

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

# **Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen membranaktiven Peptiden und bakteriellen Lipopolysacchariden**

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

Vorgelegt von  
Dipl. Phys. Malte U. Hammer  
im Oktober 2007

Referent:

PD Dr. Thomas Gutschmann

Koreferent:

\_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung:

\_\_\_\_\_

Zum Druck genehmigt:

\_\_\_\_\_

der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>9</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b>	<b>13</b>
<b>2. Hintergrund und Theorie</b>	<b>15</b>
2.1. Sepsis	15
2.2. Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien	16
2.3. Lipopolysaccharid	18
2.4. Aktivierung von humanen Immunzellen durch Lipopolysaccharid	21
2.5. Phospholipide	23
2.6. Selbstorganisation amphiphiler Moleküle	24
2.7. Membranpotential	26
2.8. Gouy-Chapman-Potential	28
2.9. Optische Dichte	30
2.10. Antibakterielle Peptide	31
2.10.1. Polymyxin B	31
2.10.2. Kathelizidine	33
2.10.2.1. hCAP18 und sein aktives Fragment LL-37	33
2.10.2.2. Vorkommen	33
2.10.2.3. Biologische Eigenschaften von LL-37	34
2.10.2.4. Antiinflammatorische Eigenschaften	35
2.10.2.5. Immunmodulierende Wirkung von LL-37	35
2.11. Wirkmechanismus membranaktiver antibakterieller Peptide	35
2.11.1. <i>Barrel-Stack</i> -Modell	37
2.11.2. <i>Torodial Pore</i> -Modell	37
2.11.3. <i>Carpet</i> -Modell	38
2.11.4. Detergens-Modell	40
<b>3. Material &amp; Methoden</b>	<b>41</b>
3.1. Puffer und Reagenzien	41
3.2. Peptide	44
3.2.1. Polymyxin B	44
3.2.2. LL-32 und Fragmente	44
3.3. Phospholipide	47
3.4. Bakterien	48
3.4.1. <i>Escherichia coli</i>	48
3.4.2. <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota	48
3.4.3. <i>Proteus mirabilis</i>	49
3.4.4. <i>Burkholderia cepacia</i>	49
3.5. Lipopolysaccharide	51
3.6. Humane Zellen und Zelllinien	53
3.6.1. Isolation von mononukleären Zellen und Differenzierung zu Makrophagen	53
3.6.2. Erythrozyten	54
3.6.3. HaCaT- und HTB-43-Zellen	54
3.7. Charakterisierung der biologischen Aktivitäten der Peptide	55
3.7.1. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Peptiden	55
3.7.2. Bestimmung der zytotoxischen Aktivität	56
3.7.3. Bestimmung der antiinflammatorischen Aktivität	57

3.8. Physikalische Untersuchungen zur Interaktion der Peptide auf bakterielle Modellsysteme und Bakterien	59
3.8.1. Messung des Zeta-Potential	59
3.8.2. Größenbestimmung durch den Zeta-Sizer	64
3.8.3. Isotherme Titrationskalorimetrie	65
3.8.4. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	66
3.8.5. Durchflusszytometrie	68
3.8.5.1. Durchflusszytometrische Messungen zur Bindefähigkeit und Wirkung von LL-32 an Gram-negativen Bakterien	69
3.8.5.2. Durchflusszytometrische Messungen zur Interaktion zwischen LL-32 und HaCaT sowie HTB-43 Zellen	70
3.8.5.3. Durchflusszytometrische Messungen zur Unterscheidung zwischen apoptotischem oder nekrotischem Zelltod von HaCaT- und HTB-43 Zellen ausgelöst durch LL-32	70
3.8.6. Förster Resonanz Energie Transfer Spektroskopie	71
3.8.7. Hydrophobes Moment und hydrophober Winkel	73
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1. FRET-Spektroskopie zur Bestimmung von Aggregat-Aggregat Interaktionen	75
4.2. Interaktion von PMB mit LPS	84
4.2.1. Ergebnisse	86
4.2.1.1. Antibakterielle Aktivität von PMB und Detergentien	86
4.2.1.2. Abhängigkeit des Zeta-Potentials von LPS-Aggregaten von der PMB-Konzentration	87
4.2.1.3. Größe von LPS-Aggregaten in Abhängigkeit von PMB, PMBN und DTPPB	89
4.2.1.4. FRET-Spektroskopie	91
4.2.1.5. Zeta-Potential von R595- und R60-Bakterien in Abhängigkeit der PMB-Konzentration	92
4.2.2. Diskussion	94
4.2.2.1. Antibakterielle Aktivität von PMB und Detergentien	94
4.2.2.2. Abhängigkeit des Zeta-Potentials von LPS-Aggregaten von der PMB-Konzentration	95
4.2.2.3. Größe von Aggregaten in Abhängigkeit von PMB, PMBN und DTPPB	96
4.2.2.4. FRET-Spektroskopie	97
4.2.2.5. Zeta-Potential von R595- und R60-Bakterien in Abhängigkeit der PMB-Konzentration	98

4.3. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von LL-32 und LPS	99
4.3.1. Ergebnisse	99
4.3.1.1. Charakterisierung der biologischen Aktivität der LL-32 Fragmente	99
4.3.1.2. Das hydrophobe Moment von LL-32 und den Fragmenten	128
4.3.1.3. Zeta-Potential und Größe von LPS-Aggregaten in Abhängigkeit von LL-32 und LL-20	129
4.3.1.4. Bindung von LL-32 an Bakterien und die Auswirkung auf die Membranintegrität	132
4.3.1.5. Kalorimetrie-Messungen an den Bakterienstämmen R595 und R60 und an Aggregaten aus deren LPS	134
4.3.2. Diskussion	136
4.3.2.1. Korrelation der biologischen Aktivitäten der LL-32 Fragmente durch globale physikalische Parameter	139
4.3.2.2. Deutung der biologischen Befunde durch physikalische Untersuchungen	141
4.4. Untersuchungen zur antitumoralen Aktivität von LL-32	146
4.4.1. Ergebnisse	146
4.4.1.1. Zytotoxische Aktivität LL-32 gegen die verwendeten Zelllinien	146
4.4.1.2. Bindung von LL-32 an Modellmembranen	147
4.4.1.3. Bindung von LL-32 an die HaCaT- und HTB-43-Zellen	148
4.4.1.4. Wirkung von LL-32 auf die Zelllinien	148
4.4.2. Diskussion	151
4.4.2.1. Bindung von LL-32 an Modell- und Zellmembranen	151
4.4.2.2. Wirkung von LL-32 auf die Zellmembran von HaCaT- und HTB-43-Zellen	153
4.5. Diskussion der Wirkmechanismen	155
4.5.1. Antibakterieller Wirkmechanismus	155
4.5.2. Antiinflammatorischer Wirkmechanismus	157
4.5.3. Zytotoxischer Wirkmechanismus	159
<b>5. Appendix</b>	<b>161</b>
5.1. LL-37 Fragmente	161
5.2. Herleitung Zeta-Potential	163
5.3. Generationszeiten der Bakterien	166
5.4. Einfluss der LL-32 Fragmente auf die Viabilität von MNC	166
5.5. Salzabhängigkeit der LD90	167
5.6. Korrelation der biologischen Aktivitäten mit globalen physikalischen Parametern	168
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>170</b>

## Abkürzungen

Ara4N	Aminoarabinose
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAC	<i>Critical Aggregate Concentration</i>
CD14	<i>Cluster of Differentiation</i>
CL	Cardiolipin
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
DTMAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
DTPPB	Dodecyltriphenylphosphoniumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calvin Serum</i>
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FZ	Forschungszentrum
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature Ceratinocytes</i>
HBSS	<i>Hanks´ buffered Salt Solution</i>
hCAP18	<i>Human Cationic Antimicrobial Peptid</i> mit 18 kDa Größe
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HTB-43	Modellzelllinie für ein <i>Human squamous head and neck carcinoma</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
Kdo	3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure
Ko	D-glycero-D-talo-oct-2-ulonsäure
Ko2b	<i>Burkholderia cepacia</i> Ko2b-Mutante
Ko2b-LPS	LPS von der <i>Burkholderia cepacia</i> Mutante Ko2b
LB	Luria-Bertani
LBP	LPS-bindende Protein
LD90	Dosis, die für 90% der Bakterien letal ist
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
M-CSF:	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MM	Molare Masse
MNC	<i>Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol
PMB	Polymyxin B
PMBN	Polymyxin B-Nonapeptid
PS	Phosphatidylserin

R345	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R345
R345 -LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R345
R4	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R4
R4-LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R4
R45	<i>Proteus mirabilis</i> Stamm R45
R45-LPS	LPS vom <i>Proteus mirabilis</i> Stamm R45
R5	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R5
R5-LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R5
R595	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R595
R595-LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R595
R60	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R60
R60-LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R60
R7	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R7
R7-LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R7
Rz	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm Rz
Rz-LPS	LPS vom <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm Rz
rCAP18	<i>Rabbit Cationic Antimicrobial Peptid</i> mit 18 kDa Größe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
T1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Mutante T1
T1-LPS	LPS von der <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Mutante T1
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
WBB01	<i>Escherichia coli</i> Stamm WBB01
WBB01-LPS	LPS vom <i>Escherichia coli</i> Stamm WBB01

## Symbole

$\Delta G$	Änderung der Gibb'schen Freien Energie
$\kappa$	Debye-Hückel-Parameter
$\lambda_D$	Debye-Länge
$\rho$	Raumladungsdichte der diffusen Schicht
$\sigma$	Oberflächenladungsdichte
$\psi_0$	Oberflächenpotential
$\mu$	Hydrophobes Moment
$U_{\text{trans}}$	transmembrane Spannung
$\zeta$	Zeta-Potential
$C_{i, \text{cis}}$	Konzentration der Ionensorte i im Zelläußeren
$C_{i, \text{trans}}$	Konzentration der Ionensorte i im Zellinneren
f	Frequenz
$P_i$	Permeabilitätskoeffizient der Ionensorte i
Q	Nettoladung
T	Temperatur

## Konstanten

$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums, $8,854187 \times 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$
e <sub>0</sub>	Elementarladung, $1,602176487(40) \times 10^{-19} \text{ C}$
F	Faraday-Konstante, $96485,3399(24) \text{ C mol}^{-1}$
k	Boltzmann-Konstante, $1,3806504(24) \times 10^{-23} \text{ J/K}$
R	$8,314472(15) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$



## 1. Einleitung und Zielsetzung

Seit Hunderttausenden von Jahren ist der menschliche Organismus durch Infektionen, ausgelöst durch eindringende Bakterien, bedroht. Durch evolutionäre Anpassung an diese Bedrohung hat das angeborene Immunsystem dabei sehr effiziente Abwehrstrategien entwickelt, doch erst mit der zufälligen Entdeckung des Penicillins durch Fleming im Jahre 1923 erschien es möglich, durch gezielte Unterstützung mit extern applizierten Substanzen „das Kapitel der Infektionskrankheiten zu schließen“ (Zitat Fleming). Doch die Bekämpfung vieler Bakterienstämme ist dadurch erschwert, dass auch bei einer Abtötung der infektiösen Keime die Bedrohung des menschlichen Organismus nicht beendet ist. Werden bestimmte bakterielle Moleküle, wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellhülle Gram-negativer Bakterien, in die Blutbahn freigesetzt, lösen sie eine inflammatorische, d.h. entzündliche Immunantwort aus. Diese kann ein solches Maß erreichen, dass hohes Fieber auftritt und letztendlich der Tod durch Multiorganversagen folgt. Gegen dieses Syndrom, ausgelöst durch Bakterien, welches als Sepsis bezeichnet wird, existiert bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine effektive Therapie.

Die Bekämpfung von Infektionskrankheiten wird dadurch erschwert, dass viele Bakterienstämme rasch Resistenzmechanismen entwickeln und viele der heute medizinisch gebräuchlichen Antibiotika zunehmend unwirksam sind. Die dramatisch schnelle Ausbreitung von zum Teil multiresistenten Krankheitserregern ist eines der bedeutendsten medizinischen Probleme weltweit.

Aus diesen Gründen müssen neue antibakterielle Substanzen entwickelt werden, die zum einen die vorhandenen bakteriellen Resistenzen überwinden und zum anderen keine neuen Resistenzmechanismen induzieren. Außerdem sollten sie die Entstehung einer Sepsis wirksam unterbinden können, also antiinflammatorisch sein und keine körpereigenen Zellen abtöten, also nicht zytotoxisch wirken. Die Anforderungen an derartige Peptide sind schematisch in Abb. 1 dargestellt. Eine mögliche Strategie dabei ist es, körpereigene antibakterielle Peptide, die bisher keinerlei, bzw. lediglich in geringem Maße, bakterielle Resistenz verursacht haben, als Leitstrukturen zu verwenden und diese so zu ändern, dass sie für ein bestimmtes Problem optimiert werden. Für eine zielgerichtete Optimierung muss jedoch notwendigerweise die Aktivität und der Wirkmechanismus dieser Peptide des Immunsystems bekannt sein.

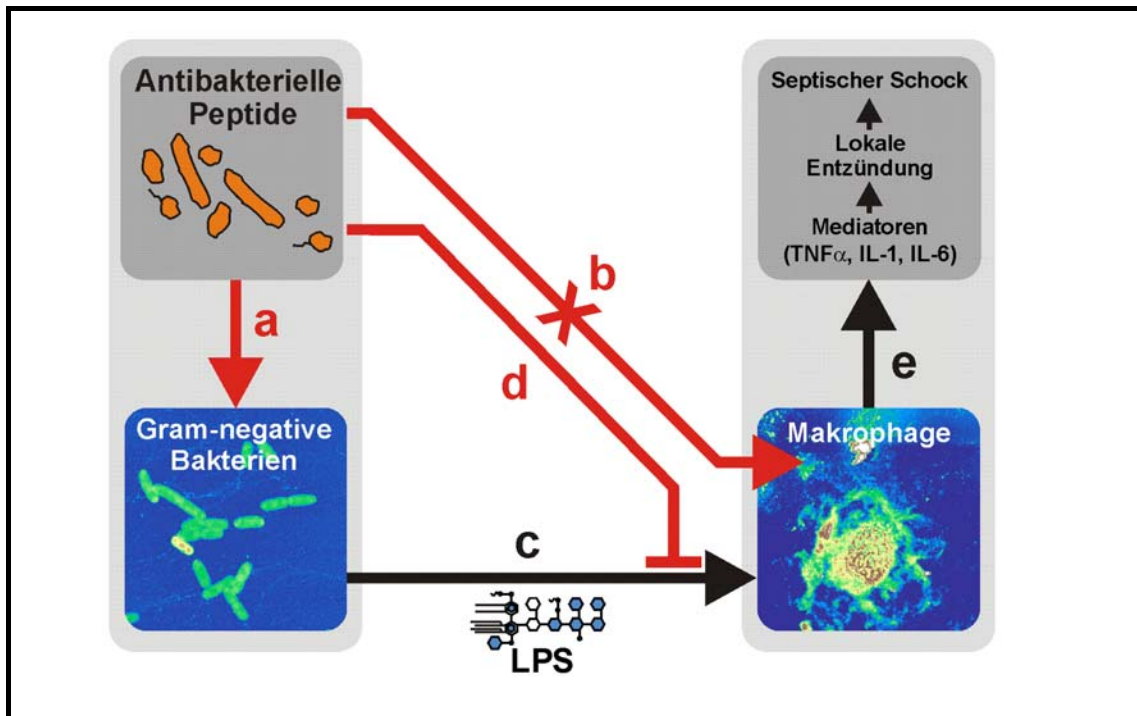


Abbildung 1: Anforderungen an die Funktion eines antibakteriellen Peptids in Hinblick auf eine medizinische Verwendung. Die Peptide sollten antibakteriell wirken (a) und nicht zytotoxisch sein (b). Zusätzlich sollten sie die Aktivierung von Makrophagen durch freigesetztes LPS (c) unterbinden(d), damit kein septischer Schock durch die Zytokinausschüttung von LPS-aktivierten Makrophagen initiiert wird (e).

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, wie in Abb. 2 schematisch angedeutet, die biologische Funktion der antibakteriell und antiinflammatorisch wirkenden Peptide durch physikalische Untersuchungen an Bakterien und aus deren LPS rekonstituierten Modellmembranen aufzuklären und so zu einem tiefergehenden Verständnis der Wirkung von Peptiden auf Gram-negative Bakterien beizutragen. Insbesondere wird der Einfluss von Variationen am LPS auf die Wirkung der Peptide untersucht.

Da extern applizierte Substanzen zuerst mit der äußersten Schicht der bakteriellen Zellhülle interagieren und das Sepsis-induzierende LPS der Hauptbestandteil dieser Schicht bei Gram-negativen Bakterien ist, wurden Modellsysteme aus aufgereinigtem LPS verwendet. An diesen wurden physikalische Untersuchungen mit verschiedenen Peptiden durchgeführt, die zum Teil auf der Struktur eines Peptids des menschlichen Immunsystems beruhen. Werden die Erkenntnisse aus diesen Messungen mit Experimenten am gesamten Bakterium verglichen, können sowohl die physikalischen Modelle verifiziert oder verbessert werden, als auch Erkenntnisse über die Vorgänge im lebenden Organismus gewonnen werden.

Um Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehung für die Interaktion zwischen Peptiden und Bakterien zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl die chemischen Strukturen der Peptide systematisch variiert als auch die des LPS. Die verwendeten LPS besitzen einen membranverankernden

Bereich, das Lipid A, und eine nach außen zeigende Saccharidkette. Die Glycostruktur dieser Kette und Substitutionen am Lipid A wurden variiert, um deren Einfluss zu charakterisieren. Mit physikalischen Methoden wird die Wirkung verschiedener, größtenteils neu synthetisierter Peptide auf Modellsysteme und Bakterien mit variierendem LPS beschrieben. Unterstützt durch die Charakterisierung der antibakteriellen und antiinflammatorischen Wirkung durch mikrobiologische *in vitro* Methoden, können damit Aussagen sowohl über die Struktur-Wirkungsbeziehung von antibakteriellen und antiinflammatorischen Peptiden als auch der Einfluss der LPS-Struktur auf ihre Wirkung getroffen werden. Außerdem können Aussagen über mögliche Wirkmechanismen erlangt werden.

Um den Einfluss der Peptidstruktur zu ermitteln, wurden Peptide unterschiedlicher Art verwendet. Zum einen wurde das relativ einfach strukturierte 10 Aminosäuren große antibakterielle Peptid Polymyxin B verwendet, für welches ein sogenannter Detergensmechanismus in der Literatur postuliert wird. Dieses ist medizinisch im Wesentlichen für topische Anwendungen nutzbar, besitzt aber sehr gute antiinflammatorische Eigenschaften und wird häufig als Modellsubstanz für membranaktive Peptide verwendet. Obwohl dieses Peptid relativ gut charakterisiert ist, ist sein Wirkmechanismus immer noch nicht im Detail verstanden. Mit neuen Erkenntnissen aus physikalischen Untersuchungen an Modellsystemen soll dieser Wirkmechanismus insbesondere in Hinblick auf den Einfluss von Glycostrukturen verifiziert und besser verstanden werden. Zum Vergleich wurden biologische Tests mit verschiedenen Detergentien durchgeführt.

Zum anderen wurde für diese Arbeit eine Reihe neuer Peptide synthetisiert, welche auf dem humanen Kathelizidin hCAP18 basieren. Die Kathelizidine, die in vielen Säugetieren nachgewiesen wurden, wirken bereits etliche tausend Jahre und es besteht die Hoffnung, dass die Bildung von bakteriellen Resistenzmechanismen unmöglich oder zumindest extrem erschwert ist. Ein Antibiotikum mit dieser Eigenschaft würde das gravierende Problem der multiresistenten Bakterien lösen.

Mit biologischen Methoden wurden die antibakteriellen und antiinflammatorischen Eigenschaften der neuen Peptide bestimmt. Deren Wirkungsweise wurde mit Hilfe von physikalischen Untersuchungen an LPS-Modellsystemen aufgeklärt und mit Hilfe physikalischer Strukturparameter beschrieben. Im Fokus der Untersuchung lag das Verständnis des Einflusses der Glycostruktur und der Ladungssubstitution des LPS auf die antibakteriellen und antiinflammatorischen Eigenschaften der Peptide. Zusätzlich kann dieses Wissen möglicherweise auch bei der Entwicklung neuer Antibiotika von Nutzen sein, die keine neuen Resistenzmechanismen induzieren und bereits vorhandene überwinden können.

Ferner wurde der Frage nachgegangen, ob ein Fragment des hCAP18, das LL-32, eine antitumorale Wirkung besitzt, indem es, ähnlich wie im Fall der Bakterien, spezifisch mit der Membran der Tumorzelle interagiert.

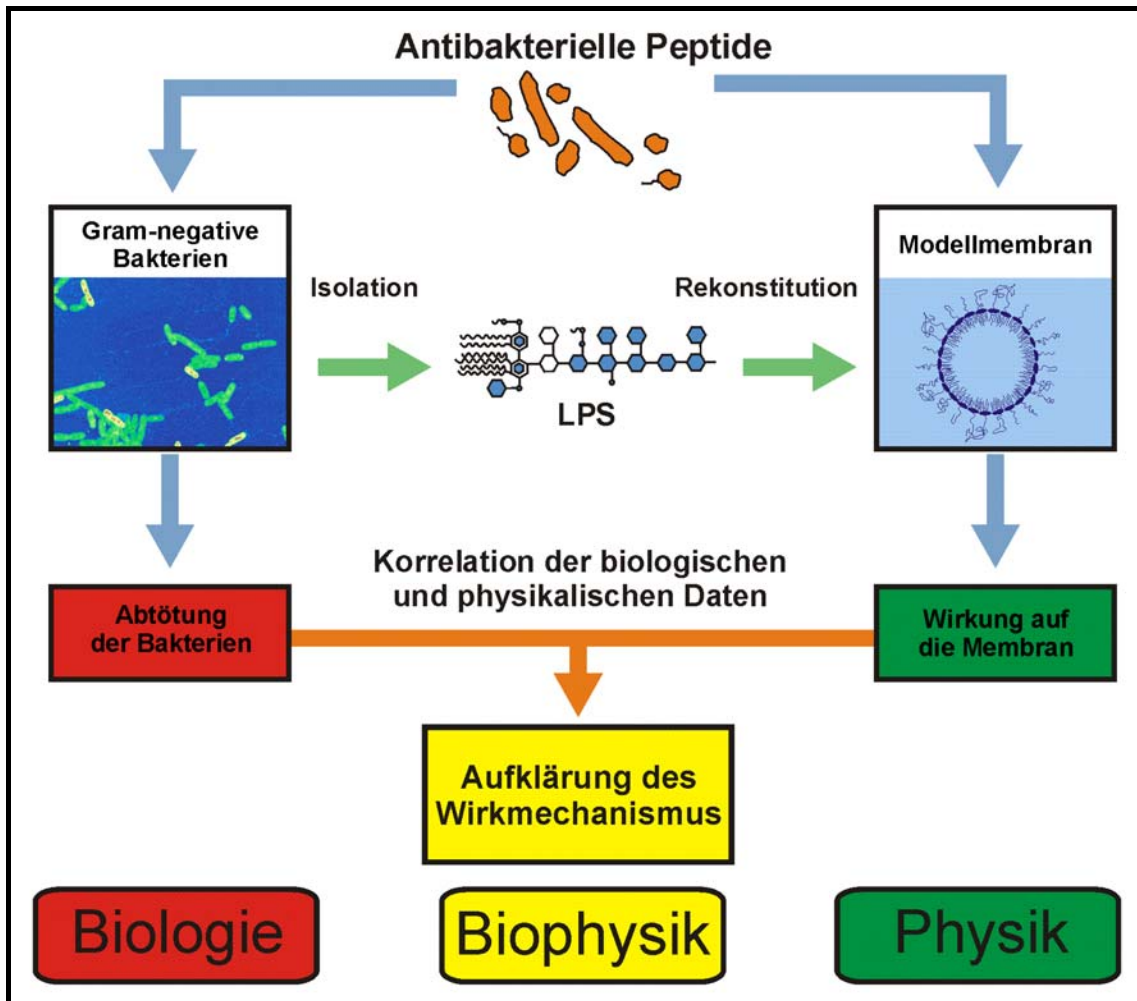


Abbildung 2: Gleichberechtigtes Zusammenspiel von Biologie und Physik zur Aufklärung des biologischen Phänomens der antibakteriellen Peptide. Durch Vergleich von biologischen Untersuchungen zum Abtötungsverhalten und physikalischen Untersuchungen an rekonstituierten Modellmembranen (z.B. Binde- und Einbauverhalten), bestehend aus von Gram-negativen Bakterien isoliertem LPS, kann sowohl das Modellsystem überprüft werden als auch die Ursachen für die antibakterielle Aktivität der Peptide bzw. der Resistenz bestimmter Stämme ermittelt werden.

### **Kurzzusammenfassung**

Lipopolysaccharid (LPS) befindet sich exklusiv in der äußeren Schicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und bildet damit die äußerste Grenze des Bakteriums. Die LPS-Schicht ist somit der erste Angriffspunkt von membranaktiven Peptiden. Bei der Abtötung von Gram-negativen Bakterien wird LPS freigesetzt und kann zu dem fatalen inflammatorischen Syndrom Sepsis führen. Damit ist die Wechselwirkung von membranaktiven Peptiden mit LPS sowohl für die antibakterielle als auch für die antiinflammatorische Wirkung der Peptide von entscheidender Bedeutung. Die Interaktion der Peptide Polymyxin B (PMB) und einem aktiven Fragment des humanen Kathelizidins, LL-32, mit LPS-Schichten wurde mit physikalischen und biologischen Methoden an aus LPS rekonstituierten Modellsystemen und Bakterien untersucht. Zur Überprüfung des für PMB vorgeschlagenen Detergens-Wirkmechanismus auf LPS-haltige Membranen mit unterschiedlicher Glycostruktur wurden Untersuchungen mit PMB, einem inaktiven Derivat und Detergentien an Bakterien und Modellmembranen vorgenommen. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass sowohl der Fettsäurerest von PMB essentiell für die Aktivität von PMB ist und dass eine längere LPS-Glycostruktur die Aktivität durch eine erhöhte Aufkonzentrierung von PMB verstärkt, während zusätzliche Ladungen an der Glycostruktur die Aktivität stark hemmen. Sie binden PMB und stellen so eine sterische Hinderung für weitere PMB-Moleküle dar. Neuartige Antibiotika sollten nicht nur die Bakterien abtöten, sondern auch die Entstehung einer Sepsis wirksam unterbinden können. LL-32 stellt dafür aufgrund seiner antibakteriellen und antiinflammatorischen Fähigkeiten eine mögliche Leitstruktur dar. Durch eine Charakterisierung der antibakteriellen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Aktivität diverser LL-32 Fragmente in Abhängigkeit einer variierenden Glycostruktur und Anzahl an Substitutionen am LPS konnte die Bedeutung einzelner Aminosäurecluster von LL-32 für dessen Aktivität beschrieben werden und infolgedessen kann nun die LL-32 Struktur in Hinblick auf eine medizinische Nutzung optimiert werden. Durch die Messung von physikalischen Parametern, sowohl an Modellmembranen als auch an Bakterien selbst, konnten Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen für die Aktivitäten gezogen und diese teilweise aufgeklärt werden. Lokale Effekte, die durch eine starke Bindung an und Insertion in LPS-Schichten ausgelöst werden, sind für die antibakterielle Aktivität entscheidend. Diese wird durch Substitutionen am Kdo bzw. Ko des LPS stark reduziert. Die antiinflammatorische Aktivität kann gut durch die Fähigkeit der Peptide LPS-Aggregatfusionen zu induzieren beschrieben werden. Sie wird durch Substitutionen am LPS verstärkt. An Bakterien und humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass die biologische Aktivität von LL-32 mit dessen Fähigkeit Läsionen in der bakteriellen und zellulären Zellhülle zu bilden korreliert. Zusätzlich wurde aufgrund der ladungsspezifischen Bindung und Läsionsbildung eine tumorspezifische Wirkung von LL-32 durch physikalische und biologische Untersuchungen an Modellmembranen und Zelllinien belegt.

## **Structure-activity-relationship between membrane-active peptides and lipopolysaccharide**

Lipopolysaccharide (LPS) is found exclusively in the outer layer of the outer membrane of Gram-negative bacteria and forms the outer barrier of the bacteria. The LPS-layer therefore poses the first point of attack for membrane-active peptides. Killing Gram-negative bacteria leads to LPS release and may cause the fatal inflammatory sepsis syndrome. Hence, the interactions of membrane-active peptides with LPS are of great significance for the antibacterial as well as the anti-inflammatory effect of peptides. The interaction of the peptides Polymyxin B (PMB) and LL-32, a fragment of the human cathelicidin, with LPS-layers are analysed utilizing biological and physical methods on reconstituted model membranes containing LPS and on whole bacteria. The detergent-like action proposed for the interaction between the peptide Polymyxin B and membranes containing LPS differing in their glycostructure is verified by use of PMB, an inactive derivative, and detergents on whole bacteria and model membranes composed of LPS. It was shown that the fatty acid of PMB is essential for its activity and that a longer LPS-polysaccharide chain increases the activity of PMB caused by an increase of the local concentration at the membrane surface. However, additional charges bound to the polysaccharide chain decrease the activity. These substitutes can bind PMB molecules leading to a sterical hinderance for further molecules.

Novel antibiotics should not only kill bacteria but additionally prevent the onset of the sepsis syndrome. The active fragment LL-32 of the human cathelizidine, hCAP18, represents due to its antibacterial and anti-inflammatory activity a possible pharmaceutical lead structure. Characterization of the antibacterial, anti-inflammatory and cytotoxic activity of a diversity of LL-32 fragments in subject to varying glycostructures and number of LPS-substitutions helps to determine the impact of single clusters of amino acids of LL-32 on its activity. This may lead to optimization of the LL-32 structure in the face of medical use. Physical assays, utilizing model membranes as well as whole bacteria, help to draw conclusions about the different mode of action being responsible for its activities. Local effects, created by a strong binding to and insertion into a LPS-layer, are essential for the antibacterial activity of the peptides. This activity is reduced by substituents at the Kdo or Ko of the LPS. The antiinflammatoric activity can be described by the ability of the peptides to induce fusion of LPS-aggregates. It is enhanced by LPS-substituents. For whole bacteria and human cells it could be shown that the biological activity of LL-32 correlates with its ability to form lesions in the bacterial and cellular cell wall. Last but not least the tumor specific effect of LL-32 is supported by physical and biological tests on model membranes and cell lines.

## 2. Hintergrund und Theorie

### 2.1. Sepsis

„Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und / oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ Übersetzt nach (Bone et al., 1989).

Der Auslöser einer Sepsis (griech. Fäulnis) ist immer eine lokale Infektion, welche z.B. von Gram-negativen Bakterien verursacht wird. Das Immunsystem reagiert auf die invasiven Erreger oder Bestandteile von ihnen mit der sogenannten inflammatorischen Antwort, die essentiell zur Bekämpfung und Begrenzung der infektiösen Mikroorganismen ist. Diese Reaktion kann auch durch molekulare Bestandteile der Bakterien ausgelöst werden, bei Gram-negativen Bakterien ist es insbesondere das Lipopolysaccharid, ein Bestandteil der Zellhülle. Das wegen seiner Wirkung auch als Endotoxin bezeichnete Molekül löst schon bei sehr geringen Konzentrationen eine starke inflammatorische Antwort aus (Karima et al., 1999). Dabei wird durch bestimmte Botenstoffe, den Zytokinen, das Immunsystem aktiviert und Immunzellen akkumulieren am Ort der Infektion. Es treten immer vier Symptome am Infektionsort auf: Dolor (Schmerz), Calor (Überwärme und Fieber), Rubor (Rötung) und Tumor (Schwellung) (Definition der Entzündung nach Celsus, 1. Jahrhundert AD). Zusätzlich kann die Funktion des betroffenen Organs eingeschränkt sein.

