  Bakterien absolut eingestetzt (pro „Napf“, s. 4.1.2). Die äußere Form der *S. minnesota* kann als zylindrisch mit Halbkugeln als Abschluß angenommen werden. Dies ist gerechtfertigt, da es sich um stäbchenförmige Bakterien handelt. Die Länge des Zylindermantels eines Bakteriums beträgt durchschnittlich  $3\ \mu\text{m}$ , der Durchmesser  $1\ \mu\text{m}$  (Boehling, 2004). Damit ergibt sich die Oberfläche eines Bakteriums zu rund  $13\ \mu\text{m}^2$ , bei einer Bakterienzahl von  $10^5$  ergibt sich somit eine Fläche von rund  $1,3 \cdot 10^6\ \mu\text{m}^2$ . Der Durchmesser einer planaren asymmetrischen Membran beträgt  $100\ \mu\text{m}$ , so daß die Membran eine Fläche von etwa  $7900\ \mu\text{m}^2$  hat. Der MHK-Wert aus den Bakterientests wird folglich über Integration einer Fläche erhalten, die um zwei Zehnerpotenzen größer ist als die Fläche bei den Experimenten mit planaren Membranen. Die MHK-Werte wurden überdies aus mindestens sieben unabhängigen Versuchen bestimmt. Demzufolge müßte man eine große Anzahl an Messungen an den planaren Membranen durchführen, um eine vergleichbare Statistik zu erhalten und den relativ geringen

Unterschied in den MHK-Werten aufzulösen. Weiter muß bedacht werden, daß die planaren asymmetrischen Membranen per se relativ instabil, weshalb Experimente an planaren Membranen sehr zeitaufwendig sind, da eine Vielzahl von Fehlversuchen der erfolgreichen Präparation einer Membran vorangehen. Zusätzlich setzt LL32 die Stabilität der Membranen noch deutlich herab.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die Tatsache, daß sich LL32 im Bakterientest als aktiv gegenüber der Spezies *P. mirabilis* R45 erwiesen hat und an planaren asymmetrischen LPS R45/PL-Membranen durch die Induktion von Läsionen ein membranvermittelter Mechanismus bestätigt werden konnte. Das bei Kaninchen gefundene Pendant, rCAP18<sub>106-137</sub>, erweist sich nämlich als inaktiv gegenüber dieser Spezies und der entsprechend rekonstituierten planaren Membran, was auf das Vorhandensein einer Substitution mit einem positiv geladenen Zucker zurückgeführt werden konnte (Gutsmann et al., 1999). Dies ist ein gutes Beispiel dafür, daß trotz Ähnlichkeit beider Peptide bereits geringe Variationen der Struktur des Peptides und damit peptidspezifischer Parameter zu einer Änderung der antibakteriellen Aktivität führen können.

## 6 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems praktisch aller Organismen. Sie repräsentieren eine erste Schranke, die von pathogenen Keimen überwunden werden muß. Erstes Ziel der AMP ist die Zellmembran des invasiven Organismus. Im Falle Gram<sup>-</sup> Bakterien wechselwirken die AMP zuerst mit der äußeren Membran (s. 3.2). Diese ist eine asymmetrische Lipiddoppelschicht: die Innenseite besteht aus einem Phospholipidgemisch, die Außenseite (dem Extrazellularraum zugewandte Seite) besteht aus Lipopolysaccharid (LPS). Als Bestandteil der äußeren Membran hat LPS natürlich auch einen Einfluß auf das Permeationsvermögen der AMP und damit eine zusätzliche Schutzfunktion. Für die Aufklärung der Wirkmechanismen der AMP ist es wichtig zu wissen welchen Einfluß die LPS-Struktur auf die Wechselwirkung mit AMP hat.

Ziel der vorliegenden Arbeit war den Einfluß von LPS unterschiedlichen Chemotyps, insbesondere mit Unterschieden in der Struktur des Kernoligosaccharids, auf die Wechselwirkung mit dem antimikrobiellen Peptid LL32 zu untersuchen. Die Peptid/LPS-Wechselwirkungen wurden mit verschiedenen Membranmodellssystemen (s. Kapitel 4) charakterisiert, mit dem Ziel die folgenden Fragen zu beantworten:

- Können biophysikalische Meßparameter mit LPS-Strukturparametern korreliert werden?
- Läßt sich eine Korrelation zwischen biologischer Aktivität und den biophysikalischen Eigenschaften der LPS herstellen?
- Ist die Lipidzusammensetzung der äußeren Membran Gram<sup>-</sup> Bakterien entscheidend für die Sensitivität respektive Resistenz gegenüber AMP, insbesondere gegenüber der Wirkung von LL32?

Bereits frühere Untersuchungen an Rauhmutanten verschiedener Gram<sup>-</sup> Stämme (*S. typhimurium*, *S. minnesota*, *E. coli*), kamen zu dem grundsätzlichen Ergebnis, daß die Sensitivität der Bakterien gegenüber AMP progressiv mit dem Verlust der Kernzucker

steigt (Rest et al., 1977; Rest et al., 1978; Hodinka und Modrzakowski, 1983). In Untersuchungen neueren Datums wurde neben der biologischen Aktivität schließlich auch die Wechselwirkung der Peptide mit LPS untersucht. So zeigten Rana et al. in biologischen Tests eine differentielle Aktivität von Magainin, einem Peptid aus der Haut des Klauenfrosch, gegenüber verschiedenen Rauhmutanten von *S. typhimurium* (Rana et al., 1991), wobei die Aktivität gegenüber den Rauhmutanten mit längerem Zucker herabgesetzt war. Aus dem Einfluß, den Magainin auf die Fluidität der Acylketten der isolierten LPS hat, leiteten Rana et al. ab, daß die Sensitivität von *S. typhimurium* gegen Magainin mit zunehmender LPS-Zuckerlänge und abnehmender negativer Ladung des LPS abnimmt. Einschränkend ist hierzu allerdings anzumerken, daß keine klare chemische Strukturanalyse der verwendeten LPS vorlag. Einen ähnlichen Zusammenhang vermuten Andrá et al. für die Aktivität von NK-2, einem Fragment von NK-Lysin, einem Peptid aus Abwehrzellen von Schweinen (Andrá et al., 2004). Die Autoren konnten für die Rauhmutanten R595 und R60 sowie die Wildtypform von *S. minnesota* in biologischen Tests eine differentielle Suszeptibilität gegenüber der Wirkung von NK-2 nachweisen. Sie untersuchten ferner die Interaktion von NK-2 mit den isolierten LPS der Stämme und leiten ebenfalls das Ergebnis ab, daß die Anzahl der Kernzucker sowie die Ladung des LPS ursächlich für die beobachteten bakteriellen Suszeptibilitäten sind. Gutschmann et al. (1999) konnten einen Einfluß der LPS-Struktur auf die Wirkungsweise von rCAP18 (ein bei Kaninchen gefundenes Kathelizidin, welches eine große Ähnlichkeit zum humanen CAP18 aufweist) nachweisen. Die Autoren führten antibakterielle Tests mit den Tiefrauhmutanten von *E. coli*, *P. mirabilis* und *S. minnesota* durch. Untersuchungen an den nachgebildeten äußeren Membranen der Stämme mit dem Rekonstitutionssystem der planaren Membranen zeigten, daß die Resistenz des Stamms *P. mirabilis* gegenüber rCAB18 auf Substitutionen mit einer positiv geladenen Aminoarabinose am Lipid A-Teil und an einem der beiden Kdo-Monosaccharide zurückzuführen ist.

