

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

**Biophysikalische Untersuchungen an
bakteriellen Modellmembranen
bezüglich ihrer lateralen Organisation
und der Interaktion mit
humanen β -Defensinen**

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

vorgelegt von

Arne Böhling

im Oktober 2007

Referent/in: PD Dr. Thomas Gutschmann
Korreferent/in: Prof. Dr. Thisbe Lindhorst
Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2007
Zum Druck genehmigt: Kiel, 12. Dezember 2007

Der Dekan

Kurzdarstellung

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien besteht aus zwei Membranen. Die äußere Membran steht dabei im Fokus dieser Arbeit. Die Lipidmatrix der äußeren Membran besteht aus einer Phospholipidmischung im Fall der inneren Monoschicht und aus Lipopolysacchariden im Fall der äußeren Monoschicht. Die Zellhülle von Mykobakterien, dem Auslöser der Tuberkulose, ist noch nicht vollständig bekannt. Ausgehend von einem in der Zellhülle vorkommenden Lipid, wurden erste biophysikalische Untersuchungen durchgeführt.

Eine Vielzahl biophysikalische Techniken, wie die Rasterkraftmikroskopie, elektrische und optische Messungen an planaren Rekonstitutionssystemen der Membran, wurden verwendet, um Untersuchungen der physikalischen Eigenschaften der Membranen und den Einfluss humaner β -Defensine zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die beiden Monoschichten der rekonstituierten äußeren Membran Gram-negativer Bakterien sich gegenseitig bezüglich ihrer Phasenseparation beeinflussen. Durch die Erstellung von Kraftkarten konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion zwischen den Fettsäureketten unterschiedlich in fluiden und rigiden Lipidomänen ist. Diese Ergebnisse führen zu einer modellhaften Vorstellung der Interaktion zwischen den beiden Monoschichten der äußeren Membran Gram-negativen Bakterien.

Das erste Angriffsziel für antimikrobielle Peptide ist die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurde das humane β -Defensin-2 (hBD-2), hBD-3 und zwei Derivate des hBD-3 für Untersuchungen zur Interaktion zwischen humanen β -Defensinen und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien verwendet. Humane β -Defensine verfügen über drei Disulfidbrücken. Um den Einfluss dieser zu untersuchen, wurden zwei humane β -Defensin Derivate ohne und mit einer Disulfidbrücke synthetisiert. Die Ergebnisse der biologischen Messungen zeigten unterschiedliche antimikrobielle Aktivitäten der beiden Derivate im Vergleich zum ursprünglichem hBD-3. Aus biophysikalischen Untersuchungen konnte ein generalisiertes Modell der Wechselwirkungen zwischen humanen β -Defensinen und der äußeren Membran aufgestellt werden. Demnach bilden humane β -Defensine keine Poren definierter Geometrie, sondern führen durch einen auf dem *carpet-like* Mechanismus basierenden Prozess zu einer Störung der Membranintegrität.

Abstract

The cell envelope of Gram-negative bacteria consists of two membranes. The outer membrane is in the focus of the present study. The lipid matrix of the outer membrane consists of a mixture of phospholipids in the inner leaflet and of lipopolysaccharide in the outer leaflet. The cell envelope of mycobacteria is not completely investigated. In this study biophysical experiments with one lipid of the cell envelope of mycobacteria were conducted.

Several biophysical techniques like atomic force microscopy, electrical and optical measurements on planar reconstitution systems were performed to investigate the physical properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria and the influence of human β -defenses on these membranes.

The results of this work show that the two leaflets of the bilayer influences each other by means of the phaseseparation of the lipids. By force mapping measurements it could be shown that the adhesion between the fatty acids differs in fluid and rigid lipid domains. These results lead to a model for the interaction of the two leaflets of the outer membrane of Gram-negative bacteria.

The first target for antibacterial peptides is the outer membrane of Gram negative bacteria. In the present work human β -defensin-2 (hBD-2), hBD-3 and two derivatives of the human β -defensin-3 were used for the experiments. Human β -defensins consist of three disulfide-bonds. To investigate the influence of the disulfide-bonds two human β -defensin derivatives without and with one disulfide-bond were synthesized. The results from biological measurements showed different antimicrobial activities of the two derivatives and hBD-3. From biophysical investigations a generalized model for the interaction between human β -defense and membranes was developed: Human β -defensins do not form pores of a defined geometry, but lead to a disturbance of membrane integrity by a 'carpet-like' mechanism.

Meiner Großmutter

Irmtraut Otti Wilma Winter

Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau herausfindet, wozu das Universum da ist und warum es da ist, dann verschwindet es auf der Stelle und wird durch noch etwas Bizarrereres und Unbegreiflicheres ersetzt. - Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist.

Douglas Adams

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	5
1 Einleitung und Zielsetzung.....	8
2 Biologische und physikochemische Grundlagen.....	11
2.1 Grundlagen von biologischen Membranen.....	11
2.2 Zellhülle humaner Zellen.....	11
2.2.1 Glycerophospholipide	12
2.3 Zellhülle Gram-negativer Bakterien.....	13
2.3.1 Lipopolysaccharide.....	15
2.4 Zellhülle der Mykobakterien.....	17
2.4.1 Trehalose Dimykolat.....	18
2.5 Humane β -Defensine.....	18
2.6 Wechselwirkung zwischen Peptiden und biologischen Membranen.....	21
3 Physikalische und physikochemische Eigenschaften von Membranen.....	24
3.1 Ersatzschaltbild einer Membran.....	24
3.1.1 Membranpotentiale.....	25
4 Selbstorganisation in biologischen Membranen.....	30
4.1 Fluidität in Membranen.....	31
4.2 Domänenbildung in Lipidmono- und doppelschichten.....	32
5 Methoden und Material.....	36
5.1 Übersicht über die Rekonstitutionssysteme.....	36
5.2 Filmwaage.....	37
5.2.1 Aufbau der Filmwaage.....	38
5.2.2 Polymorphie von Monoschichten.....	39
5.2.3 Langmuir-Blodgett-Filme.....	40
5.3 Rasterkraftmikroskopie.....	41
5.3.1 Cantilever.....	42
5.3.2 Wechselwirkung zwischen Probe und Cantileverspitze.....	43

5.3.3	Abbildungsmodi.....	45
5.3.4	Kraftkurven und Kraftkarten.....	48
5.3.5	Bestimmung der Federkonstante.....	51
5.3.6	Verwendetes Rasterkraftmikroskop MFP3D.....	53
5.3.7	Rückkopplungsschleife, PID-Regelung.....	55
5.3.8	Bildaufnahme.....	56
5.3.9	Kombination von Rasterkraftmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie.....	57
5.3.10	Funktionalisierung von Cantilevern.....	58
5.3.11	Substrat.....	58
5.4	Herstellung von Lipidaggregaten.....	59
5.4.1	Adsorption von Aggregaten an Micaoberflächen.....	59
5.5	Spektroskopische Methoden.....	60
5.5.1	Bestimmung des Phasenzustandes von Lipiden mittels Infrarot-Spektroskopie	60
5.5.2	Bestimmung des Einbaus von antimikrobiellen Peptiden in Lipidaggregate mit- tels Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Spektroskopie (FRET).....	62
5.6	Montal-Mueller-Methode.....	64
5.6.1	Aufbau der Messapparatur.....	65
5.6.2	Der elektrische Aufbau.....	67
5.6.3	Bestimmung der Membrankapazität.....	68
5.6.4	Biophysical Bilayer Analysis System [BBAS].....	69
5.6.5	Präparation der Membran.....	71
5.6.6	Auswertemethoden.....	72
5.6.7	Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes an planaren Membranen.....	74
5.7	Biologische Methoden.....	75
5.7.1	Test der Peptide auf antimikrobielle Aktivität.....	75
5.7.2	Hämolyse-Test.....	76
5.8	Verwendete Lipide.....	77
5.8.1	Glycerophospholipide.....	77
5.8.2	Lipopolysaccharide.....	78

5.8.3 Trehalose Dimykolat.....	79
5.9 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	80
5.10 Verwendete humane β -Defensine.....	80
5.10.1 hBD-3.....	80
5.10.2 hBD-3-6S.....	80
5.10.3 C-hBD-3-1-5-C.....	81
5.10.4 hBD-2.....	81
5.10.5 Tabellarischer Überblick über die verschiedenen humanen β -Defensine.....	81
5.11 Verwendetes Vergleichspeptid (Polymyxin B).....	82
5.12 Verwendete Cantilever.....	83
5.12.1 NSG11 / CSG11.....	83
5.12.2 TAP300AL.....	83
5.12.3 Multi75GB Au.....	84
5.12.4 Funktionalisierter Cantilever.....	84
6 Ergebnisse.....	85
6.1 Ergebnisse der biologischen und biophysikalischen Untersuchungen an Gram-negativen Bakterien und deren rekonstituierten äußeren Membranen.....	85
6.1.1 Ergebnisse der biologischen Untersuchungen.....	86
6.1.2 Versuche mit Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie.....	88
6.1.3 FRET-Spektroskopiemessungen an LPS-Aggregaten.....	114
6.1.4 Messung der Phasenübergangstemperatur mittels FTIR-Spektroskopie.....	118
6.1.5 Messungen an freistehenden, rekonstituierten Membranen.....	121
6.2 Biophysikalische Ergebnisse an rekonstituierten mykobakteriellen Membranen. .	135
6.2.1 Versuche mit Rasterkraftmikroskopie.....	135
6.3 Messungen an freistehenden rekonstituierten Membranen nach Montal-Mueller.	139
6.3.1 Domänenbildung in Monoschichten einer Lipidmischung mit Trehalose Dimykolat.....	139
6.3.2 Domänenbildung in Doppelschichten einer Lipidmischung mit Trehalose Dimykolat.....	141

6.3.3 Elektrische Messungen der Permeabilität von TDM-haltigen Membranen in Gegenwart von hBD-3-6S.....	142
7 Diskussion.....	144
7.1 Diskussion der Daten der verschiedene Methoden.....	144
7.1.1 Transversale und laterale Organisation der Lipidmatrix Gram-negativer Bakterien.....	145
7.1.2 TDM-haltige Mono- und Doppelschichten.....	151
7.1.3 Diskussion der Messungen zur Interaktion humanen β -Defensine mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien.....	154
7.1.4 Wechselwirkung zwischen hBD-3-6S und TDM-haltigen Doppelschichten...	166
7.1.5 Einfluss von hBD-3-6S auf substratgestützte Mono- und Doppelschichten. .	167
7.2 Zusammenfassende Diskussion.....	170
8 Ausblick.....	173
9 Literaturverzeichnis.....	176
Eidesstattliche Erklärung.....	186
Lebenslauf.....	187
Danksagung.....	188

Abkürzungen

Lipide und Lipidbestandteile

DPG	Diphosphatidylglycerol
PG	Phosphatidylglycerol
PE	Phosphatidylethanolamin
PL	Mischung der Phospholipide PE, PG, DPG
LPS	Lipopolysaccharid
Kdo	2-Keto-3-deoxyoktonat
L-Arap4N	4-Amino-4-deoxy-L- <i>arabino</i> -pentopyranose

Peptide und Proteine

hBD-3	humanes β -Defensin 3
hBD-2	humanes β -Defensin 2
hBD-3-6S	humanes β -Defensin 3 ohne Disulfidbrücken
C-hBD-3-1-5-C	humanes β -Defensin 3 mit einer Disulfidbrücke
PMB	Polymyxin B

Bakterienspezies

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>S. minnesota</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>

Formelzeichen

A	Membranfläche
R_m	spezifischer Membranwiderstand
d	Abstand zwischen den Kondensatorplatten
ϵ	Dielektrizitätskonstante
C_m	spezifische Membrankapazität
c_i	Konzentration Ionen der Sorte i
z_i	Ladungszahl der Ionen der Sorte i
T	Temperatur
l_d	Debye-Hückel-Länge
σ	Oberflächenladungsdichte
Φ_{GC}	Gouy-Chapman-Potential
W_B	Born-Energie
$\Delta\Psi$	Membranpotentialdifferenz
J	Elektrolyt-Flux
P_i	Permeationskoeffizient
A_P	Amplitude des Piezos
ω_P	Kreisresonanzfrequenz des Piezos
m	Masse des Cantilevers
Q	Schwingungsgüte des Cantilevers
k	Federkonstante des Cantilevers
G	freie Gibbsche Ennergie
M	Molfraktion

μ	chemisches Potential
Π	lateraler Druck
γ	Oberflächenspannung
Θ	Kontaktwinkel

Konstanten

$e_0 = 1,6021 \cdot 10^{-19} \text{ C}$	Elektrische Elementarladung
$F = 9,6487 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$	Faraday-Konstante
$k = 1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$	Boltzmann-Konstante
$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	Avogadro-Zahl
$R = 8,3166 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	Gaskonstante
$\varepsilon_0 = 8,55 \cdot 10^{-12} \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$	Elektrische Feldkonstante

1 Einleitung und Zielsetzung

Der menschliche Organismus unterliegt einer permanenten Infektionsgefahr. Um dieser entgegen zu wirken, verfügt er über ein Immunsystem. Dieses ist unterteilt in die angeborene und die adaptive Immunabwehr. Eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr stellen dabei antimikrobielle Peptide dar. Diese sind in der Lage Bakterien, Pilze und Viren abzutöten und so den Organismus vor einer Infektion zu schützen.

Gram-negative Bakterien verfügen über eine besondere Zellhülle, die sie besonders widerstandsfähig gegenüber Antibiotika macht. Diese besteht aus einer inneren Membran, der eine Peptidoglycanschicht vorgelagert ist, die wiederum von einer zusätzlichen, äußeren Membran umschlossen wird. In Bezug auf die Lipidkomposition unterscheiden sich die innere und die äußere Membran grundsätzlich. Die innere Membran besteht aus unterschiedlichen Phospholipiden, während das Hauptmerkmal der äußeren Membran die Asymmetrie hinsichtlich ihrer Lipidzusammensetzung darstellt: die Innenseite besteht aus Phospholipiden, die Außenseite wird von einem Glycolipid, in der Regel Lipopolysaccharid (LPS), gebildet. Das LPS besteht aus einem Membrananker, dem Lipid A, und einer anschließenden Zuckerkette. Die Länge und chemische Struktur des Zuckeranteils des LPS unterscheiden sich bei jedem Bakterienstamm, während der Lipid A-Teil. Die asymmetrische äußere Membran stellt aufgrund ihres Aufbaus eine Erhöhung der Barriereigenschaften der Zellhülle dar und ist sogleich der ersten Angriffsort für antimikrobielle Peptide des Immunsystems des Wirtes oder für extern applizierte Antibiotika. Diese Funktion macht das Verständnis der Struktur, der physikalischen Eigenschaften und die Rolle der äußeren Membran bei der Interaktion mit antimikrobiellen Peptiden zu einem wichtigen Baustein in der wissenschaftlichen Betrachtung Gram-negativer Bakterien. Das LPS der äußeren Membran hat gleichzeitig eine biologische Wirkung. Gelangen Bakterien in die Blutbahn des Wirts und wird LPS durch Zellteilung oder infolge einer durch Antibiotika induzierten Abtötung frei, so kann dieses die Produktion und Ausschüttung von sogenannten proinflammatorischen Zytokinen hervorrufen. Diese führen zunächst zu einer lokalen Entzündung, welche den Anfang der Gram-negativen Sepsis (Blutvergiftung) darstellen kann. Die Sepsis ist noch immer eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen, der etwa 60.000 Menschen in Deutschland alljährlich zum Opfer fallen.

Es wird seit Jahren eine stetige Zunahme der Zahl der gegenüber den konventionellen Antibiotika resistenten Bakterienstämmen verzeichnet. Daher ist das Verständnis der Funktion der Membran als Barriere gegen antimikrobielle Substanzen zunehmend von medizinischer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit stellt daher die äußere Membran Gram-negativer Bakterien in Bezug auf ihre Wechselwirkung mit antimikrobiellen Peptiden das zentrale Objekt der biophysikalischen Untersuchungen dar.

Die native äußere Membran ist aufgrund der Vielzahl an eingebetteten Proteinen ein kompliziertes Vielteilchensystem. Zur funktionellen Analyse wurde daher die natürliche Membran auf ihre zentralen Bestandteile, der reinen Lipidmatrix, dem LPS in der äußeren Monoschicht, sowie einer definierten Phospholipidmischung in der inneren Monoschicht, reduziert. Um die Modellmembranen zu präparieren, kamen diverse Rekonstitutionssysteme zur Anwendung. In den biophysikalischen Untersuchungen standen zunächst grundlegende physikalische Eigenschaften der Membran, welche mittels der Rasterkraftmikroskopie an Monoschichtsystemen untersucht wurden, im Mittelpunkt des Interesses. Es zeigte sich, dass eine asymmetrische Doppelschichtmembran nicht als die Summe ihrer Monoschichten betrachtet werden kann, sondern als eigenständiges physikalisches System gesehen werden muss.

Einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen stellt die Wechselwirkung zwischen antimikrobiellen Wirkstoffen der epithelialen (das Epithel ist das Deckgewebe der Haut) humanen Immunabwehr, humanen β -Defensinen, mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien dar. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Disulfidbrücken der Defensine gelegt. Dazu wurden, ausgehend von biologischen Untersuchungen mit humanen β -Defensinen, die sich in der Anzahl ihrer Disulfidbrücken unterschieden, eine Vielzahl biophysikalische Methoden angewandt. Zu diesen zählen elektrische Messungen an rekonstituierten planaren Lipiddoppelschichten, Messungen der Phasenübergangstemperatur, sowie Messungen der Interkalation zur Peptide in Membranen mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer Spektroskopie an Aggregaten und rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen an substratgestützten Mono- und Doppelschichtmembranen. Aus der zusammenfassenden Betrachtung dieser Ergebnisse konnte ein Modell der Interaktion zwischen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und humanen β -Defensinen aufgestellt werden. Demnach binden die Defensine zunächst durch die elektrostatische Wechselwirkung an die bakterielle Membran. Aufgrund der transmembranen Spannung über dieser Membran kommt

es zur Interkalation der Peptide, so dass mechanischer Stress auf die Membranstruktur ausgeübt wird, welcher nicht ausgeglichen werden kann und zu lokalen Störungen, den Läsionen, führt. Die Summe dieser Läsionen und der damit verbundene Verlust der strukturellen Schutzfunktion der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist der initiale Schritt zur Abtötung der Bakterien durch humane β -Defensine.

Mykobakterien stellen in medizinischer Hinsicht als Auslöser der Tuberkulose ein großes Problem dar. Die Therapie der Tuberkulose stellt sich oftmals als große Herausforderung dar, da Mykobakterien meist resistent gegenüber humane antimikrobiellen Peptiden sind. Die Struktur der Zellhülle von Mykobakterien ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein Bestandteil der mykobakteriellen Zellhülle ist das Trehalose Dimykolat. In der vorliegenden Arbeit wurden erste biophysikalische Untersuchungen mit Trehalose Dimykolat haltigen Phospholipidmembranen durchgeführt. Diese Membranen waren mechanisch äußerst stabil und ließen keine Induktion von transienten Läsionen durch ein humanes β -Defensin zu. Dieses Verhalten lässt erste Rückschlüsse auf die Resistenz der Mykobakterien gegenüber antimikrobiellen Peptiden zu.

Die vorliegenden biophysikalischen Untersuchungen spannen einen weiten Bogen hinsichtlich der angewendeten physikalischen Techniken und der Vielzahl engverknüpfter Untersuchungen sowohl in Bezug auf die physikalische Betrachtung biologischer Membranen als auch in Bezug auf die Interaktion humaner β -Defensine mit biologischen Membranen. Dabei wird gezeigt, dass sich biologische Phänomene mit physikalischen Techniken und physikalischen Modellannahmen sehr genau untersuchen lassen. In einer Vielzahl der physikalischen Ergebnisse, die die Funktionsweise der Vielteilchensysteme auf molekularer Ebene beschreiben, können direkte Korrelationen zu den funktionalen biologischen Untersuchungen aufgezeigt werden.

2 Biologische und physikochemische Grundlagen

2.1 Grundlagen von biologischen Membranen

Jedes Lebewesen grenzt sich mittels einer Hülle von seiner Umwelt ab. Auch für Bakterien hat die Zellhülle eine zentrale Funktion für das Überleben. Wichtiger Bestandteil der Zellhülle ist die Zytoplasmamembran, die das Innere der Zelle, das Zytoplasma, vom extrazellulären Raum trennt. Diese 6 nm [Fischer *et al.*, 1982] dünne Grenzschicht übernimmt dabei verschiedene Aufgaben: Neben der Sicherung der mechanischen Stabilität der Zelle hält sie lebenswichtige Konzentrations- bzw. Ionengradienten aufrecht und wirkt so als Permeationsbarriere.

Biologische Membranen bestehen aus einer Lipidmatrix, in die eine Vielzahl anderer Moleküle, wie Proteine, eingelagert sind. Die Lipidmatrix ist aus einer Vielzahl unterschiedlicher Lipide, die sich in Bezug auf ihre chemische Struktur, aber auch in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden, aufgebaut. Diese verschiedenen Lipide haben jedoch ein gemeinsames Strukturmerkmal: Alle Lipide sind amphiphil. Dies bedeutet, dass sie einen hydrophilen (Wasser anziehenden), bzw. polaren und einen hydrophoben (Wasser abweisenden), bzw. apolaren Strukturanteil haben.

In diese Matrix sind eine große Anzahl von Proteinen eingebettet, die eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen, wie z.B. den selektiven Austausch chemischer Substanzen oder die interzelluläre Kommunikation, übernehmen. Der Trockengewichtsanteil der Proteine beträgt dabei zwischen 25 und 75 %.

2.2 Zellhülle humaner Zellen

Die Zellhülle humaner Zellen stellt eine Doppelschichtmembran, die im Wesentlichen aus sogenannten Phospholipiden aufgebaut ist, dar. Neben den wichtigen Phospholipiden sind noch Sphingolipide, wie Sphingomyelin und Cholesterol als stabilisierende Bestandteile in der Membran vorhanden. Dabei sind die Lipide asymmetrisch in der äußeren und inneren Monoschicht der Membran verteilt. Der Aufbau der Phospholipide

wird im Folgenden näher erläutert, wobei zu beachten ist, dass die Phospholipide PE und PC den größten Anteil der Lipide in humanen Zellen stellen.

2.2.1 Glycerophospholipide

Glycerophospholipide findet man in einer Vielzahl von biologischen Membranen, u.a. in der inneren Membran und der Innenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, sowie in humanen Zellen. Glycerophospholipide werden gebildet aus einem zentralen Glycerin, welches mit zwei Fettsäuren und einer Phosphorsäuregruppe verestert ist [Darnell&Lodish&Baltimore,1986]. Die so genannte Kopfgruppe ist ebenso über eine Veresterung an die Phosphorsäuregruppe gebunden und bildet mit dieser zusammen den polaren Teil des Lipides. Die Kopfgruppe ist der Teil des Lipides, der sich bei verschiedenen Phospholipiden unterscheidet. Wird die Kopfgruppe durch ein Ethanolamin gebildet, so ist das entsprechende Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE), ist die Kopfgruppe ein Glycerol, so stellt das Phospholipid ein Phosphatidylglycerol (PG) dar und handelt es sich bei der Kopfgruppe um ein Cholin, so bildet sich ein Phosphatidylcholin (PC). Werden zwei PG-Moleküle verestert, so bildet sich ein Diphosphatidylglycerol (DPG), welches auch als Cardiolipin (CL) bezeichnet wird. Durch die Ladung der unterschiedlichen Kopfgruppen und der negativen Ladung des Phosphorsäurerestes wird die Gesamtnettoladung des Lipides bestimmt. Alle Ladungen werden in dieser Arbeit als Vielfaches der Elementarladung e_0 bei neutralem pH Wert angegeben.

Der apolare, hydrophobe Teil der Phospholipide wird durch zwei aliphatische Fettsäureketten gebildet. Die Länge der Fettsäureketten bewegt sich bei humanen Zellen im Bereich von 16 bis 18 Kohlenstoffatomen, wobei es meist ein oder mehrere Doppelbindungen gibt, so dass die Fettsäuren ungesättigt sind. Hierdurch wird die Fluidität der Membran im Vergleich zu gesättigten, linearen Fettsäuren erhöht, da der Platzbedarf der Fettsäuren höher ist und sich so ein konischer Aufbau des Lipides ergibt. Die Abbildung 1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Glycerophospholipide [Benga & Benga, 1985][Seydel *et al.*, 2000].

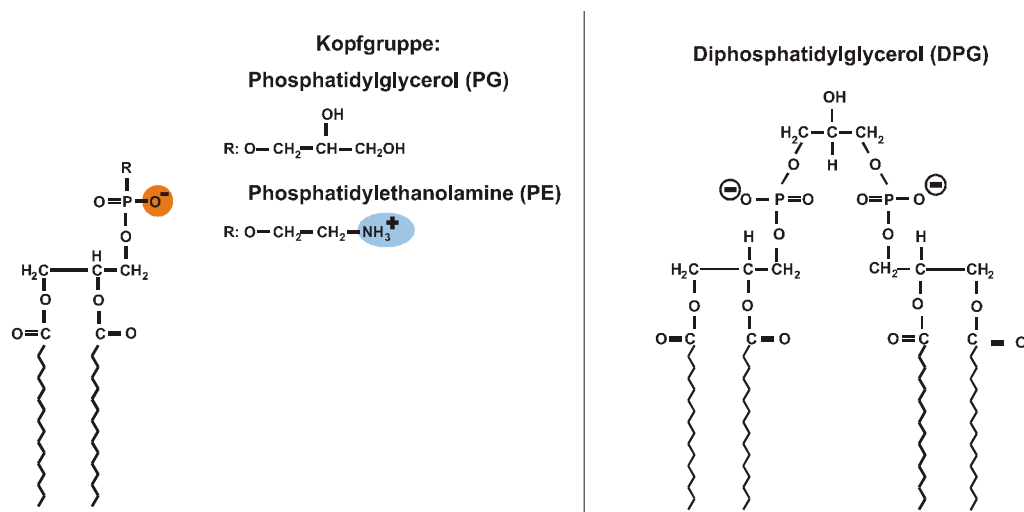


Abbildung 1: Darstellung der Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Glycerophospholipide.

2.3 Zellhülle Gram-negativer Bakterien

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Gram-negative Bakterien, da diese für eine Vielzahl von Infektionen, welche zur Ausbildung einer Sepsis führen kann, eine große medizinische Bedeutung haben. Der Begriff „Gram-negativ“ findet seinen Ursprung in einem von H.C.J. Gram beschriebenen Färbetest, der diese Bakterien im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien aufgrund des Aufbaues der Zellhülle nicht anfärbt.

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien (Abbildung 2) ist aus drei zentralen Bauteilen aufgebaut: i) der inneren Membran, deren Lipidanteil überwiegend aus Phospholipiden besteht, ii) der bzgl. ihrer Lipidzusammensetzung stark asymmetrischen äußeren Membran und iii) dem zwischen diesen Membranen liegenden Peptidoglykangerüst, auch Mureingerüst genannt. Die Asymmetrie der äußeren Membran ist in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Die Innenseite dieser Membran besteht aus Phospholipiden, während die Außenseite aus Glycolipiden, meist Lipopolysacchariden, besteht [Nikaido & Vaara, 1985]. Über Lipoproteine [Lugtenberg & van Alphen, 1982] ist die äußere Mem-

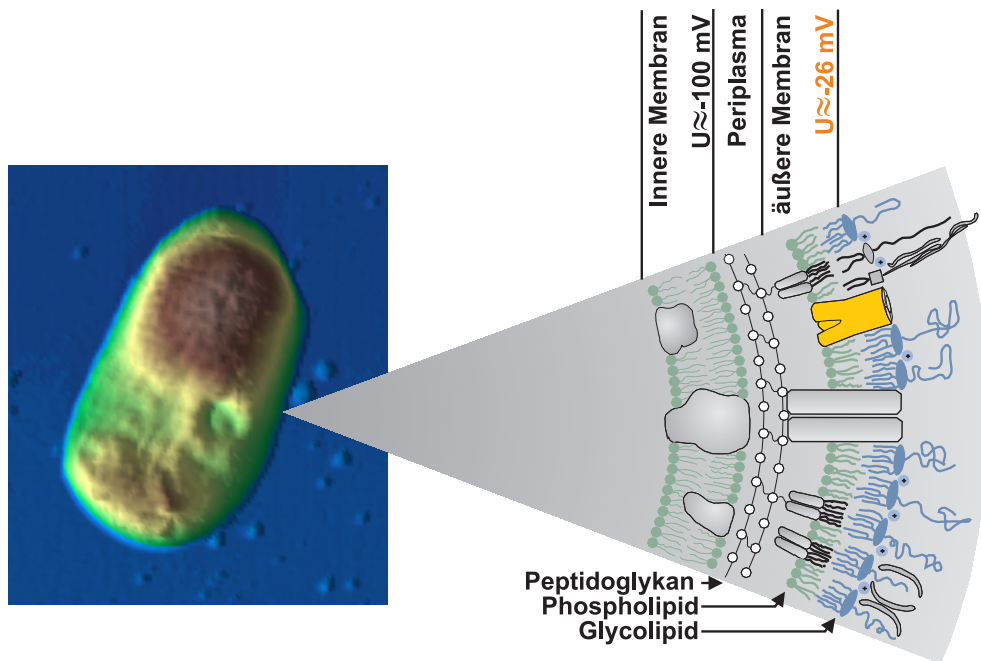


Abbildung 2: Zellhülle Gram-negativer Bakterien

bran mit dem Peptidoglykangerüst verbunden. Weitere Bestandteile der äußeren Membran sind eine Reihe von Proteinen mit spezifischen Aufgaben, wie Austausch von Ionen oder Signalen. Die Proteine wirken sich jedoch aufgrund ihres Einflusses auf die Fluidität der Fettsäuren auch auf die physikalischen Eigenschaften der Membran aus.

Die äußere Membran stellt zudem den ersten Angriffspunkt bzw. die erste Barriere für antimikrobielle Peptide dar. Unabhängig von ihrem letztendlichen Tötungsmechanismus müssen diese Peptide mindestens die äußere Membran passieren. Bis zu einer Ausschlussgrenze von etwa 600 Da [Benz & Bauer, 1988] können die Peptide durch wassergefüllte Kanäle, sogenannten Porine, die Membran passieren, sind sie größer, muss die Membran entweder perforiert werden oder die Moleküle müssen durch die Li-

pidmatrix permittieren, um einen Transfer des Peptides zu seinem Wirkort zu ermöglichen.

2.3.1 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide bilden den äußeren Teil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Abbildung 3). Das Glykolipid besteht dabei aus drei zentralen Bestandteilen, dem Lipid A, dem Kernoligosaccharid und der O-spezifischen Polysaccharidkette [Rietschel *et al.*,1987]:

- Das hydrophobe Lipid A verankert das LPS Molekül in der Membran und besteht bei einem LPS von *Escherichia coli* (*E. coli*) aus einem aus zwei Glucosaminen bestehenden Rückgrad an dem 6 Fettsäureketten gebunden sind. Die Glucosamine sind an den Stellen 1 und 4' phosphoryliert. Löst sich die Membran auf, was durch Zellteilung oder Absterben eines Bakteriums geschehen kann, wird LPS freigesetzt und wirkt im menschlichen Körper toxisch. Daher werden Lipopolysaccharide auch als Endotoxine bezeichnet [Glauser *et al.*,1991] [Rietschel *et al.*,1994], wobei das Lipid A der für die toxische Wirkung verantwortliche Teil des LPS ist und daher auch das „endotoxische Prinzip“ genannt wird.
- Das Bindeglied zwischen der weiter außen liegenden O-spezifischen Seitenkette und dem Lipid A stellt das Kernoligosaccharid dar, das aus 2-Keto-3-Deoxyoktonat (Kdo), Heptose und weiteren Monosacchariden besteht.

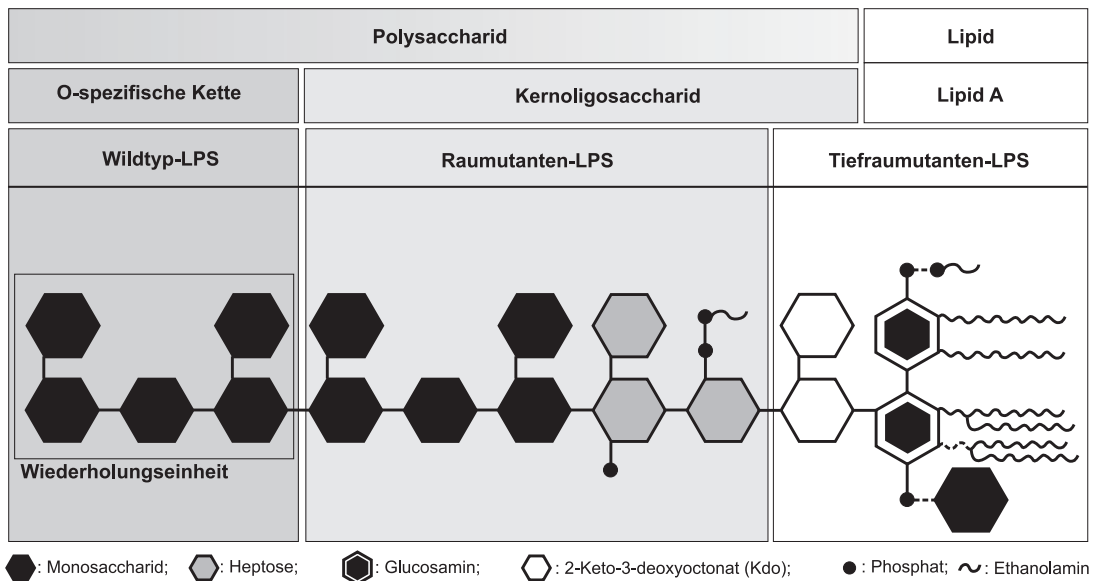


Abbildung 3: Darstellung der allgemeinen Struktur eines LPS Moleküls

- An das Kernoligosaccharid schließt sich die O-spezifische-Seitenkette an. Sie besteht aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten und wirkt als Antigen, welches den menschlichen Körper zur Bildung spezifischer Antikörper anregt.

Bildet ein Bakterienstamm LPS mit einer O-spezifischen Seitenkette und vollständigem Kernoligosaccharid, so wird dieses S-Form LPS genannt. In der Regel exprimiert eine Wildtypstamm-Bakterie S-Form LPS. Wird jedoch durch das Bakterium ein LPS ohne O-spezifische Seitenkette exprimiert, so nennt man dieses Raumutanten- oder R-Form LPS. Die Bezeichnung S- bzw. R-Form leitet sich von der Koloniemorphologie bei Wachstum der Bakterienkulturen auf einem festen Nährmedium ab, dabei steht S für „smooth“ und R für „rough“. Das kürzeste in der Natur sowie in sogenannten Defektmutanten vorkommende LPS wird als Tiefraumutanten-LPS bezeichnet und besteht nur aus dem Lipid A mit zwei Kdo. Ein Bakterienstamm, der dieses LPS exprimiert, wird als Tiefraumutante bezeichnet. Für alle Versuche innerhalb dieser Arbeit wurde ausschließlich Tiefraumutanten-LPS verwendet. Es gibt jedoch eine Vielzahl an Variationen des Tiefraumutanten-Lipopolysaccharids in verschiedenen Bakterienspezies bzw. -stämmen. Diese stellen sich durch Unterschiede in der Anzahl so genannter nicht-stöchiometrischer Substituenten, wie der 4-Amino-4-deoxy-L-arabino-pentopyranose (L-Arap4N), an einem Phosphat oder am ersten Kdo dar. Desweiteren wird die Ladung durch die Substitution mit L-Arap4N verändert. Das Lipid A verfügt an den Phosphaten über 2 negative Ladungen sowie über zwei weitere negative Ladungen an den zwei

Kdo. Da L-Arap4N positiv geladen sind, schwächt sich bei der Substitution die Nettoladung des gesamten Moleküls ab. Durch diese Variationen wird einerseits die Ladungsverteilung und andererseits die räumliche Struktur des LPS verändert.

2.4 Zellhülle der Mykobakterien

Mykobakterien, insbesondere das *Mycobacterium tuberculosis*, der Auslöser der Tuberkulose, sind schon seit vielen Jahrzehnten im Zentrum des Interesses biologischer Untersuchungen. Eine Besonderheit von Mykobakterien ist ihre außerordentliche Robustheit gegenüber Säuren, Laugen, hohen oder niedrigen Temperaturen, aber auch

gegenüber dem Eintrocknen. Die Struktur der Zellhülle ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Es sind jedoch mehrere Zellhüllbestandteile beschrieben, von denen hier einer sehr kurz erwähnt werden soll.

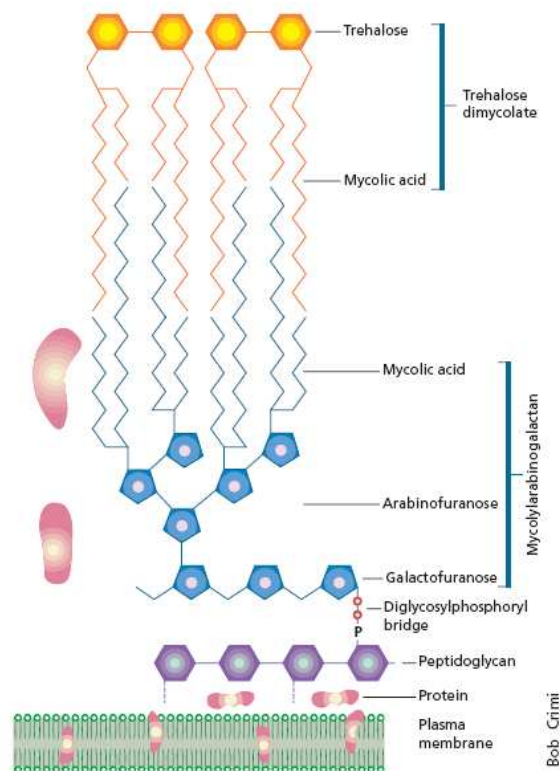


Abbildung 4: Aufbau der Zellhülle von Mykobakterien nach Tonge [Tonge,2000]

eine Mureinschicht, die in Form eines Netzwerkes die gesamte Zelle umschließt. An dieses Peptidoglykangerüst ist über eine Diglykosylphosphoryl-Brücke das Mycolylarabinogalaktan gebunden, welches über eine Galaktofuranose-Struktur an die Arabinofuranose mit den Mykolsäuren gebunden ist. Über die hydrophobe Wechselwirkung ist

Nach diesem Modell besteht die komplexe Zellhülle der Mykobakterien (Abbildung 4) aus drei Hauptbestandteilen, die im Folgenden vom Zellinneren nach außen vorgestellt werden sollen. Die Plasmamembran ist eine Lipiddoppelschicht, die überwiegend aus Phospholipiden besteht. Wichtige Phospholipide sind dabei PE und PG, sowie dem sogenannten Phosphatidylinositol. Weiter außen vor der Plasmamembran befindet sich ein Peptidoglykangerüst. Dabei handelt es sich um

daran wiederum das in dieser Arbeit untersuchte Trehalose Dimykolat gebunden [Tonge,2000].

2.4.1 Trehalose Dimykolat

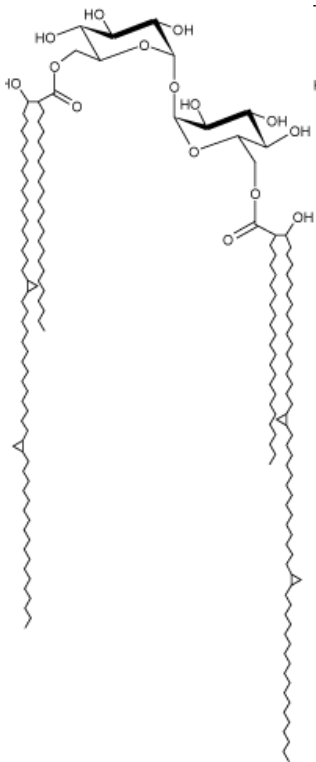


Abbildung 5: Struktur des Trehalose Dimykolat

Das Trehalose Dimykolat (Abbildung 5), auch *Cord Factor* genannt, besteht aus einer Trehalose-Kopfgruppe und zwei sehr langen Fettsäuren. Bei der Trehalose handelt es sich um zwei 2 D-Glucose-Zucker, die über die jeweiligen anomeren Gruppen verbunden sind. Über die 6- und 6'- Hydroxygruppen sind zwei Mykolsäuren verestert. Die beiden Mykolsäuren unterscheiden sich in ihrer Länge: während die kürzere etwa 20 bis 25 CH₂ Gruppen lang ist, hat die lange Mykolsäure eine Länge von 50 bis 70 CH₂ Gruppen. Aufgrund der Kopfgruppenstruktur und der Länge der Fettsäuren unterscheidet sich das Trehalose Dimykolat hinsichtlich der physikalischen und physikochemischen Eigenschaften deutlich von LPS oder Phospholipiden humaner Zellen.

2.5 Humane β -Defensine

Der permanenten Infektionsgefahr durch Bakterien und Viren stellt der menschliche Körper das angeborene und das adaptive Immunsystem entgegen. Ein Teil der bakteriellen Immunabwehr des angeborenen Immunsystems sind die antimikrobiellen Peptide. Diese Peptide wirken dabei häufig gegen verschiedene Bakterien, Viren und Pilze und sind mit 10 bis 45 Aminosäuren oft relativ klein.

Eine Gruppe der körpereigenen antimikrobiellen Peptide stellen die humanen Defensine dar, die 1985 erstmals von Tomas Ganz und Robert Lehrer beschrieben wurden [Ganz *et al.*,1985]. Zur Zeit sind in 4 Unterkategorien der Defensine beschrieben, die so-

nannten α -Defensine (teilweise *human neutrophil peptides* genannt), sowie die β -, γ - und Insekten-Defensine [Ganz & Lehrer, 1995][Lehrer & Ganz, 2002]. Bis heute wurden 6 humane α -Defensine sowie 4 humane β -Defensine beschrieben.

Humane β -Defensine haben ein gemeinsames Strukturelement, sie verfügen über 6 Cysteine in der Aminosäuresequenz, die durch Verknüpfung untereinander zur Ausbildung von 3 Disulfidbrücken führen. Die Verknüpfung der Disulfidbrücken ist dabei immer gleich: das 1. Cystein ist mit dem 5. Cystein (1-5) verbunden, die weiteren Verbindungen sind 2-4 und 3-6 [Tang & Selsted, 1993].

Das erste beschriebene humane β -Defensin (hBD-1) wurde im Urin nachgewiesen und mittels Blutfiltration extrahiert [Bensch *et al.*, 1995]. Das zweite humane β -Defensin (hBD-2) wurde 1997 in Extrakten entzündeter Haut von Psoriasispatienten durch chromatographische Auftrennung der Extrakte mittels HPLC gefunden [Harder *et al.*, 1997]. Weiter wurde das hBD-2 u.a. in Epithelzellen der Lunge und im Mund gefunden. Eine Besonderheit der beiden humanen β -Defensine ist, dass ihre Konzentration bei drohender Infektion vom Körper hochgeregelt werden kann. Eine wichtige Funktion der beiden Defensine ist ihre antimikrobielle Wirkung gegen Gram-negative Bakterien wie *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), die antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien ist jedoch sehr niedrig. Das hBD-2 wurde in großen Mengen per mRNA-Analyse mit RT-PCR in der Haut, der Lunge und der Luftröhre gefunden. Eine geringe Menge im Vergleich zu hBD-1 wurde in der Leber, der Niere und im Darm gefunden. Die Struktur des hBD-2 wurde von Hoover *et al.* aufgeklärt [Hoover *et al.*, 2000]. Dabei wurde auch die für humane Defensine charakteristische Verlinkung der Cysteine zu Disulfidbrücken von zwischen dem ersten und fünften Cysteine (1-5), dem zweiten und vierten (2-4), sowie dem dritten und sechsten Cysteine (3-6) und eine Oligomerisierung des Peptides beschrieben. Das hBD-2 verfügt über eine positive Nettoladung von +6, was die Interaktion mit negativen Lipiden vermuten lässt. Das hBD-2 verfügt über 40 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 4336 Da. Weder für das hBD-1 noch für das hBD-2 sind bis jetzt detaillierte Untersuchungen zum Wirkmechanismus durchgeführt worden.

Da das humane β -Defensin-3 (hBD-3) und zwei Derivate des Peptides in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielen, soll dieses Defensin in den folgenden Zeilen genauer eingeführt werden. Das hBD-3 wurde erstmalig im Jahre 2001 beschrieben [Harder *et al.*

,2001]. Auch dieses Peptid wurde mit Hilfe einer HPLC in Extrakten von Psoriasis-Hautgewebe detektiert und aus diesen aufgereinigt. Im Laufe der Zeit wurde hBD-3 in vielen Teilen des menschlichen Körpers wie der Skelett-Muskulatur, der Plazenta, der Speiseröhre, der oralen Schleimhaut und im weiteren Hautgewebe nachgewiesen [García *et al.*,2001][Jia *et al.*,2001]. Die erste rekombinante Herstellung und Aufreinigung gelang mittels eines Histidin-markiertem Fusions-Proteines in *E. coli* Bakterien [Harder *et al.*,2001]. Das Peptid hat eine Aminosäurekettenlänge von 45, ist 5154,7 Da schwer und hat eine Dimension von etwa 4 nm x 3,2 nm. Die Struktur wurde im Jahre 2002 mittels NMR in Flüssigkeit aufgeklärt [Schibli *et al.*,2002]. Dabei wurde u.a. festgestellt, dass auch das hBD-3 über die für Defensine typische Verlinkung der Cysteine durch Disulfidbrücken mit 1-5, 2-4, 3-6 verfügt. Diese Verlinkung ist bei der synthetischen Herstellung jedoch nicht einheitlich [Wu *et al.*,2003], was nach ersten Erkenntnissen keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* hat. Die Unterschiede ergeben sich bei dieser Bakterienspezies nur in der chemotaktischen Wirkung des Peptides [Wu *et al.*,2003].

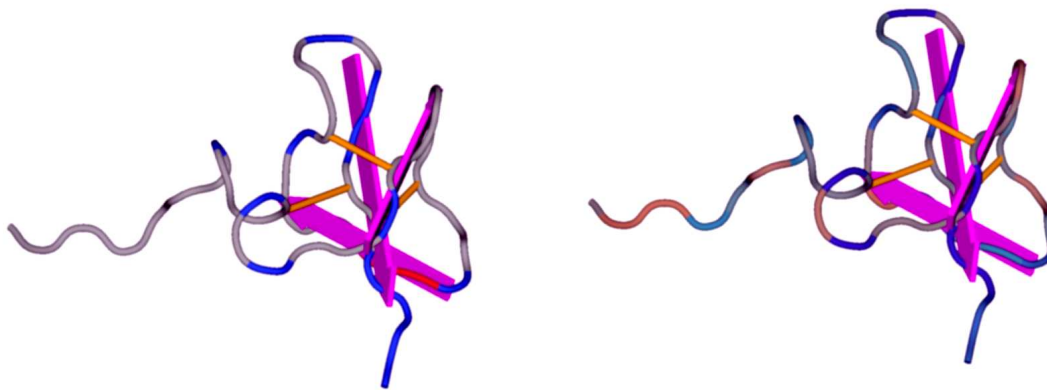


Abbildung 6: NMR-Struktur des hBD-3 [Schibli *et al.*,2002]

Links: Die blau markierten Aminosäuren sind positiv geladen, die rot markierten negativ .

Rechts: Die blau markierten Bereiche sind hydrophil, während die braun markierten Bereiche hydrophob sind

Das humane β -Defensin-3 trägt eine hohe positive Nettoladung von +11, was zu einer elektrostatischen Wechselwirkung mit den negativ geladenen LPS Molekülen in der

äußeren Membran Gram-negativer Bakterien führt. Ebenso wurde in biophysikalischen Rekonstitutionsmodellen gezeigt, dass es im Fall von rekonstituierten Membranen mit LPS sensitiver Bakterienstämme zur Bildung von transienten Läsionen in der Membran kommt [Böhling *et al.*,2006]. In biologischen Versuchen wurde für bestimmte *E. coli* Stämme gezeigt, dass die antimikrobielle Aktivität des Peptides erst bei sehr hohen, nicht physiologischen Konzentrationen signifikant abnimmt [Harder *et al.*,2001]. Weitergehend wurde für hBD-3 die Sensitivität für ein breites Spektrum von Gram-negativen Bakterienspezies, wie z.B. *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* und *E. coli*, und Gram-positiven Bakterien, z.B. wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*, gezeigt. Gegen Bakterien verschiedener *Burkholderia* Stämme ist hBD-3 jedoch nicht aktiv [Sahly *et al.*,2003]. Wie für andere humane β -Defensine wurde auch für hBD-3 gezeigt, dass es beim Kontakt von Bakterien mit Epithelialzellen zur Bildung von mRNA des hBD-3 kommt, was den Schluss zulässt, dass die Produktion des Peptides durch Bakterien hochgeregelt werden kann.

Für eine therapeutische Anwendung eines antimikrobiellen Peptides ist es unablässig, dass das Peptid einfach hergestellt werden kann, um es kostengünstig herstellen zu können. Aufgrund der komplexen Verlinkung der Disulfidbrücken ist es jedoch sehr schwierig, synthetisches hBD-3 herzustellen, da auch über chromatographische Methoden nicht letztendlich geklärt werden kann, dass die Verlinkung gleich dem des nativen Peptides ist. Daher ist es sehr schwierig, große Mengen des Peptides mit vertretbarem Aufwand herzustellen. In dieser Arbeit wurden synthetisch einfacher herstellbare, dem hBD-3 aber ähnliche Derivate verwendet. Diese verfügen entweder über keine oder über nur eine Disulfidbrücke.

2.6 Wechselwirkung zwischen Peptiden und biologischen Membranen

Im Fokus der folgenden Betrachtungen steht die äußere Membran Gram-negativer Bakterien. Diese ist - unabhängig vom letztendlichen Wirkungsort - der erste Angriffspunkt des Peptides bei der Interaktion von antimikrobiellen Peptiden und Bakterien. Diese Interaktion kann eine Perforation oder Permeation bewirken. Die Zerstörung der äußeren Membran ist meist mit der antimikrobiellen Sensitivität der Bakterien auf das Peptid korreliert [Gutsmann *et al.*,2005]. Bei der Perforation der äußeren Membran wird insbesondere zwischen definierten lochartigen Strukturen der interkalierten Substanzen, den Po-

ren, oder kleinen, zeitlich instabilen Strukturen, den Läsionen, unterschieden. Es gibt verschiedene Überlegungen, wie die Wechselwirkungsmechanismen zwischen Doppelschichtmembranen und membranaktiven Substanzen aussehen könnten.

Da die antimikrobiellen Peptide meist eine positive und die LPS Moleküle eine negative Ladung besitzen, spielt bei der ersten Interaktion der Peptide mit der Membran die elektrostatische Wechselwirkung eine wichtige Rolle, da diese, trotz der Helmholtz'schen Schicht, eine hohe Reichweite hat. Es kommt somit zu einer Akkumulation der Peptide an der Membranoberfläche oder zu einer sofortigen Interkalation der Peptide in die Membran. Hierbei spielt die Amphiphilie der Peptide eine wichtige Rolle. Durch eine klare räumliche Trennung hydrophiler und hydrophober Bereiche des Peptides kann sich dieses mit der hydrophoben Seite in Richtung der Membran bzw. der Fettsäuren der Lipide und mit der hydrophilen Seite in Richtung der wässrigen Phasen ausrichten [Dathe *et al.*, 1997].

Bei der Interaktion der antimikrobiellen Peptide mit der Membran spielt die Struktur der Kopfgruppe der LPS Moleküle eine wichtige Rolle. Durch die Länge des Zuckers bzw. Substitution des LPS Moleküls mit Aminoarabino-1,3,6-Desoxyribose, ändert sich neben der Kopfgruppenkonformation sowohl die Gesamtladung als auch die Ladungsverteilung des Moleküls. LPS mit einem längeren Zucker verfügen meist auch über eine höhere Nettoladung. Diese kann dazu führen, dass es zwar zu einer stärkeren elektrostatischen Anziehung des antimikrobiellen Peptides kommt, nicht jedoch zu einer Interkalation des Peptides, da durch die weiter außen in der Zuckerkette liegenden Ladungen das Peptid an diese binden und das Peptid so nicht bis zur Membran vordringen kann [Brandenburg & Wiese, 2004]. Weiter kann eine sterische Hinderung durch Aminoarabino-1,3,6-Desoxyribose, z.B. an das Kdo eine Interkalation des Peptides in die Membran verhindern [Böhling *et al.*, 2006][Gutsmann *et al.*, 2001][Gutsmann *et al.*, 2005]. Beide Situationen führen zu einer verringerten Sensitivität der Bakterien gegenüber dem antimikrobiellen Peptid.

Durch Änderung der Packungsdichte der Kopfgruppen, was durch An- oder Einlagerung der Peptide initiiert werden kann, kommt es auch zu einer Änderung des Platzangebotes für die Fettsäuren, was zur Fluidisierung oder Rigidisierung der Lipiddoppelschicht führt. Dadurch kann es zu mechanischem Stress innerhalb der Membran kommen, wodurch letztendlich die strukturelle Integrität der Membran nachhaltig gestört wird, so dass es zur Ausbildung von Läsionen kommen kann. Diese transienten, temporären

Störungen der Membran können mit Hilfe elektrischer Messungen an rekonstituierten planaren Membrane durch Auftreten zeitlich inhomogener Stromfluktuationen und einer Änderung der Leitfähigkeit nachgewiesen werden.

3 Physikalische und physikochemische Eigenschaften von Membranen

Für die spätere genauere Bewertung der Ergebnisse wird in diesem Kapitel eine kurze Betrachtung der physikalischen und physikochemischen Eigenschaften von biologischen Membranen vorgenommen.

3.1 Ersatzschaltbild einer Membran

Eine Lipiddoppelschicht-Membran besteht aus zwei dem elektrolytischen Puffer zugewandten geladenen oder zwitterionischen Schichten (den Kopfgruppen der Lipide), die durch eine nichtleitende Schicht getrennt ist (die Fettsäureketten der Lipide). Diese Konformation lässt sich in einem einfachen Modell als Plattenkondensator mit einem parallel geschalteten Widerstand betrachten.

Die Lipidmatrix stellt physikalisch einen elektrischen Isolator dar, sofern es nicht zu einer Permeabilisierung durch Peptide oder Proteine kommt. Der Widerstand der gesamten Membran R ist dabei abhängig vom spezifischen Membranwiderstand R_m und der Membranoberfläche A . Es ergibt sich somit

$$R = R_m \cdot A \quad .$$

Der spezifische Membranwiderstand R_m beträgt im natürlichen System zwischen 1 und $10^4 \Omega\text{cm}^{-1}$, während für porenfreie, rekonstituierte Membranen ein Wert von $10^8 \Omega\text{cm}^{-1}$ beschrieben ist. Für eine in dieser Arbeit mittels der Montal-Müller Methode rekonstituierte Lipiddoppelschicht mit einem typischen Durchmesser von $150 \mu\text{m}$ ergibt sich somit ein Widerstand von $600 \text{ G}\Omega$.

Parallel zum Widerstand muss in diesem einfachen Ersatzschaltbild die Membrankapazität betrachtet werden. Für einen Plattenkondensator gilt allgemein

$$C = \varepsilon \varepsilon_0 \frac{A}{d}$$

mit	ε	Dielektrizitätskonstante,
	ε_0	elektische Feldkonstante,
	A	Kondensatorplattenfläche,
	d	Abstand zwischen den Platten.

Zur Vereinfachung wird die spezifische Membrankapazität mit

$$C_m = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{d}$$

eingeführt. Für diese spezifische Membrankapazität wird ein vom Zelltyp unabhängiger Wert von $1 \mu\text{F cm}^{-2}$ beschrieben. Für die mit Hilfe der Montal-Müller-Methode rekonstituierten Membranen dieser Arbeit ergibt sich mit $\varepsilon = 2$, einer Membrandicke von 6 nm und einem Membrandurchmesser von $150 \mu\text{m}$ eine spezifische Membrankapazität von $0,44 \mu\text{F cm}^{-2}$ und somit eine Gesamtkapazität von 100 pF.

3.1.1 Membranpotentiale

Das Modell der Membran als eine Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator erweist sich jedoch als zu simplifiziert. Dies hat seinen Grund darin, dass die molekulare Struktur der einzelnen Komponenten einer Membran zu komplex sind, um mit Hilfe eines einfachen Systems beschrieben werden zu können. Physikalisch betrachtet handelt es sich bei einer Lipiddoppelschicht um eine Grenzfläche zwischen einer elektrolytischen Lösung und den komplexen Kopfgruppen der einzelnen Lipide. Diese Betrachtung führt dazu, dass klassischerweise Grenzflächenpotentiale beschrieben werden, was in diesem biophysikalischen Fall zur Beschreibung von Membranpotentialen führt.

Das gesamte Membranpotential setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, der transmembranen Potentialdifferenz und dem intrinsischen Membranpotential. Das intrinsische Membranpotential bildet sich dabei wiederum aus drei Komponenten (Abbildung 7):

- dem Gouy-Chapman-Potential, welches seinen Ursprung in der Oberflächenladung der Lipidschicht hat,

- dem Dipolpotential, welches aus den Dipolen in den Kopfgruppen resultiert, und
- dem Born-Potential.

Das intrinsische Membranpotential bildet sich nun jeweils durch die additive Überlagerung auf jeder Seite der Doppelschichtmembran der drei Komponenten. Nimmt man einen linear abnehmenden Verlauf des Potentials innerhalb der Membran an, so erhält man einen trapezförmigen Gesamtpotentialverlauf [Schoch&Sargent &Schwyzer,1979].

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Techniken können jedoch nur zwei Komponenten des intrinsischen Membranpotentials während der Versuche variiert werden. Das Gouy-Chapman-Potential kann durch die verschiedenen Lipide unterschiedlicher Gesamtladung bzw. Ladungsverteilung variiert werden. Durch Anlegen einer Spannung an die rekonstituierte Membran kann die transmembrane Potentialdifferenz im Versuch verändert werden.

Im Folgenden sollen daher das Gouy-Chapman und die transmembrane Potentialdifferenz als einstellbare Parameter in den Versuchen kurz genauer betrachtet werden.

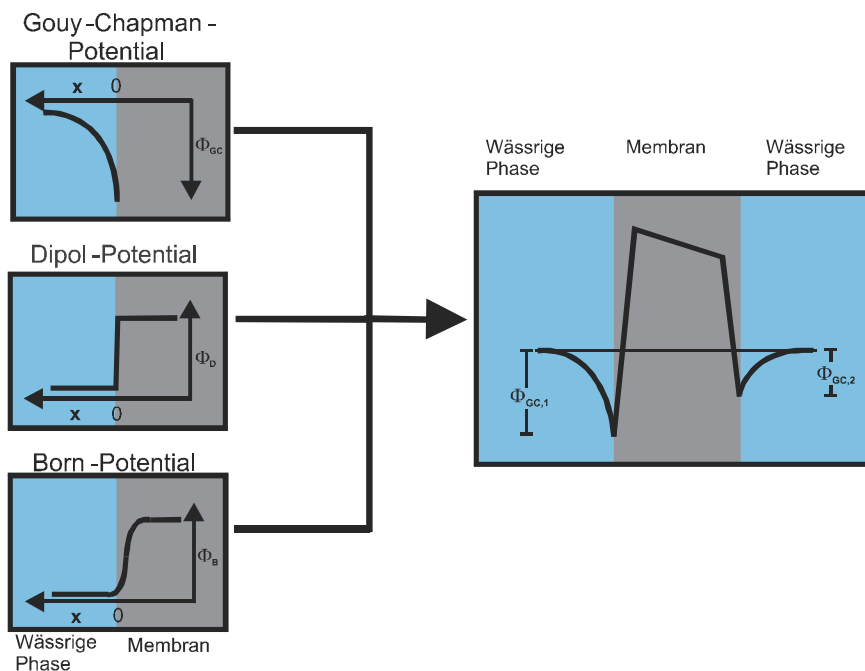


Abbildung 7: Darstellung des Gesamtverlaufes des intrinsischen Membranpotentials.