Gelingt es dem Immunsystem nicht, diese Infektion zu begrenzen, können die Erreger oder deren Toxine eine Entzündung des gesamten Körpers bewirken. Nach wenigen Stunden weisen dann alle Organe die Anzeichen der Entzündung auf. Der Körper schüttet dabei exzessiv Zytokine aus, und es kommt zu einer inflammatorischen Überreaktion des Körpers, die sich am Ende gegen das Individuum selbst richtet. Paul Ehrlich prägte hierfür den Begriff „horror autotoxicus“, wobei aber auch ein Nichtreagieren des Körpers aller Wahrscheinlichkeit den Tod zur Folge hätte. Diese Überreaktion kann zu einem Versagen der Organe führen und damit ohne intensivmedizinische Behandlung zum sicheren Tod des Betroffenen. Doch selbst mit Behandlung liegt die Mortalität bei durch Gram-negative Bakterien verursachter Sepsis je nach Studie zwischen 20% in Deutschland (Geerdes et al., 1992) und bei 30% bis 80% in den USA mit 215.000 Toten pro Jahr alleine in den USA (Glauser et al., 1991). Pro Jahr wird bei 3 von 1000 US-Bürgern dieses Syndrom diagnostiziert, bei Gesamtkosten von ca. 17 Milliarden US-Dollar (Angus et al., 2001). Vermutlich durch die zunehmende Anzahl an Kathetern und invasiven Prothesen und durch die allgemein höhere Lebenserwartung zusammen mit der daraus resultierenden höheren Anzahl an immundefizienten Menschen verdoppelte sich die Anzahl der von Sepsis Betroffenen in den USA zwischen 1979 und 1987 (Van Amersfoort et al., 2003). Damit fordert die Sepsis mehr

Todesopfer als AIDS und Brust- und Darmkrebs zusammen und ist auf chirurgischen Intensivstationen die Todesursache Nr.1 (Wochenzeitschrift „Die Zeit“ im April 2004).

Wird die Infektion durch extern applizierte Antibiotika bekämpft, kann durch die Abtötung der Bakterien weiteres LPS freigesetzt werden und so die Induktion einer Sepsis fördern. Viele moderne therapeutische Ansätze versuchen, die fatalen Folgen der Sepsis durch Eingriff und Regulierung der inflammatorischen Antwort frühzeitig zu bekämpfen. Dabei konnte leider noch kein wirklicher Erfolg erzielt werden (Bernard et al., 2001; Rivers et al., 2001; Annane et al., 2002) . Ein weiterer Ansatz ist, nicht erst in die Signalkaskade der Zytokine einzugreifen, sondern die Erreger abzutöten und dabei deren Toxine sofort zu binden oder zu blockieren, so dass es gar nicht zu einer exzessiven Zytokinexpression kommt.

Einige antibakterielle Peptide besitzen die Eigenschaft, die Toxin-induzierte Zytokinproduktion von Abwehrzellen vermutlich durch Bindung zu inhibieren. Damit sind diese Peptide potentiell sehr sinnvolle Antibiotika, da sie zum einen die bakteriellen Erreger bekämpfen und zum anderen auch deren Auswirkungen auf die inflammatorische Antwort positiv beeinflussen.

## 2.2. Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien

Aufgrund des Aufbaues ihrer Zellhülle zeigen die sogenannten Gram-negativen Bakterien keine Reaktion auf den Färbetest des dänischen Bakteriologen Hans-Christian Gram. Bei diesem Test wird die Mureinschicht, die aus peptidverknüpftem Glycan besteht und die der aus Phospholipiden aufgebauten Zytoplasmamembran liegt und die Zelle stützt, gefärbt. Da aber die Gram-negativen Bakterien im Vergleich zu den Gram-positiven nur eine sehr dünne Murein-Schicht besitzen, die zusätzlich noch von einer weiteren Membran umgeben ist, zeigt sich bei dieser taxonomischen Gruppe unter dem Lichtmikroskop keine Färbung, bzw. die Färbung kann durch Alkohol ausgewaschen werden.

Allgemein besteht ein Bakterium aus dem Zellinneren und der Zellhülle. Im Zellinneren, dem zytoplasmatischen Raum, befinden sich die meisten essentiellen Bestandteile für die Funktion des Bakteriums wie z.B. den Mitochondrien zur Energiegewinnung, dem Zellkern zur DNA-Replikation und dem endoplasmatischen Retikulum zur Prozessierung von Proteinen. Die zytoplasmatischen Bestandteile des Bakteriums können aufgrund ihrer überlebenswichtigen Funktion ein potentielles Wirkziel von antibakteriellen Substanzen sein. Auf diese Bestandteile wird in dieser Arbeit nicht eingegangen, deshalb wird für eine Beschreibung auf die Literatur verwiesen (Madigan et al., 1979; Lodish et al., 2000).

Die Zellhülle von Bakterien dient, ähnlich wie die Haut und die Schleimhaut beim Menschen, als physikalische Barriere des Organismus zur Umwelt. Sie ist essentiell für das Überleben des Bakteriums, denn sie dient unter anderem der



Aufrechterhaltung von Substanzkonzentrationen, wie z.B. Nährstoff- und Salzkonzentration und infolge dessen auch des osmotischen Drucks und des elektrischen Membranpotentials. Sie dient als Zielstruktur bestimmter antibakterieller Peptide, vor allem der sogenannten membranaktiven Peptide. Bei Gram-negativen Bakterien besteht die Zellhülle aus zwei verschiedenen Membranen mit dazwischenliegender Murein-Schicht (Abb. 3). Die innere Membran, die der Zytoplasmamembran Gram-positiver Bakterien ähnelt, besteht aus zwei Monoschichten die beide aus Glycerophospholipiden aufgebaut sind. Die für Gram-positive Bakterien charakteristische äußere Membran mit einer Schichtdicke von ca. 5 – 10 nm hingegen ist asymmetrisch aufgebaut, d.h. aus zwei Monoschichten mit unterschiedlicher Lipidkomposition. Die innen liegende Monoschicht der äußeren Membran besteht, wie beide Monoschichten der inneren Membran, aus einem Glycerophospholipidgemisch, die Lipidmatrix der äußeren Schicht hingegen besteht aus Glycolipiden, in der Regel aus Lipopolysaccharid (LPS), welches sich exklusiv in der äußeren Schicht der äußeren Membran befindet. Das LPS bildet die äußerste Grenze des Bakteriums zur Umwelt und ist damit das Molekül des Gram-negativen Bakteriums, welches als erstes mit Antibiotika in Berührung kommt. Deshalb ist die Interaktion von Peptiden, insbesondere von membranaktiven, mit dem LPS von essentieller Bedeutung für ihre antibakterielle Wirkung. Ein Gram-negatives Bakterium ist auch, zwar sehr eingeschränkt, ohne äußere Membran lebensfähig und erst eine Lochbildung in der Zytoplasmamembran oder deren Zerstörung kann letal sein. Die äußere Membran stellt daher eine Barriere dar, die überwunden werden muss und die mitbestimmt, wie viel Wirkstoff zur inneren Membran gelangt.

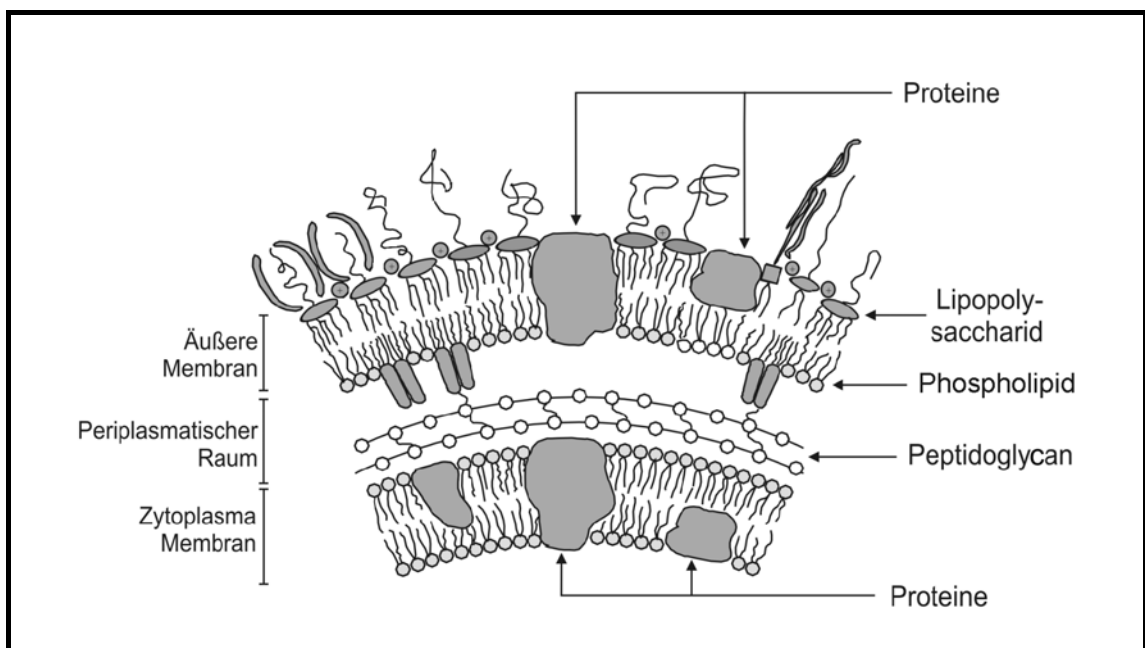


Abbildung 3: Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien. Sie ist aus der äußeren und der Zytoplasmamembran aufgebaut. Getrennt werden diese durch den periplasmatischen Raum mit der Peptidoglycan- (Murein) Schicht.

Aufgrund des Aufbaues sind reine Lipidmembranen für nicht-hydrophobe Stoffe *per se* impermeabel, aber da das Bakterium auf eine regulierte Zu- und Abfuhr von Stoffen angewiesen ist, befinden sich neben den Lipiden als Strukturmoleküle auch Proteine als funktionale Bestandteile in der Membran. Diese sind nach dem *Fluid-Mosaic-Modell* (mit Erweiterung der dynamischen Struktur ein noch heute gültiges Modell (Singer und Nicolson, 1972; Vereb et al., 2003)) als periphere oder integrale Bestandteile in die Lipidmatrix eingebettet. In der äußeren Membran befinden sich z.B. die sogenannten Porine, wassergefüllte Poren, die den Durchtritt von hydrophilen, niedermolekularen Substanzen wie z.B. Zucker zur Nährstoffversorgung des Bakteriums ermöglichen (Nikaido, 2003). Durch diese Poren können auch kleine Antibiotika die äußere Membran überwinden und zu ihrem letalen Ziel gelangen, wie im Falle des Penicillins zum Peptidoglycan. Größere Peptide (>600 Da, (Nikaido und Vaara, 1985)) benötigen einen anderen Weg, um sich Zutritt zu verschaffen. Eine Möglichkeit besteht darin, die äußere Membran so stark zu schädigen, dass Löcher entstehen, die groß genug für die Substanz sind, um selbst durch die Membran hindurchzugelangen. Dieser „Selbsteinlass“ wird in der Literatur für viele membranaktive Substanzen postuliert und als *self-promoted uptake* bezeichnet (Hancock, 1984; Hancock, 1997).

### 2.3. Lipopolysaccharid

Die Lipidmatrix der äußeren Schicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wird in der Regel vom Lipopolysaccharid gebildet. Eine Ausnahme stellt die Gram-negative Spezies *Shingomonas* dar, die anstelle des LPS Glycosphingolipid exprimiert. LPS ist ein amphiphiles Heteropolymer, aufgebaut aus einem hydrophoben Lipidanteil, der das LPS in der Membran verankert und als Lipid A bezeichnet wird, und einer hydrophilen Glycostruktur (Abb. 4) mit einem für verschiedene Spezies und Stämme stark variierenden Polysaccharidanteil.

Das Rückgrat des Lipid A wird von einer Disaccharid-Gruppe gebildet, welche aus zwei  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpften Glycosaminen besteht und in den Positionen 1 und 4' phosphoryliert ist (Zähringer et al., 1994). Die Gruppe ist insgesamt 4-fach acyliert mit gesättigten 3-Hydroxy-Fettsäuren, die in der Regel eine Länge von 12 bis 14 Kohlenstoffatomen haben. Durch Veresterung der 3-Hydroxylgruppen mit weiteren Fettsäuren sind insgesamt 4 – 7 Fettsäuren am Lipid A gebunden. Es existieren LPS-Varianten, bei denen die negativ geladenen Phosphatgruppen Substituenten besitzen. Sind diese positiv geladen, wie z.B. die Aminoarabinose, besitzt das Lipid A eine geringere Nettoladung.

Die Glycostruktur besteht maximal aus einer am Lipid A gebundenen Kernregion, bei der aufgrund unterschiedlicher Hexosen zwischen innerer und

äußerer Kernregion unterschieden wird, und einer sogenannten O-spezifischen Kette (Abb. 4).

Die O-spezifische Kette ist eine variable Kette aus verschiedenen Glycosylresten, welche sich bis zu 40-fach wiederholen. Diese Kette ist stammspezifisch und wird auch als O-Antigen bezeichnet (Kleinig, 1999). Wurde bei einem LPS die O-spezifische Kette ausgebildet, wird es als S-Form LPS bezeichnet, da die Bakterienkolonien eine glatte (*smooth*) Morphologie besitzen. Die meisten Wildtyp-Stämme, also Stämme die in der Natur existieren, haben S-Form LPS. Diese sind allerdings sehr heterogen. Hat ein LPS keine O-spezifische Kette, wird es je nach Länge der Kernregion des Polysaccharids als Re, Rd, ..., Ra-LPS (komplettes Kernoligosaccharid) bezeichnet und die zugehörigen Stämme als Raumutanten, bzw. bei Re-LPS als Tiefrau-, aufgrund ihrer rauen Koloniemorphologie (Lüderitz et al., 1982). Re-LPS ist das kürzeste LPS, welches in der Natur vorkommt (Raetz, 1993). Dessen Kernregion besteht nur aus zwei einfach-negativ geladenen 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure (Kdo).

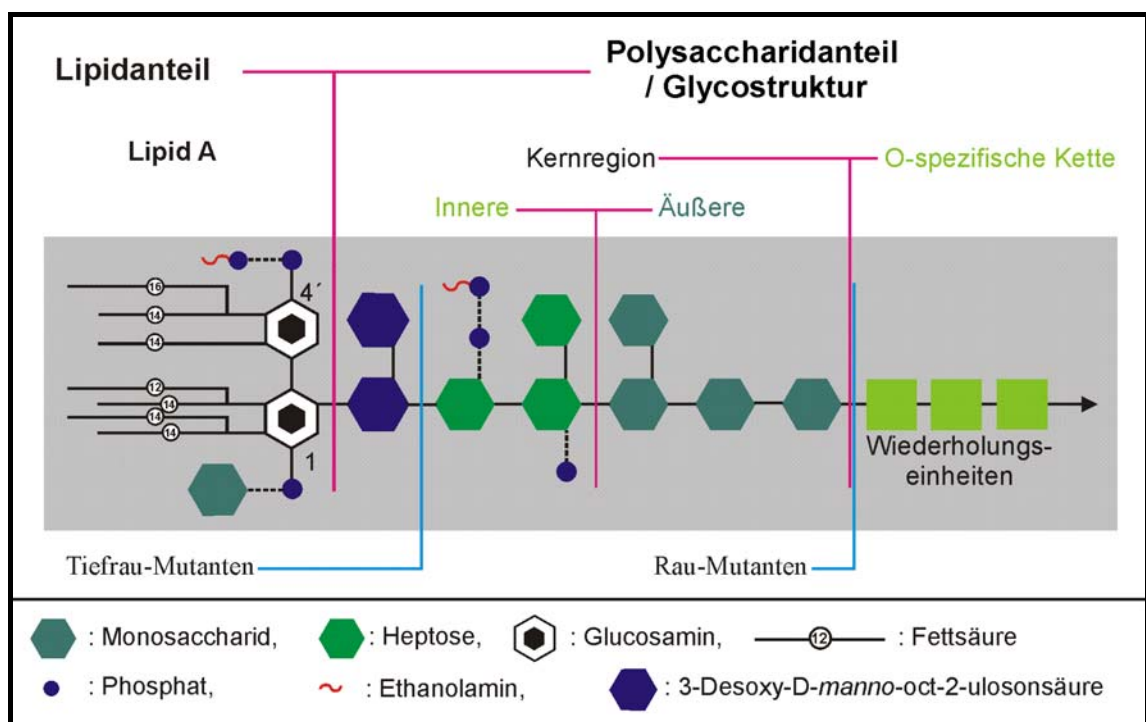


Abbildung 4: Allgemeine Struktur von Lipopolysaccharid. Das amphiphile Molekül besitzt einen hydrophoben Lipidanteil, bestehend aus Lipid A, und einen hydrophilen Polysaccharidanteil, der sowohl in der Länge als auch in der exakten Komposition stark variieren kann. Diese Glycostruktur wird in Kernregion Kette und O-spezifische unterteilt, wobei zwischen innerer und äußerer Kernregion unterschieden wird. Bindungen von möglichen Substituenten wie Phosphatgruppen oder Monosacchariden sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Je nach Länge der Kernregion des korrespondierenden LPS werden Bakterien als Rau- oder Tiefrau-Mutanten bezeichnet. Die in der Abbildung verwendeten Symbole sind in der Legende erklärt.

Für die vorliegenden Untersuchungen des Einflusses der Glycostruktur und von Ladungssubstitution im Lipid A-Teil des LPS auf die Interaktion mit Peptiden wurden gezielt Bakterien ausgewählt, die sich in ihren LPS-Strukturen unterschieden. Die durchschnittliche Nettoladung, die wie in der gesamten Arbeit als Vielfaches der Elementarladung angegeben ist, berechnet sich aus den beiden Kdo der Kernregion, der Anzahl an Phosphatgruppen und Aminoarabinosen. Diese Gruppen wurden massenspektrometrisch nachgewiesen (PD Dr. B. Lindner, FZ Borstel). Die Phosphatgruppen besitzen jeweils eine negative Ladung, während die Aminoarabinosen eine positive Ladung tragen und damit die negative Netto-Ladung im Lipid A-Teil reduzieren.

Zur Ermittlung des Einflusses der Glycostruktur wurden Stämme von *Salmonella enterica* serovar Minnesota (*S. minnesota*) verwendet, die LPS-Varianten mit unterschiedlich langer Kernregion besitzen, die sogenannten Chemotypen. Diese sind in Abb. 5 dargestellt. Alle *S. minnesota*-LPS haben 2 Phosphatgruppen im Lipid A und eine variierende Anzahl am Kernoligosaccharid. Das LPS des Stammes R595 (im Folgenden als R595-LPS bezeichnet) besitzt als einziges LPS der Reihe eine teilweise Ladungssubstitution im Lipid A-Bereich, da bei 40% der Moleküle das 1 bzw. 4' Phosphat mit einer Aminoarabinose (Ara4N) substituiert sind. Die genaue Position ist nicht bekannt. Damit ergeben sich die in Abb. 5 angegebenen Ladungen.

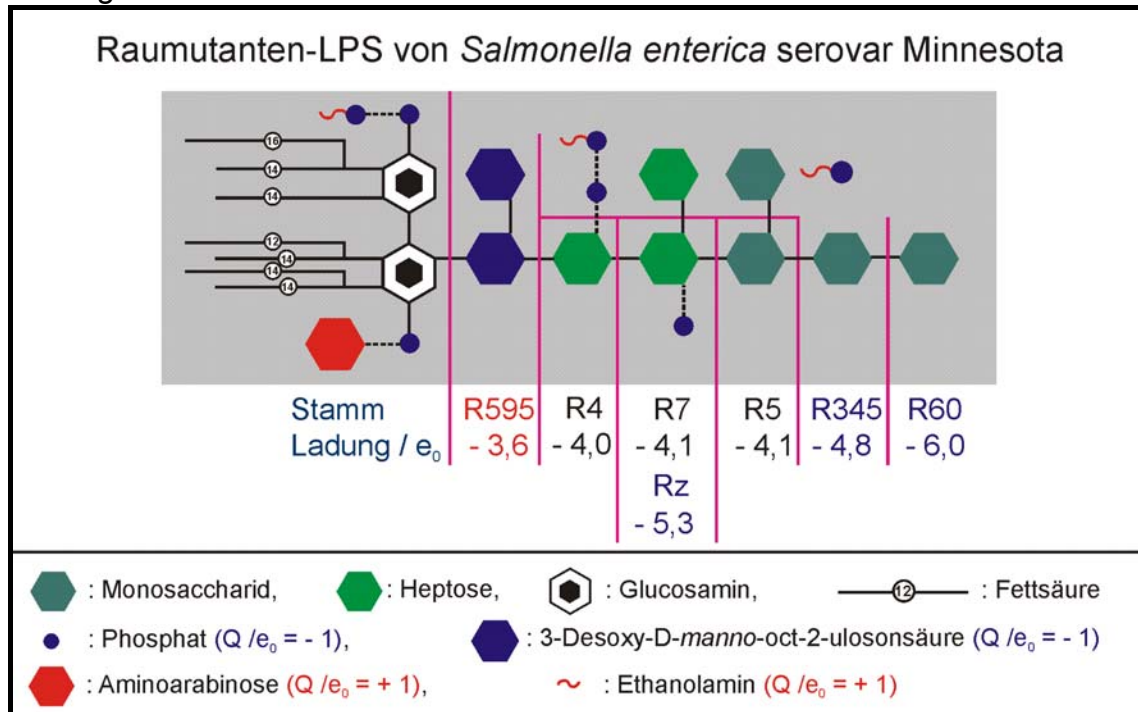


Abbildung 5: Raumutanten-LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota mit unterschiedlicher Glycostruktur im Kernoligosaccharid. Angegeben sind die Stämme, die das entsprechende LPS exprimieren und die Nettoladung des LPS. Nur R595-LPS besitzt eine Ladungssubstitution durch Aminoarabinose im Lipid A –Teil.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ladungssubstituenten im Lipid A- und Kdo-Bereich wurden verschiedene Bakterien-Spezies verwendet, die TiefraumlPS exprimieren. Dabei unterscheiden sich die LPS in Anzahl und Position der Aminoarabinose (Ara4N), welche die Netto-Ladung reduziert. Die genaue Verteilung der an die Phosphatgruppe gebundenen Ara4N (ob an 1- oder 4'-Phosphat) ist nicht bekannt. In Abb. 6 sind die verwendeten LPS schematisch dargestellt und die Position und Anzahl der substituierten Ara4N ist angegeben. Das Ko2b-LPS von einem *Burkholderia cepacia* Stamm besitzt als einziges verwendetes LPS kein zweites Kdo, sondern stattdessen eine *D-glycero-D-talo-oct-2-ulonsäure* (Ko) (Gronow et al., 2003). In Tabelle 3 sind alle verwendeten LPS mit den korrespondierenden Stämmen, molaren Massen und Ladungen angegeben.

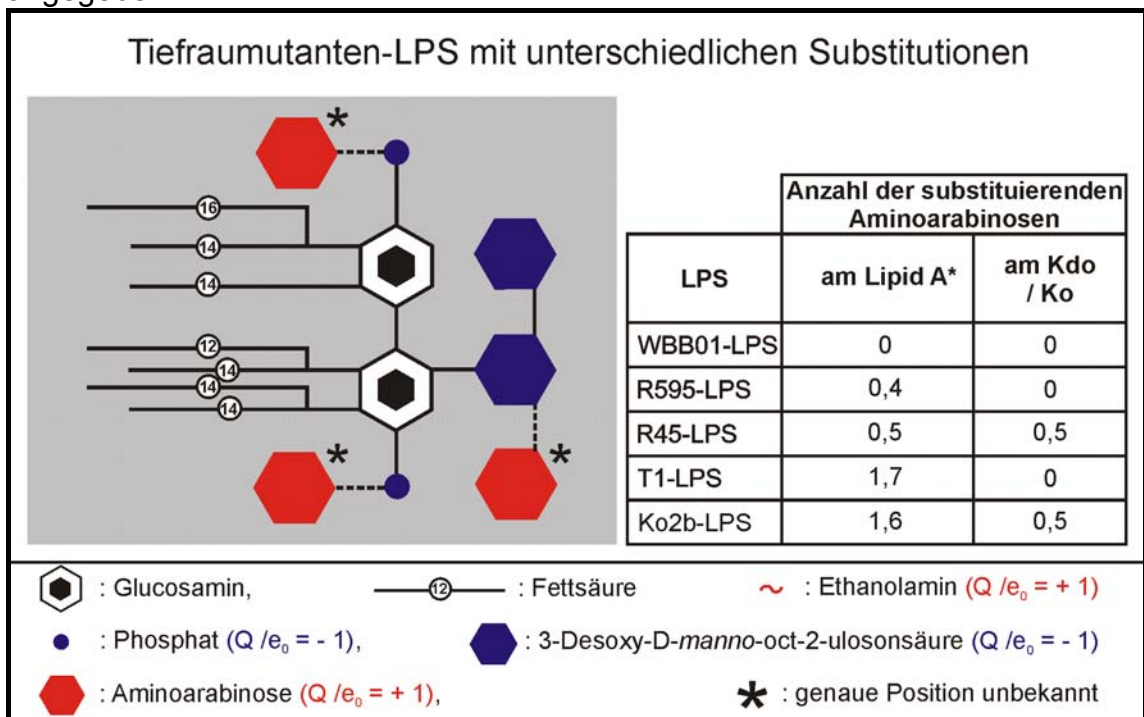


Abbildung 6: Schema der Substitutionen an TiefraumlPS. Einige verwendete LPS unterscheiden sich durch substituierte Ara4N. Diese sind in der Tabelle mit der Position und der durchschnittlichen Anzahl an Ara4N angegeben. Die exakte Position der Substituenten am Lipid A ist nicht bekannt.

## 2.4. Aktivierung von humanen Immunzellen durch Lipopolysaccharid

LPS im Blutkreislauf kann eine inflammatorische Überreaktion des humanen Immunsystems induzieren und damit eine Sepsis auslösen. Die inflammatorische Antwort des Immunsystems wird durch Reaktion des LPS mit bestimmten Immunzellen initiiert. Diese Zellen schütten in Folge dessen eine erhöhte Anzahl an serumständigen Botenstoffen, sogenannte Zytokine aus. Diese aktivieren ihrerseits weitere Zellen des Abwehrsystems. Ist die

Zytokinproduktion zu hoch, kann sich die Immunantwort gegen den Wirt selber richten und es kann zu einer fatalen Sepsis kommen.

Die Aktivierung von humanen Immunzellen durch LPS ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und wird im Folgenden vereinfacht dargestellt (Abb. 7).

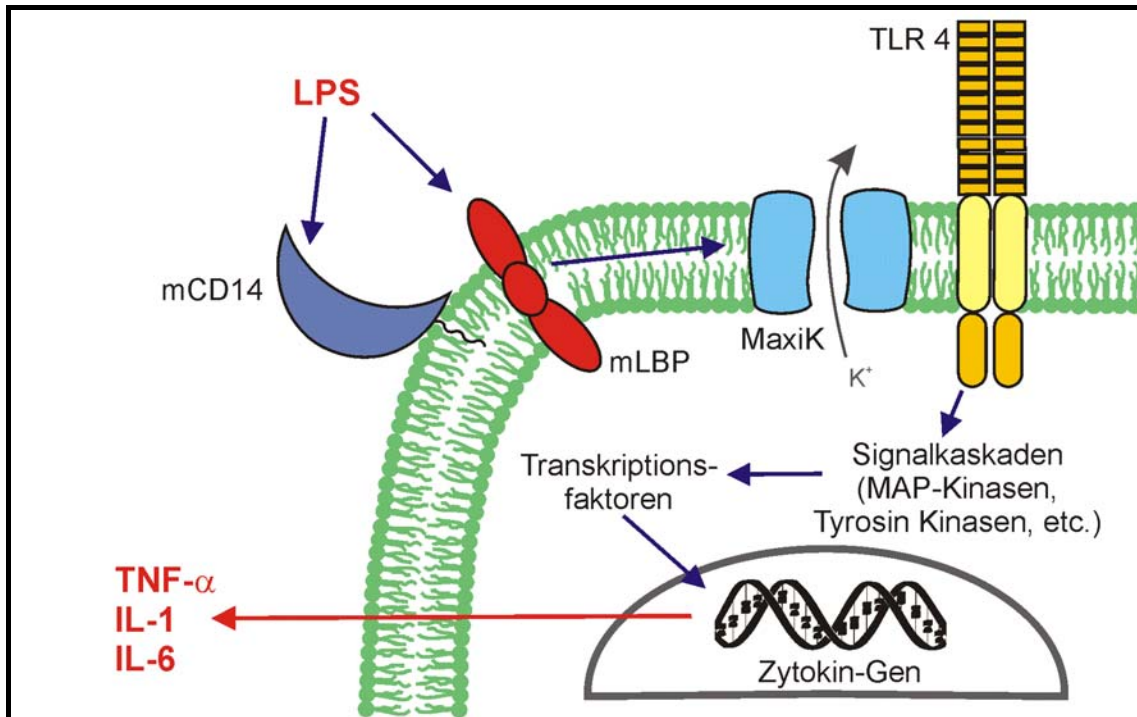


Abbildung 7: Stark vereinfachtes Schema des Signalweges (blaue Pfeile) bei der Aktivierung von Immunzellen durch LPS. Nach Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche wie CD14 und / oder LBP wird das Signal über Proteine wie den Kaliumkanal MaxiK oder TLR4 ins Zellinnere vermittelt. Dort werden durch eine Signalkaskade die Transkriptionsfaktoren reguliert. Durch Promotion der Transkription wird infolge dessen eine erhöhte Anzahl an Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6 ins umgebene Medium ausgeschüttet.

Eingeleitet wird sie durch die Bindung von LPS an die Zelloberfläche von Immunzellen, hauptsächlich mononukleäre Zellen (MNC) wie z.B. Makrophagen. Verschiedene LPS-bindende Proteine der Zellmembran wurden bereits identifiziert, deren genaues Zusammenspiel und die Signalweiterleitung in der Zelle sind jedoch nur in Ansätzen bekannt. Als Rezeptor konnte z.B. CD14 identifiziert werden (Wright et al., 1990; Lee et al., 1992). Ein weiteres wichtiges Protein zur Bindung und Detektion ist das LPS-bindende Protein (LBP), welches je nach Konzentration die Immunantwort insgesamt deutlich verstärken (Schumann et al., 1990) oder aber auch abschwächen kann (Wurfel et al., 1994). Auch wenn die exakte Funktionsweise noch umstritten ist (Tobias und Ulevitch, 1994; Schromm et al., 1996b), ist die membranständige Form mLBP wohl in der Lage, LPS-Aggregate zu detektieren, zu binden und in die Membran der Immunzelle einzubauen (Gutsmann et al., 2001a; Gutsmann et al., 2001c). Bei der Signalweiterleitung in die Zelle spielt neben den Toll-like-



Rezeptoren (TLR) (Beutler, 2002) der Kaliumkanal MaxiK zusammen mit TLR4 eine wesentliche Rolle (Blunck et al., 2001; Seydel et al., 2001). Dabei wird eine Signalkaskade bestehend aus intrazellulären Botenstoffen wie z.B. MAP- oder Tyrosin-Kinasen ausgelöst. Diese regulieren die Transkriptionsfaktoren derart, dass eine Promotion der Transkription von bestimmten Genabschnitten erfolgt, welche für Zytokine codierend sind. Diese werden darauf in erhöhter Anzahl von der Zelle ausgeschüttet. Im Serum leiten die Zytokine per Chemotaxis Immunzellen zum Ort der höchsten Zytokinkonzentration, der Entzündung. Außerdem gelangen sie zu weiteren Immunzellen und regulieren deren Aktivität. Damit stellt die Zytokinproduktion einen ersten Schritt der Immunantwort dar. Gelingt es, sie durch externe Applikation von antiinflammatorischen Substanzen zu regulieren, kann die Entstehung einer Sepsis frühzeitig verhindert werden.