LL32 ist antibakteriell aktiv gegen die *S. minnesota* Stämme (R595, R4, R7, Rz, R5, R345 und S-Form) und gegen den Stamm *P. mirabilis* R45. Die Stämme konnten bezüglich ihrer Suszeptibilität gegenüber der Wirkung von LL32 in zwei Gruppen eingeteilt werden:  $R595 \approx R4 \approx R7 \approx Rz \approx R5 > R345 \approx R60 \approx S\text{-Form} \approx R45$  (Bild

5-4). Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) zwischen suszeptiblen und weniger suszeptiblen Stämmen unterscheiden sich um etwa eine Größenordnung. LPS R45 von *P. mirabilis* unterscheidet sich von LPS R595 von *S. minnesota* nur durch Substitution mit einer positiv geladenen Aminoarabinose am Lipid A-Teil sowie am ersten Kdo. Es liegt nahe zu vermuten, daß die Substitution mit Aminoarabinose für die geringere Suszeptibilität von *P. mirabilis* R45 gegenüber LL32 im Vergleich zu *S. minnesota* R595 verantwortlich ist.

Das LPS der *S. minnesota* Rauhmutanten R345 und R60 sowie des Wildtyps (S-Form) weisen gegenüber den Stämmen R595, R4, R7, Rz und R5 eine größere Zahl an Kernzuckern und zusätzlich die Substitution mit Zuckern in der Seitenkette auf.

Aus dem Vergleich der Suszeptibilitäten der Rauhmutanten von *S. minnesota* gegenüber der Aktivität von LL32 einerseits (Bild 5-4) und PMB andererseits (Bild 5-6) ergab sich, daß LL32 eine geringere antibakterielle Aktivität als PMB besitzt. Aus der Auftragung der MHK-Werte für LL32 und PMB gegen den Parameter Ladung/Anzahl der Kernzucker kann auf einen Einfluß der Ladung und der Anzahl der Zucker des LPS auf die antibakterielle Aktivität von LL32 und PMB geschlossen werden. Grundsätzlich gibt es eine Tendenz zu höheren MHK-Werten mit steigender Zuckerzahl und steigender negativen Ladung. Eine Substitution am Lipid A-Teil mit einer positiv geladenen Aminoarabinose führt dagegen auch zu höheren MHK-Werten.

Die Untersuchungen am Rekonstitutionssystem der planaren asymmetrischen Membran ergaben, daß die Zugabe von LL32 auf die LPS-Seite der rekonstituierten LPS/PL-Membranen zu einer Änderung der Membrankapazität führte (s. 5.4) unabhängig vom LPS-Chemotyp. Die Änderung der Membrankapazität kann auf die Anlagerung von LL32 an die Membran zurückgeführt werden. In allen rekonstituierten LPS/PL-Membranen wurde zudem durch die Zugabe von LL32 auf die LPS-Seite auch eine Läsionsbildung in der Membran induziert (s. 5.4).

Im Rahmen der durchgeführten Messungen waren keine Unterschiede festzustellen bezüglich der durch LL32 hervorgerufenen Änderungen der Membrankapazität in den verschiedenen rekonstituierten LPS/PL-Membranen der jeweiligen Stämme sowie bezüglich der durch LL32 in den LPS/PL-Membranen induzierten Läsionen.

Die Ausbildung von Läsionen steht im Einklang mit Modellvorstellungen zum Wirkmechanismus vieler AMP („self promoted uptake“, Hancock, 1984). Auch LL32 permeabilisiert die äußere Membran durch Bildung ausreichend großer Läsionen und ermöglicht so den Durchtritt weiterer LL32-Moleküle. Durch die äußere Membran hindurchgetreten, entfaltet LL32 vermutlich an der Zytoplasmamembran seine eigentliche antibakterielle Wirkung. Die in allen rekonstituierten LPS/PL-Membranen beobachtete Läsionsbildung passt zu der Beobachtung, daß alle getesteten Gram<sup>-</sup> Bakterien abgetötet werden.

Die Untersuchungen an der Filmwaage zum Einbau von LL32 in die LPS-Monolayer (s. 5.2.1) zeigen ganz generell eine Wechselwirkung zwischen LL32 und den verschiedenen *S. minnesota* Rauhmутanten-LPS an. Die durch LL32 induzierten Flächenänderungen (s. Bild 5-10) in den jeweiligen LPS-Monolayern weisen auf eine Beteiligung der Ladung als auch der Anzahl der Kernzucker hin. Mit zunehmender Anzahl der Kernzucker des LPS ist der Platzbedarf von LL32 im LPS-Monolayer geringer. Dies kann auf eine potentiell größere Zahl an Bindungsmöglichkeiten für LL32 in einem längeren Zucker zurückgeführt werden, so daß letztlich weniger LL32-Moleküle in die Grenzfläche interkalieren. Mit steigender Ladung des LPS wächst der durch LL32 im LPS-Monolayer eingenommene Platzbedarf, was daran liegt, daß die größere LPS-Ladung zu einer verstärkten Attraktion von LL32 aus der Subphase an den Monolayer führt.

Die Interkalation von LL32 in LPS-Monolayer deckt sich mit der Tatsache, daß LL32 mit rekonstituierten LPS/PL-Membranen interagiert und in diesen auch Läsionen induziert.

Desweiteren führt die Anwesenheit von LL32 zu einer Fluidisierung der Acylketten der LPS-Aggregate (s. 5.3.3), dabei erhalten die Acylketten mehr Bewegungsmöglichkeiten, was sich mit einem Einbau von LL32 in die LPS-Aggregate deckt, infolge dessen es zu einer Aufweitung der Aggregatstruktur kommt. Sowohl Läsionsbildung in LPS/PL-Bilayern als auch Interkalation in LPS-Monolayer und Fluidisierung der LPS-Aggregate sprechen für den Einbau von LL32 und eine Verdrängung der LPS-Moleküle. Die Abhängigkeit der MHK-Werte von der Ladung und der Anzahl des

Kernzucker des LPS spiegelt sich in dem Einbau von LL32 in die LPS-Monolayer wider, wie oben dargelegt.

Die durch LL32 in LPS/PL-Monolayer verursachten Flächenänderungen sind vergleichbar zu in der Literatur veröffentlichten Daten von anderen Kathelizidinen (Gutsmann et al., 2001).

Die Ergebnisse aus den Experimenten zur Verdrängung von Calcium durch LL32 aus den LPS-Monolayern scheinen im Widerspruch zu den Einbaumessungen von LL32 in LPS-Monolayer zu stehen. Während bei den Messungen zur Interkalation von LL32 in Monolayer ein Einfluß sowohl der Ladung als auch der Anzahl der Kernzucker des LPS zu beobachten war, zeigte sich in den Experimenten zur Calciumverdrängung weder ein Einfluß der Ladung noch ein Einfluß der Anzahl der Zucker. Die Menge LL32, die für eine 50%ige Verdrängung der Calciumionen aus dem LPS-Monolayer benötigt wurde war für alle verwendeten *S. minnesota* Rauhmутanten-LPS praktisch identisch (5.2.2). Jedoch ist zu berücksichtigen, daß die Messungen zur Calciumverdrängung an einem Versuchsaufbau gemessen wurden, der keine Flächenänderung des LPS-Monolayers zuließ. Daher wurde bei den Verdrängungsexperimenten ein Startwert von 10 mN/m für den lateralen Druck gewählt, um bei den Verdrängungsexperimenten die Interaktion von LL32 mit den LPS-Monolayern nicht durch einen zu hohen Anstieg des Lateraldrucks zu behindern. Im Unterschied dazu wurde der Einbau von LL32 in die LPS-Monolayer bei einem konstanten lateralen Druck von 25 mN/m gemessen, so daß sich die Ergebnisse beider Messmethoden nicht notwendigerweise vergleichbar sind.

Interessant ist das Ergebnis, daß der durch LL32 verursachte Anstieg des lateralen Drucks am Ende der Verdrängungsexperimente praktisch unabhängig vom verwendeten LPS gleich war. Bucki et al. (2004) berichteten, daß die Zugabe von LL37, einem 5 Aminosäuren längeren Peptid als LL32, unter Monolayer, die aus verschiedenen geladenen und ungeladenen Phospholipiden präpariert wurden, auch stets zum gleichen Druckanstieg führte. Weiterhin berichten die Autoren, daß der durch LL37 verursachte Druckanstieg in den Monolayern abhängig war von der Peptidmenge und dem lateralen Druck des Monolayers, bei 40 mN/m verursachte LL37 keinen Anstieg des lateralen Drucks.