3.1.1.1 Transmembrane Potentialdifferenz

Im natürlichen System hat die transmembrane Potentialdifferenz, auch Diffusionspotential genannt, ihren Ursprung darin, dass es eine unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle gibt. Die transmembrane Potentialdifferenz U_0 kann mit Hilfe der Goldman-Gleichung berechnet werden. Dabei gilt mit dem ionenabhängigen Permeationskoeffizienten P_i

$$P_i = w_i \frac{RT}{d}$$

mit w_i Beweglichkeit der einzelnen Ionen,

d Dicke der Membran,

und den Ionenkonzentrationen c_i die allgemeine Goldman-Gleichung für das transmembrane Potential (Indizes: a für außen, i für innen, K für Kationen, A für Anionen)

$$U_0 = \frac{RT}{F} \cdot \ln \left(\frac{\sum_{\text{Anionen}} P_A c_A^i + \sum_{\text{Kationen}} P_K c_K^a}{\sum_{\text{Anionen}} P_A c_A^a + \sum_{\text{Kationen}} P_K c_K^i} \right)$$

Für die in dieser Arbeit wichtige äußere Membran Gram-negativer Bakterien wird unter vergleichbaren Bedingungen, wie die Ionenstärke des Puffers, eine Spannung von 26 mV beschrieben [Sen&Hellman&Nikaido,1988]. Für die innere Membran sind mit 100 bis 150 mV erheblich höhere Werte gefunden worden [Bakker &Mangerich,1981]. Die transmembrane Potentialdifferenz wird in dieser Arbeit im weiteren Verlauf transmembrane Spannung genannt, da es sich um einen einstellbaren Geräteparameter handelt und so eine Abgrenzung zum biologischen System sinnvoll erscheint.

3.1.1.2 Gouy-Chapman-Potential

LPS Moleküle bilden auf Grund ihrer Ladungen in der Kopfgruppe eine strukturabhängige Oberflächenladung aus. Diese zieht Gegenionen aus der wässrigen Phase an, die jedoch durch die thermische Bewegung der Ionen in der wässrigen Phase keine reguläre Schicht ausbildet, die zu einer Absättigung der Ladung am LPS führen würde. Es bildet sich jedoch eine diffuse Raumladungszone aus, die nach ihrem Entdecker Helmholtz'sche Doppelschicht genannt wird. Ausgehend von der allgemeinen Poission-Gleichung haben Gouy und Chapman unabhängig von einander eine theoretische Beschreibung des Potentialverlaufes gezeigt.

Mit der Annahme, dass das Oberflächenpotential Φ im Unendlichen Null ist

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \Phi(x) \rightarrow 0$$

und dass das Potential an der Oberfläche einen endlichen Wert Φ_0 annimmt

$$\lim_{x \rightarrow 0} \Phi(x) \rightarrow \Phi_0 ,$$

ergibt sich das Gouy-Chapman-Potential in seiner allgemeinen Form [McLaughlin,1989]:

$$\Phi(x) = \frac{2kT}{e_0} \ln \left(\frac{1 + \alpha \cdot \exp\left(-\frac{x}{l_d}\right)}{1 - \alpha \cdot \exp\left(-\frac{x}{l_d}\right)} \right)$$

mit l_d der sogenannten Debye-Hückel-Länge. Diese stellt den Abstand zur Oberfläche dar, an dem das Potential auf den e-ten Teil abgefallen ist. Diese Länge ist sowohl abhängig von der Konzentration c der Elektrolyte, also auch von der Dielektrizitätskonstante ϵ der Lösung, und wird beschrieben durch:

$$l_d = \frac{1}{F} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon R T}{2c}} .$$

Der Faktor α in der Potentialgleichung lautet dabei:

$$\alpha = \frac{\exp\left(\frac{e_0 \Phi_0}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{e_0 \Phi_0}{2kT}\right) + 1} .$$

Die oben genannte Beschreibung des Potentials ist recht kompliziert und in der Praxis schwer zu nutzen. Eine in der Praxis nutzbare Gouy-Chapman-Gleichung würde man jedoch nur erhalten, wenn man folgende Vereinfachungen annimmt:

- statt separater Ladungen in der Kopfgruppe nimmt man eine einheitliche und homogene Oberflächenladung an,
- die Wechselwirkungen zwischen den Ionen wird vernachlässigt,
- die Existenz von Bildladungen wird ausgeschlossen und
- die Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten im gesamten Volumen wird als homogen angenommen.

Mit der homogenen Oberflächenladungsdichte σ und der Wertigkeit z der Gegenionen vereinfacht sich der Ausdruck des Gouy-Chapman-Potentials an der Membranoberfläche Φ_{GC} zu

$$\Phi_{GC} = \frac{2kT}{z e_0} \operatorname{asinh}\left(\frac{\sigma}{\sqrt{8 \epsilon_0 \epsilon k T N_A c}}\right) .$$

4 Selbstorganisation in biologischen Membranen

Da Lipide amphiphile Moleküle sind, d.h. eine hydrophile Kopfgruppenregion und einen hydrophoben Fettsäurebereich haben, kommt es zu einem Selbstorganisationsprozess. Dieser führt oberhalb einer von ihrer physikochemischen Struktur abhängigen Konzentration, der sogenannten critical micellar concentration (CMC), zur Bildung von Aggregaten unterschiedlicher geometrischer Struktur. Dabei bilden sich bei einer zylindrischen physikalischen Struktur der Lipide sogenannte Liposome. Sind die Lipide konisch, so kommt es zur Ausbildung von komplexen Aggregaten. Die hydrophobe Wechselwirkung ist keine Wechselwirkung in einem physikalischen Sinne, sondern basiert auf der Minimierung der Gibbschen freien Energie, was zu einem spontanen und schnellen Ablauf der Selbstorganisation der Lipide führt.

Diese hydrophobe Wechselwirkung führt dazu, dass Lipide an einer Grenzschicht, wie Wasser-Luft oder Wasser-Öl, monomolekulare Schichten, sogenannte Monoschichten, ausbilden. Der hydrophile Bereich der Moleküle richtet sich dabei in Richtung des Wassers aus, während der hydrophobe Teil sich entgegen dem Wasser und zueinander ausrichtet. Der so energieminierte Zustand ist in dieser Form stabil, da z.B. Löcher einen energetisch ungünstigen Zustand im Vergleich zu einer geschlossenen Monoschicht darstellen.

Die Minimierung der freien Gibbschen Energie wird innerhalb eines wässrigen Mediums erreicht, indem die Lipide Aggregate ausbilden. Innerhalb dieser Strukturen richten die Lipide sich derart gegeneinander aus, dass die hydrophilen Anteile sich zum Medium orientieren und die hydrophoben Anteile sich zueinander ausrichten. Dabei kann es im Fall der Liposome zur Ausbildung des zentralen Strukturmerkmals biologischer Membranen kommen: der Lipiddoppelschicht.

Die Lipidmoleküle können sich innerhalb dieser Doppelschicht lateral und transmembran frei bewegen. Die laterale Wechselrate beträgt dabei etwa 10^6 bis 10^8 s^{-1} , während die transmembrane Wechselrate mit 10^{-8} bis 10^{-4} s^{-1} [Harrison & Lunt, 1977] deutlich niedriger ist. Im natürlichen System sind in diese Doppelschicht Proteine eingelagert. Je nach Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Anteile der Proteine sind diese entweder in die Membran eingelagert oder an die Membran angelagert. Dieses Modell

wird allgemein als Fluid-Mosaic Modell beschrieben und 1972 von Singer und Nicolson vorgeschlagen [Singer & Nicolson, 1972].

4.1 Fluidität in Membranen

Die Fluidität ist ein wichtiger Parameter natürlicher und rekonstituierter Membranen. Die Fluidität wird bestimmt durch den Phasenzustand, in dem sich die Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht bzw. der Monoschicht befinden. Dabei werden für Membranen im wesentlichen zwei Zustände (Phasen) unterschieden: Die Gel- oder β -Phase und die flüssigkristalline oder α -Phase. Im Monolayer entsprechen diese etwas der Liquid-Expanded (LE) und Liquid-Condensed (LC) Phase. Der Übergang zwischen beiden Phasen ist abhängig von der Temperatur - bzw. dem lateralen Druck und der Temperatur im Fall der Monoschicht - der Struktur der Kopfgruppe, sowie der Fettsäureverteilung, deren Sättigungsgrad und verschiedenen Umgebungsvariablen, wie dem pH-Wert oder der Ionenkonzentration des Puffers. Für Lipidaggregate findet der Phasenübergang bei einer bestimmten Temperatur, der Phasenübergangstemperatur T_C statt. Dabei handelt es sich um einen reversiblen Phasenübergang 1. Ordnung, für den gilt, dass die 1. Ableitung der Gibbschen freien Energie G unstetig ist. Diese Phasenübergangstemperatur kann sich bei der Interaktion der Aggregate mit antimikrobiellen Peptiden stark ändern, d.h. es kann zu einer Fluidisierung oder Rigidisierung der Membran kommen.

Bei einer Lipidmonoschicht kommt es ebenfalls zu Phasenübergängen. Bei diesem System gibt es jedoch zwei Parameter: die Temperatur und den lateralen Druck innerhalb den Monolayers. Hält man die Temperatur T während der Variation des Druckes p konstant, so kommt es zu einem Phasenübergang 1. Ordnung, bei dem der Druck bei Verringerung der Fläche konstant bleibt. Dabei ist zu beachten, dass in dem zweidimensionalen System des Monolayers nicht nur die Kopfgruppen betrachtet werden müssen, sondern auch die Konformationsänderung der Fettsäuren, so dass thermodynamisch ein Volumen V betrachtet werden muss. Dies wird beschrieben durch

$$\left(\frac{\partial G}{\partial p}\right)_T = V \cdot$$

4.2 Domänenbildung in Lipidmono- und doppelschichten

In diesem Kapitel sollen kurz die thermodynamischen Prinzipien der Domänenbildung durch Phasentrennung erläutert werden. Das thermodynamische System besteht dabei aus k Komponenten und eine Komponente wiederum aus r Phasen. Diese können z.B. zwei unterschiedliche Lipide (Komponenten) darstellen, die sich jeweils in zwei Phasen, wie fluide und rigide, innerhalb einer Komponente befinden.

Das chemische Potential einer Komponente in einer bestimmten Phase mit dem chemischen Potential unter Standarddruck μ^0 und der Molfraktion M lautet:

$$\mu = \mu^0 + RT \ln M \quad .$$

Befindet sich eine Komponente des Systems im Phasenübergang, so gilt für alle Phasen die Gleichheit der intensiven Zustandsgrößen

$$\begin{aligned} T_{1,\dots}, T_k &= T \\ p_{1,\dots}, p_k &= p \quad . \\ \mu_{1,\dots}, \mu_k &= \mu \end{aligned}$$

Betrachtet man nun ein zweiphasiges System im Phasenübergang mit den Phasen fluide und rigide, so folgt

$$\mu_{fluide}^0 + RT \cdot \ln M_{fluide} = \mu_{rigide}^0 + RT \cdot \ln M_{rigide} \quad .$$

Für die freie Gibbschen Energie G gilt weiter

$$\Delta G = \mu_{fluide}^0 - \mu_{rigide}^0 \quad .$$

Somit hängt die freie Gibbschen Energie in diesem System nur noch von den Molverhältnis der beiden Phasen ab

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{M_{fluide}}{M_{rigide}} \right) \quad .$$

Um eine Grenzfläche zwischen zwei Phasen in einem thermodynamischen System aufzubauen, muss jedoch Energie aufgewendet werden. Dazu wird die Gibbsche Fundamentalformel für Grenzflächensysteme im Phasenübergang, also im thermodynamischen Gleichgewicht, betrachtet:

$$\Delta G = -S dT + V dP + \gamma dA + \sum_{i=1}^r \mu_i dn_i$$

mit γ Oberflächenspannung,
 A Fläche.

Der Term γdA wird auch die Grenzflächenarbeit genannt, wobei man bei einem zweidimensionalen System eher von einer Grenzlinienarbeit (allgemein bekannt als *line tension*) spricht.

Diese Betrachtung ist jedoch bei geladenen Lipiden, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, nicht ausreichend. McConnell hat eine thermodynamische Erklärung für ein 2-Phasensystem aufgestellt [McConnell,1991]. Es gibt ein thermodynamisches System mit zwei Phasen deren Dipolmomentdichten μ_{fluide} und μ_{rigide} sind. Für die Dipolmoment-Dichtedifferenz gilt somit $\mu = \mu_{\text{fluide}} - \mu_{\text{rigide}}$. Teilt sich nun eine Phase in weitere Domänen, die jeweils immer kleiner werden, so reduziert sich μ immer weiter, bis ein Gleichgewicht erreicht ist, in dem für die freie Energie F (hier wird ein anderer Buchstabe gewählt, um deutlich zumachen, dass es sich nicht notwendigerweise um die freie Gibbsche Energie G handelt) gilt:

$$F = F_{el} - F_{\gamma}$$

mit F_{el} Elektrostatische Energie
 F_{γ} Energie der Grenzlinienspannung.

Nimmt man an, dass beide Phasen isotropisch sind und es definierte Grenzen zwischen den Domänen gibt, so kann die freie Energie F umgeschrieben werden in die Summe der freien Energien einer Domäne i (f_i) und die freien Energien der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen zwei einzelnen Domänen i und j ($f_{i,j}$):

$$F = \sum_i f_i + \sum_{i < j} f_{i,j} .$$

Das System hängt somit nur noch von der elektrostatischen Energie und der Grenzlinienenergie ab. Betrachtet man die elektrostatische freie Energie einer isolierten Domäne, zeigt sich folgendes Flächenintegral:

$$f_{el} = \frac{1}{2} \mu^2 \iint |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|^{-3} dA dA' ,$$

mit $\mathbf{r} - \mathbf{r}'$ Distanz zwischen zwei Punkten innerhalb einer Domäne.

Dieses Integral kann mittels des Greenschen Satzes gelöst werden, sofern man einen kleinen Abstand δ zwischen den Phasen und einige Vereinfachungen einführt [McConnell, 1991]. Es gibt sich somit für die gesamte freie Energie der Monoschicht

$$F = 2\pi R n \left(\mu^2 \ln \frac{e^2 \delta}{4R} + \lambda \right) ,$$

mit R Radius einer einzelnen Domäne,
 n Anzahl einzelner Domänen,
 λ Grenzlinienenergie.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass durch die Bildung von Domänen in einem thermodynamisch im Gleichgewicht liegenden System Energie durch die Phasenseparation frei wird, aber auch Energie für die Grenzlinien der Domänen verbraucht wird. Das Gleichgewicht dieser Energien führt zu den für die verschiedenen Lipide charakteristischen Domänenformen.

Eine weitere Frage ist, wie viele Freiheitsgrade (intensive Größen) notwendig sind, ein System mit einer bestimmten Anzahl an Komponenten k und einer bestimmten Anzahl an Phasen r zu beschreiben. Da jede Komponente und jede Phase ein chemisches Potential aufweist, gibt es in der Gesamtheit $k(r-1)$ Gleichungen für die chemischen Potentiale. Nimmt man nun an, dass die Temperatur T und der Druck p im System gleich sind, so ergeben sich zwei weitere Variablen. Es bleiben noch $r(k-1)$ unabhängige Kon-

zentrationen für r Phasen. Zusammenfassend ergibt sich somit für die Anzahl der Freiheitsgrade f

$$f = -k(r-1) + 2 + r(k-1) = k - r + 2 \quad .$$

Dies ist die Gibbsche Phasenregel. Für ein typisches System dieser Arbeit mit zwei Lipiden und zwei Phasen ergeben sich somit zwei Freiheitsgrade. Es sind somit zwei intensive Zustandsgrößen, wie z.B. der Druck und die Temperatur des Systems, notwendig, um dieses System in einem bestimmten thermodynamischen Zustand zu beschreiben.

5 Methoden und Material

5.1 Übersicht über die Rekonstitutionssysteme

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Rekonstitutionsysteme zur Präparation biologischer Modellmembranen verwendet. Diese sollen im folgenden Überblick kurz beschrieben werden. Die genauere Beschreibung der einzelnen Systeme erfolgt in den jeweiligen Stellen in den nachfolgenden Kapiteln.

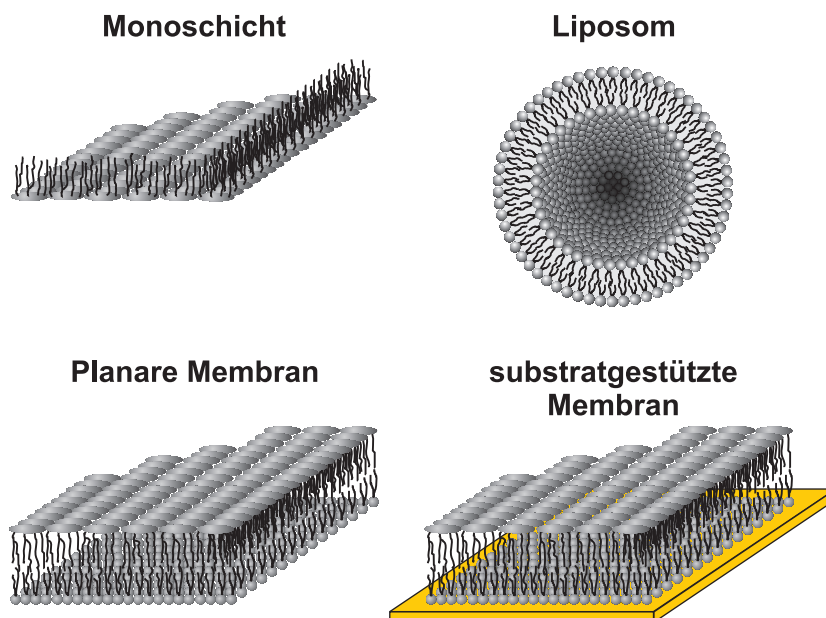


Abbildung 8: Übersicht über die verwendeten Rekonstitutionsmodelle

Monoschichten stellen die einfachste Möglichkeit dar, biologische Membranen zu rekonstituieren. Liposome bzw. Aggregate bilden im Bezug auf die Lipidverteilung symmetrische Doppelschichtmembranen aus, während mit Hilfe substratgestützter und planarer Membranen auch asymmetrische Membranen hergestellt werden können.

Die einfachste Lipidmatrix, die Lipidmonoschicht, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Filmwaage präpariert (siehe S. 37) und mittels der Langmuir-Blodgett-Technik (siehe S. 40) als substratgestützte Lipidmonoschichten mit der Rasterkraftmikroskopie verwendet, um die Domänenformation sowie die Interaktion zwischen hydrophoben

Oberflächen zu untersuchen. Weiter können mittels der Langmuir-Blodgett-Technik symmetrische und asymmetrische Lipiddoppelschichten auf einem Substrat präpariert werden. Nur symmetrische Lipiddoppelschichten lassen sich mittels der Aggregatfusion (siehe S. 59) auf einem Substrat herstellen. Diese Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Untersuchungen an Lipidaggregaten, die in Anwesenheit von antimikrobiellen Peptiden präpariert wurden, durchzuführen. Weiter wurden Aggregate in verschiedenen Puffern für spektroskopische Methoden (siehe S. 60) verwendet. Freistehende asymmetrische Membranen zur Rekonstitution der äußeren Membran Gramnegativer Bakterien lassen sich mit der Montal-Müller-Methode herstellen (siehe S. 64). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik verwendet, um die Änderung der Kapazität und die Perforation von Modellmembranen durch antimikrobielle Peptide zu untersuchen.

5.2 Filmwaage

Lipide bilden auf einer wässrigen Phase Monoschichten aus. Der sich durch Kompression der Monoschicht ausbildende laterale Druck Π ist die Differenz zwischen der Oberflächenspannung von reinem Wasser ($\gamma_0 = 72 \text{ mNm}^{-1}$) und der Oberflächenspannung des Lipidfilmes (γ). Die Messung dieser Differenz wird mit einem sogenannten Wilhelmy-Plättchen durchgeführt.

Ändert sich die Oberflächenspannung der Oberfläche, so ändert sich die Auslenkung des Wilhelmy-Plättchens. Die Kräfte teilen sich dabei auf in: (i) die Kräfte in Richtung der wässrigen Lösung, wie die Oberflächenspannung und die Gravitationskraft und die (ii) entgegengesetzte Auftriebskraft, die aus dem verdrängten Wasservolumen resultiert. Für ein Plättchen mit den Abmessungen h, b und t und einer Materialdichte ρ_P , welches mit einer Tiefe von d in einer Flüssigkeit der Dichte ρ_F eingetaucht ist, ergibt sich unter Berücksichtigung des Kontaktwinkels Θ die Kraft

$$F = \rho_P g h t b + 2 \gamma (t + b) \cos \Theta - \rho_F g t b d \quad .$$

Wird ein vollständig befeuchtetes Plättchen verwendet (mit $\Theta = 0$), so ist die Änderung der Kraft bei Vernachlässigung der Dicke t des Plättchens (es wird ein dünnes Plättchen

verwendet, derart, dass t vernachlässigbar klein wird) nur noch von der Änderung der Oberflächenspannung $\Delta\gamma$ abhängig:

$$\Delta F = 2 \Delta\gamma b \rightarrow \Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2b} .$$

Es ist somit möglich, mit Hilfe eines kapazitiven Kraftmessers den lateralen Druck des Monolayers zu messen.

5.2.1 Aufbau der Filmwaage

Die in dieser Arbeit verwendete Filmwaage (Munitech, München, Deutschland) (Abbildung 9) besteht aus einem Teflontrog mit einer integrierten Heizschlange (alle Versuche dieser Arbeit wurden bei konstant 20°C durchgeführt) und einer beweglichen Barriere,

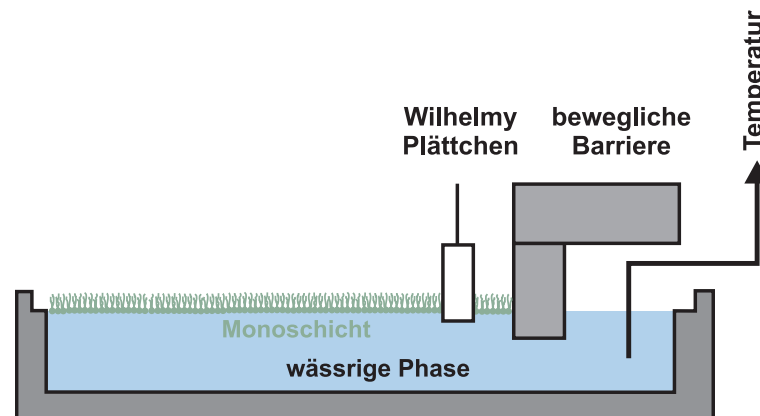


Abbildung 9: Prinzipeller Aufbau der verwendeten Filmwaage

in die der Messkopf für das Wilhelmy-Plättchen integriert ist. Die Barriere wird mittels eines Computers gesteuert. Das System kann um eine weitere senkrechte bewegliche Achse erweitert werden, an dem eine Halterung für Substrate angebracht ist, um kontrolliert über die Steuerung des Computers Langmuir-Blodgett-Filme herzustellen.

5.2.2 Polymorphie von Monoschichten

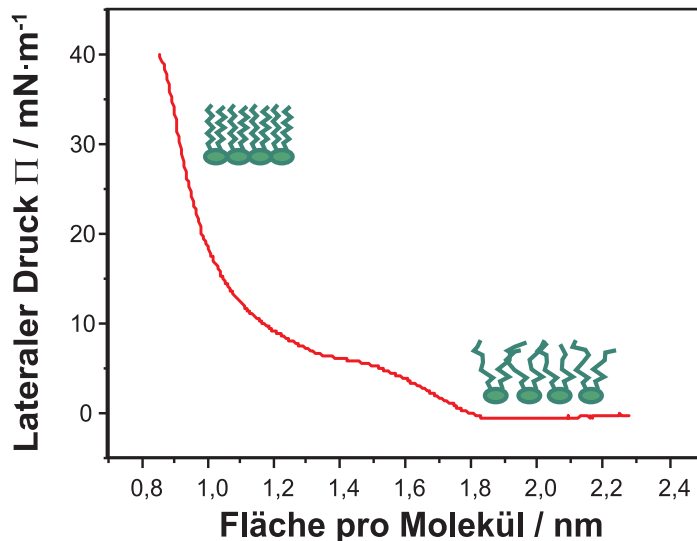


Abbildung 10: Isotherme einer Lipidmonoschicht an einer Filmwaage

Monoschicht bei konstanter Temperatur aus der Gasphase heraus über die bewegliche Barriere der Filmwaage komprimiert und der laterale Druck fortwährend gemessen.

Dabei bilden sich vier Zustände der Monoschicht aus. Liegt kein lateraler Druck vor, so steht den filmbildenden Molekülen eine große Fläche zu Verfügung. Die Fettsäuren der Lipide weisen in diesem Zustand eine geringe Ordnung und eine Flexibilität auf, daher wird dieser Zustand auch als Gaszustand beschrieben. Wird der Film weiter komprimiert, so bildet sich der flüssig-expandierte Zustand, in dem ein Teil der Fettsäuren ausgerichtet sind und die Beweglichkeit der Fettsäureketten eingeschränkt ist. In diesem Bereich ist die Kompressibilität des Filmes schon eingeschränkt, so dass es zu einem Anstieg des lateralen Drucks kommt. Durch die zunehmende Verringerung der Filmfläche kommt es zu einem Phasenübergang erster Ordnung in den flüssig-kondensierten Zustand. Der Filmdruck bleibt während des Phasenübergangs konstant, und die Fettsäureketten richten sich weiter aus, bis diese dicht gepackt sind und der kondensiert-feste Phasenzustand erreicht wird. In diesem Bereich nimmt der laterale Druck stark zu, bis der Film schlussendlich kollabiert.

Der laterale Druck Π einer Monoschicht hängt von der Oberflächenkonzentration n_i und der Fläche A des Monolayers ab:

$$\Pi = \frac{n_i}{A}$$

Beschrieben wird das Kompressionsverhalten von Lipid-Monoschichten üblicherweise mit Druck-Flächen Isothermen (Abbildung 10). Dabei wird die

Im Folgenden soll kurz erläutert werden, wie die Lipidmonoschichten in dieser Arbeit präpariert wurden. Zunächst wird der Lipidfilm auf einen Druck von 20 bis 30 mNm^{-1} komprimiert. Dies sind Werte, die dem äquivalenten Druck in einer biologischen Membran entsprechen [Blume,1979] [Marcelja,1974]. Ist die Komprimierung der Lipidmonoschicht beendet, so wird über einen Regelkreis der Druck für 60 min konstant gehalten, um zu garantieren, dass der Film stabil ist und die Fläche sich nicht mehr ändert. In einem weiteren Schritt wird dann eine definierte Menge eines antimikrobiellen Peptides unter den Film gespritzt. Kommt es nun zu einer Interaktion oder Interkalation des Peptides an bzw. in eine Monoschicht, so vergrößert sich die Fläche der Monoschicht bei konstantem Druck.

5.2.3 Langmuir-Blodgett-Filme

Um einen Lipidfilm von der wässrigen Phase auf ein festes Substrat zu überführen, wurde in dieser Arbeit die Langmuir-Blodgett-Technik genutzt [Blodgett &Langmuir,1937] [Langmuir &Schaefer,1938]. Der Vorgang soll hier kurz erläutert werden.

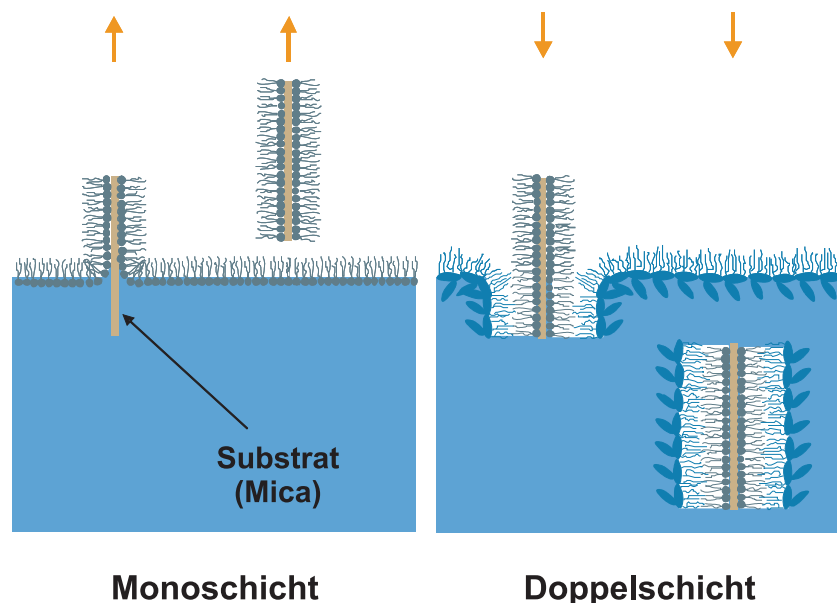


Abbildung 11: Prinzip der Langmuir-Blodgett-Technik

Als Substrat wurde Mica (siehe S. 58) verwendet. Ein Mica-Stück mit einer Größe von etwa 1 cm Breite und 2 cm Länge wird dazu vor der Präparation der Monoschicht

möglichst tief in die wässrige Phase eingetaucht. Zieht man nun das Mica-Stück mit Hilfe der senkrechten Achse der Filmwaage und einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$ durch den Lipidfilm wieder heraus, so wird die Monoschicht auf das Substrat übertragen. Eine Kontrolle des Übertrages geschieht dabei über die Abnahme der Monoschichtfläche auf der wässrigen Phase (Abbildung 11). Da Mica hydrophil ist, binden die Kopfgruppen der Lipidmoleküle an das Mica, und die hydrophoben Fettsäuren ordnen sich in Richtung Luft an. Die Orientierung des Lipidrückgrates ist dabei jedoch nicht senkrecht zum Substrat, sondern in einem Winkel, der sowohl vom Substrat, als auch von der Kopfgruppe selbst abhängt. Für Alkanthiolate auf Gold ist beispielsweise ein Neigungswinkel von 30 bis 35° in Bezug zur Substratnormalen beschrieben [Bushan,2004].

Eine Substrat-unterstützte Doppelschicht (*solid-supported bilayer*) kann durch abermaliges Präparieren eines zweiten Monolayers auf der wässrigen Phase erzeugt werden. In dieser Arbeit wurden dafür beide Monoschichten ohne Peptidzugabe präpariert. Das mit einer Monoschicht präparierte Mica-Stück wird dann aus der Luft in die wässrige Phase durch die Monoschicht geführt. Dabei orientierten sich die Fettsäuren des auf der Filmwaage präparierten Filmes in Richtung der Fettsäuren der auf dem Mica gebundenen Lipide (Abbildung 11). Diese Doppelschicht kann nun nur noch unter Wasser mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht werden, da die Doppelschichten an Luft nicht stabil sind. Diese Membranen können sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch aufgebaut werden, da die beiden Monoschichten auf der Filmwaage separat nacheinander präpariert werden.

5.3 Rasterkraftmikroskopie

Abbildung 12 zeigt das Prinzip eines Rasterkraftmikroskopes, auch *atomic force microscope*; AFM [Binnig&Quate &Gerber,1986] genannt. Das Rasterkraftmikroskop ist eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskopes (auch *scanning tunnel microscope*; STM), welches 1982 von Binnig und Rohrer vorgestellt wurde [Binnig&Rohrer &Gerber,1982]. Mit dem STM ist es möglich, elektrisch leitende Oberflächen mit bis zu atomarer Auflösung abzubilden. Die dafür notwendige Regelgröße (vergleiche S. 55) stellt der zwischen einer Spitze und der zu messenden Oberfläche fließende quantenmechanische Tunnelstrom dar. Die Regelgröße bei einem Rasterkraftmikroskop unter-

scheidet sich im Vergleich grundlegend: Als Regelgröße wird hier die Kraft zwischen einer Tastspitze an einem Federbalken (dem Cantilever) und der Oberfläche des Messobjektes genutzt. Durch Regelung des Abstands zwischen der Spitze und der Probe wird die Kraft konstant gehalten, woraus ein Höhenbild resultiert. Durch die mechanische Regelgröße ist es möglich, auch nichtleitende Oberflächen, z.B. biologische Proben, in Luft oder gar in Wasser zu untersuchen.

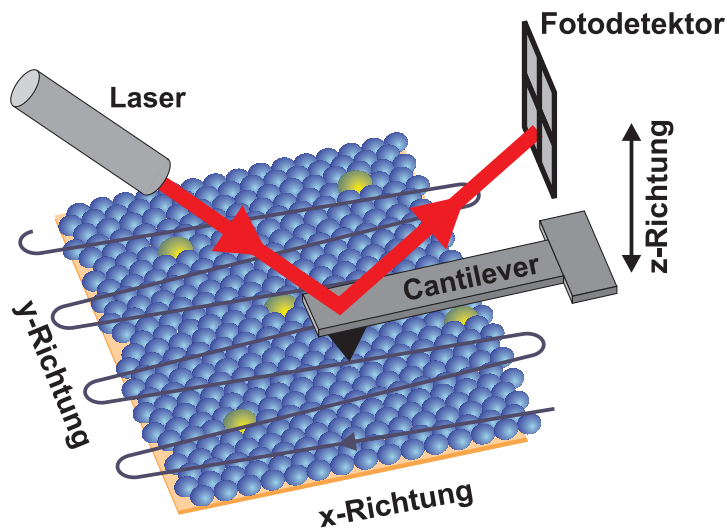


Abbildung 12: Darstellung des Prinzips des Rastkraftmikroskopes

Viele Begriffe der Rasterkraftmikroskopie sind durch das Englische geprägt und finden auch im Deutschen ihre Anwendung und werden daher in dieser Arbeit nicht übersetzt.

5.3.1 Cantilever

Ein zentrales Element des Rasterkraftmikroskopes ist der eingesetzte Cantilever (Abbildung). Mit diesem entscheidet sich sowohl die Qualität aber auch die Durchführbarkeit der Messungen. Zur Auswahl des zu verwendenden Cantilevers gibt es mehrere zentrale Kriterien. Um das System möglichst unempfindlich gegenüber externen Störungen wie Gebäudeschwingungen (unterhalb

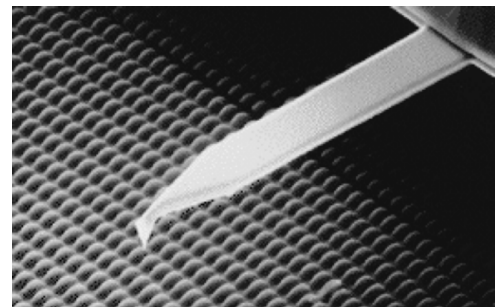


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Cantilevers. Am Ende eines Federbalkens ist die Spitze zu erkennen (Bild Olympus).

von 100 Hz) zu machen und um eine möglichst hohe Anzahl an Proben-Interaktionsstellen pro Zeiteinheit zu erreichen, was zu einer hohen Scan-Rate führt, ist eine hohe Resonanzfrequenz des Cantilevers wünschenswert. Um diese jedoch zu erreichen, müssen die Cantilever einerseits leicht (im ng-Bereich) und andererseits hart (Federkonstante $> 10 \text{ N/m}$) sein. In wässriger Umgebung ist es meist jedoch auf Grund der Empfindlichkeit der Messobjekte sinnvoll, eher weiche ($< 3 \text{ N/m}$) Cantilever zu verwenden, um Schäden an den Messobjekten durch harte Cantilever zu verhindern. Mit diesen weichen Cantilevern ist schnelles Messen, speziell im AC-Modus (siehe S. 45), nicht mehr möglich. Die meisten kommerziell erhältlichen Cantilever werden aus Silizium oder Siliziumnitrid photolithographisch hergestellt und auf der Rückseite mit Gold oder Aluminium beschichtet, um die Reflektion zu verbessern. Für bestimmte Untersuchungen, wie z.B. die Messung von Interaktionskräften einzelner Moleküle, werden Cantilever mit chemischen Verbindungen, die an die Spitze des Cantilevers präpariert werden, funktionalisiert. Hierfür kann es sinnvoll sein, Cantilever mit einer kompletten Goldbeschichtung zu verwenden.

5.3.2 Wechselwirkung zwischen Probe und Cantileverspitze

Zwei Kräfte treten maßgeblich bei der Interaktion zwischen der Cantilever-Spitze und nichtleitenden bzw. nichtmagnetischen Proben auf: die van der Waals-Kraft als anziehende (attraktive) Kraft und das quantenmechanische Pauli-Prinzip als abstoßende (repulsive) Kraft.

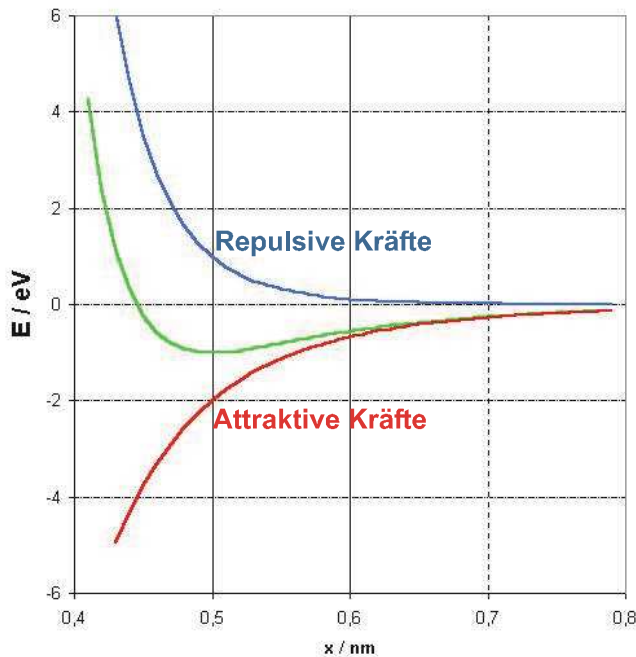


Abbildung 14: Verlauf der auf die Cantileverspitze wirkenden Kräfte in Abhängigkeit des Abstandes x zur Probenoberfläche: Die attraktiven van der Waals-Kräfte sind in rot, die repulsiven Pauli-Prinzip-Kräfte in blau dargestellt. Das daraus resultierende Lennard-Jones-Potential ist in grün eingezeichnet.

Nähert man die Cantilever-Spitze langsam an die Probe an, so wird diese zunächst durch die langreichweitige, anziehende van der Waals-Kraft in Richtung Probe ausgelenkt. Diese anziehende Kraft wird durch die gegenseitige Induktion von Dipolmomenten in den Atomverbänden der Spitze des Cantilevers und der Probe induziert. Nähert man die Cantilever-Spitze weiter der Probe an, so wird eine abstoßende Kraft gemessen. Diese resultiert aus dem Pauli-Prinzip, welches aussagt, dass die doppelte Besetzung eines Quantenzustandes verboten ist. Durch die Annäherung der Orbitale der Cantilever-Spitze und der Probe führt das Pauli-Prinzip zu einer kurzreichweitigen abstoßenden Kraft. Die Überlagerung dieser beiden Kräfte führt auf das Lennard-Jones-Potential (Abbildung 14) mit x als Abstand zwischen Cantilever-Spitze und Probe

$$V(z) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{x} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{x} \right)^6 \right] .$$

Der sogenannte Lennard-Jones-Durchmesser σ und die Lennard-Jones-Energie ε sind Materialkonstanten. Für $z < \sigma$ steigt der $1/x^{12}$ Teil stark an. Dies beschreibt die abstoßende Kraft resultierend aus dem Pauli-Prinzip, während der zweite Term die attraktiven Kräfte der van der Waals-Wechselwirkung mit $1/x^6$ beschreibt.

5.3.3 Abbildungsmodi

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, die Topografie des Messobjektes mit dem AFM aufzunehmen: Den statischen Modus (auch *contact mode*, *repulsive* oder *DC-mode*) [Binnig *et al.*,1986] und den dynamischen Modus (auch *tapping mode*, *noncontact* oder *AC-mode*).

Im *contact mode* tritt die am Ende des Cantilevers liegende Spitze in direkten Kontakt mit der Probenoberfläche. Aufgrund der aus dem Pauli-Prinzip resultierenden repulsiven Kraft kommt es beim Kontakt des Cantilevers mit der Oberfläche zu einer Verbiegung des Cantilevers, der *deflection*. Diese kann nun mittels einer Regelung konstant halten (*constant force mode*) oder direkt aufgezeichnet (*constant height mode*) werden.

Im dynamischen Modus wird der Cantilever mittels eines piezoelektrischen Kristalls (Piezo) in Schwingung versetzt [Martin&Williams &Wickramasinghe,1987]. Durch die Einwirkung attraktiver (*attractive mode*) und repulsiver Kräfte (*repulsive mode*) [Roes&Seydel &Gutsmann,2005] auf die Cantileverspitze verschieben sich die Amplitude und die Phase zwischen schwingendem Cantilever und dem Anregungspiezo. Mittels einer Regelung hält man die Amplitude konstant und erhält so die Topografie der Oberfläche.

Beiden Modi ist gemein, dass die Rasterung der Oberflächentopografie in x-y-Richtung durchgeführt wird, um ein Bild zu erzeugen. Zu beachten ist ebenfalls, dass nicht notwendigerweise die direkte Topographie des Messobjektes erfasst wird, sondern nur ein Äquikraftbild der Interaktion zwischen der Cantileverspitze und dem Objekt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung sogenannter Lateralkraftbilder. Dazu wird die Probe in einem rechten Winkel unter dem Cantilever bewegt und mittels der vierteilten Photodiode die Torsion des Cantilevers aufgezeichnet und als Bild dargestellt. Diese Methode hat den Vorteil, dass man zusätzliche Informationen über die Größenordnung der Wechselwirkung zwischen Probe und Cantileverspitze erhält. Der Messmodus kann daher gerade bei funktionalisierten Cantilevern von großem Interesse sein.

5.3.3.1 Dynamischer Modus

Hauptsächlich wurde versucht, die Messungen in dieser Arbeit im dynamischen Modus durchzuführen, um möglichst wenige Artefakte an den Proben zu haben. Daher soll dieser Modus im Folgenden näher erläutert werden.

Der dynamische Modus zeichnet sich dadurch aus, dass der Cantilever in Oszillation versetzt wird. Die Cantilever-Spitze berührt während der Messung nicht notwendigerweise die Oberfläche der Probe. Die klassische Beschreibung eines schwingenden Cantilevers ist der gedämpfte, harmonische Oszillator. Für den den Cantilever in z-Richtung treibenden Piezo gilt dabei

$$z_p = A_p \cdot \cos(\omega_p \cdot t)$$

mit :

A_p	Amplitude des Piezos,
ω_p	Kreisfrequenz des Piezos.

Nimmt man an, dass der Cantilever dem Hookeschen Gesetz folgt, und führt eine Reibungskraft mit dem Dämpfungskoeffizienten α proportional zur Cantilevergeschwindigkeit ein, so ergibt sich unter Beachtung des Newtonschen Gesetzes die folgende Differentialgleichung für die zeitabhängige z-Position der Cantileverspitze $z(t)$:

$$m \frac{d^2}{dt^2} z(t) = -\alpha \frac{d}{dt} z(t) - k \frac{d}{dt} z(t) - k_p z_p(t) .$$

Für die Schwingungsgüte Q des Cantilevers gilt allgemein

$$Q = \frac{m \omega_0}{\alpha}$$

mit:

m	Masse des Cantilevers,
ω_0	Resonanzfrequenz des Cantilevers.

Die Güte ist ein Maß für die mechanische Eigendämpfung des Systems und gibt an, wie schnell die Amplitude des Cantilevers auf den 1/e-Teil abgefallen ist, nachdem die Anregung abgeschaltet wurde. Aus der Masse und der Federkonstante k ergibt sich die Resonanzfrequenz eines freischwingenden Cantilevers mit

$$\omega_0^2 = \frac{k}{m}.$$

Fügt man ω_0 und Q in die oben aufgestellte Differentialgleichung ein, so ergibt sich

$$\frac{d^2}{dt^2} z(t) + \left(\frac{\omega_0}{Q}\right) \cdot \frac{d}{dt} z(t) + \omega_0^2 \cdot z(t) = A_p \cdot \omega_0^2 \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung führt zu einer Trennung in einen Gleichgewichtsteil und einen Einschwingteil. Nach $2Q$ Schwingungen wird der Gleichgewichtszustand erreicht, und es ergibt sich eine Phasenverschiebung ϕ zwischen Anregung und der Schwingung des Cantilevers:

$$z_{\text{gw}}(t) = A_0 \cdot \cos(\omega_0 \cdot t + \phi).$$

Im Zeitraum des Einschwingens gilt folgende Lösung der Differentialgleichung

$$z_{\text{es}}(t) = A_0 \cdot \exp\left(\frac{\omega_0^2 \cdot t}{2Q}\right) \cdot \sin(\omega_0 t + \phi).$$

Durch Einsetzen der Gleichgewichtslösung in die Differentialgleichung kann die Amplitude und Phase in Abhängigkeit der Anregungsfrequenz mit

$$A_0 = \frac{A_p \cdot Q \cdot \omega_0^2}{\sqrt{\omega^2 \omega_0^2 + Q^2 \cdot (\omega_0^2 - \omega^2)^2}}$$

$$\phi = \arctan\left(\frac{\omega \omega_0^2}{Q (\omega_0^2 - \omega^2)}\right)$$

berechnet werden.

Dabei ergibt sich, dass die Amplitude das Maximum nicht bei der Resonanzfrequenz ω_0 , wie dies bei einem klassischen freischwingenden Oszillator der Fall ist, erreicht. Diese Verschiebung des Amplitudenmaximums der Resonanzfrequenz resultiert aus der Dämpfung des Systems, bei wenig gedämpften Cantilevern mit Werten $Q > 100$ ist diese Verschiebung jedoch zu vernachlässigen.

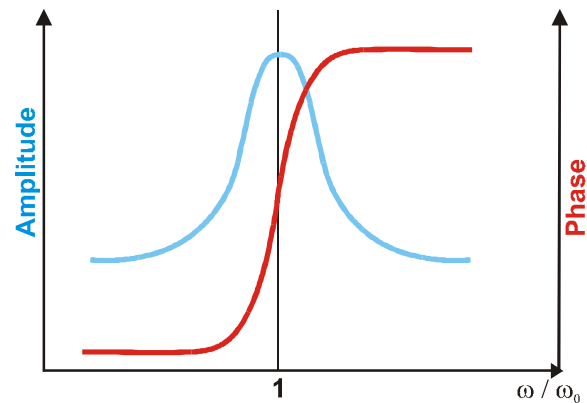


Abbildung 15: Amplituden- und Phasenverhalten eines freischwingenden Cantilevers. Die Amplitude erreicht ihr Maximum in der Resonanzfrequenz, während die Phase bei dieser Frequenz um 90° verschoben ist.

Ist der Cantilever in Resonanz, so ergibt sich eine Phasenverschiebung zwischen dem Treiberpiezo und dem Cantilever von 90° (Abbildung 15). Wirken auf den Cantilever jedoch anziehende (attraktive) Kräfte, so erhöht sich die „virtuelle“ Masse des Cantilevers, die Resonanzfrequenz verschiebt sich zu tieferen Frequenzen. Betrachtet man die Phase bei der festen Frequenz ω_0 , so verschiebt sich diese zu Werten oberhalb von 90° , dieser Modus wird attraktiver Modus genannt. Kommt es jedoch zu Interaktion mit abstoßenden (repulsiven) Kräften, so verringert sich die „virtuelle“ Masse, und die Phase erreicht Werte unterhalb von 90° . Dieser Modus wird repulsiver Modus genannt. Da es bei der Nutzung attraktiver Kräfte nicht zum direkten Kontakt mit der Probe kommt, nennt man diesen Modus auch *non contact mode*.

5.3.4 Kraftkurven und Kraftkarten

Rasterkraftmikroskope können nicht nur zur Aufnahme von Höhen-, Phasen- oder Lateralkraftbildern verwendet werden, sondern auch zu kraftspektroskopischen Messungen. Dazu werden Kraft-Abstands-Kurven (kurz: Kraftkurven) erzeugt, die die Kraft zwischen Cantilever-Spitze und Probe repräsentieren und an denen verschiedene Messparameter, wie z.B. Elastizitätsmodula oder Adhäsionskräfte ausgewertet werden können. Die Anwendung dieser Kurven ist vielfältig und umfasst u.a. Bindungsmessung an einzel-

nen Molekülen, die Bestimmung der Elastizität von Zellen [Hassan, E. *et al.*, 1998] oder die Bestimmung der Schichtdicke von Membranen.

Die x-y-Position des Cantilevers über der Probe wird für diese Messungen konstant gehalten und der Cantilever mit Hilfe des z-Piezos in Richtung der Probe bewegt. Dabei wird die Auslenkung des Cantilevers (im Englischen *deflection*) und die Ausdehnung des z-Piezos mit Hilfe eines LVDT (*Linear Variable Differential Transformer*) aufgezeichnet. Für eine sinnvolle Auswertung der Messdaten müssen sie von abstrakten Spannungswerten in reale Längswerte und Kraftwerte transformiert werden, so dass sogenannte Kraft-Abstands-Kurven berechnet werden können. Dazu müssen zunächst die in Volt gemessenen Deflection-Werte (Defl [V]) in Deflection-Werte in m bzw. nm (Defl [nm]) umgewandelt werden. Hierzu wird die invertierte optische Cantilever-Sensitivität (InvOLS [nm/V]) bestimmt. Dazu wird der Cantilever im Kontakt mit einer harten Oberfläche zunehmend weiter durchgedrückt und die Steigung der daraus resultierenden Gerade bestimmt. Nun kann die Auslenkung des Cantilevers mittels

$$Defl[nm] = Defl[V] \cdot InvOLS[nm/V]$$

bestimmt werden. Im nächsten Schritt wird die Federkonstante k des Cantilevers mit Hilfe des thermischen Rauschens (siehe auch S. 51) bestimmt, so dass die auf den Cantilever wirkende Kraft F mittels

$$F[pN] = Defl[nm] \cdot k \left[\frac{pN}{nm} \right]$$

bestimmt werden kann. Die Auslenkung des z-Piezos wird mit Hilfe eines LVDT bestimmt. Diese Position ist jedoch die Position des Kopfes des Cantilever-Halters und nicht die der Cantilever-Spitze, diese kann jedoch mittels Einführung der Variablen *Seperation* (Sep [nm]) über

$$Sep[nm] = LVDT_z[nm] - Defl[nm]$$

bestimmt werden.

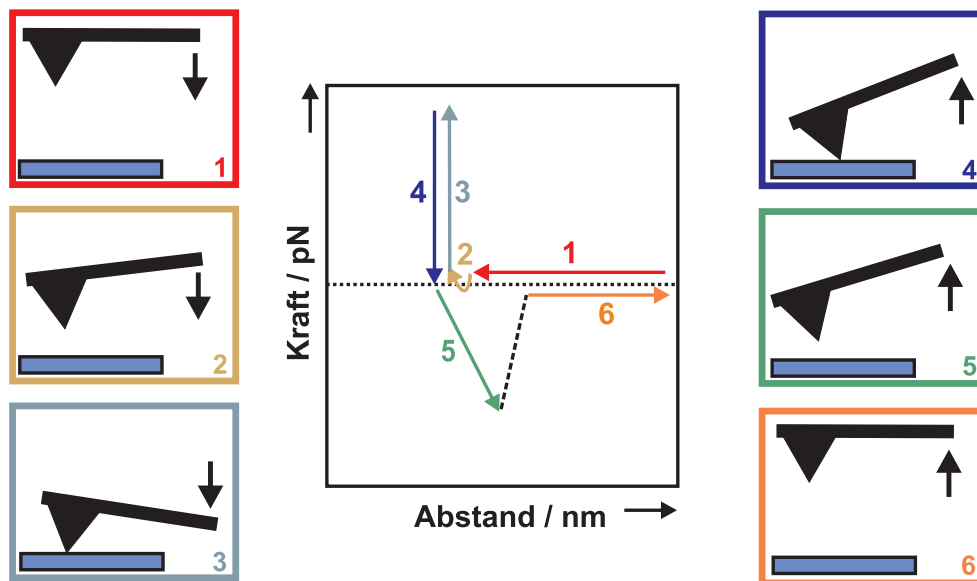


Abbildung 16: Grafik zur Durchführung einer Kraft-Abstands-Kurve

Im Folgenden soll eine Kraft-Abstands-Kurve auf einer idealen, nichtleitenden und harten Probe exemplarisch erläutert werden (Abbildung 16 dient als Grafik zur Erläuterung).

Zu Beginn der Aufzeichnung einer Kraft-Abstands-Kurve ist die Cantilever-Spitze weit von der Probe entfernt, es wirken keine Kräfte auf den Cantilever, so dass sowohl die Auslenkung als auch die Kraft Null sind (Bereich 1). Wird der Cantilever nun an die Probe angenähert, kommt es kurz vor dem Kontakt mit der Oberfläche zu einer attraktiven Kraft (Bereich 2), der Cantilever bindet an die Probe (Bereich 3). Die Spitze des Cantilevers befindet sich nun auf der Oberfläche der Probe. Wird die Auslenkung des z-Piezos weiter erhöht, so drückt sich der Cantilever auf Grund der repulsiven Kräfte zunehmend weiter durch. In diesem Bereich wird die InvOLS bestimmt. Zieht man den Cantilever durch Verringerung der z-Piezo-Spannung wieder von der Oberfläche weg, bleibt die Cantilever-Spitze auf Grund adhäsiver Kräfte an der Oberfläche (Bereich 4 und 5), es werden dabei negative Kräfte bestimmt. An einem bestimmten Punkt werden die adhäsiven Kräfte kleiner als die Zugkraft, und die Spitze des Cantilevers reißt von der Probe ab (Ende Bereich 5) und erreicht wieder die Ruheposition.

Innerhalb dieser Arbeit wurden aus den Kraft-Abstandskurven zwei Parameter berechnet: die Adhäsionsarbeit und die Abreißkraft. Beide Parameter werden aus der Abzugs-

kurve (*retract curve*) (Bereich 4 und 5) berechnet. Die Adhäsionsarbeit W_{adhesion} berechnet sich aus dem Integral aller Kraft-Werte kleiner als Null:

$$W_{\text{adhesion}} = \int_{x_i | x: F(x) < 0} F(x) dx \quad .$$

Die Abreißkraft F_{pulloff} ist die Kraft, an dem die abziehende Zugkraft größer wird als die Adhäsionskraft:

$$F_{\text{pulloff}}(x_{\text{pulloff}}) = F_{\text{adhesion}}(x_i) < F_{\text{pull}}(x_{i+1}) \quad .$$

Diese Werte können für jede Kraftkurve separat ausgewertet werden. Es ist nun möglich, die zeitliche Änderung der Parameter an einer Stelle der Probe zu untersuchen oder an unterschiedlichen Stellen der Probe Kraft-Abstands-Kurven aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der Laborgruppe Biophysik die Methode der Kraftkarten etabliert. Dazu wurden in einem Bildausschnitt auf der Probe mit Hilfe der Änderung der x-y-Position an äquidistanten Punkten Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen und ausgewertet. Es ergab sich somit ein Kraftbild der berechneten Parameter, wie z.B. Kraftbilder der Adhäsionsarbeit.

5.3.5 Bestimmung der Federkonstante

Zur genauen Bestimmung der Kräfte zwischen der Cantilever-Spitze und der Probe muss nach

$$F [pN] = Defl [nm] \cdot k \left[\frac{pN}{nm} \right]$$

die exakte Federkonstante k des Cantilevers bekannt sein. Die Hersteller liefern hierzu zwar Werte, diese sind aber auf Grund der produktionsbedingten Variationen innerhalb einer Cantileverserie nur als Richtwert anzusehen. Somit ist es notwendig, vor jeder Messung den genauen Wert der Federkonstante zu ermitteln.

Für die Federkonstante gilt

$$k = \frac{F}{\Delta x}$$

mit der Federbelastung F und der Federauslenkung Δx . Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung der Federkonstante, eine gute Übersicht bietet Sader *et al.* [Sader,2002]. Das in dieser Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop MFP3D verwendet die *Thermal Noise* Methode, die im Folgenden kurz erläutert werden soll.

Grundlage ist die Betrachtung eines durch Brownsche Molekularbewegung getriebenen harmonischen Oszillators. Die Hamilton-Funktion des Oszillators wird beschrieben durch den verallgemeinerten Impuls p , der Kreisfrequenz ω_0 , der Masse des Oszillators m und den verallgemeinerten Koordinaten q :

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega^2 q^2$$

Die Brownsche Molekularbewegung der Luft wird beschrieben durch den Gleichverteilungssatz der mittleren thermischen Energie, wobei für jeden Freiheitsgrad mit der Boltzmann-Konstante k_B und der Temperatur in Kelvin T $0,5 k_B T$ gilt. Dies führt zu

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad ,$$

weiter gilt für die Resonanzfrequenz eines harmonischen Oszillators mit der Federkonstante k und der Masse m

$$\omega^2 = \frac{k}{m} \quad .$$

Dies führt für die Federkonstante zu

$$k = \frac{k_B T}{q^2} \quad ,$$

wobei q^2 gerade die Fläche unterhalb des Resonanzpeaks im Frequenzspektrum ist, da der Cantilever in erster Näherung nur in eine Richtung, entlang der z-Achse, schwingen kann. Zur Rauschunterdrückung nähert man diesen Resonanzpeak mittels einer Harmonischen an, berechnet das Integral unterhalb des so erzeugten Resonanzmaximums und bestimmt darüber die Federkonstante k . Dieses Verfahren ist sowohl für rechteckige als auch für dreieckige Cantilever anwendbar.