## 2.5. Phospholipide

Glycerophospholipide, im Folgenden kurz als Phospholipide bezeichnet, sind wie das LPS amphiphile Moleküle. Sie bilden sowohl die innere Schicht der äußeren Membran als auch die Zytoplasmamembran bei Gram-negativen Bakterien, dabei variiert allerdings deren exakte Komposition.

Das Glycerol als Strukturzentrum ist verestert mit einer Hydroxygruppe, die ein enPhosphorsäurerest trägt. Diese Struktur bildet die hydrophile Kopfgruppe des Phospholipids zusammen mit verschiedenen Resten (Abb. 8). Ist dies z.B. ein weiteres Glycerol oder ein Ethanolamin, so ergibt das Phosphatidylglycerol (PG) bzw. Phosphatidylethanolamin (PE).

Zusätzlich ist an das Glycerol der unpolare, also hydrophobe Anteil des Lipids gebunden. Dieser Anteil besteht meistens aus zwei aliphatischen Fettsäureketten mit einer Länge von 14 bis 24 Kohlenstoffatomen. Eine Ausnahme bildet das Diphosphatidylglycerol (DPG), welches auch als Cardiolipin bezeichnet wird. Dabei sind zwei Phosphatidylreste an ein Glycerol gebunden.

Sowohl die innere Schicht der äußeren Membran als auch die Zytoplasmamembran der Gram-negativen Bakterien werden von den Phospholipiden PE, PG und DPG gebildet. Bei der Zytoplasmamembran von dem Bakterium *Salmonella typhimurium* liegen diese in einem molaren Verhältnis von PE : PG : DPG = 81 : 17 : 2 vor (Osborn et al., 1972). Die gleichen Phospholipide kommen auch bei anderen Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) in der Zytoplasmamembran vor. Das Phospholipid PC stellt den größten Anteil an Lipiden der Zellmembran humaner Zellen dar (Boon und Smith, 2002). Das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) kommt in geringem Maße vor, allerdings in höherer Konzentration bei Tumorzellmembranen (Boon und Smith, 2002). Die chemischen Strukturen von den in dieser Arbeit verwendeten Phospholipiden sind in Abb. 8 dargestellt. Sie

sind ein aufgereinigtes natürliches Gemisch verschiedener Herkunft und besitzen deshalb eine heterogene Verteilung der Fettsäurekettenlängen.

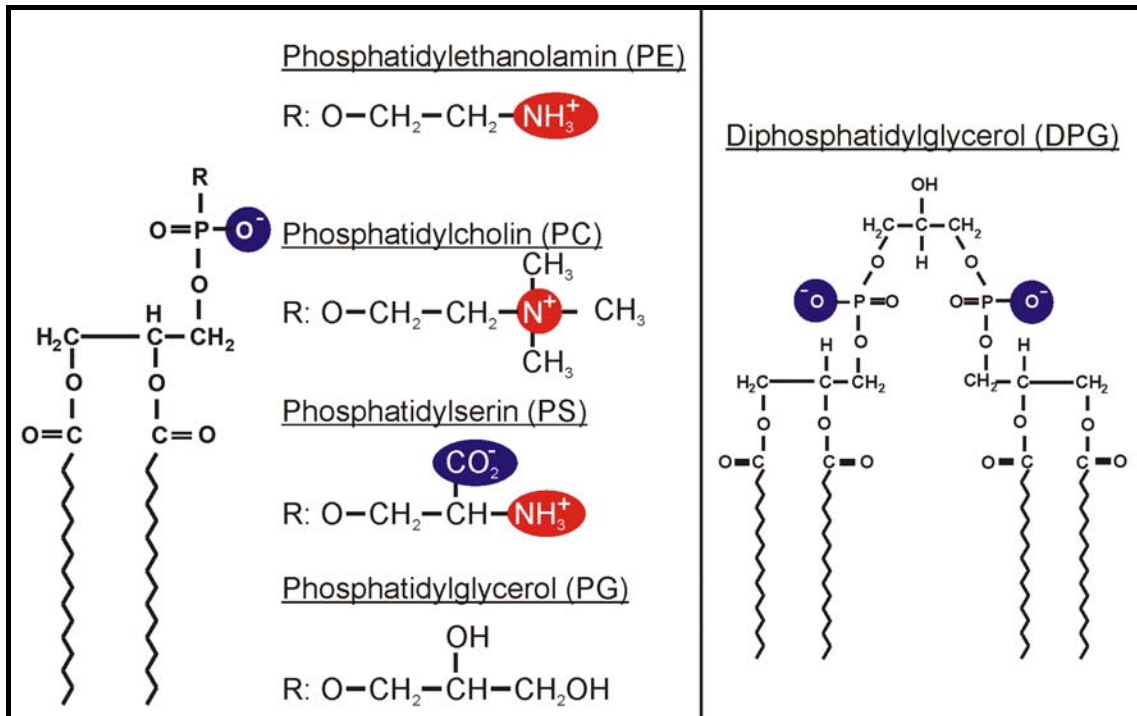


Abbildung 8: Chemische Strukturen der verwendeten Phospholipide Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Diphosphatidylglycerol. PE und PC tragen keine Nettoladung, PS und PG sind einfach negativ geladen und DPG trägt zwei Elementarladungen. Die dargestellte C14-Fettsäurekette ist beispielhaft, die eingesetzten Phospholipide besaßen aufgrund ihrer natürlichen Herkunft eine heterogene Fettsäurenkette.

## 2.6. Selbstorganisation amphiphiler Moleküle

Moleküle können in Lösung aufgrund von Ladungswechselwirkungen aggregieren und Überstrukturen bilden.

Polare Bereiche eines Moleküls werden als hydrophil bezeichnet, da sie mit anderen polaren Molekülen wie Wasser elektrostatische Bindungen wie Wasserstoffbrücken eingehen. Die Bindungsenergie führt zu einer Minimierung der Gibbs'schen Freien Energie des Gesamtsystems. Damit sind hydrophile Bereiche vornehmlich von anderen hydrophilen Molekülen oder Molekülregionen umgeben, da nach dem thermodynamischen Prinzip zur Minimierung der Gibbs'schen Freien Energie das Gesamtsystem dann einen energetisch günstigen Zustand einnimmt.

Unpolare Bereiche eines Moleküls werden hydrophob genannt, da sie nicht die durch Ladungswechselwirkung hervorgerufenen Bindungen eingehen können, außer den schwachen Van-der-Waals-Bindungen. Das Gibbs'sche Prinzip führt deshalb dazu, dass die hydrophilen Moleküle sich mit anderen hydrophilen Molekülen umgeben, so dass die hydrophoben Moleküle ausgeschlossen



werden. Damit werden sie an Grenzflächen verdrängt oder bilden geschlossene Bereiche mit minimaler Kontaktfläche zum Wasser. Dieses indirekte Bestreben hydrophober Moleküle, sich mit anderen hydrophoben Molekülen zu umgeben, wird auch häufig als hydrophobes Moment bezeichnet. Dies ist die Änderung der Gibbs'schen Freien Energie, die durch den Wechsel von Wasser zu einer hydrophoben Umgebung verursacht wird. Als ein hohes hydrophobes Moment wird dabei eine stark negative Änderung der Gibbs'schen Freien Energie bezeichnet.

Besitzt ein Molekül sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche, wird es als amphiphil bezeichnet. Damit nimmt es einen energetisch günstigen Zustand an, wenn die einen Bereiche eine hydrophobe Umgebung haben, die anderen eine hydrophile. Dies ist an Grenzflächen von hydrophilen und hydrophoben Bereichen der Fall. Eine solche Grenzfläche liegt bei einer Membran im Übergangsbereich von den Kopfgruppen zu den Fettsäuren der Lipide vor. Amphiphile Peptide haben deswegen die Neigung, sich dort einzulagern. Zum anderen können die amphiphilen Moleküle derart miteinander aggregieren, dass ihre hydrophoben Bereiche miteinander Kontakt haben und ihre hydrophilen ebenfalls mit anderen polaren Molekülbereichen oder Wasser. Dies führt dazu, dass amphiphile Moleküle wie Phospholipide und LPS in wässriger Umgebung oberhalb einer molekülspezifischen Konzentration miteinander Aggregate bilden. Die Konzentration, ab der diese Selbstorganisation eintritt, wird als CAC bezeichnet (*Critical Aggregate Concentration*, Kritische Aggregat Konzentration, (Abb. 9, (Israelachvili, 1991))). Die Form der entstehenden Aggregate hängt dabei sowohl von der Form als auch von der Ladungsverteilung der beteiligten Moleküle ab.

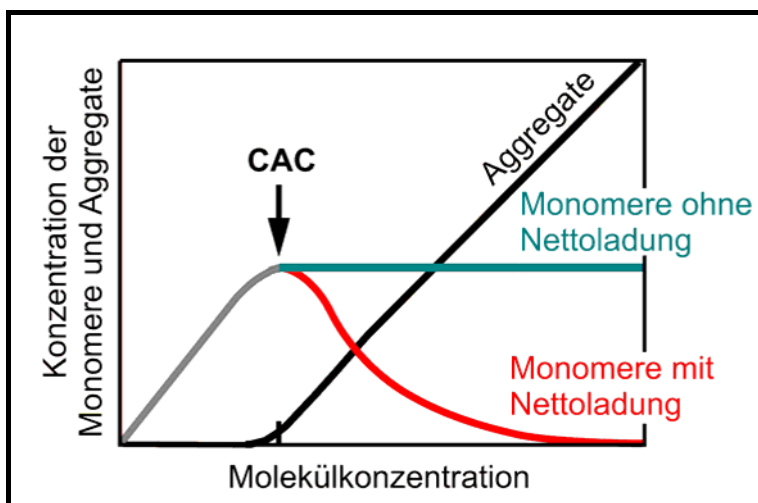


Abbildung 9: Abhängigkeit der Monomer- und Aggregatkonzentration von der Molekülkonzentration. Ab der markierten *Critical Aggregate Concentration* nimmt die Konzentration der Monomere nicht mehr zu.

Bei sehr niedriger Konzentration liegen die amphiphilen Moleküle noch vereinzelt in Lösung vor und werden als Monomere bezeichnet. Mit steigender Konzentration nimmt die Anzahl der Monomere bis zur molekülspezifischen CAC zu (Abb. 9). Ab dieser lagern sich die Monomere zusammen und bilden Aggregate unterschiedlichster Form wie z.B. kugelförmigen Mizellen, die eine geschlossene kugelförmige Einzelschicht darstellt, oder uni- oder multilamellare Vesikel, welche aus einer oder mehreren kugelförmig geschlossenen Doppelschichten bestehen. Die Gestalt der Aggregate hängt von den beteiligten Molekülen ab, eine bedeutende Größe ist die Form des Moleküls (*shape*). Bei weiter steigender Konzentration der amphiphilen Moleküle bilden sich immer mehr Aggregate, während die Anzahl der Monomere gleich bleibt bzw. bei Lipiden oder LPS mit Nettoladung sinkt (Israelachvili, 1991). Auch wenn bei gleichbleibender Konzentration die Anzahl der Aggregate und der Monomere konstant bleibt, so unterliegen sie aufgrund des dynamischen Reaktionsgleichgewichts einem stetigen Austausch. Die mittlere Zeit, die ein Molekül in einem Aggregat verbleibt, wird als Residenzzeit bezeichnet. Sie ist antiproportional zur CAC. Für mizellierende Lipide mit einer CAC von 1 mM beträgt sie 0,1 ms, für Lipiddoppelschichten bereits Stunden (Israelachvili, 1991; Brandenburg und Wiese, 2004).

Eine herausragende Bedeutung für die Biologie haben lamellare Strukturen die z.B. durch geschlossene planare Doppelschichten bei Zellmembranen eingenommen werden. Sie bilden aufgrund des Gibbs'schen Gesetzes zur Minimierung der Freien Energie eine sich selbst organisierende stabile Struktur, die von fast keinem hydrophilen Molekül passiert werden kann, da sie das hohe Gesamtpotential der Membran (2.7.) überwinden müssten. Damit ist eine Lipiddoppelschicht eine impermeable Barriere, die einen umgebenen Bereich von der Umgebung abgrenzt.

Die LPS-Aggregate, die in dieser Arbeit als bakterielle Modellmembran verwendet wurden, sind außerordentlich stabil aufgrund einer Residenzzeit von wahrscheinlich Monaten (Buschner, 1999). Die LPS bilden schon ab sehr geringen Konzentrationen Aggregate mit geschlossener LPS-Oberfläche.

## 2.7. Membranpotential

Über der Membran eines biologischen Organismus befindet sich in der Regel eine elektrische Potentialdifferenz und damit eine Spannung. Diese ist essentiell für das Überleben des Organismus, da nur durch sie eine kontrollierte Stoffaufnahme, wie z.B. die Nährstoffzufuhr, über die Membran gewährleistet wird (Matsuzaki et al., 1996). Außerdem wird durch die Spannung die Ausrichtung von Peptiden und Proteinen in der Membran reguliert (Gutsmann et al., 2001b). Das Gesamtpotential setzt sich aus verschiedenen Anteilen zusammen; zum einen aus dem aus der Ionenkonzentration der Umgebung verursachtem transmembranen Potential und zum anderen aus dem intrinsischen Potential, welches von den membranbildenden Lipiden selbst

verursacht wird. Damit sind interne und externe Komponenten für den Potentialverlauf über einer Membran entscheidend.

Das transmembrane Potential lässt sich mit Hilfe der Goldman-Gleichung berechnen.

$$(F1) \quad U_{trans} = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_i P_i C_{i,cis}}{\sum_i P_i C_{i,trans}}$$

mit  $P_i$  = Permeabilitätskoeffizient der Ionensorte  $i$

$C_{i,cis}$  = Konzentration der Ionensorte  $i$  im Zelläußeren

$C_{i,trans}$  = Konzentration der Ionensorte  $i$  im Zellinneren

Das transmembrane Potential ist die treibende Kraft für gesteuerte Transportprozesse über eine Membran und beeinflusst die Ausrichtung von Proteinen und Peptiden in oder an einer Membran. Es beträgt im Falle der zytoplasmatischen Membran ca. -60 mV, für die äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien ca. -26 mV (Sen et al., 1988), wobei die Zellumgebung als Nullpotential gesetzt wurde.

Das intrinsische Potential lässt sich weiter aufteilen, je nach Ursache der Potentialänderung. Die Umgebungsänderung aus einer hydrophilen (wässriger Puffer) zu einer hydrophoben Umgebung in der Membran bedingt ein zu überwindendes Potential, wenn ein hydrophiler Stoff die Membran passieren will. Dieses sogenannte Born-Potential ist für alle verwendeten Peptide stark positiv und ist zusammen mit dem ebenfalls positiven Dipol-Potential der Grund dafür, weshalb die verwendeten Peptide keine intakte Membran passieren können. Das Dipol-Potential wird durch Ausrichtung von Wassermolekülen an den eventuell polarisierten Lipidkopfgruppen und der daraus resultierenden Änderung der Dipolladungsverteilung hervorgerufen. Die dritte intrinsische Membranpotentialkomponente ist das sogenannte Gouy-Chapman-Potential, ein durch eventuelle Ladungen oder Teilladungen der Kopfgruppen verursachtes elektrostatisches Oberflächenpotential. Dieses Potential ist maßgeblich für das sogenannte Zeta-Potential (3.8.1.), welches in einem bestimmten Abstand zur Membran definiert ist und zusätzlich durch direkt an die Membran angelagerte Ionen reduziert ist. Es wird im Folgenden ausführlicher dargestellt. Da die anderen Potentialanteile in dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung sind, wird für eine tiefergehende Beschreibung auf die Literatur verwiesen (Neumecke und Läger, 1969; McLaughlin, 1977; Gawrisch et al., 1992).

In Abb. 10 sind die intrinsischen Potentiale nach Schoch (Schoch und Sargent, 1976) dargestellt. Die drei Einzelpotentiale beider Schichten einer Membran überlagern sich zum ebenfalls dargestellten Gesamtpotentialverlauf. Werden die beiden Einzelschichten der Membran von unterschiedlichen Lipiden

gebildet, ist die Membran also asymmetrisch, besitzen die unterschiedlichen Einzelschichten verschiedene Gouy-Chapman- und Dipol-Potentiale. Damit ist der Potentialverlauf asymmetrisch.

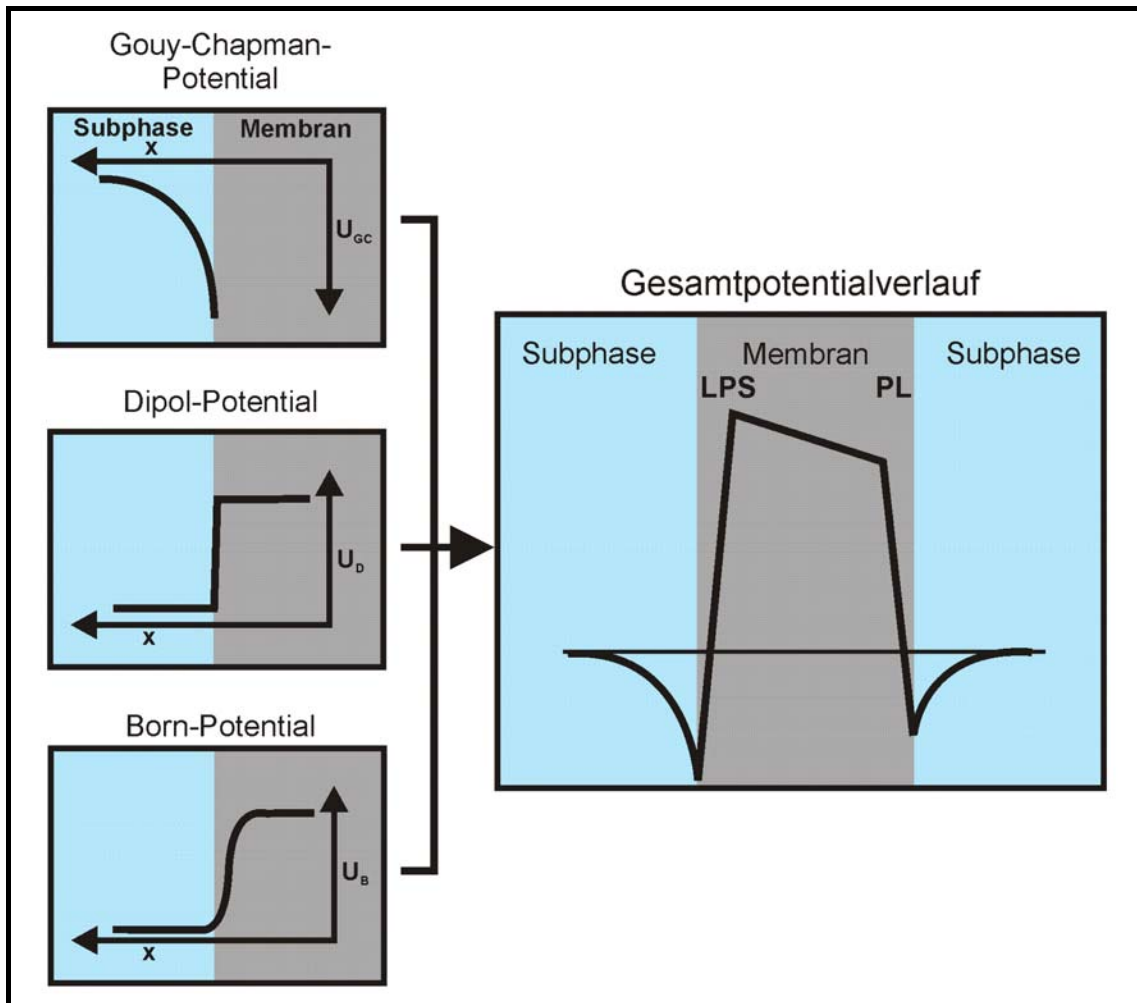


Abbildung 10: Potentialverlauf über einer Membran mit asymmetrischer Lipidkomposition (Schoch und Sargent, 1976). Das Gouy-Chapman-Potential wird durch Ladungen der Lipide verursacht, das Dipol-Potential entsteht durch Ausrichtung der Wasser-Dipole und das Born-Potential wird durch den Wechsel der Umgebung von hydrophil zu hydrophob erzeugt. Die drei Potentiale von beiden Lipid-Einzelschichten überlagern sich zum Gesamtpotential, das eine Membran über sich aufbaut.

## 2.8. Gouy-Chapman-Potential

Zur Beschreibung von elektrischen Potentialen von Membranoberflächen wurde von Gouy und Chapman ein nach ihnen genanntes Modell entwickelt. Dessen Grundlage ist die Poisson-Gleichung, mit der die elektromagnetische Wechselwirkung zwischen Membran und Ionen beschrieben wird, und die Boltzmann-Gleichung, mit der die Ionendiffusion beschrieben wird (Cevc, 1990).

Das Gouy-Chapman-Modell geht von folgenden Vereinfachungen aus:

- $\delta$ -funktionsartige Verteilung der Ladungsdichte an der Grenzfläche von Lipid zur wässrigen Umgebung
- keine Wechselwirkung der Ionen miteinander
- keine Membrananlagerung von Ionen
- wässrige Phase ist homogen und damit ist deren Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon$  konstant

Für das Gouy-Chapman-Potential gilt (Cevc, 1990):

$$(F2) \quad \Psi_0 = 2 \frac{kT}{Ze_0} \operatorname{arsinh} \frac{\sigma}{K\sqrt{J}} \quad \text{mit } K = \frac{1}{\sqrt{8000\varepsilon\varepsilon_0 NkT}}$$

$Z$  = Wertigkeit der Ionen  
 $\varepsilon$  = Dielektrizitätskonstante der wässrigen Phase

Die Ionenstärke der wässrigen Phase  $J$  wird durch die Konzentration der einzelnen Ionensorten  $i = 1, \dots, n$  bestimmt (Adam et al., 1995):

$$(F3) \quad J = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad \text{mit } z_i = \text{Wertigkeit der Ionensorte } i$$

$c_i$  = Konzentration der Ionensorte  $i$

Die Oberflächenladungsdichte  $\sigma$  berechnet sich zu:

$$(F4) \quad \sigma = \frac{ze_0}{A} \quad \text{mit } z = \text{Ladungszustand des Lipids}$$

$A$  = Platzbedarf eines Lipidmoleküls

Das Potential ist nach (F2) abhängig von der Ionenstärke der wässrigen Phase und der Oberflächenladungsdichte  $\sigma$ . Die Reichweite wird durch die Debye (-Hückel) Länge  $\lambda_D$  beschrieben. Sie gibt die Entfernung an, in der das Potential auf den e-ten Teil abgefallen ist.

$$(F5) \quad \lambda_d = \frac{1}{F} \sqrt{\frac{\varepsilon\varepsilon_0 RT}{2000J}}$$

Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine Adsorption der Ionen an der Membran eine nicht zu vernachlässigende Größe ist (McLaughlin, 1977; Cevc, 1990; Egorova et al., 1992). Durch Anlagerungen von Konterionen, die sogenannte Langmuir-Adsorption, wird die Oberflächenladung teilweise kompensiert. Dies ist in der Gouy-Chapman-Stern-Approximation berücksichtigt:

$$(F6) \quad \sinh\left(\frac{\varepsilon_0 \Psi_0}{2kT}\right) \frac{-K\sigma}{\sqrt{J\left(1 + KJ \exp\left(\frac{\varepsilon_0 \Psi_0}{kT}\right)\right)}} = 0$$

Falls das Potential größer als  $RT / F = 25 \text{ mV}$  ist, besitzt es keinen exponentiellen Abfall. Dies war bei allen in dieser Arbeit verwendeten Lipidschichten der Fall. In diesen Fällen wird das Potential folgendermaßen beschrieben (McLaughlin, 1989):

$$(F7) \quad \Psi(x) = \frac{2kT}{e_0} \ln \frac{1 + \alpha \exp\left(\frac{-x}{\lambda}\right)}{1 - \alpha \exp\left(\frac{-x}{\lambda}\right)} \quad \text{mit } \alpha = \frac{\exp\left(\frac{e_0 \Psi_0}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{e_0 \Psi_0}{2kT}\right) + 1}$$

## 2.9. Optische Dichte

In dieser Arbeit wurde die Zelldichte von Bakterien und Zellen über die Messung der optischen Dichte einer Zellsuspension bestimmt.

Die optische Dichte ist ein Maß für die Konzentration eines Lichtabsorbers. Sie kann durch Intensitätsmessungen bestimmt werden.

Die optische Dichte OD oder Extinktion ist definiert als:

$$(F8) \quad OD_\lambda = -\ln \frac{I}{I_0} \quad \begin{array}{l} \text{mit } I : \text{ Intensität} \\ I_0 : \text{ einfallende Intensität} \end{array}$$

Mit dem Beer'schen Gesetz über die Abhängigkeit der Intensität  $I$  in Abhängigkeit von Wellenlänge  $\lambda$  und Wegstrecke  $x$ :

$$(F9) \quad I(\lambda, x) = I_0(\lambda) \cdot \exp(-\sigma(\lambda)cx) \quad \begin{array}{l} \text{mit } I_0 : \text{ einfallende Intensität} \\ \sigma : \text{ spezifischer Wirkungsquerschnitt des} \\ \quad \text{absorbierenden Mediums} \\ c : \text{ Konzentration des Absorbers} \end{array}$$

ergibt sich nach Umformung:

$$(F10) \quad OD_\lambda = \sigma(\lambda)cx$$

Damit ist bei gleicher durchlaufener Strecke im gleichen absorbierenden Medium die optische Dichte linear von der Konzentration abhängig. Durch eine Kalibriergerade von anderweitig bestimmten Konzentrationen mit dessen OD kann somit jede Konzentration durch eine Extinktionsmessung bestimmt werden. Wird die Steigung der Geraden bestimmt, so lässt sich bei bekannter Wegstrecke der spezifische Wirkungsquerschnitt berechnen.

## 2.10. Antibakterielle Peptide

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid Polymyxin B wird gemeinsam mit dem humanen Kathelizidin hCAP18 vorgestellt. LL-32, ein aktives Fragment des hCAP18, wird neben weiteren Fragmenten in dieser Arbeit ebenfalls auf die Interaktion mit LPS und Bakterien untersucht. In der Literatur ist das Peptid LL-37, welches fünf Aminosäuren größer als LL-32 und ebenfalls ein aktives Fragment vom hCAP18 ist, gut beschrieben. Andere in der Literatur beschriebene Fragmente vom hCAP18 / LL-37 sind im Appendix aufgeführt.

### 2.10.1. Polymyxin B

Polymyxin B, ein 1947 erstmalig isoliertes Stoffwechselprodukt des Gram-positiven Bakteriums *Bacillus polymyxa*, ist ein zyklisches, fünffach positiv geladenes Decapeptid mit einem verzweigten Fettsäurerest (Abb. 11). Es ist ein membranaktives Peptid und gehört nach einer Einteilung von Hancock zur Gruppe der „loops“ (verbrückte Peptide) (Hancock, 1997). Es existieren 11 verschiedene Varianten vom PMB, die sich in der Länge des Fettsäurerest unterscheiden. Die beiden Varianten PMB<sub>1</sub> mit Isopelargonsäure (5-(oder 2-)Methyl-Hepta-acyl) und PMB<sub>2</sub> mit (5-(oder 2-)Methyl-Hexa-acyl) stellen dabei den Hauptanteil dar (Elverdam et al., 1981).

PMB besitzt ein antibakterielles Wirkspektrum gegen Gram-negative Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* und verschiedene *Pseudomonas* und *Salmonella* Spezies (Evans et al., 1999). Es existieren allerdings auch PMB-resistente Gram-negative-Spezies, wie z.B. *Proteus mirabilis* und *Sphingomonas paucimobilis*. PMB zeigt keine Wirkung gegen Gram-positive Bakterien und auch nicht gegen Mykobakterien (Otten et al., 1975). Das Peptid besitzt eine LPS-bindende und –neutralisierende Eigenschaft und wirkt damit einer Sepsis (2.1.) entgegen (Baldwin et al., 1991; Jiang et al., 2004; Cirioni et al., 2006). Dies konnte auch im Tiermodell gezeigt werden (Rifkind, 1967; Cirioni et al., 2006). Unglücklicherweise ist PMB aber auch zytotoxisch, was die medizinische Verwendung stark einschränkt (Vinnicombe und Stamey, 1969; Kunin und Bugg, 1971). Es wird hauptsächlich für Oberflächenanwendungen (Drabick et al., 1998), wie z.B. bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen im Auge (Neosporin von Monarch Pharmaceuticals, Bristol, Groß Britannien) oder als letztes Notfallmittel im Falle einer Sepsis verwendet.

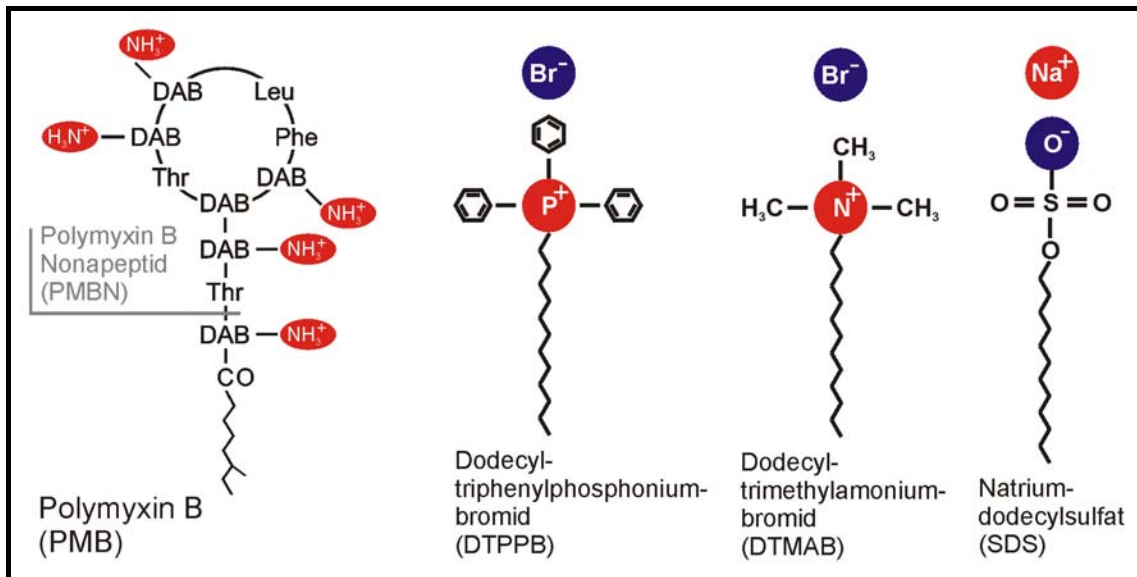


Abbildung 11: Struktur von PMB und seinem Derivat PMB-N, welches sich durch das Fehlen einer Aminosäure und des Fettsäurerestes vom PMB unterscheidet. Die Strukturen der verwendeten Detergentien Dodecyltriphenylphosphoniumbromid, Dodecyltrimethylammoniumbromid und Natriumdodecylsulfat sind ebenfalls abgebildet. Sie sind in 3.1. beschrieben.