Die Wechselwirkung zwischen LL32 und LPS-Aggregaten der verschiedenen *S. minnesota* Rauhmутanten ist exotherm in der flüssig-kristallinen Phase (s. Tabelle 5-2). Die auf das Peptid bezogene molare Reaktionsenthalpie für diese Wechselwirkung war für alle LPS praktisch gleich groß (**Bild 5-17**). Die Molekularität  $n$ , also die pro LPS gebundenen Moleküle LL32, nimmt mit der Ladung sowie der Anzahl der Kernzucker des LPS zu (s. Bild 5-16). Desweiteren wurde eine Abhängigkeit der Molekularität  $n$  von dem LPS-Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker gefunden. Mit einem abnehmenden Wert des Quotienten Ladung/Anzahl Kernzucker steigt  $n$ . Die Entropie der Wechselwirkung zwischen LL32 und den LPS-Aggregaten der verschiedenen *S. minnesota* Rauhmутanten war in allen Fällen negativ (s. Bild 5-17), was einer Zunahme der Ordnung während der Reaktion entspricht. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die bereits an die LPS-Aggregate angelagerten LL32-Moleküle die weitere Anlagerung von LL32 behindern.

Die Molekularität  $n$  weist ebenso wie die MHK-Werte eine Abhängigkeit von der Ladung und der Anzahl der Kernzucker des LPS auf. Einer größeren Molekularität  $n$  entspricht somit eine höhere MHK. Das heißt die Zucker stellen eine zusätzliche protektive Barriere der Bakterien gegen die Peptide dar (Andrä et al., 2004).

Die für eine Abschirmung des Zetapotentials der LPS-Aggregate benötigten Mengen an LL32 zeigen ebenfalls eine deutliche Ladungsabhängigkeit. Mit steigender Ladung des LPS steigt auch die Menge an LL32, die benötigt wird, um eine Abschirmung zu erreichen. Ein Einfluß der Zuckeranteils war in den Messungen zum Zetapotential nicht festzustellen. Da das Zetapotential nicht gleich dem Oberflächenpotential der LPS-Aggregate ist, sondern einem Potential in einem bestimmten Abstand von der Oberfläche entspricht, kann auch nicht unbedingt ein Einfluß der Zuckerstruktur auf die zur Abschirmung benötigte LL32-Menge erwartet werden. Hier kann somit davon ausgegangen werden, daß die Messungen zum Zetapotential rein durch Ladungswechselwirkung bestimmt werden. Die Anlagerung von LL32 an der Oberfläche führt zu einer Reduktion des in die Lösung präsentierten elektrostatischen Potentials und damit auch des Zetapotentials.

Sowohl die Ergebnisse aus den kalorimetrischen Messungen (Molekularität, s. oben) als auch die Messungen zum Zetapotential zeigen eine Abhängigkeit der Interaktion zwischen LL32 und den LPS-Aggregaten von der Ladung des LPS. Ferner ist auch der Einbau von LL32 in die LPS-Monolayer von der Ladung des LPS abhängig. Die biologischen Daten zeigen ebenfalls eine, wenn auch nicht so stark ausgeprägte Abhängigkeit von der Ladung des LPS. Die zentrale Rolle der Ladungen für die Wechselwirkung zwischen AMP und Membranen ist für viele andere Peptide beschrieben (Papo und Shai, 2003).

Die beobachteten CD-Spektren des Peptids LL32 in Anwesenheit von *S. minnesota* LPS-Aggregaten (s. Bild 5-22) ergeben sich vermutlich aus einer Mittelung über die verschiedenen Sekundärstrukturen, die LL32 im System annimmt: es sind dies die Strukturen von „freiem“ LL32 in der Subphase und die Strukturen, die LL32 an der Oberfläche der LPS-Aggregate annimmt. Beim Vergleich der CD-Spektren von LL32 in Anwesenheit verschiedener LPS Chemotypen fällt auf, daß diese sich kaum voneinander unterscheiden. In Anwesenheit von LPS R7- und LPS R60-Aggregaten sind die CD-Spektren von LL32 praktisch identisch, während in Anwesenheit von LPS R595-Aggregaten im CD-Spektrum des Peptids eine etwas ausgeprägtere Bande bei ~210 nm zu beobachten ist. Aus den CD-Spektren sowie den anderen Messdaten geht die Position von LL32 bezüglich der LPS-Aggregatoberfläche nicht eindeutig hervor. Für eine Nähe zur hydrophoben Kohlenwasserstoffphase spricht die bathochrome Verschiebung der Absorptionsbanden sowie der Einbau von LL32 in LPS-Monolayer. Die aus den kalorimetrischen Messungen gewonnenen Molekularitäten für die Interaktion zwischen LL32 und LPS-Aggregaten lassen vermuten, daß im Vergleich zu LPS R7- und LPS R60-Aggregaten der Anteil der nicht an Aggregate gebundenen LL32-Moleküle für LPS R595-Aggregate größer ist und so die ausgeprägtere Bande bei ~210 nm im CD-Spektrum verursacht. Gebunden an LPS zeigt LL32, unabhängig vom jeweiligen Chemotyp, stets ein vergleichbares CD-Spektrum. und befindet sich somit prinzipiell in den Aggregaten verschiedener LPS Chemotypen in vergleichbarer Umgebungen.

Für eine Position von LL32 in der Grenzschicht, zwischen den Lipidmolekülen, mit Kontakt zur hydrophoben Phase spricht ferner eine Studie mit LL37 (Henzler Wildman et al., 2003). Die Autoren konnten zeigen, daß sich LL37 in Gegenwart von Phospholipiden nahe der hydrophoben Kohlenwasserstoffphase aufhält, wobei die hydrophoben Aminosäurereste in die Kohlenwasserstoffphase eintauchen und die hydrophile Molekülseite Kontakt zu den polaren bzw. geladenen Lipidkopfgruppen hat.

Die kubisch unilamellare Struktur der LPS-Aggregate von LPS R595 und LPS R60 änderte sich in Anwesenheit von LL32 zu einer multilamellaren Struktur (s. 5.3.5). In der kubisch unilamellaren Phase ist die Molekülkonformation des LPS (bzw. des Lipid A-Teils) konisch (s. 4.3.7), mit unterschiedlichem Platzbedarf der Kopfgruppe und der Acylketten. Die Lamellarisierung der LPS-Aggregate durch LL32 spricht dafür, daß sich das Peptid in die Aggregatstruktur einbaut. Dabei kommt es zu einer Aufweitung der LPS-Aggregate im Kopfgruppenbereich und die Membrankrümmung ändert sich. Den entstehenden LPS (Lipid A)/Peptid-Komplexen kann dabei eine effektive zylindrische Molekülkonformation zugeschrieben werden, aufgrund derer es zu der Lamellarisierung kommt. Die Röntgenbeugungsdaten decken sich mit den Einbaumessungen an LPS-Monolayern (s. 5.2.1), die zeigen, daß LL32 in die Monolayer interkaliert und dabei die LPS-Moleküle verdrängt. Der Einfluß von LL32 auf die Fluidität der LPS-Aggregate (s. 5.3.3) spricht ebenfalls für einen Einbau von LL32 in die LPS-Aggregate und eine Aufweitung der Aggregatstruktur. Auch die durch LL32 induzierte Läsionsbildung in asymmetrischen planaren LPS/PL-Membranen (s. 5.4) bedeutet, daß LL32 beim Einbau in den Bilayer die LPS-Moleküle verdrängt. Überdies decken sich die Ergebnisse zum Einfluss von LL32 auf die LPS-Aggregatstruktur mit Befunden für LL37. Henzler Wildman et al. (2003) haben nachgewiesen, daß die Anwesenheit von LL37 zu einer Änderung der Krümmung der Membranoberfläche von Lipidvesikeln führt. Ferner bedeutet die Lamellarisierung der LPS-Aggregate durch LL32, daß die immunstimulatorischen Eigenschaften des LPS inhibiert werden (s. 3.3.2). Dies ist in Übereinstimmung mit der beobachteten Lamellarisierung von LPS-Aggregaten durch andere Peptide, wie z. B. Lactoferrin (Brandenburg et al., 2001), PMB (Brandenburg et al., 2002) oder NK-2 (Andrä et al.,

2004), und der daraus resultierenden Inhibierung der Immunzellstimulation durch das LPS.