5.3.6 Verwendetes Rasterkraftmikroskop MFP3D

Der prinzipielle Aufbau des verwendeten AFMs MFP3D von Asylum Research (Santa Barbara, CA, USA) ist in Abbildung 17 gezeigt. Die Durchbiegung des Cantilevers wird bei diesem Rasterkraftmikroskop mit Hilfe der Laserstrahlauslenkung (*Deflection-Signal*) bestimmt [Alexander *et al.*,1989] [Marti&Colchero &Mlynek,1990] [Meyer &Amer,1988] [Meyer &Amer,1990]. Bei diesem Verfahren wird das Licht eines Infrarotlasers auf die Rückseite des Cantilevers gerichtet, wird dort reflektiert und fällt auf einen vierfach unterteilten Photodetektor. Diese bei den meisten kommerziell erhältlichen Rasterkraftmikroskopen verwendete Methode zur Bestimmung der Durchbiegung des Cantilevers hat vielfache Vorteile: es ist möglich, einen großen Arbeitsabstand zu realisieren. Dabei ist das Verfahren wenig sensitiv gegenüber Abstandsänderungen, dennoch ist die Winkelauflösung hoch, so dass kleinste Winkeländerungen, z.B. hervor-

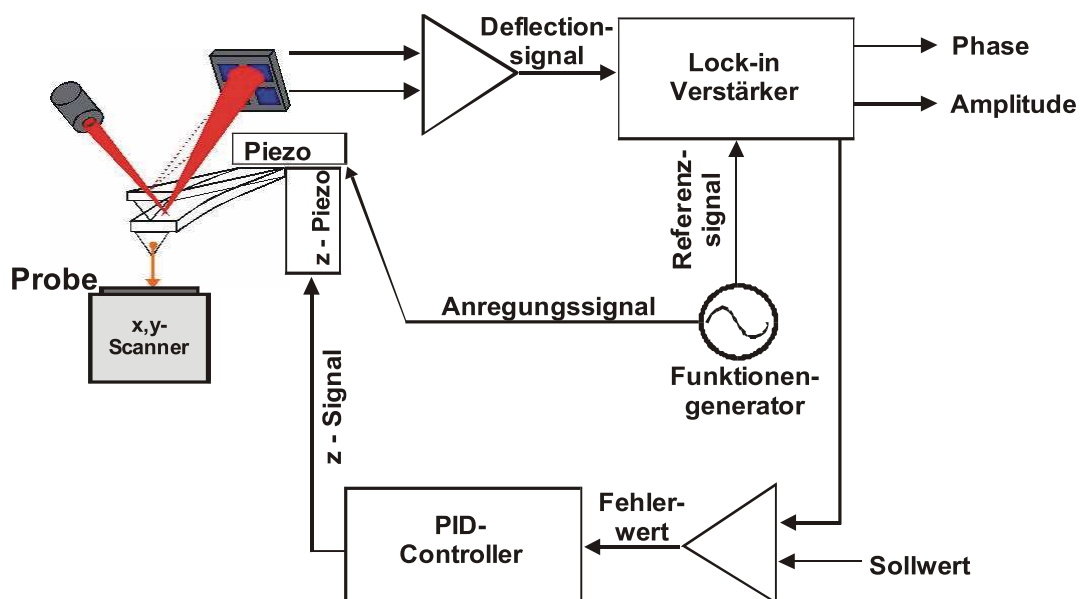


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des verwendeten MFP-3D. Dargestellt ist die Funktion im AC-Modus. Der von der Cantilever-Rückseite reflektierte Laserstrahl wird von einer 4-teiligen Photodiode detektiert. Über die Steuerung des AC-Piezos wird die vom verwendeten Cantilever abhängige Anregungsfrequenz gewählt. Ein Lock-in Verstärker vergleicht Amplitude und Phase der Cantilever-Schwingung mit dem vorgegebenen Referenzsignal. Um die z-Höhe des Cantilevers einzustellen, wird die Amplitude des schwingenden Cantilevers als Rückkopplungssignal zur Regelung des Abstandes zwischen Spitze und Probe genutzt. Mit Hilfe des Phasensignals kann zwischen repulsivem und attraktivem Modus unterschieden werden.

gerufen durch Reibungskräfte, aufgezeichnet werden können. Die an der Photodiode abfallende Spannung wird über eine Vorverstärkerstufe an die sogenannte Translationsbox geleitet. In der Translationsbox findet die Digitalisierung des Spannungssignales (Auflösung: 16 bit Abtastung: 5 MHz) statt. Die Signale werden mit Hilfe eines digitalen Lock-In Verstärkers und eines digitalen Impuls-Frequenzfilters (*Infinite Impulse Response Filter*, IIR-Filter) entrauscht und an den Digitalen Signal Prozessor (DSP) im Controller geleitet. Das rückgekoppelte Signal wird nun mittels eines Digital-Analog-Wandlers (Auflösung 24 bit, Abtastung: 100 kHz) analogisiert und über einen Hochspannungsverstärker - das Signal wird typischerweise auf +150 V verstärkt - an den z-Piezo zurückgeleitet. Zentrales Bauelement der Rückkopplungsschleife ist ein *Field Programmable Gate Array* (FPGA). Dieser Baustein kann flexibel über eine Software im Computer programmiert werden und führt daher gerade rechenintensive Vorgänge sehr performant aus. Die Ansteuereinheit für den Laser ist, zusammen mit dem Vorverstärker, separat in einer abgeschirmten Einheit untergebracht, um elektrische Störungen des Hochspannungsverstärkers und der Translationsbox zu umgehen.

Piezos werden an verschiedenen Stellen des AFM verwendet: (i) zur oszillatorischen Anregung des Cantilevers, (ii) zur Auslenkung des Cantilevers in z-Richtung, sowie (iii) zur Steuerung der x-y-Ebene. Legt man an einen Piezokristall eine Spannung an, so kommt es zu einer Strukturänderung der Piezokristalle. Diese führt zu einer Ausdehnung des Kristalls in eine Dimension und zur Kontraktion des Kristalls in der anderen Dimension. Um ein großes lineares Ausdehnungsvermögen zu erreichen, wurden im verwendeten Rasterkraftmikroskop gestapelte Piezoelemente, sogenannte Piezo-Stacks, verwendet. Zur Kontrolle der tatsächliche Auslenkung werden kapazitive oder induktive Sensoren (LVDTs) verwendet. Ein weiterer Regelkreis sorgt nun für die Einhaltung der vorgegebenen Ausdehnung des Kristalls (sogeanntes *close-loop*-Verfahren). Dies ist notwendig, da die Piezos sowohl einer Hysterese als auch einer Relaxation unterliegen.

5.3.7 Rückkopplungsschleife, PID-Regelung

Unabhängig vom jeweiligen Messmodus kommt es bei der Annäherung der Cantileverspitze zu einem Fehlerwert einer modusabhängigen Regelgröße. Beim *Contact*-Modus nutzt man das *Deflection*-Signal, beim dynamischen Modus die Schwingungsamplitude des Cantilevers als Regelgröße. Der Fehlerwert der Regelgröße entsteht durch die Änderung des aus dem System rücklaufenden Ist-Wertes im Vergleich zu dem gesetzten Sollwert. Um diesen Fehler zu minimieren, wird eine Regelung eingesetzt. Eine sehr

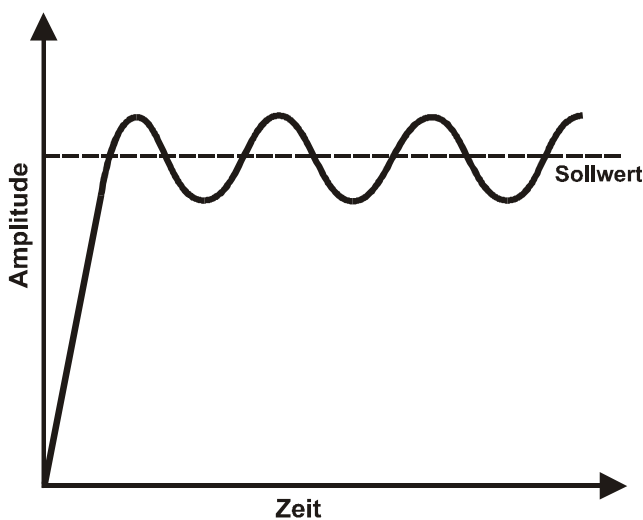


Abbildung 18: Bei einer einfachen Regelung wird der vorgegebene Sollwert niemals erreicht. Der Ist-Wert schwingt um den Sollwert.

einfache Regelung wäre, wenn man zur Annäherung an den Sollwert das Ein- und Abschalten eines konstanten Wertes nutzt. Der gesetzte Sollwert wird so jedoch nicht erreicht (Siehe Abbildung 18). Eine weitaus schnellere und genauere Regelung umfassen eine proportionale, eine integrale und eine differentielle Verstärkung (sogenannte Regler) des Fehlersignals (PID-Regelung).

Durch den Proportionalterm wird das Fehlersignal linear verstärkt, so dass die Größenordnung des Korrektursignals festgestellt werden kann. Weitergehend wird ein Proportionalband definiert, welches eine Umgebung um den Sollwert definiert. Beträgt es z.B. 20%, so ergibt sich für die Proportionalverstärkung der Wert 5. Je kleiner dieses Proportionalband, desto größer wird die Proportionalverstärkung. Dieses Proportionalband bedingt jedoch, dass der erreichte Sollwert einen Offset gegenüber dem erwünschten Sollwert hat (Abbildung 14). Eine Anpassung dieses Offsets über eine verringerte Verstärkung ist meist jedoch nicht möglich, da sich das System dadurch aufschwingt.

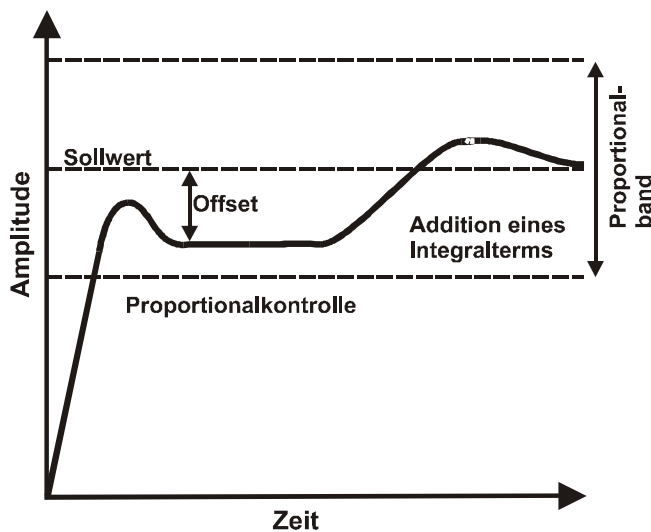


Abbildung 19: Eine PID-Regelung regelt mit Hilfe einzelner Regler (proportionaler, integraler und differenzieller Regler) den Istwert in die Nähe des Sollwertes.

seits das System schneller wird, was letztendlich eine höhere Auflösung zur Folge hat. Wählt man die differentielle Verstärkung jedoch zu hoch, kommt es zu hochfrequenten Störungen durch Aufschwingen des Systems.

Letztendlich ist jedoch die Einstellung der einzelnen Regler ein wichtiger Bestandteil der experimentellen Arbeit, da immer, in Abhängigkeit von der Probe, ein möglichst guter Kompromiss aus Dauer, also der Scangeschwindigkeit, und Genauigkeit der Messung gefunden werden muss.

5.3.8 Bildaufnahme

Die Höheninformation eines Bildpunktes wird aus der durch die PID-Regelung gesteuerten z-Position gewonnen. Dabei ist jedoch immer zu beachten, dass es sich bei Höhenbildern auf Grund der Interaktion zwischen Cantilever und Probe immer um Positionen gleicher Kraft handelt. Die Abrasterung der Probe wird beim MFP-3D durch laterales Verschieben der Probe unterhalb des Cantilevers mittels elektrischer Ansteuerung der x- und y-Piezos erreicht. Das Bild wird dabei zeilenweise aufgebaut, das heißt, dass erst eine Zeile durch einen sich schnell bewegenden Piezo aufgenommen wird, wobei der jeweils andere Piezo am Ende der Zeile dann die Probe zur Aufnahme der nächsten

Um das Problem des Aufschwingens zu lösen und dennoch eine Minimierung des Offsets zu erreichen, wird kurzzeitig ein Integralterm addiert. Da die Piezos jedoch träge sind, darf das Zeitfenster der Addition nicht zu klein gewählt werden, da das System sich sonst ebenfalls aufschwingt.

Mit dem differentiellen Anteil des Fehlersignals kann sehr schnell auf kleine Änderungen des Sollwertes reagiert werden, wodurch einerseits das Rauschen abnimmt und andererseits

Zeile durch einen kleinen Vorschub bewegte. Der Scanwinkel ist bei dieser Methode frei wählbar. In dieser Arbeit wurden nur untereinander rechte Winkel (0° , 90° , 180° und 270°) verwendet. Zur Weiterverarbeitung der Höhensignale während der Messung führt die MFP-3D Software (auf Basis von Igor Pro, WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) zunächst eine Normalisierung aller Bildpunkte durch, indem jedem Punkt einer aufgenommenen Linie ein durchschnittlicher Höhenwert abgezogen wird. Sofern notwendig, kann nachträglich eine bestmögliche Ebene über alle Punkte berechnet werden. Dieser Vorgang wird als *flatten* bezeichnet und führt bei der Bildbetrachtung zu einer einheitlichen Grundebene. Die gängigste Betrachtungsweise von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen ist das Höhenbild, es ist jedoch möglich oder notwendig, auch andere Größen, z.B. die Phase, die laterale Auslenkung des Cantilevers oder die Amplitude des schwingenden Cantilevers als Bilder darzustellen.

5.3.9 Kombination von Rasterkraftmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Der Kopf und der Scanner des Rasterkraftmikroskop MFP-3D ist auf einem inversen Multifunktions-Lichtmikroskop (IX70, Olympus, Tokio, Japan) montiert. Dadurch ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Kombination von rasterkraftmikroskopischen und lichtmikroskopischen Untersuchungen. Zur Untersuchung von Domänenstrukturen in Membranen, wurden in dieser Arbeit das Phospholipid PE, an dessen Kopfgruppe ein 7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol (NBD) (siehe S. 80) gebunden ist, verwendet. Dazu wurde das Lichtmikroskop mit einem Filtersatz für NBD (Olympus, Tokio, Japan) und einer Kurzbogenquecksilberdampfampe (Olympus, Tokio, Japan) ausgerüstet. Als Detektorsystem dient eine ungekühlte CCD-Kamera (C8484-02, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herschingen, Deutschland), die eine hohe elektronische Auflösung ermöglicht. Verwendet wurden zwei Objektive, für Übersichtsaufnahmen wurde ein 4-fach Objektiv (UPLFLN 4x, Olympus, Tokio, Japan), für die Detailaufnahmen ein 40-fach Objektiv (LCPlanF 40x, Olympus, Tokio, Japan) verwendet. Eine besondere Herausforderung ergibt sich durch den verwendeten Aufbau, wenn eine Überlagerung der Bilder des Fluoreszenzmikroskopes und des Rasterkraftmikroskopes erreicht werden soll. Da es sich um ein inverses Lichtmikroskop handelt, muss eine optisch möglichst plane Anordnung gefunden werden. In dieser Arbeit wurde durchsichtiges Mica (siehe

S. 58) verwendet, welches mit Hilfe von goldbeschichteten Magneten (NeoTEXX, Berlin, Deutschland) auf dem Boden einer Petrischale (Tissue Culture Dish 35x10mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) fixiert wurde.

Die Durchführung der Experimente soll im folgenden Absatz kurz beschrieben werden. Vor der Durchführung jedes Experimentes muss die Spitze des Cantilevers in der Mitte des lichtmikroskopischen Bildes zentriert werden. Daraufhin wird die Probe eingespannt und die Zentrierung des Cantilevers abermals durchgeführt. Als erster Schritt einer Messung wird ein Fluoreszenzbild aufgenommen, im weiteren Verlauf der Messung werden dann die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen erstellt, daran anschließend wird der Lipidfilm der Fläche des Bildausschnittes im Contact-Modus weggekratzt, so dass sie sich zur Kontrolle im nachfolgend aufgenommenen fluoreszenzmikroskopischen Bild eine dunkle Fläche befindet. Somit können die Fluoreszenzbilder mit den Rasterkraftbildern überlagert werden.

5.3.10 Funktionalisierung von Cantilevern

Um die wirkliche Interaktion zwischen Fettsäuren messen zu können, müssen Fettsäuren an den Cantilever gebunden werden. Spreizt man eine Hexadecanhiollösung ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$) auf einer Goldoberfläche, so bildet sich ein *self-assembled monolayer* (SAM) aus [Mrksich *et al.*, 1996]. Dabei kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen der Thiolgruppe des Hexadecanhiols und den Goldatomen der Oberfläche. Dieser Vorgang kann auch bei goldbeschichteten Cantilevern verwendet werden. Dazu wird von einem Cantilever zunächst die Resonanzfrequenz und die Federkonstante bestimmt, danach wird der Cantilever über 12 Stunden in einer Lösung aus 3:10 Hexadecanhiol:Chloroform inkubiert. Bei der Verwendung ist darauf zu achten, dass die Beschichtung des Cantilevers nicht beschädigt wird, d.h. es wird nur die InvOLS bestimmt und der Cantilever nur für Kraft-Abstands-Kurven verwendet.

5.3.11 Substrat

Als Substrat wurde Mica (Ruby Red Mica Sheets, Electron Microscopy Sciences, Ft.-Washington, PA, USA) verwendet. Dies ist Glimmer, der aus vielen ca. 1 nm dicken kris-

tallinen Ebenen besteht. Diese können durch einfaches Aufkleben und Abziehen von tesa®-Film (tesa AG, Hamburg, Deutschland) getrennt werden. Es ergibt sich eine atomar-glatte Oberfläche über eine Fläche von mehreren μm^2 . Die Oberfläche des Mica ist überwiegend hydrophil und negativ geladen.

5.4 Herstellung von Lipidaggregaten

Für verschiedene Untersuchungen in dieser Arbeit wurden LPS-Aggregate verwendet. Diese werden hergestellt, indem die Lipide in Chloroform gelöst werden (1 mg/ml) und in 1,5 ml Schraubampullen (Machery-Nagen, Düren, Deutschland) überführt. Unter einem Stickstoffstrom wird die Lösung eingedampft. Dabei bildet sich an den Innenwänden des Gefäßes ein gleichmäßiger Lipidfilm. Die Ampulle wird nun mit Puffer aufgefüllt, so dass sich eine Endkonzentration von 1 mM einstellt. Pro ml angesetzter Suspension wird die Probe 1 min mit einem Ultraschallgerät (Branson-Sonifier, Hensenstamm, Deutschland) oder - für die Untersuchungen mit dem FT-IR-Spektrometer - mit Hilfe eines Ultraschallbades, beschallt. Daraufhin wird zwei Mal ein Temperaturzyklus mit abwechselnd 4°C für 30 min und 56°C für weitere 30 min durchlaufen. Danach werden die Aggregatsuspensionen für mindestens 12 h bei 4°C gelagert.

5.4.1 Adsorption von Aggregaten an Micaoberflächen

Eine Methode, um symmetrische planare Membranen auf einem Substrat zu präparieren, ist die Vesikel- bzw. Aggregatfusion [Jass&Tjarnhage &Puu,2000]. Dabei werden Lipidaggregate in Suspension auf ein Substrat gebracht. Diese können untereinander fusionieren und adsorbieren an die Oberfläche. Dabei können die Aggregate aufbrechen und eine Lipiddoppelschicht auf der Oberfläche bilden. Hierbei bilden sich zunächst einzelne Lipidinseln, die auf Grund der fortschreitenden Adsorption weiterer Aggregate miteinander verschmelzen und so einen geschlossenen Lipidfilm bilden.

Im Folgenden soll kurz erläutert werden, wie die Präparation auf Mica vorgenommen wurde. In einen Petrischalendeckel wurde ein Stück Mica mit Epoxy-Kleber (ITW Dev-

con, Glenview, Illinois, USA) eingeklebt. Das Mica wurde mit Hilfe von tesa-Film gereinigt und die Aggregatensuspension wurde auf dem Plättchen aufgetropft. Auf einem Schüttler wurde die Präparation über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde der Puffer mehrmals gegen frischen Puffer ausgetauscht, um freie Aggregate aus der Lösung zu entfernen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die präparierte Lipiddoppelschicht nicht der Luft ausgesetzt wurde.

5.5 Spektroskopische Methoden

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche licht-spektroskopische Methoden verwendet, um die Interkalation von Peptiden in Lipid-Aggregate und die Peptid-induzierte Änderung der Phasenübergangstemperatur der Fettsäuren der Lipidaggregate zu untersuchen. Die Methoden sollen im Folgenden vorgestellt werden.

5.5.1 Bestimmung des Phasenzustandes von Lipiden mittels Infrarot-Spektroskopie

Durch die Interaktion mit antimikrobiellen Peptiden kann es zur Änderung des Phasenzustandes der Fettsäureketten in Lipidaggregaten kommen (siehe S. 21). Daher wurde in dieser Arbeit Infrarot-Spektroskopie verwendet, um die Änderung der symmetrischen Streckschwingung der CH₂-Gruppen der Fettsäureketten in Abhängigkeit der Temperatur zu messen und so den Ordnungszustand der Fettsäuren in Lipidaggregaten zu bestimmen. Vorteil dieser Methode ist, dass keine Markierung der Lipidaggregate notwendig ist. Das Verfahren soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Vibrationsniveaus der meisten Atome liegen im Bereich der infraroten elektromagnetischen Strahlung, d.h. in einem Wellenzahlbereich von 200 bis 4000 cm⁻¹. Ist eine funktionale Gruppe wie die CH₂ Gruppe infrarot-aktiv, so kommt es bei der Einstrahlung von Licht mit einer Wellenlänge im Infraroten zu einer Änderung des permanenten Dipolmomentes μ . Es gilt mit der Polarisierbarkeit α und der elektrischen Feldstärke E

$$\mu = \alpha \cdot E$$

Die Absorption der infraroten Strahlung wird in Transmission gemessen, dabei kommt es durch die Wechselwirkung der funktionalen Gruppe und der IR-Strahlung zur Ausbildung von Absorptionsbanden. Diese Banden sind dabei durch ihre Lage, die Intensität und die Breite charakteristisch für die unterschiedlichen funktionalen Gruppen. Dabei gilt für die Intensität des transmittierten IR-Strahls I das Lambert-Beer-Gesetz

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu_A d}$$

mit I_0 Intensität des einfallenden IR-Strahls,
 μ_A Absorptionskoeffizient,
 d Schichtdicke.

Die Messungen wurden mit einem Fourier-transformierenden IR-Spektrometer (IFS 55, Bruker, Deutschland) durchgeführt. Der Vorteil dieser Technik ist, dass mit Hilfe des Interferometers in einer Messung ein Interferogramm mit allen Frequenzen erzeugt werden kann. Dieses wird mit Hilfe einer Fourier-Transformation in ein Absorptionsspektrum überführt.

Die Analyse der Spektren erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird die Basislinie, verursacht durch die OH-Beugeschwingungen der wässrigen Phase, subtrahiert. Im folgenden Schritt wird die Änderung der CH_2 -Bande, dessen Peak sich beim Phasenübergang vom gelförmigen zum flüssigen Zustand der Fettsäuren von ca. 2850 cm^{-1} auf bis zu $2852,5 \text{ cm}^{-1}$ ändert, betrachtet. Die Bestimmung der Phasenübergangstemperatur T_c erfolgt dann durch die Betrachtung des Nulldurchganges der zweiten Ableitung der Wellenzahl der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung über der Temperatur.

Die Messungen wurden in einer wässrigen Lösung mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 5 mM HEPES bei pH 7,0 in Form einer Suspension durchgeführt. Dazu wurden zunächst Lipidaggregate (siehe S. 59) hergestellt. Das antimikrobielle Peptid wird vor der Messung hinzugeben und die Mischung kurz gerührt und geschüttelt. Die Probe wurde daraufhin mit einer $12,5 \mu\text{m}$ dicken Teflonfolie zwischen zwei CaF_2 -Fenster gepresst. Die Messungen erfolgten dann in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 55°C bei einer Heizrate von $0,6^\circ\text{C min}^{-1}$.

5.5.2 Bestimmung des Einbaus von antimikrobiellen Peptiden in Lipidaggregate mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Spektroskopie (FRET)

Die Ausnutzung des Förster-Resonanz-Energie-Transfers wird in dieser Arbeit verwendet, um den Einbau der antimikrobiellen Peptide in Lipidaggregate zu untersuchen [Wu & Brand, 1994]. Dabei werden Lipidaggregate mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch einen Verdünnungseffekt bei der Interkalation nicht-markierter antimikrobieller Peptide in die Lipidaggregate kommt es zu einer Änderung des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (*Probe Dilution Assay*). Die Methode wird im Folgenden genauer erläutert.

Durch die Einstrahlung von Licht der Wellenlänge $\lambda_E = 470 \text{ nm}$ kommt es zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes NBD, im Folgenden Donor genannt, in den Zustand $P(t)$. Über zwei Möglichkeiten kann es nun zu einer Rückfall in den Grundzustand kommen:

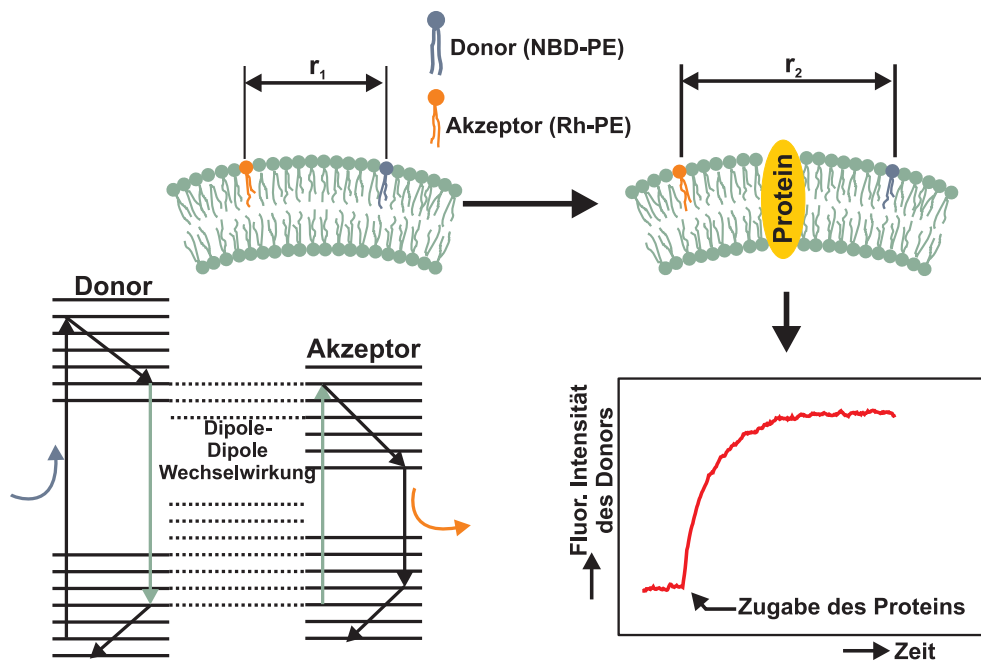


Abbildung 20: Prinzip des Förster-Energietransfers

(i) durch Fluoreszenzemission der Wellenlänge λ_F oder (ii) durch den Übertrag der Elektronenanregungsenergie auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff N-(Rhodamin B sulfonyl) (auch Rhodamin, Rh), dem Akzeptor. Dieser Akzeptor emittiert mit einer

Wellenlänge von $\lambda_A = 593$ nm. Beide Emissionssignale werden über jeweils einen Analysator und einen Photomultiplier registriert.

Wichtige Grundlage für den Energietransfer ist die Betrachtung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die den Energieübertrag für (ii) beschreibt. Es gilt somit nach Förster für die Rate des strahlungslosen Energietransfers

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \sum_{i=1}^{N_A} \left(\frac{R_0}{r_i} \right)^6$$

- mit τ_D Donor-Lebenszeit in Anregung bei Abwesenheit des Akzeptors
 R_0 kritische Transferdistanz (Transferrate = Zerfallsrate)
 r_i Entfernung zwischen Donor und Akzeptor
 N_A Anzahl der Akzeptoren

Da der Prozess des Energietransfers mit r_i^{-6} sehr stark von der räumlichen Entfernung der beiden Farbstoffmoleküle abhängt, wird durch den Einbau von nicht-markierten Substanzen in Lipidaggregate der Energietransfer stark herabgesetzt, da der Abstand zwischen Donor und Akzeptor zunimmt. Es kommt somit zu einer Zunahme der Donor-Intensität und einer Abnahme der Akzeptor-Intensität.

Die Messungen wurden mit einem Spektrometer Modell Fluorolog F1 T11 (Edison, NJ, USA) mit Fluorophor-markierten Lipidaggregaten (siehe auch S. 59) bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Dazu wurde eine Quarzküvette mit 900 μ l der Lipidaggregatlösung befüllt. Durch die Variation der Spaltgröße vor den Photomultipliern wurden die Fluoreszenz-Intensitäten auf einen Fixwert eingestellt. Nach 50 s Messzeit wurde eine Menge von 50 μ l des Peptides (1 mg/ml) zu den Lipidaggregaten gegeben und die Werte für die Donor- und Akzeptorintensitäten über 250 s aufgezeichnet. Um den Einfluss von Ausdünnung durch die 0,01% Essigsäure, in der die Peptide gelöst sind, zu untersuchen, wurde pro Messreihe einmal eine Kontrollmessung mit reinem Lösungsmittel durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte über das Auftragen des Quotienten aus Donor- und Akzeptorsignal über die Zeit. Zu beachten ist, dass die Messungen nur zwischen gleichen Lipiden vergleichbar sind, nicht jedoch die zwischen unterschiedlichen Lipiden, da die Fluo-

reszenzausbeute des Farbstoffes (NBD) von der jeweiligen Lipidumgebung abhängt. Desweiteren spielt der Einfluss des Salzgehaltes des Puffers eine große Rolle.

5.6 Montal-Mueller-Methode

Die Montal-Mueller-Methode [Montal & Mueller, 1972] ist eine Methode zur Präparation freistehender rekonstituierter planarer Membranen. Stellt man den Aufbau vereinfacht dar, so besteht die Montal-Mueller-Apparatur aus zwei durch eine mit einem kleinen Loch (Apertur) versehene dünne Teflonfolie (dem Septum) getrennte und mit einer Elektrolytlösung befüllten Messkammern, in denen jeweils eine Messelektrode eingebracht ist. Zunächst wird in beiden Kammern auf die wässrige Phase jeweils eine definierte Menge Lipid aufgetropft, die jeweils eine Monoschicht ausbilden. Diese Monoschichten werden im nächsten Schritt durch Erhöhung des Flüssigkeitsspiegels über die

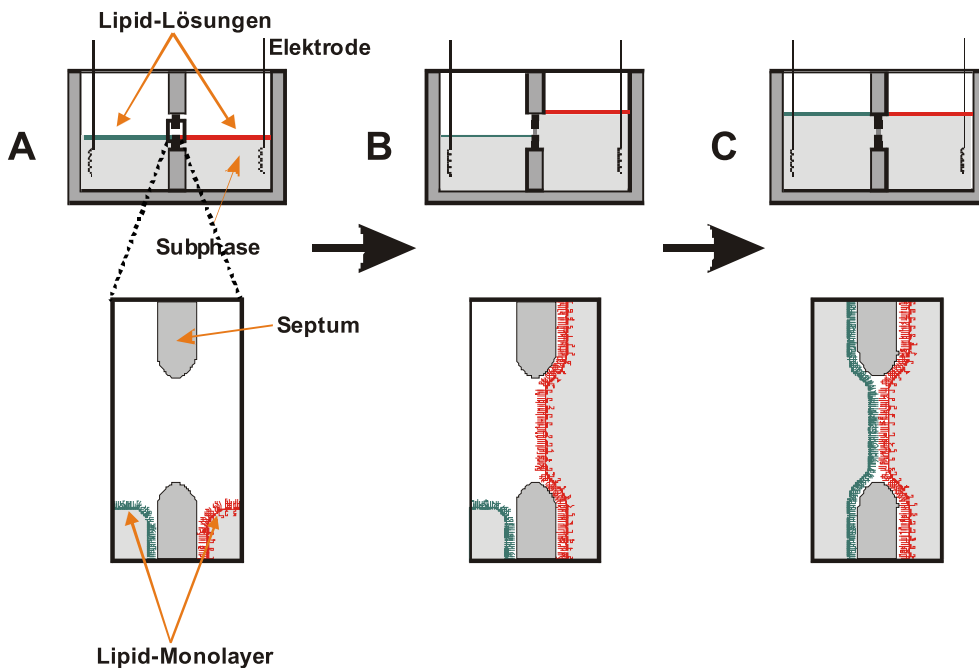


Abbildung 21: Darstellung des Vorganges zur Bildung einer Lipiddoppelschicht mit Hilfe der Montal-Mueller-Methode (1972) [Montal & Mueller, 1972]. In der unteren Reihe ist die Vergrößerung des Vorgangs zu sehen.

Apertur in der Teflonfolie geschoben (Abbildung 21). Aus den beiden Monoschichten bildet sich daraufhin eine freistehende planare Lipiddoppelschicht zwischen zwei wässrigen Phasen. Mittels der beiden Elektroden können an dieser Membran elektrische

Messungen zur Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften, wie der Kapazität, der Leitfähigkeit oder den intrinsischen Membranpotentialdifferenzen [Hagge *et al.*, 2004] durchgeführt werden. Das Kompartiment, dessen Elektrode an Masse liegt, wird trans-Kompartiment genannt, das Kompartiment, an dessen Elektrode eine Spannung angelegt werden kann, wird als cis-Kompartiment bezeichnet. Die herausragende Eigenschaft dieser Methode ist, dass man in der Wahl der Lipide in bestimmten Grenzen frei ist und symmetrische oder aber insbesondere auch asymmetrische Membranen rekonstituieren kann.

5.6.1 Aufbau der Messapparatur

Die Messkammer besteht aus zwei halbkonischen Kompartimenten, welche aus Teflon hergestellt sind (Abbildung 22A). Die Kompartimente verfügen jeweils über ein Volumen von etwa 2 ml, wobei ca. 1,5 ml auf die Präparationskammer und ca. 0,5 ml auf die Elektrodenlöcher entfallen. Die planen Stirnseiten der Kompartimente weisen jeweils

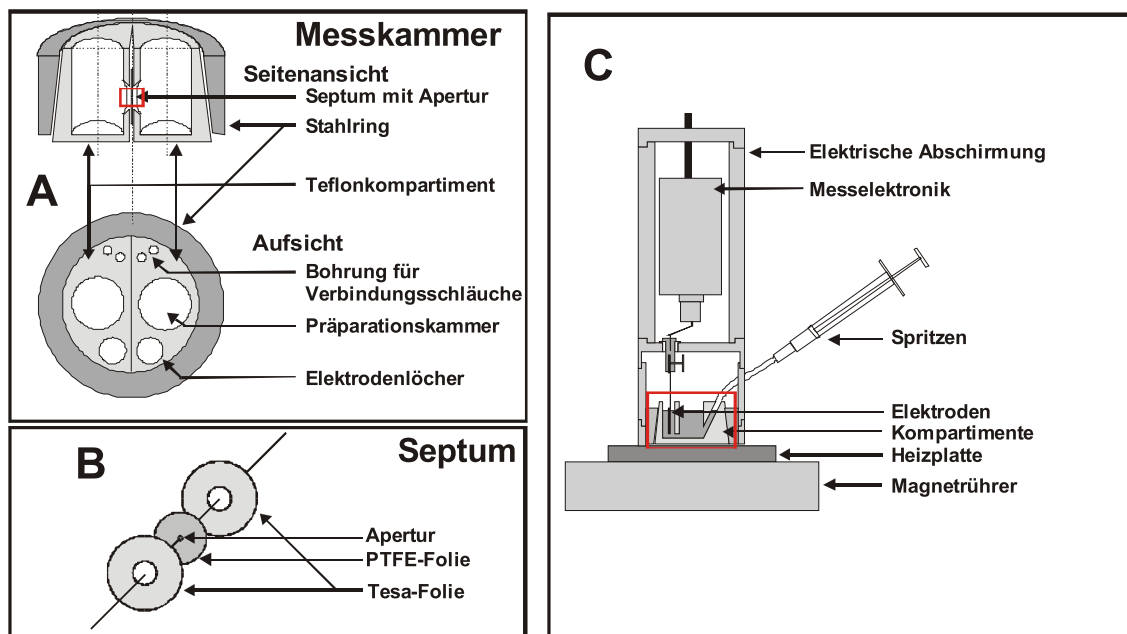


Abbildung 22: Mechanischer Aufbau der Messapparatur nach Montal-Mueller. An dieser Apparatur können elektrische Messungen an freistehenden planaren symmetrischen oder asymmetrischen Lipiddoppelschichten durchgeführt werden.

eine Bohrung in der Hauptkammer auf, über denen das Septum (Abbildung 22B) eingeklebt wird. Zwei weitere Bohrungen sind für die Schläuche der zum Anheben des Flüssigkeitsspiegels verwendeten Spritzen in die Kompartimente eingelassen. Eine weitere Bohrung dient als Aufnahme für die Elektroden.

Zur Abdichtung des Septums und der Verbindung der beiden Kompartimente werden vor dem Zusammensetzen die Stirnseiten der Kompartimente mit viskosem Silikonfett eingestrichen, wobei der Bereich um die Bohrung ausgespart wird. Zentrales Bauteil des Septums ist eine 12,5 µm dünne PTFE-Folie (Kastilo Technische Gewebe Vertriebs GmbH, Ulm). Diese wird von beiden Seiten durch jeweils eine Lage einer reißfesten, selbstklebenden Folie (tesa® Film) stabilisiert. Das gereinigte Septum wird daraufhin derart über die Bohrung eines Kompartimentes gelegt, so dass die Apertur über der Bohrung zentriert ist. Die beiden Kompartimente werden dann mit Hilfe eines konischen Metallringes zusammengedrückt. Wichtig ist, dass alle Komponenten des gesamten Systems stets sauber gehalten werden, da jegliche Verunreinigung den Präparations- und Messprozess erheblich stören würde (siehe dazu [Böhling,2004]). Die fertig präparierte Messkammer wird in die Halterung eingesetzt, die mit Hilfe einer unterhalb der Halterung montierten Heizplatte temperiert wird. Die dafür notwendige Regelung ist extern untergebracht, um elektrische Störungen zu minimieren.

Die Flüssigkeitsspiegel in den Messkammern können mittels zweier Spritzen unabhängig variiert werden. An diese 1 ml-Spritzen sind Teflonschläuche angebracht, die über die Schlauchbohrungen der Kompartimente in die Kammer eingebracht werden. Die Schläuche sind jeweils mit Metallflechtschläuchen umwickelt und geerdet, so dass sie elektrisch entkoppelt sind.

Auf die Halterung wird die sogenannte Head-Stage aufgesetzt. Diese enthält den durch einen Faradayschen Käfig entstörten Vorverstärker und die Halterungen für die Elektroden (Abbildung 22C). Die Präparationskammer kann von hinten mit einer batteriebetriebenen weißen LED-Lampe beleuchtet werden. Mittels einer Stereolupe (h33, Hund, Wetzlar) kann die Präparation der Membran beobachtet werden. Zur mechanischen Dämpfung wird das gesamte System auf einer luftgedämpften (Luftfederelemente des Typs SLM-3, Barry Controls, Raunheim) 200 kg schweren Granitplatte gelagert.

5.6.2 Der elektrische Aufbau

Das Blockschaltbild in Abbildung 23 zeigt den elektrischen Aufbau der Messapparatur. Die Head-Stage-Einheit ist mit der Controller-Einheit, einem Patch-Clamp-Verstärker L/M-PCA (List-Medical, Darmstadt, Deutschland), mit einem mehrfachgeschirmten Kabel verbunden. Die Controller-Einheit enthält eine Spannungsquelle sowie die Signal-aquisitions- und die Steuereinheit des Systems. Es ist möglich, verschiedene Verstärkungsfaktoren zwischen 0,5 mV/pA und 1000 mV/pA zum Messen des Stromes zu wählen. Weiter erlaubt es der Patch-Clamp-Verstärker, mittels eines Bessel-Filters 6. Ordnung das Stromsignal am Ausgang tiefpass zu filtern. Sofern nicht anders angegeben, erfolgt dies bei niedrig aufgelösten Messungen mit 10 kHz, bei hochaufgelösten Messungen mit 80 kHz.

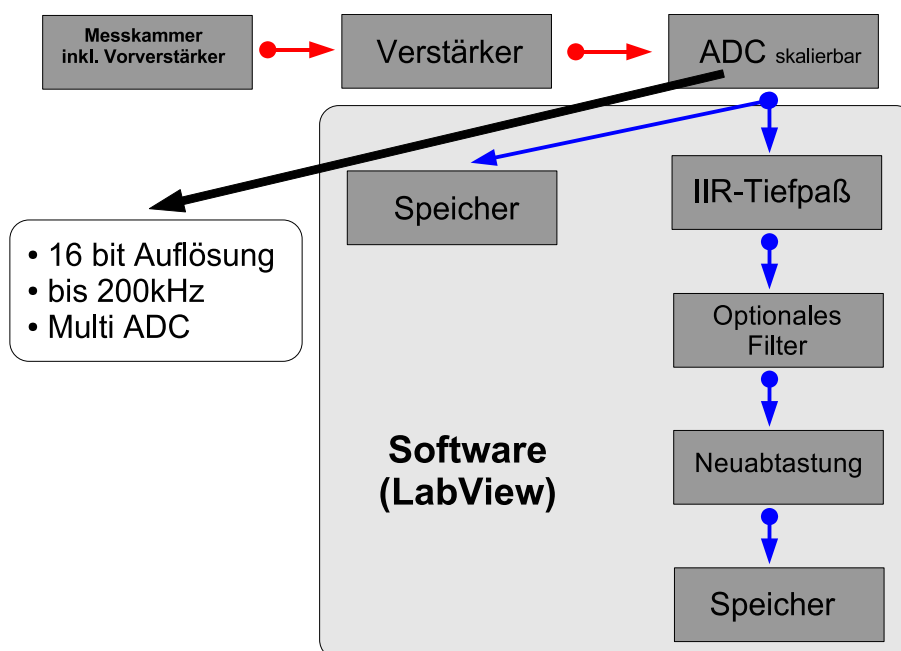


Abbildung 23: Blockschaltbild des elektrischen Aufbaus der Apparatur zur Messung elektrischer Größen an planaren Lipiddoppelschichten.

An die Elektroden der Head-Stage kann entweder ein Spannungssignal aus der Spannungsquelle des Controllers oder eines aus einer externen Quelle angelegt werden. Dieses Signal kann um einen Faktor zwischen 10 und 1000 abgeschwächt werden (verwendet wird in der Regel eine Abschwächung um den Faktor 100). Bei den

Messungen dieser Arbeit wird dabei immer ein externes Spannungssignal verwendet. Dabei wird eine I/O-Karte (PCI-6036E, National Instruments) eines Personal Computers verwendet, die ausgehenden Spannungswerte werden mittels der Software gesteuert und zur Kontrolle aufgezeichnet. Die I/O-Karte wird auch zur Aufnahme der Stromsignale mit einer Aufnahmetiefe von 16 bit und einer Abtastrate mit bis zu 160 kHz verwendet. Die Daten werden dabei intern, mit Hilfe eines in dieser Arbeit geschriebenen LabVIEW-Programmes (BBAS [*B*iophysical *B*ilayer *A*nalysis *S*ystem] siehe Seite S. 69), weiterverarbeitet. Dazu werden zwei Datenstränge erzeugt, der erste repräsentiert die ungefilterten Originaldaten, der zweite wird über ein digitales Filter 10er Ordnung gefiltert und mit niedriger Abtastfrequenz neu abgetastet (typische Abtastrate: 2,5 kHz). Der mit niedriger Frequenz abgetastete Datensatz wird zur Weiterverarbeitung der Daten verwendet, um die Datenmenge während der Verarbeitung zu verringern. Zur Visualisierung und Weiterverarbeitung der Daten wurde Grace-5.1.20 (Grace Development Team und Evgeny Stambulchik, <http://plasmagate.weizmann.ac.il/Grace/>) verwendet.

5.6.3 Bestimmung der Membrankapazität

Um den ersten Schritt der Wechselwirkung eines Peptids mit der rekonstituierten Membran, die Anlagerung, zu untersuchen, wird die Membrankapazität in Abhängigkeit von

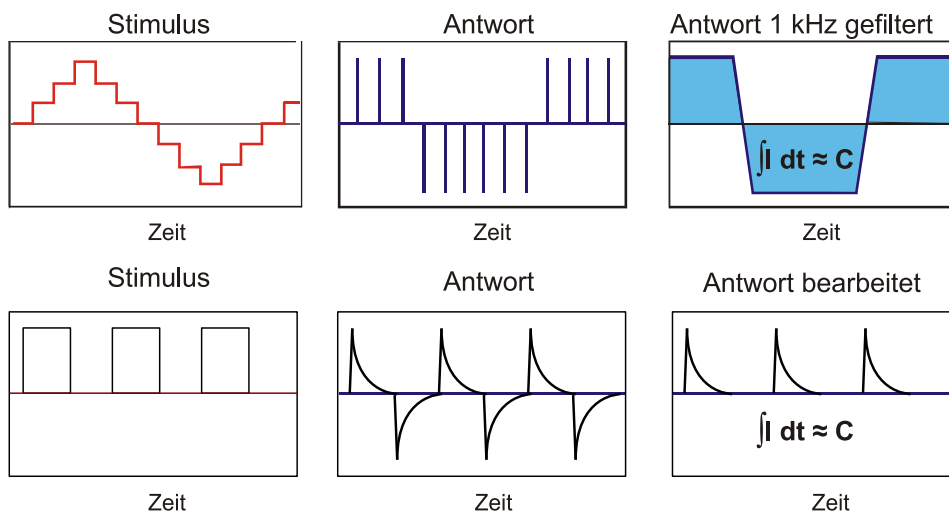


Abbildung 24: Darstellung der Spannungssprung-Methode zur zeitaufgelösten Messung der Membrankapazität mit Spannungstreppe (**oben**) und mit Rechtecksignalen (**unten**).

der Zeit gemessen. Diese Messung erfolgt mittels der Spannungssprung-Methode [Alvarez & Latorre, 1978]. Dazu wird ein Spannungssprung an die Membran angelegt. Der Strom I lädt die Kapazität der Membran auf, die sich darauf wieder entlädt, der Entladestrom ist dabei proportional zur Membrankapazität.

Die Software unterstützt dabei zwei Messmodi: (a) Messung der Kapazität mit Hilfe von einer Spannungstreppe und (b) Messung der Kapazität mit Hilfe eines Rechtecksignals.

Die Messung der Kapazität mit Hilfe der Spannungstreppe erfolgt mit einem treppenförmigen Verlauf der an die Membran angelegten Spannung. Dazu wird von der Software eine Spannungstreppe mit 1000 Spannungsstufen und einer Amplitude von $10 \text{ mV}_{\text{SS}}$ erzeugt. Zur Bestimmung der Membrankapazität werden die Stromimpulse mit einem digitalem Filter bei 1 kHz tiefpassgefiltert und über eine halbe Periode integriert. Mittels bekannter Kapazitäten wird das Integral kalibriert. Vorteil dieser Methode ist die Stabilität der Bestimmung gegenüber äußeren Einflüssen. Zur Bestimmung der Kapazität mit Hilfe einer Rechteckspannung wird eine Rechteckspannung mit typischerweise 20 Hz an die Membran angelegt. Die einzelnen Stromantworten der Membran werden über einen Stromtrigger bestimmt und jeweils integriert. Mittels bekannter Kapazitäten wird das Integral kalibriert und als separater Parameter abgespeichert. Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Membrankapazität mit bis zu 50 Hz zu messen. Außerdem sind die Spannungseinflüsse (typischerweise $0,1 \text{ mV}_{\text{SS}}$) auf die Membran bei dieser Methode deutlich geringer.

5.6.4 Biophysical Bilayer Analysis System [BBAS]

Wie bereits erwähnt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Datenacquisitionssystem zur Analyse der mit Hilfe der Montal-Mueller-Methode rekonstituierten Doppelschichtmembranen eingeführt. Das Grundkonzept des Systems basiert auf dem Einsatz einer I/O-Karte der Firma National Instruments und einer Software basierend auf LabVIEW, die jegliche Verarbeitung und Sicherung der Daten vornimmt. Vorteil dieser Lösung ist, dass auf kostenintensive Bauteile, wie analoge Frequenzfilter (diese müssen gleichstromfähig sein) und digitale Aufzeichnungsgeräte, verzichtet werden kann.

Das System wurde modular aufgebaut, so dass die Erweiterung der Funktionalität relativ leicht möglich ist. Das System in der Versionsstufe 1.5 umfasst Module zur Auf-

nahme von Stromspuren bei Variation der Spannung, zur Aufnahme von Kapazitätswerten und zur Aufnahme von Strom-Spannungs-Charakteristiken. Das Modul zur Aufnahme der Stromspuren teilt die aufgenommenen Spannungswerte in zwei Datenstränge auf. Der erste wird dabei ohne weitere Verarbeitung gespeichert, so dass jederzeit der Zugriff auf die Originaldaten gewährt bleibt. Die Daten des zweiten Stranges werden über ein einstellbares digitales FIR-Filter (*finite impulse response filter*) gefiltert. Diese Verarbeitungsstufe macht die vorher bestehenden analogen Filter überflüssig und gewährt zudem eine große Flexibilität des Systems. Aufgrund der berechenbaren Impulsverarbeitung und der kurzen Verarbeitungszeit wurde an dieser Stelle ein FIR-Filter verwendet und kein volldigitales IIR-Filter (*infinite duration impulse response filter*). Die gefilterten Daten werden daraufhin nochmal neu abgetastet. Dies wird mit einer niedrigeren Abtastfrequenz durchgeführt, so dass das Datenvolumen verkleinert wird. Dies ist notwendig, da viele Datenverarbeitungsprogramme nicht mit großen Datenmengen umgehen können. Dieser Schritt kann jedoch auch bei weniger leistungsfähigen Computern zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden. Das Modul lässt je nach Rechenleistung des verwendeten Computers eine Abtastfrequenz von bis zum 200 kHz zu. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Computer wurde ein 3 GHz „Pentium 4 HT“ Prozessor verwendet. Mit dieser Konfiguration werden Abtastfrequenzen bis 160kHz möglich. Weiter stellt dieses Modul die Möglichkeit bereit, Spannungen an die Membran anzulegen.

Das Modul zum Aufzeichnen der zeitlichen Veränderung der Kapazität stellt zwei Messmodi zu Verfügung. Der erste nutzt eine Spannungsrampe, um die Kapazität der Membran zu messen, der zweite Messmodus nutzt ein Rechtecksignal zur Messung der Kapazität (siehe auch S.68). Zur Integration der Stromantwort muss das Signal möglichst rauschfrei sein, dazu wird ein Bandpass-Filter verwendet, deren Filterfrequenzen je nach Messaufbau und der elektrischen Umgebung angepasst werden müssen. Die Auswertung der Entladungsimpulse der zweiten Methode erfordert zudem einen Trigger. Das Problem hier ist, dass nur die eigentlichen Impulse getriggert werden sollen und nicht einzelne Spannungsspitzen, die vom Rauschen oder Netzstörungen herrühren. Der Messplatz muss daher gut abgeschirmt werden, da es sonst zu Artefakten der Kapazitätsmessung kommt.

Das Modul zum Aufzeichnen von Strom-Spannung-Charakteristiken ist relativ einfach aufgebaut. Neben der Einstellung der Spannungamplitude und der Dauer eines

Spannungsrampendurchlaufes können nur die Samplingfrequenz und die Filterfrequenz gewählt werden.

Als weitere Funktion speichert das Programm alle durchgeführten Einstellungen in einer Konfigurationsdatei, so dass Messungen immer wieder mit den gleichen Programmparametern durchgeführt werden können.

Zur Dokumentation der Messungen werden alle durchgeführten Schritte in einer Datei festgehalten, so dass die Messung jederzeit nachvollzogen werden kann.

5.6.5 Präparation der Membran

Die Rekonstitution der Membran, in der Regel die äußere Membran Gram-negativer Bakterien, und die Durchführung der Messung erfordert in jedem Schritt der Durchführung besondere Umsicht und Sorgfalt.

Um die Septen vor dem Zusammensetzen der gereinigten Kompartimente hydrophober zu machen, werden diese zunächst in einem Gemisch von Hexan/Hexadecan im Volumenverhältnis von 20:1 gewaschen. Nach dem Zusammensetzen werden die Kompartimente zügig in die Halterung oberhalb der Heizplatte eingelassen. Beide Messkammern werden daraufhin mit jeweils 1750 µl Puffer befüllt. Um sicherzustellen, dass die Hydrophobizität der Septen erhalten bleibt, wird der Puffer zunächst nur bis knapp unterhalb der Apertur aufgefüllt. Innerhalb einer Wartezeit zwischen 10 und 15 min erwärmt sich der Puffer auf eine Temperatur von 37°C, was der physiologischen Umgebungstemperatur der natürlichen Membran entspricht. Daraufhin werden, je nach verwendetem LPS, 5 bis 15 µl des in Chloroform / Methanol gelösten LPS vorsichtig auf die Oberfläche der wässrigen Phase im cis-Kompartiment aufgetropft. Auf die wässrige Phase des trans-Kompartimentes werden 3 bis 6 µl einer in Chloroform gelösten Phospholipidmischung (PL) (siehe S. 77) aufgetragen. Damit die sich ausbildenden Monoschichten frei von Lösungsmitteln sind, wird nun abermals eine Wartezeit von mindestens 7 min eingehalten, in der das Lösungsmittel verdampft. Innerhalb dieser Wartezeit kann der Messkopf mit den darin verschraubten Ag / AgCl-Messelektroden aufgesetzt werden. Die eigentliche Membranpräparation geschieht durch das aufeinander folgende Anheben beider Pufferspiegel (Abbildung 21 B, C).

Ob die Präparation erfolgreich war, wird über die Messung der Membrankapazität und des Membranstromes überprüft. In einem Zeitraum von etwa 5 min ändert die frisch präparierte Membran ihre Kapazität. Wird ein konstanter Wert erreicht, wird eine weitere Überprüfung der Membran durch Anlegen von vier Spannungen (-50 mV, +50 mV, -100 mV, +100 mV) für jeweils etwa 20 s durchgeführt. Fließt dabei ein Strom > 2 pA (dabei handelt es sich um einen Erfahrungswert) durch die Membran, so kann mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Dazu wird die Aufzeichnung der Daten gestoppt und nach 1 min Ruhezeit das Peptid hinzugegeben und das Messprotokoll abgearbeitet.

5.6.6 Auswertemethoden

5.6.6.1 Fourier-Analyse

Die Fourier-Analyse wird herangezogen um zu untersuchen, aus welchen harmonischen Komponenten welcher Amplitude eine periodische Funktion aufgebaut ist.

Da es sich bei den in diesen Versuchen aufgezeichneten Messwerten um diskrete Werte handelt, muss zur Auswertung der Daten die diskrete Fourier-Analyse verwendet werden. Für ein Polynom y mit äquidistanten Stützstellen x_i gilt die diskrete Fourier-Transformation:

$$y_x = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{v=0}^{n-1} c_v e^{-2\pi i v x / n} .$$

Dabei sind c_v die Fourier-Koeffizienten und die Transformation $y \Rightarrow c$ stellt die Fourier-Analyse dar. Da es sich um diskrete Werte handelt, kann man eine Matrix T mit den Werten

$$T_{v,x} := n^{-1/2} e^{2\pi i v x / n}$$

einführen und verkürzend schreiben

$$y = T c .$$

Dies ermöglicht eine einfache Umsetzung in einen Rechenalgorithmus für einen Computer. Zur Verkürzung der Rechenzeiten wird meist die Fast Fourier Transformation (FFT) verwendet werden, dazu muss sichergestellt werden, dass gilt: $n = 2^p$ mit $p > 0$.

5.6.6.2 Autokorrelationsfunktion

Die Autokorrelationsfunktion dient bei diesen Funktionen zur Untersuchung der zeitlichen und funktionalen Abhängigkeit der Zeitreihen.

Für die Anwendung der diskreten Autokorrelationsfunktion gelten folgende Voraussetzungen:

Der stochastische Prozess $X_t = F_{t_1, \dots, t_n}(x_1, \dots, x_n)$ muss äquidistante Stützstellen ausweisen und schwach stationär sein: Der Erwartungswert μ ist dabei unabhängig von der Zeit t :

$$E(X_t) = \mu$$

und die Kovarianz zwischen zwei Werten x_s, x_t hängt nicht von der Zeit ab:

$$\begin{aligned} \text{Cov}(X_s, X_t) &= \int (x_1 - \mu)(x_2 - \mu) dF_{(x_s, x_t)}(x_1, x_2) \\ &= \int (x_1 - \mu)(x_2 - \mu) dF_{(x_0, x_{(t-s)})} = \text{Cov}(X_0, X_{(t-s)}) . \end{aligned}$$

So kann man die Autokorrelationsfunktion ρ mit der Laufvariable l

$$\rho(l) = \frac{\sum_{i=1}^{N-l} (x_i - \mu)(x_{(i+l)} - \mu)}{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

auswerten. Dabei gilt die Regel, nur Verschiebungen mit $l < N/2$ zu vertrauen. Ist die Zeitreihe nicht stationär, so muss ein ausreichend kleines Zeitintervall oder eine trend-korrigierte Zeitreihe verwendet werden.

5.6.7 Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes an planaren Membranen

Zur Untersuchung von Domänen in Membranen wird seit vielen Jahren die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Durch die Dotierung der membranbildenden Lipide mit einem Lipid, welches durch ein kopfgebundenes Fluorophor fluoresziert, können Domänenstrukturen sichtbar gemacht werden.

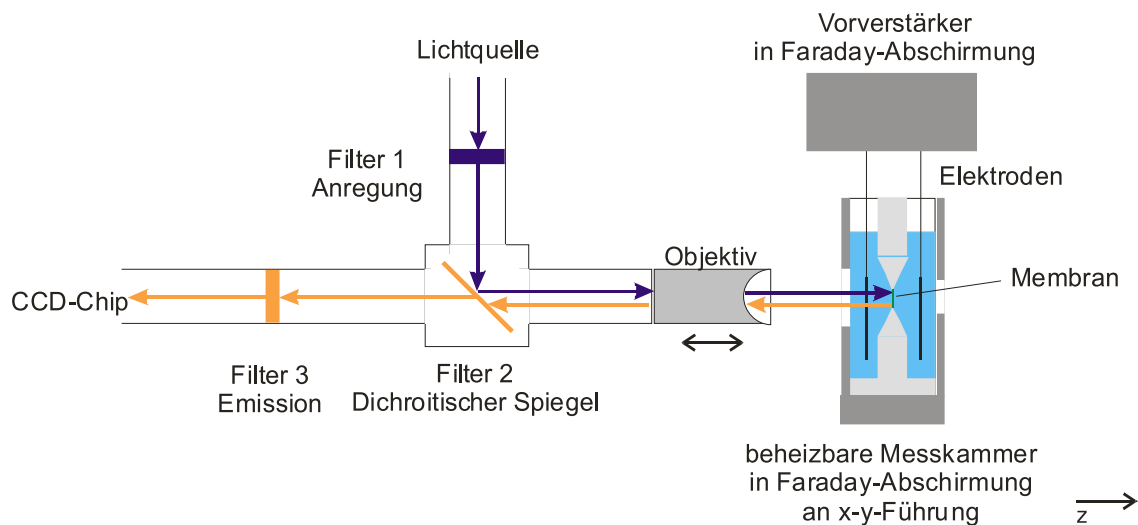


Abbildung 25: Aufbau des Fluoreszenzmikroskops für die optische Charakterisierung von planaren Membranen

Um Domänenstrukturen an planaren Membranen mikroskopisch untersuchen zu können, wurde in der Laborgruppe Biophysik ein spezielles Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 25) entwickelt.