Wie aus Abb. 11 ersichtlich, ist Polymyxin B ein Decapeptid (DAB – Thr – DAB – DAB – D-Phe – Leu – DAB – DAB – Thr), wobei der C-Terminus von Threonin (Thr) (10. Aminosäure) durch eine Amidbindung mit der Seitenkette von der vierten Diaminobuttersäure (DAB) zu einem Ring verknüpft ist. Zusätzlich ist die N-terminale Diaminobuttersäure mit einer verzweigten Fettsäure acyliert. Alle Aminosäuren (AS) sind in der natürlich vorkommenden L-Konfiguration, mit Ausnahme vom Phenylalanin (Phe). Durch die nichtproteinogene Aminosäure Diaminobuttersäure ist das Peptid bei neutralem pH-Wert fünffach positiv geladen und damit bis auf einen hydrophoben Sektor, bestehend aus Phenylalanin und Leucin (Leu), hydrophil.

In Verbindung mit der hydrophoben Fettsäurekette ist PMB deshalb amphiphil. Diese Eigenschaft führt zur Aggregatbildung ab einer Konzentration von ca. 10 mM (Gutsmann, 1997). Aus der chemischen Summenformel  $C_{55}H_{96}N_{16}O_{13}$  ergibt sich eine molekulare Masse von ca. 1,3 kDa. Der maximale Durchmesser des Moleküls beträgt 1,23 nm (El Mashak und Tocanne, 1980).

Polymyxin B-Nonapeptid (PMBN) ist ein PMB-Derivat, bei welchem die acylierte DAB-Aminosäure durch Ficin oder Papain enzymatisch abgespalten wurde (Duwe et al., 1986). Damit besitzt PMBN eine Nettoladung von +4 und eine molare Masse von 963 Da. Die antibakterielle Wirkung ist gegenüber PMB stark reduziert, allerdings bindet es weiterhin LPS (Vaara und Vaara, 1983; Vaara, 1983). PMBN ist nicht zytotoxisch und kann die Wirkung anderer Antibiotika durch synergistische Effekte erhöhen (Vaara, 1992).



## 2.10.2. Kathelizidine

Kathelizidine sind Peptide mit einem konservierten N-Terminus, auch Cathelin (Cystein Protease Inhibitor) genannt, und einem variablen antibakteriellen C-Terminus. Sie unterstützen das Immunsystem in vielen Säugetieren und wurden z.B. in den Neutrophilen des Menschen, von Rindern und Schweinen gefunden [Übersicht (Zanetti et al., 1995; Zanetti et al., 2000; Yang et al., 2004)]. Sie werden als Präpropeptide synthetisiert. Die Prä-Sequenz besitzt eine Signalfunktion, die Speicherung erfolgt in der Proform, aus der das aktive Peptid proteolytisch freigesetzt wird. Erste Hinweise deuten auf eine antibakterielle und Protease-inhibierende Funktion der Pro-Sequenz hin (Zaiou et al., 2003).

Im Menschen befindet sich das Kathelizidin hCAP18, das *human Cationic Antimicrobial Peptide* bestehend aus 140 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18kDa, in Zellen des Immunsystems und an Grenzflächen unseres Körpers zur Umwelt, wie z.B. der Haut oder der Schleimhaut der Lunge.

### 2.10.2.1. hCAP18 und sein aktives Fragment LL-37

Als erstes Kathelizidin wurde in der Literatur CAP18 aus den Granulozyten des Kaninchens beschrieben, das aufgrund seiner LPS-Bindfähigkeit entdeckt wurde (Larrick et al., 1991). Über DNA-Vergleich wurde bald beim Menschen ein homologes Kathelizidin, das hCAP18, entdeckt (Larrick et al., 1995a) und aus den myeloiden Knochenmarkzellen isoliert (Agerberth et al., 1995; Cowland et al., 1995; Gudmundsson et al., 1996). Es ist bis heute das einzig entdeckte Kathelizidin des Menschen. Beim hCAP18 wird das aktive C-terminale Fragment hCAP18<sub>104-140</sub> als LL-37 (Sequenz: LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) bezeichnet, da es 37 AS lang ist und die ersten beiden Aminosäuren Leucin (L) sind. Das Fragment besitzt eine amphipatische  $\alpha$ -helikale Struktur und trägt eine Ladung von +6  $e_0$  bei physiologischem pH-Wert (Sigurdardottir et al., 2006). LL-37 gehört zur Gruppe der linearen  $\alpha$ -helikalen Peptide (Brogden, 2005). Es wird vom Kathelizidin durch die Proteinase-3 abgespalten (Gudmundsson et al., 1996; Sorensen et al., 2001). Auf der Haut wird LL-37 weitestgehend durch Proteasen weiter sezerniert, so dass kleinere Peptide wie z.B. RK-31 (Sequenz aus 31 AS beginnend mit RK), KS-30, KR-20 (Murakami et al., 2004), KS-30, KS-27, KR-20 oder LL-23 (Yamasaki et al., 2006) entstehen. Für eine genauere Beschreibung von LL-37 sei auf einen aktuellen und umfangreichen Übersichtsartikel verwiesen (Dürr et al., 2006).

### 2.10.2.2. Vorkommen

Mittlerweile wurde hCAP18 / LL-37 in den Granula der neutrophilen Granulozyten, in natürlichen Killerzellen, T-Helferzellen, B-Zellen,

Makrophagen, Alveolarmakrophagen (Agerberth et al., 1999; Agerberth et al., 2000) und in Gelenkknorpel (Varoga et al., 2005) nachgewiesen.

Außer in den genannten Zellen der angeborenen Immunabwehr befindet sich hCAP18 / LL-37 auch in der Epidermis sowohl der Haut / Hoden (Frohm et al., 1996; Frohm et al., 1997), als auch des Darms und der Lunge (Bals et al., 1998), also an Grenzflächen des Körpers zur Umwelt. Der Hauptzelltyp der Epidermis, die Keratinozyten, bildet als Teil der angeborenen Immunabwehr eine physikalische Barriere (Ganz, 2002) gegen eindringende Pathogene. Während einer entzündlichen Reaktion setzen diese Zellen nicht nur Mediatoren frei, die phagozitierende Leukozyten herbeiholen (Bals, 2000; Zanetti, 2004), sondern exprimieren auch hCAP18 / LL-37. Die Expression kann durch Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise dem Interleukin-6, stimuliert werden (Frohm et al., 1997). Auch bei einer Verletzung der Epithelzellen ist die Produktion von hCAP18 / LL-37 erhöht (Dorschner et al., 2001). In Wundflüssigkeiten kann die Konzentration bis zu 5 µg / ml erreichen (Schaller-Bals et al., 2002). Zusätzlich wird hCAP18 / LL-37 von weiteren Zellen der Haut, wie den Neutrophilen (Turner et al., 1998), Mastzellen (Di Nardo et al., 2003) und Schweißdrüsen (Murakami et al., 2002), hergestellt. Die Bedeutung von hCAP18 / LL-37 und anderen Peptide des Immunsystems für die cutane Abwehr gegen eindringende Bakterien (Nizet et al., 2001) wird bei einigen Krankheitsbildern wie Psoriasis und atypischer Dermatitis besonders deutlich (Christophers und Henseler, 1987; Ong et al., 2002a; Leung, 2003). So haben Patienten mit Psoriasis eine erhöhte Expression von hCAP18 / LL-37 und anderen Peptiden und trotz der Defekte in der Hautbarriere eine geringe Anfälligkeit gegen bakterielle Infekte (Henseler und Christophers, 1995; Frohm et al., 1997; Harder et al., 1997; Harder et al., 2001; Nomura et al., 2003; Schröder und Harder, 2006). Im Gegensatz dazu haben Patienten mit atypischer Dermatitis ein vergleichsweise niedriges Niveau an hCAP18 / LL-37 und anderen Peptiden und sind infolgedessen anfällig für Infektionen von Bakterien und Viren (Ong et al., 2002b; Leung, 2003; Nomura et al., 2003; Howell et al., 2004; Leung et al., 2004).

Damit unterstützt hCAP18 / LL-37 die Haut und andere Grenzflächen maßgeblich bei der Abwehr von Infekten und kann somit als ein Teil des angeborenen Immunsystems betrachtet werden (Zanetti, 2004).

### 2.10.2.3. Biologische Eigenschaften von LL-37

Neben den antibakteriellen und LPS-bindenden Eigenschaften besitzt hCAP18 / LL-37 einen modulierenden Einfluss auf das Immunsystem. Auch Fragmente von LL-37 besitzen zum Teil diese Eigenschaften.

Sowohl das synthetisch hergestellte C-terminale aktive Fragment vom Kaninchen CAP18 (rCAP18), das rCAP18<sub>106-142</sub>, als auch sein Pendant vom Menschen, das LL-37, besitzen eine breite antibakterielle Aktivität gegen Gram-negative und -positive Bakterienstämme (IC<sub>50</sub> < 1 µM) (Larrick et al., 1993;

Larrick et al., 1995b). Die antimikrobielle Aktivität von LL-37 ist vom pH-Wert und Salzgehalt des Mediums abhängig (Bals et al., 1998; Johansson et al., 1998). Des Weiteren wirkt LL-37 gegen Chlamydien (Donati et al., 2007), Viren (Howell et al., 2004) und mäßig gegen Mykobakterien (Martineau et al., 2007). In Anwesenheit von anderen antibakteriellen Peptiden des Immunsystems wie z.B. humanen  $\beta$ -Defensinen wird die antibakterielle Aktivität von LL-37 gesteigert (Chen et al., 2005), während Glycosaminglycan-reiche Flüssigkeiten diese senken (Baranska-Rybak et al., 2006). Auch die Wechselwirkung mit klassischen, den Metabolismus attackierende Antibiotika kann die Wirkung von LL-37 hemmen (Kristian et al., 2007).

Von den Peptiden rCAP18<sub>106-142</sub> und LL-37 wurden die letzten fünf Aminosäuren weggenommen, die entstehenden Fragmente, rCAP18<sub>106-137</sub> und LL-32, hatten eine höhere antibakterielle Aktivität (Larrick et al., 1993).

#### 2.10.2.4. Antiinflammatorische Eigenschaften

rCAP18<sub>106-142</sub>, rCAP18<sub>106-137</sub> und die entsprechenden Pendants des hCAP18, LL-37 und LL-32, haben alle LPS-bindende Eigenschaften (Larrick et al., 1993; Larrick et al., 1995a). LL-37 zeigte auch in Tiermodellen eine antiinflammatorische Wirkung (Bals et al., 1999) und schützte vor den Folgen einer bakteriellen Sepsis (Cirioni et al., 2006).

Dies konnte auch auf genetischer Ebene gezeigt werden, da LL-37 die LPS-induzierte Expression von Genen großteils unterdrückt (Mookherjee et al., 2006b), dies betrifft aber pro- und antiinflammatorische Rezeptoren (Mookherjee et al., 2006a). Damit reguliert LL-37 die Immunantwort bei der Aktivierung von Immunzellen durch LPS.

#### 2.10.2.5. Immunmodulierende Wirkung von LL-37

Neben der Aktivierung von Abwehrzellen durch LPS werden durch das humane Fragment LL-37 weitere Aktivitäten der zellulären Abwehr beeinflusst, die bei der Immunreaktion infolge eines entzündlichen Prozesses beispielsweise in der Haut von Bedeutung sind. Dazu gehören neben der Regulierung der inflammatorischen Antwort auch die Chemotaxis für neutrophile Monozyten (Yang et al., 2000), Angiogenese, Zytotoxizität gegen Wirtszellen und Aktivierung, Wundheilung, Proliferation und Migration von Epithelzellen (Heilborn et al., 2003; Shaykhiev et al., 2005) und die Induktion von Apoptose (Ciornei et al., 2006). Für tiefere Informationen wird auf ein Übersichtsartikel verwiesen (Niyonsaba et al., 2006).

## 2.11. **Wirkmechanismus membranaktiver antibakterieller Peptide**

Antibakterielle Substanzen stören lebenswichtige Funktionen des Bakteriums oder zerstören essentielle Strukturen. Einige klassische Antibiotika wie

Penicillin greifen in die Synthese der Mureinschicht ein und unterbinden einen Neuaufbau. Damit kann das Bakterium keine Zellteilung mehr durchführen, bzw. verliert die mechanische Stabilität der Zellhülle und stirbt ab. Einige resistente bakterielle Stämme sind jedoch in der Lage, Enzyme zu produzieren, die die Struktur des Penicillins ändern und es damit unwirksam werden lassen. Auch existieren diverse Pumpsysteme, die eingedrungene antibakterielle Substanzen wieder nach außen pumpen.

Eine Klasse mit völlig anderem Wirkmechanismus sind die sogenannten membranaktiven Peptide, zu der auch die beschriebenen kationischen antibakteriellen Peptide PMB und LL-32 gehören. Während die klassischen Antibiotika sich z.B. durch Porenen den Zugang zum Wirkziel verschaffen, attackiert diese Klasse von Substanzen direkt die Membran. Dabei erzeugen sie Löcher in der Membran, machen also die Membran permeabel (diese Löcher werden im Folgenden als Läsionen bezeichnet). Dadurch können sie sich mit Hilfe des sogenannten *self-promoted uptake* (Hancock, 1997) selbst Zugang zu weiter innen liegenden Bereichen des Bakteriums verschaffen oder töten das Bakterium direkt, denn ohne die Barrierefunktion der Membran ist das Bakterium nicht lebensfähig, da z.B. der die Spannung über einer Membran erzeugende Salzgradient zusammenbricht. Da die Bindung von kationischen Peptiden an die anionische LPS-Schicht auch durch elektrostatische Wechselwirkung getrieben wird, ist zu vermuten, dass eine Netto-Ladungsänderung des LPS diese Bindung beeinflusst. Damit ist ein Einfluss von Ladungssubstitutionen im LPS auf die Läsionsbildung zu vermuten. Da die Bindung an die Membranoberfläche vermutlich auch durch die aus der Membran herausragenden Glycostruktur von LPS beeinflusst wird, ist auch ein Einfluss der Läsionsbildung von der Glycostruktur des LPS zu vermuten.

Im Falle Gram-negativer Bakterien ermöglicht der *self-promoted uptake* (Abb. 12) den membranaktiven Wirkstoffen durch die äußere Membran zur inneren Membran zu gelangen und diese ebenfalls zu permeieren. Ihre tödliche Wirkung entfalten sie durch Depolarisation der inneren Membran oder nach einem weiteren *self-promoted uptake* durch Eingriff in intrazelluläre Prozesse (Matsuzaki, 1999).

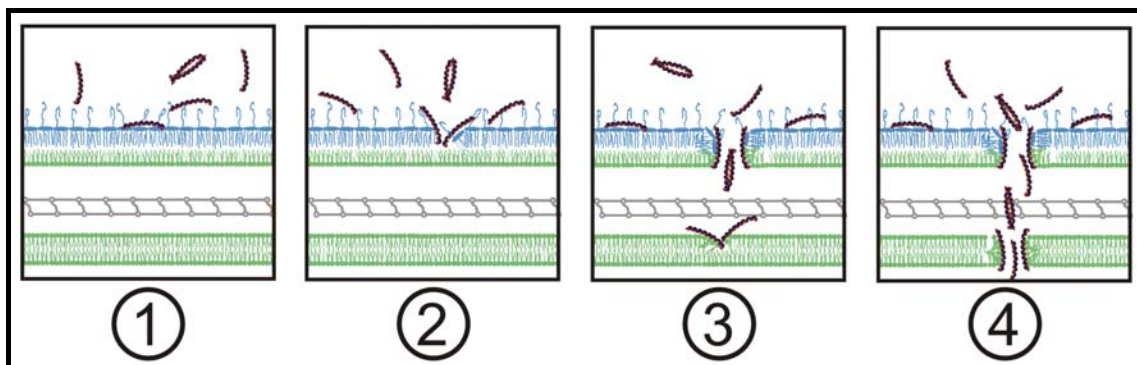


Abbildung 12: Prinzip des „self-promoted uptake“. 1) Die Peptide binden an die äußere Schicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und 2) kreieren eine Läsion. 3) Durch diese Läsion können die Peptide zur inneren Membran zu gelangen und diese ebenfalls zu permeieren. 4) Ihre tödliche Wirkung entfalten sie durch Depolarisation der inneren Membran oder nach einem weiteren *self-promoted uptake* durch Eingriff in intrazelluläre Prozesse (Matsuzaki, 1999).

Zytoplasmamembran gelangen. 4) Durch eine erneute Läsionsbildung können die Peptide zum Zellinneren gelangen.

Es existieren drei verbreitete Modelle zur Membranpermeabilisierung durch membranaktive Peptide: das *Barrel-Stave*-, das *Carpet*-Modell und das *Torodial Pore*-Modell (Brogden, 2005; Neville et al., 2006). Des Weiteren existiert ein sogenanntes Detergens-Modell, ein „Ausdünnungs“-Modell (Chen et al., 2003) und ein Modell zur Bildung von nicht-lamellaren Phasen (Lohner und Prenner, 1999).

Nach Literaturangaben kann die Wirkung von LL-37 und damit vermutlich auch für LL-32 entweder durch das *Carpet*- oder das *Torodial Pore*-Modell beschrieben werden und die Wirkung von PMB mit dem Detergensmodell. Die drei verbreiteten Modelle und das Detergensmodell werden im Folgenden beschrieben.

### 2.11.1. Barrel-Stave-Modell

Bei dem sogenannten *Barrel-Stave*-Modell (dt.: Fassdauben-Modell) bauen sich die Moleküle des Wirkstoffes transmembran ein und durchspannen die gesamte Membran. Diese Moleküle lagern sich anschließend zu einem Verbund mehrerer Moleküle zusammen, der im Inneren eine wassergefüllte Pore bildet (Abb. 13).

Zuerst binden die als Monomere vorliegenden Moleküle des Peptids an die Lipidmembran und bewirken eine Aufkonzentration des Peptids an der Oberfläche der Membran. Anschließend beginnen die Peptidmoleküle ab einem kritischen Peptid-zu-Lipid-Verhältnis zu oligomerisieren (Huang, 2000), wobei die hydrophoben Flächen des Peptids mit den Acylketten-Bereich der Membran interagieren. Die hydrophilen Bereiche sammeln sich derart an, dass eine Pore gebildet wird, wobei die Größe durch Einbau von zusätzlichen Monomeren vergrößert werden kann. Aufgrund von NMR-Untersuchungen wird dieses Modell für LL-37 verworfen (Henzler Wildman et al., 2003).

### 2.11.2. Torodial Pore-Modell

Sehr ähnlich wie das *Barrel-Stave*-Modell ist das sogenannte *Torodial Pore*-Modell. Bei diesem Modell dringen die einzeln vorliegenden Peptide schon bei geringen Konzentrationen in die Membran ein und biegen dabei die äußere Monoschicht kontinuierlich um. Dabei entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer Peptide eine Läsion. Diese ist dabei nicht vollständig von transmembranen Peptiden ausgekleidet, sondern auch von den Lipiden der Membran (Abb. 13). Dabei sind die polaren Seiten von den Peptiden mit den polaren Kopfgruppen der Lipide assoziiert. Dieses Modell wird zum Teil auch für LL-37 vorgeschlagen (Brogden, 2005).

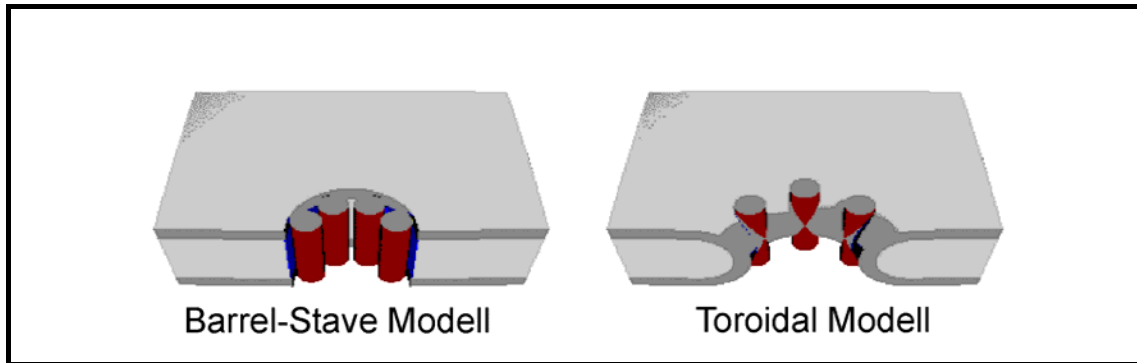


Abbildung 13: Unterschied in der Läsionsbildung zwischen dem *Barrel-Stave*- und dem *Toroidal Pore*-Modell. Während beim *Barrel-Stave*-Modell die Läsion vollständig von den hydrophilen Bereichen des Peptids ausgekleidet ist (links), wird die nach dem *Toroidal Pore*-Modell gebildete Läsion auch von Lipiden der Membran gebildet (rechts). Die Ausrichtung der Lipide bleibt beim *Barrel-Stave*- im Gegensatz zum *Toroidal Pore*-Modell unverändert. Die Zeichnung wurde (Yang et al., 2001) entnommen.

### 2.11.3. *Carpet*-Modell

Die Adsorption der Wirkstoffe an die Kopfgruppen der membranbildenden Lipide erfolgt bei diesem Modell in paralleler Orientierung. Die Störung der Membranintegrität erfolgt entweder durch Mizellierung der Membran oder durch Porenbildung. Dabei wird immer häufiger der *Carpet*-Mechanismus als ein allgemeiner Wirkmechanismus angesehen (Shai, 2002).

Beim sogenannten *Carpet*-Modell (dt.: Teppich-Modell) bauen sich die Moleküle des Wirkstoffs zuerst nicht transmembran ein, sondern binden fast ausschließlich auf der Oberfläche der Membran (Abb. 14). Dabei stören sie die Ausrichtung und Ordnung der Lipide und erzeugen damit mechanischen Stress / Spannung. Ab einer kritischen Konzentration ist der Stress groß genug, um die Membran kollabieren zu lassen. Dabei schnürt sich die Lipiddoppelschicht bis zur Verbindung beider Seiten ein. Ähnlich wie beim *Toroidal Pore*-Modell entstehen dabei Läsionen, aber auch aus der Membran herausgelöste Mizellen. An die Läsions- und Mizellenbildung kann sich der komplette Kollaps der Membran anschließen (Yang et al., 2001).

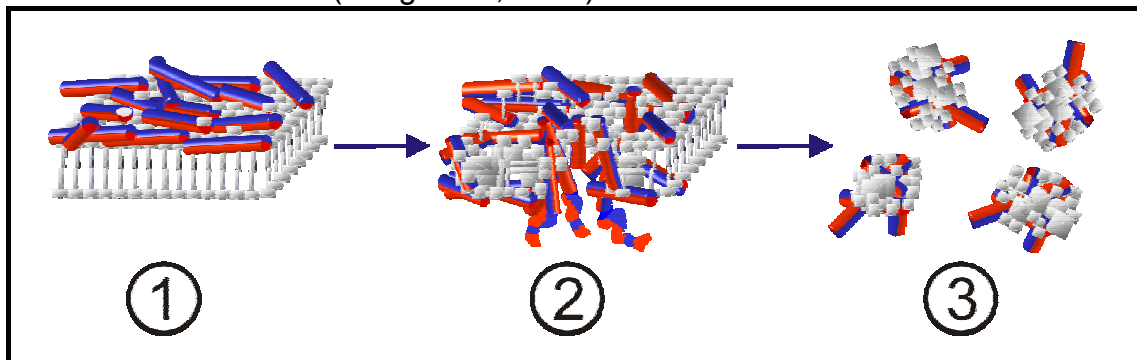


Abbildung 14: Das *Carpet*-Modell. 1) Die Peptide binden an die Membran und 2) bilden Läsionen oder lösen Mizellen aus der Membran; 3) Vollständiger Kollaps der Membran. Verändert nach (Shai und Oren, 2001).

Für LL-37 ist das *Carpet*-Modell vorgeschlagen und weitestgehend akzeptiert (Oren et al., 1999; Henzler Wildman et al., 2003; Henzler-Wildman et al., 2004). NMR-Untersuchungen und *Differential Scanning Calorimetry* Untersuchungen konnten zeigen, dass LL-37, wie im Modell vorgeschlagen, zuerst die Membran bedeckt und erst dann die Membran schädigt (Henzler Wildman et al., 2003; Henzler-Wildman et al., 2004). Da dies auch für LL-32 und andere Fragmente gezeigt werden konnte (Gutsmann et al., 2001b), wird davon ausgegangen, dass der Wirkmechanismus sehr ähnlich oder gleich ist.

In Übereinstimmung mit dem Modell konnte gezeigt werden, dass LL-37 die Oberflächen sowohl von zwitterionischen als auch von negativ geladenen Lipiden bedeckt, wobei aber die Oligomerisation von der Membranzusammensetzung abhängt (Dürr et al., 2006). LL-37 bildet schon in Lösung Oligomere (Johansson et al., 1998; Oren et al., 1999) und bindet so auch an die Kopfgruppen von zwitterionischen Lipiden. Bei der Bindung an negativ geladene Lipide monomerisiert es dagegen (Oren et al., 1999). Die Störung der Membran wird durch Induktion von positivem Krümmungs-Stress auf die Lipiddoppelschichten erzeugt, was nicht-lamellare Phasen stabilisiert. Allerdings konnte nicht gezeigt werden, dass es isotrope Phasen wie Mizelle oder kubische Phasen erzeugt. In weiteren Studien wurde der Einfluss von LL-37 auf den hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht untersucht (Henzler-Wildman et al., 2004). Sowohl bei ionischen als auch bei zwitterionischen Membranen aus Phospholipiden wurde deren Hauptphasenübergang durch den Einfluss des Peptids breiter und damit weniger kooperativ. Außerdem gibt es Hinweise, dass bei hohen Peptid-Konzentrationen LL-37 nicht homogen verteilt ist, wie an ähnlichen Peptiden gezeigt wurde (Lohner und Prenner, 1999). Der Einfluss von LL-37 auf die Packungsdichte der Acylketten wurde ebenfalls untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass LL-37 sowohl die Packung als auch die Kooperativität der Fettsäureketten stört. Dies konnte auch für LL-32 gezeigt werden (FTIR-Messungen, unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Biophysik). Der Einbau in die hydrophob-hydrophile Grenzschicht der Membran hängt von der exakten Membranzusammensetzung ab, wobei bei cholesterolphaltigen Membranen die Störung unterdrückt wird. Dieser Effekt von Cholesterol wurde auch für andere membranaktive Peptide beobachtet (Andrä et al., 2004). Cholesterol ist in den Membranen von z.B. Körperzellen enthalten, aber nicht in bakteriellen Membranen. Da bei diesem Modell also die Bindung an die Membran und der Einbau in diese entscheidend ist für die Läsionsbildung, ist zu erwarten, dass auch Änderungen in der Glycostruktur und in der Ladungssubstitution des LPS eine Änderung des Binde- und Einbauverhalten von LL-32 bewirken. Damit sollte dann auch die Läsionsbildung eines Peptids von der exakten LPS-Struktur abhängig sein. Dies wurde in der Arbeit untersucht.



### 2.11.4. Detergens-Modell

Das für die Wirkung von PMB vorgeschlagene Modell basiert auf dem sogenannten Detergens-Mechanismus (Abb. 15) (Helenius und Simons, 1975; Schröder et al., 1992), weil PMB mit der hydrophilen Ringstruktur und der Fettsäure selbst eine Detergens-ähnliche Struktur besitzt. Sehr ähnliche Modelle werden in der Literatur auch als *Worm-hole-* (dt.: Wurmloch-) Modelle bezeichnet (Matsuzaki, 1999).

Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass PMB durch elektrostatische Wechselwirkung an die Membran bindet und dort aufkonzentriert wird. Wird eine kritische Konzentration überschritten, bilden sich PMB-Mizellen. Aus diesen baut sich PMB in die Membran ein und stört den lamellaren Aufbau, da das Peptid eine andere Molekülform (*shape*) besitzt. Ist der erzeugte mechanische Stress groß genug, so entstehen in ähnlicher Weise zum *Carpet-*Modell Läsionen.

Der vorgeschlagene Mechanismus wird in dieser Arbeit auf seine Gültigkeit bei variierender LPS-Glycostruktur hin untersucht, indem der Einfluss der LPS-Glycostruktur auf die Wirkung von PMB und Detergentien verglichen wird.

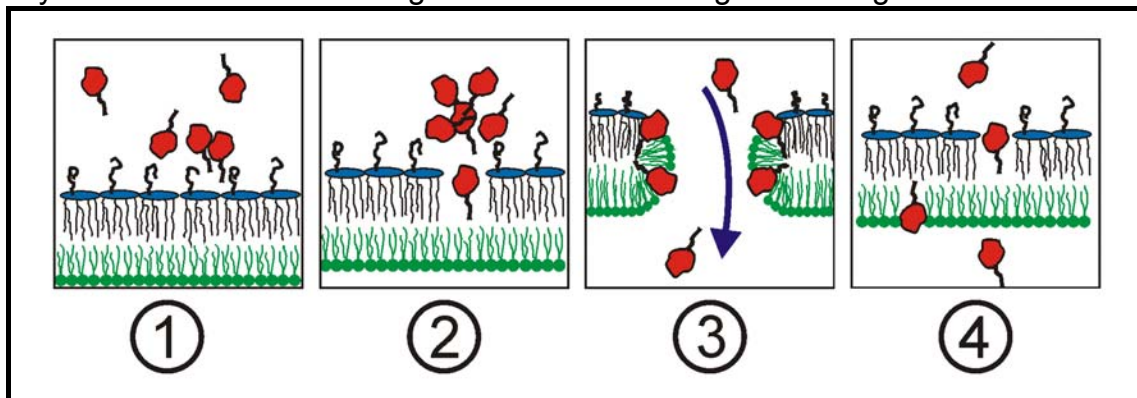


Abbildung 15: Der Detergens-Mechanismus ist der in der Literatur vorgeschlagene Wirkmechanismus von PMB. 1) Zuerst erfolgt eine Aufkonzentrierung von PMB an der Membran 2) Ab einer bestimmten Konzentration bildet PMB Mizellen und baut sich daraus in die Membran ein. 3) Durch den dabei verursachten Stress werden Läsionen erzeugt. Sie ermöglichen den Durchtritt weiterer Moleküle (*self-promoted uptake*). 4) Die Läsionen können sich durch Herauslösen von PMB aus der Lipidschicht oder durch Verdünnung aufgrund von lateraler Diffusion in der Membran wieder schließen.