Im Folgenden wird ein Modell der LL32/LPS Wechselwirkung vorgestellt, daß im Einklang mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten steht (Bild 6-1).

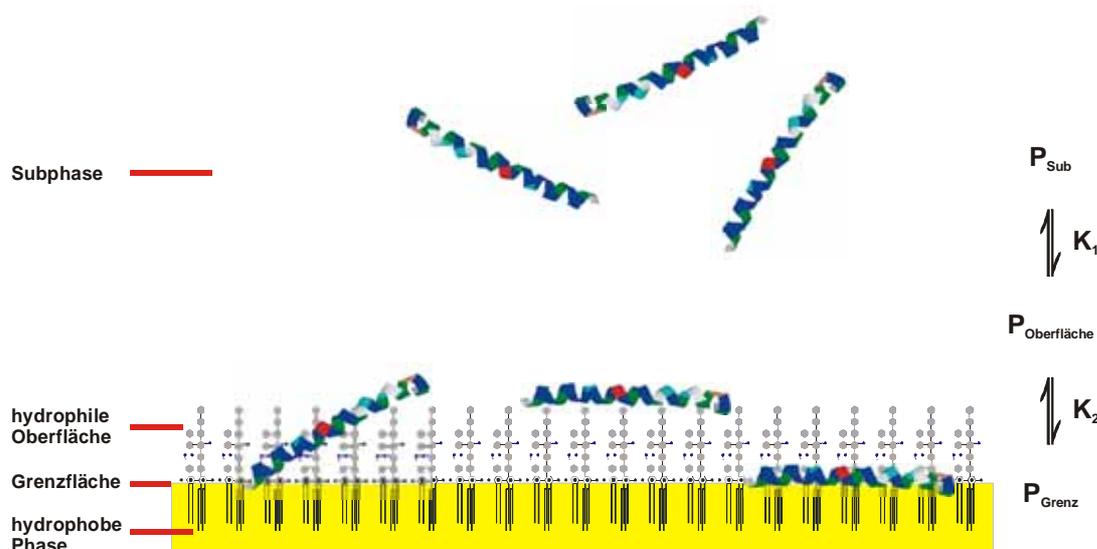


Bild 6-1: Modell zur Wechselwirkung des Peptids LL32 mit einer LPS-Membranoberfläche.

Es können verschiedene Bereiche unterschieden werden: die Volumenphase (Subphase), eine hydrophile Oberflächenschicht, deren Ausdehnung im wesentlichen durch die Länge des LPS-Kernoligosaccharids bestimmt wird. Es folgt die Grenzfläche, die die hydrophobe Phase der Acylketten von der hydrophilen Phase der Kernzucker abtrennt. Die genannten Acylketten bilden den vierten Bereich. Im Rahmen dieses Modells findet die Wechselwirkung von LL32 mit LPS-Membranen im wesentlichen in zwei Schritten statt. Zunächst erfolgt eine Anlagerung (Anreicherung) von LL32 an die hydrophile Oberfläche, was im Prinzip einer Adsorption an eine Oberfläche entspricht. Die Adsorption wird durch ein erstes Gleichgewicht charakterisiert und ist abhängig von der Ladung (Attraktion), die die Oberfläche in die Subphase präsentiert und damit von der Ladung des LPS. In einem zweiten Schritt lagert sich LL32 dergestalt in die

Grenzfläche ein, daß hydrophobe Aminosäurereste in die hydrophobe Phase eintauchen (sogenannter nichtklassischer hydrophober Effekt). Der zweite Schritt wird durch die Grenzflächenaktivität des LL32 bestimmt sowie der Struktur des Kernoligosaccharids der LPS und kann durch ein zweites Gleichgewicht charakterisiert werden.

Aus den CD-Spektren ergibt sich für LL32 eine  $\alpha$ -helikale Struktur, die in Anwesenheit von LPS-Aggregaten etwas stärker ausgeprägter scheint. Nimmt man foglich für LL32 eine ideale  $\alpha$ -helikale Struktur an, so ergibt sich die Länge des Peptids zu 4,8 nm (0,54 nm/3,6 Aminosäuren). Für LPS kann die Länge aus den lamellaren Periodizitäten der LPS-Aggregate abgeschätzt werden. Für LPS-Aggregate wurden Periodizitäten von 6 bis 8,8 nm bestimmt (Seydel et al., 1993b). Unter Vernachlässigung der Wasserschicht entspricht die Ausdehnung einer Seite der Lipiddoppelschicht in etwa der halben lamellaren Periodizität. Nimmt man ferner die Länge der Acylketten zu 2 nm an, erhält man für die Längen der Kernzucker der LPS Werte von 1 bis 2,4 nm (entsprechend LPS R595 und LPS R60). Das Peptid LL32 hat also ungefähr die zweifache Länge der Kernzucker der LPS. Dies bedeutet, daß bereits eine geringe Neigung von LL32 gegenüber der Membranparallelen ausreicht, um die hydrophile Schicht (Kernzucker der LPS) zu durchspannen. Berücksichtigt man weiter, daß das N-terminale Ende von LL32 durch die hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren einen hydrophoben „Finger“ bildet, so ist durchaus vorstellbar, daß dieses Ende z. T. Kontakt zur hydrophoben Phase hat, während sich ein großer Teil des Moleküls von LL32 noch an der Oberfläche befindet. LL32 wird sich also nicht nur ausschließlich an der Oberfläche oder ausschließlich in der Grenzschicht finden.

Es kann daher wie folgt zusammengefasst werden. Es wurde gezeigt, daß die als Modellstämme dienenden Rauhmutanten von *S. minnesota* eine unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber der Wirkung von LL32 aufweisen. Weiter wurde eine Abhängigkeit der MHK-Werte von LL32 gegen die *S. minnesota* Rauhmutanten von dem Parameter Ladung/Anzahl der Kernzucker des LPS gefunden. Daraus und aus früheren Untersuchungen folgte die Interpretation, daß für den Verlauf der Suszeptibilitäten der Modellstämme deren LPS-Struktur verantwortlich ist.

Es wurden biophysikalische Untersuchungen zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen LL32 und den isolierten LPS der Modellstämme durchgeführt. Die biophysikalischen Parameter konnten mit Strukturparametern der LPS korreliert werden. Der Einbau von LL32 in LPS-Monolayer zeigte eine Abhängigkeit sowohl von der Ladung als auch der Anzahl der Kernzucker (s. Bild 5-10), wobei der Einbau von LL32 in den LPS-Monolayer um so geringer war, je mehr Zucker das LPS trägt und sein Einbau um so größer war, je mehr Ladungen das LPS besitzt. Die aus kalorimetrischen Messungen gewonnene Molekularität (s. Tabelle 5-2) zeigte ebenfalls eine ausgesprochene Abhängigkeit von sowohl der Ladung als auch der Anzahl der Zucker der LPS (s. Bild 5-16), und auch die Ergebnisse aus den Messungen zum Einfluß von LL32 auf das Zetapotential der LPS-Aggregate zeigten eine Abhängigkeit von der Ladung der LPS (s. Bild 5-20). LL32 zeigte einen Einfluß auf die Fluidität der LPS-Aggregate (s. Bild 5-21) und änderte die LPS-Aggregatstruktur von nicht-lamellar zu lamellar (s. Bild 5-23). Dies entspricht einer Interkalation von LL32 in die LPS-Aggregate und steht im Einklang mit dem Einbau von LL32 in LPS-Membranen. Die Lamellarisierung der LPS-Aggregate bedeutet weiter, daß LL32 die biologische Aktivität von LPS inhibiert (s. 3.3.2). Die Messungen an den rekonstituierten asymmetrischen planaren Membranen zeigten, daß LL32 in allen LPS/PL-Membranen Läsionen induzierte (s. 5.4). Die Läsionsbildung steht im Einklang mit der Vorstellung des „self-promoted-uptake“ und erklärt die Suszeptibilität der *S. minnesota* Rauhmütanten gegenüber LL32.