Da bei dem Standardaufbau (siehe S. 65) der Abstand zwischen der Membran und der Außenbegrenzung des Kompartimentes relativ groß ist, musste eine neue Präparationskammer mit vermindertem Arbeitsabstand zwischen der Membran und dem Objektiv entwickelt werden. Den Abschluss der Kammer bilden jeweils zwei Haemacytometer Deckgläser (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland), welche optisch plan sind und keine Absorption im verwendeten Längenwellenbereich aufweisen. Die Kammer kann mit Hilfe einer roten LED mit Durchlicht bestrahlt werden, um die Membranpräparation zu beobachten. Da als Fluorophor NBD mit einer Anregungswellenlänge $\lambda = 460 \text{ nm}$ verwendet wird, bleicht die Probe dabei nicht aus. Als Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung dient eine Kurzbogenquecksilberlampe (HBO 103W/2, Osram, Mün-

chen) mit einem Filtersatz (455DF70, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) für NBD. Das Licht wird dann mit einem dichromatischen Spiegel in den Strahlengang eingekoppelt. Über ein Apochromatobjektiv (M Plan APO 50x, Mitutoyo America Corporation, Aurora, IL, USA) wird die Membran beleuchtet. Die Besonderheit dieses Objektivs ist, dass es über einen Arbeitsabstand von 13 mm verfügt. Auch eignen sich Apochromatobjektive zur Aufnahme von Farbbildern, da sie für 4 Farben chromatisch und für 2 bis 3 Farben sphärisch korrigiert sind, so dass die Farbverzerrungen minimiert sind. Das von der Membran emittierte Licht wird wieder durch das Objektiv, durch den dichroitischen Spiegel und zur Filterung des restlichen Anregungslichtes durch ein 515 nm-Filter (515ALP, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) auf den CCD-Chip der Kamera (C8484-02, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herschingen) geleitet. Zur Weiterverarbeitung der Bilder im Computer dient das Programm WASABI (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herschingen). Die optische Auflösung des System beträgt in Luft 470 nm, die elektronisch mögliche Auflösung beträgt 150 nm und ist somit höher als die optisch mögliche Auflösung.

5.7 Biologische Methoden

Um die biophysikalischen Daten zu untermauern, wurden in dieser Arbeit biologische Methoden verwandt. Dabei ist zur Kontrolle der verwendeten antimikrobiellen Peptide der Test auf antimikrobielle Wirksamkeit besonders wichtig. Weiter wurde die Hämolyse, das Abtöten der roten Blutkörperchen, ermittelt.

5.7.1 Test der Peptide auf antimikrobielle Aktivität

Für den Test lässt man die Bakterien für 3 bis 4 Stunden in LB-Medium bei einer Temperatur von $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ wachsen. Danach werden die Bakterien drei Mal mit einem 10 mM Phosphat-Puffer mit pH 7.4 gewaschen und auf eine Konzentration von 10^4 bis 10^5 Bakterien pro ml eingestellt. Eine Menge von 100 μl dieser Lösung wird nun mit 10 μl der zubeschreibenden Peptidlösung gemischt. Da diese mit einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt ist, ergibt sich die maximale Endkonzentration mit 100 $\mu\text{g/ml}$. Die Mischung aus Bakterien und dem antimikrobiellen Peptid wird bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ nochmal für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die sogenannte kolonie-

bildende Einheit (ein Maß für die Anzahl an individuellen und aneinanderhaftenden Bakterien) bestimmt. Die Negativkontrolle wird nur mit 10 µl 0,01% Essigsäure statt der Peptidlösung durchgeführt. Die Ergebnisse werden als LD₉₀ angegeben. Bei dieser Konzentration werden 90% der eingesetzten Bakterien abgetötet. Dieser Wert orientiert sich an dem Wert, der sich im klinischen Einsatz als sinnvoll erweist, da die Abtötung der letzten 10% der Bakterien eine überproportional große Menge an antimikrobiellem Peptid benötigt.

5.7.2 Hämolyse-Test

Zum Testen der hämolytischen Wirkung antimikrobieller Peptide werden zunächst Erythrozyten (rote Blutkörperchen) mit PBS (137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,2 mM Na₂HPO₄ bei pH 7,4) gewaschen und in 5 ml PBS aufgenommen. Nach einem Verdünnungsschritt (die Lösung wird 1:6 in PBS verdünnt) wird die optische Dichte (OD) auf 1,4 eingestellt. Es wird somit eine bestimmte Zellkonzentration eingestellt. Daraufhin wird das Peptid mit PBS versetzt, um die verwendete Konzentrationsreihe (10 µM bis 3 nM) einzustellen. Zur Kontrolle wird Wasser für die maximale Lyse und PBS für die minimale Lyse verwendet. In einer Rundbodenplatte werden nun 80 µl Wasser, PBS oder die Peptidlösung mit 20 µl der Erythrozyten-Suspension versetzt und für 30 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Mit Hilfe von Eis wird die Inkubation gestoppt. Zur Gewinnung des Überstandes wird die Platte zentrifugiert. Die Überstände werden nun in eine weitere Platte überführt und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Messung des roten Farbstoffes (als Maß für die Lyse) wird mit Hilfe eines Elisareaders (Rainbow F039034, TECAN, Grödig, Österreich) bei einer Wellenlänge von 406 nm durchgeführt. Die Ergebnisse werden auf die maximale Lyse normiert.

5.8 Verwendete Lipide

5.8.1 Glycerophospholipide

Glycerophospholipide wurden im Laufe dieser Arbeit an verschiedenen Stellen verwendet: Zum einen zur Rekonstitution der Innenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, zum anderen in Verbindung mit dem Trihalose Dimykolat zur Rekonstitution der Zellhülle von Mykobakterien.

Für die Rekonstitution der Innenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wurde eine Mischung von Glycerophospholipiden verwendet, wie sie für das Bakterium *Samonella enterica* serovar Typhimurium beschrieben wurde. Diese besteht aus den Lipiden PE, PG und DPG im molaren Verhältnis 81:17:2 [Osborn *et al.*, 1972]. Diese Mischung wird im Rahmen dieser mit der Abkürzung PL betitelt.

Für die Rekonstitution der Zellhülle von Mykobakterien wurde eine Mischung aus PE:PG:TDM in einem molaren Verhältnis 25:25:50 verwendet. Diese Mischung wurde verwendet, da auch PE und PG Bestandteile der mykobakteriellen Membran sind.

Alle Glycerophospholipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) bezogen und ohne weitere Aufreinigung mit einer Konzentration zwischen 1,0 bis 2,5 mg/ml in Chloroform gelöst. Die Aufstellung der verwendeten Phospholipide ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Lipid	Abkürzung	Herkunft	rel. Masse M _r / Da	Q / e ₀
Phosphatidylethanolamin	PE	<i>E. coli</i>	871,61	0
Phosphatidylglycerol	PG	Eigelb	770,5	-1
Diphosphatidylglycerol	DPG	Rinderherz	1501	-2

Tabelle 1: Herkunft, Gewicht, relative Molekülmasse und Ladung der verwendeten Glycerophospholipide

LPS	Herkunft	Stamm	rel. Masse M_r / Da	Q/e ₀
LPS WBB01	<i>E. coli</i>	WBB01	2237	-4
LPS R595	<i>S. minnesota</i>	R595	2415	-3,4
LPS R45	<i>P. mirabilis</i>	R45	2465	-3

Tabelle 2: Verwendete LPS, deren Herkunft, die relative Molekülmasse und die Nettoladung

5.8.3 Trehalose Dimykolat

Das verwendete Trehalose Dimykolat stammt von *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis*) Kopenhagen. Die durchschnittliche relative Molekülmasse liegt bei 2812 Da. Das verwendete Trehalose Dimykolat wurde von Ulrich Schaible (London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London, London, Großbritannien) extrahiert. Die Struktur ist in Abbildung 27 gezeigt.

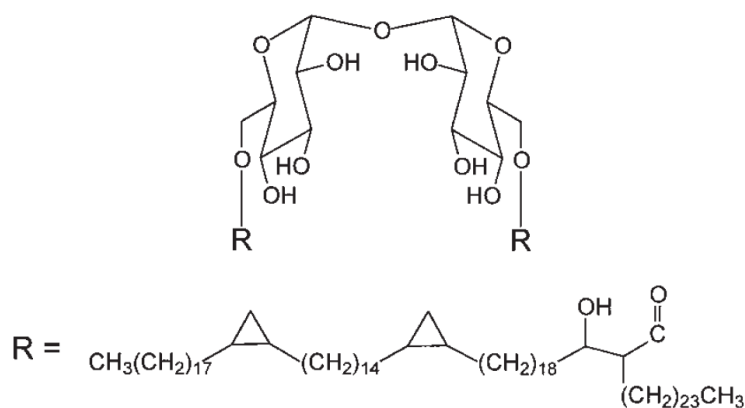


Abbildung 27: Struktur des verwendeten Trehalose Dimykolat von *M. bovis*

5.9 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Fluoreszenzmakierung zur Beschreibung der Domänenbildung in rekonstituierten Membransysteme wurde ein PE NBD gebunden ist, verwendet. Das NBD-PE wurde von Molecular Probes (Invitrogen, USA) bezogen und ohne weitere Aufreinigung zu 1 % den unmakierten Lipiden hinzugesetzt.

Für die FRET-Messungen wurden die Lipid-Aggregate mit dem oben genannten NBD-PE und Rh-PE zu jeweils 1 % versetzt.

5.10 Verwendete humane β -Defensine

Es wurde rekombinates hBD-2, rekombinates hBD-3 und 2 synthetische Derivate von hBD-3 in dieser Arbeit verwendet.

5.10.1 hBD-3

Aufgrund erheblicher Schwierigkeiten bei der Herstellung von synthetischem hBD-3 wurde in dieser Arbeit rekombinates hBD-3 verwendet, welches in *E. coli* Bakterien exprimiert und mittels eines His-Tags extrahiert wird (J. Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland). Bei jeder einzelnen Lieferung wurde die antimikrobielle Aktivität bestimmt, weiter wurde mittels Massenspektrometrie die Masse bestimmt, ebenso wurde kontrolliert, ob die Disulfidbrücken geschlossen sind. Mit Hilfe der Chromatographie wurde festgestellt, dass die Disulfidbrücken im Vergleich mit dem nativen hBD-3 einheitlich verlinkt sind.

5.10.2 hBD-3-6S

Dieses Derivat des hBD-3 wurde hergestellt, in dem alle Cysteine des Peptides durch Serine ersetzt werden. Somit können sich keine Disulfidbrücken ausbilden, so dass

dieses Peptid einfacher synthetisch herstellbar ist. Auch bei diesem Peptid wurde vor dem Einsatz die antimikrobielle Aktivität gemessen und mittels Massenspektrometrie die Masse kontrolliert.

5.10.3 C-hBD-3-1-5-C

Bei diesem Derivat des hBD-3 wurden die Cysteine 2,3,4 und 6 durch Serine ersetzt. Somit bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 1 und 5. Mittels Massenspektrometrie wurde sowohl die korrekte Masse als auch der geschlossene Zustand der Disulfidbrücke kontrolliert. Weiter wurde die antimikrobielle Aktivität bestimmt.

5.10.4 hBD-2

Auch dieses Peptide wurde, wie schon das hBD-3, wegen erheblicher Schwierigkeiten bei der Synthese rekombinant hergestellt, d.h. in *E. coli* Bakterien exprimiert und mittels eines His-Tags extrahiert. Die antimikrobielle Aktivität ist bei jeder einzelnen Lieferung bestimmt worden. Mittels Massenspektrometrie wurde geprüft, ob die Masse korrekt ist und die Disulfidbrücken geschlossen sind. Die Chromatographie wurde genutzt, um sicherzustellen, dass die Disulfidbrücken im Vergleich mit dem nativen hBD-2, einheitlich verlinkt sind.

5.10.5 Tabellarischer Überblick über die verschiedenen humanen β -Defensine

In den folgenden Tabellen soll ein kurzer Überblick über die verwendeten humanen β -Defensine gegeben werden.

Peptid	rel. Masse M_r / Da	Ladung / e_0	Anzahl Disulfidbrücken
hBD-3	5154	+11	3
hBD-2	4331	+6	3
hBD-3-6S	5064	+11	0
C-hBD-3-1-5-C	5093	+11	1

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Defensine und wichtige Molekülparameter

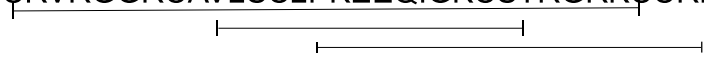

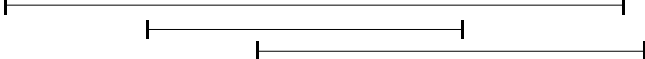
Peptid	Aminosäuresequenz
hBD-3	GIINTLQKYYÇRVRGGRCAVLSSCLPKKEEQIGKCSTRGRKÇCRRKK 
hBD-3-6S	GIINTLQKYYSRVRRGGRSAVLSSLPKKEEQIGKSSTRGRKSSRRKK
C-hBD-3-1-5-C	GIINTLQKYYCRVRRGGRSAVLSSLPKKEEQIGKSSTRGRKCSRKK 
hBD-2	GIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP 

Tabelle 4: Aminosäuresequenz der verwendeten Defensine

5.11 Verwendetes Vergleichspeptid (Polymyxin B)

Polymyxin B (PMB) ist ein Stoffwechselprodukt des Bakteriums *Bacillus polymyxa*. Dieses zyklisches Dekapeptid verfügt über einen hydrophoben Schwanz und 5 positive Ladungen, der Durchmesser des Peptides beträgt 1,23 nm [El Mashak & Tocanne, 1980] und es hat eine relative Molekularmasse von 1380 Da. PMB ist aktiv gegen eine Vielzahl Gram-negativer Bakterien, wobei es Ausnahmen gibt wie *P. mirabilis*. Weiter hat das PMB einen amphiphilen Charakter, so dass es bei hohen Konzentrationen (CMC-Wert ca. 10 mM) Aggregate bildet. Es dient in der Laborgruppe Biophysik als Modellsubstanz zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Peptiden und

Gram-negativen Bakterien [Wiese&Gutsmann & Seydel, 2003], da der Porenbildungsmechanismus hinreichend genau bekannt ist [Vaara, 1992].

5.12 *Verwendete Cantilever*

Hier soll eine kurze Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Cantilever gegeben werden.

5.12.1 NSG11 / CSG11

Diese Cantilever werden aus Silizium-Nitrit von NT-MDT (Moskau, Russland) hergestellt und auf der Rückseite mit einer Goldschicht zur Verbesserung der Reflektivität überzogen. Jeder Träger verfügt dabei über zwei Cantilever. Die folgende Tabelle gibt die wichtigsten Parameter an.

Cantilever	Empfohlener Modus	Federkonstante / N m⁻¹	Resonanzfrequenz in Luft / kHz	Länge / μm	Spitzenradius / nm
NSG 11 A	AC	5,5	150	130	< 10
NSG 11 B	AC	11	255	100	< 10
CSG 11 A	DC	0,1	20	250	< 10
CSG 11 B	DC	0,03	10	350	< 10

Tabelle 5: Parameter der verwendeten NT-MDT Cantilever

5.12.2 TAP300AL

Diese Cantilever werden ebenfalls aus Silizium-Nitrit hergestellt., jedoch von BudgetSensors (Innovative Solutions Bulgaria Ltd, Sofia, Bulgarien) Sie sind auf der Rückseite mit Aluminium beschichtet.

Cantilever	Empfohlener Modus	Federkonstante / N m^{-1}	Resonanzfrequenz in Luft / kHz	Länge / μm	Spitzenradius / nm
TAP300AL	AC	40	300	125	< 10

Tabelle 6: Parameter der verwendeten BudgetSensors Cantilever

5.12.3 Multi75GB Au

Diese Cantilever wurden für die Interaktionsmessungen mit den Lipidmonoschichten und zur Beschichtung mit Hexadecanthiol verwendet. Die Cantilever sind ebenfalls aus Silizium-Nitrit von BudgetSensors hergestellt, aber komplett mit Gold beschichtet. Daher ergibt sich ein deutlich größerer Spitzenradius.

Cantilever	Empfohlener Modus	Federkonstante / N m^{-1}	Resonanzfrequenz in Luft / kHz	Länge / μm	Spitzenradius / nm
Multi75GB Au	DC/AC	3	75	220	< 25

Tabelle 7: Parameter des verwendeten Goldcantilever

5.12.4 Funktionalisierter Cantilever

Zur Beschichtung der Cantilever des Typs Multi75GB mit Hexadecan wurde 1-Hexadecanthiol der Firma Fluka (52270, Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz) verwendet.

6 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Struktur rekonstituierter Membranen Gram-negativer Bakterien und des Einflusses antimikrobieller Peptide auf diese Membranen wurde eine Vielzahl biophysikalischer Methoden verwendet. Die daraus gewonnenen Daten werden im folgenden Abschnitt vorgestellt. Dieses Kapitel ist in zwei Abschnitte aufgeteilt: zunächst werden die Daten für Gram-negative Bakterien und rekonstituierte Membranen Gram-negativer Bakterien vorgestellt. Im zweiten Abschnitt werden die Daten zu rekonstituierten Membranen von Mykobakterien beschrieben. Die weitere Unterteilung der Ergebnisse wird nach den verwendeten biophysikalischen Techniken und den verwendeten Rekonstitutionsmethoden vorgenommen. Die Verweise auf die jeweiligen Techniken werden jeweils am Anfang der einzelnen Kapitel angegeben.

Da im Besonderen die rekombinanten antimikrobiellen Peptide nur in geringer Menge zur Verfügung standen, konnten nicht alle Versuchsreihen mit allen Peptiden durchgeführt werden. Stattdessen wurden jeweils die Peptide ausgewählt, die sowohl in ausreichender Menge als auch von grundlegendem biophysikalischem Interesse waren.

6.1 *Ergebnisse der biologischen und biophysikalischen Untersuchungen an Gram-negativen Bakterien und deren rekonstituierten äußeren Membranen*

In diesem Abschnitt werden alle Daten im Zusammenhang mit Gram-negativen Bakterien vorgestellt. Dazu gehören zunächst die biologischen Versuche an (i) ganzen Bakterien, (ii) an substratgestützten Mono- und Doppelschichten mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie, sowie (iii) an LPS Aggregaten mittels spektroskopischer Messungen und (iv) freistehenden asymmetrischen Membranen, die mit Hilfe der Montal-Mueller-Technik rekonstituiert wurden.

6.1.1 Ergebnisse der biologischen Untersuchungen

Zur Korrelierbarkeit mit biophysikalischen Daten ist es immer notwendig, auch biologische Tests durchzuführen. Im Folgenden sollen die Daten zur antimikrobiellen Aktivität der untersuchten Peptide und die Daten zur Hämolyse der Peptide vorgestellt werden (siehe S. 76).

6.1.1.1 Untersuchungen auf antimikrobielle Aktivität

Die Ergebnisse werden in den Tabellen als minimale bakterizide Konzentration (MBK) und als Konzentration, die 90% der Bakterien abtötet (LD 90), angegeben.

Zunächst sollen die Untersuchungen der hBD-3 Derivate (Tabelle 8), hBD-3-6S und C-hBD-3-1-5-C angegeben werden. Zum Vergleich wurden die Daten für rekombinantes hBD-3 mit aufgelistet.

Stämme	hBD-3-6S		C-hBD-3-1-5-C		rek. hBD-3	
	MBK / $\mu\text{g/ml}$	LD 90 / $\mu\text{g/ml}$	MBK / $\mu\text{g/ml}$	LD 90 / $\mu\text{g/ml}$	MBK / $\mu\text{g/ml}$	LD 90 / $\mu\text{g/ml}$
<i>E. coli</i> WBB 01	0,78	0,2	0,39	0,1	0,39	0,1
<i>S. minnesota</i> R 595	0,39	0,1	1,56	0,2	1,56	0,39
<i>P. mirabilis</i> R 45	3,13	0,39	>100	12,5	>100	12,5

Tabelle 8: Ergebnisse der antimikrobiellen Tests für die verwendeten hBD-3 Derivate.

Zum Vergleich sind die Daten für rekombinantes hBD-3 mit aufgelistet.

Die Ergebnisse zeigen eine gute antimikrobielle Aktivität aller Peptide gegen *E. coli* WB-B01 und *S. minnesota* R595 Tiefraumutanten-Stämme. Gegen *P. mirabilis* R45 ist jedoch nur hBD-3-6S aktiv, gegen die anderen Peptide ist dieser Stamm resistent.

Um darzustellen, wie unterschiedlich die Ergebnisse für unterschiedliche Chargen des hBD-2 sind, werden in der folgenden Tabelle 9 die Daten für die Messungen an *E. coli* mit zwei Chargen hBD-2 angegeben.

Stämme	hBD-2 A		hBD-2 B	
	MBK / $\mu\text{g/ml}$	LD 90 / $\mu\text{g/ml}$	MBK / $\mu\text{g/ml}$	LD 90 / $\mu\text{g/ml}$
<i>E. coli</i> WBB 01	6,25	1,56	>100	0,78
<i>S. minnesota</i> R 595	6,25	1,56	-	-
<i>P. mirabilis</i> R 45	>100	>100	-	-

Tabelle 9: Ergebnisse der antimikrobiellen Tests für die verwendeten hBD-2.

Die verschiedenen Chargen hBD-2 hatten sehr unterschiedliche Aktivitäten gegen die einzelnen Bakterienstämme. Als Beispiel sind die antimikrobiellen Aktivitäten für den *E. coli* Stamm WBB01 angegeben.

Die Ergebnisse zeigen eine deutlich niedrigere Aktivität des Peptides als dies für hBD-3 und deren Derivate gezeigt wurde. Interessanterweise variieren die Daten für WBB01 zwischen den Chargen sehr stark. Daher musste vor der Verwendung die antimikrobielle Aktivität der jeweiligen Charge überprüft werden. Dies führte zu einer weiteren Verringerung der zur Verfügung stehenden Menge des Peptides.

6.1.1.2 Hämolyse der humanen β -Defensine

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen β -Defensine zeigten keine hämolytische Wirkung. Die Werte der Lyse humaner roter Blutkörperchen war für alle Peptide sehr gering. In Tabelle 10 werden die Prozentwerte bezogen auf die maximal mögliche Lyse induziert durch die Inkubation in destilliertem Wasser angegeben.

Konz.(μM)	hBD3/ Lyse %	hBD2/ Lyse %	C-hBD3-1-5-C/ Lyse %	hBD3-6S/ Lyse %
0	2,959	-0,179	-1,254	0,179
0,01	0,358	1,075	0,896	0,358
0,03	0,896	1,434	-1,434	-2,330
0,1	3,226	2,688	-0,717	-0,896
0,3	-0,179	1,613	-1,613	-1,434
1	-0,717	-0,179	-0,179	-1,075
3	-1,075	-0,358	-1,075	-2,509
10	0,538	-2,688	-1,254	1,075

Tabelle 10: Zusammenstellung der Daten des Hämolysetest für die verwendeten Defensine.

6.1.2 Versuche mit Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie

In diesem Abschnitt werden zunächst die Daten, die an reinen LPS- und Phospholipidmonoschichten (siehe S. 40) gewonnen wurden, gezeigt. Diese wurden mit Hilfe der Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Weitergehend wurden Versuche durchgeführt, in denen hBD-3-6S unter Monoschichten gespritzt wurde. Die daraus resultierenden Änderungen der Domänenstrukturen wurden ebenfalls mit dem Rasterkraftmikroskop (siehe S. 41) untersucht.

Zur weiteren Untersuchung der mit und ohne interkaliertem hBD-3-6S Lipid-Domänenstrukturen wurden Adhäsions- und Abriss-Kraftkarten (siehe S. 48) mit dem Rasterkraftmikroskop aufgenommen.

Weitergehend wurden Untersuchungen an Peptid-inkubierten LPS Aggregaten (siehe S. 59), die auf Mica aufgebracht wurden, durchgeführt.

6.1.2.1 Domänenbildung in LPS- und Phospholipid-Monoschichten

Für ein grundlegendes Verständnis der molekularen Interaktionen in biologischen Membranen, speziell in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, wurden verschiedene Untersuchungen an Lipidmonoschichten durchgeführt. Für alle Messungen wurde

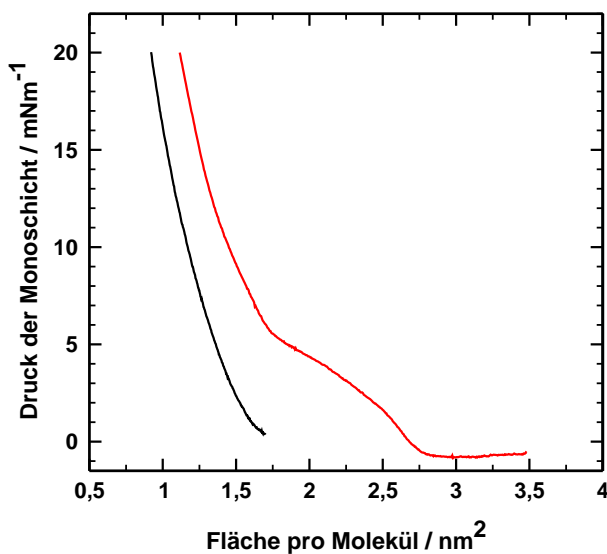


Abbildung 28: Isothermen der Kompression verschiedener Lipidmonoschichten.

Die LPS R45 (**rot**) und PL (**schwarz**) Lipidmonoschichten wurden bis zu einem lateralen Druck von 20 mNm⁻¹ bei Raumtemperatur komprimiert. Die Isotherme der LPS R45 Monoschicht zeigt im Bereich von 3 bis 6 mN/m eine Umorganisation der Monoschicht. Folgender Puffer wurde verwendet: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0.

ein einheitlicher Puffer verwendet, der 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei einem pH-Wert von 7,0 beinhaltet. Die Lipidmonoschichten wurden bei Raumtemperatur als Langmuir-Blodgett-Film bei einem lateralen Druck der Monoschicht von 20 mN/m auf Mica übertragen, was im Bereich des dem im Bezug auf natürliche Membranen äquivalenten Druckes (Äquivalenzdruck) liegt. Verwendet wurden zwei verschiedene Lipide, die Phospholipidmischung PL, die die innere Lipidmonoschicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien repräsentiert und das LPS des Raumutantenstammes von *P. mirabilis* R45 (LPS R45). Dieses LPS wurde verwendet, da der Stamm, der dieses LPS exprimiert, gegen viele antimikrobielle Peptide, wie hBD3, hBD2 oder PMB resistent ist und daher weitere Erkenntnisse zur Struktur dieser Membran sehr wichtig sind. Zur Kontrolle wurde bei jeder Messung die Druck-Flächen-Isotherme des Lipidfilmes aufgenommen (Abbildung 28). Dabei zeigte sich, dass die Lipidmonoschichten des LPS R45 im Bereich eines lateralen Druckes von 3 bis 6 mN/m einer Umorganisation unterliegen. In diesem Bereich ist die Steigung des Druckes geringer als bei höheren Drücken. Bei diesem Phänomen handelt es sich jedoch nicht um einen Phasenübergang, da dieser erst bei höheren lateralen Drücken vorkommt und zudem temperaturabhängig wäre. Mit Hilfe von Cantilevern des Typs NSG11B wurden Höhenbilder der LB-Filme auf Mica mit dem Rasterkraftmikroskop aufgenommen (Abbildung 29).

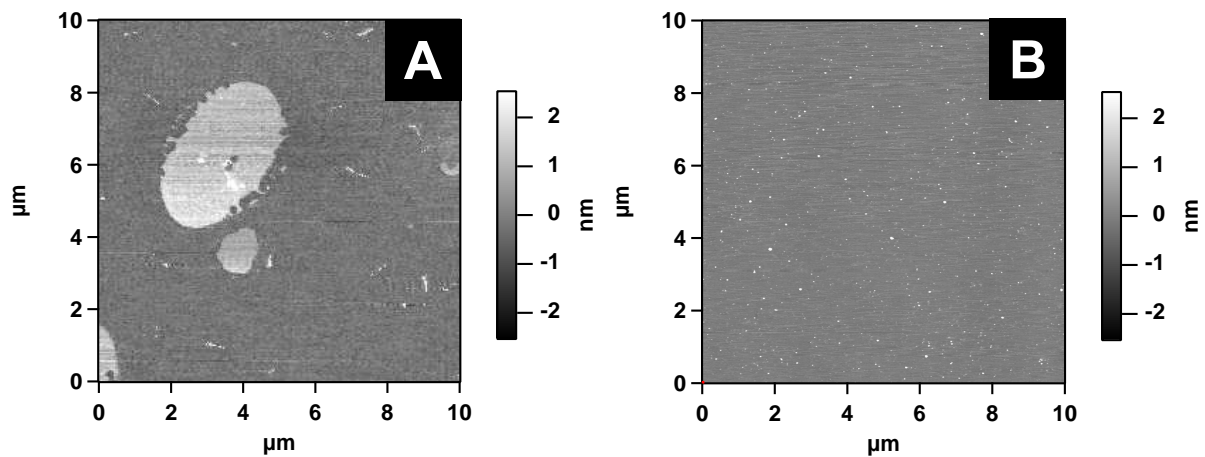
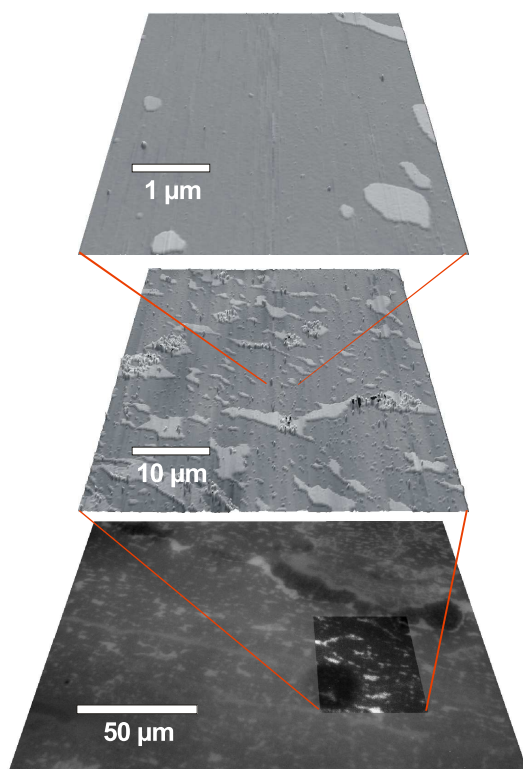


Abbildung 29: AFM Höhenbilder verschiedener Lipidmonoschichten.

Die (A) LPS R45 (B) PL Lipidmonoschichten wurden bei einem lateralem Druck von 20 mN/m bei Raumtemperatur auf Mica transferiert. Die Aufnahmen wurden im attraktiven AC-Modus aufgenommen. Bei den höher erscheinenden Flächen handelt es sich um fluide Bereiche. Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0; Cantilever: NSG11 B.

Abbildung 30: Kombination von Fluoreszenzbild und rasterkraftmikroskopischem Höhenbild



Bei dem unteren Bild handelt es sich um das Fluoreszenzbild, das mittlere und obere Bild stellten rasterkraftmikroskopische Bilder dar. Diese Aufnahmen wurden im attraktiven AC-Modus aufgenommen. Die LPS R45 Lipidmonoschichten wurden mit einem lateralem Druck von 25 mN/m bei Raumtemperatur auf Mica präpariert. Bei den höher erscheinenden bzw heller leuchtenden Flächen handelt es sich um fluide Bereiche. Am Ende der rasterkraftmikroskopischen Messung wurde der Lipidfilm weggekratzt, so dass die mit dem Rasterkraftmikroskop gemessene Fläche wiedergefunden werden konnte. Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0; Cantilever: MDT NSG11 B.

Dabei sind Domänen in LPS R45 Monoschichten erkennbar, nicht jedoch in Lipidmonoschichten der Phospholipidmischung PL. Die kleinen Erhöhungen, die in Abbildung 29 B zu erkennen sind, stellen lediglich Verunreinigungen der Lipidmischung dar. Aus dem Phasenbild konnte durch Mittelung aller Bildpunkte ermittelt werden, dass die Phase größer war als 90° , so dass es sich bei den höher erscheinenden Domänen um flüssig-expandierte (LE) Domänen, die im Folgenden verkürzend als fluide bezeichnet werden, handelt. Die niedrigeren Areale sind demzufolge die flüssigkondensierten (LC) Bereiche. Um zu untersuchen, ob dieses Verhalten im Fall des LPS R45 über die gesamten Lipidmonoschichten vorhanden ist, wurden die AFM-Aufnahmen mit Fluoreszenzaufnahmen derselben Monoschicht kombiniert. Dazu wurde das LPS R45 in chloroformischer Lösung mit 1% NBD-PE gemischt. In Abbildung 30 wurden die einzelnen Aufnahmen übereinander gelegt. Im Fluoreszenzbild erscheinen die fluiden Domänen heller als die rigiden, im rasterkraftmikroskopischen Bild erscheinen die fluiden Bereiche höher. Durch den lateralen Druck von 25 mN/m, dieser liegt im Bereich des Äquivalenzdruckes natürlicher bakterieller Membranen, bilden sich in der Monoschicht grundsätzlich kleinere Domänen als bei einem lateralen Druck von 20 mN/m. Die Daten ergeben, dass es sowohl größere Domänenverbände, als auch kleinere, im optischen Bild nicht mehr erkennbare, Domänen gibt. Dabei kann der Einfluss des NBD-PE vernachlässigt werden. Mit der Kombination aus optischer und Rasterkraftmikroskopie ist es möglich, sowohl große Strukturen in der Lipidmonoschicht als auch kleine Substrukturen zu untersuchen.

6.1.2.2 Einfluss von hBD-3-6S auf die Domänenstruktur in Lipidmonoschichten

Für diese Messungen wurden Lipidmonoschichten mit LPS R45 präpariert und hBD-3-6S unter die Monoschicht gespritzt, die Monoschicht wurde im nächsten Schritt mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik auf Mica übertragen und mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht. Der laterale Druck der Monoschichten betrug 20 mN/m. Weitergehend wurde ein einheitlicher Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES bei pH 7,0 verwendet. Es wurden zwei Versuche durchgeführt: in einer Versuchsreihe wurde ein molares Verhältnis von 1:1 zwischen LPS und hBD-3-6S (dies entspricht 0,11 $\mu\text{g/ml}$) verwendet, das hBD-3-6S wurde dabei direkt unter die Monoschicht gespritzt. Zum Ver-

gleich mit anderen Messungen dieser Arbeit wurde zudem eine Versuchsreihe durchgeführt, in der eine hBD-3-6S Konzentration von 5 µg/ml in den Puffer gleichmäßig über das Volumen eingespritzt wurde. In beiden Fällen baute sich das antimikrobielle Peptid in die Monoschicht ein, wodurch sich die Fläche des Filmes vergrößerte (Abbildung 31). Die Flächenzunahme in der Sättigung bei einem molaren Verhältnis von 1:1 zwischen LPS und Peptid beträgt $29\% \pm 10\%$, während die Zunahme der Fläche bei einer hohen Peptidkonzentration im Puffer auf $58\% \pm 10\%$ ansteigt.

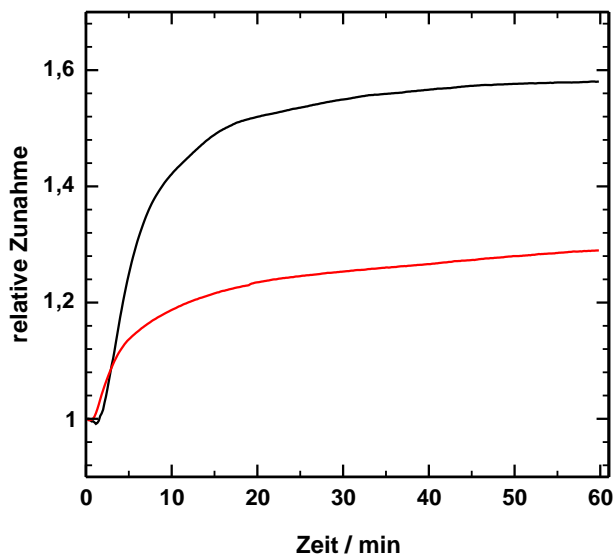


Abbildung 31: Zunahme der Filmfläche nach Zugabe von hBD-3-6S in die Subphase.

Die LPS R45 Monoschicht wurde bei einem lateralem Druck von 20 mN/m mit hBD-3-6S auf einem Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei 20°C inkubiert.

Die **rote** Kurve zeigt die Flächenzunahme nach Zugabe von hBD-3-6S in die Subphase im Verhältnis 1:1 M/M LPS R45:hBD-3-6S (entsprechend 0,11 µg/ml).

Die **schwarze** Kurve zeigt die Flächenzunahme nach Zugabe von 5 µg/ml hBD-3-6S.

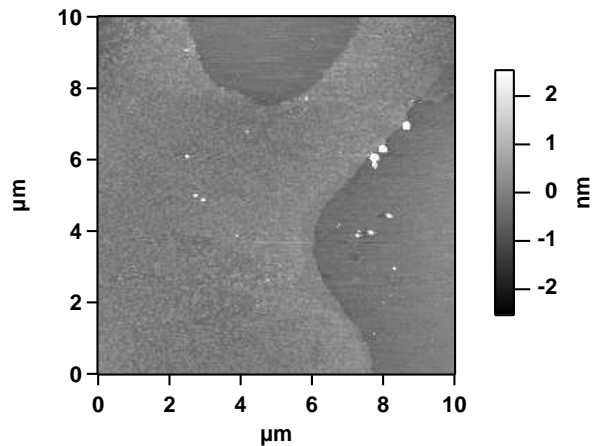


Abbildung 33: Höhenbild einer LPS R45 Monoschicht nach Zugabe von 1:1 M/M LPS R45:Peptid hBD-3-6S.

Die LPS R45 Monoschicht wurde bei einem lateralem Druck von 20 mN/m mit 1:1 M/M LPS:hBD-3-6S hBD-3-6S auf einem Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei 20°C versetzt. Die Monoschicht wurde auf Mica übertragen und ist im repulsiven AC-Modus mit einem Cantilever des Typs CSG 11B aufgenommen worden. Die fluiden Domänen erscheinen tiefer als rigide Domänen.

Zunächst sollen hier die Höhenbilder dargestellt werden. Bei der Probe mit 1:1 M/M LPS:hBD-3-6S (Abbildung 33) erkennt man einen deutlichen Unterschied zu den oben gezeigten Proben ohne interkaliertem Peptid. Die Domänenstruktur hat sich sehr stark geändert (Vergleiche Abbildung 29 auf S. 90). Unabhängig vom Phasenzustand der Domänen sind sowohl die LE als auch die LC Domänen deutlich großflächiger geworden, so dass es keine große Anzahl kleiner Domänen, sondern eine kleine Anzahl großer Domänen gibt. In den Bildern zeigt der rigide Bereich eine Unterstruktur in Form kleinerer Domänen. Zudem erkennt man sehr kleine Domänen, die mit 5 nm deutlich höher sind, als der übliche Wert von 1 nm der zwischen fluiden und rigiden Domänen liegt. Diese werden sich später in vergleichbarer Dimension auch in den Doppelschicht-

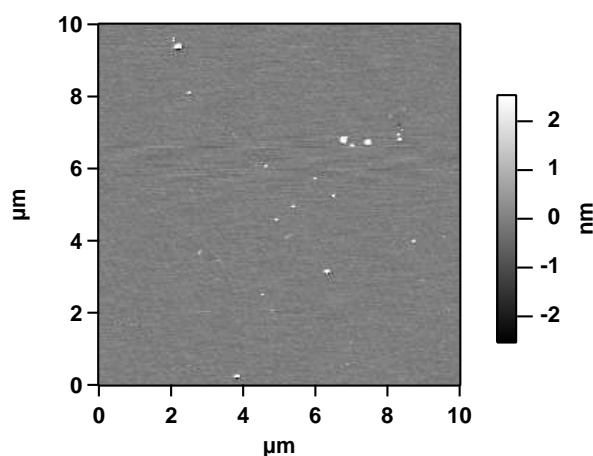


Abbildung 32: Höhenbild einer LPS R45 Monoschicht auf Mica mit 5 µg/ml hBD-3-6S in dem Puffer während der Präparation.

Die LPS R45 Monoschicht wurde bei einem lateralem Druck von 20 mN/m mit 5 µg/ml hBD-3-6S in einem Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei 20°C präpariert. Die Monoschicht wurde auf Mica übertragen und ist im attraktiven AC-Modus mit einem Cantilever des Typs CSG 11B aufgenommen worden.

systemen zeigen. Ohne der Diskussion der Daten schon zu weit vorzugreifen: bei diesen Domänen handelt es sich um einen Verbund (*Cluster*) von hBD-3-6S. Dies lässt sich aus der Höhe dieser Bereiche schließen, da diese deutlich höher sind als reine Lipiddomänen. Die Unterstruktur zeigt einen geringeren Höhenunterschied (± 600 pm) als der Unterschied zwischen fluiden und rigidem Domänen.

Betrachtet man nun die Daten der Monoschicht, die bei einer Peptidkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ in der Subphase präpariert worden sind, so zeigt sich abermals ein großer Unterschied. Die klare Domänenstruktur, wie in den Abbildungen ohne Peptid oder in denen mit geringer Peptidkonzentration, ist verschwunden (Abbildung 32). Die Monoschicht ist grundsätzlich homogen, d.h. es ist keine Unterstruktur innerhalb der Monoschicht erkennbar, bis auf einige kleine etwa 5 nm hohe Strukturen. Zusammenfassend erkennt man deutlich, dass bei konstantem lateralem Druck von 20 mN/m es zu einer deutlichen Umorganisation der Monoschicht kommt.

6.1.2.3 Interaktion zwischen nichtfunktionalisierten Cantilevern und Lipidmonoschichten

Für diese Versuche wurden zwei Typen von Cantilevern verwendet, der NSG11 und der Multi75GB. Der NSG11 ist ein unbeschichteter Silizium-Nitrit Cantilever, während der

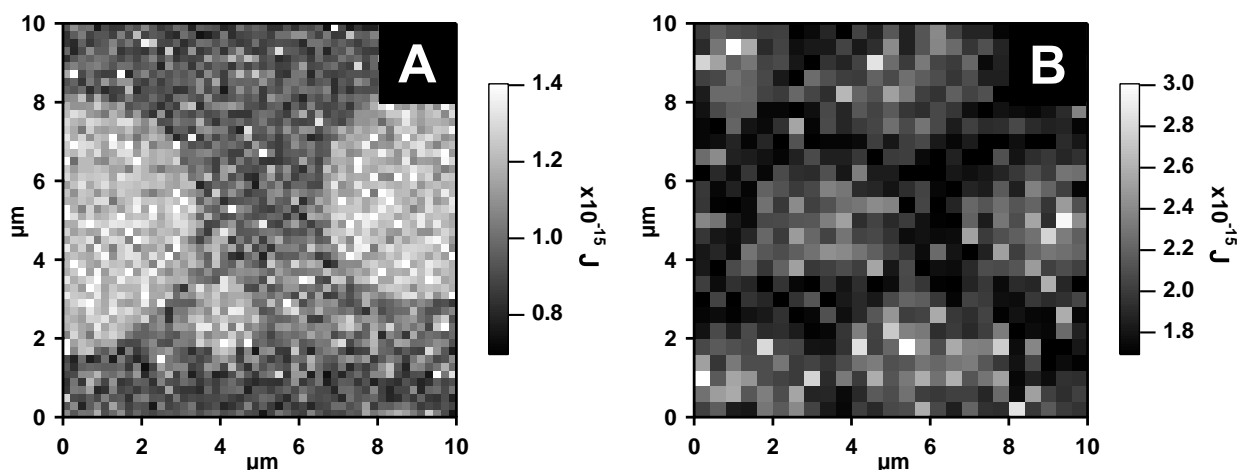


Abbildung 34: Vergleich der Adhäsionsarbeit verschiedener Cantilever an LPS Monoschichten.

Abbildung (A) zeigt die Messung mit einem NSG 11B aus Silizium-Nitrit und (B) mit einem Multi 75GB mit Goldbeschichtung. Lateraler Druck des Lipidfilmes: 20 mN/m ; Puffer: 100 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES , pH: 7,0; Temperatur: RT; Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung: $2 \mu\text{m/s}$.

Multi75GB ein vollständig mit Gold beschichteter Cantilever ist, wodurch sich eine hydrophobe Oberfläche ergibt. Die Messungen wurden an Lipidmonoschichten des LPS R45 auf Mica durchgeführt. Der Film wurde nach der Langmuir-Blodgett-Technik mit einem lateralem Druck von 20 mN/m präpariert. An dieser Monoschicht wurden nun in äquidistanten Abständen Kraftkurven mit einer Geschwindigkeit in z-Richtung von 2 $\mu\text{m/s}$ aufgenommen. Mittels einer automatisierten Berechnung wurden die Adhäsionsarbeit, sowie die Gesamtabrisskraft zwischen Cantilever und Probe bestimmt und über der Fläche aufgetragen, so dass eine Kraftkarte entstand.

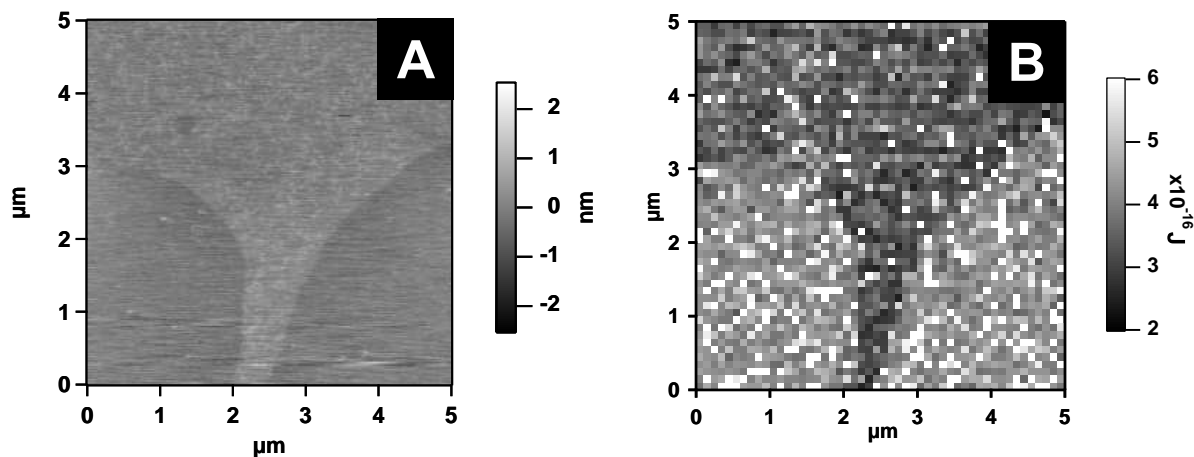


Abbildung 35: Höhenbild im attraktiven AC-Modus (A) im Vergleich mit einer Adhäsions-Kraftkarte (B).

Die Lipidmonoschicht wurde bei mit einem lateralem Druck von 20 mN/m bei Raumtemperatur auf Mica präpariert. Bei den höher erscheinenden Flächen handelt es sich um fluide Bereiche.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, pH: 7,0; Cantilever: NSG11 B; Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung: 2 $\mu\text{m/s}$.

Betrachtet man die Monoschichten des LPS R45, so zeigt sich, dass (Abbildungen 34) sich beide Cantilever eignen, um die unterschiedlichen Phasen der Lipidmonoschichten aufzuzeigen. Es bleibt jedoch zu beachten, dass auf Grund der großen Anzahl an Kraftkurven und der vielfältigen Möglichkeiten der Interaktion zwischen Lipidmonoschicht und dem Cantilever in einigen Fällen keine optimalen Kraftkurven aufgenommen werden konnten und somit die Berechnung der Interaktionskräfte an den jeweiligen Punkten der Kraftkarte fehlschlägt. Daher haben die gemittelten Werte immer einen nicht vernachlässigbaren Fehler. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden Mittelwerte berechnet, indem zunächst ein Histogramm der jeweiligen Parameter erstellt wurde, wel-

ches anschließend mit zwei überlagerten Gauß-Kurven berechnet wurde. Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der so ermittelten Werte für die verschiedenen Cantilever.

	NSG11	Multi75GB	Phase
Hohe Adhäsionsarbeit / fJ	2,14 ± 0,34	1,61 ± 0,12	fluide
Niedrige Adhäsionsarbeit / fJ	1,97 ± 0,34	1,34 ± 0,11	rigide
Hohe Abrisskraft / nN	56,7 ± 6,1	50,5 ± 3,2	fluide
Niedrige Abrisskraft / nN	52,2 ± 6,1	46,6 ± 3,2	rigide

Tabelle 11: Übersicht über die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft verschiedener Cantilever.

Die LPS R45 Lipidmonoschichten wurden bei einem lateralen Druck von 20 mN/m bei Raumtemperatur auf Mica präpariert. Da die Monoschicht in zwei Phasen vorliegt, werden jeweils zwei Werte angegeben. Die einzelnen Kraftkurven wurden mit einer Geschwindigkeit von 2 µm/s aufgenommen und automatisch ausgewertet.

Für den goldbeschichteten Cantilever spricht die bessere Unterscheidbarkeit bei den Phasen der Monoschicht bei kleinerem Fehler. Ansonsten sind die Werte für die beiden Cantilever vergleichbar, es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ermittelt werden. In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, welche Werte für die Abrisskraft und die Adhäsionsarbeit für welche Phase der Monoschicht angenommen werden können. Dazu wurde ein Höhenbild im repulsiven AC-Mode aufgenommen und mit den an derselben Stelle aufgezeichneten Kraftkarten verglichen (siehe Abbildung 35). Daraus ergibt sich, dass es sich bei den Bereichen hoher Adhäsionsarbeit um fluide Domänen handelt.

6.1.2.4 Interaktion zwischen funktionalisierten Cantilevern und Lipidmonoschichten

Zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen den beiden Monoschichten einer biologischen Membran wurden die Wechselwirkungen zwischen Fettsäuren mit Hilfe eines funktionalisierten Cantilever und Lipidmonoschichten durchgeführt. Dazu wurde ein Cantilever des Typs Multi75GB mit einem *self-assembled monolayer* (SAM) aus Hexa-

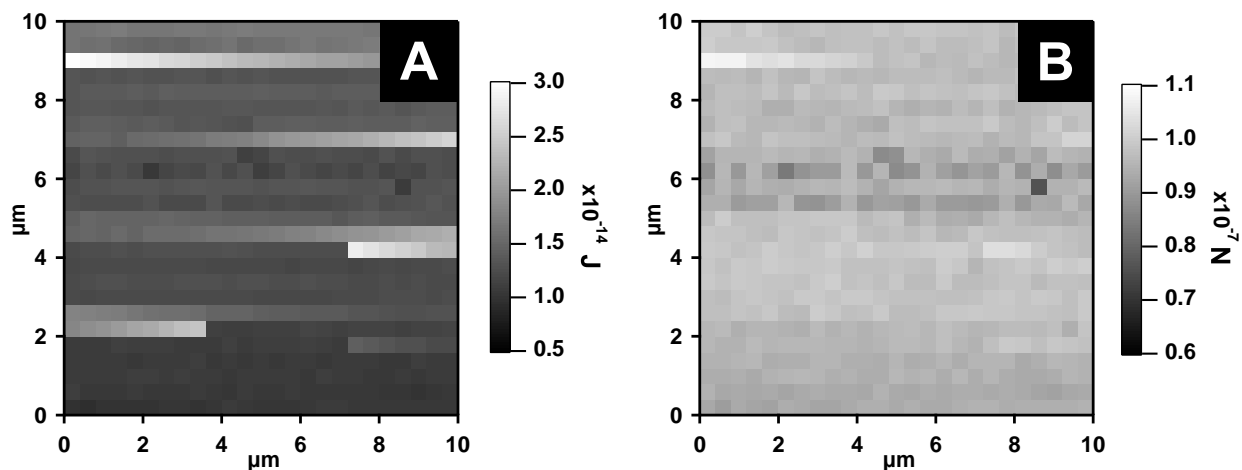


Abbildung 36: Kraftkarten mit funktionalisiertem Cantilever einer PL Monoschicht

Der Cantilever des Typ Multi75GB wurde mit Hexadecanthal funktionalisiert. **(A)** zeigt die Adhäsionsarbeit und **(B)** die Abrisskraft des Cantilevers von einer PL Monoschicht.

Lateraler Druck des Lipidfilmes: 20 mN/m; Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0; Temperatur: RT; Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung: 2 µm/s.

decanthiol belegt. Mit diesem Cantilever wurden daraufhin Kraftkarten von LPS R45 und PL Monoschichten aufgenommen. So ist es möglich, direkt die Interaktion zwischen den Fettsäuren am Cantilever und denen in der Monoschicht zu messen. Die Auswertung der Kraftkarten einer PL Monoschicht lässt keine Domänen erkennen (Abbildung 36). Bei Messungen an LPS R45 Monoschichten lassen sich die beiden Phasen in den Kraftkarten hingegen gut unterscheiden (Abbildung 37).

Zur genaueren Untersuchung der Interaktionskräfte ist es zunächst notwendig, die Abhängigkeit der einzelnen Kraftkurven von der Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung zu untersuchen. Dazu wurden an einer Stelle mehrere Kraftkurven mit unterschied-

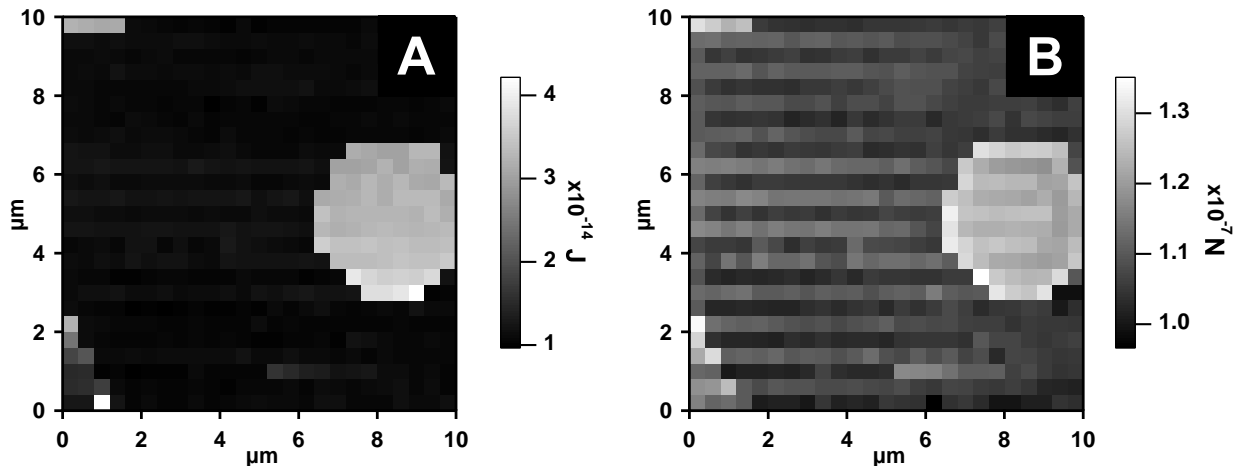


Abbildung 37: Kraftkarten einer LPS R45 Monoschicht mit funktionalisiertem Cantilever.

Der Cantilever des Typs Multi75GB wurde mit Hexadecanthiol funktionalisiert. (A) zeigt die Adhäsionsarbeit und (B) die Abrisskraft des Cantilevers von einer LPS R45 Monoschicht.

Lateraler Druck des Lipidfilmes: 20 mN/m; Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0; Temperatur: RT; Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung: 2 µm/s.

lichen Geschwindigkeiten aufgenommen (Abbildung 38). Diese Messungen zeigen, dass es keine signifikante Änderung der einzelnen Kraftkurve untereinander gibt mit Ausnahme der Kraftkurve, die bei der langsamsten Geschwindigkeit von 100 nm/s aufgenommen wurde. Die gemessene Abweichung würde auf Grund der größeren Fläche

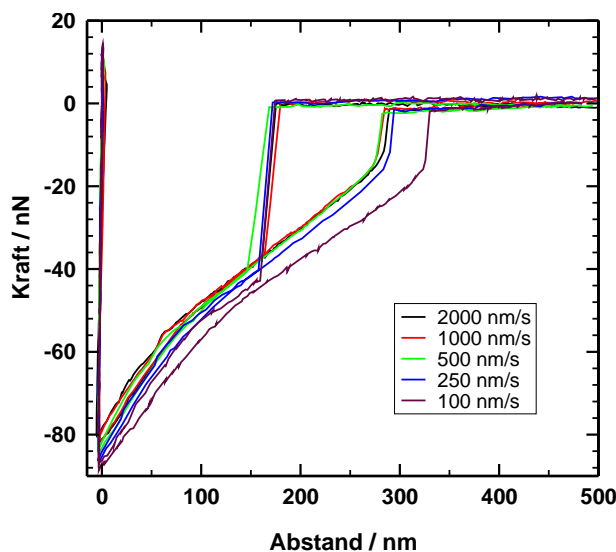


Abbildung 38: Abhängigkeit der Kraftkurven von der Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung.

Der Cantilever des Typs Multi75GB wurde mit Hexadecanthiol funktionalisiert.

Lipidmonoschicht: PL; Lateraler Druck des Lipidfilmes: 20 mN/m; Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0; Temperatur: RT.

unter der Kurve zu einer erhöhten Adhäsionsarbeit führen. Die Messungen wurden jedoch alle mit $2 \mu\text{m/s}$ durchgeführt, so dass die Änderung bei niedrigen Geschwindigkeiten nicht relevant ist. Allerdings nimmt bei den funktionalisierten Cantilevern die Anzahl nicht optimal verlaufender Kraftkurven im Vergleich zu nicht funktionalisierten Cantilevern zu, so dass auch die Anzahl der fehlausgewerteten Datenpunkte zunimmt. Da es sich bei der Wechselwirkung zwischen dem funktionalisierten Cantilever und den Lipidmonoschichten um eine hydrophobe Wechselwirkung handelt, muss sichergestellt werden, dass die Werte nicht von der Luftfeuchtigkeit abhängen. Daher wurde in einer Stickstoff-Atmosphäre untersucht, wie sich die Werte für die Adhäsion unter Reduktion der Luftfeuchtigkeit verhalten. In dem gemessenen Bereich zwischen 1 und 25% hängen die Werte nicht signifikant von der Luftfeuchtigkeit ab (Daten nicht gezeigt). Tabelle 12 zeigt die gemittelten Werte für reines Mica und für PL Monoschichten auf Mica, während Tabelle 13 die Werte für LPS R45 Monoschichten auf Mica darstellt.

	reines Mica	PL Monoschicht auf Mica
Adhäsionsarbeit / fJ	$3,21 \pm 0,03$	$35,9 \pm 8,2$
Abrisskraft / nN	$64,7 \pm 1,1$	$92,9 \pm 4,2$

Tabelle 12: Übersicht über die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft zwischen reinem Mica bzw. PL Monoschichten auf Mica und funktionalisierten Cantilevern.

Die PL Lipidmonoschichten wurden bei einem lateralen Druck von 20 mN/m bei Raumtemperatur auf Mica präpariert. Der Cantilever des Typs Multi75GB wurde mit Hexadecanthalol funktionalisiert, die Cantilevergeschwindigkeit in z-Richtung lag bei $2 \mu\text{m/s}$.

Da es in der LPS R45 Monoschicht zu einer Phasentrennung kommt, werden jeweils für die beiden Phasen getrennte Werte angegeben. Die Zuordnung der Phasen erfolgt dabei wieder durch einen Vergleich mit den Höhenbildern (siehe S. 96). Die Mittelwerte zeigen, dass die Fehler, speziell die der Werte der LPS R45 Monoschicht, sehr groß sind, so dass mit der Abrisskraft keine signifikante Unterscheidung zwischen fluider und rigider Phase gemacht werden kann.