### 3. Material & Methoden

Im dritten Teil dieser Arbeit, Material und Methoden, werden die verwendeten Materialien wie die Peptide (3.2.), deren Wechselwirkung mit Phospholipiden (3.3.), Bakterien (3.4.) und deren Lipopolysacchariden (3.5.) und humanen Zellen (3.6.) untersucht wird, vorgestellt. Anschließend werden die für die Charakterisierung der Peptide verwendeten biologischen Tests (3.7.) erläutert. Mit einem biologischem Test wurde von den 18 LL-32 Fragmenten die antibakterielle Aktivität (3.7.1.), also ab welcher Peptidkonzentration die Bakterien abgetötet oder am Wachstum gehemmt werden, gegenüber 12 Gram-negativen Bakterienstämmen bestimmt. Außerdem wurde die Zytotoxizität (3.7.2.), also die Aktivität gegen körpereigene Zellen der Peptide gemessen. Die antiinflammatorischen Eigenschaften wurden mit einem immunologischen Zytokinnachweis (3.7.3.) untersucht. Die Interaktion der Peptide mit Bakterien, Zellen und LPS-Modellsystemen wurde mit physikalischen Messungen des Zeta-Potentials (3.8.1.), der Aggregatgröße (3.8.2.), der Reaktionswärme mittels Isothermer Titrationkalorimetrie (3.8.3.) und optisch mithilfe eines konfokalen Mikroskops (3.8.4.), der Durchflusszytometrie (3.8.5.) und mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen (3.8.6.) untersucht. Zusätzlich wurde das hydrophobe Moment der LL-32 Fragmente berechnet (3.8.7.).

#### 3.1. Puffer und Reagenzien

Die zur Versuchsdurchführung benötigten Puffer und Reagenzien wie Detergentien werden im Folgenden beschrieben. Die verwendeten Peptide, Lipide und Bakterien werden später ausführlich dargestellt.

M-CSF: rekombinantes *Human Macrophage Colony Stimulating Factor* zur Ausdifferenzierung von Mononukleären Zellen zu Makrophagen (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Pen/Strep: enthält 10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin).

Amphotericin-B: besitzt eine Konzentration von 250 µg/ml und wurde von Biochrom AG, Berlin bezogen.

BSA: *Bovine Serum Albumin*, wurde als „Albumin Fraktion V (aus Rinderserum)“ von Merck, Darmstadt gekauft.

FCS: Fötale Kälberserum (*Fetal Calvin Serum*) von der Firma Linaris (Battingen/Main).

Humanes AB-Serum: aus dem Blut gesunder Spender mit Blutgruppe AB gewonnen. Die zellulären Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt.

RPMI 1640: gebrauchsfertiges Kulturmedium, welches mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wird. Es wurde von Biochrom AG, Berlin bezogen.

LB-Medium: Das Luria-Bertani Nährmedium nach Miller (Salzgehalt) wurde von Merck KGaA (Darmstadt) als Bouillon bezogen. Es wurden 25 g LB pro 1 l Wasser verwendet. Vor der Verwendung wurde es 15 min lang bei 121°C autoklaviert.

Thimerosal: bezogen von Merck, Darmstadt.

HEPES: Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (Merck, Darmstadt) wurde als Puffersubstanz für einen pH-Wert um Sieben verwendet.

TRIS: Trishydroxymethylaminomethan wurde ebenfalls als Puffersubstanz für einen pH-Wert um Sieben benutzt (NeoLab, Heidelberg).

Braun-Wasser: das sterile und hochreine Wasser wurde von der Firma Braun, Melsungen bezogen.

HBSS: *Hanks' buffered Salt Solution* mit 8 mg/ml Phenol Rot ohne NaHCO<sub>3</sub>. Wurde von Biochrom AG, Berlin als 10fach Konzentrat geliefert und vor Benutzung mit Braun-Wasser verdünnt. Es enthält dann 138 mM mg NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,81 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,6 mM Glucose und 28 µM Phenolrot.

MEM: *Minimal Essential Medium* ist ein Pulver mit essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren und wurde bezogen von Biochrom AG, Berlin.

MEM-Puffer: Der Puffer enthält 9,7 g MEM, 20 mM HEPES und 8,8 mM NaHCO<sub>3</sub>. Mit NaOH wurde pH = 7,3 eingestellt. Anschließend wurde pro Liter 100 ml FCS, 2 ml Pen/Strep und 10 ml Amphotericin-B hinzugegeben. Der Puffer wurde steril filtriert und bei 4° C gelagert.

D-MEM-Puffer: Mit einer Salzzusammensetzung von Dulbecco modifiziertes MEM. Bezogen von Biochrom AG, Berlin.

PBS: Für viele Versuche wurde *Phosphate Buffered Saline* nach Dulbecco (Salzgehalt) verwendet. Es wurde als PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Biochrom AG, Berlin) in flüssiger Form bezogen. Der Puffer enthält 153 mM Na<sup>+</sup>, 4,2 mM K<sup>+</sup>, 139,9 mM Cl<sup>-</sup>, 8,1 mM HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und 1,5 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Er ist steril und besitzt einen pH-Wert von 7,2.

Natriumphosphat-Puffer: Für die Bestimmung der LD90 wurde ein steriler Puffer verwendet, der 10 mM Natriumphosphat enthielt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde.

CsCl-Puffer: Für die Messungen am Zeta-Sizer wurde eine steril filtrierte Pufferlösung mit 10 mM TRIS, 2 mM CsCl<sub>2</sub> bei pH = 7 verwendet.

Puffer für ITC Messungen an LPS-Aggregaten: Für die Isothermen Titrationskalorimetrie-Messungen an LPS-Aggregaten wurde ein steriler und entgaster Puffer mit 20 mM HEPES verwendet.

Ficoll: gebrauchsfertig mit einer Dichte von 1,077 g/cm<sup>3</sup> von Biochrom AG, Berlin bezogen. Ficoll wird auch als Biocoll bezeichnet.

PFA: Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt).

NaCl, NaOH, CsCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub> und NaOH wurde von Merck, Darmstadt bezogen.

### Detergentien

Als Vergleichssubstanzen zur Überprüfung des vorgeschlagenen Detergensmechanismus für PMB wurden vier Detergentien verwendet. Die kationischen Substanzen Dodecyltriphenylphosphoniumbromid (DTPPB) und Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTMAB). Zusätzlich wurde auch das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Die chemische Struktur der drei Detergentien ist in Abb. 11 dargestellt. In Lösung tragen alle eine Nettoladung und sind in der Lage, Membranen zu solubilisieren. Für DTPPB und DTMAB konnte gezeigt werden, dass sie in LPS-haltigen Modellmembranen Läsionen verursachen (Gutsmann, 1997).

DTPPB hat eine molare Masse von 511 Da, eine CAC (2.6.) von ca. 1mM in einem Puffer mit 100 mM KCl und 5mM MgCl<sub>2</sub>. Die Substanz bildet in planaren asymmetrischen LPS-Membranen Läsionen ab ca. 5 µM.

DTMAB besitzt eine molare Masse von 308 Da, eine CAC von ca. 14 mM in einem Puffer mit 100 mM KCl und 5mM MgCl<sub>2</sub>. Das Detergens bildet ab ca. 100 µM Läsionen in LPS-Membranen.

SDS besitzt eine molare Masse von 288 Da. Die CAC ist stark salzabhängig und beträgt in H<sub>2</sub>O 8,2 mM und in 500 mM NaCl-Lösung 0,52 mM (Helenius und Simons, 1975). Die Läsionsbildungsfähigkeit ist unbekannt.

DTPPB und DTMAB wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in einer Bromid-Salzform gekauft. In wässriger Umgebung löst sich das Anion ab und das Detergens trägt eine Nettoladung.

SDS wurde von der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) bezogen. In Lösung trennt es sich in Na<sup>+</sup> und ein negativ geladenes Dodecylsulfat.

## 3.2. Peptide

### 3.2.1. Polymyxin B

Das verwendete Polymyxin B und das Polymyxin B-Nonapeptid (PMBN) wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) als Sulfatsalz (Produkt-Nummer P1004, MDL Nummer MFCD00131991, bzw. Produkt-Nummer P2076, MDL Nummer MFCD00214217) bezogen. Polymyxin B liegt dabei als Mischung aus PMB<sub>1</sub> und PMB<sub>2</sub> (Stoffmengenanteil von PMB<sub>2</sub> ~20% nach massenspektroskopischer Analyse) vor. Für die Experimente wurde PMB und PMBN in Konzentrationen bis maximal 2 mM in 0,01-%iger Essigsäure gelöst.

### 3.2.2. LL-32 und Fragmente

Das Peptid LL-32, welches aus den ersten 32 Aminosäuren von LL-37 besteht, besitzt ebenso wie PMB antibakterielle und antiinflammatorische Eigenschaften. Es hat eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur, eine Nettoladung von +7 bei pH = 7 und ein Molekulargewicht von 3921,7 Da. Die Seitenketten der Aminosäuren sind derart angeordnet, dass sich auf der einen Seite der Helix hydrophile, auf der anderen Seite hydrophobe Aminosäuren befinden. Damit besitzt das Peptid ein ausgeprägtes hydrophobes Moment und eine amphipatische Struktur. Die Struktur des homologen rCAP18<sub>106-137</sub> Peptids ist in Abb. 16 dargestellt.

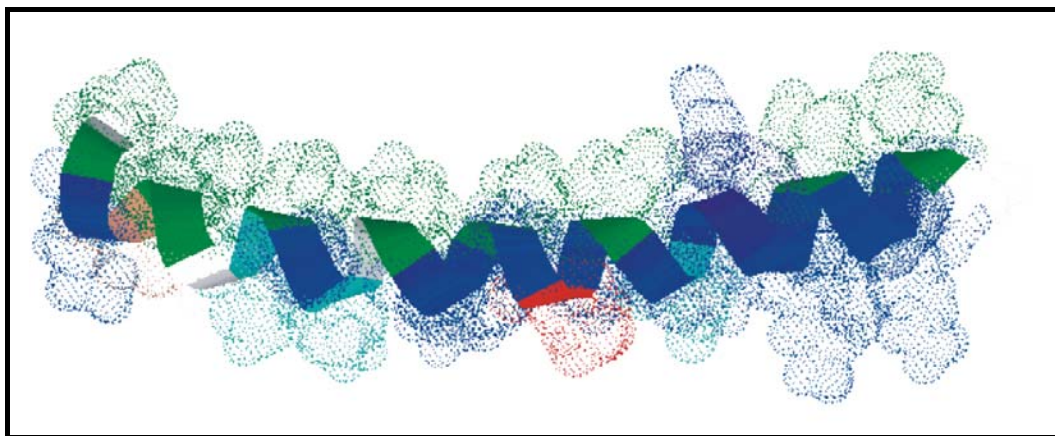


Abbildung 16: NMR-Struktur des homologen rCAP18106-137 (Chen et al., 1995).

Zur Aufklärung der Wirkung und einer eventuellen Optimierung der Struktur wurden diverse Fragmente von LL-32 hergestellt und untersucht. Sie wurden ebenso wie LL-32 und die fluoreszenzmarkierten Peptide am Forschungszentrum Borstel von R. Bartels (Arbeitsgruppe Strukturbiochemie) mit amidierten C-Terminus synthetisiert und in aufgereinigter Form zur Verfügung gestellt. Die Fragmente sind Analoga von LL-32, bei denen die Aminosäuresequenz gekürzt oder verändert wurde. Je nach Ort der Deletion oder Substitution lassen sie sich in die in Tabelle (Tab.) 1 dargestellten Gruppen einteilen. Die Peptide wurden nach den ersten beiden Aminosäuren (nach der 1-Buchstabennomenklatur) der Sequenz und ihrer Länge bezeichnet. Bei interner Deletion wurden die Peptide nach den ersten beiden Buchstaben

der Aminosäuresequenz und der Länge der Sequenz bis zur Deletion benannt. Der Buchstabe der beiden Aminosäurenbezeichnungen nach der Deletion werden ebenso wie die Länge der folgenden Sequenz zusätzlich an den Namen gehängt. Bei den Peptiden der Gruppe mit der internen Substitution gibt die Bezeichnung die Häufigkeit der Substitution und die neue Aminosäure an. Die angegebenen Ladungen beinhalten die Ladung vom amidierten C-Terminus. Die verschiedenen Peptide wurden für die einzelnen Versuche wie dort beschrieben angesetzt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde LL-32 jeder Gruppe vorangestellt.

1. Basispeptide				
Name	Aminosäure-Sequenz	Ladung / e <sub>0</sub>	n (AS)	MM / Da
LL-37	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLVPRTES	7	37	4493
LL-32	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	7	32	3922
rCAP18 <sub>106-137</sub>	GLRKRLRKFRNKIKE KLKKIGQKIQGLLPKLA	13	37	3801
2. N-terminale Deletion				
LL-32	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	7	32	3922
FF-28	FFRKSKEKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	8	28	3523
SK-24	SK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	6	24	2945
IG-20	IGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	5	20	2472
3. C-terminale Deletion				
LL-32	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	7	32	3922
LL-20	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQ	5	20	2465
4. N- und C-terminale Deletion				
LL-32	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	7	32	3922
GD-28	GDFFRKSKEKIGK EFKRIVQRIK DFLRN	7	28	3483
FF-24	FFRKSKEKIGK EFKRIVQRIK DFL	7	24	3041
RK-20	RKSKEKIGK EFKRIVQRIK D	7	20	2486
5. Interne Deletion				
LL-32	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	7	32	3922
LL-15-KR15	LLGDFFRKSK EKIGK KRIVQRIK DFLRNLV	8	30	3645
LL-14-RI14	LLGDFFRKSK EKIG RIVQRIK DFLRNLV	6	28	3389
LL-12-VQ-12	LLGDFFRKSKEK VQRIK DFLRNLV	5	24	2950
LL-10-RI-10	LLGDFFRKSK RIK DFLRNLV	5	20	2465
6. Interne Substitution				
LL-32	LLGDFFRKSK EKIGK EFKRIVQRIK DFLRNLV	7	32	3922
2A	LLGDFFRKSK EKIGK AAKRIVQRIK DFLRNLV	8	32	3788
2G	LLGDFFRKSK EKIGK GGRIVQRIK DFLRNLV	8	32	3760
4A	LLGDFFRKSK EKIGAAA RIVQRIK DFLRNLV	6	32	3673
4G	LLGDFFRKSK EKIGGGGRIVQRIK DFLRNLV	6	32	3617

Tabelle1: Einteilung der LL-32 Fragmente in Gruppen je nach Ort der Modifikation. Angegeben sind die zu den 5 verschiedenen Gruppen gehörige Peptide mitsamt ihrer Aminosäuresequenz, Ladung inkl. der Ladung am amidierten N-Terminus, Aminosäureanzahl (n(AS)) und molarer Masse (MM). LL-32 ist als Bezug jeder Gruppe zugeordnet. Veränderte Aminosäuren sind grün dargestellt, kationische rot und anionische blau.

### 3.3. Phospholipide

Die verwendeten Phospholipide sind natürliche Isolate und wurden von den Firmen Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Sie sind in Tab. 2 angegeben.

Lipid	Ladung / $e_0$	Molare Masse / Da	Herkunft
Phosphatidylethanolamin (PE)	0	872	<i>E. coli</i>
Phosphatidylcholin (PC)	0	761	Ei
Phosphatidylserin (PS)	-1	812	Gehirn
Phosphatidylglycerin (PG)	-1	771	<i>E. coli</i>
Diphosphatidylglycerin (DPG) / Cardiolipin (CL)	-2	1444	Herz

Tabelle 2: Angegeben sind die verwendeten Phospholipide und ihre Abkürzungen ebenso wie die Ladung pro Molekül und das relative Molekulargewicht. Da die Fettsäuren der natürlichen Phospholipide variieren, ist dies ein mittleres Gewicht. Die Herkunft der natürlichen Isolate ist ebenfalls angegeben.

#### Präparation

Die Phospholipide wurden für die Messung des Zeta-Potentials als Vesikel in wässriger Lösung vorliegend verwendet. Dazu wurden sie als lyophilisiertes Pulver eingewogen und mit der entsprechenden Menge des CsCl-Puffers (3.1.) für eine 1 mM Lösung aufgefüllt. Die Proben wurden intensiv geschüttelt und anschließend folgendem Thermozyklus mit Ultraschallbehandlung unterzogen:

- 20 min bei 65° C im Ultraschallbad
- 20 min bei 4° C
- 20 min bei 60° C im Ultraschallbad
- 20 min bei 4° C
- 20 min bei 60° C
- 20 min bei 4° C
- 20 min bei 60° C
- 20 min bei 4° C
- Lagerung über Nacht bei 4° C

Durch diese Behandlung wurden thermodynamisch instabilere Aggregate mit uneinheitlicher makroskopischer Struktur durch den mehrfachen Phasenübergang und die mechanischen Kräfte des Ultraschallbades aufgebrochen. Damit wurde eine einheitliche Gestalt erzielt. Durch diese Behandlung bilden sich kleine unilamellare Vesikel, sogenannte SUVs (*Small Unilamellar Vesicles*). Vor Messbeginn wurde die 1 mM Stammlösung auf die Konzentration von 0,01 mM mit CsCl-Puffer verdünnt.

### 3.4. Bakterien

Für die dargestellten Versuche wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

- *Escherichia coli* WBB01
- *Salmonella enterica* serovar Minnesota R595, R4, R7, Rz, R5, R345, R60 und T1-Mutante
- *Proteus mirabilis* R45
- *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 und Ko2b-Mutante

#### 3.4.1. *Escherichia coli*

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*, 1919 entdeckt von Theodor Escherich) gehört zur Familie der Enterobacteriaceae (griech. für Darm) und kommt im menschlichen und tierischen Darm als Kommensale vor. Das stäbchenförmige Bakterium dient in der Forschung weltweit als Modellorganismus und ist entsprechend gut untersucht.

*E. coli* ist im Allgemeinen fakultativ pathogen, d.h. nur krankheitsauslösend, wenn es am falschen Ort/Organ ist. Während innerhalb des Darms nur wenige Stämme Krankheiten hervorrufen, können sie außerhalb Harnwegsinfekte, Peritonitis oder bei Neugeborenen Meningitis hervorrufen.

Der verwendete *E. coli* Stamm WBB01 ist eine Tiefraummutante und im Allgemeinen sehr leicht durch Antibiotika abzutöten. Er wurde als Bezugsstamm zum Vergleich mit Literaturdaten verwendet und zur Bestimmung des Einflusses von Substitutionen im Lipid A Teil des LPS. Der Stamm produziert LPS ohne Substitutionen am Lipid A und ist in Tab. 3 in der „Substitutions-Reihe“ und in Abb. 6 dargestellt.

#### 3.4.2. *Salmonella enterica* serovar Minnesota

Die verwendeten Stämme von *Salmonella enterica* serovar Minnesota (*S. minnesota*) gehören ebenso wie *E. coli* zur Familie der Enterobacteriaceae. Nach älteren Einteilungen existieren zahlreiche Spezies von den Salmonellen, wobei die meisten jedoch der Gruppe *S. enterica* ssp. *enterica* angehören. Nach einer neuen molekularbiologisch gestützten Einteilung existieren nur noch zwei verschiedene Spezies (Tindall et al., 2005). Die mit ca. 2 µm kurzen stäbchenförmigen Bakterien sind im Allgemeinen opportunistische Pathogene, also Erreger, die auch bei Gesunden häufig vorkommen und nicht notwendigerweise Krankheiten verursachen. Bei Eintritt in die Blutbahn oder bei immunsupprimierten Menschen können sie allerdings Wundinfektionen, Sepsis oder Pneumonie verursachen. Viele Stämme rufen auch Durchfallerkrankungen hervor (in Deutschland ca. 55.000 Erkrankte im Jahr 2005 (Wikipedia), in den USA mehr als 500 Tote pro Jahr (Mead et al., 1999). Ein Großteil der Infektionen ist auf Tier-zu-Mensch Übertragung durch den Verzehr von tierischen Erzeugnissen zurückzuführen (Holmberg et al., 1984).



Mit den *S. minnesota*-Stämmen standen Bakterien zur Verfügung, deren LPS sich hauptsächlich in der Glycostruktur unterscheidet. Sie wurden verwendet, um den Einfluss dieser Struktur auf die Wechselwirkung mit Peptiden zu charakterisieren und sind zur „Glycostruktur-Gruppe“ (Tab. 3) zusammengefasst. In Abb. 5 sind sie schematisch dargestellt. Der Tiefraumutantenstamm R595 und sein LPS wurden zusätzlich zur Untersuchung des Einfluss von Substitutionen am Lipid A verwendet, da er nur einen sehr geringen Anteil an Substitutionen aufweist. Er ist, wie in Tab. 3 ersichtlich, auch in der „Substitutions-Reihe“ eingeordnet. Eine Variante vom Stamm R595, die R595 280 puM T1-Mutante, besitzt ein Tiefrau-LPS mit einer deutlich erhöhten Anzahl an Substitutionen am Lipid A. Das LPS wird als T1-LPS bezeichnet und ist in Tab. 3 in der „Substitutions-Reihe“ eingeordnet. Die möglichen Positionen der Substituenten von den Tiefrau-LPS sind in Abb. 6 dargestellt.

### 3.4.3. *Proteus mirabilis*

Der verwendete Stamm *Proteus mirabilis* (*P. mira.*) R45 gehört zur Gattung *Proteus* in der Familie Enterobacteriaceae. Die Gram-negativen stäbchenförmigen Bakterien sind fakultativ anaerob, nicht sporenbildend und stark begeißelt. Die in ihrem Erscheinungsbild sehr wandelbaren Bakterien (benannt nach dem griech. Hilfsgott Proteus, der ein sehr unterschiedliches Erscheinungsbild hat) sind opportunistische Krankheitserreger, die natürlicherweise im Darm vorkommen. (Walker et al., 1999). Bei immungeschwächten Personen können Harnwegsinfekte, Pneumonie, Wundinfektionen und letztlich Sepsis ausgelöst werden (Warren et al., 1982). Die klinische Bedeutung dieses Erregers ist gering. Allerdings sind einige Stämme resistent gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wie z.B. Penicilline oder Cephalosporine.

Der verwendete Tiefraumutantenstamm R45 besitzt LPS mit Substitutionen am Lipid A (Abb. 6) und wird deshalb in der „Substitutions-Reihe“ (Tab. 3) verwendet. Das Bakterium ist resistent gegen einige Antibiotika, insbesondere auch gegen PBM, was es zu einem guten Testobjekt dafür macht, ob ein neues Peptid auch gegen Stämme wirksam ist, die Resistenzen gegen herkömmliche Antibiotika zeigen.

### 3.4.4. *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*, 1950 von W.H. Burkholder entdeckt, früher als *Pseudomonas cepacia* bezeichnet) ist ein Komplex, also eine Gruppe eng verwandter Spezies, der Gattung *Burkholderia* (Coenye und Vandamme, 2003) und gehört zu den virtuellen-ubiquitären, aeroben stäbchenförmigen Gram-negativen Bakterien (Yabuuchi et al., 1992). *B. cepacia* ist pathogen für immundefiziente Menschen und kann diverse Infekte auslösen (Goldmann und Klinger, 1986). Bei Patienten mit zystischer Fibrose kann eine pulmonale

Infektion ausgelöst werden, die zum Teil zum fatalen, nicht therapierbaren „Cepacia Syndrom“ führen kann (Govan und Nelson, 1992; Jones et al., 2001). Erschwerend für eine Behandlung ist, dass *B. cepacia* eine natürliche Resistenz gegen viele geläufige Antibiotika wie Aminoglycoside und auch PMB besitzt (McGowan, Jr., 2006). Teilweise sind auch Resistenzen gegen Penicillin verbreitet (Prince, 1986). Die Resistenzen gegen membranaktive Peptide wie PMB sind auf Substitutionen am Lipid A des LPS zurückzuführen (Cox und Wilkinson, 1991; Shimomura et al., 2003).

Der verwendete Tiefraustamm Ko2b wurde durch Inaktivierung des waaC-Gen durch Insertion einer Kanamycinresistenz-Kassette aus dem *B. cepacia* Stamm ATCC 25416 kreiert (Gronow et al., 2003). Sein LPS besitzt von allen verwendeten LPS die meisten Substitutionen am Ko und einem hohen Anteil an Substituenten am Lipid A (Abb. 6). Es ist in Tab. 3 in der Substitutions-Reihe dargestellt. Da *B. cepacia* die am stärksten ausgeprägte Resistenz gegen membranaktive Peptide von allen verwendeten Bakterien hat, ist es ein gutes Modell dafür, ob neue Peptide auch in der Lage sind, sehr stark ausgeprägte Resistenzmechanismen zu überwinden.

In Tab. 3 sind die verwendeten Stämme mit Daten zu ihrem LPS angegeben. Sie wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Bakterienstämme der Glycostruktur-Gruppe unterscheiden sich in der Glycostruktur vom LPS, haben aber einen vergleichbaren Membrananker. Sie eignen sich deshalb, um den Einfluss der Glycostruktur zu untersuchen. Die Ladungssubstitutionsgruppe umfasst drei Bakterienstämme, deren LPS eine unterschiedliche Anzahl an substituierten Gruppen im Lipid A besitzt. Sie wurden verwendet, um den Einfluss dieser Substituenten zu untersuchen.

Die Bakterienstämme wurden vom Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt, der *B. cepacia* Stamm und die *S. minnesota* R595 puM-Mutante T1 von Dr. S. Gronow (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

Die Bakterienkonzentrationen wurden über eine Vergleichsgerade ermittelt. Für diese wurde per Neubauer-Zählkammer die Bakterienanzahl nach unterschiedlichen Wachstumszeiten ermittelt und die optische Dichte (2.9.) an einem Spektrometer gemessen. Die optische Dichte wurde durch eine optische Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Nach mehrfacher Wiederholung konnte so eine Vergleichsgerade zwischen Bakterienkonzentration und optischer Dichte gewonnen werden. Zusätzlich konnten die Generationszeiten der Bakterienstämme ermittelt werden.

Für die Versuche wurden die Stämme einzeln aus einer tiefgefrorenen Stammsammlung auf Kryokügelchen (Mast Diagnostica, Reinfeld) in 4 ml LB-Medium nach Miller als Vorkultur über Nacht angezogen. Aus der Vorkultur wurde durch geeignete Verdünnung in LB-Medium nach Miller und nach geeigneter neuer Wachstumszeit die Kultur für die Messung gewonnen. Für die

Messungen zur Bestimmung der MHK (3.7.1.) wurden diese Kulturen auf eine Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^6$  / ml mit LB-Medium verdünnt.

Für die Messungen der Bindung der Peptide an Bakterien mit Hilfe durchflusszytometrischer Verfahren (3.8.5.), für die Messungen mit dem Zeta-Sizer (3.8.1.) und für die Isothermen Titrationskalorimetrie-Messungen (3.8.3.) wurden die Bakterien nach geeigneter Wachstumsphase mehrmals mit PBS durch Zentrifugation und Dekantieren gewaschen und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die genauen Bedingungen sind in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

### 3.5. Lipopolysaccharide

Von den verwendeten Bakterienstämmen wurde deren LPS nach der Phenol-Chloroform-Petrolether Methode (Galanos et al., 1969) extrahiert und stand für diese Arbeit zur Verfügung. Sie wurden in der Triethylammonium-Salzform verwendet. Die LPS werden nach ihrem korrespondierenden Stamm bezeichnet. Eine Übersicht über die LPS und ihrer strukturellen Parameter ist in Tab. 3 gezeigt. Darin sind die LPS in zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem ob sie zur Ermittlung des Einflusses der Glycostruktur oder der Ladungssubstitution dienen.

Die verwendeten LPS wurden sowohl für die Messung der TNF- $\alpha$  Inhibierung, des Zeta-Potentials, den Isothermen Titrationskalorimetrie-Messungen, der Bestimmung der Aggregatgrößen mit dem Zeta-Sizer als auch für den FRET-Assay als Aggregate in wässriger Lösung vorliegend verwendet. Sie wurden genauso wie die Phospholipide angesetzt und einem Thermozyklus unterzogen (3.3.). Eine Ausnahme stellt das LPS von *B. cepacia* dar, das nur in chloroformischer Lösung vorlag. Das Lösungsmittel wurde zuerst unter einem Stickstoffstrom abgedampft, bevor die entsprechende Menge an Puffer dazugegeben wurde. Bei den verwendeten LPS stellt sich jedoch, im Gegensatz zu den Phospholipiden, eine nicht so einheitliche Größe und Struktur ein und die genaue Überstruktur ist weitestgehend unbekannt. Deshalb wird nicht von Vesikeln, sondern von Aggregaten gesprochen. Aufgrund thermodynamischer Gesichtspunkte kann aber davon ausgegangen werden, dass sie alle eine Struktur mit geschlossener äußerer LPS-Schicht ausbilden. Die Stammlösungen mit 1 mM oder 500  $\mu$ M wurden kurz vor den Messungen mit entsprechendem Puffer auf die jeweiligen Endkonzentrationen verdünnt.

Glycostruktur-Gruppe				Kernoligosaccharid	
LPS	Stamm	MM / Da	Ladung / e <sub>0</sub>	Anzahl der Saccharide	Ladung / e <sub>0</sub>
R595-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R595	2186	-3,6	2	-2,0
R4-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R4	2430	-4,0	3	-2,0
R7-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R7	2622	-4,1	4	-2,1
Rz-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Rz	2824	-5,3	4	-3,3
R5-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R5	2784	-4,1	5,25	-2,1
R345-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R345	3504	-4,8	8	-2,8
R60-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R60	3826	-6,0	9	-4,0
Substitutions-Gruppe				Substitutionsanzahl	
LPS	Stamm	MM / Da	Ladung / e <sub>0</sub>	am Lipid A	am KdO / KO
WBB01-LPS	<i>Eschericia coli</i> WBB01	2238	-4,0	0	0
R595-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R595	2186	-3,6	0,4	0
R45-LPS	<i>Proteus mirabilis</i> R45	2369	-3,0	0,5	0,5
T1-LPS	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota puM280T1	2461	-2,3	1,7	0
Ko2b-LPS	<i>Burkholderia cepacia</i> K02b	2513	-1,9	1,6	0,5

Tabelle 3: Die verwendeten LPS und ihre korrespondierenden bakteriellen Stämme sind mit ihren strukturellen Daten angegeben. Die angegebenen Werte für die Ladungen und Anzahl von Sacchariden und Substitutionen sind Durchschnittswerte, die durch massenspektrometrische Untersuchungen ermittelt wurden. Die angegebenen molaren Massen (MM) entsprechen den durchschnittlichen MM des jeweiligen Hexaacyl-LPS.

Für die spektroskopischen Messungen zum FRET-Fusionsassay wurden die LPS-Aggregate mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden versetzt. Dafür wurden N-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-PE (NBD-PE, Molecular Probes (Eugene, OR, USA)) und N-(Rhodamin B sulfonyl)-PE (Rh-PE, Molecular Probes (Eugene, OR, USA)) einzeln in chloroformischer Phase mit LPS in einem molaren Verhältnis [LPS]:[NBD-PE] = 100:1, bzw. [LPS]:[Rh-PE] = 100:1 gemischt und nach Abdampfen des Chloroforms unter einem Stickstoffstrom als Aggregat wie oben beschrieben präpariert. Die 1 mM Stammlösung wurde vor dem Versuch auf eine Konzentration 0,01 mM mit PBS verdünnt und die beiden einzeln markierten LPS-Aggregate zusammengegeben. Damit lag insgesamt eine LPS-Konzentration von 0,01 mM vor, wobei die eine Hälfte der Aggregate Rh-PE enthielten, die andere Hälfte NBD-PE.

Aus mikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Bakterien ungefähr eine Gesamtlänge von 2  $\mu\text{m}$  und eine Höhe von 1  $\mu\text{m}$  besitzen.