Die Abhängigkeit der MHK-Werte der verschiedenen *S. minnesota* Stämme von der Ladung und der Anzahl der Kernzucker ihres LPS (ausgedrückt in dem Parameter Ladung/Anzahl Kernzucker) spiegelt sich also in den verschiedenen biophysikalischen Parametern wieder.

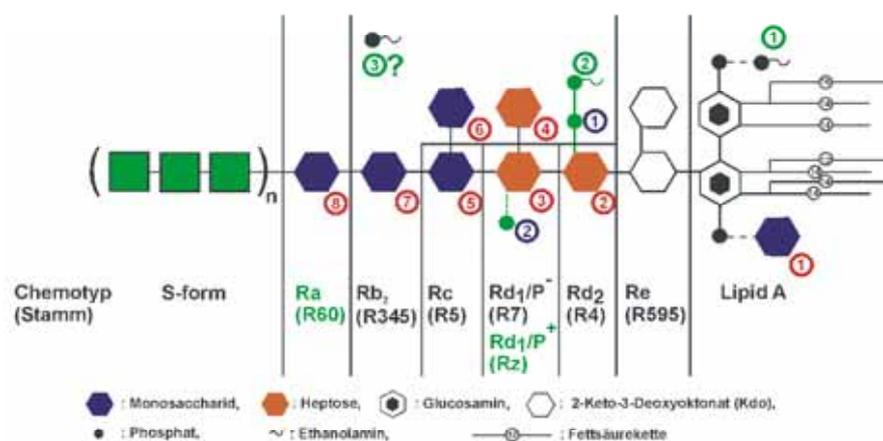
Gegenwärtig werden die Wechselbeziehungen der biophysikalischen Meßparameter untereinander und mit den biologischen Aktivitäten mit Hilfe eines neuronalen Netzwerks untersucht. Der große Vorteil neuronaler Netzwerke liegt darin, daß mit ihrer Hilfe nichtlineare Beziehungen zwischen den Objekten (biologische und biophysikalische Meßparameter) aufgefunden werden können. Die ersten Ergebnisse sind

---

vielversprechend, jedoch sind die Rechnungen während der Niederschrift der vorliegenden Arbeit noch nicht beendet, so daß hier noch nicht abschließend darüber berichtet werden kann.

## 7 Anhang

### 7.1 Substitutionsmuster der *S. minnesota* LPS



	R595	R4	R7	Rz	R5	R345	R60
Salzform	TEN	TEN	TEN	TEN	TEN	TEN	TEN
Masse <sup>1</sup>	2238	2430	2622	2824	2784	3504	3826
T <sub>c</sub> / °C	29,7	30,2	31,6	35,3	34,3	35,3	37
1 L-Arap	30-50	0	0	0	0	0	0
2 Hep	0	100	100	100	100	100	100
3 Hep	0	0	100	100	100	100	100
4 Hep	0	0	0	0	0	100	100
5 Glc	0	0	0	0	100	100	100
6 Gal	0	0	0	0	5/6 25 <sup>a)</sup>	100	100
7 Gal	0	0	0	0	5/6 25 <sup>a)</sup>	100	100
8 Glc	0	0	0	0	0	0	100
1 P-Etn	15	0	0	0	0	0	0
1 P	0	0	10	100	10	80	100
2 P-Etn	0	0	0	60	3	100	100
2 P	0	0	0	30	0	0	100
3 P-Etn	0	0	0	0	0	0	40
Tetra	14	7	10	36	6	13	45
Penta	11	7	10	28	6	13	12
Hexa	57	43	49	28	63	65	30
Hepta	17	43	32	8	25	10	12
Nettoladung	3,6	4	4,1	5,3	4,1	4,8	6

Tabelle 7-1 Substitutionsmuster der *S. Minnesota* LPS. Die Bezeichnungen Tetra, Penta etc. beziehen sich auf die Zahl der Fettsäuren am Lipid A. Bei Masse ist das Molekulargewicht des Hexaacyl-LPS (s. Bild 7-1) angegeben. <sup>a)</sup> An Position 5 oder 6 zu 25% vorhanden.

## 7.2 Übersicht über die vorkommenden Lipid A-Strukturen

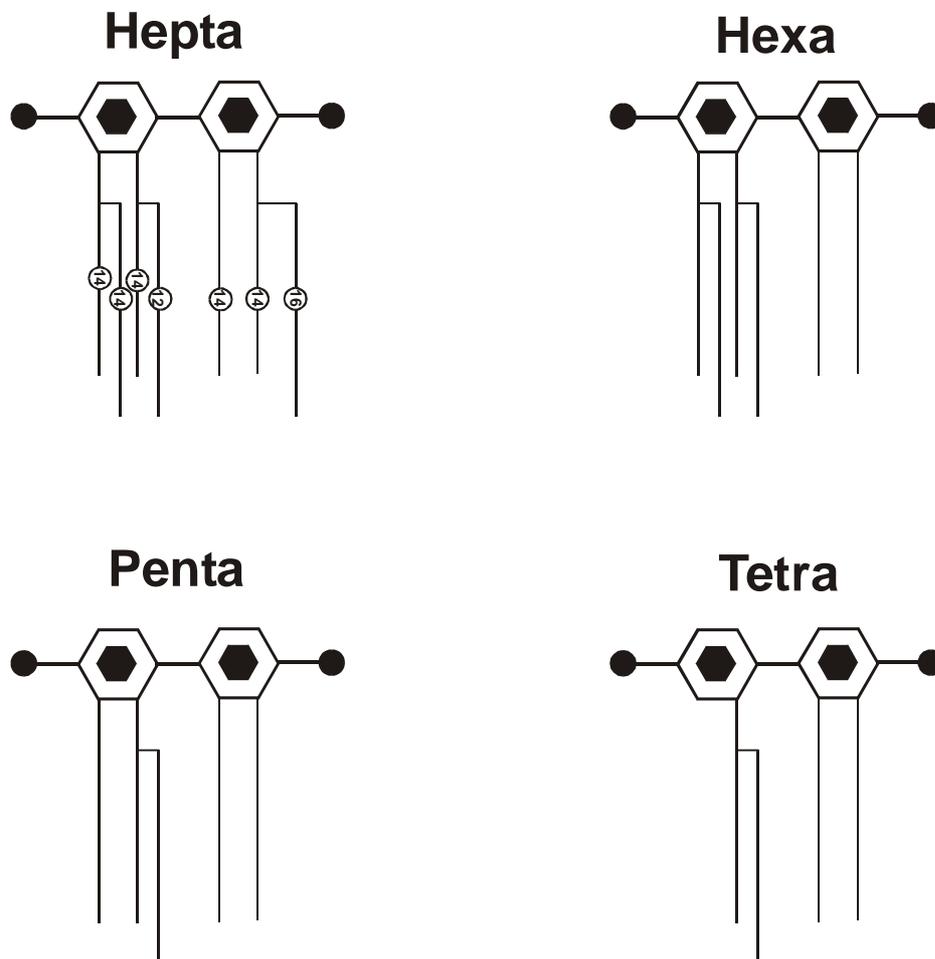


Bild 7-1 Vorkommende Substitutionsmuster des Lipid A-Teils. Die eingekreisten Zahlen geben die Zahl der Kohlenstoffatome der Fettsäure an.