	R45 Monoschicht
Adhäsionsarbeit / fJ der fluiden Phase	16,1 ± 4,1
Adhäsionsarbeit / fJ der rigiden Phase	7,5 ± 1,5
Abrisskraft / nN der fluiden Phase	72,6 ± 11,3
Abrisskraft / nN der rigiden Phase	63,1 ± 8,5

Tabelle 13: Übersicht über die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft zwischen reinem LPS R45 Monoschichten auf Mica und funktionalisierten Cantilevern.

Die LPS R45 Lipidmonoschichten wurden bei einem lateralem Druck von 20 mN/m bei Raumtemperatur auf Mica präpariert. Der Cantilever des Typ Multi75GB wurde mit Hexadecanthal funktionalisiert, die Pull-Geschwindigkeit liegt bei 2 µm/s. Die Daten werden für die fluide und rigide Phase der LPS Monoschicht angegeben.

Vergleicht man die Werte der Adhäsionsarbeit der LPS R45 Monoschichten mit denen der PL Monoschichten, so erkennt man unter Berücksichtigung des Fehlers, dass die Werte der Bereiche hoher Adhäsion der LPS R45 Monoschichten deutlich höher sind als die für Bereiche niedriger Adhäsion, jedoch nicht die Werte für PL Monoschichten erreichen. Ähnliches gilt für die Abrisskräfte, nur dass sich in diesem Fall Bereiche niedriger Abrisskräfte nicht von denen reinen Micas unterscheiden. Daraus wird deutlich, wie fehleranfällig die genaue Analyse der Wechselwirkung zwischen Cantilever und den Fettsäureketten ist. Dies liegt daran, dass nicht nur eine Fettsäurekette an der Cantileverspitze mit einer Fettsäurekette der Lipidmonoschicht interagiert, sondern dass immer mehrere Interaktionen mehrerer Fettsäureketten stattfinden, so dass aufgrund der wechselnden Anzahl der Interaktionen es zu einem deutlichen Fehler des Mittelwertes kommt.

6.1.2.5 Einfluss des hBD-3-6S auf die Interaktion zwischen Cantilevern und Lipidmonoschichten

Neben dem Einfluss des hBD-3-6S auf die Lipidomänen (siehe S. 91) wurde auch untersucht, welchen Einfluss die Interkalation des Peptides in die Monoschicht auf die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen einem Goldcantilever und den hydrophoben

Gruppen der Monoschicht hat. Die ursprüngliche Idee war dabei zu untersuchen, ob die Fettsäureketten innerhalb der Monoschichten im rigiden oder fluiden Zustand vorlagen.

Um die Frage zu lösen, wurden Kraftkarten für LPS R45 Monoschichten ohne Peptid in der Subphase, sowie für Monoschichten mit einem molaren LPS:hBD-3-6S Verhältnis von 1:1 (entsprechen 0,11 µg/ml) und Monoschichten mit einer Konzentration des Peptides von 5 µg/ml im Puffer aufgenommen. Die Versuche wurden mit einem goldbeschichtetem Cantilever (Multi 75GB) durchgeführt, um die hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Cantilever und den Fettsäureketten zu untersuchen. Dieser Cantilever ist jedoch nicht funktionalisiert, um einen kleineren Fehler in der Adhäsionsarbeit sowie in der Abrisskraft im Vergleich zu dem mit Hexdecanthiol beschichteten Cantilever zu erreichen. Abbildung 39 zeigt den direkten Vergleich zwischen den einzelnen Proben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Messungen mit demselben Cantilever durchgeführt. Um zu kontrollieren, dass der Cantilever nicht zu stark während der Messungen verunreinigt wurde, wurde die zuerst gemessene Probe zum Ende des Messzyklusses abermals vermessen. Während bei der Probe ohne hBD-3-6S die Domänenstruktur sehr gut erkennbar ist, sieht man schon bei der Probe mit dem 1:1 Verhältnis zwischen LPS und Peptid keine eindeutige Domänenstruktur mehr. Zudem zeigen sich bei dieser Probe schon höhere Werte für die Abrisskraft und die Adhäsionsarbeit. Eine vollkommen ebene Kraftkarte zeigt sich bei der Probe, bei der 5 µg/ml hBD-3-6S in den Puffer unterhalb der Monoschicht zugegeben wurde. Die Werte für die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft nehmen im Vergleich zu der Probe mit der geringeren Peptidkonzentration abermals zu.

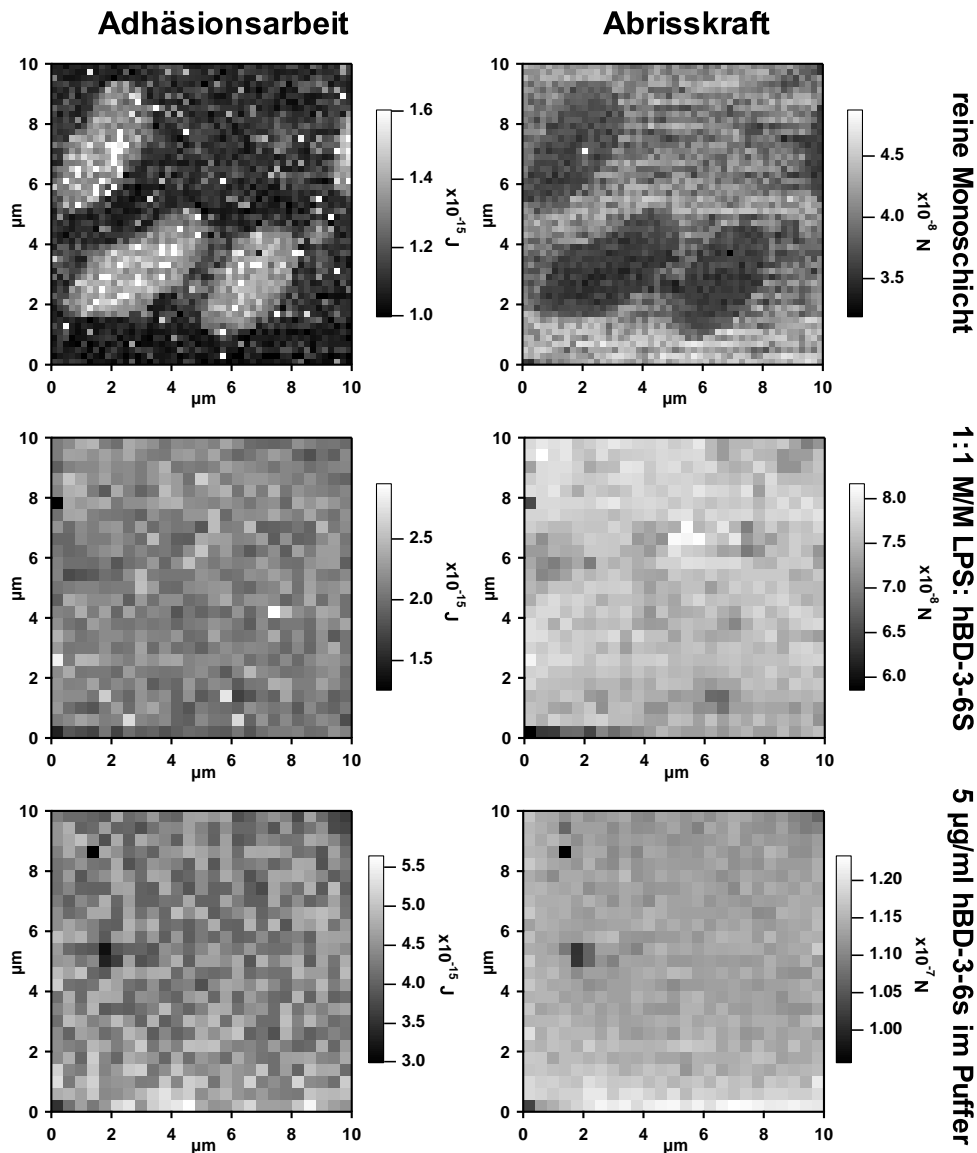


Abbildung 39: Kraftkarten von LPS R45 Monoschichten auf Mica mit verschiedenen Konzentrationen hBD-3-6S im Puffer während der Präparation.

Die LPS R45 Monoschichten wurden bei einem lateralem Druck von 20 mN/m auf einem Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei 20°C präpariert. In der linken Spalte wird die Adhäsionsarbeit, in der rechten Spalte die Abrisskraft gezeigt. In der ersten Reihe werden die Daten einer reinen LPS R45 Monoschicht, in der zweiten Reihe mit einer 1:1 M/M Verhältnis zwischen LPS:hBD-3-6S (entsprechend 0,11 µg/ml) und in der letzten Reihe die Daten für eine Konzentration von 5 µg/ml hBD-3-6S im Puffer bei der Präparation gezeigt. Die Monoschicht wurde auf Mica übertragen und mit einem Cantilever Multi75GB vermessen.

Zur besseren Übersichtlichkeit werden in Abbildung 40 die gemittelten Daten aufgelistet. Dabei zeigt sich deutlich, dass die Proben mit interkaliertem hBD-3-6S deutlich höhere Werte für die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft als die reinen LPS R45 Monoschichten oder des reinen Micas aufweisen. Die unterschiedlichen Werte der fluiden (LE-) und rigiden (LC-) Domänen der reinen LPS R45 Monoschichten sind im Vergleich zu den entsprechenden Unterschieden bei den Schichten mit interkaliertem Peptid sehr klein.

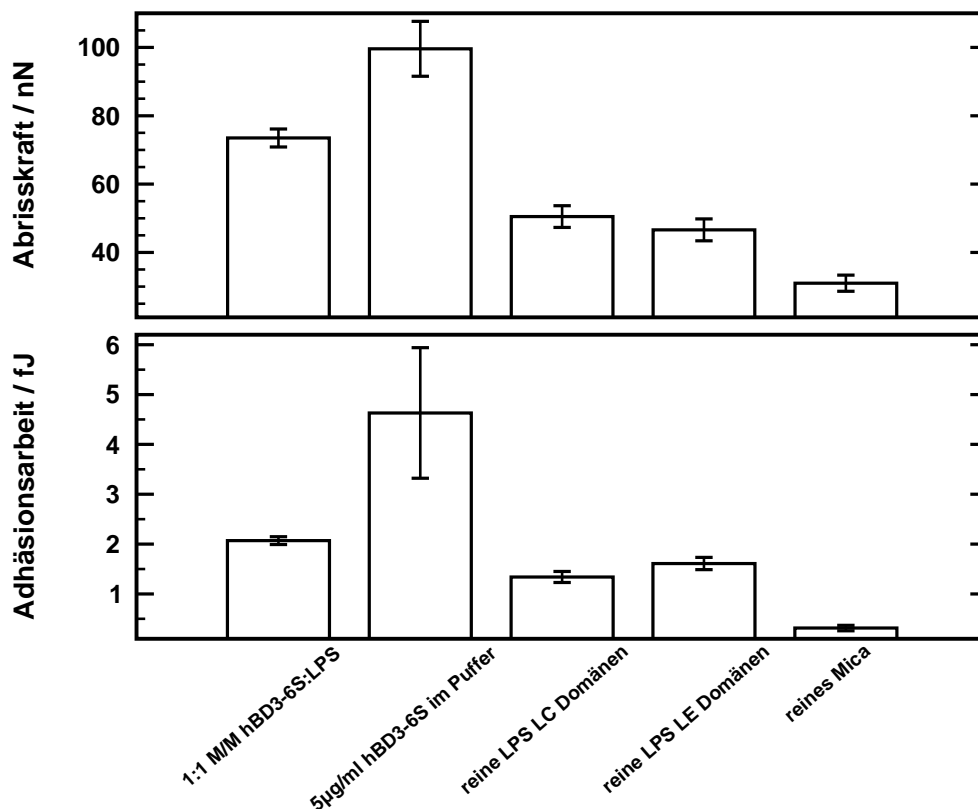


Abbildung 40: Vergleich der gemittelten Daten der Kraftkarten von reinem Mica und den unterschiedlichen LPS R45 Monoschichten auf Mica mit und ohne hBD-3-6S in der Subphase.

Zum Vergleich werden die Daten der reinen LPS R45 Monoschicht getrennt für die rigiden (LC-) und fluiden (LE-) Domänen gezeigt. Zudem werden die Daten für Mica ohne LPS-Monoschicht gezeigt.

6.1.2.6 Messungen an LPS-Doppelschichten vorinkubiert mit hBD-3-6S

Diese Messungen wurden durchgeführt, um die Änderung der Struktur reiner LPS Doppelschichten zu untersuchen. Dabei wurden symmetrische LPS Doppelschichten auf Mica aufgebracht und mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht (siehe S. 41).

Bei diesen Messungen wurden LPS-Aggregate aus einer Suspension mit einer Konzentration 1 mM LPS auf Mica über Nacht inkubiert. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine Kontrollgruppe, ohne dass das Peptid mit den Aggregaten inkubiert wurde, sowie eine Gruppe, in der das hBD-3-6S vor der Präparation der Aggregate zum LPS hinzugefügt wurde, mit dem Rasterkraftmikroskop im repulsiven AC-Modus in Puffer untersucht. Dazu wurden die Aggregate auf Mica gebracht, durch die Fusion mit dem Mica ergeben sich Doppelschicht- oder Multischichtmembranen. Es wurde ein Cantilever des Typs CSG11 B mit einer Resonanzfrequenz von etwa 8 kHz im Puffer verwendet. Vor den Messungen wurden alle Proben mit reinem Puffer gespült, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probe nicht der Luft ausgesetzt wurde. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde LPS der drei verschiedenen Raumutantenstämme verwendet, das LPS WBB01, LPS R595 sowie das LPS R45. Bei allen Messungen wurde ein einheitlicher Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES mit pH 7,0 verwendet. Im Folgenden sollen die Ergebnisse für die drei untersuchten LPS vorgestellt werden.

Messungen an LPS R595 Doppelschichten nach Vorinkubation mit hBD36S

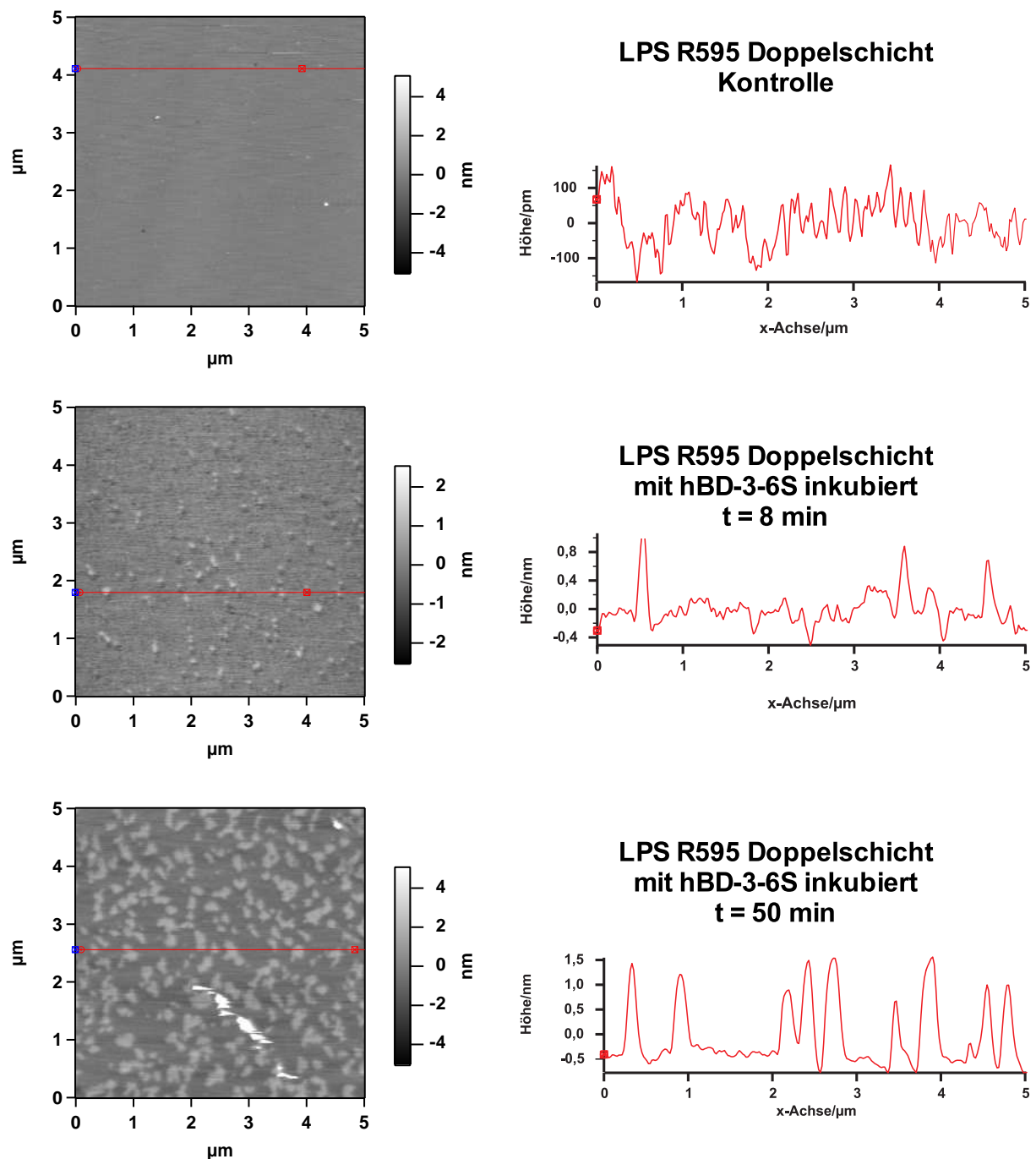


Abbildung 41: Rasterkraftmikroskopische Höhenbilder links und Höhenlinien rechts einer reinen LPS R595 Doppelschicht (oben), einer LPS R595 Doppelschicht inkubiert mit hBD-3-6S (Mitte) und eines LPS R595 Doppelschicht 50 min nach dem mittleren Bild aufgenommen (unten). Die Bilder wurden im Puffer im AC-Modus bei RT aufgenommen.

In der Abbildung zu den Messungen nach der Vorinkubation mit hBD-3-6S an LPS R595 Doppelschichten werden links die Höhenbilder und rechts die Höhenlinien der rasterkraftmikroskopischen Messungen dargestellt. Diese haben ergeben, dass die reine LPS R595 Doppelschicht eine glatte Oberfläche ausbildete (Abbildung 41 oben), welche über mehrere Stunden stabil blieb. Dies änderte sich, wenn die Proben die mit dem antimikrobiellen Peptid hBD-3-6S vorinkubiert wurden (Abbildung 41, Mitte). In diesem Fall sind einige etwa 1,2 nm hohe Strukturen zu erkennen. Die Anzahl dieser höher erscheinenden Strukturen nahm dabei über die Zeit zu: Abbildung 41 unten wurde 50 min nach Abbildung 41 Mitte erstellt und zeigt dieses Verhalten sehr klar. Die Höhenlinien durch die Bilder zeigen zudem, dass die Strukturen zunehmend höher werden. Durch die Erhöhung der Kraft des Cantilevers auf die Probe konnten diese Erhöhungen entfernt werden (Daten hier nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass die höher erscheinenden Strukturen keine zusätzlichen Moleküle an der Oberfläche darstellen, sondern Reste der am Beginn der Messung vollständig vorhandenen Doppelschicht sind. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht festgestellt werden kann, ob es sich bei den am Ende der Messung tiefer liegenden Flächen um Mica oder um weitere Lipidschichten handelt. Dies ist begründet darin, dass nicht bekannt ist, ob es sich um eine LPS Doppelschicht oder um Multischichten handelt. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass sich Teile der Membran ablösen.

Messungen an LPS R45 Doppelschichten nach Vorinkubation mit hBD-3-6S

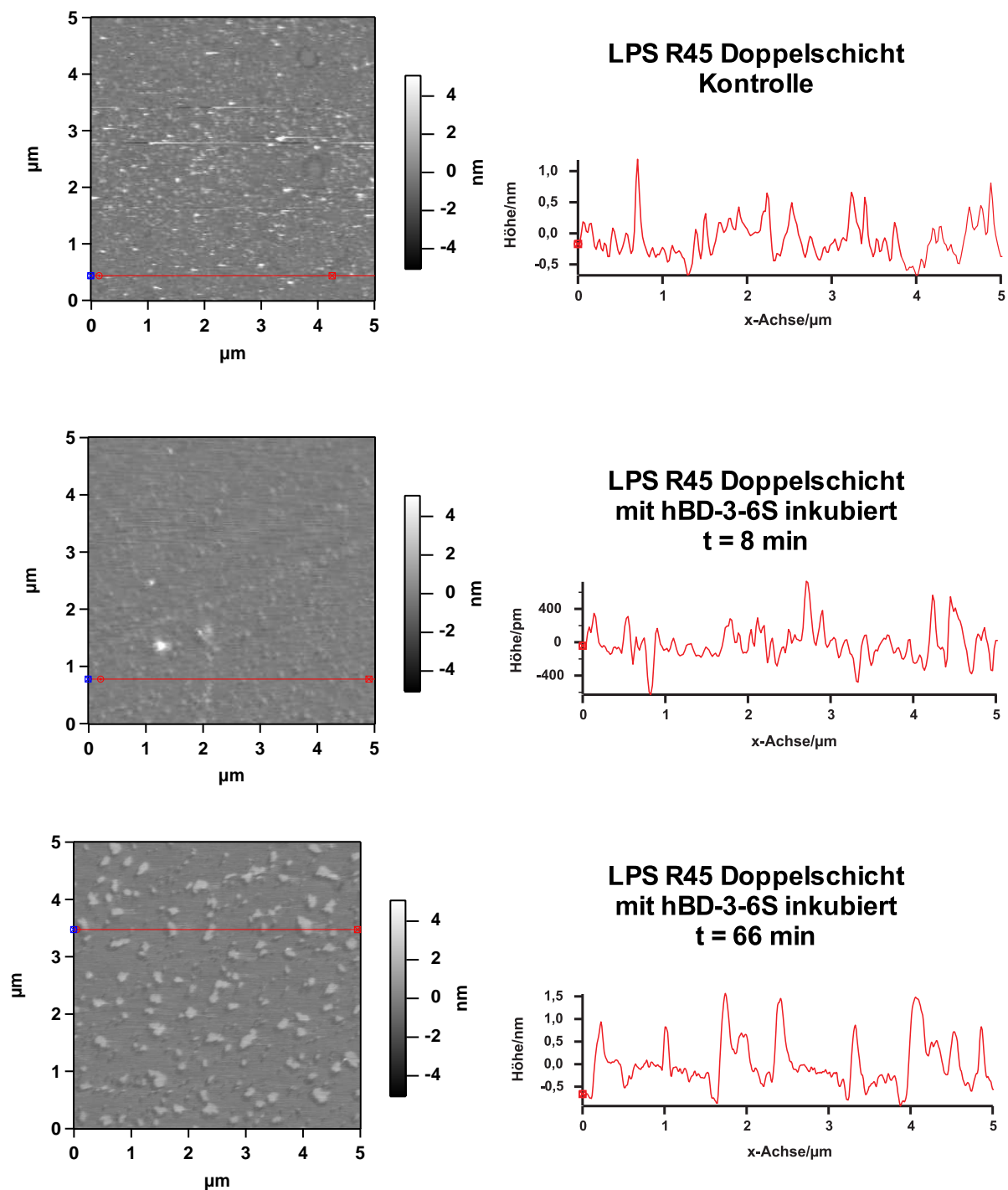


Abbildung 42: Rasterkraftmikroskopische Höhenbilder (links) und Höhenlinien (rechts) einer reinen LPS R45 Doppelschicht (**oben**), einer LPS R45 Doppelschicht inkubiert mit hBD-3-6S (**Mitte**) und der LPS R45 Doppelschicht 66 min nach Bild B (**unten**) aufgenommen. Die Bilder wurden im Puffer im AC-Modus aufgenommen.

Die Untersuchungen an reinen LPS R45 Doppelschichten zeigten eine gleichmäßige, nahezu glatte Oberfläche (Abbildung 42, oben). Die Doppelschicht war dabei ebenfalls über mehrere Stunden stabil. Die Oberfläche änderte sich jedoch, wenn vorher hBD-3-6S mit den LPS Aggregaten inkubiert wurde. Zunächst erkannte man nur kleine Strukturen, diese wuchsen jedoch über die Zeit. Abbildung 42 (Mitte) zeigt den Zustand zu Beginn der Messung, während Abbildung 42, (unten) 50 min später aufgenommen wurde. Dabei wurden die Strukturen deutlich höher (die einzelnen Strukturen sind in Abbildung 42 Mitte etwa 1 nm hoch, Abbildung 42 unten jedoch etwa 2 nm). Auch bei diesen mit hBD-3-6S vorinkubierten LPS Aggregaten löste sich die ehemals geschlossene Lipiddoppelschicht vom Mica ab.

Messungen an LPS WBB01 Doppelschichten nach Vorinkubation mit hBD-3-6S

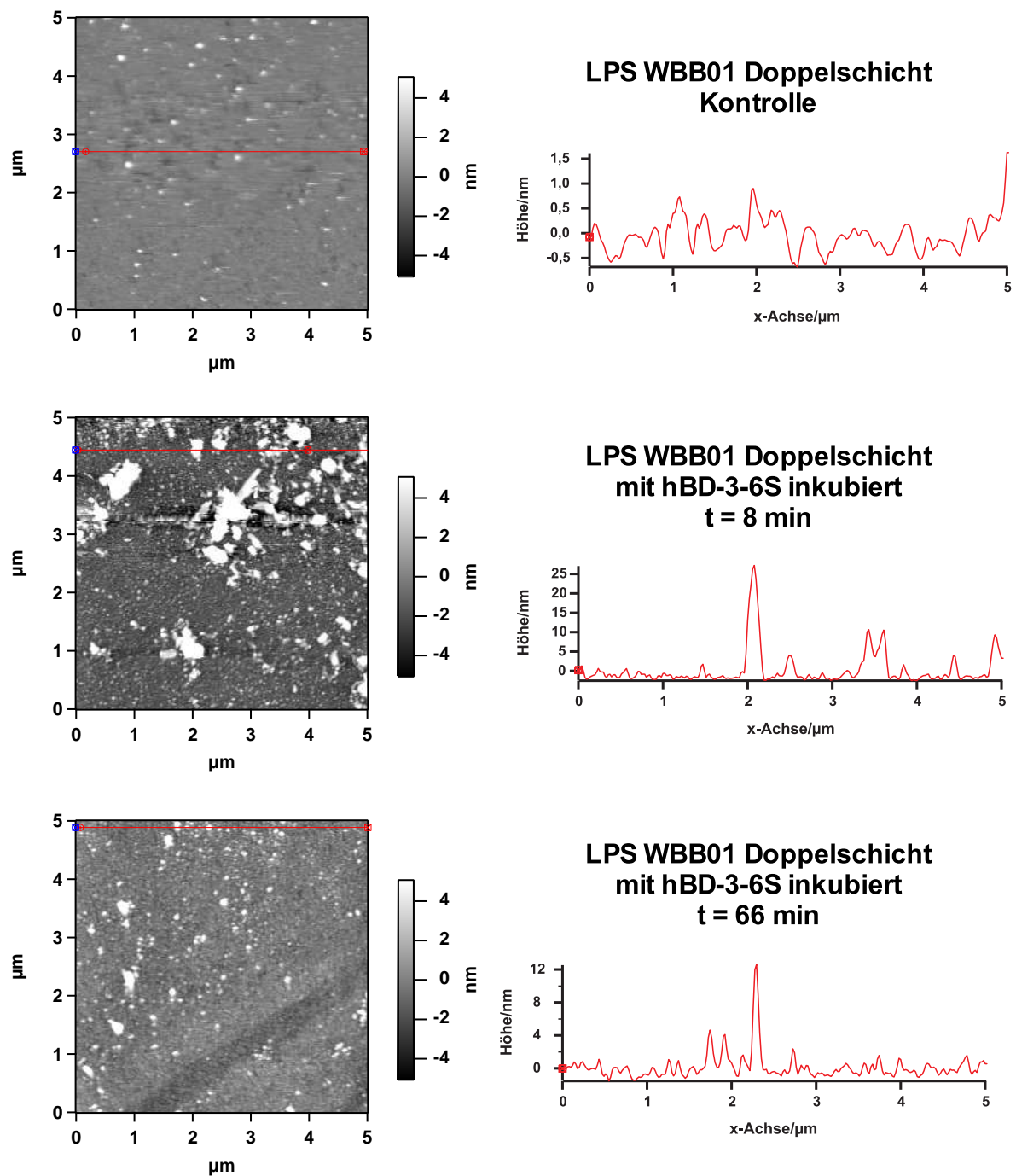


Abbildung 43: Rasterkraftmikroskopische Höhenbilder (links) und Höhenlinien (rechts) einer reinen LPS WBB01 Doppelschicht (**oben**), einer LPS WBB01 Doppelschicht inkubiert mit hBD-3-6S (**Mitte**) und der LPS WBB01 Doppelschicht 66 min nach Bild B (**unten**) aufgenommen. Die Bilder wurden im Puffer im AC-Modus aufgenommen.

Die Strukturen der LPS WBB01 Doppelschichten unterscheiden sich von den oben beschriebenen Systemen. Schon die reine LPS WBB01 Doppelschicht zeigte Fehlstellen sowie einige Erhöhungen (Abbildung 43 oben). Die Aggregate, die mit hBD-3-6S vorinkubiert wurden, bildeten eine stark veränderte Oberfläche (Abbildung 43 Mitte und 43 unten). Die Höhenbilder zeigten eine große Anzahl an Erhöhungen. Mittels der Höhenlinien konnten Werte bis zu 25 nm, was deutlich höher ist als die Werte einer Lipiddoppelschicht, gezeigt werden. Insgesamt ist die Oberfläche sehr rau. Auch war es nicht möglich, mit dem verwendeten Cantilever die oberflächlichen Strukturen durch Erhöhung der Kraft zu entfernen, und Versuche, mit Hilfe von Kraftkurven Aufschlüsse über die Dicke der Doppelschicht zu erhalten, misslangen aufgrund des zu weichen Cantilevers. Ein härterer Cantilever zerstörte jedoch bei Messungen die Oberfläche, so dass keine Korrelation zwischen Höhenbildern und Kraftkurven gegeben war. Die Ergebnisse machen deutlich, dass es durch Zugabe von hBD-3-6S zu LPS WBB01 zu einer deutlichen Änderung der Aggregatstruktur und damit zur Struktur der Schicht auf Mica kam. Im Gegensatz zu den Messungen mit LPS R45 und LPS R595 kam es jedoch nicht zu einem großflächigen Ablösen der Doppelschicht.

6.1.2.7 Domänenbildung in LPS/PL Lipiddoppelschichten

Um zu untersuchen, ob sich Domänen in LPS/PL Doppelschichten bilden, wurden mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops in Verbindung mit dem Fluoreszenzmikroskop zwei verschiedene Langmuir-Blodgett-Filme untersucht. Verwendet für diese Versuche wurde

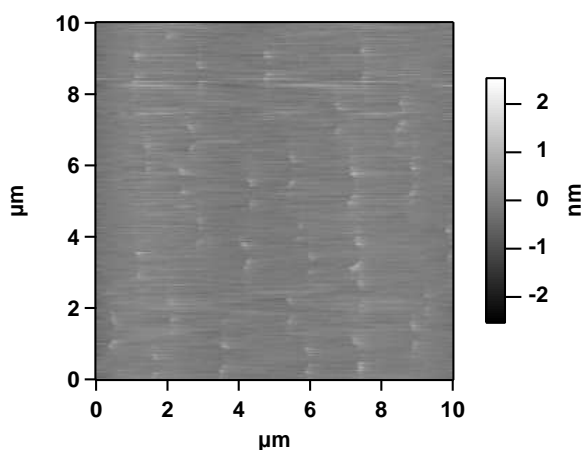


Abbildung 44: Keine Domänenformation in einer Doppelschichtmembran LPS R45/PL.

Es ist keine Lipiddomänenformation in der Doppelschicht erkennbar. Die PL Monoschicht ist auf dem Mica aufgebracht, während die LPS R45 Monoschicht in Richtung des Puffers (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,0) orientiert ist. Die Aufnahme wurde im AC-Modus mit einem Cantilever des Typs CSG 11B durchgeführt.

LPS R45 und der gleiche Puffer wie in den vorangegangenen Messungen. Es wurde ein Cantilever des Typs CSG11 B verwendet.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Phospholipidmischung (PL) auf die Mica-Seite übertragen und die LPS R45 über die PL Schicht präpariert (Siehe S. 110). Somit richteten sich die Fettsäureketten gegeneinander aus und die Kopfgruppen des PL sind in Richtung des Micas und die des LPS gegen den Puffer orientiert. Wie Abbildung 44 zeigt, ist keine Domänenbildung in der Lipiddoppelschicht erkennbar, lediglich geringfügige Verschmutzungen auf der Oberfläche. Auch bei anderen Auflösungen (Daten nicht gezeigt) zeigten sich keine Domänen.

In der zweiten Versuchsreihe wurde das LPS R45 mit NBD-PE markiert und derart präpariert, dass die Kopfgruppen in Richtung des Micas orientiert sind. Die PL-Schicht wurde über die LPS-Schicht präpariert, so dass die PL-Kopfgruppen gegen den Puffer ausgerichtet waren. Die Idee dabei war, dass die in den Monoschicht-Untersuchungen gezeigte Domänenbildung unter Umständen bei einer Bindung der LPS-Moleküle an das Mica erhalten bleibt. Eine solche Domänenbildung könnte dann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie aufgezeigt werden.

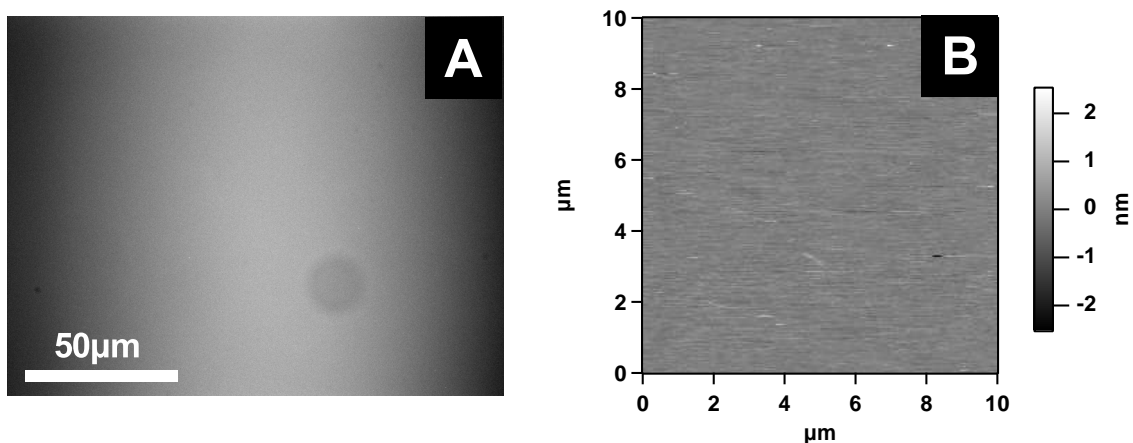


Abbildung 45: Keine Domänenformation in einer Doppelschichtmembran PL/LPS R45.

Es sind keine Lipiddomänen in der Doppelschicht erkennbar. Die LPS R45 Monoschicht ist auf dem Mica aufgebracht, während die PL Monoschicht in Richtung des Puffers (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,0) orientiert ist. Die LPS-Schicht ist mit NBD-PE markiert (A), es zeigen sich keine Domänen in der LPS-Monoschicht. Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme wurde im AC-Modus mit einem Cantilever des Typs CSG 11B durchgeführt und zeigt ebenfalls keine Domänen (B).

In der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Abbildung 45 A erkennt man jedoch keine Domänen in der LPS-Schicht. Um sicher zu stellen, dass man sich in der Ebene der LPS-Monoschicht befindet, wurde die Gesamthelligkeit des Bildes maximiert. Bedauerlicherweise ist eine Verunreinigung der Optik auf dem Bild zu sehen.

Auch auf dem rasterkraftmikroskopischen Bild (Abbildung 45 B), welches von der PL-Schicht der Doppelschicht erstellt wurde, sind keine Domänen erkennbar. Weitere Aufnahmen mit anderen Aufnahmegrößen zeigten ebenfalls keine Domänen (Daten hier nicht gezeigt). Somit ist die Doppelschicht frei von Domänen in den jeweiligen Monoschichten und in der gesamten Doppelschicht.

6.1.2.8 Einfluss von hBD-3-6S auf die Domänenstruktur in asymmetrischen Lipiddoppelschichten

Die Versuche im vorhergehenden Kapitel haben gezeigt, dass sich in einer LPS/PL-Doppelschicht keine Domänen ausbilden. Die Frage, die in diesem Kapitel untersucht werden soll ist, ob sich Lipiddomänen durch den Einfluss eines antimikrobiellen Peptides induzieren lassen.

Dazu wurde mittels Langmuir-Blodgett-Technik (siehe S.) eine LPS R45/PL Doppelschicht-Membranen erzeugt. Dabei wurde zunächst die PL Monoschicht bei einem lateralen Druck von 20 mN/m auf der Micaseite, im zweiten Durchgang die LPS R45 Monoschicht bei gleichem lateralen Druck auf die PL Monoschicht aufgebracht. Diese wurden mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops in wässriger Lösung aufgenommen. In dem Puffer, der mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 versetzt wurde, wurde bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml hBD-3-6S zugegeben. Nach der Zugabe wurden in einem Abstand von 8 min 32s Höhenbilder mit dem Rasterkraftmikroskop im AC-Modus aufgenommen. Der zeitliche Abstand der Bilder ergab sich dabei aus der Aufnahmegeschwindigkeit.

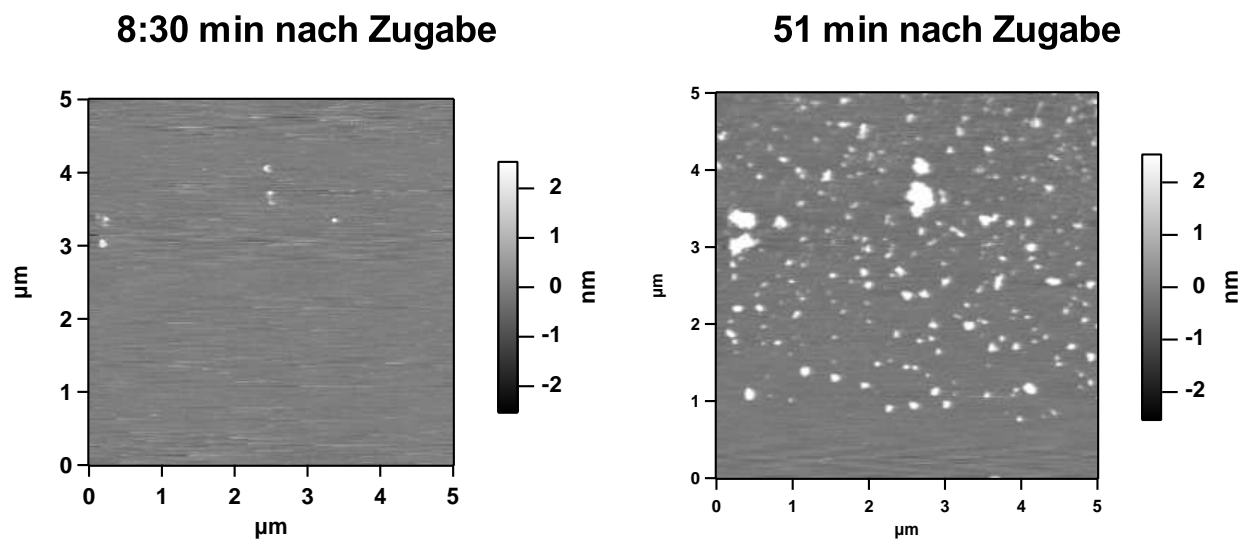


Abbildung 46: LPS R45 / PL Doppelschichtmembran auf Mica nach Zugabe von 5 µg/ml hBD-3-6S in die Subphase nach 8:30 min. (links) und nach 51 min. (rechts) mit dem Rasterkraftmikroskop aufgenommen.

Darstellung einer LPS R45 / PL Doppelschichtmembran, wobei die PL-Monoschicht auf der Mica-Seite aufgebracht wurde, während die Kopfgruppen der LPS R45 Monoschicht in Richtung des Puffers orientiert sind. Der Puffer besteht aus 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 und Raumtemperatur. Verwendet wurde ein Cantilever des Typs CSG 11 B. Die Aufnahmen wurden im Puffer im AC-Modus aufgenommen.

In Abbildung 46 werden exemplarisch das erste und das letzte Bild einer Messung gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass es eine Vielzahl kleiner Bereiche gab, die in den Bildern sehr hoch erscheinen. Die durchschnittliche Höhe dieser Bereiche beträgt dabei am Ende der Messung 1,88 nm. Diese Werte sind viel höher als die Werte, die aus einer Domänenbildung durch Phasentrennung des Lipides herrühren würden. Betrachtet man die Gesamtfläche der Datenpunkte mit einer Höhe über 750 pm, so ergibt sich eine Zunahme von 0,13 µm² auf 1,25 µm² innerhalb von 51 min der Messung. Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass es keine Änderung der Membranstruktur durch das hBD-3-6S gegeben hat. Da es neben dem hBD-3-6S keine weiteren Änderungen im System gab, ist anzunehmen, dass die Erhöhungen Cluster des Peptids auf der Oberfläche der Membran darstellen.

6.1.3 FRET-Spektroskopiemessungen an LPS-Aggregaten

Um die Interkalation der unterschiedlichen antimikrobiellen Peptide in LPS-Aggregate (siehe S. 59) zu untersuchen, wurden FRET-spektroskopische Messungen (siehe S. 62) in Abhängigkeit der Salzkonzentration durchgeführt.

Dazu wurden in zwei unterschiedlichen Puffern, die sich im Salzgehalt unterscheiden, die Interkalation der drei antimikrobiellen Peptide hBD-3, hBD-3-6S und C-hBD-3-1-5-C mittels des FRET-Signals in Aggregate, bestehend aus zwei verschiedenen LPS (LPS WBB01 und LPS R45), gemessen. Die unterschiedlichen Pufferlösungen wurden verwendet, da die Bindungseigenschaften der Aggregate sehr vom Salzgehalt des Puffers abhängen, was schon in vielen Systemen in der Vergangenheit gezeigt werden konnte. So führt gerade Magnesium zu einer Quervernetzung der LPS-Moleküle und so zu einer erschwerten Interkalation der antimikrobiellen Peptide. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Um die Verdünnung der Fluorophore innerhalb der Aggregate zu untersuchen, wurden die Signale des Donors durch die des Akzeptors geteilt. Ein Anstieg des Gesamtsignales repräsentiert somit eine Interkalation der Peptide in die Aggregate. Ein wichtiger Punkt ist, dass die Messungen mit LPS-Aggregaten verschiedener Präparationen nicht untereinander vergleichbar sind. Daher wurden zu jedem Aggregatansatz jeweils Kontrollmessungen durchgeführt, indem anstatt der Peptidlösung nur das Lösungsmittel (0,01% Essigsäure) zu der Aggregatlösung hinzugegeben wurde. Messungen mit LPS R45-Aggregaten stellten sich im Laufe der Untersuchungen als sehr schwierig heraus, da das gemessene Fluoreszenzlicht eine niedrigere mittlere Intensität hatte, als dies die Erfahrungswerte für die anderen LPS zeigten, zudem waren die Signale sehr verrauscht.

Zunächst sollen die Ergebnisse mit hBD-3 betrachtet werden. Dabei zeigen die schwarzen und roten Kurven die Messungen mit dem Puffer bestehend aus 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0, während die grünen und blauen Kurven die Messungen mit einem Puffer bestehend aus 5 mM HEPES bei pH 7,0 repräsentieren. Dabei wurden jeweils die Kontrollen durch Hinzugabe von 5 µl 0,01% Essigsäure (Kurven schwarz und grün) durchgeführt. Jeweils 5 µg / ml hBD-3 (Kurven in rot und blau) wurden für die Interaktionsmessungen mit Peptid hinzugegeben.

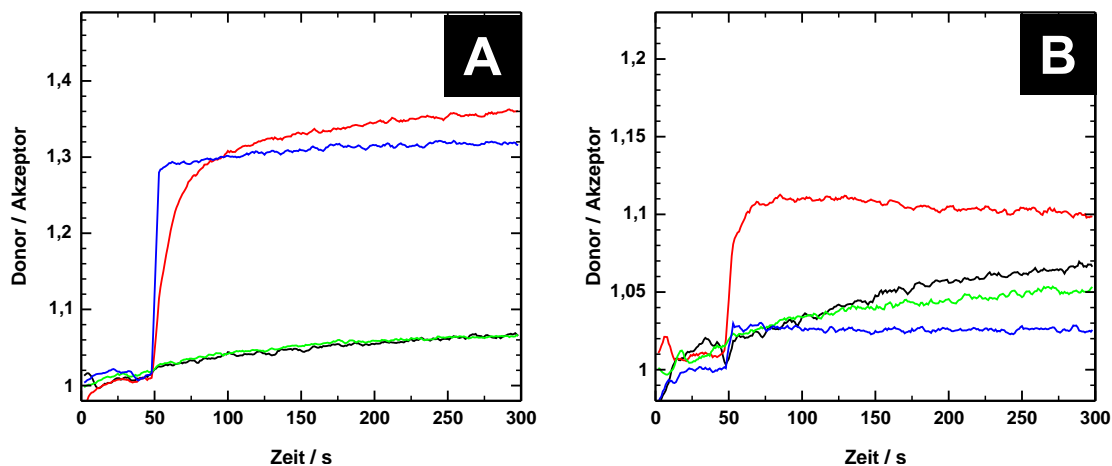


Abbildung 47: Einbaumessung von hBD-3 in Aggregate aus (A) LPS WBB01 und (B) LPS R45.

Die Messungen wurden mit FRET-Spektroskopie in zwei verschiedenen Puffern bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES bei pH 7,0

schwarz: 5 μl 0,01% Essigsäure als Kontrolle,

rot: 5 μg / ml hBD-3

Puffer: mit 5 mM HEPES bei pH 7,0

grün: 5 μl 0,01% Essigsäure als Kontrolle

blau: 5 μg / ml hBD-3.

Die Messungen mit LPS WBB01 Aggregaten (Abbildung 47 A) zeigen einen starken Anstieg des Donor / Akzeptor-Signales für beide Salzkonzentrationen im Puffer nach Zugabe von hBD-3. Dies kann als ein Einbau der hBD-3 Moleküle interpretiert werden. Betrachtet man die Messungen mit LPS R45 Aggregaten (Abbildung 47 B), so zeigt sich nur ein Anstieg des Donor/Akzeptor-Signales mit dem Puffer (KCl und MgCl_2). Die Kontrollmessungen mit reiner 0,01% Essigsäure zeigen hingegen keinen deutlichen Anstieg der Signale, so dass es zu keiner Umorganisation der Fluorophore in den LPS Aggregaten kam. Zusammenfassend bedeutet dies, dass es im Fall der LPS R45 Aggregate eine Salzabhängigkeit der Interaktion mit hBD-3 bei einer Konzentration von 100 mM KCl und 5 mM MgCl_2 gab. Diese Salzabhängigkeit wurde bei Interaktion von hBD-3- mit LPS WBB01 Aggregaten nicht gemessen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für hBD-3-6S betrachtet. Die Messungen zeigen ein mit den Messungen mit hBD-3 vergleichbares Verhalten. Es kommt zu einem starken Anstieg des Donor / Akzeptor-Signales für beide Salzkonzentrationen im Puffer

bei Zugabe von hBD-3-6S im Fall der LPS WBB01-Aggregate (Abbildung 48 A). Dies kann generell als ein salzunabhängiger Einbau der hBD-3-6S Moleküle in die LPS-Aggregate interpretiert werden. Jedoch ist zu beachten, dass es im Fall der Interaktion des hBD-3-6S mit LPS WBB01 Aggregaten zu einer geringeren Interkalation des hBD-3-6S in die Aggregate kam, sofern sich Salze im Puffer befanden. Betrachtet man die Donor/Akzeptor-Signale des hBD-3-6S Einbaus in LPS R45 Aggregate (Abbildung 48 B), so zeigt sich nur ein Anstieg der Messkurve bei dem Puffer mit KCl und MgCl₂. Der zunächst schwache Anstieg im Fall des salzfreien Puffers und dem darauf folgenden Abfall des Signales deutet auf eine Umorganisation der Aggregate oder einem schwachen Einbau hin. Bei allen Messungen zeigt sich, dass es bei den Kontrollmessungen mit Essigsäure keinen deutlichen Anstieg der Signale gibt, so dass es auch zu keiner deutlichen Umorganisation der Fluorophore in den LPS-Aggregaten kam.

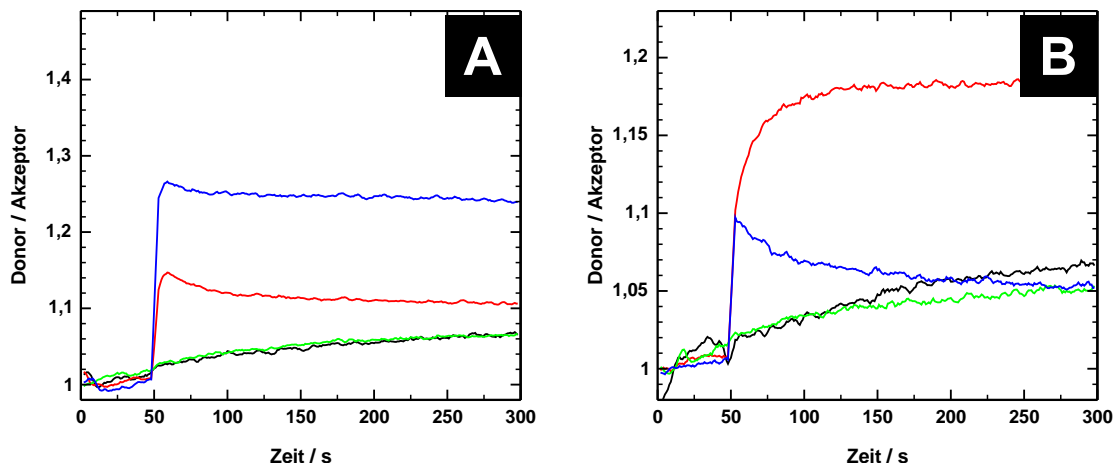


Abbildung 48: Einbau von hBD-3-6S in Aggregate aus (A) LPS WBB01 und (B) LPS R45.

Die Messungen wurden mit FRET-Spektroskopie in zwei verschiedenen Puffern bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0

schwarz: 5 μl 0,01% Essigsäure als Kontrolle

rot: 5 μg / ml hBD-3-6S

Puffer: 5 mM HEPES bei pH 7,0

grün: 5 μl 0,01% Essigsäure als Kontrolle

blau: 5 μg / ml hBD-3-6S.

Etwas anders als das rekombinante hBD-3 und das hBD-3-6 verhält sich das C-hBD-3-1-5-C bei den FRET-Messungen. Die Darstellungen der Daten entspricht den vorherigen Darstellungen für das hBD-3 und des hBD-3-6S.

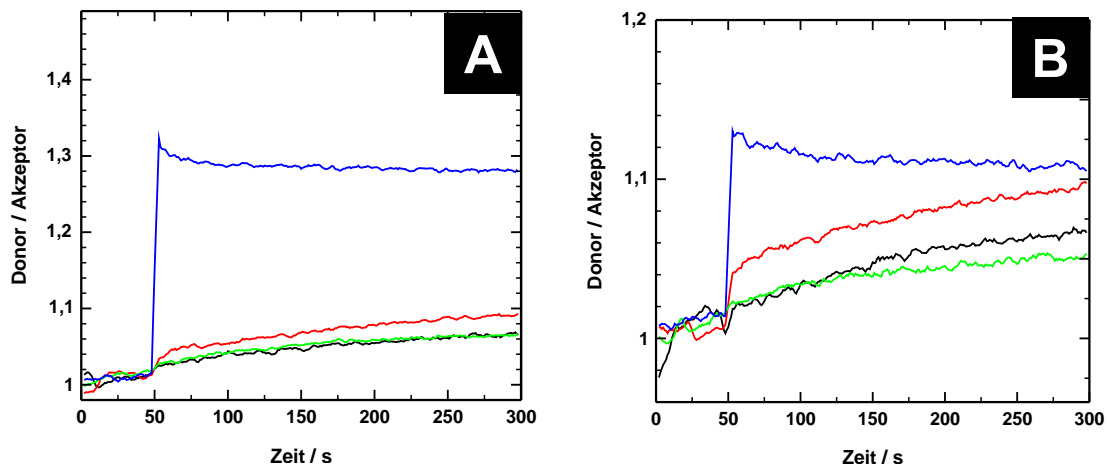


Abbildung 49: Einbau von C-hBD-3-1-5-C in Aggregaten aus (A) LPS WBB01 und (B) LPS R45.

Die Messungen wurden mit FRET-Spektroskopie in zwei Puffern bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES bei pH 7,0

schwarz: 5 μl 0,01% Essigsäure als Kontrolle

rot: 5 μg / ml C-hBD-3-1-5-C

Puffer: 5 mM HEPES bei pH 7,0

grün: 5 μl 0,01% Essigsäure als Kontrolle

blau: 5 μg / ml C-hBD-3-1-5-C

Im Fall der Interaktion des C-hBD-3-1-5-C mit LPS WBB01 Aggregaten (Abbildung 49 A) zeigte sich nur im salzfreien Puffer ein deutlicher Anstieg des Donor/Akzeptor-Signals. Der Anstieg im Fall des MgCl_2 und KCl haltigen Puffers fällt sehr gering aus. Daraus kann geschlossen werden, dass sich nur im salzfreien Puffer eine nennenswerte Menge an C-hBD-3-1-5-C in die Aggregate einbauen kann. Ebenfalls etwas undifferenziert zeigt sich das Verhalten der Interkalation des C-hBD-3-1-5-C in LPS R45-Aggregate (Abbildung 49 B). Auch hier kam es nur im Fall des salzfreien Puffers zu einem deutlichen, wenn auch geringen Anstieg des Donor/Akzeptor-Signals. Die Änderungen sind im Allgemeinen sehr gering, für die salzfreien Puffer kann jedoch für beide LPS von einer schwachen Interkalation des C-hBD-3-1-5-C in die Aggregate gesprochen werden.

6.1.4 Messung der Phasenübergangstemperatur mittels FTIR-Spektroskopie

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die verschiedenen antimikrobiellen Peptide auf das Phasenverhalten der Fettsäureketten der LPS-Moleküle haben, wurden die Phasenübergänge der Lipide mittels Fourier-transformierter Infrarot (FTIR) Spektroskopie gemessen. Allgemein zeigen die antimikrobiellen Peptide einen sehr geringen Einfluss auf das Phasenverhalten der Fettsäureketten.

Die LPS Aggregate wurden in einem Puffer aus 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 präpariert und gemessen. Es wurden Aggregate aus drei Tiefraummutanten-LPS verwendet, LPS WBB01, LPS R595 und LPS R45 eingesetzt und der Einfluss von drei humanen β -Defensinen, hBD-3-6S, C-hBD-3-1-5-C und hBD-2, in verschiedenen molaren Verhältnissen zum LPS untersucht. Für entsprechende Messungen mit rekombinatem hBD-3 war keine ausreichende Menge des Peptides vorhanden. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich zwischen 5 und 70°C durchgeführt.

Die Phasenübergangstemperaturen der reinen LPS Aggregate sind in Tabelle 14 angegeben. Diese dienen als Ausgangswerte für die Werte, die nach Zugabe der Peptide ermittelt wurden. Dabei zeigt sich, dass der Fehler dieser aus verschiedenen Ansätzen gemittelten Werte sehr groß im Vergleich zu den durch die Peptide induzierten Änderungen ist. Diese großen Fehler zeigen, dass es nur sinnvoll ist, die absoluten Phasenübergangstemperaturen darzustellen, sofern die LPS Aggregate aus einem Ansatz stammen. Dies ist im Folgenden entsprechend gehandhabt worden.

LPS Aggregate	LPS WBB01	LPS R595	LPS R45
Phasenübergangstemperatur / °C	50,2 ± 2,4	34,9 ± 2	42,3 ± 0,7

Tabelle 14: Phasenübergangstemperaturen der verschiedenen LPS Aggregate.

Die Messungen wurden in einem Puffer durchgeführt aus 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES bei pH 7,0 durchgeführt.

Die Ergebnisse zur Änderung der Phasenübergangstemperatur infolge der Peptid-Einwirkung werden in der Tabelle 15 angegeben. Desweiteren zeigen die Abbildungen 50

und 51 typische Verläufe der Wellenzahlen der symmetrischen Streckschwingung der CH_2 -Gruppen in Abhängigkeit der Temperatur.

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge an aktivem hBD-2 wurden mit diesem Peptid nur Messungen mit zwei verschiedenen LPS Chemotypen durchgeführt (Tabelle 15). Die Messungen zeigten jedoch keinen signifikanten Einfluss des hBD-2 auf

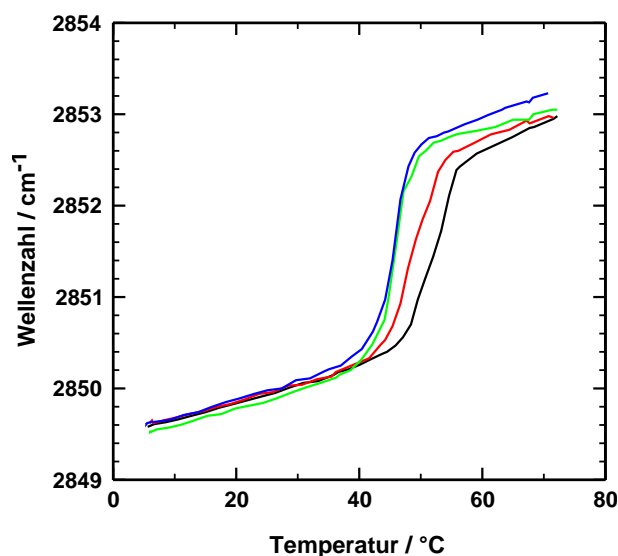


Abbildung 50: Einfluss von hBD-3-6S auf den Phasenübergang von LPS WBB01

Der Phasenübergang wurde mittels FTIR-Spektroskopie an LPS WBB01 Aggregaten gemessen.

schwarz: kein Peptid

rot: 10:1 M/M LPS : hBD-3-6S

grün: 2 : 1 M/M LPS:hBD-3-6S

blau: 1 : 1 M/M LPS:hBD-3-6S

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 5 mM HEPES bei pH 7,0.

das Phasenverhalten der Fettsäureketten des LPS WBB01, die Phasenübergangstemperatur des Lipides blieb unverändert. Nur geringfügig größer war die Änderung der Phasenübergangstemperatur für LPS R45 Aggregate, was aber auch in diesem Fall nicht signifikant war.