Zur Abschätzung, wie viele LPS Moleküle ein Gram-negatives Bakterium besitzt, wird das stäbchenförmige Bakterium durch einen Zylindermantel der Höhe  $h$  mit zwei Halbkugeln mit dem Radius  $r$  an den Enden genähert. Damit ergibt sich folgende Oberfläche  $A$  des Bakteriums:

$$(F11) \quad A = 2\pi \cdot r \cdot h + 4\pi \cdot r^2$$

Damit ergibt sich:  $r = 500 \text{ nm}$  und  $h = 2r$ . Damit ist die Oberfläche  $A \approx 6,3 \times 10^6 \text{ nm}^2$ . Mit den Annahmen, dass die Oberfläche zu ca. 75% mit LPS besetzt ist und ein LPS-Molekül einen ungefähren Platzbedarf von  $1,2 \text{ nm}^2$  (Hagge et al., 2006) besitzt, ergibt sich, dass sich ca.  $4 \times 10^6$  LPS Moleküle auf der Oberfläche eines Gram-negativen Bakteriums befinden. In der Literatur ist dieser Wert mit  $3,5 \times 10^6$  angegeben (Rietschel et al., 1994). Diese Abschätzung dient im Folgenden der Berechnung molarer Verhältnisse von Peptid zu LPS bei Versuchen mit Bakterien.

### 3.6. Humane Zellen und Zelllinien

#### 3.6.1. Isolation von mononukleären Zellen und Differenzierung zu Makrophagen

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen (*Mononuclear Cells*, MNC) wurde mit dem peripheren Vollblut gesunder Spender (vom Forschungszentrum Borstel) eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Frisches heparinisieretes Blut (20 IE/ml) wurde mit HBSS im Verhältnis 1:2 verdünnt, je 38 ml wurden davon über 9 ml Ficoll geschichtet und 30 min lang bei ca. 400 g und 4° C zentrifugiert. Die sich in der Interphase befindlichen MNC wurden geerntet. Die Zellen wurden dreimal gewaschen (zweimal mit HBSS, einmal mit RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, jeweils 10 min bei 300 g und 4° C) und anschließend wieder in RPMI 1640 (mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin) überführt. Die Zellzahl sowie die Viabilität wurde durch Zählung unter einem Mikroskop (ID 02, Zeiss, Jena) nach einer Trypanblau-Färbung (0,4% in 0,75% NaCl-Lösung; Merck, Darmstadt) bestimmt. Der prozentuale Anteil an gefärbten und damit nicht-viablen Zellen wurde bestimmt und lag üblicherweise zwischen 1% und 3%. Durch geeignete Verdünnung wurde die MNC-Konzentration auf  $5 \times 10^6 / \text{ml}$  eingestellt.

Die für einige Versuche benötigten Makrophagen wurden aus frisch isolierten MNC ausdifferenziert. Dazu wurden die wie oben beschrieben aufgereinigten MNC 7 Tage lang in RPMI 1640 mit 4% humanem AB-Serum (2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 4% humanes AB-Serum) in Gegenwart von 2 ng/ml M-CSF (3.1.; R&D Systems, Minneapolis, USA) bis zur vollständigen Reifung zu Makrophagen in Teflonbeuteln kultiviert. Wie die MNC

wurden die Makrophagen dreimal in serumfreien Medium gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl auf  $0,5 \times 10^5$  / ml eingestellt.

### 3.6.2. Erythrozyten

Diese primären Zellen stammen ebenso wie die MNC aus dem peripheren Vollblut gesunder Spender und konnten gleichzeitig mit diesen gewonnen werden. Nach der diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation befinden sich die Erythrozyten im Bodensatz und wurden von dort entnommen. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und die optische Dichte bei 412 nm auf 1,4 durch Verdünnen mit PBS eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  Zellen pro ml.

### 3.6.3. HaCaT- und HTB-43-Zellen

Da die Bindung und damit die Wirkung vom kationischen LL-32 vermutlich ladungsabhängig ist und Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen einen erhöhten Anteil an negativen Lipiden in der Zellmembran aufweisen (Schröder-Borm et al., 2005), wurde auch der Fragestellung nachgegangen, ob LL-32 eine tumorspezifische Wirkung besitzt.

Dafür wurden zwei Zelllinien verwendet, die HaCaT (*Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes*) als Modellzelllinie für normale Keratinozyten (Hautzellen), die HTB-43 als Modellzelllinie für ein schuppiges Kopf- und Halskarzinom (*Human squamous head and neck carcinoma*). Um die Bindungsstärke und Wirkungsweise zu bestimmen, wurden an diesen beiden Zelllinien nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem LL-32 und LL-20 sowohl durchflusszytometrische Messungen als auch konfokale Mikroskopaufnahmen angefertigt. Außerdem wurde mit einem *Apoptose Detection Kit* (TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit TA4638, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) der Fragestellung nachgegangen, ob LL-32 Apoptose (der sogenannte programmierte Zelltod) oder Nekrose verursacht.

Die HaCaT Zelllinie wurde als Modellzelle für die Wirkung auf Keratinozyten benutzt. Sie besitzt eine Differenzierungskapazität, biochemische Zusammensetzung und Leistungsfähigkeit wie native Keratinozyten. Durch eine p54 Mutation ist diese Zelllinie immortalisiert, wodurch sie sich als Kulturzelle eignet. Sie ist nicht tumorbildend im Gegensatz zur HTB-43-Zelllinie. Diese ursprünglich von einem 56jährigen Kaukasier aus der Peripherie eines schuppigen Kopf- und Halskarzinomes entnommenen Zellen lassen in Mäusen ein Epithelzellkarzinom entstehen. Deshalb wurde diese Zelllinie als Tumormodell verwendet. Beide Zellsorten sind konfluent adhäsiv (Informationen von ATCC, [www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

Sie wurden von PD Dr. J. Meyer (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden den ATCC-Richtlinien entsprechend in MEM-Puffer mit 10% BSA

kultiviert. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden sie durch enzymatischen Verdau mit 500 µl Trypsin / EDTA (0,05% W / 0,02% V in PBS; Biochrom AG, Berlin) suspensiert. Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop dagegen wurden im adhärenen Zustand durchgeführt.

### 3.7. Charakterisierung der biologischen Aktivitäten der Peptide

#### 3.7.1. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Peptiden

Die Fähigkeit eines Wirkstoffes, Bakterien am Wachstum zu hindern (bakteriostatisch) oder abzutöten (bakteriozid) wird hier als „antibakterielle Aktivität“ bezeichnet. Diese Aktivität ist spezifisch für den jeweiligen Bakterienstamm und hängt weiterhin in starkem Maße von den äußeren Bedingungen wie Salz- und Nährstoffgehalt des Mediums, Temperatur, usw. ab.

##### Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration

Ein Maß für die antibakterielle Aktivität eines Peptids auf einen Bakterienstamm ist die sogenannte „Minimale Hemm-Konzentration“ (MHK). Sie ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffs, die eine Bakterienpopulation am Wachstum hemmt. Je nach Betrachtung stellt sie damit sowohl ein Maß für die Aktivität des Peptids als auch für die Sensitivität eines Bakterienstammes dar. Experimentell wird die MHK bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe mit variierender Wirkstoffkonzentration auf Bakterien gegeben und die Konzentration ermittelt wird, bei der kein Wachstum mehr stattfindet.

Um Messdaten zur Charakterisierung der biologischen Aktivität der LL-32 Fragmente und der Detergentien in Abhängigkeit der Glycostruktur und der Ladungssubstitution des LPS zu erhalten, wurde die MHK der Fragmente sowohl gegen die Bakterien der Glycostruktur-Gruppe als auch der Substitutions-Gruppe (Tab. 3) mit Hilfe eines so genannten Mikrosuszeptibilitätstest bestimmt.

Auf einer Platte mit 96 kleinen Testkammern, einer sogenannten 96-Well Platte (PS-Microplate, F-Form, Greiner bio-one, (Kremsmünster, Österreich)) wurden in jede verwendete Kammer 90 µl 20 mM HEPES-Puffer sowie 10 µl einer Bakteriensuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  / ml in LB-Medium gegeben. Des Weiteren wurde eine Positiv- und Negativ-Kontrolle, d.h. eine Kammer ohne Peptid und eine Kammer ohne Bakterien, angelegt, um Kontrollwerte für 100% und für 0% Wachstum zu erhalten. Zu den Stämmen wurden die Peptide in einer seriellen 1 : 2 Verdünnungsreihe titriert. Die Platten wurden über Nacht verschlossen im Brutschrank bei 37° C gelagert. Am nächsten Tag wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm die optische Dichte durch eine Extinktionsmessung an einem Photometer der Firma Tecan Rainbow (Salzburg, Österreich), bestimmt. Die niedrigste Wirkstoffkonzentration, die das Wachstum der Bakterien inhibiert, wurde als MHK bezeichnet.

### Bestimmung der letalen Dosis

Ein weiteres Maß der biologischen Aktivität ist die Dosis eines Wirkstoffes, bei dem 90% der Bakterien abgetötet werden, die sogenannte LD90. Von der Arbeitsgruppe von Dr. R. Podschun am Institut für Infektionsmedizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurden im Rahmen einer Kooperation dieser LD90-Wert von den LL-32 Fragmenten gegen verschiedene Bakterienstämme ermittelt und zur Auswertung und Verwertung zur Verfügung gestellt.

Zur Ermittlung dieses Wertes wurde ebenfalls mit einer seriellen 1 : 2 Verdünnung des Wirkstoffes gegen  $10^4$  bis  $10^5$  Bakterien in Natriumphosphatpuffer-Puffer (10mM Natriumphosphat, pH = 7,4) gearbeitet. Außerdem wurden Kontrollen ohne Wirkstoff durchgeführt, um ein Maß für unbeeinträchtiges Bakterienwachstum zu erhalten. Nach einer Wirkzeit von 2 Stunden bei 37 °C wurde die Anzahl an kolonieformenden und damit lebenden Bakterien der einzelnen Verdünnungsstufen des Peptids durch Ausplattieren nach dem Koch'schem Plattengußverfahren auf *Brain-Heart-Infusion-Agar* ermittelt.

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der antibakteriellen Aktivität von LL-32 von dem Salzgehalt des Mediums ermittelt. Aus Platzgründen sind die zugehörigen Ergebnisse im Anhang präsentiert.

### **3.7.2. Bestimmung der zytotoxischen Aktivität**

Die Fähigkeit von Peptiden Erythrozyten zu lysieren, wird in dieser Arbeit als zytoxozische Aktivität bezeichnet. Diese Aktivität der LL-32 Fragmente, wurde für verschiedene Peptid-Konzentrationen mit Hilfe eines Hämolysetest bestimmt. Dabei wurde als Bezugswert für 0%-Lyse die optische Dichte von Erythrozyten in PBS und für 100%-Lyse die optische Dichte von Erythrozyten in destilliertem Wasser verwendet.

Die Erythrozyten (3.6.2.) wurden dreimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS aufgenommen. Durch Verdünnung mit PBS wurde die optische Dichte bei 412 nm auf 1,4 eingestellt, was einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  Zellen pro ml entspricht. Anschließend wurden pro verwendetem Peptid eine Spalte mit 8-Kammern einer Rundbodenplatte mit 96 Kammern (Nunclon Surface 163320, NUNC, Roskilde, Dänemark) mit 80 µl einer seriellen 1: 6 Verdünnung des Peptids versehen. Die Startkonzentration lag bei 100 µM, die niedrigste bei 0,03 µM. Für die 8 positiv- und negativ-Kontrollen wurden je 80 µl PBS bzw. entsalztes Wasser verwendet. Durch den osmotischen Druckunterschied vom zytoplasmatischen Raum und dem entsalzten Wasser lysieren die Erythrozyten vollständig. In dem Nährmedium PBS dagegen nicht. Zu jeder Kammer wurden anschließend 20 µl der Erythrozyten-Suspension gegeben. Die Platten wurden 30 min bei 37° C auf dem Schüttler bei 160 U/min inkubiert und danach die Reaktion durch schnelles Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Platten wurden 10 min



bei 500 g zentrifugiert und die zellfreien Überstände in neue Platten überführt. Dort wurden sie 1:10 mit PBS verdünnt und ihre optische Dichte im Elisareader (Rainbow, Tecan, Crailsheim) bei 405 nm gemessen. Durch Bezug auf die 0%- und 100%-Lyse Werte kann der Anteil an lysierten Zellen bestimmt werden, da lysierte und nicht-lysierte Zellen ein unterschiedliches Absorptionsverhalten besitzen.

### 3.7.3. Bestimmung der antiinflammatorischen Aktivität

Die Fähigkeit von Peptiden, die LPS-induzierte Produktion und Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokines TNF- $\alpha$  durch humane mononukleäre Zellen (MNC) zu senken, wird hier als Maß für die antiinflammatorische Aktivität verwendet. Die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand LPS-stimulierter Zellen wurde mit Hilfe eines *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) gemessen. Dabei wird die TNF- $\alpha$  Konzentration indirekt über eine Oxidation eines Farbstoffes spektroskopisch quantifiziert. Da die nachzuweisende Substanz von zwei spezifischen Antikörpern umschlossen wird, spricht man auch von Doppelsandwich-ELISA. Das Funktionsprinzip ist in Abb. 17 schematisch dargestellt.

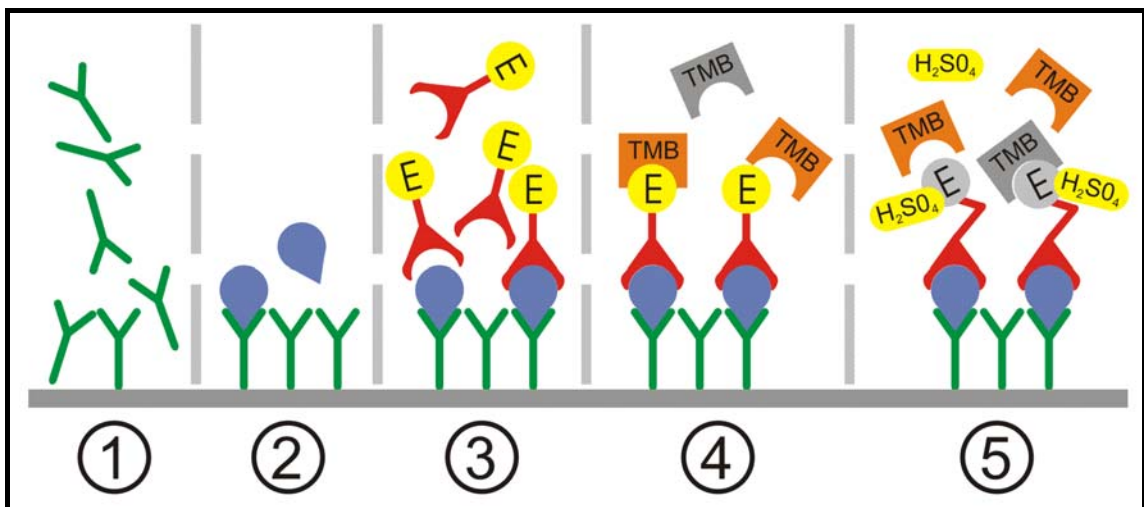


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des verwendeten Doppelsandwich ELISA. 1) Beschichtung der Platte mit einem TNF- $\alpha$  AK (grün). 2) Spezifische Bindung von TNF- $\alpha$  (blau) an den AK. 3) Bindung des zweiten AK (rot) mit Enzym E (gelb). 4) Enzym setzt TMB (grau) zu farbigem Produkt (orange) um. 5) Schwefelsäure stoppt die Reaktion.

Aus den verschiedenen verwendeten LPS wurden durch mehrfaches Erhitzen über die Phasenübergangstemperatur, Abkühlen unterhalb der Phasenübergangstemperatur und Beschallen in 20 mM HEPES-Puffer einheitliche Aggregate hergestellt (Thermozyklus, 3.3.). Die LPS-Aggregate wurden in geeigneter Weise verdünnt und mit 2  $\mu$ M Peptidlösung für 10 min bei 37 °C inkubiert, so dass eine LPS-Konzentration von 500 nM, 50 nM, bzw. 5 nM

LPS mit einem Verhältnis von Peptid zu LPS von 40:1, 400:1, bzw. 4000:1 eingestellt wurde.

Die antikörperbindende Oberfläche einer Flachboden-Mikrotiterplatte (96-Kammer-Platten, Firma Greiner, Solingen, Deutschland) wird mit einem monoklonalen murinen Antikörper gegen humanes TNF- $\alpha$  (Klon 6b von der Intex AG, Schweiz; gelöst in 100 mM Natriumphosphat, pH = 6,0) beschichtet. Dieser AK bindet TNF- $\alpha$  und immobilisiert es. Zusätzlich wurden evtl. Freistellen der Kammeroberfläche durch bovines Serumalbumin (BSA) blockiert und in diesem BSA-haltigem Blockierungspuffer gelagert (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 g/l BSA; 0,25 g/l Thimerosal). Dieser wurde kurz vor Gebrauch der Platte ausgeschlagen.

In einer 96-Kammer-Platte mit Rundboden (Nunclon Surface 163320, NUNC, Roskilde, Dänemark) werden 200  $\mu$ l MNC mit einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml zusammen mit den vorbereiteten LPS-Peptid Aggregaten 5 Stunden lang bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Zellkulturüberstand wird mit Verdünnungspuffer (100 mM TRIS / HCl, pH = 9,0; 100 ml/l FCS; 0,5 g/l Thimerosal; 1 g/l Phenol) verdünnt und 100  $\mu$ l davon in die vorbereitete Flachboden-Mikrotiterplatten transferiert.

Zusätzlich zum Zellkulturüberstand wurden 25  $\mu$ l eines 1:500 im Verdünnungspuffer gelösten zweiten Antikörpers mit gebundener Peroxidase (anti-human TNF- $\alpha$  Antikörper - Meerrettich Peroxidase Konjugat; Intex AG, Schweiz), in die Kammern der vorbereiteten Platte gegeben, so dass der zweite AK in einer Konzentration von 80 ng / ml vorlag. Die Platte wurde dann über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler (PSU 2T plus, Rudolf Franke Labortechnik, Hamburg) inkubiert.

Zur Entfernung von freien Antikörpern wurden die Platten dreimal mit Reinst-Wasser gewaschen.

Im Anschluss wurde 100  $\mu$ l TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (TMB: [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) dazugegeben. Dabei wird die Peroxidase oxidiert und reagiert erst dann mit dem TMB zu einem chromogenen Produkt. Diese Reaktion wird nach 10 min durch Zugabe von 50  $\mu$ l 0,5 M Schwefelsäure gestoppt, indem die Peroxidase zerstört wird. Die bis dahin entstandene Menge des Farbstoffes ist ein Maß für die Menge an TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand. Die Farbstoffkonzentration wurde durch photometrische Extinktionsmessungen bei einer Wellenlänge von 450 nm mithilfe eines „ELISA-Readers“ (Rainbow, Tecan, Crailsheim) bestimmt.

Die Extinktionen wurden auf die Positiv-Kontrolle (nur LPS ohne Peptid) normiert, um ein Maß für den Einfluss von den Peptiden auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$  Sekretion durch MNC zu erhalten.

Damit sichergestellt ist, dass nicht die verwendeten Peptide die MNC abtöten und diese deswegen eine geringere Menge an TNF- $\alpha$  ausschütten, wurde die Zellviabilität mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung überprüft. Dabei wurden MNC

mit Trypanblau (0,4% in 0,75% NaCl-Lösung; Merck, Darmstadt) in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt. Der prozentuale Anteil an gefärbten und damit toten Zellen wurde unter dem Mikroskop ausgezählt.

### **3.8. Physikalische Untersuchungen zur Interaktion der Peptide auf bakterielle Modellsysteme und Bakterien**

Zur Beschreibung des Wirkmechanismus der verwendeten membranaktiven Peptide wurden verschiedene Methoden verwendet, die eine Aussage über das Bindungsverhalten von den Peptiden, sowohl an den LPS-Modellsystemen als auch an Bakterien und humanen Zellen, erlauben. Des Weiteren konnten zum Teil auch Aussagen über die Wirkung, wie z.B. Läsionsbildung, gewonnen werden.

#### **3.8.1. Messung des Zeta-Potential**

Aufgrund der unterschiedlichen Ladung der untersuchten Reaktionspartner LPS und Peptid wird vermutet, dass die elektrostatische Anziehung eine maßgebliche Rolle bei der Interaktion einnimmt. Deshalb wurde das Zeta-Potential, ein Maß für die Oberflächenladung eines Partikels (siehe Theorie), von Phospholipiden, LPS und Bakterien in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration bestimmt.

Zur Bestimmung des Zeta-Potentials wurde der ZetaSizer 4 (Malvern Instruments GmbH, Herrsching) benutzt, der jedoch während der Entstehung dieser Arbeit funktionsunfähig wurde. Deshalb wurde anschließend der ZetaSizer Nano (Malvern Instruments GmbH, Herrsching) benutzt, welcher von Prof. Dr. M. Winterhalter (Arbeitsgruppe Biophysik an der Jacobs University Bremen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Bei den Geräten wird das Zeta-Potential auf unterschiedliche Weise bestimmt (siehe Messweise), jedoch ist durch gleiche Kalibriersubstanzen eine Vergleichbarkeit der Messwerte gewährleistet.

An dem ZetaSizer 4 wurde der Einfluss von LL-32 auf das Zeta-Potential von Phospholipiden bestimmt. Außerdem gelang es, die Änderung des Zeta-Potentials durch PMB an Bakterien selbst zu messen. Mit dem ZetaSizer Nano wurde der Einfluss der Glycostruktur vom LPS auf die Bindung von LL-32 und PMB untersucht, exemplarisch auch für die Peptide LL-20 und PMB-N und für das Detergens DTPPB.

#### Theorie

Das Zeta-Potential ist ein Maß für die Oberflächenladung eines Partikels, abhängig hauptsächlich von der Debye-Länge des umgebenen Mediums und der Oberfläche des Partikels. Zur Bestimmung dieses Potentials wird das zu untersuchende Partikel in einer Suspension mithilfe einer angelegten Spannung in Bewegung versetzt. Die elektrophoretische Geschwindigkeit ist dann ein Maß für das Zeta-Potential des Partikels.

Jedes polare oder geladene Partikel besitzt eine Oberflächenladung und damit ein Oberflächenpotential  $\psi_0$ . Im Zusammenhang mit dem Zeta-Potential wird das Oberflächenpotential oft als Nernst-Potential bezeichnet und nicht wie sonst üblich als Gouy-Chapman-Potential.

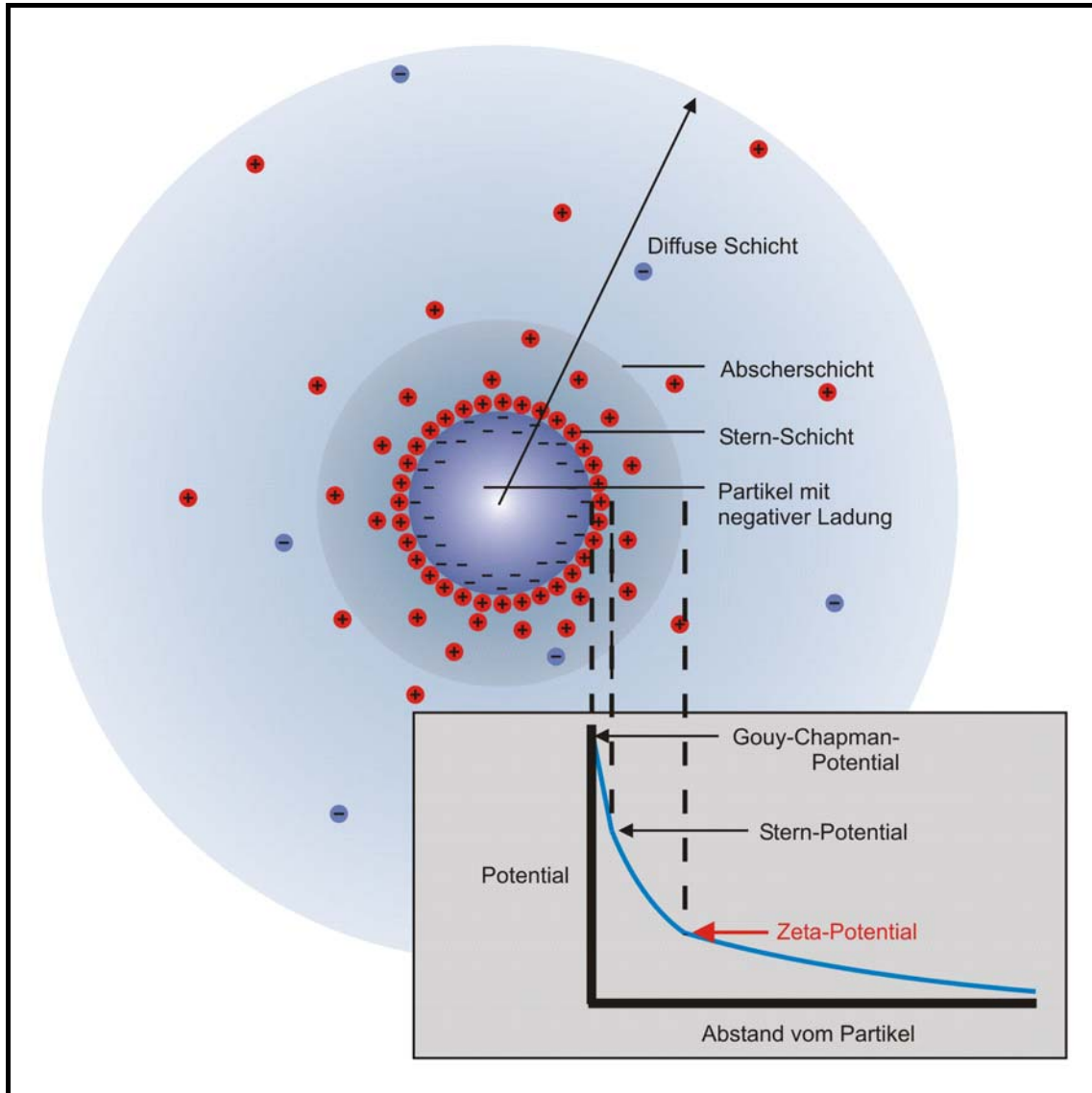


Abbildung 18: Geladenes Partikel mit angelagerten Schichten der Ionen des umgebenen Mediums. Wird das Partikel in Bewegung versetzt, werden die Ionen außerhalb der Abscherschicht durch hydrodynamischen Widerstand abgestreift. Das Zeta-Potential entspricht dem Potential an der Abschergrenze.

In einem wässrigen Medium mit Ladungsträgern, wie z.B. salziger Lösung, lagern sich nach dem Schichtenmodell nach Stern, Helmholtz und Gouy-Chapman Ladungsträger in verschiedenen Schichten an das Partikel an. An der Oberfläche bildet sich die sogenannte Stern-Schicht mit fest gebundenen Ionen aus. Das Potential wird durch die Gouy-Chapman-Stern-Approximation angenähert und deshalb auch als Stern-Potential bezeichnet. Dieses Potential wird nach Gouy und Chapman in einer diffusen Schicht aus locker gebundenen

Ionen kompensiert und fällt exponentiell ab. Abb. 18 zeigt ein geladenes Partikel mit den angelagerten Schichten. Durch diese Anlagerung wird das Potential des Partikels kompensiert und lässt es aus großer Entfernung elektrisch neutral erscheinen. Die Länge, an dem das Potential auf den  $e$ -ten Teil abgefallen ist, wird als Debye-Länge  $\lambda_D$  bezeichnet und ist ein Maß für die effektive Reichweite von elektromagnetischen Wellen in Medien mit Ladungsträgern. Der Debye-Hückel-Parameter  $\kappa$  ist dabei das Reziproke der Debye-Länge  $\lambda_D$ .

Wird das Partikel in Bewegung versetzt, haften die stärker gebundenen Ladungsträger weiterhin an dem Partikel. Die sich außerhalb einer bestimmten Grenzschicht befindenden Ionen der diffusen Schicht sind zu schwach gebunden um dem hydrodynamischen Druck zu widerstehen und werden abgeschert. Damit kompensieren nur die Ladungsträger innerhalb dieser Schicht das Coulomb-Potential. Der Abstand dieser Schicht hängt stark von der Ladungsträgerdichte des Mediums und der Oberflächenbeschaffenheit wie z.B. der Rauigkeit ab. Die Grenzschicht wird als Abscherebene und das dort existierende Potential als Zeta-Potential bezeichnet. Bei gleichem Medium und gleicher Oberflächenbeschaffenheit ist es also ein Maß für die Ladung und damit für die Oberflächenladungsdichte.

Auch wenn die umgebenen Ladungsträger des Mediums das Partikel aus großer Entfernung elektrisch neutral erscheinen lassen, kann das Partikel durch Anlegen einer Spannung in Bewegung versetzt werden. Durch die thermische Eigenbewegung liegt auch bei scheinbarer Ruhe keine vollständige Kompensation des Potentials vor.

Bestimmt werden kann das Zeta-Potential, indem durch Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld aufgebaut wird, welches eine Kraft auf das geladene Partikel ausübt und es in Bewegung versetzt. Die elektrophoretische Geschwindigkeit ist dann proportional zum Zeta-Potential (siehe Herleitung in 5.2.).

Für weitere Betrachtungen inklusive Effekte aufgrund von Partikelform, Viskositäts- und Dielektrizitätsänderungen an der Abschergrenze und des retardierenden Effekts, sei auf die Literatur verwiesen (Lagaly, 1984; Nitzsche und Simon, 1997).

### Messweise

Die Messungen wurden sowohl an einem ZetaSizer 4 als auch an einem ZetaSizer NanoSeries (beide von Malvern Instruments GmbH, Herrsching) durchgeführt. Bei beiden Geräten werden die Partikel durch Anlegen einer Spannung in Bewegung gesetzt und die Geschwindigkeit der Partikel durch Lichtstreuungsmessungen bestimmt. Zur genaueren Messung wird die angelegte Spannung mehrfach umgepolt, damit die Partikel sich zur anderen Seite der Messküvette bewegen können und Wiederholungsmessungen ermöglicht werden.

### Zeta Sizer 4

Beim Zeta Sizer 4 wird die Geschwindigkeit durch die sogenannte Laser-Doppler-Anemometry (LDA) bestimmt. Entgegen der Namensgebung wird dabei aber kein Dopplereffekt ausgenutzt, da die Wellenlänge des reflektierten Lichts nicht bestimmt wird. Bei dem Verfahren wird ein Laserstrahl in zwei Teilstrahlen aufgetrennt und mit Hilfe einer Optik im Messvolumen unter einem Winkel im Bereich um  $12,7^\circ$  gekreuzt. Durch Interferenz entsteht im Kreuzungsvolumen ein paralleles Hell-Dunkel-Streifenmuster. Wenn Partikel nun in diesem sogenannte LDA-Messvolumen einen Hell-Bereich passieren, streuen sie Licht in den Detektor solange, bis sie in den nachfolgenden Dunkel-Bereich eindringen. Während der Passage dieses Bereiches streuen sie kein Licht mehr zum Detektor, erst wenn sie wieder in einen Hell-Bereich eintreten. Die Streifenbreite  $d$  berechnet sich aus der Wellenlänge  $\lambda$  des eingestrahnten Laserlicht und den Winkel  $\alpha$ , unter dem die beiden Strahlen gekreuzt werden, zu:

$$(F12) \quad d = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin(\alpha/2)}$$

Mit dem Streifenabstand  $d$  lässt sich die Geschwindigkeit der Partikel in Beziehung zur Frequenz, unter der das Streulicht beim Detektor eintrifft, setzen. Offensichtlich passiert ein Partikel mit der Geschwindigkeitskomponente  $v_s$  senkrecht zum Streifenmuster pro Sekunde  $(v_s / d)$  –Streifen. Damit ergibt sich die Frequenz  $f$ , unter dem das Streulicht zum Detektor gelang zu:

$$(F13) \quad f = \frac{2v_s \sin(\alpha/2)}{\lambda}$$

Die Frequenz des Detektorsignals ist damit ein Maß für die Geschwindigkeit des Partikels. Das Vorzeichen der Geschwindigkeit wird ermittelt, indem der Einstrahlwinkel in das Messvolumen eines Halbstrahls kontinuierlich variiert wird, so dass die Streifenbreite kontinuierlich geändert wird und damit die Streifen wandern. Jetzt erzeugen Partikel, die sich mit gleicher Geschwindigkeit und Richtung bewegen wie die Streifen, ein kontinuierliches Signal am

Detektor, also mit der Frequenz 0. Teilchen, die sich in Richtung der Streifen bewegen, eine niedrigere Frequenz, Teilchen die sich entgegen der Streifen bewegen, eine erhöhte Frequenz. Durch eine weitere Messung an den Partikeln, bei dem sie aber diesmal durch die angelegte Spannung in die andere Richtung bewegt werden, kann dann das Vorzeichen der Geschwindigkeit und damit das Vorzeichen des Zeta-Potentials ermittelt werden (1996; Müller, 1996).