## 8 Literaturverzeichnis

Adam, G., P. Lauger und G. Stark. 1977. Physikalische Chemie und Biophysik. Springer-Verlag, Berlin.

Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell und G.H. Gudmundsson. 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96:3086-3093.

Agerberth, B., J. Grunewald, E. Castanos-Velez, B. Olsson, H. Jornvall, H. Wigzell, A. Eklund und G.H. Gudmundsson. 1999. Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160:283-290.

Agerberth, B., H. Gunne, J. Odeberg, P. Kogner, H.G. Boman und G.H. Gudmundsson. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:195-199.

Alvarez, O. und R. Latorre. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophys. J.* 21:1-17.

Andra, J., M.H. Koch, R. Bartels und K. Brandenburg. 2004. Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1593-1599.

- Arrighi, R.B., C. Nakamura, J. Miyake, H. Hurd und J.G. Burgess. 2002. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarias. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2104-2110.
- Atkins, P.W. 1990. *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Bakker, E.P. und W.E. Mangerich. 1981. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.* 147:820-826.
- Bals, R. 2000. [Antimicrobial peptides and peptide antibiotics]. *Med. Klin.* 95:496-502.
- Bals, R., X. Wang, M. Zasloff und J.M. Wilson. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:9541-9546.
- Bals, R., D.J. Weiner, R.L. Meegalla und J.M. Wilson. 1999a. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J. Clin. Invest* 103:1113-1117.
- Bals, R., D.J. Weiner, A.D. Moscioni, R.L. Meegalla und J.M. Wilson. 1999b. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* 67:6084-6089.
- Baumann, G. und P. Mueller. 1974. A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* 2:538-557.
- Benz, R. 1994. *In Bacterial Cell Wall*. J.-M. Ghuyssen und R. Hackenbeck, editors. Elsevier Science B. V., Amsterdam. 397-423.

Beyer, H. und W. Walter. 1991. Lehrbuch der Organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.

Boehling, A. 2004. Charakterisierung und Visualisierung der Wechselwirkung von humanem  $\beta$ -Defensin mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Diplomarbeit. *Universität Kiel*.

Boman, H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:61-92.

Boman, H.G. 1998. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand. J. Immunol.* 48:15-25.

Boulin, C., R. Kempf, M.H.J. Koch und S.M. McLaughlin. 1986. Data appraisal, evaluation and display for synchrotron radiation experiments: Hardware and software. *Nucl. Instr. Meth.* A249:399-407.

Brandenburg, K., G. Jurgens, M. Muller, S. Fukuoka und M.H. Koch. 2001. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biol. Chem.* 382:1215-1225.

Brandenburg, K., H. Mayer, M.H.J. Koch, J. Weckesser, E.Th. Rietschel und U. Seydel. 1993. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 218:555-563.

Brandenburg, K., I. Moriyon, M.D. Arraiza, G. Lewark-Yvetot, M.H.J. Koch und U. Seydel. 2002. Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxins. *Thermochim. Acta* 382:189-198.

Brandenburg, K. und U. Seydel. 1990. Investigation into the fluidity of lipopolysaccharide and free lipid A membrane systems by Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Eur. J. Biochem.* 191:229-236.

Brandenburg, K. und U. Seydel. 1996. Fourier transform infrared spectroscopy of cell surface polysaccharides. *In Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. H.H. Mantsch und D. Chapman, editors. Wiley Liss, New York. 203-37.

Bucki, R., J.J. Pastore, P. Randhawa, R. Vegners, D.J. Weiner und P.A. Janmey. 2004. Antibacterial activities of rhodamine B-conjugated gelsolin-derived peptides compared to those of the antimicrobial peptides cathelicidin LL37, magainin II, and melittin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1526-1533.

Bulet, P., R. Stocklin und L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198:169-184.

Chapman, D. 1975b. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.* 8:185-235.

Chapman, D. 1975a. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quart. Rev. Biophys.* 8:185-235.

Chou, P.Y. und H.A. Scheraga. 1971. Calorimetric measurement of enthalpy change in the isothermal helix--coil transition of poly-L-lysine in aqueous solution. *Biopolymers* 10:657-680.

Cowland, J.B., A.H. Johnsen und N. Borregaard. 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 368:173-176.

Darnell, J., H. Lodish und D. Baltimore. 1986. Molecular cell biology. Scientific American Books, New York.

Dathe, M., M. Schumann, T. Wieprecht, A. Winkler, M. Beyermann, E. Krause, K. Matsuzaki, O. Murase und M. Bienert. 1996. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* 35:12612-12622.

Dathe, M. und T. Wieprecht. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:71-87.

Diamond, G. und C.L. Bevins. 1998.  $\beta$ -defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:221-225.

Dörfler, H.-D. 1994. Grenzflächen- und Kolloidchemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Weinheim.

Elsbach, P. 2003. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J. Clin. Invest* 111:1643-1645.

Epand, R.M. und H.J. Vogel. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:11-28.

Fehlbaum, P., P. Bulet, S. Chernysh, J.P. Briand, J.P. Roussel, L. Letellier, C. Hetru und J.A. Hoffmann. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:1221-1225.

Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell und G.H. Gudmundsson. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 272:15258-15263.

Frohm, M., H. Gunne, A.C. Bergman, B. Agerberth, T. Bergman, A. Boman, S. Liden, H. Jornvall und H.G. Boman. 1996. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur. J. Biochem.* 237:86-92.

Frömter, E. 1982. Stofftransport durch biologische Membranen. *In* Biophysik. W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler, editors. Springer Verlag, Berlin. 480-531.

Galanos, C., O. Lüderitz und O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245-249.

Gallo, R.L., M. Murakami, T. Ohtake und M. Zaiou. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:823-831.

- Ganz, T. 2004. Antimicrobial polypeptides. *J. Leukoc. Biol.* 75:34-38.
- Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S.L. Harwig, K. Daher, D.F. Baiton und R.I. Lehrer. 1985. Defensins Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76:1427-1435.
- Gorter, E. und F. Grendel. 1925. On bimolecular layers of lipid on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41:439-443.
- Gräfe, U. 1992. Biochemie der Antibiotika. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Greenfield, N.J. 1996. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.* 235:1-10.
- Gudmundsson, G.H., B. Agerberth, J. Odeberg, T. Bergman, B. Olsson und R. Salcedo. 1996. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* 238:325-332.
- Gutsmann, T., M. Fix, J.W. Larrick und A. Wiese. 2000. Mechanisms of action of rabbit CAP18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. *J. Membr. Biol.* 176:223-236.
- Gutsmann, T., S.O. Hagge, J.W. Larrick, U. Seydel und A. Wiese. 2001. Interaction of CAP18-Derived Peptides with Membranes Made from Endotoxins or Phospholipids. *Biophys. J.* 80:2935-2945.

Gutsmann, T., J.W. Larrick, U. Seydel und A. Wiese. 1999. Molecular mechanisms of interaction of rabbit CAP18 with outer membranes of gram-negative bacteria.

*Biochemistry* 38:13643-13653.

Hagge, S.O. 2003. Charakterisierung der Eigenschaften rekonstituierter planarer Membranen und deren Änderung durch porenbildende mit Hilfe von elektrischen und optischen Methoden. *Universität Kiel*.

Hagge, S.O., A. Wiese, U. Seydel und T. Gutsmann. 2004. Inner field compensation as a tool for the characterization of asymmetric membranes and Peptide-membrane interactions. *Biophys. J.* 86:913-922.

Hamann, C.H. und W. Vielstich. 1985. Elektrochemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Hancock, R.E. und G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8:402-410.

Hancock, R.E. und A. Rozek. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206:143-149.

Hancock, R.E. und M.G. Scott. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:8856-8861.

Hancock, R.E.W. 1997. Peptide antibiotics. *The Lancet* 349:418-422.

Hancock, R.E.W. 1984. Alterations in outer membrane permeability. *Ann. Rev. Microbiol.* 38:237-264.