Mit dem hBD-3-6S wurden Messungen an drei verschiedenen LPS-Aggregaten vorgenommen (Tabelle 15). Abbildung 50 zeigt einen typischen Messgraphen. Dabei zeigt die schwarze Kurve die Messung ohne Peptid, die rote Kurve die Messungen im molaren Verhältnis 10:1 LPS : hBD-3-6S, die grüne Kurve das Verhältnis 2 : 1 LPS : hBD-3-6S und die blaue Kurve eine 1 : 1 LPS : hBD-3-6S dar. Betrachtet man zunächst die Messungen mit LPS WBB01, so zeigt sich ein geringer Einfluss des Peptides auf den Phasenübergang der Fettsäureketten der Lipide. Es zeigt sich eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu niedrigeren Temperaturen ab einem molaren Verhältnis von 2:1 zwischen LPS und hBD-3-6S. Die Fettsäureketten der Lipide werden bei gleicher Temperatur somit fluider. Der Phasenübergang ist, wie für natürliches LPS üblich, relativ breit. Bei niedrigeren Temperaturen sind die Fettsäureketten rigide (Wellenzahlen

unterhalb von 2850 cm^{-1}), während sie bei höheren Temperaturen fluide sind (Wellenzahlen oberhalb von $2852,5 \text{ cm}^{-1}$). Vergleicht man diese Daten mit denen von LPS R595-Aggregaten, so zeigte sich bei diesen Messungen kein nennenswerten Unterschied zwischen den reinen LPS-Aggregaten und den Aggregaten unter dem Einfluss des Peptides. Das gleiche Verhalten zeigt sich bei LPS R45 Aggregaten. Auch bei diesen Messungen zeigten sich keine Änderung des Phasenverhaltens unter dem Einfluss des hBD-3-6S.

Aus das Peptid C-hBD-3-1-5-C hatte keinen Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur von LPS Aggregaten (Abbildung 51).

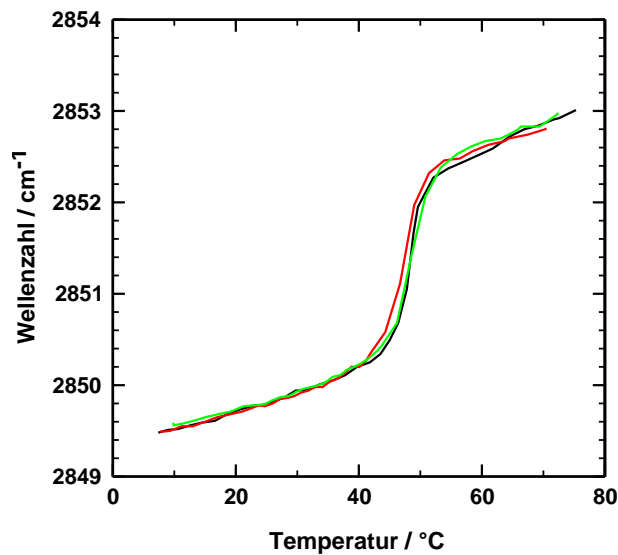


Abbildung 51: Einfluss des C-hBD-3-1-5-C auf den Phasenübergang von LPS WBB01

Der Phasenübergang wurde mittels FTIR an LPS WBB01 Aggregaten gemessen.

schwarz: kein Peptid

rot: 10:1 M/M LPS : C-hBD-3-1-5-C

grün: 2 : 1 M/M LPS:C-hBD-3-1-5-C

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 5 mM HEPES bei pH 7,0

		Änderung der Phasenübergangstemperatur nach Zugabe des Peptides zu LPS-Aggregaten		
zugegebenes Peptid	molares Verhältnis LPS:Peptid	LPS WBB01 / °C	LPS R595 / °C	LPS R45 / °C
hBD-2	1:0,1	-1,5	n.b.	-2,2
	1:0,5	-0,2	n.b.	-1,2
hBD-3-6S	1:0,1	-6,1	1,7	1,3
	1:0,5	-8,2	-0,7	0,7
	1:1,0	-8	-1	0,9
C-hBD-3-1-5-C	1:0,1	-0,9	0,6	-2,1
	1:0,5	0,1	0,8	-1

Tabelle 15: Phasenübergangstemperaturen verschiedener LPS Aggregate nach Zugabe humaner β -Defensine.

Verwendeter Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES pH 7,0. n.b.: nicht bestimmt

Zusammenfassend zeigt Tabelle 15, dass mit Ausnahme des hBD-3-6S bei LPS WB-B01 Aggregaten, die Peptide keinen oder höchstens einen sehr geringen Einfluss auf die Fettsäureketten in LPS Aggregaten haben.

6.1.5 Messungen an freistehenden, rekonstituierten Membranen

Diese Messungen liefern, mittels elektrischer Messungen an freistehenden Membranen (siehe S. 64), Ergebnisse zur Aufklärung der molekularen Wechselwirkungen zwischen humanen β -Defensinen mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Dazu werden die durch die antimikrobiellen Peptide induzierten Permeabilitätsänderungen in verschiedenen, mittels der Montal-Mueller-Technik rekonstituierten Membranen gemessen. Exemplarisch wurden drei in Bezug auf ihre Lipidzusammensetzung unterschiedliche asymmetrische Membranen untersucht. Die PL-Monoschicht, diese stellt die

innere Monoschicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien dar, auf der trans-Seite (dabei handelt es sich um die Seite, die der Peptidzugabe gegenüber liegt) blieb dabei jeweils unverändert, während die auf der cis-Seite präparierte LPS-Monoschicht variiert wurde. Es wurde wiederum LPS von drei verschiedenen Raumutantenstämmen verwendet, das LPS WBB01, das LPS R595 und das LPS R45. Auf Grund der Vielzahl der Peptide kam es zur Beschränkung auf die oben genannten LPS, die jeweils nicht notwendigerweise durchgängig mit jedem Peptid verwendet werden konnten.

Alle Messungen wurden mit einem einheitlichen Puffer durchgeführt, der 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES enthielt und mit Hilfe von KOH auf pH 7,0 eingestellt wurde. Die Temperatur wurde bei allen Versuchen auf 37°C geregelt. Es wurden zwei unterschiedliche Messparameter bestimmt, die Membrankapazität und der Strom durch die Membran. Auf Grund der meist kurzen Lebensdauer der Membranen nach Zugabe der verschiedenen antimikrobiellen Peptide konnten keine komplexen Spannungsvariationen durchgeführt werden. Stattdessen wurde eine konstante Spannung über den Zeitraum der Messung über die Membran angelegt. Dabei ist zu beachten, dass die Elektrode der PL-Seite (trans-Kompartiment) geerdet ist und die Elektrode im cis-Kompartiment, also auf der LPS-Seite, gegenüber dieser auf positives oder negatives Potential gebracht werden kann. Ist die resultierende Spannung positiv, entspricht dies dem natürlichen System, da im biologischen System die dem Zellinneren zugewandten Seite mit -26 mV negativ ist.

Es sei noch angemerkt, dass die gezeigten Diagramme nicht immer die gesamte Messung zeigen, sondern nur die für die zu machende Aussage interessanten Teile. Dies folgert, dass die einzelnen Diagramme nicht notwendigerweise bei $t = 0$ s beginnen.

6.1.5.1 Untersuchungen mit dem hBD-3-6S

Bei diesen Messungen wurde das in 0,01% Essigsäure gelöste hBD-3-6S auf der LPS-Seite (im cis-Kompartiment) zugegeben. Generell kam es zu einer schwachen Änderung der Kapazität, zur Ausbildung kleiner transientser Läsionen.

hBD-3-6S induzierte Änderung der Membrankapazität

Nach der Zugabe des hBD-3-6S kam es zu einer Änderung der Kapazität bei allen untersuchten LPS/PL Membranen. Dabei weisen die Messungen nach Zugabe des hBD3-

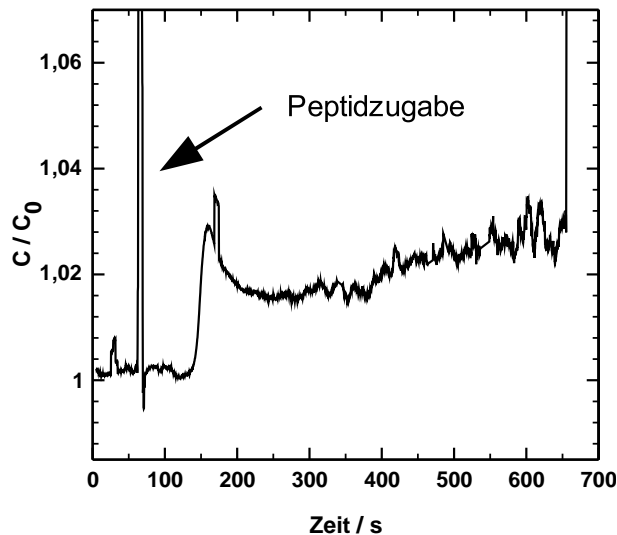


Abbildung 52: Exemplarischer Verlauf der Membrankapazität einer LPS R45/PL Membran nach Zugabe von hBD-3-6S auf der LPS-Seite.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,0 und 37°C verwendet. Peptidkonzentration: 4 µg/ml

6S keinen qualitativ eindeutigen Verlauf auf. Es kam sowohl zum Anstieg als auch zum Abfall der Kapazität. Dieses Verhalten war dabei nicht abhängig von der eingesetzten Menge des Peptides (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 52 zeigt einen Verlauf der Änderung der Kapazität für eine LPS R45/PL-Membran, mit denen die meisten Versuche zur Kapazitätsänderung gemacht wurden.

hBD-3-6S induzierte Stromfluktuationen

Durch die Zugabe von hBD-3-6S war es möglich, in allen verwendeten LPS/PL-Membranen Stromfluktuationen bei positiven (physiologischen) Spannungen zu induzieren. Zur Induktion des Stromflusses waren Spannungen von nur +20 mV, aber eine im Vergleich zu anderen untersuchten antimikrobiellen Peptiden hohe Konzentration von 5 µg/ml an hBD3-6S notwendig. Bei negativen Spannungen traten im Fall von LPS R45/PL Membranen keine Läsionen auf. Abbildung 53 zeigt unterschiedliche Stromverläufe durch unterschiedliche Membranen, die aber nicht charakteristisch für die jewei-

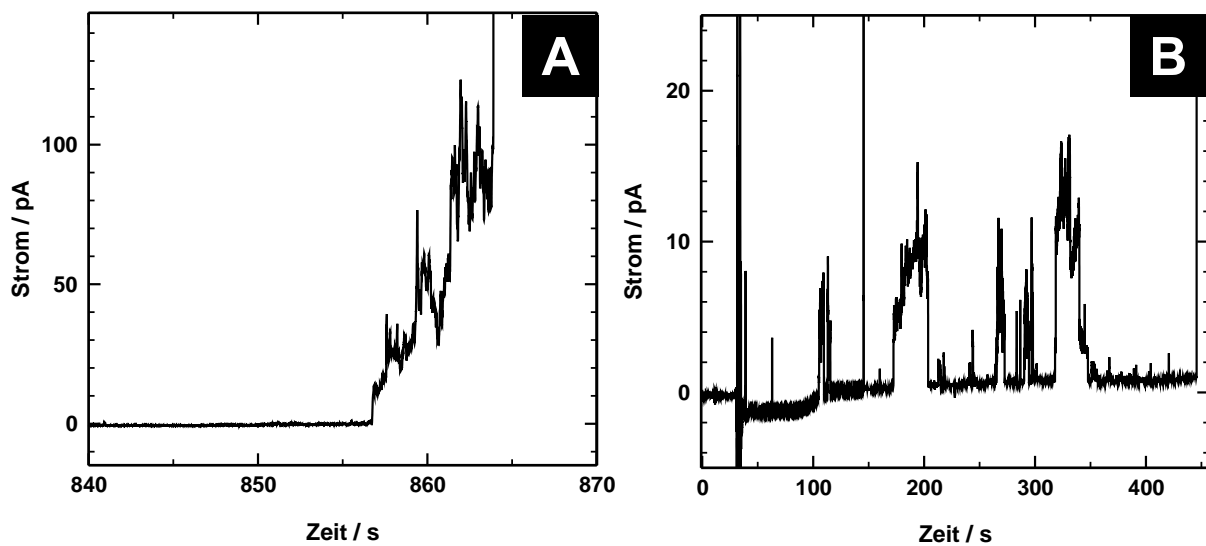


Abbildung 53: Stromfluss durch hBD-3-6S-induzierte Läsionen in einer (A) LPS R45/PL Membran und (B) LPS R595/PL Membran bei konstanter Spannung von 20 mV.

Die beiden gezeigten Stromflüsse sind charakteristisch für das Verhalten des hBD-3-6S und können in allen verwendeten Membranen auftreten. Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,0 und 37°C verwendet. Peptidkonzentration: 5 µg/ml

ligen LPS/PL-Membranen sind, sondern lediglich zwei Charakteristiken darstellen, die durch hBD-3-6S induziert wurden. Der Verlauf des Stromes durch die Membran ist qualitativ in zwei Charakteristiken unterteilbar: Im Großteil der Messungen traten nach einer längeren Wartezeit mit angelegter Spannung Stromschwankungen auf, woraufhin die Membran zerstört wurde. Der Verlauf des Stromes war dabei ähnlich: der Strom stieg über die Zeit immer weiter an, bis die Membran kollabierte (Abbildung 53 A). In einigen Fällen jedoch kam es nur zu Stromflüssen über einen begrenzten Zeitraum, der nicht zur Zerstörung der Membran führte (Abbildung 53 B). Eine statistische Auswertung ist auf Grund der Inhomogenität der unterschiedlichen Messungen nicht möglich, so dass dieses Verhalten nur qualitativ gezeigt werden kann. Zudem kann die tatsächliche

Konzentration des Peptides aufgrund der Zugabetechnik nicht absolut reproduziert werden.

Lebensdauer asymmetrischer Membranen nach Zugabe von hBD-3-6S

Die Betrachtung der Membranlebensdauer nach Zugabe des hBD-3-6S führt zu der Beobachtung, dass in der Tendenz die Lebensdauer der Membranen mit steigender Konzentration des Peptides abnimmt. Auch bei dieser Auswertung ist jedoch zu beachten, dass die Standardabweichung der Mittelwerte sehr groß ist, was von der Heterogenität der Messungen an den planaren Membranen und der Tatsache, dass es sich um Messungen an einzelnen Membranen und nicht um eine große Anzahl an Aggregaten wie dies z.B. bei spektroskopischen Messungen der Fall ist, herrührt. Da es sich um zeitaufwendige Messungen an einzelnen Membranen handelt, ist zudem die Verringerung des Fehlers über eine große Anzahl an Messungen nicht zu realisieren. Die Mittelwerte wurden aus 2 bis 8 Einzelmessungen ermittelt.

LPS	Konzentration/ µg/ml	Mittlere Lebensdauer nach Zugabe / s	Standardabweichung / s
WBB01	5	845	332
	10	129	102
R595	7	249	125
R45	3,5	1528	521
	4	1215	710
	5	909	756
	6	320	21
	7	680	276

Tabelle 16: Übersicht über die Lebensdauer unterschiedlicher LPS/PL Membranen nach Zugabe von hBD-3-6S in unterschiedlichen Konzentrationen.

6.1.5.2 Untersuchungen mit C-hBD-3-1-5-C

Nach Zugabe des antimikrobiellen Peptides C-hBD-3-1-5-C kam es zu einer Änderung der Kapazität der Membranen. Auch war es möglich bei positiven (physiologischen) Spannungen Stromfluktuationen durch LPS/PL-Membranen zu induzieren.

C-hBD-3-1-5-C induzierte Änderung der Membrankapazität

In dieser Arbeit wurden für LPS WBB01/PL Membranen Kapazitätsmessungen mit dem Peptid C-hBD-3-1-5-C durchgeführt. Diese zeigten einen qualitativ einheitlichen Verlauf: Nach der Zugabe des Peptides steigt die Kapazität der Membran und erreicht einen maximalen Wert, der etwa 20 % bis 30 % höher liegt als der Anfangswert. Über die weitere Messzeit sank die Kapazität geringfügig (Abbildung 54).

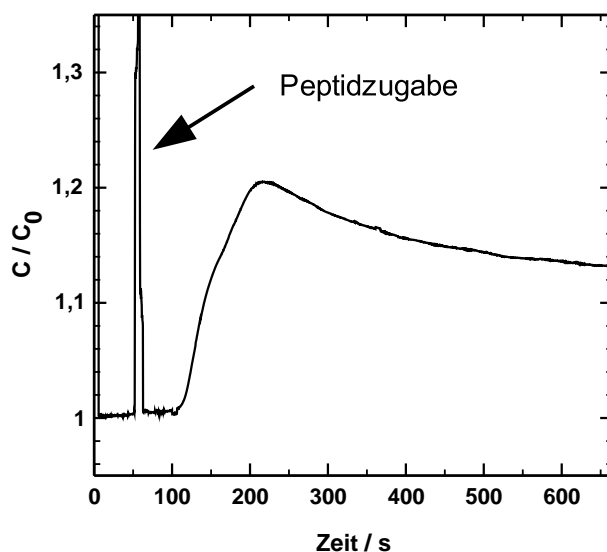


Abbildung 54: Verlauf der Membrankapazität einer LPS WBB01/PL Membran nach Zugabe von C-hBD-3-1-5-C auf der LPS-Seite.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,0 und 37°C verwendet. Peptidkonzentration: 2,3 µg/ml

C-hBD-3-1-5-C-induzierte Stromfluktuationen

Diese Untersuchungen wurden mit dem LPS WBB01 und dem LPS R45 durchgeführt. Dabei wurde speziell darauf geachtet, ab welchen Spannungen die Stromfluktuationen durch das Peptid in den verschiedenen LPS/PL-Membranen induziert werden konnten.

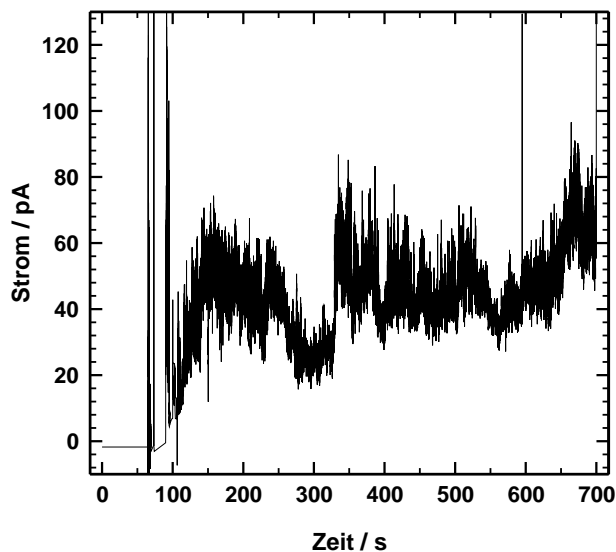


Abbildung 55: Stromfluss durch C-hBD-3-1-5-C induzierte Läsionen in einer WBB01/PL Membran bei konstanter Spannung von 25 mV.

Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,0 und 37°C verwendet. Peptidkonzentration: 2,3 µg/ml

Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Peptiden ist zur Induktion der Stromfluktuationen eine deutlich höhere Spannung (etwa 25 mV) und höhere Konzentrationen des C-hBD-3-1-5-C notwendig (Abbildung 55). Das Auftreten des Stromflusses führt bei den LPS/PL Membranen nicht sofort zur Zerstörung der Membran, sondern es kommt über einen langen Zeitraum zu sehr starken Stromschwankungen. Diese Schwankungen unterscheiden sich jedoch in Bezug auf ihre Charakteristik sehr stark von denen, die das hBD-3-6S oder das hBD-3 induzieren. Der mittlere Strom durch die Membran ist bei diesen Fluktuationen bedeutend höher, ebenso die Größenordnung der Schwankungen selbst. Interessanterweise führen diese starken Stromschwankungen nicht zu einer schnellen Zerstörung der Membran. Es zeigten sich jedoch auch keine konstanten Stromflüsse, die auf eine stabile Öffnung durch die Membran schließen lassen würden, was mit Hilfe von einem Histogramm gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Lebensdauer asymmetrischer Membranen nach Zugabe von C-hBD-3-1-5-C

In der folgenden Tabelle sind die Lebensdauern der unterschiedlichen LPS/PL Membranen nach Zugabe des C-hBD-3-1-5-C angegeben. Auf Grund der geringen Anzahl der Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptides werden hier nur zwei Werte angegeben. Die Standardabweichung der Lebensdauer ist, wie oben schon

erläutert, auch in diesen Fall sehr groß. Die Mittelwerte wurden aus 2 bis 4 Einzelmessungen ermittelt.

LPS	Konzentration/ µg/ml	Mittlere Lebensdauer nach Zugabe / s	Standardabweichung / s
WBB01	5	1780	1699
R45	10	1200	1020

Tabelle 17: Übersicht über die Lebensdauer unterschiedlicher LPS/PL Membranen nach Zugabe von C-hBD-3-1-5-C

6.1.5.3 Untersuchung hBD-3 induzierter Läsionen

Ziel dieser Untersuchungen war es zu klären, ob hBD-3 stabile Öffnungen in der Membran (Poren) mit sehr kurzer Lebensdauer bildet oder ob das Peptid statistisch von einander abhängige Störungen der Membranintegrität (Läsionen) bildet. Beide Modellvorstellungen würden durch die Überlagerung von Einzelereignissen zur Ausbildung der beobachteten Stromfluktuationen führen. Mit Hilfe des neu entwickelten Messsystemes war es möglich, Stromspuren mit sehr hoher zeitlicher Auflösung aufzunehmen. Die so aufgenommenen Daten wurden an ausgewählten Zeitpunkten mit Hilfe einer Fourieranalyse auf charakteristisches Rauschen analysiert sowie mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion in Bezug auf ihre statistische Abhängigkeit untersucht. Dazu wurden Stromspuren mit einer Abtastfrequenz von 140 kHz aufgenommen und kurze Zeitabschnitte für die beiden Analysen ausgewählt. Dabei wurde das analoge Filter des Verstärkers mit 20 kHz verwendet. Dies führt dazu, dass die höhere Abtastfrequenz nur zur Verringerung der Quantisierung des Signals verwendet wurde. Das antimikrobielle Peptid PMB wurde als Vergleichssubstanz verwendet.

Zur Auswertung wurden direkt die Originaldaten verwendet. Bei den hier gezeigten Stromspuren wurde zur besseren Übersicht eine Glättung der Daten (Abbildung 56 oben) vorgenommen. Die analysierten Daten werden jedoch ohne Glättung gezeigt (Abbildung 56 unten). Im Fall der ausgewerteten Autokorrelationsdaten wurde die Laufvariable mittels der Abtastfrequenz wieder in eine Zeit umgerechnet, damit die Übersichtlichkeit der Daten erhalten bleibt.

Aufgrund der sehr großen Datenmenge (mehrere GByte), die bei diesen Untersuchungen entstehen, und der damit verbundenen sehr langen Rechenzeiten konnten nur Messungen mit LPS/PL Membranen LPS WBB01 und zwei antimikrobiellen Peptiden (PMB und hBD-3) durchgeführt werden.

Weitergehend wurde ein einheitlicher Puffer bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ verwendet, der 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 5 mM HEPES bei pH 7,0 beinhaltet.

Stromspuranalyse mittels Fouriertransformation

Für diese Analyse wurde über drei Zeitabschnitte eine Fouriertransformation durchgeführt. Zunächst wurde eine Rauschanalyse des Grundrauschens der intakten Membran vorgenommen, der zweite Abschnitt ist der Zeitbereich in dem der Stromfluss beginnt und der dritte besonders interessante Zeitabschnitt ist in dem Bereich, in dem der Strom bzw. die Stromfluktuationen einen nahezu konstanten Wert erreichen.

Für die Untersuchungen mit PMB wurden jeweils Daten einer Länge von 200.000 Punkten, was etwa 1,4 s entspricht, verwendet. Es ergibt sich somit ein Frequenzspektrum der Länge von 100.000 Datenpunkten, welches Aussagen bis zu einer Frequenz von 5 Hz zulässt.

Im Fall des PMB zeigt sich folgendes Verhalten der Stromspur (Abbildung 56 oben): Der Strom steigt sprunghaft an und hält danach einen nahezu konstanten Wert, bis die Membran zerstört wird. Der Strom unterliegt dabei einem geringen Rauschen, dies zeigt die Fourieranalyse (Abbildung 56 unten) sehr deutlich. Das Rauschverhalten des Stromflusses durch die Membran ist dem Grundrauschen (vergleiche Abbildung 56 unten links und rechts) sehr ähnlich. Lediglich in der Übergangsphase (Abbildung 56 unten, Mitte) ergibt sich ein höheres Rauschniveau bei Frequenzen unterhalb von 100 Hz. Gut zu erkennen ist, dass das Grundrauschniveau bei Frequenzen oberhalb von 300 Hz sowie die in allen Diagrammen sichtbaren Störungen in den drei ausgewählten Zeitbereichen in Bezug auf ihre Amplitude nahezu gleich bleiben, was sicherstellt, dass die Messungen untereinander gut vergleichbar sind.

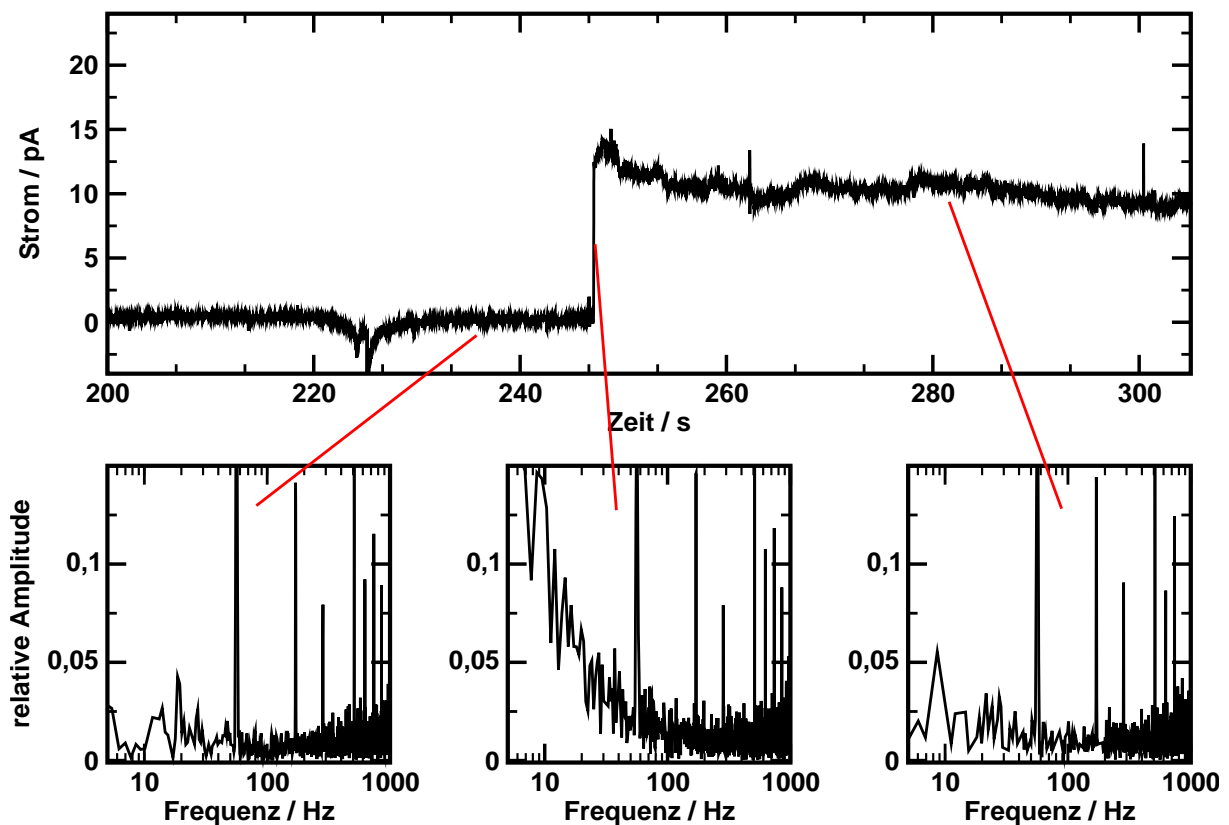


Abbildung 56: Untersuchung des Rauschverhaltens PMB-induzierter stabiler Läsionen in WB-B01/PL Membranen mittels Fourieranalyse.

Oben: analysierte Stromspur; **unten:** Ergebnisse der an den unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten FFT-Analysen.

Die Daten wurden bei konstanter Spannung von 20 mV aufgenommen. Die PMB Konzentration betrug 1,7 $\mu\text{g/ml}$. Es wurde ein Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 5 mM HEPES und pH 7,0 bei 37°C verwendet.

Für die Messungen mit hBD-3 wurde, aufgrund der deutlich unruhigeren Stromspur, ein Zeitintervall von 700.000 Punkten ausgewählt. Dies entspricht etwa 5 s und lässt somit Aussagen im Frequenzspektrum bis etwa 2 Hz zu.

Die Stromspur zeigt dabei einen anderen Verlauf als bei den Messungen mit PMB (Abbildung 57 oben): Nach Beginn des Stromflusses steigt der Strom zunächst leicht an und erreicht einen im Mittel konstanten Wert der gehalten wird, bis die Membran zerstört wird. Dabei ist der Strom stark verrauscht und zeigt viele Spitzen kurzer Dauer. Die Rauschanalyse (Abbildung 57 unten) zeigt dieses Verhalten sehr deutlich. Im Grundspektrum (Abbildung 57 unten, links) sind im Wesentlichen die Netzstörungen sowie das systemische Rauschen oberhalb von 500 Hz sichtbar. Bei Beginn der Stromfluktua-

tionen (Abbildung 57 unten, Mitte) zeigt sich ein leicht erhöhtes Rauschen in einem Frequenzbereich unterhalb von etwa 300 Hz. Dieses erhöht sich weiter, wenn die Stromfluktuationen den stationären Zustand erreicht haben. In diesem Bereich nimmt die Amplitude bei niedrigen Frequenzen im Vergleich zum Anfangsbereich und dem Anfangsbereich extrem stark zu (Abbildung 57 unten, rechts). Dabei lässt sich ein Maximum in Bereich zwischen 10 und 50 Hz erkennen. Dies bedeutet, dass die meisten Fluktuationen eine Lebensdauer zwischen 20 und 100 ms haben.

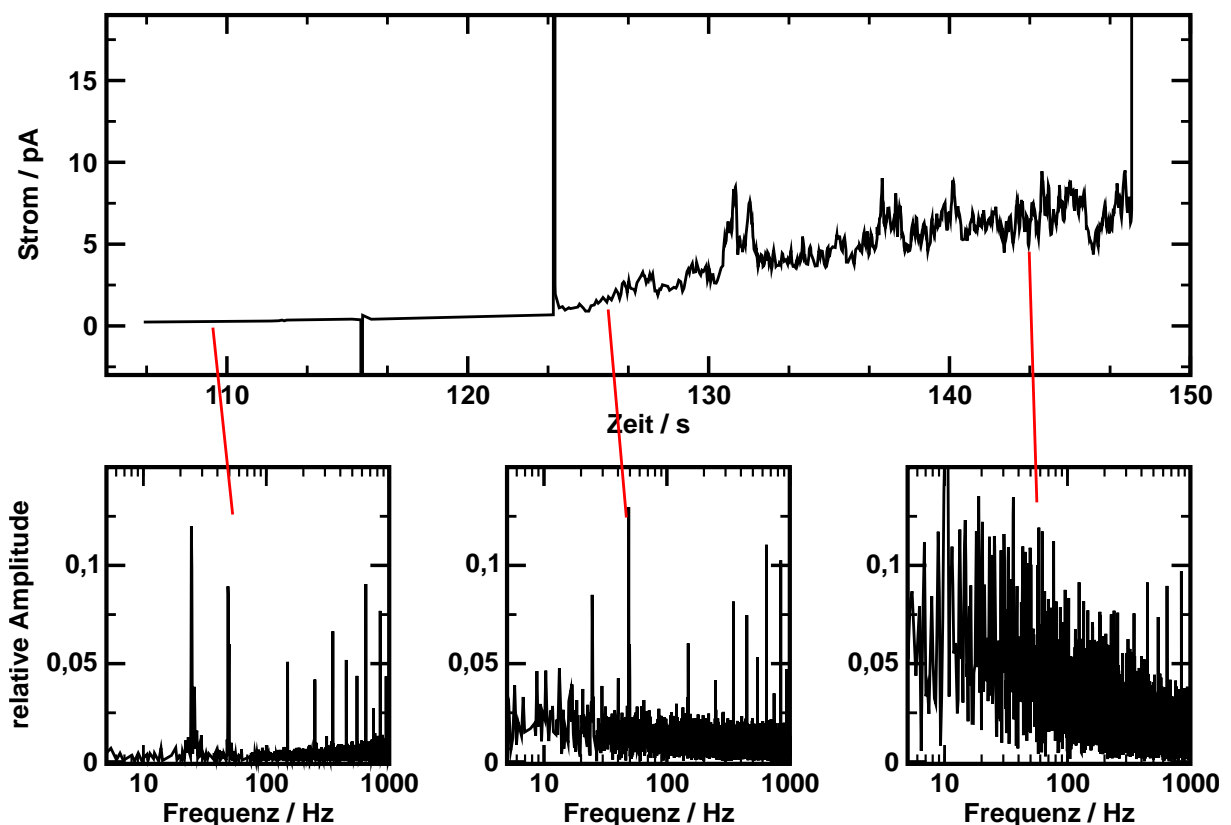


Abbildung 57: Untersuchung des Rauschverhaltens hBD-3-induzierten Läsionen in WBB01/PL Membranen mittels Fourieranalyse.

Oben: analysierte Stromspur; **unten:** Ergebnisse der an den unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten FFT-Analysen.

Die Daten wurden bei konstanter Spannung von 20 mV aufgenommen. Die hBD-3 Konzentration betrug 5 µg/ml. Es wurde ein Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES und pH 7,0 bei 37°C verwendet.

Stromspurenanalyse mittels Autokorrelationsfunktion

Um zu untersuchen, ob die Läsionen bzw. Poren statistisch voneinander abhängig sind, wurde an den drei entsprechenden Zeitabschnitten, die für die Rauschanalyse ausgewählt wurden, eine Autokorrelationsanalyse durchgeführt.

Zunächst sollen die Daten mit PMB betrachtet werden. Dazu wurden jeweils Intervalle von 160.000 Datenpunkten Länge, dies entspricht etwa 1,1 s, zu den ausgewählten Zeitpunkten definiert. Danach wurde überprüft, ob die Reihe an Datenpunkten stationär ist, was im Fall der Daten für PMB gegeben ist. Daraufhin wurde an den drei Punkten die Autokorrelationsfunktion bis zu einer Laufvariablen von bis zu 160.000 berechnet.

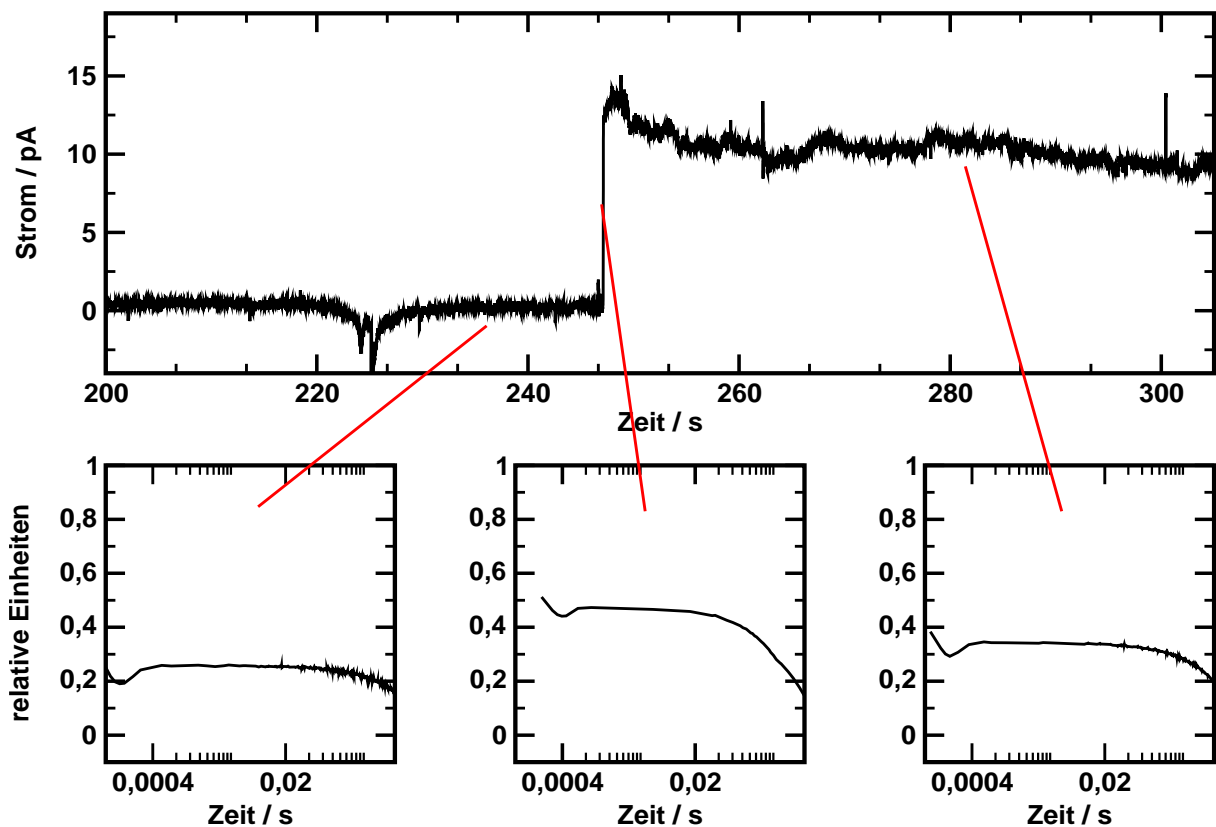


Abbildung 58: Untersuchung der statistischen Abhängigkeit PMB-induzierter Poren in WBB01/PL Membranen mittels Autokorrelationsfunktion.

Oben: analysierte Stromspur; **unten:** Ergebnisse der an den unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Autokorrelationsanalysen.

Die Daten wurden bei konstanter Spannung von 20 mV aufgenommen. Die PMB Konzentration betrug 1,7 µg/ml. Es wurde ein Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES und pH 7,0 bei 37°C verwendet.

Unter Beachtung des Vertrauensintervalles werden nur Datenpunkte bis zu einer Zeit von 0,5 s (entsprechend einer Laufvariable von bis zu 80.000) dargestellt.

Die Autokorrelationsfunktion (Abbildung 58 unten, links) zeigt schon im Grundbereich des Stromes einen relativ hohen Wert im Vergleich zu den Messungen mit hBD-3 (Abbildung 59). Dies liegt darin begründet, dass das Messsystem während der gezeigten Messung stark rauschte. Da dieser hohe Rauschanteil während der Messung konstant blieb, ist der hohe Anfangswert jedoch irrelevant.

Ausgehend vom Grundbereich (Abbildung 58 unten, links) zeigt sich, dass nur in der Anfangsphase des Stromflusses der Wert der Autokorrelation deutlich ansteigt (Abbildung 58 unten, Mitte). Im weiteren Verlauf des Stromflusses sind die Werte wieder niedriger, erreichen jedoch nicht den Wert des Grundbereiches (Abbildung 58 unten, rechts). Ohne der Interpretation zu weit vorzugreifen, soll hier kurz erläutert werden, was die Diagramme bedeuten. Aufgrund des hohen Rauschens des Messsystems ergeben sich schon für das Grundsignal (Abbildung 58 unten, links) sehr hohe statistische Abhängigkeiten innerhalb der Zeitreihe. Im Bereich des Beginns des Stromflusses (Abbildung 58 unten, Mitte) erhöht sich die statistische Abhängigkeit der Daten untereinander, was später zu diskutieren ist. Im weiteren Verlauf erniedrigt sich die Abhängigkeit innerhalb der Zeitreihe trotz des im Vergleich zum Grundsignal erhöhten Stromes wieder. Dies liegt darin begründet, dass die Autokorrelationsfunktion nur die Änderungen des Signals, aber nicht dessen Mittelwert berücksichtigt. Das heißt, dass der Strom durch die Membran im Fall des PMB nahezu die gleiche statistische Abhängigkeit aufweist wie das Rauschen des Grundzustandes.

Im Folgenden sollen die Daten für die hBD-3-induzierten Stromfluktuationen ausgewertet werden. Dazu wurden jeweils Intervalle von 140.000 Datenpunkten Länge (entsprechend 1 s) zu den ausgewählten Zeitpunkten definiert. Bei der Überprüfung, ob die einzelnen Zeitreihen stationär sind, zeigte sich, dass dies für die Daten des mittleren Zeitintervalls nicht der Fall war. Daher wurde in diesem Bereich mittels einer linearen Regression eine lineare Funktion bestimmt und mittels Subtraktion dieser die Daten des

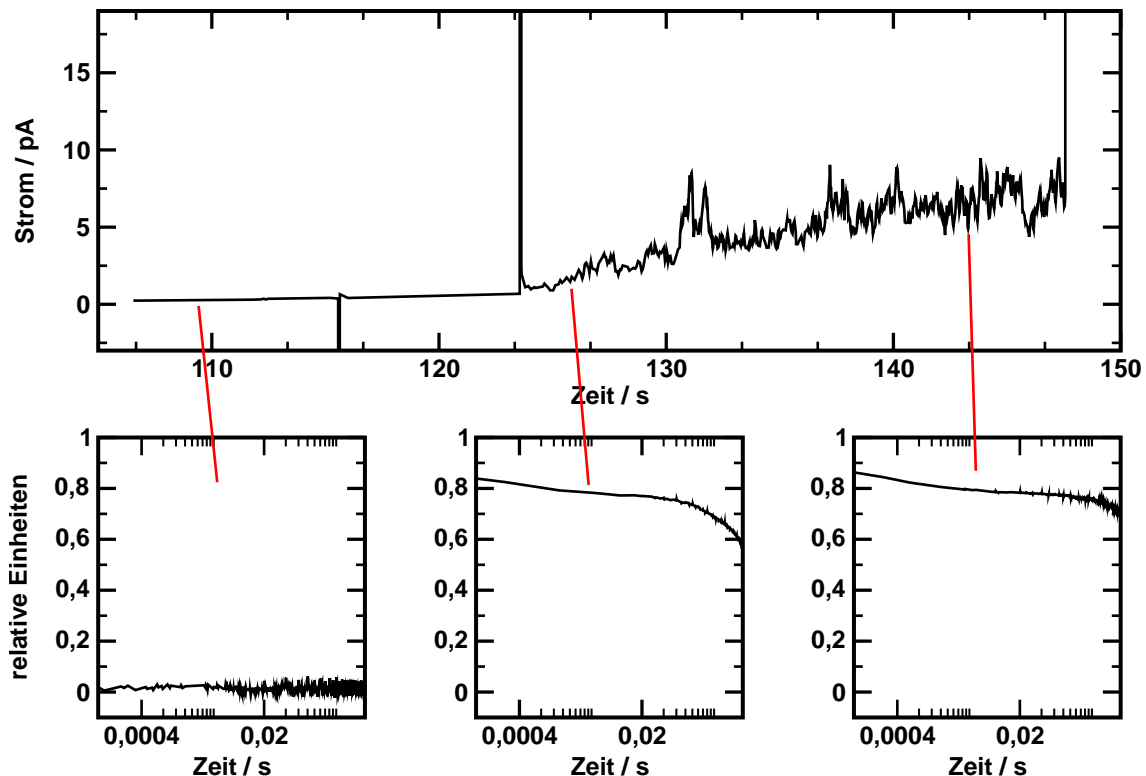


Abbildung 59: Untersuchung der statistischen Abhängigkeit hBD-3-induzierter Läsionen in WB-B01/PL Membranen mittels Autokorrelationsfunktion

Oben: analysierte Stromspur; **unten:** Ergebnisse der an den unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Autokorrelationsanalysen

Die Daten wurden bei konstanter Spannung von 20 mV aufgenommen. Die hBD-3 Konzentration betrug 5 µg/ml. Es wurde ein Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES und pH 7,0 bei 37°C verwendet.

mittleren Zeitabschnittes stationär gemacht. Daraufhin wurde die Autokorrelationsfunktion bis zu einer Laufvariablen von bis zu 140.000 in allen Intervallen berechnet, jedoch werden hier die Daten nur bis zu einer Laufvariablen von 70000 (entsprechend einer Zeit von 0,5 s) angezeigt, um das Vertrauensintervall einzuhalten.

Betrachtet man die Daten (Abbildung 59) im Vergleich zu den vorherigen Daten, so erkennt man, dass im Grundbereich die statistische Abhängigkeit deutlich kleiner ist. Dies liegt darin begründet, dass bei diesen Aufnahmen das Grundrauschen deutlich geringer war. Im Grundbereich (Abbildung 59 unten, links) liegen die Werte der Autokorrelationsfunktion nahe bei 0, so dass hier keine statistische Abhängigkeit der Daten untereinander festzustellen ist. Im Übergangsbereich, bei Beginn der Stromfluktuationen, zeigt sich dass die Daten über eine längere Zeit statistisch abhängig sind (Abbildung 59 unten, Mitte). Ein vergleichbares Bild zeigt sich, wenn die Stromfluktuationen einen stationären Zustand erreicht haben (Abbildung 59 unten, rechts). Die Daten der Autokorrelationsfunktion unterscheiden sich in diesen beiden Bereichen nur sehr geringfügig. Dies bedeutet, dass die statistische Abhängigkeit der Läsionen über die Zeit nicht ändert, so dass die Läsionen auch im stationären Zustand voneinander abhängig sind, was bei PMB-induzierten Poren nicht der Fall ist.

6.2 *Biophysikalische Ergebnisse an rekonstituierten mykobakteriellen Membranen*

In diesem Abschnitt werden alle Daten an rekonstituierten mykobakterieller Membranen vorgestellt. Dazu gehören zunächst die Versuche an substratgestützten Mono- und Doppelschichten sowie an freistehenden symmetrischen Membranen, die nach der Montal-Mueller-Technik präpariert worden sind.

6.2.1 *Versuche mit Rasterkraftmikroskopie*

In diesem Abschnitt werden substratgestützte Mono- und Doppelschichten einer Trehalose Dimykolat (TDM)-haltigen Lipidmischung mit dem Rasterkraftmikroskop im Bezug auf ihre Domänenbildung untersucht.

6.2.1.1 *Domänenbildung in Monoschichten einer Lipidmischung mit Trehalose Dimykolat*

Um die Domänenbildung TDM-haltiger Monoschichten zu untersuchen, wurde eine Mischung aus PE:PG:TDM mit einem Gewichtsverhältnis von 25:25:50 verwendet. Zur

Kontrolle wurde zudem eine Mischung aus PE:PG mit einem Gewichtsverhältnis von 50:50 verwendet. Beide Mischungen wurden mittels der Langmuir-Blodgett-Technik auf Mica bei einem lateralem Druck von 20 mN/m übertragen, wobei ein Puffer mit 100 mM KCl und 5 mM HEPES bei pH 7,0 verwendet wurde. Die Monoschichten wurden mit einem RC800PCA Cantilever im attraktiven AC-Modus mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht.

Die Lipidmonoschicht der PE:PG Mischung zeigt keine Domänenbildung (Abbildung 60). Die Abbildung 61 zeigt hingegen eine deutliche Domänenbildung der PE:PG:TDM Lipidmischung. Dabei zeigen sich drei Höhenniveaus: (i) die größte Fläche ist die Fläche mit niedrigem Niveau, (ii) diese Domänenflächen liegen 2 nm höher als (i) und werden umrandet (iii) von einer weiteren höher liegenden Schicht (0,2 nm). Eine Berechnung der Flächeninhalte ergibt jedoch kein Verhältnis von 25:25:50. Aufgrund der Verwendung des Gewichtsverhältnisses anstatt eines sonst verwendeten molaren

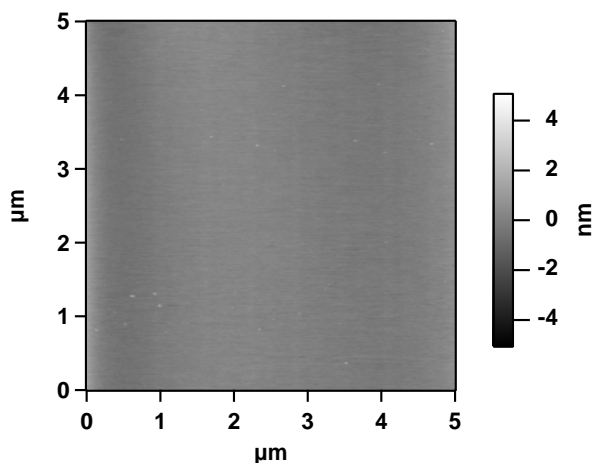


Abbildung 60: Höhenbild einer PE:PG Monoschicht

Die PE:PG Monoschicht (Gewichtsverhältnis 50:50) wurde bei einem lateralem Druck von 20 mN/m auf einem Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei RT präpariert. Die Monoschicht wurde auf Mica übertragen und ist im attraktiven AC-Modus mit einem Cantilever des Typs RC800PSA aufgenommen worden.

Verhältnisses (die Molmasse von dem verwendeten TDM ist nicht bekannt) kann jedoch keine Rückrechnung vom Flächeninhalt auf die Lipide erstellt werden. Da der Höhenunterschied jedoch 3 nm beträgt, was höher ist als die Werte, die bei einer thermodynamischen Phasentrennung zu erwarten wären (siehe Abschnitt auf S.) und da reine PE:PG Monoschichten (Abbildung 60) keine Domänen aufzeigen, handelt es sich bei den in PE:PG:TDM Monoschichten auftretenden Domänen sehr wahrscheinlich um eine Separation des TDM.

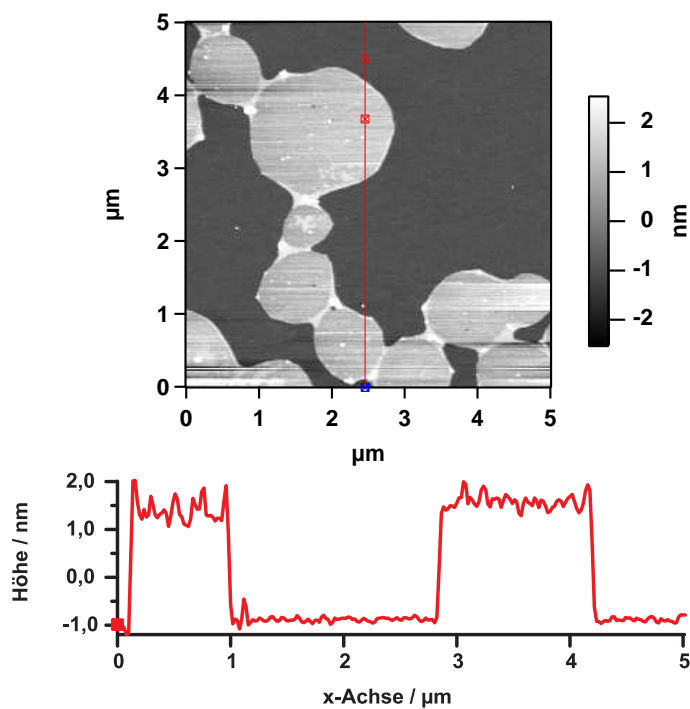


Abbildung 61: Höhenbild einer Monoschicht einer PE:PG:TDM Lipidmischung.

Die PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis PE:PG:TDM: 25:25:50) Monoschicht wurde bei einem lateralem Druck von 20 mN/m auf einem Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei RT präpariert. Die Monoschicht wurde auf Mica übertragen und ist im attraktiven AC-Modus mit einem Cantilever des Typs RC800PSA aufgenommen worden.

6.2.1.2 Domänenbildung in Doppelschichten von Lipidmischungen mit Trehalose Dimykolat

Um die Domänenbildung in TDM-haltigen Doppelschichten zu untersuchen, wurden Aggregate aus einer Mischung aus PE:PG:TDM mit einem Gewichtsverhältnis von 25:25:50 hergestellt. Zur Kontrolle wurden ebenso Aggregate aus einer Mischung PE:PG (Gewichtsverhältnis 50:50) hergestellt. Durch Aggregatfusion wurden diese auf Mica aufgebracht und mit dem Rasterkraftmikroskop im Puffer mit einem RC800PSA im repulsiven AC-Modus aufgenommen.

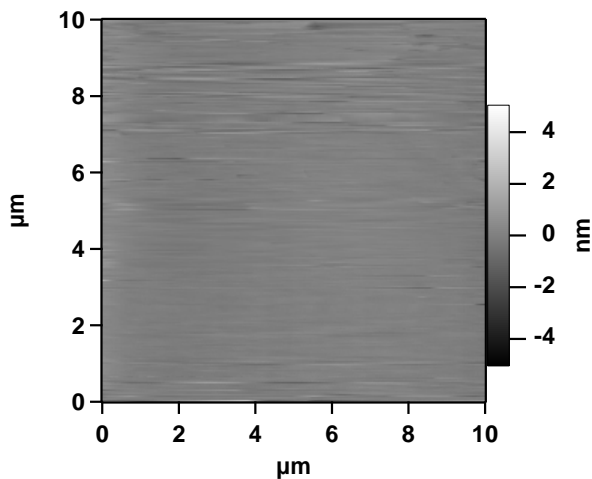


Abbildung 62: Höhenbild einer PE:PG Doppelschicht

Die PE:PG (Gewichtsverhältnis PE:PG 50:50) Doppelschicht wurde durch Aggregatfusion auf Mica mit einem Puffer aus 100 mM KCl, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei RT präpariert. Die Aufnahme wurde im repulsiven AC-Modus mit einem Cantilever des Typs RC800PSA aufgenommen.

Während die PE:PG-Doppelschichten (Abbildung 62) keine Domänenstruktur aufzeigen, ist eine ausgeprägte Domänenstruktur im Fall der PE:PG:TDM-Doppelschichten (Abbildung 63) gezeigt werden. Die einzelnen Domänen waren dabei recht klein. Zwar zeigen sich bei diesen Aufnahmen kleinere Domänen als in den Monoschichten, dennoch lässt die Verteilung der Domänen sowie die Höhe dieser Domänen auf eine Lipidseparation schließen.

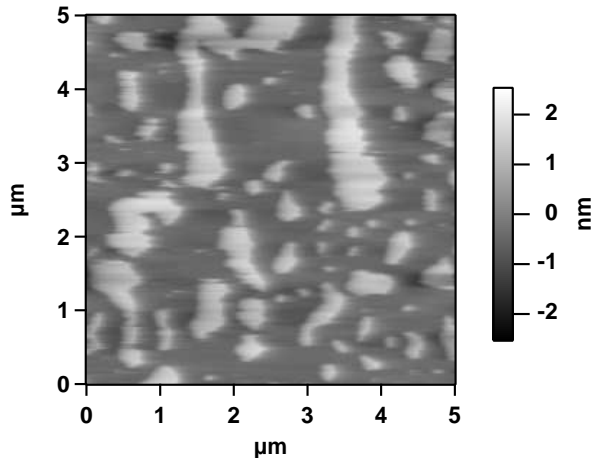


Abbildung 63: Höhenbild einer TDM-haltigen Doppelschicht

Die PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis PE:PG:TDM 25:25:50) Doppelschicht wurde durch Aggregatfusion auf Mica mit einem Puffer aus 100 mM KCl, 5 mM HEPES bei pH 7,0 bei RT präpariert. Die Aufnahme wurde im repulsiven AC-Modus mit einem Cantilever des Typs RC800PSA aufgenommen worden.

6.3 Messungen an freistehenden rekonstituierten Membranen nach Montal-Mueller

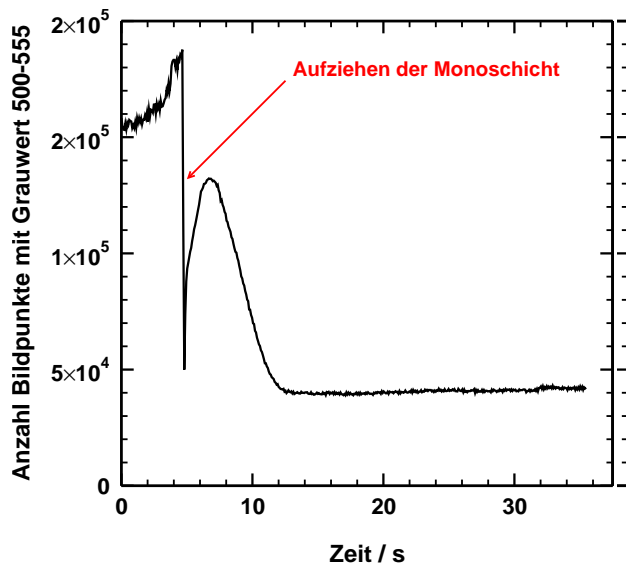


Abbildung 64: Auswertung der Gesamtgröße der dunklen Domänen einer TDM-haltigen Monoschicht über die Zeit.

Es handelt sich um eine Mischung aus PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis PE:PG:TDM 25:25:50), welche mit 4% NBD-PE versetzt und als Monoschicht mittels der Montal-Mueller-Technik präpariert wurde. Puffer: 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH: 7,0.

In diesem Abschnitt werden aus einer Lipidmischung aus PE:PG:TDM in einem Gewichtsverhältnis von 25:25:50 freistehenden Mono- und symmetrische Doppelschichten mit der Montal-Mueller-Technik präpariert. Die Membranen wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei NBD-PE als Fluorophor eingesetzt wurde.

6.3.1 Domänenbildung in Monoschichten einer Lipidmischung mit Trehalose Dimykolat

Um die Dynamik der Domänenbildung von Trehalose Dimykolat (TDM) in Phospholipidmembranen zu untersuchen, wurde dieses mit PE und PG gemischt. Die Domänen wurden dabei durch NBD-PE mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht. Dazu wurde eine Mischung aus PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis 25:25:50) mit 4% NBD-PE versetzt und auf den Puffer (100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH: 7,0) bei $37^\circ C$ des Montal-Mueller-Aufbaus mit Fluoreszenzmikroskop aufgetropft. Betrachtet wurden Monoschichten, die sowohl auf der dem Objektiv abgewandten Seite

(trans-markiert) präpariert wurden, als auch Monoschichten, die in dem Objektiv zugewandten Kompartiment (cis-markiert) aufgezogen wurden (siehe dazu Abbildung 25 auf S. 74). Betrachtet man zunächst die trans-markierten Monoschichten, erkennt man scharfe Bilder mit dem Rand der Apertur und der Domänenstruktur (Abbildung 65). Der Rand der Apertur erscheint dabei als ringförmige Struktur, welche in allen Bildern gleich bleibt und die Flächen der Domänenbildung umrandet. Mit der Hilfe der Kamera wurden fortlaufend Bilder in einem zeitlichen Abstand von etwa 200 ms aufgenommen (Abbildung 64). Dabei fiel auf, dass die Größe und die Anzahl der Domänen mit der Zeit variierte. In Abbildung 64 wurde die Anzahl der Bildpixel mit einem Graustufenwert zwischen 500 und 555 (die Kamera stellt 16 bit Graustufen dar, was somit 65536 Graustufen ergibt), welcher die dunklen Flächen darstellt, ausgewertet. Dabei ist zu erkennen, dass die Gesamtfläche der dunklen Domänen über die Zeit schnell abfällt. Am Ende dieses Prozesses wurde eine komplett helle Monoschicht ausgebildet. Dieser Vorgang ließ sich innerhalb der Versuchsdurchläufe mehrmals wiederholen. Dabei ist für den Vergleich mit den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zu beachten, dass die Auflösung des optischen Mikroskops geringer ist als die des Rasterkraftmikroskops.