Ein weiterer Vorteil der Messungen mit moduliertem Strahlengang ist, dass Partikel mit keiner oder geringer Ladung ein deutliches Frequenzsignal liefern. Die Wandung des Messröhrchens aus Quarzglas besitzt eine Oberflächenladung. Die dadurch entstehende ungleiche Verteilung der Ionen bewirkt bei Anlegen einer Spannung ein Fluss im Rohr. Dabei wird die Strömung im Außenbereich zur Kathode durch einen Rückfluss im Inneren kompensiert, der sogenannte elektroosmotische Fluss. Dabei existiert ein Bereich (Abstand zur Wandung: 14,6% des Innendurchmessers), die sogenannte stationäre Schicht, in dem sich beide Ströme kompensieren. In diesem Bereich ist das Messvolumen, da sich hier die elektroforetische Geschwindigkeit der zu untersuchenden Partikel nicht durch eine Strömungsgeschwindigkeit überlagert und damit verfälscht wird.

Das Messsignal wird mit einem PC-Programm der Herstellerfirma ausgelesen und analysiert.

#### ZetaSizer Nano

Bei den Geräten der ZetaSizer Nano Serie wird der Laserstrahl in einen Mess- und einen Referenzstrahl geteilt. Der Messstrahl dringt senkrecht zur Bewegungsrichtung der Partikel ein und das unter einem Winkel von  $17^\circ$  gestreute Licht wird mit dem Referenzstrahl überlagert und detektiert.

Die Geschwindigkeitsmessung beruht auf einer Weiterentwicklung der traditionellen LDA-Technik, der sogenannten M3-PALS Technik. Diese von Malvern patentierte Technik ist nicht mehr darauf angewiesen, dass sich das Messvolumen in der stationären Schicht befinden muss, da die M3- (*Mixed Mode Measurement*) Technik durch unterschiedlich schnelles Umschalten des angelegten Feldes die elektroosmotische Eigenbewegung des Mediums bestimmen und somit rausrechnen kann. Bei der eigentlichen Geschwindigkeitsmessung durch die PALS- (*Phase Analysis Light Scattering*) Technik wird die Tatsache ausgenutzt, dass das unter  $17^\circ$  am Partikel gestreute Licht einen Phasenversatz proportional zur Partikelgeschwindigkeit aufweist. Dieser Phasenversatz wird bestimmt, indem die Phasen des Messstrahls mit denen des Referenzstrahls verglichen werden.

#### Experimentdurchführung

Die Experimentdurchführung ist bei den beiden verwendeten Geräten, ZetaSizer 4 und ZetaSizer Nano, weitestgehend identisch. Von der Möglichkeit

mit dem neueren ZetaSizer Nano an geringeren Konzentrationen zu messen wurde Gebrauch gemacht.

Für die Messungen am ZetaSizer 4 wurde die Phospholipid-Vesikellösung auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt und 3 ml wurden für die Messungen verwendet. Die zugegebene Menge von jeweils 6  $\mu\text{l}$  LL-32 mit einer Konzentration von 1 mM wurde so gewählt, dass sich das molare Konzentrationsverhältnis von LL-32 zu den Phospholipiden pro Zugabe um 0,2 erhöht. Am Ende der Messreihe wurde ein Volumen von 12  $\mu\text{l}$  dazugegeben, um das Verhältnis um 0,4 zu steigern,

Bei den Messungen des Zeta-Potentials von Bakterien mit dem ZetaSizer 4 wurden die Bakterien mit einer optischen Dichte von ca. 0,04 bei 620 nm in PBS verwendet (entspricht einer Konzentration von  $1,5 \times 10^7$  / ml). PMB wurde in verschiedenen Mengen dazugegeben und die Lösung vor jeder Messung kräftig geschüttelt. Nach einer Wirkzeit von 5 min wurden die Messungen durchgeführt.

Die Messungen am ZetaSizer Nano wurden mit 600  $\mu\text{l}$  einer 2  $\mu\text{M}$  LPS-Aggregatlösung durchgeführt. Die in Volumen von je 12  $\mu\text{l}$  zugegebenen Peptide mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  erhöhen das molare Verhältnis von Peptid zu LPS um 0,2 je Zugabe. Am Ende der Messreihe wurde das molare Verhältnis durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  um 0,5 erhöht.

### 3.8.2. Größenbestimmung durch den Zeta-Sizer

Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgt beim ZetaSizer 4 durch Analyse von 90° Streulicht der ruhenden Partikel. Nach der Lorentz-Mie-Streutheorie ist dessen Intensität abhängig von der Größe des Streuzentrums:

Die Lorentz-Mie-Streuung beschreibt die Lichtstreuung an sphärischen Partikeln, die mindestens so groß sind wie die Wellenlänge des eingestrahlten Lichts ( $d \geq \lambda$ ). Hier ist die Intensität des gestreuten Lichts proportional zum Quadrat des Durchmessers des Partikels. Durch Kalibrierungsmessungen an bekannten Teilchen kann damit die Größe bestimmt werden.

Beim ZetaSizer Nano wird die Größe von Partikeln mit Hilfe der sogenannten Dynamischen Licht Streuung (*Dynamic Light Scattering* (DLS), auch als *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS) bezeichnet) bestimmt. Im Prinzip wird der Diffusionskoeffizient bestimmt und daraus auf die Molekülgröße zurückgeschlossen.

Wenn kohärentes und monochromatisches Licht, wie z.B. beim Laser, an Partikeln in Lösung gestreut wird, empfängt der Detektor zeit-abhängige Fluktuationen der Streulichtintensität. Diese Fluktuationen stammen aus der zufälligen thermischen Bewegung der Moleküle, die die Abstände zwischen den Molekülen variiert. Interferenz vom Streulicht benachbarter Partikel im Messvolumen erhöht die Fluktuationen. Damit enthalten die Fluktuationen Information aus der Brownschen Bewegung und damit des Diffusionskoeffizienten. Dadurch kann aus der Zeitabhängigkeit der



Fluktuationen der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Bei bekannter Viskosität des Mediums kann über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius der Partikel berechnet werden.

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wird das Detektorsignal mittels einer Autokorrelationsfunktion ausgewertet. Der zeitliche Abfall der Autokorrelationsfunktion ist charakteristisch für den Diffusionskoeffizient. Auch kann die Verteilung der Größen errechnet werden, da monodisperse Partikel einen exponentiellen Abfall der Autokorrelationsfunktion verursachen, multidisperse Partikel jedoch eine Überlagerung aus mehreren exponentiellen Abfällen. Durch Anpassen der tatsächlichen Autokorrelationsfunktion mit theoretischen Berechnungen aus angenommenen Verteilungen wird dann die Größenverteilung berechnet.

### 3.8.3. Isotherme Titrationskalorimetrie

Generell wird bei der Isothermen Titrationskalorimetrie (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) die bei beliebigen Reaktionen umgesetzte Wärme bestimmt (Langerman und Biltonen, 1979; Ladbury und Chowdhry, 1996). Dabei kann ein vollständiges thermodynamisches Profil der untersuchten Reaktion erstellt werden (Wiseman et al., 1989). Vorteilhaft bei dieser Methode ist, dass die Anforderungen an die Probenqualität in Hinblick auf optisches Verhalten oder Eigenbewegung der Probenobjekte gering bzw. gleich Null sind. Auch auf eine Markierung der zu untersuchenden Stoffe kann bei dieser Methode verzichtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wärmefreisetzung von Peptid – LPS und Peptid – Bakterien Reaktionen mithilfe des Gerätes MCS-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) und der Steuersoftware MCS-Observer untersucht sowie mit dem Programm Origin 6.0 ausgewertet.

Das Gerät besitzt zwei thermisch isolierte Zellen, die Referenz- und die Reaktionszelle mit angeschlossener Titrationseinheit. In beiden Zellen befinden sich je ein Wärmesensor und ein Heizelement. Die jeweils 1,5 ml großen Mess-, bzw. Referenzvolumina können mithilfe von Röhrchen befüllt werden. Beide Zellen sind von einem sogenannten isothermen Mantel umgeben, der mit Hilfe von Heiz- und Sensorelementen auf einer konstanten Temperatur gehalten wird. Die mit einer Hamiltonspritze mit einem Volumen von bis zu 120  $\mu$ l ausgestattete Titrationseinheit wird über einen Schrittmotor bedient und ermöglicht eine nahezu stufenlose Volumenwahl und Injektionshäufigkeit. Die Spitze der Spritze ist mit einer Röhreinheit ausgestattet, so dass eine möglichst gleichmäßige Probendurchmischung erreicht wird.

Zur Bestimmung der Reaktionswärme wird grundsätzlich ein ständiger Vergleich zwischen der Temperaturdifferenz der Referenz- und der Messzelle durchgeführt. Beide sind grundsätzlich baugleich und aus einem Material, das einen schnellen Temperatenausgleich gewährleistet. Da beide Zellen den

gleichen Wärmeverlust an den isothermen Mantel besitzen, ist die Differenz des Stroms ihrer Heizelemente, der benötigt wird, um die Zellen auf einer konstanten Temperatur zu halten, ein Maß für die Reaktionswärme. Findet also eine exotherme Reaktion in der Messzelle statt, so ist die Heizleistung für die Messzelle geringer als die für die Referenzzelle und somit die Differenz von Heizstrom der Referenzzelle und des Heizstroms der Messzelle bei gleicher angelegter Spannung ein Maß für die freiwerdende Reaktionswärme der Reaktion. Bei einer endothermen Reaktion ist die Heizleistung der Referenzzelle geringer und damit ändert sich das Vorzeichen der Differenz der Heizströme.

Diese Größe ist messtechnisch schnell und exakt erfassbar, so dass eine gute Zeitauflösung und eine hohe Genauigkeit erreicht wird. Für eine genauere Betrachtung wird auf die Literatur verwiesen (Wiseman et al., 1989; Livingstone, 1996).

### Experimentdurchführung

Zur Experimentdurchführung wurde die Referenzzelle mit 1,5 ml entgastem sterilen 20 mM HEPES-Puffer und die Messzelle entweder mit 1,5 ml einer 50  $\mu\text{M}$  LPS-Aggregatsuspension in entgastem 20 mM HEPES-Puffer (3.1.) gefüllt oder mit einer Bakteriensuspension in PBS mit einer optischen Dichte von 0,5 bei 620 nm. Die Titrationseinheit wurde mit 110  $\mu\text{l}$  Peptidlösung befüllt. Die Häufigkeit der Peptid-Injektionen, die Konzentration und das Volumen der Peptidlösung richtete sich nach den speziellen Anforderungen des Experiments. Bei den Messungen an LPS-Aggregaten wurde das molare Verhältnis von Peptid zu LPS durch jede Injektion um 0,07 erhöht, bis ein Verhältnis von 2 : 1 erreicht wurde. Bei den Messungen an Bakterien wurde die Peptidkonzentration durch fünf Zugaben um jeweils 1,07  $\mu\text{M}$  bzw. 10,7  $\mu\text{M}$  erhöht. Nachdem sich ein thermisches Gleichgewicht zwischen isothermen Mantel und beiden Zellen eingestellt hat, wurde das Peptid in gewünschter Weise zu verschiedenen Zeitpunkten injiziert. Bei den Messungen an Bakterien wurde mindestens 1 Stunde (max. 1,5 Std.) gewartet, damit die Bakterien sich an die neuen Umgebungsparameter anpassen können (Lag-Phase). Eine gute Versorgung mit Sauerstoff konnte leider nicht gewährleistet werden, das PBS wurde nicht entgast. Zur Ermittlung des Einflusses von Verdünnungs- und Mischenthalpien wurde sowohl die Peptidlösung in Puffer als auch der Puffer der Peptidlösung in die LPS-Suspension titriert.

### **3.8.4. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie**

Mithilfe der Konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)) ist es möglich, optische Schnitte mit einer Tiefe von ca. 1  $\mu\text{m}$  aufzunehmen. Dies wird dadurch erreicht, dass mithilfe einer Lochblende, die sich in der Fokusebene der abzubildenden Ebene befindet, idealer Weise nur Strahlen von einem einzigen Punkt abgebildet werden. Damit muss zur Aufnahme eines Bildes das Objekt abgerastert werden.

Bei der klassischen Mikroskopie wird das gesamte Objekt ausgeleuchtet und die Reflektionen werden durch eine Linse abgebildet. Dabei werden die Teilbereiche des Objekts (unterschiedlicher Gegenstandsweite) aufgrund der Linsengleichung in unterschiedlichen Ebenen scharf abgebildet (unterschiedliche Bildweite). Damit wird auf einem Schirm nicht nur eine Objektebene scharf abgebildet, sondern das Bild wird durch unscharfe Abbildungen von Gegenständen vor und hinter der Objektebene überlagert. Diese Überlagerungen werden bei der konfokalen Mikroskopie durch eine in der Fokusebene des abzubildenden Punkts angebrachte Lochblende ausgeschlossen. Durch das Loch der Blende gelangen fast nur Strahlen von einem einzigen Punkt aus der Objektebene. Durch Abrastern der Objektebene kann aus den Einzelpunkten ein Bild zusammengesetzt werden. Eine weitere Verbesserung der Tiefenschärfe wird dadurch erreicht, dass mithilfe einer Illuminationsblende nur der abzubildende Objektbereich ausgeleuchtet wird. Dies reduziert Streulicht von den nichtabzubildenden Objektpunkten.

Die konfokalen Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) durchgeführt. Dieses Mikroskop besitzt Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen, so dass Aufnahmen mit mehreren unterschiedlich fluoreszierenden Substanzen angefertigt werden können.

Mit der CLSM wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von fluoreszenzmarkierten Peptiden an humanen Zellen untersucht. Dabei konnte der Bindungsort identifiziert werden und über die Auswirkungen auf die Zellmorphologie konnten Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus gezogen werden.

#### Experimentdurchführung

Mithilfe von Membran- und Zellkernfärbung wurde mit fluoreszenzmarkiertem LL-32 und LL-20 deren Bindefähigkeit und –ort an Zellen der HaCaT und die HTB-43 Zelllinien bestimmt. Aus der Morphologie der Zellen können Rückschlüsse auf die Wirkung der Peptide geschlossen werden. Dazu wurden mikroskopische Aufnahmen nach drei unterschiedlich langen Inkubationszeiten der Peptide angefertigt.

Für die Experimente wurden HaCaT und HTB-43 Zellen nach den ATCC-Richtlinien kultiviert. Jede Zelllinie wurde in alle Kammern je einer 8-Kammer-Platte (Lab Tek II, Boden mit Deckgläschen, Nunc, Wiesbaden) mit einer Zellzahl von 200.000 in 500 µl MEM-Medium mit 10% FCS transferiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37° C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, bevor zu beiden Zelllinien in jeweils drei Kammern 250 µl NBD-markiertes LL-32 oder 250 µl NBD-markiertes LL-20 mit einer Konzentration von je 5 µM dazugegeben wurde. Von den jeweiligen drei Kammern wurde bei einer Kammer nach 1 min, 5 min oder 10 min das fluoreszenzmarkierte Peptid abgesaugt und die Zellen 2 min bei Raumtemperatur mit 400 µl PBS und 2% PFA fixiert. Anschließend wurden alle Kammern dreimal mit 500 µl PBS gewaschen, bevor bei allen Kammern die

Membranfärbung mit 250 µl Weizenkeimagglutinin-Alexa555 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) mit einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS und 10% BSA vorgenommen wurde. Die Zellen wurden 40 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bevor das Medium abgesaugt wurde. Wiederum wurden sie 2 min mit 500 µl PBS und 2% PFA fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in allen Kammern mit 250 µl TOTO3 (1 µM in PBS und 10% BSA, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) eine Zellkernfärbung durchgeführt. Nach einer dreiviertel Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Kammern dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2 Tropfen Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA) eingebettet und bei 4° C bis zu den Aufnahmen gelagert.

Bei den Aufnahmen am konfokalen Mikroskop wurden die gelbfluoreszenten NBD-markierten Peptide durch einen Argon-Laser mit der Wellenlänge 488 nm angeregt, WGA A555 mit 543 nm und TOTO3 mit einem Helium-Neon-Laser bei 647 nm. Mithilfe geeigneter Filtereinstellungen des variablen 3-stufigen Tiefpasses wurde für jedes Fluorophor die Intensität über einen gewissen Spektralbereich eingestellt. Die Bilder sind akkumulierte Aufnahmen aus 4 Einzelbildern. Die Versuche wurden mit gleichbleibenden Geräteeinstellungen durchgeführt.

Es wurden sowohl Übersichtsaufnahmen von Zellverbänden als auch vergrößerte Darstellungen einzelner Zellen oder Zellbestandteile angefertigt.

### 3.8.5. Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Bindefähigkeit von LL32 an lebende Zellen und Bakterien wurde die sogenannte Durchflusszytometrie, häufig auch als *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) bezeichnet, verwendet. Die Messungen wurden am Gerät FACS-Calibur (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Diese Methode wird nur kurz dargestellt, für eine tiefergehende Beschreibung wird auf die Literatur verwiesen (Alvarez-Barrientos et al., 2000; Herzenberg et al., 2002).

Hierbei handelt es sich um ein durchflußzytometrisches Verfahren, bei dem an hydrodynamisch fokussierten und separierten Zellen (Dean et al., 1978) Lichtstreu- und fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt werden (Bonner et al., 1972; Tanke und van der, 1993). Dadurch können Erkenntnisse über physikalische und molekulare Eigenschaften von Einzelzellen gewonnen werden. Im Gegensatz zu normalen mikroskopischen Messungen können hierbei Informationen von mehreren tausend Zellen pro Sekunde aufgenommen werden (Brehm-Stecher und Johnson, 2004).

Verschiedene Photomultiplier detektieren dabei Kleinwinkel- und Weitwinkel (90°)-Streulicht und die Intensität bei verschiedenen Wellenlängen. Die Kleinwinkelstreuung, auch als *Forward Scattering* (FSC) bezeichnet, bei der der Detektor durch einen Shutter vor direkter Lasereinstrahlung geschützt ist, liefert

ein Maß für die Größe des analysierten Partikel. Die Intensität der Weitwinkelstreuung, auch als *Side Scattering* (SSC) bezeichnet, ist ein Maß für die Granularität der Zelle, also die Anzahl an weiteren Streuzentren. Dadurch, dass Laserlicht mit bis zu vier verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig eingestrahlt werden kann, ist es möglich, verschiedene Fluorophore parallel anzuregen und das emittierte Fluoreszenzlicht nach vier Wellenlängenbereichen getrennt an Detektoren aufzuzeichnen. Damit kann also von jeder einzelnen Zelle gleichzeitig eine Information über Größe, Granularität und Anzahl an gebundenen Fluorophoren gewonnen werden. Da die gewonnenen Informationen keine absoluten Werte darstellen, müssen sie immer in Bezug zu unbehandelten Kontrollen betrachtet werden.

#### Experimentdurchführung

Insgesamt wurden drei verschiedene Messreihen am FACS-Calibur durchgeführt. Es wurde die Bindungsfähigkeit von fluoreszenzmarkiertem LL-32 sowohl an die Bakterien der verschiedenen Stämme, als auch an die HaCaT und HTB-43 Zellen bestimmt. Mit Hilfe des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid (PI) wurde außerdem ermittelt, ob, wie stark und wie schnell LL-32 die Integrität der bakteriellen, bzw. der zellulären Hülle beeinträchtigt. An den verwendeten Zelllinien wurde außerdem mit einem Färbetest (TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, R&D Systems) untersucht, ob LL-32 Apoptose-induzierend ist. Für die Messungen an den Zellen wurden immer dieselben Geräteeinstellungen verwendet, ebenso wie für alle Bakterienmessungen.

Aufgrund der verwendeten Bakterien, die fast alle der Sicherheitsstufe L2 unterliegen, wurden die durchflusszytometrischen Messungen an den Bakterien im S3-Labor am FZB durchgeführt, da kein FACS-Gerät in einem L2- oder S2-Labor zur Verfügung stand.

#### 3.8.5.1. Durchflusszytometrische Messungen zur Bindefähigkeit und Wirkung von LL-32 an Gram-negativen Bakterien

Um die Bindefähigkeit und Wirkung von LL-32 in Abhängigkeit von der Glycostruktur und der Ladungssubstitution vom LPS an Bakterien zu messen, wurde die Bakterienkonzentration von den verschiedenen Stämmen (3.4.) nach zweimaligem Waschen (in PBS mit Zentrifugation (8000g, 10min, 20°C)) mithilfe der optischen Dichte und der Eichkurve auf  $10^7$  / ml eingestellt. 2400 µl der PBS-Bakteriensuspension wurden wiederum zentrifugiert und das Pellet wurde in 400 µl eines sogenannten Inkubationsreagenz resuspendiert. Dieses besteht aus PBS mit 10% Propidiumjodid (PI). PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der verwendet wird, um eine Läsionsbildung in den Zellmembranen zu detektieren, da er nur passiv in die Zelle diffundieren kann, also nicht membrangängig ist. In der Zelle bindet PI an DANN. Er ist in dem verwendeten Färbetest enthalten (aus TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, R&D Systems). Deshalb ist die Menge von internalisiertem PI ein Maß für die

Läsionsbildung. Nach 15 min wurden 2 ml PBS dazugegeben und damit wieder eine Bakterienkonzentration von  $10^7$  / ml erreicht.

Zur Kontrolle wurden 2-mal je 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension entnommen, die jeweils mit 900  $\mu$ l PBS mit 15,4 mM Natriumazid versetzt wurden. Eine Kontrollmessung fand vor der Messung der LL-32 Wirkung statt, eine nach 63 min. Anschließend wurde die Zellsuspension mit NBD-LL32 versetzt, so dass sie eine Konzentration von 5  $\mu$ M LL-32 enthielten. Zur Aufnahme einer Wirkkinetik wurden 100  $\mu$ l Proben nach 1 min, 5 min, 9 min,... und 61 min Wirkzeit entnommen, mit 900  $\mu$ l PBS mit 15,4 mM Natriumazid verdünnt und 30 s später gemessen.

### 3.8.5.2. Durchflusszytometrische Messungen zur Interaktion zwischen LL-32 und HaCaT sowie HTB-43 Zellen

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Bindung von fluoreszenzmarkiertem LL-32 an die HaCaT und HTB-43 Zellen (3.6.3.) und dessen Auswirkung auf die Integrität der Zellhülle wurden ähnlich wie die entsprechenden Messungen an den Bakterien durchgeführt (siehe oberer Absatz). Dazu wurden  $2,4 \times 10^6$  Zellen in D-MEM mit 10% FCS zentrifugiert (250 g, 5 min, T = RT) und mit PBS gewaschen. Nach einer wiederholten Zentrifugation wurde das Pellet in 400  $\mu$ l des oben beschriebenen Inkubationsreagenz resuspendiert. Nach ca. 15 min wurde die Lösung mit 2000  $\mu$ l PBS auf eine Zelldichte von  $10^6$  / ml verdünnt.

Die Proben wurden auf gleiche Weise wie bei den Bakterienmessungen entnommen, so dass 2 Kontrollmessungen ohne LL-32 und eine Wirkkinetik von LL-32 von 1 min bis 61 min Wirkzeit aufgenommen wurden. Dabei wurde die LL-32 Konzentration auf 25  $\mu$ M eingestellt. Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der LL-32 Bindung wurde LL-32 unterschiedlicher Konzentration auf je  $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml PBS titriert und über Nacht (20 h) wirken lassen. Bei einer anderen Messung wurde 1  $\mu$ M LL-32 bei einer Inkubationszeit von 12 Stunden verwendet und die Zellen dann wie oben beschrieben für die Messungen vorbereitet.

### 3.8.5.3. Durchflusszytometrische Messungen zur Unterscheidung zwischen apoptotischem oder nekrotischem Zelltod von HaCaT- und HTB-43 Zellen ausgelöst durch LL-32

Die Messungen zur apoptotischen oder nekrotischen Wirkung wurden mit einem Färbetest (TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit TA4638, R&D Systems), welches fluoreszenzmarkiertes Annexin V und PI enthält, nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Grundlage des Tests ist das Verhalten einer Zelle bei Apoptose. Dabei gelang am Anfang des Absterbevorgangs der Zelle Phosphatidylserin (PS), ein negativ geladenes Lipid, verstärkt in die äußere Schicht der Zellmembran. Anschließend wird die Integrität der Zellmembran zerstört. Annexin V, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC

markiert ist, bindet spezifisch an PS, so dass die Menge an gebundenen Annexin V-FITC ein Maß für die PS-Exposition in der Membran ist. Da bei Apoptose zuerst die Membranladung steigt und erst danach die Membran permeabel wird, steigt also erst die Menge an gebundenem Annexin V-FITC und anschließend die Menge an internalisiertem PI. Bei einem nekrotischen Vorgang steigt die Menge an internem PI zuerst an, anschließend kann evtl. die Annexin V Bindung ebenfalls erhöht werden, da jetzt auch die vorher unzugänglichen Lipide der inneren Schicht der Zellmembran zugänglich sind.

### 3.8.6. Förster Resonanz Energie Transfer Spektroskopie

Mit einer fluoreszenzspektroskopischen Methode wurde der Einfluss der verwendeten Peptide auf LPS-Aggregate untersucht. Dabei wurde mit Hilfe fluoreszenzmarkierter LPS-Aggregate untersucht, inwiefern die verwendeten Peptide in der Lage sind, sich in die Aggregate einzubauen und diese miteinander zu fusionieren.

Das Prinzip des intermolekularen Förster Resonanz Energie Transfers (FRET) basiert darauf, dass ein angeregter Fluorophor seine Energie nicht nur durch Aussenden eines Lichtquants (Fluoreszenz) abgeben kann, sondern auch durch strahlungslose Nahfeld-Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf benachbarte Moleküle übertragen kann (Cardullo, 2007). Im Falle von benachbarten Fluorophoren können diese dadurch derartig angeregt werden, dass sie anschließend die Anregungsenergie durch Aussenden eines Lichtquants abbauen, also selbst fluoreszieren. Damit wird die Anregungsenergie des ersten Fluorophors, auch als Donor bezeichnet, auf den zweiten Fluorophor, dem Akzeptor, übertragen. Deshalb sinkt durch den FRET die Fluoreszenzintensität des Donors, während die des Akzeptors steigt. Dies hat zur Folge, dass das Verhältnis von Fluoreszenzintensität von Akzeptor zu Donor ( $I_A/I_D$ ) ansteigt. Voraussetzung ist, dass sich das Anregungsspektrum des Akzeptors mit dem Fluoreszenzspektrum des Donors überlappt und der angeregte Donordipol nicht senkrecht zum unangeregtem Akzeptordipol ist (Dale and Eisinger 1974).

Da die Effizienz des FRET sehr stark vom Donor-Akzeptor Abstand abhängig ist, kann eine Änderung des mittleren Abstandes von Akzeptor und Donor durch Änderung des ( $I_A/I_D$ )-Wertes detektiert werden (Cardullo, 2007). (Schromm et al., 1996a)

#### Theorie

Im Zusammenhang mit Selbstauslöschungs-Effekten (Quenching) von Fluorophoren erkannte Jean Perrin Anfang des 20. Jahrhunderts, dass ein angeregter Fluorophor seine Anregungsenergie auf ein nah benachbartes Molekül durch Wechselwirkung zwischen oszillierenden Dipolen übertragen kann. Es findet jedoch kein Energietransfer statt, wenn der angeregte Dipol senkrecht zum empfangenden Dipol ist. Ist das benachbarte Molekül ebenfalls ein Fluorophor, kann die Anregung zur Fluoreszenz führen. Dieses

quantenmechanische Verhalten findet im Nahfeld des angeregten Fluorophores statt, also in einer Entfernung bis zu  $\lambda/2\pi$  mit  $\lambda$  als Wellenlänge des freien elektrischen Feldes, das mit der Frequenz des atomaren elektrischen Felds schwingt. Dies sind meist Entfernungen bis ca. 10 nm.

Bei der Weiterentwicklung der Theorie machte Perrin jedoch einige Fehler. 1946 griff Theodor Förster, der sich mit Photosynthese beschäftigte, Perrins Idee auf und entwickelte sie zu Ende. Dabei konnte er seine quantenmechanischen Herleitungen experimentell untermauern und zeigen, dass für die abstandsabhängige Energie-Transfer-Effizienz  $E$  zwischen einem einzelnen Donor und einem einzelnen Akzeptor folgende Beziehung gilt:

$$(F14) \quad E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad \begin{array}{l} \text{mit } R = \text{Abstand Donor-Akzeptor} \\ R_0 = \text{Förster Radius, entspricht dem} \\ \text{Abstand bei } E = 0,5 \end{array}$$

Dabei bedeutet  $E_{FRET} = 1$ , dass die gesamte von Donor aufgenommene Energie an den Akzeptor transferiert wurde. Durch die starke Abstandsabhängigkeit zur sechsten Potenz kann innerhalb eines gewissen Längenbereiches bis etwa 10 nm eine Abstandsänderung zwischen Donor und Akzeptor sehr genau detektiert werden.

Im Falle von Molekülen in komplexen Membranen hat sich aber gezeigt, dass eine genaue Berechnung der FRET-Signale nicht möglich ist (Zimet et al., 1995). Deshalb beschränken sich die Aussagen über einer Änderung der Intensitäten der Signale in dieser Arbeit auf relative Änderungen und damit auf relative Abstandsänderungen.

#### Experimentdurchführung

Die spektroskopischen Messungen zur Wirkung von Peptiden auf farbstoffmarkierte LPS-Aggregate wurden am Fluorolog F1 T11 der Firma Spex Instruments (Edison, NJ, USA) durchgeführt. Bei dem verwendeten Spektrometer wird die Probe durch eine Quecksilberdampf Lampe mit einem Wellenlängendiskriminator ausgeleuchtet. Senkrecht zur Anregung wird das reflektierte oder emittierte Licht durch zwei Photomultiplier detektiert. Sowohl Anregungsintensität als auch die Intensität des detektierten Signals lassen sich durch mechanische Spaltblenden regulieren. Für die beschriebenen Versuche wurden die Proben mit einer Wellenlänge von 470 nm, der Hauptanregungswellenlänge von NBD, beleuchtet und die Intensitäten bei den Wellenlängen 531 nm und 593 nm detektiert. Dies sind die Emissionswellenlängen von NBD und Rh.