- Hanke, W. und W.-R. Schlue. 1993. Planar lipid bilayers: methods and applications. Academic Press, London.
- Harrison, R. und G.G. Lunt. 1977. Biologische Membranen. Gustav-Fischer-Verlag, New York.
- Henry, N.F.M. und K. Lonsdale. 1969. International tables for X-ray crystallography. Kynoch press, Birmingham.
- Henzler Wildman, K.A., D.K. Lee und A. Ramamoorthy. 2003. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42:6545-6558.
- Heumann, D. und M.P. Glauser. 1994. Pathogenesis of Sepsis. *Sci. Am.* 1:28-37.
- Hirsch, J.G. 1956. Phagocytin: a bacterial substance from polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 103:589-621.
- Hodinka, R.L. und M.C. Modrzakowski. 1983. Bactericidal Activity of Granule Contents from Rat Polymorphonuclear Leukocytes. *Infect. Immun.* 40:139-146.
- Holst, O. 1999. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. *In* Endotoxin in Health and Disease. H. Brade, S.M. Opal, S.N. Vogel und D.C. Morrison, editors. Marcel Dekker, Inc., New York. 115-54.
- Hotchkiss, R.S. und I.E. Karl. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348:138-150.

- Huang, H.W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39:8347-8352.
- Israelachvili, J.N., S. Marcelja und R.G. Horm. 1980. Physical principles of membrane organisation. *Q. Rev. Biophys.* 13:121-200.
- Johansson, J., G.H. Gudmundsson, M.E. Rottenberg, K.D. Berndt und B. Agerberth. 1998. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273:3718-3724.
- Kamysz, W., M. Okroj und J. Lukasiak. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* 50:461-469.
- Kieffer, A.E., Y. Goumon, O. Ruh, S. Chasserot-Golaz, G. Nullans, C. Gasnier, D. Aunis und M.H. Metz-Boutigue. 2003. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.* 17:776-778.
- Koch, M.H.J. 1988. Instruments and methods for small-angle scattering with synchrotron radiation. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* 15:79-90.
- Koch, M.H.J. und J. Bordas. 1983. X-ray diffraction and scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nucl. Instr. Meth.* 208:461-469.
- Kondejewski, L.H., M. Jelokhani-Niaraki, S.W. Farmer, B. Lix, C.M. Kay, B.D. Sykes, R.E. Hancock und R.S. Hodges. 1999. Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. *J. Biol. Chem.* 274:13181-13192.

Ladbury, J.E. und B.Z. Chowdhry. 1996. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem. Biol.* 3:791-801.

Langerman, N. und R.L. Biltonen. 1979. Microcalorimeters for biological chemistry: applications, instrumentation and experimental design. *Methods Enzymol.* 61:261-286.

Larrick, J.W., M. Hirata, R.F. Balint, J. Lee, J. Zhong und S.C. Wright. 1995a. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63:1291-1297.

Larrick, J.W., M. Hirata, J. Zhong und S.C. Wright. 1995b. Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology.* 1:65-72.

Lehninger, A.L. 1983. Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim.

Lehrer, R.I. und T. Ganz. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11:23-27.

Lehrer, R.I. und T. Ganz. 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14:96-102.

Lehrer, R.I., A.K. Lichtenstein und T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11:105-128.

Lehrer, R.I., M.E. Selsted, D. Szklarek und J. Fleischmann. 1983. Antibacterial activity of microbicidal cationic proteins 1 and 2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Infect. Immun.* 42:10-14.

- Lenaz, G. und G.P. Castelli. 1985. Membrane fluidity: Molecular basis and physiological significance. *In* Structure and Properties of Cell Membranes. G. Benga, editor. CRC Press, Boca Raton. 93-136.
- Lindblom, G. und L. Rilfors. 1989. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 988:221-256.
- Lindholm, P., U. Goransson, S. Johansson, P. Claesson, J. Gullbo, R. Larsson, L. Bohlin und A. Backlund. 2002. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. *Mol. Cancer Ther.* 1:365-369.
- Livingstone, J.R. 1996. Antibody characterization by isothermal titration calorimetry. *Nature* 384:491-492.
- Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore und J. Darnell. 2000. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman and Company, New York.
- Lugtenberg, B. und L. Van Alphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 737:51-115.
- Maget-Dana, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:109-140.
- Makowski, L. und J. Li. 1984. X-ray diffraction and electron microscope studies of the molecular structure of biological membranes. *In* Biomembrane structure and function

Topics in molecular and structural biology, Vol. 4. D. Chapman, editor. Verlag Chemie, Weinheim. 43-166.

Martin, E., T. Ganz und R.I. Lehrer. 1995. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* 58:128-135.

Massey, J.B., A.M. Gotto, Jr. und H.J. Pownall. 1979. Contribution of alpha helix formation in human plasma apolipoproteins to their enthalpy of association with phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254:9559-9561.

Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:1-10.

Montal, M. und P. Mueller. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:3561-3566.

Mueller, P., D.O. Rudin und H.T. Tien. 1962. Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature* 194:979-981.

Müller, R.H. 1996. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart.

Nagaoka, I., S. Hirota, S. Yomogida, A. Ohwada und M. Hirata. 2000. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm. Res.* 49:73-79.

Nikaido, H. 1994. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science* 264:382-388.

- Nikaido, H. und M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial. Rev.* 49:1-32.
- Oren, Z., J.C. Lerman, G.H. Gudmundsson, B. Agerberth und Y. Shai. 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non- cell-selective activity. *Biochem. J.* 341:501-513.
- Oren, Z. und Y. Shai. 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47:451-463.
- Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi und J. Carson. 1972. Mechanism and assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 247:3962-3972.
- Ouellette, A.J., M.M. Hsieh, M.T. Nosek, D.F. Cano-Gauci, K.M. Huttner, R.N. Buick und M.E. Selsted. 1994. Mouse paneth cell defensins: primary structure and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect. Immun.* 62:5040-5047.
- Ouellette, A.J. und M.E. Selsted. 1996. Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 10:1280-1289.
- Papo, N. und Y. Shai. 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* 24:1693-1703.
- Petty, M.C. 1996. Langmuir-Blodgett films: an introduction. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pichhardt, K. 1998. Lebensmittelmikrobiologie. Grundlagen für die Praxis. Springer-Verlag.

- Piers, K.L., M.H. Brown und R.E.W. Hancock. 1993. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 134:7-13.
- Pottel, H., W. Van Der Meer und W. Herreman. 1983. Correlation between the order parameter and the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta Bio-Membr.* 730:181-186.
- Quayle, A.J., E.M. Porter, A.A. Nussbaum, Y.M. Wang, C. Brabec, K.P. Yip und S.C. Mok. 1998. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am. J. Pathol.* 152:1247-1258.
- Rana, F. und J. Blazyk. 1989. Outer membrane structure in smooth and rough strains of *Salmonella typhimurium* and their susceptibility to the antimicrobial peptides, magainins and defensins. *Prog. Clin. Biol. Res.* 292:77-85.
- Rana, F.R., E.A. Macias, C.M. Sultany, M.C. Modzrakowski und J. Blazyk. 1991. Interactions between Magainin 2 and *Salmonella typhimurium* Outer Membranes: Effect of Lipopolysaccharide Structure. *Biochemistry* 30:5858-5866.
- Rest, R.F., M.H. Cooney und J.K. Spitznagel. 1977. Susceptibility of Lipopolysaccharide Mutants to the Bactericidal Action of Human Neutrophil Lysosomal Fractions. *Infect. Immun.* 16:145-151.
- Rest, R.F., M.H. Cooney und J.K. Spitznagel. 1978. Bactericidal Activity of Specific and Azurophil Granules from Human Neutrophils: Studies with Outer-Membrane mutants of *Salmonella typhimurium* LT-2. *Infect. Immun.* 19:131-137.