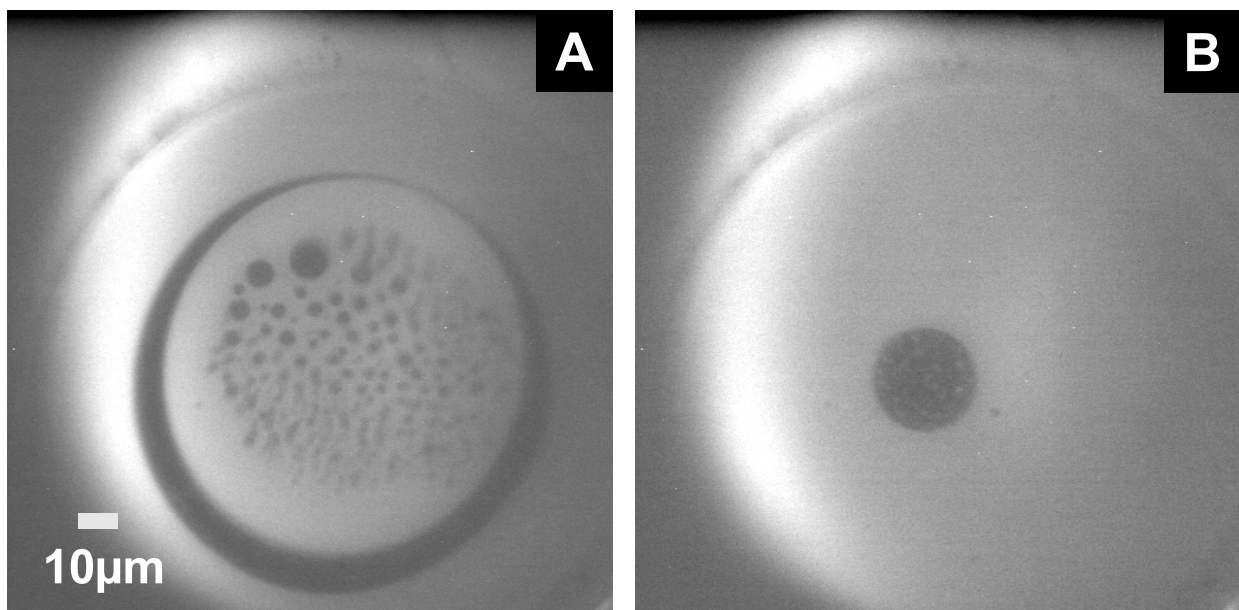


Abbildung 65: Fluoreszenzbild der fluiden Domänen einer TDM-haltigen Monoschicht

Es handelt sich um eine Mischung aus PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis PE:PG:TDM 25:25:50), welche mit 4% NBD-PE versetzt und als Monoschicht mittels der Montal-Mueller-Technik präpariert wurde. Dabei wurde eine Aufnahme zu Beginn (**A**) und am Ende (**B**) der Domänenbewegung aufgenommen. Die dunklen Bereiche stellen die rigiden Domänen dar. Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0.

Wird eine Monoschicht auf der cis-Seite markiert, so ergeben sich keine scharfen Abbildungen (Daten nicht gezeigt), da sich in diesem Fall zwischen der Monoschicht und dem Objektiv Puffer befindet (siehe dazu Abbildung 25 auf S. 74).

6.3.2 Domänenbildung in Doppelschichten einer Lipidmischung mit Trehalose Dimykolat

Auch bei diesen Versuchen wurde eine Mischung aus PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis PE:PG:TDM 25:25:50) mit 4% NBD-PE versetzt und auf den Puffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0) bei 37°C des Montal-Mueller-Aufbaus mit Fluoreszenzmikroskop aufgetropft. Das Problem bei diesen Messungen ist, dass die Bilder durch die Pufferlösung hindurch aufgenommen werden müssen. Abbildung 66 zeigt eine solche Aufnahme. Es ist zu erkennen, dass eine gleichmäßig helle Fläche von einer Ringstruktur umrandet wird. Bei der Ringstruktur handelt es sich um den Rand der Apertur, über die die Doppelschichtmembran präpariert wurde.

Die auf Seite 137 gezeigten Domänenstrukturen wurden mittels der Rasterkraftmikroskopie aufgenommen. Bei den in diesem Abschnitt gezeigten Messungen handelt es sich um optische Messungen. Daher kann die Existenz kleiner Domänen mit einer Größe unterhalb der optischen Auflösung des optischen Mikroskopes in diesen Versuchen nicht ausgeschlossen werden.

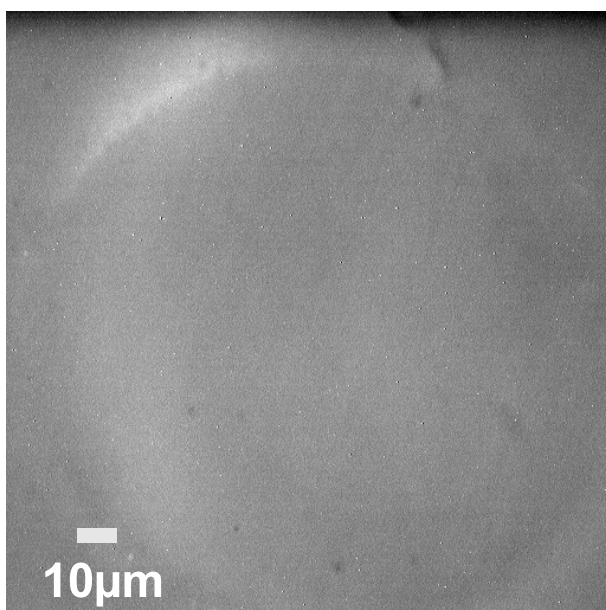


Abbildung 66: Fluoreszenzbild einer TDM-haltigen Doppelschicht.

Es handelt sich um eine Mischung aus PE:PG:TDM (Gewichtsverhältnis PE:PG:TDM 25:25:50), welche mit 4% NBD-PE versetzt und als symmetrische Doppelschicht mittels der Montal-Mueller-Technik präpariert wurde. Die ringförmige Struktur stellt die Apertur dar, die helle Fläche innerhalb der Apertur ist die Doppelschicht. Puffer: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH: 7,0.

6.3.3 Elektrische Messungen der Permeabilität von TDM-haltigen Membranen in Gegenwart von hBD-3-6S

Für diese Untersuchungen wurden zwei symmetrische Membransysteme miteinander verglichen: Eine Lipidmischung mit PE:PG in einem Gewichtsverhältnis von 50:50 und eine Lipidmischung mit PE:PG:TDM mit einem Gewichtsverhältnis von 25:25:50. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit des TDM konnten weitere Messungen mit anderen antimikrobiellen Peptiden nicht durchgeführt werden.

Bei der Präparation TDM-haltiger rekonstituierter Membranen zeigte sich, dass die Kapazität der Membranen mit Werten unter 10 pF (Daten nicht gezeigt) nur sehr gering ist. Auch zeigte sich, dass die Membranen außergewöhnlich stabil sind, d.h. eine sehr lange Lebensdauer aufweisen.

Im Folgenden sollen die Ströme durch PE:PG- und PE:PG:TDM-Membranen nach der Zugabe von hBD-3-6S verglichen werden. Die Spannung betrug bei den Messungen konstant 20 mV. Dabei ließen sich in symmetrischen PE:PG Membranen Stromfluktua-

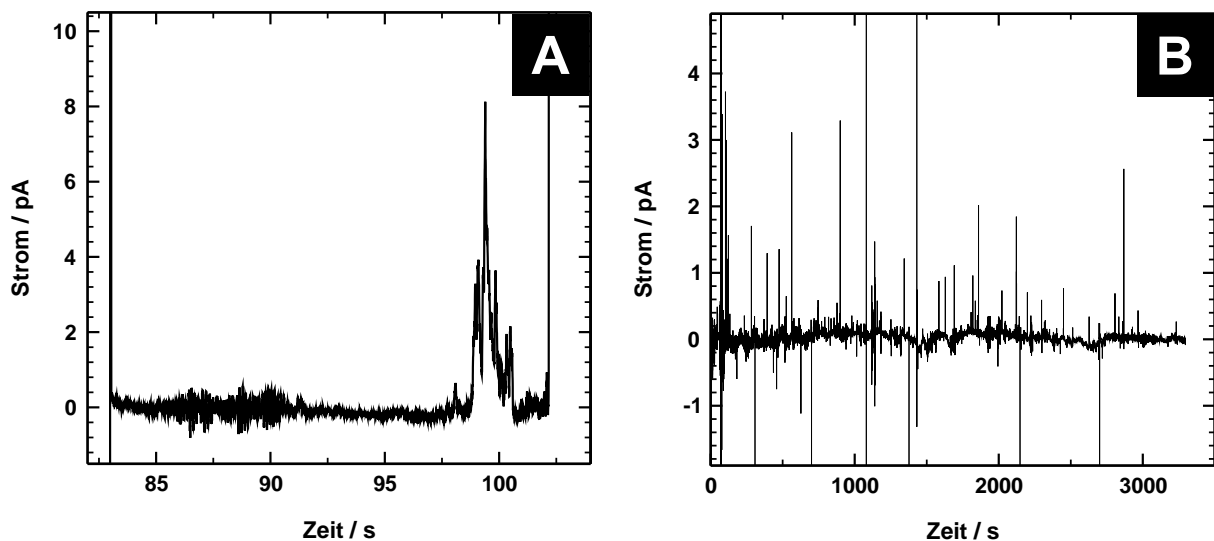


Abbildung 67: Stromfluss durch hBD-3-6S-induzierte Läsionen in einer (A) PE:PG-Membran und (B) PE:PG:TDM-Membran bei konstanter Spannung von 20 mV.

Im Fall der PE:PG-Membranen (Gewichtsverhältnis PE:PG 50:50) können Läsionen durch das hBD-3-6S induziert werden, in den TDM-haltigen Membranen (Gewichtsverhältnis 25:25:50) jedoch nicht. Es wurde ein Puffer mit 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM HEPES und pH 7,0 bei 37°C verwendet. Die Konzentration betrug 5 µg/ml hBD-3-6S in (A) und 10 µg/ml hBD-3-6S in (B). Bei den Spitzen in (B) handelt es sich um kurzzeitige elektrische Störungen. Die Kurven enden jeweils mit der Zerstörung der Membran.

tionen induzieren (Abbildung 67 A), wobei eine hBD-3-6S-Konzentration von mindestens 2,5 µg/ml notwendig war. Es zeigte sich, dass die Membran nicht direkt nach dem Auftreten der Fluktuationen zerstört wurde, wie das bei den weiter vorn vorgestellten LPS/PL-Membranen der Fall war. Die Fluktuationen hielten dabei nur wenige Sekunden an. Dies zeigt, dass die Membran zwar derart destabilisiert wird, dass es zu einem Stromfluss durch die Membran kommt, aber dass sie nicht ihre Gesamtstabilität verliert. Betrachtet man die Messung mit PE:PG:TDM-Membranen (Abbildung 67 B), so ist es auch bei deutlich höherer Konzentration (10 µg/ml) des Peptides nicht möglich, Stromfluktuationen zu induzieren. Dies ist wahrscheinlich auf eine zusätzliche Stabilisierung der Membran durch TDM zurückzuführen.

7 Diskussion

7.1 *Diskussion der Daten der verschiedene Methoden*

Der menschliche Organismus unterliegt einer permanenten Infektionsgefahr. Um dieser entgegen zu wirken, verfügt er über ein Immunsystem. Dieses ist wiederum unterteilt in die angeborene und die adaptive Immunabwehr. Eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr stellen antimikrobielle Peptide dar. Diese sind in der Lage, Bakterien, Pilze und Viren abzutöten und so den Organismus vor einer Infektion zu schützen.

Ein biologischer Organismus ist ein kompliziertes physikalisches Vielteilchensystem, derart kompliziert, dass es nicht möglich ist, es ganzheitlich zu charakterisieren. Zur Charakterisierung der einzelnen physikalischen Prozesse ist es daher sinnvoll, modellhafte Ansätze zu finden, um das gesamte System zu vereinfachen. In der vorliegenden Untersuchung wurden dahingehend bakterielle Membranen auf ihre jeweiligen Lipidkomponenten reduziert und mittels physikalischer Methoden in Bezug auf die Wechselwirkung mit humanen β -Defensinen charakterisiert.

Humane β -Defensine sind endogene antimikrobielle Peptide der epithelialen Immunabwehr (d.h. der Immunabwehr der Deck- und Drüsengewebe der menschlichen Haut) [Harder *et al.*,1997]. Es handelt sich um vergleichsweise große Peptide (etwa 40 Aminosäuren), die über drei Disulfidbrücken verfügen [Ganz *et al.*,1985] [Ganz &Lehrer,1995]. Die tertiäre Struktur wird durch β -Faltblatt Strukturen gebildet, welche durch die Disulfidbrücken stabilisiert werden. In der Literatur wird diskutiert, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität, sondern nur auf die Chemotaxis des Peptids hat [Wu *et al.*,2003]. Der Betrag der Disulfidbrücken zur Wirkungsweise der Peptide ist jedoch noch nicht vollständig bekannt und biophysikalisch bis dato nicht untersucht worden. Aus therapeutischer Sicht können Defensine von großem Interesse sein, da sie bislang keine Ausbildung von Resistenzen unter physiologischen Bedingungen, wie dies bei klassischen Antibiotika der Fall ist, ausbilden [Hancock,1999].

Gram-negative Bakterien stellen die Ursache für eine Vielzahl von Infektionen dar, welche zur Ausbildung einer bakteriellen Sepsis führen können [Rietschel *et al.*,1999], was

ihre große medizinische Bedeutung erklärt. Gram-negative Bakterien sind Bakterien, die über eine besondere Zellhülle verfügen, welche aus einer inneren und einer äußeren Membran besteht. Die äußere Membran stellt dabei das erste Hindernis für antimikrobielle Peptide dar. Der Grund liegt darin, dass unabhängig vom letztendlichen Wirkmechanismus des Peptides diese Membran perforiert werden muss, um z.B. ein Eindringen des Peptides in das Bakterium (*self-promoted uptake*) zu gewährleisten, oder durch die Zerstörung der Membranintegrität den bakteriellen Stoffwechselmechanismus zu stören und damit das Bakterium abzutöten [Gutsmann *et al.*,2005] [Hancock & Bell,1988]. Die äußere Membran ist in Bezug auf ihre Lipidzusammensetzung asymmetrisch, die innere Monoschicht besteht aus Phospholipiden, während sich die äußere Monoschicht aus Lipopolysacchariden bildet. Diese äußere Membran steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Um jedoch physikalische Untersuchungen durchführen zu können, ist es notwendig, ein möglichst genau definiertes System zu untersuchen. Daher wird die äußere Membran auf ihre Lipidkomponenten reduziert. Dies ermöglicht die Durchführung physikalischer Untersuchungen zur Interaktion zwischen humanen β -Defensinen und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien mittels verschiedener Rekonstitutionssysteme. Jedoch ist auch dieses auf seine Lipidzusammensetzung vereinfachte Membransystem in Bezug auf die Wechselwirkungen der beiden Monoschichten noch nicht vollständig untersucht worden. Grundlage des Verständnisses der Interaktion zwischen Peptiden und biologischen Membranen ist die Kenntnis des Aufbaus der Membran und ihrer thermodynamischen Eigenschaften. Daher wurden physikalische Untersuchungen zur lateralen und transversalen Organisation der Lipidmoleküle in der Membran in Bezug auf ihre Phasenseparation durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen zu einem besseren Verständnis einerseits der Membran selbst, andererseits auch der Interaktion zwischen humanen β -Defensinen und der Membran.

7.1.1 Transversale und laterale Organisation der Lipidmatrix Gram-negativer Bakterien

Im folgenden Abschnitt der Diskussion werden zunächst die biophysikalischen Untersuchungen zur lateralen und transversalen Organisation der rekonstituierten Lipidmatrix der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien behandelt (siehe dazu Kapitel 7.1.2).

Dazu wurde das LPS des *P. mirabilis* Tiefraummutantenstammes R45 zur Rekonstitution der äußeren Monoschicht, sowie die natürliche Phospholipidmischung zur Rekonstitution der inneren Monoschicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien verwendet. Das einfachste Modellsystem zur Rekonstitution der äußeren Monoschicht der bakteriellen Membran stellt die substratunterstützte Lipidmonoschicht dar. Die Monoschichten wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht. Dabei zeigte sich bei einem lateralen Druck, der äquivalent zum natürlichen System ist (Äquivalenzdruck), Domänen in den LPS R45 Monoschichten. Im Fall der Phospholipidmischung PL zeigte sich eine solche Domänenbildung nicht. Es gilt grundsätzlich zwei unterschiedliche Arten der Domänenbildung zu unterscheiden: die Phasenseparation chemisch identischer Moleküle und die Separation einzelner chemisch verschiedener Lipidkomponenten. Die Phasenseparation ist ein thermodynamischer Prozess, der auf der Minimierung der freien Gibbschen freien Energie beruht. Bei der Separation einzelner Lipidkomponenten trennen sich die unterschiedlichen Lipide einer Lipidmischung. Im Fall der Domänenbildung in LPS Monoschichten handelt es sich im Wesentlichen um eine thermodynamische Phasentrennung, wobei es zur Trennung der im flüssig expandierten (*Liquid Expanded*, LE, fluide) und der im flüssig kondensierten (*Liquid Condensed*, LC, rigide) Zustand vorliegenden Fettsäureketten der Lipide kommt.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie Messungen zur Domänenbildung an freistehenden planaren Membranen und freistehenden Monoschichten durchgeführt [Hagge,2003]. Auch bei diesen Untersuchungen konnte eine Domänenbildung innerhalb von LPS R45 Monoschichten, jedoch keine Domänenbildung in Monoschichten bestehend aus der Phospholipidmischung PL gezeigt werden. Die Untersuchungen an den freistehenden Monoschichten wurden im Phasenkoexistenzbereich des LPS R45 bei 37°C durchgeführt. Die substratgestützten Monoschichten (siehe Kapitel 6.1.2.1) wurden aus messtechnischen Gründen bei 20°C präpariert. Durch die Wahl des geeigneten lateralen Druckes von 20 mNm⁻¹ zeigte sich in den festkörperunterstützten Membranen ein zu den Messungen an freistehenden Membranen vergleichbares Verhalten der Phasentrennung. Durch den Vergleich von rasterkraftmikroskopischen Höhenbildern mit fluoreszenzmikroskopischen Bildern konnte eine Zuordnung der Phasen mittels der durch die Fluoreszenzmikroskopie detektierten farbstoffangereicherten Bereiche erreicht werden. Außerdem wurde mit den rasterkraftmikroskopischen Bildern gezeigt, dass sich in beiden Monoschichten beim

gewählten lateralen Druck keine Domänen im Submikrometerbereich, sondern ausschließlich Strukturen größer als ein Mikrometer ausbildeten. Dies macht die in der vorliegenden Arbeit gemachten Aussagen vergleichbar hinsichtlich der lateralen Organisation mit denen an freistehenden Membranen. Weitergehend stellt die Etablierung der Kombination von Rasterkraftmikroskopie und Lichtmikroskopie die Möglichkeit bereit, sowohl große Strukturen (durch die Lichtmikroskopie) als auch kleine Domänenstrukturen (durch die Rasterkraftmikroskopie) innerhalb einer Probe zu untersuchen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur lateralen Organisation an freistehenden Membranen wurden auch Messungen an rekonstituierten Membranen Gram-negativer Bakterien durchgeführt. Diese Messungen ergaben, dass es innerhalb der Doppelschichtmembranen, welche aus einer domänenbildenden Monoschicht, die im untersuchten Fall aus LPS R45, und einer nicht domänenbildenden Monoschicht, die aus PL präpariert wurden, zu keiner thermodynamischen Phasenseparation kam. Dieses Verhalten konnte für substratgestützte Membranen ebenfalls gezeigt werden (siehe Kapitel 6.1.2.7). Wird zunächst die fluide PL-Monoschicht mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik an das Substrat gebunden und die sich im Koexistenzbereich befindende LPS R45 Monoschicht darüber präpariert, so zeigte sich keine Domänenbildung. Wurde die Doppelschicht auf dem Substrat in umgekehrter Orientierung präpariert, so zeigte sich ebenfalls keine Domänenbildung innerhalb der Doppelschichtmembran und dies, obwohl die auf dem Substrat präparierte LPS R45-Monoschicht vor der Präparation der zusätzlichen PL-Monoschicht eine Domänenbildung aufzeigte. Dies lässt zuerst einmal auf eine Diffusion der vormals in den fluiden Domänen konzentrierten Fluoreszenzfarbstoffmoleküle schließen. Dieses Verhalten wirft die Frage auf, wieso die Domänenbildung in beiden Monoschichten der Doppelschichtmembran aufgehoben wird. In der Literatur wurden bislang hauptsächlich Untersuchungen in Bezug auf die reduzierte laterale Beweglichkeit innerhalb der rigiden Domänen vorgenommen [Chiantia&Kahya &Schwille,2007]. In einer Untersuchung wurden einzelne Lipidmoleküle mittels chemisch funktionalisierter Cantileverspitzen aus der Membran herausgezogen. Dabei zeigte sich, dass die Verankerung der Lipidmoleküle in rigiden Membranen größer war als in fluiden Membranen [Wieland&Gewirth &Leckband,2005]. Weitergehend wurde die Interaktionslänge hydrophober Wechselwirkungen mit Hilfe einer Kombination von *Surface Forces Apparatus* (SFA) und Rasterkraftmikroskopie an Tensidoberflächen gemessen [Lin *et al.*,2005] [Tsao&Evans &Wennerström,1993]. Bei diesen Messungen

zeigte sich, dass die Wechselwirkung mit 10 bis 100 nm sehr langreichweitig ist. Die transversale Interaktion der beiden Monoschichten der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien miteinander wurde bisher jedoch nicht untersucht. Hierzu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Kraftmessungen in Form von Kraftkarten an LPS- und PL-Monoschichten durchgeführt (siehe Kapitel 6.1.2.3 und 6.1.2.4).

Zunächst wurde mittels eines Silizium-Nitrit-Cantilevers untersucht (siehe Kapitel 6.1.2.3), ob sich die Parameter Adhäsionsarbeit und Abrisskraft zwischen Cantilever und der Probenoberfläche zur Charakterisierung der Domänen eignen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es deutliche Unterschiede zwischen den fluiden und rigiden Domänen in Bezug auf die Abrisskräfte und Adhäsionsarbeit gibt. Die Adhäsion im Bereich der fluiden Domänen ergab höhere Werte als im Bereich der rigiden Domänen. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch Messungen von Lipidmonoschichten im attraktiven AC-Modus, in denen die fluiden Domänen in Höhenbildern höher erscheinen [Roes *et al.*, 2005], was einer stärkeren Interaktion zwischen Cantilever und Probe im Bereich der fluiden Domänen als in den rigiden Domänen entspricht. Demnach interagiert die Cantileverspitze im Fall der rigiden Fettsäureketten im Wesentlichen mit den terminalen CH₃-Gruppen und im Fall der fluiden Fettsäureketten verstärkt auch mit den CH₂-Gruppen [Berger *et al.*, 1995]. Diese unterschiedliche Bindung führt letztendlich zur Änderung der Adhäsion zwischen Cantilever und Monoschicht. Wichtig für die Betrachtung der Adhäsionsarbeit ist, dass nicht nur eine einzige, punktuelle Bindung des Cantilevers mit der Probe gemessen wird, sondern die gesamte Wechselwirkung mit der Probe, die dieser bei der Annäherung an die Probe widerfährt. Die Abrisskraft hingegen ist im Bereich der fluiden Domänen niedriger als in den rigiden Domänen. Bei der Abrisskraft spielt die Bindung der Cantileverspitze an die Probe eine entscheidende Rolle. Im vorliegenden Fall kommt es zu einer schwachen Bindung zwischen den Fettsäureketten und der Cantileverspitze. Der Unterschied in der Betrachtungsweise im Vergleich zur Adhäsionsarbeit ist, dass bei der Abrisskraft nur die größte Kraft zwischen Cantilever und Probe entscheidend ist und nicht ein integraler Wert, wie im Fall der Adhäsionsarbeit. Die Messungen zeigen also eine stärkere Bindung des Cantilevers im Bereich der rigiden Domänen. Hier wird jedoch schon ein systemisch bedingtes Problem deutlich: durch die Interaktion der Cantileverspitze mit einer Vielzahl von Lipidmolekülen und dabei speziell mit den Fettsäureketten, ist der Fehler der einzelnen Messungen untereinander sehr groß, da sich die Anzahl der mit der Cantileverspitze in Interaktion tretenden Fettsäure-

ketten bei jedem Messvorgang unterscheidet. Zusätzlich ist es nicht möglich, die Anzahl der mit der Spitze in Interaktion tretenden Fettsäureketten zu kontrollieren. Dies führt dazu, dass die Unterschiede zwischen den fluiden und rigiden Domänen in den einzelnen Kraftkarten sichtbar sind, mittelt man jedoch eine Vielzahl von Messungen, so lässt sich keine Signifikanz des Gesamtergebnisses darstellen. Auch ist zu beachten, dass die Abrisskräfte sehr hoch im Vergleich zu einer kovalenten Bindung [Grandbois *et al.*,1999] sind. Dies ist einerseits damit zu erklären, dass eine Vielzahl einzelner Bindungen zwischen den Fettsäuren und der Cantileverspitze abreißen und andererseits damit, dass die Software die maximale negative Auslenkung des Cantilevers als Grundlage zur Bestimmung der Abrisskraft nutzt. Dies führt dazu, dass es nicht möglich ist, die einzelnen Abrisskräfte einzelner Bindungen zu detektieren. Bestimmt wird hingegen die Gesamtabrisskraft aller Bindungen.

Um eine besser definierte Interaktion in Bezug auf die hydrophobe Wechselwirkung zu messen, wurden aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Gold goldbeschichtete Cantilever verwendet (siehe Kapitel 6.1.2.3). Die Messungen mit diesem Cantilever haben ergeben, dass dieser ebenfalls geeignet ist, die Adhäsionsunterschiede zwischen fluiden und rigiden Domänen messtechnisch darzustellen. Die gemittelten Werte für die Adhäsionsarbeit zeigen ähnliche Werte wie die des Silizium-Nitrit-Cantilevers, wobei der Fehler geringer ist, so dass sich im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen die gemittelten Werte klar den unterschiedlichen Phasen zuordnen lassen. Die Werte für die mittlere Abrisskraft zwischen den Phasen unterscheiden sich etwas von den mit dem Silizium-Nitrit-Cantilever ermittelten Werten, sind aber aufgrund des kleinen Fehlers ebenfalls klar den einzelnen Phasen zuzuordnen. Die Messwerte mit dem goldbeschichteten Cantilever ergeben aufgrund der gezielteren Messung der hydrophoben Interaktionskräfte qualitativ bessere Messergebnisse, als das mit einem Silizium-Nitrit-Cantilever möglich ist.

Letztendliches Ziel ist es jedoch, direkt die Interaktionskräfte zwischen den Lipidmonoschichten innerhalb einer Membran zu untersuchen. Daher wurden Fettsäureketten an die Spitze des Cantilevers gebunden und so die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft zwischen Lipidmonoschichten und dem funktionalisierten Cantilever gemessen (siehe Kapitel 6.1.2.4). Vergleichbare Untersuchungen wurden mit funktionalisierten Cantileverspitzen für chemisch präparierte Oberflächen mit variablem elektrischen Potential durchgeführt [Kwon &Gewirth,2005]. Dabei zeigte sich, dass die Interaktion zwischen

Cantileverspitze und der Oberfläche sowohl vom Potential als auch von der Kettenlänge der zur Beschichtung verwendeten Alkane abhängt. Somit ergab sich auch bei diesen Untersuchungen eine deutliche Abhängigkeit der Interaktion zwischen den jeweiligen chemischen Gruppen und dem Cantilever. Die Interaktion zwischen Cantilever und der jeweiligen Probe kann von der Geschwindigkeit des Cantilevers in z-Richtung abhängen. Daher stellt die Ermittlung der Abhängigkeit der Kraftkurven von der Geschwindigkeit des Cantilevers in z-Richtung auch für die vorliegende Untersuchung einen wichtigen Vorversuch dar. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Geschwindigkeit in z-Richtung im relevanten Geschwindigkeitsbereich um 2 $\mu\text{m/s}$ keinen Einfluss auf die quantitative Aussage der Kraftkurven hat. Weitergehend muss sicher gestellt sein, dass die Luftfeuchtigkeit auf die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Cantileverspitze und Probe keinen Einfluss hat. Dies wurde von Xiao und Qian für mit n-Octadecyltrimethoxysilane (OTE) hydrophobilisierte Cantilever gezeigt [Xiao & Qian, 2000]. Betrachtet man nun zunächst die Werte für reines Mica, so zeigte sich eine schwache Adhäsion der Fettsäureketten gebunden am Cantilever an der eher hydrophilen Oberfläche des Micas. Vergleicht man diese Werte mit der Adhäsionsarbeit, gemessen an einer PL-Monoschicht, so erhält man deutlich höhere Werte für die Interaktion mit einer PL-Monoschicht. Diese Werte sind aufgrund der vollständig fluiden Fettsäureketten repräsentativ für fluide Domänen. Ein vergleichbares Bild ergibt sich für die Abrisskraft. Die Werte für die reine Micaoberfläche sind deutlich geringer als die Werte für eine vollständig fluide Monoschicht, die ebenfalls durch eine PL-Monoschicht repräsentiert wird. Betrachtet man nun die Werte der LPS-Monoschicht, so erhält man auch hier zwei unterschiedliche Werte, die Werte für fluide Domänen liegen näher an den Werten einer PL-Monoschicht, während die der rigiden Domänen signifikant niedriger als die für fluide Domänen liegen. In den einzelnen Kraftkarten sind die Domänen ebenfalls deutlich sichtbar. Unter der Annahme, dass die Fettsäuren am Cantilever aufgrund ihrer größeren Bewegungsfreiheit eher fluide sind, ergibt sich zusammengefasst folgendes Bild: im Bereich fluider Fettsäureketten ist die Adhäsion zwischen den Fettsäureketten stärker, als die Adhäsionsarbeit zwischen fluiden und rigiden Fettsäureketten. Die Frage ist nun, wie man dieses Ergebnis nutzen kann, um die Transformation der Phasen einer isolierten Monoschicht, die verschiedene Phasen aufweist, in eine phasenfreie Monoschicht als Hälfte einer asymmetrischen Membran zu erklären. Im Folgenden soll ein spekulatives Modell aufgezeigt werden.

Betrachtet man die Domänenbildung in Monoschichten thermodynamisch, so wird Energie bei der lateralen Phasentrennung frei. Gleichzeitig muss Energie aufgewendet werden, um die Grenzlinie zwischen den fluiden und rigiden Phasen aufzubauen. Beachtet man nun, dass die transversalen Kräfte zwischen den Phasen fluider Fettsäureketten deutlich größer sind, als die zwischen fluiden und rigiden Phasen, so wird die Grenzlinie gestört, wodurch Energie freigesetzt wird. Da dieser Prozess nur am Rand der Domänen stattfindet, wird die Domänenstruktur von ihrer Grenzfläche aus sukzessive aufgelöst. Dabei werden, aufgrund der großen transversalen Kräfte innerhalb der Doppelschichtmembran, auch die an das Mica gebundenen Kopfgruppen der Lipide verschoben, so dass die Fluidität der Fettsäureketten sich nachhaltig ändert. Dies ist ersichtlich aus den Messungen, bei denen zunächst eine fluoreszenzmarkierte LPS R45-Monoschicht auf das Mica übertragen wurde und nachträglich eine fluide PL-Monoschicht aufgebracht wurde, woraufhin es zu einer Umwandlung der Domänenstruktur innerhalb der LPS R45-Monoschicht kam.

Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, dass eine Doppelschichtmembran nicht als ein physikalisches System zweier separater Monoschichten zu sehen ist, sondern als eigenständiges physikalisches System betrachtet werden muss. Insbesondere hinsichtlich der Stabilität und der Organisation der einzelnen Lipidkomponenten ist eine Doppelschichtmembran nicht als die Addition der thermodynamischen Eigenschaften ihrer beiden Monoschichten zu betrachten.

7.1.2 TDM-haltige Mono- und Doppelschichten

Mykobakterien stellen aufgrund ihrer Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika ein ernsthaftes medizinisches Problem dar, insbesondere hinsichtlich ihrer Bedeutung als Auslöser von Tuberkulose. Um zu einem besseren Verständnis der diesbezüglichen Vorgänge in mykobakteriellen Membranen zu gelangen, wurden in dieser Arbeit Messungen an freistehenden und substratunterstützten Mono- und Doppelschichten, einer Lipidmischung aus 25% PE, 25% PG und 50% TDM (jeweils Gewichtsprozent), durchgeführt (siehe Kapitel 6.2). Diese Lipidmischung wurde verwendet, da alle drei Lipide Bestandteile der Zellhülle von Mykobakterien sind [Tonge,2000] und somit die Möglichkeit bieten, einfache biophysikalische Modellsysteme der mykobakteriellen Zellhülle zu präparieren.

Zunächst wurden Langmuir-Blodgett-Monoschichten der Lipidmischung auf Mica angefertigt und mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet (siehe Kapitel 6.2.1). Da der Äquivalenzdruck der mykobakteriellen Membran nicht bekannt ist, wurden die Messungen bei einem lateralem Druck von 20 mN/m, vergleichbar mit dem der rekonstituierten Gram-negativen bakteriellen Membran durchgeführt. Bei diesem lateralen Druck zeigten die Monoschichten ausgeprägte Domänen mit drei Höhenniveaus. Die Flächeninhalte der einzelnen Höhenniveaus lassen sich jedoch nicht zu den prozentualen Verhältnissen der unterschiedlichen Lipide zuordnen. Dies ist wahrscheinlich auf die außergewöhnlich breite Massenverteilung des TDM zurückzuführen. Vergleicht man die TDM-haltigen Monoschichten mit reinen PE:PG-Monoschichten, so zeigt sich, dass die reinen Phospholipidschichten keine Domänenstruktur aufweisen. Daher lässt sich schließen, dass es sich bei den in der TDM-haltigen Lipidmischung auftretenden Domänen um Domänen mit einem erhöhten TDM-Anteil handelt. Umfangreiche Untersuchungen zu Monoschichten einer Lipidmischung aus TDM und Phosphatidylinositol ergaben eine deutliche Stabilisierung der TDM-haltigen Monoschichten [Almog & Mannella, 1996]. Im Rahmen der zitierten Arbeit wurde ein Modell der Orientierung der Fettsäureketten bei unterschiedlichen lateralen Drücken entwickelt. Demnach knicken die langen Fettsäureketten des TDM selbst bei hohen lateralen Drücken ab. Dies würde im rasterkraftmikroskopischen Höhenbild zwar zu einer erhöhten Domäne führen, jedoch nicht zu einer Höhe, die vergleichbar mit der realen Länge der Fettsäureketten wäre. Zu beachten ist jedoch, dass die rasterkraftmikroskopischen Bilder im attraktiven AC-Modus aufgenommen wurden, so dass nicht unbedingt die realen Höhenunterschiede gemessen wurden. Somit lässt sich feststellen, dass es sich im Fall der Domänen um eine Lipidseparation handelt, wobei es zu einer Entmischung zwischen Phospholipiden und TDM kommt. Die drei Höhenniveaus im rasterkraftmikroskopischen Bild sind damit zu erklären, dass es aufgrund der Länge der Fettsäureketten an den Domänengrenzen, wo sich zwei Domänen mit hohem TDM-Anteil berühren, aufgrund miteinander interagierender Fettsäureketten zu einer weiteren Erhöhung im Höhenbild kommt.

Mittels Aggregatfusion auf Mica wurden substratgestützte Doppelschichtmembranen der PE:PG:TDM-Lipidmischung (siehe vorangegangenes Kapitel), sowie reiner PE:PG-Lipidmischungen hergestellt und mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet (siehe Kapitel

6.2.1.2). Im Fall der TDM-haltigen Lipidmischung bildeten sich sehr kleine Domänen, die deutlich kleiner waren, als die in den entsprechenden Monoschichten derselben Lipidmischung. In den Monoschichten zeigten sich aufgrund des Abknickens der Fettsäureketten des TDM drei Höhenniveaus, in den Doppelschichten jedoch nur zwei. Dies lässt darauf schließen, dass die TDM-angereicherten Domänen sich innerhalb der Doppelschicht transversal gegenüber liegen. Berechnet man die Fläche der Domänen, lassen sich jedoch ebenso wie bei den Monoschichten keine Rückschlüsse auf die Lipidverteilung ziehen. Die Doppelschichten der PE:PG-Mischungen zeigten, wie schon bei den Monoschichten, keine Domänenbildung, so dass man auch im Fall der Doppelschichtmembran von einer Lipidseparation des TDM ausgehen kann.

Weiterführend wurden freistehenden Membranen mit Hilfe der Montal-Mueller-Technik präpariert (siehe Kapitel 6.3). Dabei stellte sich heraus, dass die Membranen sehr niedrige Kapazitäten aufwiesen. Dies hat seinen Grund darin, dass die Fettsäurekettenlänge des TDM sehr lang ist [Adam *et al.*, 1967], wodurch die Doppelschichtmembran dicker ist als die von z.B. humanen oder Gram-negativen Membranen. Zudem stellte sich heraus, dass die TDM-haltigen Membranen eine ungewöhnlich große mechanische Stabilität aufwiesen. Um dies näher zu untersuchen, wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen an PE:PG:TDM-Mono- und Doppelschichten durchgeführt, die mit Hilfe der Montal-Mueller-Technik präpariert wurden. Dabei zeigte sich, dass es nach dem Aufziehen der Monoschichten zu einer raschen Abnahme der Fluoreszenzfarbstoff-freien, also der rigiden, Domänen kam. Nach dem Aufziehen zeigten die rigiden Domänen zudem eine große laterale Dynamik, die einzelnen Domänen bewegten sich sehr schnell, bis zum Schluss ein fluider Endzustand erreicht wurde. Diese deutliche Bewegungsfreiheit der Domänen zeigte sich bei vorangegangenen Messungen an LPS-Monoschichten nicht. Dieses Verhalten der Membran kann einen Hinweis darauf liefern, weshalb die TDM-haltigen Membranen eine derart große mechanische Stabilität aufwiesen. Durch die große laterale Beweglichkeit kann mechanischer Stress innerhalb der Membran sehr einfach ausgeglichen werden, so dass die Membran mechanisch stabiler ist als z.B. LPS-Monoschichten. Die Ursache dieses Verhaltens kann in der Länge und Flexibilität der Fettsäureketten des TDM liegen. Zu beachten ist jedoch, dass die vorhergehenden Messungen an substratgestützten Doppelschichten Domänen zeigten. Diese lassen sich jedoch mit der Fluoreszenzmikroskopie nicht auflösen, da die Auflösungsgrenze aufgrund des grünen Lichtes bei etwa 250 nm (wegen des zwischen dem Objektiv und

der Membran befindlichen Wassers liegt dieser Wert in der Praxis noch höher) liegt. Daher erscheint die Doppelschichtmembran im Fluoreszenzbild als durchgehende fluide Fläche.

TDM-haltige Membranen stellen also mechanisch sehr stabile Membranen dar, die eine hohe innere Dynamik sowie in Rekonstitutionssystemen eine niedrige Kapazität aufweisen und eine Lipidseparation des TDM aufzeigen.

7.1.3 Diskussion der Messungen zur Interaktion humanen β -Defensine mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist das erste Hindernis für antimikrobielle Peptide, um das Bakterium abzutöten. Daher liefert das Verständnis der Interaktion zwischen antimikrobiellen Peptiden und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Wirkungsweise dieser Peptide. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen mit den endogenen humanen β -Defensinen 2 und 3, sowie zweier Derivate des hBD-3 ohne und mit nur einer Disulfidbrücke in Bezug auf die Wechselwirkung mit Membranen durchgeführt. Dabei wurde eine Vielzahl biophysikalischer Methoden angewendet, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden. Nach der Diskussion der biologischen Daten werden diese mit den Daten der Messungen an verschiedenen rekonstituierten Membranen und den verschiedenen Peptiden in Verbindung gebracht. Dieser Diskussionsteil endet mit der genauen Analyse der Auswirkungen des hBD-3 Derivats ohne Disulfidbrücke auf Lipidmonoschichten.

Für biophysikalische Untersuchungen dieser Arbeit werden vergleichsweise große Mengen der antimikrobiellen Peptide benötigt. hBD-3 ist aber aufgrund der komplexen Disulfidbrückenverknüpfung synthetisch sehr schwierig herzustellen, und rekombinantes hBD-3 war für die biophysikalischen Untersuchungen nicht in ausreichendem Maße vorhanden. Da insbesondere auch die Frage der Rolle der Disulfidbrücken für die Wechselwirkung zwischen Peptid und Membran biophysikalisch noch nicht geklärt ist und ein einfach in großen Mengen produzierbares Peptid die therapeutische Nutzbarkeit des hBD-3 deutlich vergrößern würde, wurden zwei, sich hinsichtlich der Zahl der Disulfidbrücken unterscheidende, Derivate des hBD-3 untersucht: das hBD-3-6S

verfügt über keine Disulfidbrücke, das C-hBD-3-1-5-C hingegen über eine Disulfidbrücke.

7.1.3.1 *Biologische Untersuchungen*

Zunächst wurde festgestellt, ob die verwendeten Peptide antimikrobiell wirksam sind (siehe Kapitel 6.1.1). Die Ergebnisse der biologischen Tests ergaben, dass alle Peptide gegen die beiden Tiefraummutantenstämme *E. coli* WBB01 und *S. minnesota* R595 aktiv sind. Das hBD-3 zeigt zudem ein breites antimikrobielles Spektrum [Harder *et al.*,2001] [Sahly *et al.*,2003] [Vylkova *et al.*,2007], welches sowohl Gram-negative wie *E. coli*, *S. minnesota* oder *P. aeruginosa* als auch Gram-positive Bakterien wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* und Pilze wie *Candida albicans* umfasst. Es konnten jedoch auch Resistenzen von *Burkholderia cepacia* und *P. mirabilis* R45 gegen dieses Peptid [Böhling *et al.*,2006] gezeigt werden. Das hBD-3 Derivat hBD-3-6S, bei diesem Peptid wurden die zur Verknüpfung der Disulfidbrücken notwendigen Cysteine gegen Serine ausgetauscht, war hingegen aktiv gegen den *P. mirabilis* R45 Stamm. Das hBD-3 Derivat C-hBD-3-1-5-C, welches die Disulfidbrücke nur zwischen dem Cysteinen 1 und 5 ausbildet, zeigte jedoch nur eine sehr schwache antimikrobielle Wirkung gegen *P. mirabilis* R45. Diese Aussagen sind konträr zu den Aussagen von Wu *et al.* [Wu *et al.*,2003], der publizierte, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des Peptides hat. Seinerzeit wurden jedoch nur Untersuchungen an *E. coli* Stämmen durchgeführt, die auch in den Messungen dieser Arbeit keinen Einfluss der Disulfidbrücken auf die antimikrobielle Aktivität erkennen ließen. In einem weiteren Test wurde gezeigt, dass, die Peptide keine hämolytische Aktivität aufweisen. Diese Beobachtung wurde auch für hBD-3 publiziert [Harder *et al.*,2001].

Aus diesen biologischen Daten ergibt sich nun zunächst die Frage, warum die verwendeten β -Defensine unterschiedliche Aktivitäten gegen die verschiedenen Bakterienstämme zeigen. Durch die Reduzierung der äußeren Membran auf seine Lipidkomponenten war es in der Vergangenheit möglich, strukturell bedingte Variationen in den LPS-Molekülen für die Unterschiede der Sensitivität der Bakterienstämme gegenüber antimikrobiellen Peptiden herauszustellen [Gutsmann *et al.*,2001] [Gutsmann *et al.*,2005] [Gutsmann *et al.*, 2000] [Gutsmann *et al.*, 1999]. Dabei sind die L-Arap4N von besonderem Interesse. Das LPS WBB01 verfügt über keine L-Arap4N, während das

LPS R595 über eine L-Arap4N an den Phosphaten verfügt. Das LPS R45 besitzt eine zusätzliche L-Arap4N am 1. Kdo. Wie die biologischen Versuche gezeigt haben, sind hBD-2 und C-hBD-3-1-5-C nicht aktiv gegen *P. mirabilis* R45. Neben einer möglichen sterischen Hinderung [Hagge *et al.*,2004] [Wiese *et al.*,1998], kommt es durch die L-Arap4N zur effektiven Reduzierung der Nettoladung des LPS-Moleküls und so zu einer verminderten Anlagerung des kationischen Peptides an die Membran. Dabei verfügt das LPS WBB01 über 4 negative Ladungen, das LPS R595 über 3,4 negative Ladungen und das LPS R45 über 3 negative Ladungen.

Durch die Kombination verschiedener biophysikalischer Techniken und Rekonstitutions-systemen ist es möglich, eine Modellvorstellung der Wechselwirkung zwischen den jeweiligen Peptiden und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu entwickeln.

In der folgenden Diskussion werden die Messdaten der unterschiedlichen biophysikalischen Techniken für die jeweiligen Peptide zusammengefasst, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erhalten.

7.1.3.2 Biophysikalische Untersuchung mit hBD-2

Zunächst werden die Daten für das hBD-2 diskutiert. Mit diesem Peptid war es jedoch nicht möglich, alle Techniken und jedes LPS zu nutzen, da die verfügbare Menge an antimikrobiell aktivem hBD-2 stark begrenzt war.

Wie schon dargestellt, ist die Fluidität der Fettsäureketten der Lipide ein wichtiger Parameter für die thermodynamische Beschreibung von Lipiddoppelschichten. Daher wurde zunächst untersucht, inwieweit hBD-2 Einfluss auf den Phasenübergang der Fettsäureketten in LPS-Aggregaten nimmt (siehe Kapitel 6.1.4). Es wurden dahingehend Messungen mit hBD-2 zum Einfluss auf das Phasenverhalten von LPS Aggregaten eines sensitiven (LPS von *E. coli* WBB01) und eines resistenten (LPS von *P. mirabilis* R45) Bakterienstammes durchgeführt. Betrachtet man die Ergebnisse, so zeigt sich keine Veränderung der Phasenübergangstemperatur. Dies kann derart gedeutet werden, dass das Peptid nicht so tief in die Kopfgruppenregion interkaliert, das es in

den hydrophoben Fettsäurekettenbereich der Aggregate vordringt. In diesem Fall würde sich aufgrund der geänderten Platzverhältnisse die Fluidität der Fettsäuren ändern, was auch zu einer Änderung der Phasenübergangstemperatur führen würde. Kommt es hingegen nur zu einer Bindung an die Kopfgruppenregion, so besteht die Möglichkeit, dass die Kopfgruppen der einzelnen LPS-Moleküle nicht soweit auseinander gedrückt werden, dass es zu einer Änderung des Platzbedarfs der Fettsäureketten kommt.

7.1.3.3 Wechselwirkung zwischen hBD-3 Derivaten und LPS-Aggregaten

Im folgenden Abschnitt werden die Daten der biophysikalischen Untersuchungen mit den Derivaten des hBD-3 diskutiert. hBD-3 selbst wurde in der Laborgruppe Biophysik schon in der Vergangenheit untersucht [Böhling,2004] [Böhling *et al.*,2006].

Betrachtet man zunächst die Messungen an LPS-Aggregaten, so zeigt sich, dass sich die Phasenübergangstemperatur von LPS R45 und LPS R595 durch beide Derivate nicht ändert (siehe Kapitel 6.1.4). Betrachtet man jedoch die Messung an LPS WBB01-Aggregaten, so zeigt sich für das C-hBD-3-1-5-C keine, für das hBD-3-6S jedoch eine geringfügige Änderung der Phasenübergangstemperatur. Man erkennt somit, dass das hBD-3-6S soweit in die LPS WBB01 Aggregate interkalieren kann, dass es zu einer Fluidisierung der Fettsäureketten kommt. Dies ist für das hBD-3 und das C-hBD-3-1-5-C, wie schon für das hBD-2 diskutiert, nicht der Fall. Es ist zu beachten, dass sich im Vergleich mit den Daten zur antimikrobiellen Aktivität die Phasenübergangstemperatur ausschließlich im Fall des aktivsten Peptides ändert. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde eine geringe Änderung der Phasenübergangstemperatur durch hBD-3 gezeigt [Böhling,2004]. Diese Daten wurden jedoch mit dem Einsatz eines Fluorophors gemessen, der unter Umständen die Bewegungsfreiheit der Fettsäureketten einschränkt. Daher sind die Daten nicht direkt mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Für die FRET-spektroskopischen Untersuchungen wurden Kontrollmessungen mit rekombinantem hBD-3 durchgeführt. Insgesamt zeigt sich für die FRET-spektroskopischen Messungen folgendes Bild (siehe Kapitel 6.1.3): Da eine Quervernetzung der einzelnen LPS-Kopfgruppen durch Magnesium [Gutsmann *et al.*,2001] diskutiert wird, wurden die Messungen mit zwei Puffersystemen mit und ohne Magnesium durchgeführt. Im Fall des hBD-3 zeigte sich, dass es zu einem Anstieg des FRET-Signales in

beiden Puffersystemen kommt, was als eine Interkalation des Peptides in die LPS-Aggregate interpretiert werden kann [Gutsmann *et al.*,2000]. Im Fall der LPS R45-Aggregate, dem LPS eines resistenten Bakterienstammes, ist diese Interkalation jedoch sehr schwach ausgeprägt. Vergleicht man nun die Ergebnisse des hBD-3-6S, so zeigt sich ein ähnliches Bild, nur ist im Fall der LPS WBB01-Aggregate die Interkalation abhängig von der Salzkonzentration im Puffer. Dieses Verhalten ist im Fall des C-hBD-3-1-5-C noch ausgeprägter. Dieses Peptid baut sich in die LPS WBB01-Aggregate in Anwesenheit von Magnesium im Puffer nur sehr geringfügig ein. Aber auch bei diesem Peptid kommt es zu einer schwachen Interkalation in LPS R45-Aggregate. Fasst man die Interaktion der verschiedenen Derivate mit den LPS-Aggregaten zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: (i) alle drei Derivate bauen sich in LPS WBB01-Aggregate in Abwesenheit von Magnesium im Puffer nahezu gleich gut ein, (ii) das Magnesium hat einen unterschiedlichen Einfluss auf die Interkalation der drei Derivate und (iii) zum ausgeprägtesten Einbau kommt es für hBD-3-6S in LPS R45-Aggregate. Für das antimikrobielle Peptid CAP18 wurden ebenfalls Untersuchungen an Aggregatsystemen vorgenommen [Gutsmann *et al.*,2000]. Dabei zeigten sich Unterschiede für den Einbau zwischen LPS resistenter Bakterienstämme und LPS sensibler Bakterienstämme, welche mittels FRET-spektroskopischen Messungen und Messung der Membranfluidität durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich, dass L-Arap4N am ersten Kdo des LPS R45 der strukturelle Grund für die Ausbildung der Resistenz des Bakterienstammes gegen CAP18 darstellte. Davon ausgehend zeigt sich, dass das hBD-3 und dessen Derivate gut in LPS-Aggregate sensibler Bakterienstämme und schwach in die resistenten Bakterienstämmen einbauen. Das Disulfidbrücken-freie hBD-3-6S interkaliert so weit in die LPS WBB01-Aggregate, dass sich die Fluidität der Fettsäureketten ändert. Dies beruht darauf, dass das LPS WBB01 über keine L-Arap4N verfügt, die die Interkalation sterisch oder elektrostatisch hindern könnten.

Weiter wurden Untersuchungen mit auf Mica absorbierten LPS-Aggregaten durchgeführt (siehe Kapitel 6.1.2.6). Dabei wurden die LPS-Aggregate zusammen mit dem hBD-3-6S präpariert. Aufgrund der Vermischung von Peptid und LPS vor der Präparation der Aggregate kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer Durchmischung der Aggregate mit hBD-3-6S kam. In wässriger Lösung wurden daraufhin Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop durchgeführt. Ähnliche Messungen wurden an Phospholipiddoppelschichten mit eingebauten membranständigen Proteinen, wie dem LPS-

bindenden-Protein (LBP) [Roes *et al.*,2006], und ebenfalls für Melittin-haltige Aggregate [Chen *et al.*,2007] gemacht. Im Fall der Melittin-haltigen Aggregate zeigten sich Änderungen der Domänenbildung in DPPC-Membranen nach der Inkubation mit dem antimikrobiellen Peptid Melittin [Hristova&Dempsey &White,2001]. Dieses Verfahren eignet sich somit für die folgenden Untersuchungen.

Während die Kontrollmessungen an reinen LPS R595- und LPS R45-Membranen glatte Oberflächen zeigten, zeigte sich bei den Proben mit vorinkubiertem Peptid eine mit der Zeit zunehmende Bildung kleiner höher stehender Areale. Mittels einer hohen Kraft auf den Cantilever war es möglich, diese Strukturen von der Oberfläche zu entfernen. Die Diskussion dieses Phänomens stellt ein besondere Herausforderung dar. Es wäre naheliegend, dass es sich bei den höher erscheinenden Bereichen um Domänen handelt. Jedoch würde in diesem Fall das Wegkratzen der Strukturen nicht zu einer vollkommen ebenen Fläche führen. Daher kann angenommen werden, dass sich die zu Beginn der Messung geschlossene, aber interkaliertes hBD-3-6S enthaltende Doppelschichtmembran nach und nach vom Mica ablöste. Mit diesem Modell wäre zu erklären, dass das Wegkratzen der höher erscheinenden Bereiche zu einer ebenen Fläche führte. Ein anderes Bild ergab sich für LPS WBB01-Doppelschichtmembranen. Diese zeigten schon in der Kontrollgruppe ohne interkaliertem hBD-3-6S eine ausgeprägte Oberflächenrauigkeit mit einzelnen Fehlstellen. Eine sehr unebene Oberfläche bildeten die mit Peptid vorinkubierten Proben. Dabei kam es in einem deutlich geringeren Maß zu einer Ablösung der Membran von der Micaoberfläche. Zusammenfassend führte die Vorinkubation mit hBD-3-6S zu einer deutlichen Änderung der Doppelschichtmembranen aller verwendeter LPS. Die Ablösung der Doppelschichtmembran von der Micaoberfläche kann unter Umständen durch eine Reduzierung der hydrophilen Bindung der Lipidkopfgruppen an das Mica und/oder durch eine Ladungsabsättigung der LPS Moleküle durch das Peptid erklärt werden. Mica ist überwiegend hydrophil, wie auch die Lipidkopfgruppen. Betrachtet man die Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren des hBD-3-6S auf der Basis des hBD-3 [Schibli *et al.*,2002], so zeigt sich, dass die hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren unregelmäßig über das Peptid verteilt sind, so dass sich keine ausgeprägte Amphiphilie ergibt. Interkaliert das aufgrund der fehlenden Disulfidbrücken mechanisch sehr flexible hBD-3-6S in die Doppelschichtmembran, so kann es durch die unregelmäßige Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren zu einer weniger hydrophilen Membranoberfläche kommen. Die Micaoberfläche

ist zudem eher negativ geladen, die Oberfläche der LPS-Membran ist ebenfalls negativ geladen. Eine Bindung zwischen Mica und LPS-Schicht ist, neben der hydrophilen Wechselwirkung, nur durch die Ausbildung einer dünnen Wasserschicht möglich. Ändert man nun durch die Interkalation eines stark positiv geladenen Peptides die Ladungsverteilung der Membran, so kann dies in Verbindung mit der Abschwächung der hydrophilen Wechselwirkung zwischen Membranoberfläche und Mica zu einer insgesamt schwächeren Bindung der Doppelschichtmembran an das Mica führen. Dies kann auch die Tatsache erklären, dass die LPS WBB01 Membran stabiler ist als die LPS R595 und LPS R45 Membran. Das LPS WBB01-Molekül trägt vier negative Ladungen, während im Fall des LPS R595 nur 3,4 und im Fall des R45 nur drei negative Ladungen ausgebildet werden. Somit kann das LPS WBB01 die Ladung des hBD3-6S besser kompensieren, so dass die Ladungsverteilung auf der Membranoberfläche sich unter Umständen weniger ändert, als das bei den anderen LPS der Fall war. Bleibt nun der Austausch mit freien Aggregaten im Puffer aus, was während der Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop der Fall ist, löst sich die Membran über die Zeit vom Mica ab. Zusammenfassend kann dies nun bedeuten, dass es unabhängig von der chemischen Struktur des LPS zu einer Änderung der Ladungsverteilung und damit zur Änderung der hydrophilen Oberfläche durch das vorinkubierte Peptid kommt.

7.1.3.4 Wechselwirkungen zwischen hBD-3 Derivaten und rekonstituierten Membranen Gram-negativer Bakterien

Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse für die rekonstituierten asymmetrischen Membranen betrachtet (siehe Kapitel 7.1.5). Diese kommen den Lipiddoppelschichten der nativen äußeren Membranen der untersuchten Gram-negativen Bakterien am nächsten. Diese Membranen wurden mit Hilfe der Montal-Mueller-Technik rekonstituiert. Betrachtet man zunächst mittels der Kapazitätsmessungen die Interaktion zwischen Peptid und der LPS/PL-Membran, so erkennt man für alle untersuchten Membranen eine Änderung der Kapazität nach Zugabe von hBD-3-6S (siehe Kapitel 6.1.5.1) und C-hBD-3-1-5-C (siehe Kapitel 6.1.5.2). Dabei ist der Verlauf in Bezug auf eine Zu- oder Abnahme für das hBD-3-6S nicht eindeutig. Eindeutig ist jedoch der Verlauf der Kapazitätsmessung nach der Zugabe von C-hBD-3-1-5-C, da die Kapazität der Membran in allen Versuchen zunimmt. Es kommt somit zu einer Interaktion des Peptides und der Membran, was in früheren Untersuchungen als eine Anlagerung und Aufkonzentration

bzw. Einbau des Peptides in die Membran interpretiert wurde [Gutsmann *et al.*,2001]. Betrachtet man dieses in Verbindung mit der weiter vorn gemachten Aussage, dass das Peptid sich nur geringfügig in LPS Aggregate einbaut (siehe Kapitel 6.1.3), so kann bei der Betrachtung der Kapazität eher von einer Anlagerung an die Membran ausgegangen werden und weniger von einer Interkalation. Eine Anlagerung antimikrobieller Peptide an Membranen wurde für andere Peptide, wie z.B. Magainin [Dathe *et al.*,2001] oder CAP18 [Gutsmann *et al.*,2001] [Hagge *et al.*,2004], in der Vergangenheit schon mehrfach beschrieben. Die treibende Kraft für diese Anlagerung ist die elektrostatische Wechselwirkung, da diese die einzige langreichweitige Wechselwirkung im betrachteten Modellsystem darstellt. Interessanterweise scheint die Reduzierung der Nettoladung der LPS-Moleküle durch die Substitution mit L-Arap4N und der damit verbundenen Reduzierung des Gouy-Chapman-Potentials keine Auswirkung auf die Anlagerung der Peptide an die Membran zu haben. Dies lässt sich auf die hohe Nettoladung der verschiedenen Peptide zurückführen, da die geringfügigen Reduzierung der Oberflächenladung (-25 %) der Membran nicht den Einfluss hat, da es aufgrund der hohen Ladung des Peptids (+11 e_0) dennoch zu einer starken elektrostatischen Anziehung kommt.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte für das hBD-3 gezeigt werden [Böhling *et al.*,2006], dass bei einer Spannung vergleichbar der natürlichen Spannung über der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ein Stromfluss durch asymmetrische Membranen gemessen werden kann. Analog dazu induziert auch hBD-3-6S (siehe Kapitel 6.1.5.1) ab einer transmembranen Spannung von 20 mV Stromfluktuationen in allen untersuchten LPS/PL-Membranen. Es zeigten sich zwei unterschiedliche Charakteristiken: (i) es kam entweder zu zeitlich begrenzten Stromfluktuationen oder (ii) Stromfluktuation, die direkt in die Zerstörung der Membran übergingen. Wichtig zu beachten ist, dass die Stromfluktuation aus vielen kleinen und kurzen Ereignissen bestehen (Läsionen), so dass nicht von einer definierten Öffnung durch die Membran, wie dies bei einer peptidausgekleideten Pore der Fall wäre. Diese Poren würden zu einem konstanten Strom führen [Gutsmann *et al.*,2003] [Hagge *et al.*,2002]. Die beobachteten transienten Stromfluktuationen sind jedoch mit der Bildung von Läsionen korreliert [Böhling,2004] [Böhling *et al.*,2006] [Gutsmann *et al.*,1999], sodass die Bildung von definierten Poren ausgeschlossen werden kann. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass sich die Lebensdauer der Membran durch die Zugabe der Peptide meist deutlich verkürzt. Diese Ergebnisse sind direkt mit denen für hBD-3 vergleichbar, mit der ent-

schiedenen Ausnahme, dass es mit hBD-3-6S auch möglich ist, in LPS R45/PL-Membranen Läsionen zu induzieren. Generell musste allerdings eine größere Menge hBD-3-6S zur Induktion von Läsionen eingesetzt werden als beim rekombinanten hBD-3 [Böhling *et al.*,2006]. Somit zeigte sich bei den Messungen eine Übereinstimmung zwischen biophysikalischen und biologischen Daten. Zusammenfassend ist im Fall des hBD-3-6S der gleiche Mechanismus wie im Fall des hBD-3 für die Zerstörung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu Grunde zu legen.