Rietschel, E.T., U. Mamat, L. Hamann, A. Wiese, L. Brade, P. Sanchez-Carballo, T. Mattern, P. Zabel, D. Heumann, F. Di Padova, S. Hauschildt und A. Woltmann. 1999. Bacterial endotoxins as inducers of septic shock. *Novo Acta Leopoldina* 307:93-122.

Rietschel, E.Th., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, F. Di Padova, M. Schreier und H. Brade. 1994. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217-225.

Robinson, W.E., Jr., B. McDougall, D. Tran und M.E. Selsted. 1998. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 63:94-100.

Schaller-Bals, S., A. Schulze und R. Bals. 2002. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165:992-995.

Seelig, J., S. Nebel, P. Ganz und C. Bruns. 1993. Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. Lipid binding and functional properties of somatostatin analogues of charge  $z = +1$  to  $z = +3$ . *Biochemistry* 32:9714-9721.

Seelig, J. und W. Niederberger. 1974. Deuterium-labeled lipids as structural probes in liquid crystalline bilayers. A deuterium magnetic resonance study. *Journal of the American Chemical Society* 96:2069-2072.

Seltmann, G. und O. Holst. 2002. The Bacterial Cell Wall. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Sen, K., J. Hellman und H. Nikaido. 1988. Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 263:1182-1187.
- Seydel, U., M.H. Koch und K. Brandenburg. 1993a. Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. *J. Struct. Biol.* 110:232-243.
- Seydel, U., M.H.J. Koch und K. Brandenburg. 1993b. Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. *J. Struct. Biol.* 110:232-243.
- Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:55-70.
- Silvius, J.R. 1982. Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modification by membrane proteins. *Lipid Protein Interactions* 2:239-281.
- Singer, S.J. und G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 173:720-731.
- Singleton, P. und D. Sainsbury. 1987. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Sitaram, N. und R. Nagaraj. 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:29-54.

- Sorensen, O., J.B. Cowland, J. Askaa und N. Borregaard. 1997. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J. Immunol. Methods* 206:53-59.
- Spanos, N., P.G. Klepetsanis und P.G. Koutsoukos. 2002. Encyclopedia of Surface and Colloid Science. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Tang, Y.Q. und M.E. Selsted. 1993. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268:6649-6653.
- Tang, Y.Q., J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C.J. Miller, A.J. Ouellette und M.E. Selsted. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286:498-502.
- Tien, H.T. 1974. Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice. Marcel Dekker, New York.
- Tran, D., P.A. Tran, Y.Q. Tang, J. Yuan, T. Cole und M.E. Selsted. 2002. Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides. *J. Biol. Chem.* 277:3079-3084.
- Vereb, G., J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T.A. Waldmann und S. Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:8053-8058.

Weber, M.H.W., W. Klein, L. Müller, U.M. Niess und M.A. Marahiel. 2001. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaption during cold shock. *Mol. Microbiol.* 39:1321-1329.

White, S.H. und W. Chang. 1981. Voltage dependence of the capacitance and area of black lipid membranes. *Biophys. J.* 36:449-453.

White, S.H., W.C. Wimley und M.E. Selsted. 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:521-527.

Wieprecht, T., O. Apostolov, M. Beyermann und J. Seelig. 2000. Membrane Binding and Pore Formation of the Antibacterial Peptide PGLa: Thermodynamic and Mechanistic Aspects. *Biochemistry* 39:442-452.

Wieprecht, T., M. Beyermann und J. Seelig. 1999. Binding of Antibacterial Magainin Peptides to Electrically Neutral Membranes: Thermodynamics and Structure. *Biochemistry* 38:10377-10387.

Wiese, A., M. Münstermann, T. Gutschmann, B. Lindner, K. Kawahara, U. Zähringer und U. Seydel. 1998. Molecular mechanisms of Polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted uptake. *J. Membr. Biol.* 162:127-138.

Wiese, A. und U. Seydel. 2000. Electrophysiological measurements on reconstituted outer membranes. *Methods Mol. Biol.* 145:355-370.

- Wiseman, T., S. Williston, J.F. Brandts und L.N. Lin. 1989. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179:131-137.
- Yang, D., A. Biragyn, D.M. Hoover, J. Lubkowski und J.J. Oppenheim. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22:181-215.
- Zaiou, M., V. Nizet und R.L. Gallo. 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J. Invest Dermatol.* 120:810-816.
- Zanetti, M. 2003. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.*
- Zanetti, M., R. Gennaro und D. Romeo. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374:1-5.
- Zasloff, M. 2002a. Antimicrobial Peptides in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 347:1199-1200.
- Zasloff, M. 2002b. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
- Zimmermann, G.R., P. Legault, M.E. Selsted und A. Pardi. 1995. Solution structure of bovine neutrophil  $\beta$ -defensin-12: the peptide fold of the  $\beta$ defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* 34:13663-13671.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, den ..... ..



## Kurzer Lebenslauf

Name		Alexander David
Anschrift		Parkallee 26 D-23845 Borstel
Geboren	27.12.1971	Pfullendorf
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch
Hochschulausbildung	1993	Studium der Chemie an der Universität (TH) Karlsruhe
	1994	Studium der Rechtswissenschaften an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
	1995	Studium der Chemie an der Universität (TH) Karlsruhe
	1997	Studium der Chemie an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel
	2001	Universität zu Kiel, Abschluß mit Diplom
		Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Mäder, Institut für Physikalische Chemie, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Mikrowellenspektroskopische Untersuchungen am 1,3-Difluobenzol-Krypton-komplex: <sup>83</sup> Krypton Kernquadrupolkopplung und Strukturuntersuchung
	seit Juli 2001	Promotion am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie, Laborgruppe Biophysik
Schulausbildung	1978	Südschule Neureut, Grundschule, Karlsruhe
	1982	Südschule Neureut, Hauptschule, Karlsruhe
	1983	Realschule Neureut, Karlsruhe
	1989	Gertrud-Bäumer-Schule Karlsruhe, Berufliches Gymnasium
	1992	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife



## Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mir die Promotion ermöglicht haben und mir bei der Anfertigung der Arbeit tatkräftig zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Ulrich Seydel, Leiter der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit, für die konstruktiven Diskussionen, die intensive Betreuung und die anhaltende Unterstützung bei der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Thomas Gutschmann für die gute Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen. Herrn PD Dr. Klaus Brandenburg und Herrn PD Dr. Buko Lindner danke ich für Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die Beantwortung meiner Fragen zum Thema Lipopolysaccharide. Für die hervorragende Zusammenarbeit und die ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion danke ich Herrn Dr. Jörg Andrä, Frau Dr. Stefanie Roes, Frau Dr. Mareike Müller und insbesondere Herrn Dr. S.-O. Hagge. Danken möchte ich auch Herrn cand. Dipl. Physiker Jörg Howe für seine stets aufrichtige Kritik: „Das ist Quatsch“.

Der gesamten Laborgruppe Biophysik danke ich für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima und die Hilfe die mir zu Teil wurde. Frau Helga Lüthje danke ich für die Extraktion und Aufreinigung des Lipopolysaccharides, Frau Brigitte Kunz für die Anfertigung massenspektrometrischer Untersuchungen, Frau Maren Lohs für die Hilfe bei der Anfertigung diverser Grafiken und Herrn Dipl.-Ing. Gerold von Busse für die Anfertigung infrarotspektrometrischer Untersuchungen. Für die Anfertigung der Foliensepten und die Unterstützung bei der Durchführung von Untersuchungen an planaren Lipiddoppelschichten danke ich den Auszubildenden am Forschungszentrum Borstel.

Für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der gezeigten Untersuchungen danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 470 Projekt B5).

Für die Synthese des Peptids LL32 danke ich Herrn Rainer Bartels aus der Laborgruppe Strukturbiochemie des Forschungszentrums Borstel.

Für die moralische Unterstützung, die Ablenkung von der Arbeit und die vielen Kochabende (an denen auch Herr Dr. S.-O. Hagge maßgeblich beteiligt war) während meiner Freizeit danke ich Herrn Dr. Ingo Fricke.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Ingola David.