Es gibt in der Literatur zwei prinzipiell unterschiedliche Modelle zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen antimikrobiellen Peptiden und biologischen Membranen. Das *barrel-stave* Modell [Shai,1999] beruht auf der Annahme der Ausbildung von peptid-ausgekleideten Poren, während das *carpet-model* [Matsuzaki,1999] eher auf der Annahme einer Störung der Membranintegrität führt. Das hier vorgestellte Modell der Wechselwirkung zwischen humanen β -Defensinen und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien basiert auf dem *carpet-model*.

Zunächst kommt durch die elektrostatische Anziehung zwischen dem humanen β -Defensin und der Membran zu einer Anlagerung bzw. Aufkonzentration des Peptides an der Membranoberfläche. Dies allein führt jedoch noch nicht zu einer Änderung der Membranstabilität, da es nicht zu einer Interkalation des Peptides in die Membran kommt. Ist jedoch eine transmembrane Spannung vorhanden (was im natürlichen System gegeben ist), wird durch das angelagerte Peptid mechanischer Stress auf die Membran ausgeübt. Durch die hohe Ladung des hBD-3-6S wird der mechanische Stress innerhalb der Membran noch verstärkt, da die Ladung eines hBD-3-6S (+11 e_0) nur durch eine Vielzahl an LPS-Molekülen (Ladung -4 e_0 bis -3 e_0) kompensiert werden kann. Es kommt somit zu kurzzeitigen Störungen der Membranintegrität, so dass Ionen die Membran passieren können und durch Addition dieser einzelnen fließenden Ladungen ein stark verrauschter Strom durch die Membran fließt. Dieses Modell der Desintegration der Membran wird zudem gestützt durch die verringerte Lebensdauer der Membran nach Zugabe des Peptides. Es stellt sich jedoch die Frage, warum hBD-3 keine Läsionen in LPS R45/PL-Doppelschichtmembranen induzieren kann, hBD-3-6S jedoch schon. Aufgrund der nicht vorhandenen Disulfidbrücken kann angenommen werden, dass hBD-3-6S flexibler ist [Ovchinnikova *et al.*,2007], so dass die sterische Hinderung der am ersten Kdo befindlichen L-Arap4N nicht den Einfluss auf die Interkalation des hBD-3-6S in die Kopfgruppenregion hat, wie dies bei dem hBD-3 der Fall ist. Dies lässt

sich mit den oben gezeigten Daten der FRET- und Phasenübergangstemperatur-Messungen ebenfalls untermauern.

Ein etwas anderes Bild zeigt sich beim C-hBD-3-1-5-C (siehe Kapitel 6.1.5.2). Nach Zugabe des Peptides lassen sich nur bei transmembranen Spannung oberhalb von 25 mV Stromfluktuationen induzieren. Dieser Wert liegt zwar noch in der Nähe des für das biologische System beschriebenen Werte, ist aber geringfügig höher als der der anderen in dieser Arbeit untersuchten Peptide. Zudem wirkt sich die Zugabe des Peptides nicht so stark auf die Verkürzung der Lebensdauer der rekonstituierten Membranen aus, wie das bei den vorhergehend beschriebenen Peptiden der Fall war. Die Stromfluktuationen haben im Vergleich zu anderen Peptiden eine andere Charakteristik. Es kommt im Vergleich zum hBD-3 und hBD-3-6S zu einem hohen Gesamtstrom, der jedoch ein Rauschen mit sehr hoher Amplitude aufweist, wobei diese Stromfluktuationen über einen langen Zeitraum andauern, ohne die Membran zu zerstören. Es handelt sich jedoch in diesem Fall ebenfalls nicht um peptidausgekleidete Poren, sondern ebenfalls um Läsionen. Porenartige Strukturen würden, trotz des Rauschens, äquidistante Stromniveaus erzeugen. Dies konnte im Fall des C-hBD-3-1-5-C nicht gezeigt werden. Es scheinen sich Läsionen auszubilden, die eine deutlich größere Anzahl an Ionen durch die Membran passieren lassen, so dass es zu kurzzeitigen Strömen hoher Amplitude kommt. Dies kann dahingehend gedeutet werden, dass die einzelnen Läsionen eine größere Ausdehnung haben. Diese Läsionen überlagern sich und bilden so die gemessene Charakteristik. Dabei scheinen die C-hBD-3-1-5-C-induzierten Läsionen die Membran mechanisch weniger zu belasten, was sich darin zeigt, dass die Lebensdauer der Membran vergleichbar stark abnimmt wie bei der Zugabe von hBD-3-6S.

Das Peptid C-hBD-3-1-5-C ist nicht aktiv gegen *P. mirabilis* R45 Bakterien, obwohl es auch möglich ist, in LPS R45/PL-Membranen Läsionen zu induzieren (siehe Kapitel 6.1.5.2). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht genau festgestellt werden, ob die zur Induzierung der Läsionen notwendige Spannung im Fall der LPS R45/PL-Membranen signifikant höher ist als die für LPS WBB01/PL-Membranen. Weiter konnten weder hinsichtlich der Stromamplitude noch der Stromcharakteristik signifikante Unterschiede zwischen in den beiden LPS/PL-Membranen induzierten Läsionen gezeigt werden. Es ist daher nicht möglich, an Hand der biophysikalischen Daten zwischen rekonstituierten Membranen bestehend auf der einen Seite aus PL, und auf der anderen Seite LPS der jeweiligen sensitiven bzw. resistenten Bakterienstämme zu unterscheiden. Dies kann

seinen Grund darin haben, dass das C-hBD-3-1-5-C, wie auch das schon zuvor untersuchte hBD-3 und das hBD-3-6S, in erster Linie die Membranstabilität stört. Festzustellen ist jedoch, dass der Mechanismus der Induktion von Läsionen durch C-hBD-3-1-5-C ein anderer zu sein scheint, als der für hBD-3 und hBD-3-6S. Dieser wird in Zukunft jedoch noch genauer untersucht werden müssen. Ein spekulatives Modell wäre, dass das C-hBD-3-1-5-C aufgrund der einen Disulfidbrücke weniger flexibel ist und daher eine andere Struktur ausbildet, als das natürliche hBD-3 oder das hBD-3-6S. Dadurch wäre es möglich, dass es bei der Einlagerung in die Kopfgruppenregion der Membran zur Ausbildung größerer Einzelläsionen kommt, die über ihre größeren Abmessungen eine größere Anzahl Ionen passieren lassen, wodurch der Gesamtstrom höher ausfällt, als der der durch hBD-3 oder hBD-3-6S induzierten Stromfluktuationen.

Es zeigte sich nun, dass das hBD-3-6S und das C-hBD-3-1-5-C zwar über sehr ähnliche Aminosäuresequenzen mit der gleichen positiven Nettoladung verfügen und dass nach Untersuchungen von Klüver et al. Derivate von hBD-3 immer über eine β -Faltblatt Konformation verfügen [Klüver *et al.*, 2005], die Charakteristik der Läsionen aber eine andere zu sein scheint. Das hBD-3-6S führt zu einem mit dem rekombinanten hBD-3 vergleichbaren Verhalten der Stromfluktuationen. Das C-hBD-3-1-5-C hingegen scheint andere Läsionen zu induzieren. Daraus lässt sich die Aussage ableiten, dass nicht nur die Struktur der Lipide in der Membran, sondern auch kleine strukturelle Änderungen in ansonsten gleichen Peptiden zu deutlich unterschiedlichen Läsionen führen. In Bezug auf das natürliche System ist jedoch zu beachten, dass die native Membran durch die Einlagerung von Proteinen und durch die Stabilisierung durch das Peptidoglykangerüst mechanisch deutlich stabiler ist als in den verwendetem Rekonstitutionsmodell. Einen weiteren wichtigen Schritt zur Abtötung der Bakterien stellt die Permeabilisierung der inneren Membran dar. Aufgrund der höheren transmembrane Spannung von 150 mV und den bezogen auf die Lipide einfacheren Aufbau der Membran ist anzunehmen, dass die humanen β -Defensine die innere Membran einfacher permeabilisieren können als die äußere Membran der Gram negativen Bakterien. Die Zerstörung der inneren Membran kann das Bakterium *per se* abtöten oder durch einen *self-promoted uptake* des Peptides zur Zerstörung weiterer lebenswichtiger Zellstrukturen im Inneren des Bakteriums führen.

Die Lipidmatrix der Zellhülle humaner Zellen besteht aus einem hohen Anteil Phosphatidylcholin (PC). Für hBD-3 wurde gezeigt, dass es nicht möglich ist, in symmetrische

DOPC-Membranen Läsionen zu induzieren. Dies zeigte in Verbindung mit biologischen Untersuchungen, dass hBD-3 humane Zellen nicht abtötet [Böhling *et al.*,2006].

7.1.3.5 Diskussion der Charakteristik hBD-3-induzierter Läsionen

In der vorangegangenen Diskussion wurde schon mehrmals der Unterschied zwischen peptidausgekleideten porenartigen Läsionen und kleinen transienten Läsionen erwähnt. Läsionen stellen kleine und kurzlebige Löcher in der Membran dar [Gutsmann *et al.*,2005]. In diesem Abschnitt sollen die Daten zur genauen Untersuchung von hBD-3-induzierten Läsionen in Membranen diskutiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Stromflüsse durch LPS WBB01/PL-Membranen mit Hilfe der Fouriertransformation und der Autokorrelationsanalyse untersucht (siehe Kapitel 6.1.5.3). Als Beispiel eines Peptides, welches definierte Läsionen bildet, wurde das vielfach biophysikalisch untersuchte Polymyxin B (PMB) verwendet [David *et al.*,1992] [Gutsmann *et al.*,2005] [Hartmann *et al.*,1978] [Sixl &Galla,1981] [Vaara *et al.*,1985] [Wiese *et al.*,1998].

Mit Hilfe der Rauschanalyse mittels Fouriertransformation konnte gezeigt werden, dass im Fall einer PMB-induzierten stabilen Läsion der Stromfluss durch diese über die Zeit geometrisch konstante Struktur kein anderes Rauschverhalten zeigt als das systemische Grundrauschen vor dem Auftreten des Stromflusses. Dies bedeutet, dass durch diese Struktur ein stetiger, nahezu ungestörter Ionenfluss fließt, was wiederum auf eine stabile porenartige Struktur konstanter Größe schließen lässt [Wiese *et al.*,1998]. Im Übergangsbereich nimmt das Rauschen zu tiefen Frequenzen zu, was sich dadurch erklären lässt, dass sich zu diesem Zeitpunkt die porenartige Struktur öffnet und über einen langen Zeitraum geöffnet bleibt. Dies führt im Rauschverhalten im betrachteten Zeitraum zu einem Anstieg der Amplitude bei sehr tiefen Frequenzen. Betrachtet man im Vergleich das Rauschverhalten der hBD-3-induzierter Stromfluktuationen, so zeigt sich, dass die Amplitude der niedrigeren Frequenzen mit steigender Anzahl der Läsionen zunimmt. Dies bedeutet, dass es zu keinem stetigen Ionenfluss kommt. Es lässt sich erkennen, dass das Amplitudenmaximum bei Frequenzen zwischen 10 und 100 Hz liegt, wodurch sich die Dauer der Öffnung der Läsionen im Zeitbereich von 10 bis 100 ms abschätzen lässt.

Damit ergibt sich nun die Frage nach der statistischen Abhängigkeit der einzelnen Läsionen voneinander. Dies kann mit Hilfe der Autokorrelationsanalyse durchgeführt

werden. Dabei zeigte sich, dass die durch PMB gebildete Pore keine höhere statistische Abhängigkeit zeigte als das Grundrauschen vor Beginn des Stromflusses. Dies ist logisch begründbar, da eine einzelne Pore keine statistische Abhängigkeit zu sich selbst aufweisen kann. Nur im Übergangsbereich steigt der Wert der Autokorrelation an. Dies ist jedoch eindeutig der Entstehung der Pore zuzuschreiben, wodurch es zu Störungen des Ionenstroms kommt und folglich einen höheren Wert der Autokorrelationsfunktion bedingt. Legt man die Annahme einer statischen Pore zu Grunde, so ergibt sich genau das gemessene Verhalten der Autokorrelationsfunktion. Ein anderes Bild zeigte sich bei den hBD-3-induzierten Läsionen. Während das Grundrauschen eine vergleichsweise geringe statistische Abhängigkeit zeigte, sind die Werte der Autokorrelation für die unterschiedlichen Zeitpunkte der Stromfluktuationen konstant hoch. Dies deutet auf eine statistische Abhängigkeit der Einzelereignisse, also der einzelnen Läsionen hin. Diese Abhängigkeit lässt sich durch den mechanischen Stress innerhalb der Membran bei der Interaktion mit dem hBD-3 modellhaft wie folgt erklären: Schließen sich Läsionen an einer Stelle, so reißt die unter mechanischem Stress stehende Membran an anderer Stelle wieder auf. Dadurch kommt es zu einer kontinuierlichen Änderung der Ionenflussrate, wodurch die Stromfluktuationen entstehen.

Somit lässt sich nun Folgendes zusammenfassen: Die durch hBD-3 induzierten Stromfluktuationen haben ihren Ursprung in der Überlagerung vieler einzelner Läsionen, deren Lebensdauer zwischen 10 und 100 ms liegt. Durch den Stress in der Membran öffnen und schließen sich permanent Läsionen.

7.1.4 Wechselwirkung zwischen hBD-3-6S und TDM-haltigen Doppelschichten

Die äußere Zellhülle von Mykobakterien unterscheidet sich in Bezug auf ihre chemische Zusammensetzung sehr stark von der der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Die Struktur der mykobakteriellen Membran ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Phospholipide PE und PG sowie das Trehalose Dimykolat (TDM) Bestandteile der Zellhülle darstellen. Die im Folgenden diskutierten Untersuchungen basieren auf einem einfachen Modell der mykobakteriellen Membran bestehend aus PE, PG und TDM.

Wie oben schon beschrieben, stellt die mechanische Stabilität der Membranen einen wichtigen Aspekt im Bezug auf die Induktion von Läsionen dar. Lipidmembranen, die TDM enthalten, sind ausgesprochen stabil. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit es möglich ist, mit Hilfe des in Bezug auf die Induktion von Läsionen sehr aktiven hBD-3-6S Läsionen auch in TDM-haltigen Membranen zu induzieren (siehe Kapitel 6.3.3). Dazu wurden Messungen an mit Hilfe der Montal-Mueller-Technik rekonstituierten PE:PG:TDM-Membranen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es möglich ist, in PE:PG-Membranen ohne TDM Läsionen durch das Peptid zu induzieren. Dies gelang bei TDM haltigen Membranen nicht. Setzt man diese Ergebnisse mit denen der LPS/PL-Membranen in Bezug, so zeigt sich, dass durch die Stabilisierung der Membran durch das TDM das Peptid nicht den mechanischen Stress in der Membran aufbauen kann, der zur Ausbildung von Läsionen und letztendlich zur Zerstörung der Membran führt. Damit unterstützen diese Messungen das Modell, welches davon ausgeht, dass in erster Linie mechanischer Stress die Ursache für die Zerstörung der Membranen darstellt. Es zeigt sich jedoch auch, dass biophysikalische Untersuchungen genutzt werden können, um die besondere Resistenz von Mykobakterien gegenüber antimikrobiellen Peptiden aufzuklären. Zu beachten ist allerdings, dass es sich bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit um erste biophysikalische Versuche an mit Hilfe der Montal-Mueller-Technik präparierten TDM-haltigen Membranen handelt.

7.1.5 Einfluss von hBD-3-6S auf substratgestützte Mono- und Doppelschichten

Am Beginn der Diskussion (siehe Abschnitt 8.1.1) wurden die physikalischen Eigenschaften von LPS R45-Monoschichten untersucht. Im mittleren Teil der Diskussion (siehe Kapitel 8.1.3.4) wurde der Einfluss verschiedener humaner Defensine auf Rekonstitutionssysteme behandelt. Im folgenden letzten Teil der Diskussion sollen nun die Vorgänge der Interkalation des hBD-3-6S (welches aktiv gegen *P. mirabilis* R45 ist) in LPS R45-Monoschichten und die Domänenbildung in LPS R45/PL-Doppelschichten nach Zugabe des Peptides behandelt werden. Dazu wurden die vorn vorgestellten rasterkraftmikroskopischen Techniken (siehe Abschnitt 8.1.1) genutzt, um Untersuchungen an Membranen nach Zugabe des humanen β -Defensins durchzuführen.

Durch die Filmflächenzunahme einer LPS R45-Monoschicht auf der Grenzfläche Puffer/Luft einer Filmwaage nach Zugabe des hBD-3-6S konnte gezeigt werden, dass sich das Peptid konzentrationsabhängig in die Monoschicht einbaut. Dies konnte auch schon für verschiedene andere antimikrobielle Peptide wie PMB, CAP 18 und hBD-3 mittels Einbaumessungen an Filmwaagen oder Kalziumverdrängung über die Messung der ^{42}Ca -Aktivität gezeigt werden [Böhling *et al.*,2006] [Gutsmann *et al.*,2000] [Hagge *et al.*,2006] [Roes&Seydel &Gutsmann,2005]. Für die Untersuchungen innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Langmuir-Blodgett-Technik hergestellte substratgestützte Mono- und Doppelschichten verwendet. Nach dem Übertrag auf Mica wurden Höhenbilder mit dem Rasterkraftmikroskop aufgenommen (siehe Kapitel 6.1.2.5). Dabei zeigte sich, dass sich die Domänenstruktur innerhalb der Monoschicht stark veränderte, sofern hBD-3-6S in diese Monoschicht interkalierte. Derartige Änderungen konnten ebenfalls für PMB und hBD-3 gezeigt werden, wobei sich für das hBD-3 eine Abhängigkeit der Änderung der Domänen von der Aktivität des Peptides gegen den Bakterienstamm des verwendeten LPS zeigte [Böhling *et al.*,2006] [Roes *et al.*,2005]. Bei einer Konzentration entsprechend derer, die in Versuchen mit der Montal-Mueller-Technik verwendet wurde, konnten keine Domänen innerhalb der LPS-Monoschicht festgestellt werden. Es sind jedoch kleine Bereiche erkennbar, die besonders hoch aus den Monoschichten herausragen. Aufgrund der Höhe von mehr als 3 nm (der Höhenunterschied zwischen fluiden und rigiden Domänen beträgt etwa 2 nm) kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Cluster, die einen hohen Anteil hBD-3-6S enthalten oder vollständig aus dem Peptid bestehen, handelt und nicht um Lipiddomänen. Für das dem hBD-3-6S verwandte hBD-2 wurde gezeigt, dass die Peptidmoleküle oligomerisieren [Hoover *et al.*,2000]. Nimmt man dies auch für das hBD-3-6S an, so können die beobachteten Cluster in den Höhenbildern mit einer Oligomerisierung der hBD-3-6S-Moleküle erklärt werden. Zudem wird aus den Höhenbildern deutlich, dass sich das hBD-3-6S eher an den Domänenrändern einbaut. In einem nächsten Schritt wurden Kraftkarten aufgenommen, ursprünglich um festzustellen, in welchem Phasenzustand sich die Fettsäureketten nach der Zugabe des Peptides befanden (siehe Kapitel 6.1.2.5). Es zeigte sich jedoch, dass die hydrophobe Wechselwirkung umso stärker wurde, je mehr Peptid eingesetzt wurde. Es konnte daher nicht festgestellt werden, ob die Fettsäureketten der Monoschicht fluide oder rigide sind, da die Werte für die Adhäsionsarbeit und die Abrisskraft weitaus größer sind als die für fluide Domänen. Der starke Anstieg deutet darauf-

hin, dass nicht nur die Wechselwirkung zwischen dem Cantilever und den Fettsäureketten gemessen wurde, sondern dass auch ein Anteil der hydrophoben Aminosäuren des in die Monoschicht interkalierten Peptides für die erhöhte Adhäsion zwischen Cantilever und der Probe verantwortlich ist. Dies würde jedoch bedingen, dass das Peptid sehr weit in die LPS Monoschicht vordringt, was durch die Flächenzunahme der Monoschicht bei konstantem Druck ebenfalls gezeigt wurde. Ein solches Verhalten konnte jedoch nur innerhalb des Monoschichtsystems gezeigt werden, da hier die stabilisierende Wirkung der zweiten Monoschicht einer Membran fehlt. Modellhaft ist dieses Verhalten derart zu erklären, dass durch das Peptid ein mechanischer Stress in der Membran erzeugt wird, der im Monoschichtsystem durch die Zunahme der Filmfläche abgebaut wird, im Doppelschichtsystem wird dieser Stress durch die Bildung von Läsionen abgebaut.

Im nächsten Schritt wurden LPS R45/PL-Membranen präpariert, wobei die PL-Schicht an das Mica gebunden wurde, während die LPS R45-Schicht gegen den Puffer ausgerichtet war. Dem Puffer wurde nun hBD-3-6S zugegeben und dann fortlaufend Höhenbilder mit dem Rasterkraftmikroskop aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass es durch die Zugabe des hBD-3-6S zu einer Vielzahl kleiner Erhöhungen auf der Membran kam. Durch die Vermessung dieser Erhöhungen stellte sich wie bei den Monoschichten heraus, dass es sich aufgrund der ermittelten Höhe nicht um LPS Domänen handeln konnte, sondern um Cluster, in denen hBD-3-6S angereichert ist. Im Verlauf der Messung kam es nicht zur vollständigen Zerstörung der Membranoberfläche, was zur Ausbildung von großflächigen Vertiefungen geführt hätte, sondern es kam zu einer Zunahme der kleinflächigen Erhöhungen. Es kann somit angenommen werden, dass sich über die Einwirkzeit des Peptides zusehends mehr Domänen erhöhter Peptidkonzentration auf der Membranoberfläche bildeten. Dieses Ergebnis untermauert somit die Ergebnisse, die zur Untersuchung des Phasenüberganges gemacht wurden, sowie die Kapazitätsmessungen an den freistehenden Membranen: das Peptid dringt nicht in den hydrophoben Bereich der Membran ein, sofern keine transmembrane Spannung anliegt. Mit diesen Messungen wird die modellhafte Vorstellung unterstützt, dass es sich bei der Interaktion zwischen Peptid und LPS-Aggregaten, wie sie auch FRET-spektroskopische Untersuchungen gezeigt haben, nicht um eine derart tiefe Interkalation handelt, dass der hydrophobe Bereich der Membran betroffen ist. Es zeigte sich jedoch auch, dass es nicht zur Ausbildung von hBD-3-6S-induzierten Lipiddomänen kommt. Dieses Verhalten

wurde in der Literatur ebenfalls für zwitterionische Phospholipidmembranen und alpha-helikale Peptide gezeigt [Polozov *et al.*, 1997]. Für diese Untersuchungen wurden fluoreszenzmikroskopische Techniken verwendet. Der Vergleich mit diesen Messungen stellt sehr gut dar, dass nicht nur die tiefe, die Phasenübergangstemperatur ändernde Interkalation der Peptide zu einer Störung der Membranintegrität führt, sondern die generelle Interaktion zwischen Peptid und Membran ausreicht, die Membran nachhaltig zu stören. Dass diese Störung der Membranintegrität jedoch nicht hinreichend ist, zeigen die Messungen an den Modellsystemen mit LPS R45. Auch zeigte sich, dass durch die starke Wechselwirkung der beiden Monoschichten die Fettsäureketten des LPS ihren fluiden Zustand auch nach der Interkalation des Peptides beibehalten.

7.2 Zusammenfassende Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit schlagen einen weiten Bogen über vielfältige biophysikalische Untersuchungen an verschiedenen rekonstituierten biologischen Membranen und deren Wechselwirkung mit antimikrobiellen Peptiden. Dabei standen einerseits die äußere Membran Gram-negativer Bakterien und andererseits humane β -Defensine im Mittelpunkt dieser Arbeit. Es wurde herausgestellt, dass sowohl die Betrachtung der Membran, als auch die genaue biophysikalische Untersuchung der Interaktion zwischen einem Peptid und der Membran wichtige Hinweise über die Struktur der Membran und die strukturellen Änderungen der Membran bei der Interaktion mit Defensinen liefert.

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die äußere Membran Gram-negativer Bakterien nicht auf zwei separate Monoschichten aus LPS und Phospholipiden reduziert werden kann, sondern als ganzheitliches physikalisches System gesehen werden muss. Dies zeigen die außergewöhnlich starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den beiden Monoschichten, die die gesamte Membran thermodynamisch beeinflussen. Diese transversalen Wechselwirkungen sind dabei die entscheidende Kraft, die zum Ausbleiben der Domänenbildung in rekonstituierten Doppelschichtsystemen, die modellhaft die Lipidmatrix der äußere Membran Gram-negativer nachbilden, führt.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen der Membran Gram-negativer Bakterien und humanen β -Defensinen biophysikalisch sowohl in Bezug

auf die Änderung der Membran durch die Interaktion, als auch in Bezug auf Variationen seitens des Peptides betrachtet werden muss. Obwohl mit den verwendeten Methoden nicht geklärt werden konnte, warum *P. mirabilis* R45 resistent gegen C-hBD-3-1-5-C ist, sind viele Hinweise für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung zwischen biologischen Membranen und humanen β -Defensinen herausgefunden worden. Dabei standen die thermodynamischen Eigenschaften der Membran, wie sie ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert worden sind, im Mittelpunkt. Es zeigte sich jedoch auch, dass humane β -Defensine in den biophysikalischen Untersuchungen ein deutlich anderes Verhalten aufwiesen als für andere antimikrobielle Peptide, wie PMB oder CAP18, beschrieben wurde. Da es sich hierbei eher um eine andere Klasse der Wechselwirkung handelt, soll im Folgenden, ausgehend von den in vorherigen Kapitel getroffenen Aussagen, ein allgemeines Modell der Wechselwirkung zwischen humanen β -Defensinen und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien formuliert werden.

Es kann angenommen werden, dass die in den Untersuchungen verwendeten humanen β -Defensine unabhängig von der Anzahl der Disulfidbrücken in Lösung β -Faltblatt-Strukturen ausbilden. Aufgrund der eher homogenen Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren formen sie wahrscheinlich in Lösung Oligomere [Hoover *et al.*, 2000]. Die Oberfläche der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien hat aufgrund der negativen Ladungen der einzelnen LPS-Moleküle ein negatives Oberflächenpotential. Die humanen β -Defensine sind hoch positiv geladene Moleküle. In dem betrachteten System stellt die elektrostatische Wechselwirkung die einzige langreichweitige Wechselwirkung dar, wodurch es zu einer Anziehung der Defensine an die Membran kommt. Die Peptidcluster können jedoch nicht ohne transmembrane Spannung in die Membran interkalieren, sondern würden sich nur an der Membran anlagern. Die Transmembranspannung beträgt bei der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien etwa 26 mV, so dass die Peptide in die Kopfgruppenregion der äußeren Monoschicht, der LPS Schicht, der Membran interkalieren. An diesem Punkt der Interaktion hängt es von der Flexibilität des Defensin-Moleküls ab, wie weit es in die Membran interkaliert, d.h. die Flexibilität der Defensin-Moleküle ist eine wichtige Determinante der Resistenz des Bakterienstamms. Die hohe positive Gesamtladung eines einzelnen Defensin-Moleküls führt dazu, dass die Ladung eines Defensin-Moleküls nicht durch ein einziges LPS Molekül abgesättigt werden kann. Es kommt durch diese nicht abgesättigten Ladungen und der damit verbundenen elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Defensin-Mo-

lekülen und LPS-Molekülen zu mechanischem Stress innerhalb der Membran. Je nachdem welche Anzahl an LPS-Molekülen mit einem Defensin interagieren und wie gut die Membran aufgrund ihrer chemisch-strukturellen Zusammensetzung den dabei entstehenden Stress absorbieren kann, führt dies entweder zu der Bildung von Läsionen oder auch nicht. Somit ist der in der Membran entstehende Stress eine weitere Determinante für die Resistenz einzelner Bakterienstämme. Kann der induzierte mechanische Stress durch die Membran nicht abgefangen werden, kommt es zur Ausbildung stressbedingter kleiner Löcher in der Membran. Diese schließen und öffnen sich fortlaufend und perforieren so die Membran. Dies kann dem Peptid die Möglichkeit geben, durch die Membran zu permittieren und Strukturen im Inneren des Bakteriums oder funktionale Abläufe zu stören oder zu zerstören. Diese weitergehenden Vorgänge führen letztendlich zum Absterben des Bakteriums.

Betrachtet man unter diesen Gesichtspunkten die Untersuchungen an TDM-haltigen Membranen, so zeigen sich biophysikalische Anhaltspunkte zur Erklärung der Resistenz von Mykobakterien gegenüber antimikrobiellen Peptiden. Die TDM-haltigen Membranen zeigten in den Untersuchungen dieser Arbeit eine außergewöhnlich hohe mechanische Stabilität. Zudem war es nicht möglich, mit einem Derivat eines humanen β -Defensins Läsionen in diesen Membranen zu induzieren. Das Vermögen oder Unvermögen eines Peptides, Läsionen unter biologisch vergleichbaren Bedingungen zu induzieren, stellte in der Vergangenheit eine biophysikalische Determinante für Aktivität bzw. Resistenz eines Bakterienstammes gegenüber einem antimikrobiellen Peptid dar [Gutsmann *et al.*, 2005]. Dies konnte im Hinblick auf Mykobakterien im Rahmen dieser Arbeit abermals aufgezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Derivate des humanen β -Defensins 3 untersucht, die im Fall des hBD-3-6S keine und im Fall des C-hBD-3-1-5-C eine Disulfidbrücke ausbilden. Dabei zeigte sich einerseits, dass die biologische Aktivität nicht für alle Stämme dem des rekombinanten hBD3 entspricht, aber andererseits auch, dass die prinzipielle Wechselwirkung mit rekonstituierten Membranen Gram-negativer Bakterien dem rekombinanten hBD-3 sehr ähnlich ist. Somit kann gerade das hBD-3-6S als ein Modellpeptid für humane β -Defensine bei biophysikalischen Untersuchungen fungieren.

Die hier vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass substratgestützte und freistehende planare Membranen einen wichtigen biophysikalischen Beitrag zum Ver-

ständnis der Interaktion zwischen antimikrobiellen Peptiden und biologischen Membranen, sowohl von Membranen Gram-negativer Bakterien als auch von Mykobakterien, liefern können. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl kleine Variationen der Peptide als auch Variationen der Membranzusammensetzung eine funktionelle Änderung der Interaktion hervorrufen, die sich letztendlich in den biologisch messbaren Parametern wie der antimikrobiellen Aktivität widerspiegeln. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine biologische Doppelschichtmembran in Bezug auf die physikalischen Eigenschaften nicht als die Addition der Eigenschaften ihrer einzelnen Monoschichtmembranen interpretiert werden darf, sondern als ganzheitliches System betrachtet werden muss.

8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Wechselwirkung zwischen antimikrobiellen Peptiden und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien sowohl kleine Variationen der chemischen Struktur der Peptide als auch der Membranzusammensetzung eine deutliche biophysikalische Änderung in der Charakteristik der Wechselwirkung bedingen. Dies bedeutet, dass es sinnvoll ist, auch in Zukunft die molekularen Eigenschaften dieses Vielteilchensystems näher zu untersuchen. Wagt man einen Ausblick für die Untersuchungen hinsichtlich der rekonstituierten Lipidmatrix der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien, so zeigen sich eine Reihe weiterführender Versuche: Für eine technische Verbesserung ist es sicherlich notwendig, die großen Fehler der Kraftmessungen an Lipidmonoschichten zu verringern. Hier können kleinere Spitzenradien der Cantilever aufgrund ihrer kleineren Interaktionsfläche eine deutliche Verbesserung durch eine Verringerung der Anzahl der an der Interaktion beteiligten Moleküle bringen. Zudem wäre es sinnvoll, die kraftmikroskopischen Untersuchungen an anderen Lipidsystemen wie TDM-haltigen Membranen, LPS mit längeren Zuckerstrukturen, aber auch an sogenannten Lipid-Raft-Mischungen durchzuführen, um zu untersuchen, ob es sich bei den in dieser Arbeit gemachten Aussagen hinsichtlich der unterschiedlichen transversalen Wechselwirkungen verschiedener Fettsäurekettenzustände um ein generelles Funktionsmerkmal biologischer Membranen oder um eine spezielle Eigenschaft der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien handelt. Die Kombination von rasterkraftmikroskopischen Techniken und optischer Mikroskopie kann weitere Erkenntnisse über die Fluidität und Bewegungsfreiheit der einzelnen Domänen in LPS

Monoschichten selbst oder als Teil einer Doppelschichtmembran liefern. Mit Hilfe eines Lasers können einzelne Areale ausgebleicht werden, um danach mittels Fluoreszenzmikroskopie das Eindringen noch aktiver Fluorophore in die vormals ausgebleichten Regionen zu untersuchen (FRAP). Mit diesem System ist es möglich, die Beweglichkeit innerhalb der unterschiedlichen Domänen zu untersuchen. Diese Technik könnte sowohl an den freistehenden Membranen als auch bei den substratgestützten Membranen angewendet werden. Weitere Erkenntnisse ließen sich mittels Ellipsometrie über die Domäneneigenschaften herausfinden. Mittels abbildender Ellipsometrie wäre es möglich zu untersuchen, ob es zwischen fluiden und rigiden Fettsäureketten einen realen Höhenunterschied gibt. Dieser kann mittels Rasterkraftmikroskopie nicht unbedingt untersucht werden, da die Spitze des Cantilevers immer mit der Probe interagiert. Dies ist bei der durch die Verwendung von polarisiertem Licht bei der Ellipsometrie nicht der Fall.

TDM-haltige Membranen sind bis zum heutigen Zeitpunkt sehr wenig biophysikalisch untersucht worden. Um weitere biophysikalische Grundlagenuntersuchungen zu machen, wäre die Ausarbeitung eines besseren Rekonstitutionsmodells für die Zellhülle von Mykobakterien sinnvoll, was jedoch eine vorhergehende Charakterisierung der mykobakteriellen Membran bedingt.

Ein weites Feld ergibt sich für weitere Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen biologischen Membranen und humanen β -Defensinen. Notwendig sind Untersuchungen zur Aktivität des hBD-2, die im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen innerhalb verschiedener Chargen sehr stark variierte. Diese Unterschiede müssen strukturelle Ursachen haben, die bisher mit massenspektrometrischen Untersuchungen nicht aufgelöst werden konnten. Möglicherweise können NMR-Untersuchungen die strukturellen Unterschiede aufzeigen. Auch gibt es eine Reihe weiterer biophysikalischer Untersuchungen an hBD-3 Derivaten, die zusätzliche Erkenntnisse zur Funktionsweise dieser Peptide liefern können. Zunächst ist die Untersuchung der C-hBD-3-1-5-C-vermittelten Läsionscharakteristik mittels Rauschanalyse und Autokorrelationsanalyse ein wichtiger Schritt, um die Unterschiede der Läsionscharakteristik zu denen, die durch hBD-3 und hBD-3-6S induziert werden, herauszufinden. Für die beiden Derivate hBD-3-6S und C-hBD-3-1-5-C müssen für umfassende biophysikalische Untersuchungen noch Messungen mit einer weiteren LPS/PL Membranen, die sich in den chemischen Eigenschaften des LPS unterscheiden, und symmetrischen Phospholipidmembranen als Rekonstitutionssystem

humaner Zellen durchgeführt werden. Weitere interessante Grundaussagen zur Anlagerung antimikrobieller Peptide an Membranen kann mittels substratgestützter Membranen und mit Hilfe von Mikroquarzwaagen [Chen *et al.*,2007], wie z.B. durch die Nutzung akustischer Oberflächenwellen (SAW, surface acoustic wave), durchgeführt werden. Dabei wird die Massenzunahme durch das angelagerte Peptid bzw. die Peptid-Induzierte Änderung der Viskosität gemessen.

Mit Hilfe von Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie wäre es möglich, die Dynamik der Interaktion zwischen biologischen Membranen und antimikrobiellen Peptiden zu untersuchen. Diese Untersuchungen könnten weiteren Aufschluss über die Unterschiede der verschiedenen Klassen antimikrobieller Peptide hinsichtlich der Interaktion mit Membranen liefern. Dabei wäre eine Untersuchung speziell des ersten Schrittes einer Interaktion, der Bindung des Peptides an die Oberfläche und die Stärke dieser Bindung, von großem Interesse.

Letztendliche Ziele der biophysikalischen Untersuchungen zur Interaktion zwischen antimikrobiellen Peptiden und biologischen Membranen müssen die Erklärung von Resistenzen einzelner Bakterienstämme gegenüber antimikrobiellen Peptiden und der zukünftige therapeutische Einsatz neuer, in Bezug auf ihre biochemischen Eigenschaften besserer Antibiotika sein.

9 Literaturverzeichnis

Adam A., Senn M., Vilkas E. & Lederer E., Spectrometrie de masse de glycolipids. *Eur. J. Biochem* (1967) **2**: Seite 460-468.

Alexander S., Hellemans L., Marti O., Schneir J., Elings V. & Hansma P.K., An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J.Appl.Phys.* (1989) **65**: Seite 164-167.

Almog R. & Mannella C.A., Molecular packing of cardiolin and its interaction with phosphatidylinositol in mixed monolayers.. *Biophys J* (1996) **71**: Seite 3311-3319.

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

Bakker E.P. & Mangerich W.E., Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport.. *J Bacteriol* (1981) **147**: Seite 820-826.

Benga G. & Benga G., Structure and properties of cell membranes, vol. i: a survey of molecular aspects of membrane structure and function., 1985.

Bensch K.W., Raida M., Mägert H.J., Schulz-Knappe P. & Forssmann W.G., Hbd-1: a novel beta-defensin from human plasma.. *FEBS Lett* (1995) **368**: Seite 331-335.

Benz R. & Bauer K., Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. review on bacterial porins. *European Journal of Biochemistry* (1988) **176**: Seite 1-19.

Berger C.E.H., van der Werf K.O., Kooyman R.P.H., de Grooth B.G. & Greve J., Functional group imaging by adhesion afm applied to lipid monolayers. *Langmuir* (1995) **11** : Seite 4188-4192.

Binnig G., Quate C. & Gerber C., Atomic force microscope.. *PHYSICAL REVIEW LETTERS* (1986) **56**: Seite 930-933.

Binnig G., Rohrer H. & Gerber C., Surface studies by scanning tunneling microscopy. *PHYSICAL REVIEW LETTERS* (1982) **49**: Seite 57-61.

Blodgett K.B. & Langmuir I., Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys.Rev.* (1937) **51**: Seite 964-982.

Blume A., A comparative study of the phase transition of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* (1979) **557**: Seite 32-44.

Böhling A., Charakterisierung und Visualisierung der Wechselwirkung von humanem β -Defensin 3 mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 2004.

Böhling A., Hagge S.O., Roes S., Podschun R., Sahly H., Harder J., Schröder J., Grötzinger J., Seydel U. & Gutschmann T., Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3.. *Biochemistry* (2006) **45**: Seite 5663-5670.

Brandenburg K. & Wiese A., Endotoxins: relationships between structure, function, and activity.. *Curr Top Med Chem* (2004) **4**: Seite 1127-1146.

Bushan B., Self-assembled monolayers for controlling adhesion, friction and wear.. In *Nanotechnology*. B.Bushan (Ed.). 2004. .

Chen L., Cheng C., Lin J. & Chen W., Exploring the effect of cholesterol in lipid bilayer membrane on the melittin penetration mechanism.. *Anal Biochem* (2007) **367**: Seite 49-55.

Chiantia S., Kahya N. & Schwille P., Raft domain reorganization driven by short- and long-chain ceramide: a combined afm and fcs study.. *Langmuir* (2007) **23**: Seite 7659-7665.

Darnell J., Lodish H. & Baltimore D., Molecular cell biology., 1986.

Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M. & Bienert M., Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters* (2001) **501**: Seite 146-150.

Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M. & Bienert M., Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle sub-

tended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters* (1997) **403**: Seite 208-212.

David S.A., Balasubramanian K.A., Mathan V.I. & Balaram P., Analysis of the binding of polymyxin b to endotoxic lipid a and core glycolipid using a fluorescent displacement probe. *Biochim.Biophys.Acta Lipids Lipid Metab.* (1992) **1165**: Seite 147-152.

El Mashak E.M. & Tocanne J.F., Polymyxin b-phosphatidylglycerol interactions. a monolayer (π , Δv) study.. *Biochim Biophys Acta* (1980) **596**: Seite 165-179.

Fischer K.A., Stoeckenius W., Hoppe W., Lohmann W., Markl H. & Ziegler H. Membran-modelle. In *Biophysik.* . 1982. Seite 426-438.

Galanos C., Lüderitz O. & Westphal O., A new method for the extraction of r lipopolysaccharides.. *Eur J Biochem* (1969) **9**: Seite 245-249.

Ganz T. & Lehrer R.I., Defensins.. *Pharmacol Ther* (1995) **66**: Seite 191-205.

Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F. & Lehrer R.I., Defensins. natural peptide antibiotics of human neutrophils.. *J Clin Invest* (1985) **76**: Seite 1427-1435.

García J.R., Jaumann F., Schulz S., Krause A., Rodríguez-Jiménez J., Forssmann U., Adermann K., Klüver E., Vogelmeier C., Becker D., Hedrich R., Forssmann W.G. & Bals R., Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. its interaction with plasma membranes of xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction.. *Cell Tissue Res* (2001) **306**: Seite 257-264.

Glauser M.P., Zanetti G., Baumgartner J.D. & Cohen J., Septic shock: pathogenesis. *Lancet* (1991) **338**: Seite 732-736.

Grandbois M., Beyer M., Rief M., Clausen-Schaumann H. & Gaub H.E., How strong is a covalent bond?. *Science* (1999) **283**: Seite 1727-1730.

Gutsmann T., Fix M., Larrick J.W. & Wiese A., Mechanisms of action of rabbit cap18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. *Journal of Membrane Biology* (2000) **176**: Seite 223-236.

Gutsmann T., Hagge S.O., David A., Roes S., Bohling A., Hammer M.U. & Seydel U., Lipid-mediated resistance of gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *J.Endotoxin.Res.* (2005) **11**: Seite 167-173.

Gutsmann T., Hagge S.O., Larrick J.W., Seydel U. & Wiese A., Interaction of cap18-derived peptides with membranes made from endotoxins or phospholipids. *Biophysical Journal* (2001) **80**: Seite 2935-2945.

Gutsmann T., Larrick J.W., Seydel U. & Wiese A., Molecular mechanisms of interaction of rabbit cap18 with outer membranes of gram-negative bacteria. *Biochemistry* (1999) **38**: Seite 13643-13653.

Gutsmann T., Riekens B., Bruhn H., Wiese A., Seydel U. & Leippe M., Interaction of amoebapores and nk-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* (2003) **42**: Seite 9804-9812.

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

Hagge S.O., De Cock H., Gutsmann T., Beckers F., Seydel U. & Wiese A., Pore formation and function of phosphoporin phoe of escherichia coli are determined by the core sugar moiety of lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* (2002) **277**: Seite 34247-34253.

Hagge S.O., Hammer M.U., Wiese A., Seydel U. & Gutsmann T., Calcium adsorption and displacement: characterization of lipid monolayers and their interaction with membrane-active peptides/proteins. *BMC.Biochem.* (2006) **7**: Seite 15.

Hagge S.O., Wiese A., Seydel U. & Gutsmann T., Inner field compensation as a tool for the characterization of asymmetric membranes and peptide-membrane interactions. *Biophysical Journal* (2004) **86**: Seite 913-922.

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

Hancock R.E., Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential?. *Drugs* (1999) **57**: Seite 469-473.

Hancock R.E. & Bell A., Antibiotic uptake into gram-negative bacteria.. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (1988) **7**: Seite 713-720.

Harder J., Bartels J., Christophers E. & Schroder J.M., Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* (2001) **276**: Seite 5707-5713.

Harder J., Bartels J., Christophers E. & Schröder J.M., A peptide antibiotic from human skin.. *Nature* (1997) **387**: Seite 861.

Harrison R. & Lunt G.G., Biologische Membranen., 1977.

Hartmann W., Galla H.J. & Sackmann E., Polymyxin binding to charged lipid membranes. an example of cooperative lipid protein interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* (1978) **510**: Seite 124-139.

Hassan,E., W.F. Heinz, M.D. Antonik, N.P.D. Costa, S. Nageswaran, C.A.Schoenenberger, and J.H.Hoh., Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J* (1998) **74**: Seite 1564-1578.

Hoover D.M., Rajashankar K.R., Blumenthal R., Puri A., Oppenheim J.J., Chertov O. & Lubkowski J., The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *Journal of Biological Chemistry* (2000) **275**: Seite 32911-32918.

Hristova K., Dempsey C.E. & White S.H., Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface.. *Biophys J* (2001) **80**: Seite 801-811.

Jass J., Tjarnhage T. & Puu G., From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophysical Journal* (2000) **79**: Seite 3153-3163.

Jia H.P., Schutte B.C., Schudy A., Linzmeier R., Guthmiller J.M., Johnson G.K., Tack B.F., Mitros J.P., Rosenthal A., Ganz T. & McCray P.B.J., Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach.. *Gene* (2001) **263**: Seite 211-218.

Klüver E., Schulz-Maronde S., Scheid S., Meyer B., Forssmann W. & Adermann K., Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cy-

steine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity.. *Biochemistry* (2005) **44**: Seite 9804-9816.

Kwon H. & Gewirth A.A., Afm force measurements between sam-modified tip and sam-modified substrate in alkaline solution.. *J Phys Chem B* (2005) **109**: Seite 10213-10222.

Langmuir I. & Schaefer V.J., Activities of urease and pepsin monolayers. *J. Am Chem. Soc.* (1938) **60** : Seite 1351-1360.

Lehrer R.I. & Ganz T., Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology* (2002) **14**: Seite 96-102.

Lin Q., Meyer E.E., Tadmor M., Israelachvili J.N. & Kuhl T.L., Measurement of the long- and short-range hydrophobic attraction between surfactant-coated surfaces.. *Langmuir* (2005) **21**: Seite 251-255.

Lugtenberg B. & Van Alphen L., Molecular architecture and functioning of the outer membrane of escherichia coli and other gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* (1982) **737**: Seite 51-115.

Marcelja S., Chain ordering in liquid crystals; ii. structure of bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* (1974) **367**: Seite 165-176.

Marti O., Colchero J. & Mlynek J., Combined scanning force and friction microscopy of mica. *Nanotechnology* (1990) **1** : Seite 141-144.

Martin Y., Williams C. & Wickramasinghe H., Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J Appl Phys* (1987) **61**: Seite 4723.

Matsuzaki K., Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) **1462**: Seite 1-10.

McConnell H.M., Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annual Review of Physical Chemistry* (1991) **42**: Seite 171 -195.

McLaughlin S., The electrostatic properties of membranes.. *Annu Rev Biophys Biochem* (1989) **18**: Seite 113-136.

Meyer G. & Amer N.M., Optical-beam deflection atomic force microscopy: the nacl(001) surface. *Appl.Phys.Lett.* (1990) **56**: Seite 2100-2101.

Meyer G. & Amer N.M., Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl.Phys.Lett.* (1988) **53** : Seite 1045-1047.

Montal M. & Mueller P., Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1972) **69**: Seite 3561-3566.

Mrksich M., Chen C.S., Xia Y., Dike L.E., Ingber D.E. & Whitesides G.M., Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold.. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) **93**: Seite 10775-10778.

Nikaido H. & Vaara M., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial.Rev.* (1985) **49**: Seite 1-32.

Osborn M.J., Gander J.E., Parisi E. & Carson J., Mechanism and assembly of the outer membrane of salmonella typhimurium. *Journal of Biological Chemistry* (1972) **247**: Seite 3962-3972.

Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Nadezhdin K.D., Balandin S.V., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N. & Arseniev A.S., Recombinant expression, synthesis, purification, and solution structure of arenicin.. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) : .

Polozov I.V., Polozova A.I., Molotkovsky J.G. & Epand R.M., Amphipathic peptide affects the lateral domain organization of lipid bilayers.. *Biochim Biophys Acta* (1997) **1328**: Seite 125-139.

Rietschel E.T., Brade H., Brade L., Brandenburg K., Schade U., Seydel U., Zahringer U., Galanos C., Luderitz O. & Westphal O., Lipid a, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Progress in Clinical and Biological Research* (1987) **231:25-53**: Seite 25-53.

Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U. & Di Padova F., Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* (1994) **8**: Seite 217-225.

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

Roes S., Mumm F., Seydel U. & Gutschmann T., Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy. *J Biol Chem* (2006) **281**: Seite 2757-2763.

Roes S., Seydel U. & Gutschmann T., Probing the properties of lipopolysaccharide monolayers and their interaction with the antimicrobial peptide polymyxin b by atomic force microscopy. *Langmuir* (2005) **21**: Seite 6970-6978.

Roes S., Seydel U. & Gutschmann T., Probing the properties of lipopolysaccharide monolayers and their interaction with the antimicrobial peptide polymyxin b by atomic force microscopy. *Langmuir* (2005) **21**: Seite 6970-6978.

Sader J., Calibration of atomic force microscope cantilevers. In *Encyclopedia Of Surfaces And Colloid Science*. . 2002. Seite 846-856.

Sahly H., Schubert S., Harder J., Rautenberg P., Ullmann U., Schroder J. & Podschun R., Burkholderia is highly resistant to human beta-defensin 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2003) **47**: Seite 1739-1741.

Schibli D.J., Hunter H.N., Aseyev V., Starner T.D., Wiencek J.M., McCray P.B.J., Tack B.F. & Vogel H.J., The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of hbd3 against staphylococcus aureus.. *J Biol Chem* (2002) **277**: Seite 8279-8289.

Schoch P., Sargent D.F. & Schwyzer R., Capacitance and conductance as tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes.. *J Membr Biol* (1979) **46**: Seite 71-89.

Sen K., Hellman J. & Nikaido H., Porin channels in intact cells of escherichia coli are not affected by donnan potentials across the outer membrane.. *J Biol Chem* (1988) **263**: Seite 1182-1187.

Seydel U., Oikawa M., Fukase K., Kusumoto S. & Brandenburg K., Intrinsic conformation of lipid a is responsible for agonistic and antagonistic activity.. *Eur J Biochem* (2000) **267**: Seite 3032-3039.

Shai Y., Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) **1462**: Seite 55-70.

Singer S.J. & Nicolson G.L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* (1972) **173**: Seite 720-731.

Sixl F. & Galla H.J., Polymyxin interaction with negatively charged lipid bilayer membranes and the competitive effect of Ca^{2+} . *Biochimica et Biophysica Acta* (1981) **643**: Seite 626-635.

Tang Y.Q. & Selsted M.E., Characterization of the disulfide motif in bnbd-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* (1993) **268**: Seite 6649-6653.

Tonge P.J., Another brick in the wall.. *Nat Struct Biol* (2000) **7**: Seite 94-96.

Tsao Y.H., Evans D.F. & Wennerström H., Long-range attractive force between hydrophobic surfaces observed by atomic force microscopy.. *Science* (1993) **262**: Seite 547-550.

Vaara M., Agents that increase the permeability of the outer membrane.. *Microbiol Rev* (1992) **56**: Seite 395-411.

Vaara M., Viljanen P., Sukupolvi S. & Vaara T., Does polymyxin b nonapeptide increase outer membrane permeability in antibiotic supersensitive enterobacterial mutants ?. *FEMS Microbiology Letters* (1985) **26**: Seite 289-294.

Vylkova S., Nayyar N., Li W. & Edgerton M., Human beta-defensins kill candida albicans in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption.. *Antimicrob Agents Chemother* (2007) **51**: Seite 154-161.

Wieland J.A., Gewirth A.A. & Leckband D.E., Single-molecule measurements of the impact of lipid phase behavior on anchor strengths.. *J Phys Chem B* (2005) **109**: Seite 5985-5993.

Wiese A., Gutschmann T. & Seydel U., Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. *J Endotoxin Res* (2003) **9**: Seite 67-84.

Wiese A., Münstermann M., Gutschmann T., Lindner B., Kawahara K., Zähringer U. & Seydel U., Molecular mechanisms of polymyxin b-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted transport.. *J Membr Biol* (1998) **162**: Seite 127-138.

Wu P. & Brand L., Resonance energy transfer: methods and applications.. *Anal Biochem* (1994) **218**: Seite 1-13.

Wu Z., Hoover D.M., Yang D., Boulègue C., Santamaria F., Oppenheim J.J., Lubkowski J. & Lu W., Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3.. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**: Seite 8880-8885.

Xiao X. & Qian L., Investigation of humidity-dependent capillary force. *Langmuir* (2000) **16**: Seite 8153-8158.

Eidesstattliche Erklärung

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

Kiel, den

.....

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Arne Böhling
 Kühnehöfe 15
 22791 Hamburg
 Telefon: 040-82298363
 Geburtsort: Bremen
 Geburtstag: 08. Juni 1977
 Familienstand: ledig, keine Kinder

Schullaufbahn:

August 1983 bis Juli 1984	Vorschule an der Freiligrathstraße in Bremen
September 1984 bis Juni 1988	Grundschule an der Freiligrathstraße in Bremen
August 1988 bis Juli 1990	Orientierungsstufe am Schulzentrum Julius-Brecht-Allee in Bremen
August 1990 bis Juli 1994	Realschule am Schulzentrum Julius-Brecht-Allee in Bremen, Realschulabschluss
September 1994 bis Mai 1997	Gymnasium am Gymnasium Horn in Bremen, Leistungskurse: Mathematik und Physik, Abitur

Zivildienst:

Juli 1997 bis August 1998	Zivildienstleistender im Behinderten-, Blut- und Organfahrdienst beim Deutschen Roten Kreuz in Bremen
---------------------------	---

Hochschullaufbahn:

Oktober 1998 bis Februar 1999	Studium der Elektrotechnik an der Universität Kiel
Februar 1999 bis Juni 2004	Studium der Physik an der Universität Kiel
Mai 2003 bis Mai 2004	Diplomarbeit am Forschungszentrum Borstel
Juli 2004 Bis Juli 2007	Promotion am Forschungszentrum Borstel

Berufliche Laufbahn:

seit Juli 2007	Tätigkeit als Projektingenieur bei der LAIRM Consult GmbH
----------------	---

Danksagung

Für die Unterstützung meiner Arbeit in der Laborgruppe Biophysik, für die immer spannenden, kritischen Diskussionen und das hervorragende Arbeitsklima danke ich Herrn PD Dr. Thomas Gutsmann.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Seydel bedanken, der mir in vielen Vorlesungen und während meiner Diplom- und Promotionszeit die Biophysik eindrucksvoll näher gebracht hat und mich stets tatkräftig unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Sven-Olaf Hagge für die jahrelange Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen über alle Belange der Biophysik.

Für die zahlreichen Diskussionen zu unterschiedlichen biophysikalischen Fragestellungen und die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Brandenburg. Für die massenspektrometrischen Untersuchungen danke ich Herrn PD Dr. Buko Lindner. Für die Unterstützung in biochemischen Fragen danke ich PD Dr. Jörg Andrä. Für die zahlreichen Diskussionen und die Unterstützung danke ich meinem Mentor PD Dr. Norbert Reiling.

Für die zahlreichen Messungen an den planaren Membranen und die Unterstützung im alltäglichen Laborbetrieb möchte ich meinen ehemaligen Auszubildenden Birte Wegner, Christyn Wildgrube und Corinna Studt danken, die großartige Arbeit geleistet haben.

Für die große Anzahl an antimikrobiellen Tests und die vielen Diskussionen möchte ich OA PD Dr. H. Sahly und Prof. Dr. R. Podschun, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel danken.

Der gesamten Labrgruppe Biophysik möchte ich für ihre immerwährende Unterstützung und das gute Arbeitsklima danken. Insbesondere möchte ich Frau Christine Harmann für die Durchführung der FRET Untersuchungen, Frau Brigitte Kunz für die Messungen am Massenspektrometer, Frau Helga Lüthje für die Extraktion und das Aufreinigen des LPS, Herrn Dipl. Ing. Gerold von Busse für die chemisch-technische Hilfestellung und die FTIR-Messungen und Frau Kerstin Stephan für die Präparation von Bakterienproben und die Durchführung der Hämolysetests. Gedenken möchte ich Frau Maren Lohs, die einige Zeichnungen dieser Arbeit anfertigte.

Für die Bereitstellung des hBD-3 und hBD-2 möchte ich mich bei Prof. Dr. J. M. Schröder und Dr. J. Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bedanken. Für die, teils aufwendige, Synthese des hBD-3-6S und des C-hBD-3-1-5-C möchte ich mich bei Herrn Rainer Bartels bedanken. Dank für die Finanzierung meiner Stelle geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 417).

Henrik Lemke, Göran Hübner, Jörg Howe, Florian Mumm, Malte Hammer, Stephanie Gutschmann, Katja Farhat und Catherina Crone danke ich sehr herzlich für alles was wir gemeinsam er- und durchlebt haben.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, Helga und Rolf Böhling, die es mir ermöglichen zu studieren und mir immer zur Seite gestanden haben, sowie meinem Bruder Sven Böhling und meinen langjährigen Freunden Johannes Feuser und Nils Müller, die mich in den letzten Jahren nur wenig gesehen haben. Für vielfältige Unterstützung möchte ich mich bei Margret und Hans Bahr bedanken.

Meiner Großmutter Irmtraut Winter danke ich für ihre Neugier und die langjährige tatkräftige Unterstützung.

Ein besonders liebevoller Dank gebührt Karin für ihre Geduld und ihre tiefe Zuneigung.