Für die Messungen wurden die mit NBD-PE oder Rh-PE markierten LPS-Aggregate (3.5.) in PBS auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verdünnt. Anschließend wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  der markierten LPS-Aggregate zusammengegeben, so dass LPS-Aggregate mit einer Konzentration von



10  $\mu\text{M}$  vorlagen, wobei die eine Hälfte mit einem FRET-Donor- und die andere Hälfte mit einem FRET-Akzeptor-Farbstoff markiert ist. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nachdem die Probe in den Strahlengang des Spektrometers gestellt wurde, wurden die Intensitäten der detektierten Wellenlängen auf ein einheitliches Niveau von 200.000 Ereignissen / s eingestellt. Dann wurde die Messung gestartet und nach 100 s wurden 10  $\mu\text{l}$  0,3 mM Peptid (in Reinst-Wasser mit 0,01-%iger Essigsäure) dazutitriert. Damit lag ein LPS zu Peptid Verhältnis von 1:0,3 vor. Dann wurde alle 50 s durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Peptidlösung passender Konzentration das Verhältnis auf 1:0,6, 1:1, 1:2 und nach 300 s auf 1:5 erhöht. Nach 400 s wurden die Messungen gestoppt.

Es wurden LPS-Aggregate aus R595-, R60- und R45-LPS gegen alle LL-32 Fragmente und gegen PMB und PMB-N gemessen. Zusätzlich wurde ein Verdünnungseffekt durch die 10  $\mu\text{l}$  Zugaben durch eine Kontrollmessung mit Zugaben von 0,01%-iger Essigsäure überprüft. Zur Unterscheidung von Peptid-Aggregat- und Aggregat-Aggregat-Effekten wurden Messungen mit dem Peptid FF-28 an nur mit einem Farbstoff markierten R45-LPS-Aggregaten durchgeführt. Dies wird explizit im Kapitel 4 erläutert.

### 3.8.7. Hydrophobes Moment und hydrophober Winkel

Zur Berechnung des hydrophoben Moments der LL-32 Fragmente wurde ein frei verfügbares Programm (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel>) verwendet.

Das hydrophobe Moment des Peptids ist die Vektorsumme der hydrophoben Momente der Aminosäuren. Der Betrag des hydrophoben Moments der einzelnen AS beruht auf experimentellen Werten für die Änderung der Gibb'schen Freien Energie bei Änderung der Umgebung von Wasser zu einer ungeladenen Phospholipidmembran-Umgebung (z.B. für die Aminosäure Leucin ist  $\Delta G = -2\,345 \pm 167$  J/mol bei dem Übergang von Wasser zu POPC) (Jacobs und White, 1989). Für die Berechnung der Vektorsumme wird jeder Aminosäure eine Position auf einer idealen  $\alpha$ -Helix zugeordnet. Dabei wurde angenommen, dass zwischen zwei Aminosäuren ein Winkel von  $100^\circ$  ist, also zwischen 1. und i-ter AS ein Winkel von  $(i-1) \cdot 100^\circ$  ist.

Damit ergibt sich das hydrophobe Moment  $\vec{\mu}$  zu:

$$(F15) \quad \vec{\mu} = \sum_i (\Delta G \cdot \cos((i-1) \cdot 100^\circ), (\Delta G \cdot \sin((i-1) \cdot 100^\circ))$$

Für viele Belange ist häufig auch nur der Betrag des hydrophoben Moments von Interesse. Für eine tiefergehende Beschreibung wird verwiesen auf:

- (i) das Programm (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel>),
- (ii) die Internet-Inhalte: ([http://blanco.biomol.uci.edu/hydrophobicity\\_scales.html](http://blanco.biomol.uci.edu/hydrophobicity_scales.html))
- (iii) die Literatur (Schiffer und Edmundson, 1967; Kamtekar et al., 1993).

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Die dramatisch ansteigende Anzahl an resistenten infektiösen Bakterienstämmen schränkt zunehmend die Wirksamkeit herkömmlicher Antibiotika ein. Neuartige Antibiotika müssen nicht nur bei den bereits vorhandenen Resistenzen wirksam sein, sondern sollten auch keine neuen Resistenzmechanismen induzieren oder zumindest die Bildung neuer Resistenzen stark erschweren. Zusätzlich sollten sie in der Lage sein, die Entstehung einer Sepsis durch freigesetztes LPS wirksam zu unterbinden, also antiinflammatorisch sein.

Das antibakterielle Polymyxin B (PMB) wurde in dieser Arbeit als Modellsubstanz für ein membranaktives Peptid verwendet. LL-32, ein aktives Fragmente des zum angeborenen Immunsystem gehörenden humanen Kathelizid hCAP18 (2.10.2.), kann aufgrund seiner antibakteriellen und antiinflammatorischen Eigenschaften als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Antibiotika dienen. Die Induktion einer Resistenz in Bakterien durch membranaktive antibakterielle Peptide scheint fast unmöglich, bzw. extrem erschwert zu sein (Perron et al., 2006).

Die äußere Schicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wird durch LPS gebildet (2.2.). Werden die Bakterien durch membranaktive Peptide abgetötet, wird LPS freigesetzt. Freies LPS kann im Blutkreislauf das fatale inflammatorische Syndrom Sepsis auslösen (2.1.). Verschiedene Peptide können freies LPS neutralisieren. Damit ist die Interaktion von Peptiden mit LPS sowohl für deren antibakterielle als auch für deren antiinflammatorische Aktivität von entscheidender Bedeutung. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen LPS und den membranaktiven Peptiden PMB und LL-32 wurde in dieser Arbeit mithilfe biologischer und physikalischer Methoden charakterisiert.

In diesem Kapitel der Arbeit werden zunächst die Ergebnisse der in Kapitel 3 beschriebenen Versuche dargestellt und interpretiert. Zuerst wird eine, in dieser Form bisher nicht verwendete, auf dem Effekt des Förster Resonanz Energie Transfer (FRET-Effekt) basierende spektroskopische Methode als Verständnissgrundlage für die im weiteren Verlauf präsentierten Ergebnisse vorgestellt.

Dann werden die Daten zur Wechselwirkung von LPS mit dem Peptid PMB dargestellt und anschließend interpretiert. Dazu wurde die Bindung und Insertion an, bzw. in eine LPS-Schicht in Abhängigkeit von der LPS-Glycostruktur für PMB und Vergleichssubstanzen durch Zeta-Potential-Messungen untersucht. Die Auswirkung der Bindung und Insertion auf LPS-Aggregate wurde durch Messung der Aggregatgröße und durch einen spektroskopischen FRET-Assay beschrieben. Zur Überprüfung des LPS-Modellsystems wurde die Abhängigkeit des Zeta-Potentials von Bakterien von der Peptidkonzentration mit den Messungen an aus entsprechenden LPS rekonstituierten Modellmembranen verglichen (4.2.1.2.). Aus den gewonnenen

Erkenntnissen wurden Rückschlüsse auf die Glycostrukturabhängigkeit des in der Literatur vorgeschlagenen Detergens-Wirkmodells gezogen. Außerdem werden die Erkenntnisse für eine allgemeine Diskussion der Wirkmechanismen von membranaktiven Peptiden für deren antibakterielle, antiinflammatorische und zytotoxische Aktivität im Kapitel 4.5. verwendet.

Im dritten Teil werden die Ergebnisse der Messungen mit dem Peptid LL-32 und seinen Fragmenten dargestellt und im Anschluß diskutiert. Aus der mikrobiologischen Charakterisierung der antibakteriellen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Aktivität von verschiedenen Fragmenten von LL-32 (4.3.1.1) kann die Bedeutung einzelner Aminosäurecluster für die Aktivität von LL-32 abgeleitet werden. Mit diesen Erkenntnissen könnte LL-32 nun in Hinblick auf eine medizinische Nutzung optimiert werden. Desweiteren konnte durch die Bestimmung physikalischer Messgrößen, wie z.B. dem Zeta-Potential von Modellmembranen und Bakterien, Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen der antibakteriellen und antiinflammatorischen Aktivität gezogen werden. Dabei wurde auch die im ersten Abschnitt dieses Kapitels vorgestellte, auf dem FRET-Effekt basierende, spektroskopische Methode verwendet. Diese erlaubt Aussagen zur Wirkung von LL-32 auf die Interaktion der LPS-Aggregate untereinander. Außerdem wurden Messungen zur Bindung von LL-32 an Bakterien und zur Läsionsbildung in deren Zellhülle durchgeführt.

Im letzten Teil werden Messungen zu einer möglichen Tumorspezifität von LL-32 präsentiert und diskutiert. Durch Zeta-Potential-Messungen wurde die Ladungsabhängigkeit der Bindung von LL-32 an Zellmembranmodellen aus Phospholipiden, welche die zelluläre Membran bilden, bestimmt. Da tumorbildende Zellen einen erhöhten Anteil in der äußeren Schicht der Zellmembran an negativ geladenen Phospholipiden präsentieren sollen (Schröder-Borm et al., 2005) könnte die ladungsspezifische Interaktion die gemessene antitumorale Aktivität von LL-32 zur Folge haben. Die mögliche tumorspezifische Bindung von LL-32 wurde an zwei Modellzelllinien (3.6.3.), wovon eine eine tumorbildende ist, überprüft. Der Bindungsort von LL-32 an den Zellen wurde ebenso bestimmt, wie die Fähigkeit von LL-32 Läsionen in der Zellmembran zu indizieren. Aus den Erkenntnissen wurden Aussagen zum antitumoralen Wirkmechanismus von LL-32 gewonnen.

Eine zusammenfassende Diskussion aller Erkenntnisse für mögliche Wirkmechanismen der verschiedenen biologischen Aktivitäten von membranaktiven Peptiden folgt in der abschließenden Gesamtdiskussion.

#### **4.1. FRET-Spektroskopie zur Bestimmung von Aggregat-Aggregat Interaktionen**

Mit Hilfe einer auf dem FRET-Effekt basierenden spektroskopischen Methode (3.8.5.) wurden die Auswirkungen der Peptide auf Aggregat-Aggregat Interaktionen untersucht. Durch Messungen der LPS-Aggregatgröße in

Abhängigkeit von der Peptidkonzentration im Rahmen dieser Arbeit (4.2.2.3. und 4.3.1.3.) konnte gezeigt werden, dass einige Peptide eine Vergrößerung der Aggregate bewirken. Um zu unterscheiden, ob es sich dabei um Bindungs- oder Einbaueffekte der Peptide an bzw. in die Aggregate, oder durch eine Peptid-induzierte Interaktionen der Aggregate untereinander handelt, wurde eine spektroskopische Methode entwickelt, die auf dem FRET-Effekt basiert. Als Aggregat-Aggregat Interaktion wird in dieser Arbeit eine Aggregation oder Fusion der Aggregate untereinander verstanden. Diese können von Peptiden induziert werden, z.B. durch Reduzierung des Zeta-Potentials und der damit reduzierten elektrostatischen Abstoßung der Aggregate untereinander. Die Intensitäten auf der Emissionswellenlänge des Donors werden als Donorintensität bzw. Donorsignal bezeichnet und die Intensitäten auf der Emissionswellenlänge des Akzeptors werden entsprechend als Akzeptorintensität bzw. Akzeptorsignal bezeichnet.

Bei den Versuchen wurden die durch jede der fünf 10 µl Zugaben unterschiedlicher Peptidkonzentration bewirkten Änderungen als die Änderungen des Verhältnisses der Akzeptor- zur Donorintensitäten ( $\Delta(I_A/I_D)$ ) berechnet. Dieser Wert ist ein Maß für die Änderung der mittleren Abstände der beiden eingesetzten Fluorophore. Dabei wurde jeweils der  $(I_A/I_D)$ -Wert der letzten Sekunde vor der nächsten Zugabe von dem  $(I_A/I_D)$ -Wert eine Sekunde vor der erfolgten Zugabe abgezogen. Aus diesen Werten lassen sich Aussagen über eine Peptid-induzierte Fusionierung von Aggregaten ableiten wie im Folgenden dargestellt wird.

Da die FRET-Spektroskopie, so wie in dieser Arbeit verwendet, nach Wissen des Autors in der Literatur noch nicht beschrieben ist und auch in der Arbeitsgruppe Biophysik vorher nicht verwendet wurde, wird vor der Präsentation der Ergebnisse eine Interpretation der mit dieser Methode erzielten Ergebnisse dargelegt.

Die Auswirkungen von Peptiden auf Aggregat-Aggregat Interaktionen wurden mit Hilfe des FRET-Effektes zweier Fluorophore beschrieben (3.8.6.). Der extern angeregte Donor, NBD, kann die Anregungsenergie strahlungslos an einen eng benachbarten Akzeptor, Rh, weitergeben, was dazu führt, dass der Akzeptor anstelle des Donors ein Lichtquant abgeben kann, also fluoresziert. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor zu Donor ist damit ein Maß für die Nähe der Fluorophore. In dem verwendeten Versuchsablauf sind Lipid-gekoppelter Donor und Akzeptor getrennt auf LPS-Aggregaten angeordnet und damit in großem räumlichen Abstand. Eine Änderung der Intensität von Akzeptor zu Donor kann Aussagen über eine Änderung der durchschnittlichen Abstände erlauben. Aggregieren die Aggregate, so sind die beiden Fluorophore an den Kontaktstellen nahe aneinander. Bei einer Fusion würden Aggregate miteinander verschmelzen und die Fluorophore wären gleichverteilt im entstehenden Aggregat. Dabei wären die mittleren Abstände aufgrund der gewählten Konzentration ebenfalls gering. Die daraus

resultierenden Änderungen der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor werden jedoch überlagert von Signaländerungen, die durch Interaktion von dem Peptid mit einzelnen Aggregaten hervorgerufen werden, und durch Verdünnungseffekte aufgrund einer Volumenzugabe und der daraus resultierenden geringeren Konzentration im Messvolumen. Wie im Folgenden anhand von Kontrollmessungen gezeigt, lassen sich diese verschiedenen Effekte jedoch teilweise unterscheiden.

Um die Peptid-Aggregat-Wechselwirkung von der zu bestimmenden Aggregat-Aggregat-Wechselwirkung zu unterscheiden, wurde die Wirkung einiger der verwendeten Peptide auf mit nur einem Farbstoff markierte LPS-Aggregate untersucht und beispielhaft in Abb. 19 für das Peptid FF-28 und R45-LPS-Aggregate dargestellt. Die Auswirkungen der Zugaben auf doppelmarkierte R45-LPS-Aggregate sind zum Vergleich ebenfalls in derselben Abbildung präsentiert. Für das Verständnis der Interpretation ist diese Abbildung jedoch nur eingeschränkt zu gebrauchen, da FF-28 nur positive Änderungen des ( $I_A/I_D$ )-Wert erzeugt. Deshalb werden in Abb. 20 zusätzlich die Auswirkung von SK-24 Zugaben auf doppelmarkierte Aggregate aus R60-LPS und die dadurch entstehenden  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte dargestellt. In Abb. 21 sind die ebenfalls für die Interpretation benötigten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte der 10  $\mu\text{l}$  Zugaben von 0,01% Essigsäure (Verdünnungskontrolle) angegeben. Die Geräteeinstellungen aller Messungen waren identisch.

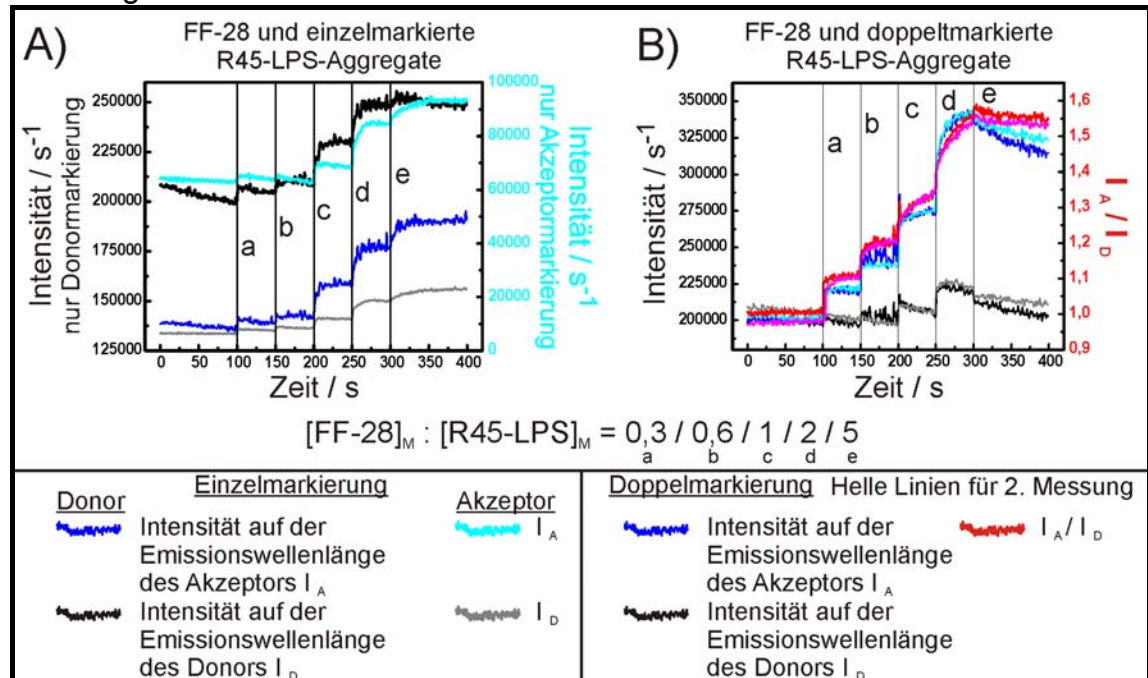


Abbildung 19: Donor- und Akzeptorintensität von nur mit Donor- oder Akzeptormarkierten (A) R45-LPS-Aggregaten (10  $\mu\text{M}$  in PBS) oder mit 50% Donor-markierten und 50% Akzeptor-markierten (B), im Folgenden als Doppeltmarkiert bezeichnet)) R45-LPS-Aggregaten in Abhängigkeit von fünf 10  $\mu\text{l}$  Zugaben „a“ bis „e“ des in 0,01%-iger Essigsäure gelösten Peptids FF-28, die das molare Peptid- zu LPS-Verhältnis von 0 auf 0,3, 0,6, 1, 2 und 5 zu 1 schrittweise erhöhen.

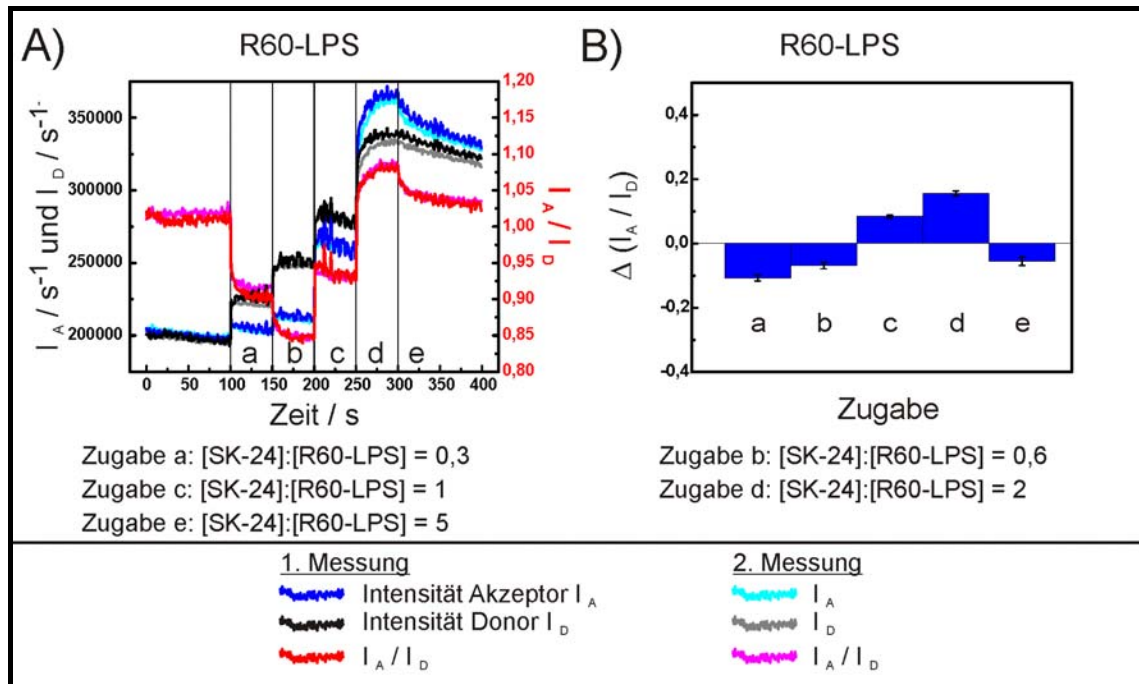


Abbildung 20: A) Zeitlicher Verlauf der Akzeptor- und Donorintensität von zwei Messungen zum Einfluss von SK-24 auf R60-LPS-Aggregate. Ebenfalls eingezeichnet ist der Verlauf des Verhältnisses von Akzeptor- zu Donorintensität  $I_A/I_D$ ; die zugehörige Ordinate ist die rechte. Gemessen wird an fluoreszenzmarkiertem LPS, wobei 50% der Aggregate mit dem FRET-Donor NBD-PE, die anderen mit dem FRET-Akzeptor Rh-PE markiert ist.

B) Änderung des Verhältnisses von Akzeptor- zu Donorintensität  $\Delta(I_A/I_D)$  bewirkt durch die Zugaben „a“ bis „e“. Aus den  $I_A/I_D$ -Werten aus A) wurden die von den jeweiligen Zugaben erzielten Änderungen berechnet. Dabei wurde jeweils der Wert der letzten Sekunde vor der nächsten Zugabe von dem Wert eine Sekunde vor der erfolgten Zugabe abgezogen.

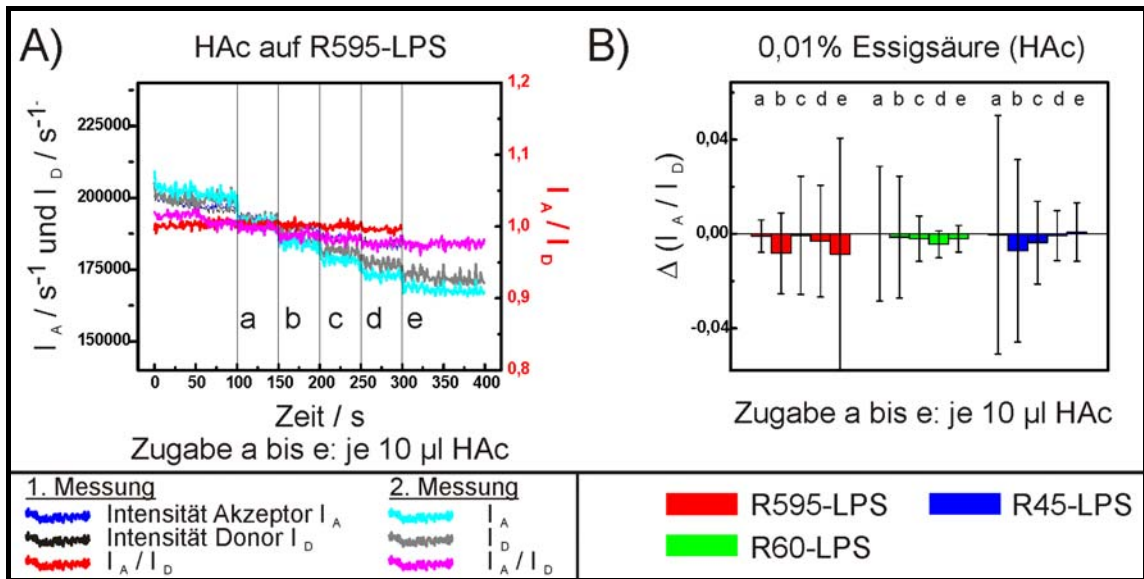


Abbildung 21: A) Zeitlicher Verlauf der Akzeptor- und Donorintensität von zwei Messungen zum Einfluss der 10 µl 0,01%-iger Essigsäure auf R595-LPS-Aggregate. Ebenfalls eingezeichnet ist der Verlauf des Verhältnisses von Akzeptor- zu Donorintensität  $I_A/I_D$ ; die zugehörige Ordinate ist die rechte. Gemessen wird an fluoreszenzmarkiertem LPS, wobei 50% der Aggregate mit dem FRET-Donor NBD-PE, die anderen mit dem FRET-Akzeptor Rh-PE markiert ist. Die Versuchsdurchführung ist in 3.8.5. beschrieben.

B) Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor zu Donor  $\Delta(I_A/I_D)$  in Abhängigkeit der Zugaben von 10 µl 0,01%-iger Essigsäure zu Aggregaten aus dem LPS der Stämme R595, R60 und R45.

Bei den Messungen nur mit Donormarkierung in Abb. 19 A) ist das Donorsignal genauso hoch wie bei den doppeltmarkierten LPS-Aggregaten in Abb. 19 B). Das Akzeptorsignal ist, obwohl kein Akzeptorfarbstoff vorliegt, größer als 50% des Akzeptorsignals mit Doppelmarkierung. Bei den Messungen nur mit Akzeptormarkierung ist deren Donorsignal äußerst gering, das Akzeptorsignal beträgt keine 50% des Akzeptorsignals der doppeltmarkierten Aggregate. Die Addition der Akzeptorwerte der einzelmarkierten Aggregate liefert den Akzeptorwert der doppeltmarkierten Aggregate. Entsprechendes gilt ebenso für die Donorintensitäten.

Am Beispiel des Fragments FF-28 sei im Folgenden der Versuchsablauf exemplarisch dargestellt.

Die Zugabe von FF-28 bewirkt bei den einzelmarkierten LPS-Aggregaten eine Zunahme aller Intensitätswerte, wobei die Änderungen durch die ersten beiden Zugaben nicht so stark ausfielen. Bei den donormarkierten Aggregaten kam es zu einem relativ größeren Anstieg der Intensitäten. Die durch Peptidzugabe ausgelöste Änderung von  $I_A$  (nur mit dem Akzeptor markiert) /  $I_D$  (nur mit dem Donor markiert) betrug ungefähr -0,15.



In Abbildung 20A ist der zeitliche Verlauf der Akzeptor- und Donorintensität von doppeltmarkierten R60-LPS-Aggregaten und Zugaben vom Peptid SK-24 als Beispiel für diese Art von Messung dargestellt. SK-24 wurde deshalb ausgewählt, weil es sowohl positive als auch negative Änderungen erzeugt. Durch jede der fünf SK-24 Zugaben wird  $I_A/I_D$  geändert. Die Fehler sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen resultierend aus den in Abb. 20A dargestellten Messungen.

Mit Zugabe „a“ 100 s nach Messbeginn wird das Verhältnis von SK-24 und R60-LPS auf 0,3 zu 1 eingestellt. Beide Einzelintensitäten steigen an, aber da die Intensität des direkt angeregten FRET-Donors NBD stärker ansteigt als die des FRET-Akzeptors Rh, sinkt  $I_A/I_D$ . Damit ist der zur Zugabe „a“ gehörige  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert negativ. Er wurde aus dem  $I_A/I_D$ -Wert der letzten Sekunde vor der folgenden Zugabe „b“ und dem  $I_A/I_D$ -Wert eine Sekunde vor der erfolgten Zugabe „a“ berechnet. 150 s nach Messstart wird durch Zugabe „b“ das SK-24 zu R60-LPS Verhältnis in der Messküvette auf 0,6 eingestellt. Dadurch steigen beide Signale weiter an und  $I_A/I_D$ -Wert sinkt weiter ab. Nach der Zugabe „c“, die das Verhältnis auf 1 erhöht, steigen wieder beide Einzelintensitäten, aber diesmal steigt die Akzeptorintensität stärker als die vom Donor an, was deshalb zu einem erhöhten  $I_A/I_D$ -Wert und damit auch zu einem positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert führt. Bei der Zugabe „d“ (Verhältnis 2) nach 250 s steigt das Akzeptorsignal im Vergleich zu dem des Donors noch stärker an, was folglich zu einem erhöhten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert führt. Durch die letzte Zugabe „e“ nach 300 s wird das Peptid zu LPS Verhältnis auf 5 erhöht, was dazu führt das beide Signale leicht abfallen. Da das Akzeptorsignal dabei anteilig stärker abfällt, ist der  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert negativ.

Die in Abb. 21 dargestellte Verdünnungskontrolle zeigt, dass die Zugabe der 10  $\mu$ l 0,01% Essigsäure kaum Auswirkung auf den  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert hat. Die niedrigen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte können durch eine leicht verringerte FRET-Effizienz aufgrund der höheren mittleren Abstände der um 1% niedrigeren Konzentration der Aggregate nach der Zugabe erklärt werden. Der betragsmäßig maximale  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert der dabei auftrat betrug -0,0086 und der maximale Fehler aller drei Doppelmessungen betrug 0,0506. Damit hat die Zugabe von 10  $\mu$ l 0,01% Essigsäure auf die Messungen der Peptidwirkung einen nur sehr geringen Einfluss und der Hauptanteil der beobachteten Änderungen wird durch das Peptid verursacht.

Die dargestellten Effekten der Peptidzugabe auf die jeweils mit einem der beiden Farbstoffe markierten Aggregate werden im Folgenden mithilfe der Effekte der Peptidzugaben auf die nur mit einem Farbstoff markierten Aggregate interpretiert.



### **Interpretation des spektroskopischen FRET-Assays**

In Abb. 19 A) sind Kontrollmessungen mit dem Peptid FF-28 und einzelmarkiertem LPS dargestellt. Es ist aus der Graphik ersichtlich, dass das Peptid einen Einfluss auf die einzelmarkierten Aggregate besitzt, die zu Änderungen der Donor- und Akzeptorintensität führen. Da Aussagen über den Einfluss des Peptides auf die Wechselwirkung zwischen Aggregaten getroffen werden sollen, muss sichergestellt sein, dass sich die verschiedenen Signaländerungen aufgrund der Wechselwirkung der Aggregate miteinander von den Signaländerungen aufgrund der Wechselwirkung des Peptides mit den Aggregaten trennen lässt. Die Wirkung des Peptides auf die getrennt markierten Aggregate ändert den mittleren Abstand von Akzeptor zu Donor nicht, aber die Einzelsignale von Akzeptor und Donor können z.B. durch Quenching- oder Dequenching-Effekte geändert werden. Wenn die getrennt markierten Aggregate miteinander fusionieren oder aggregieren, ändert sich der mittlere Abstand und damit auch die FRET-Effizienz. Die Peptidzugaben auf die einzelmarkierten LPS-Aggregate bewirkten alle einer Steigerung der Donor- und Akzeptorsignale. Damit kann es sich nur um Dequenching-Effekte und nicht um Quenching-Effekte handeln.

Die bei der Messung ausschließlich mit Donormarkierung entstandene hohe Intensität auf der Emissionswellenlänge des Akzeptors, lässt sich dadurch deuten, dass der direkt angeregte Donor NBD ein so breites Emissionsspektrum besitzt, so dass auch eine Intensität bei der Emissionswellenlänge des Akzeptors gemessen wird. Auch inelastisch gestreutes Licht könnte einen Beitrag zu diesem Signal leisten. Die Signalverläufe wären identisch.

Bei den Messungen, bei denen nur die Akzeptormarkierung verwendet wurde, traten bei direkter Anregung des Donors wie erwartet weit geringere Intensitäten sowohl bei der Emissionswellenlänge des Donors als auch der des Akzeptors auf. Die gemessene Intensität auf der eigentlichen Emissionswellenlänge des Akzeptors kann dadurch zustande kommen, dass der Akzeptor zu einem gewissen Anteil auch durch die Anregungswellenlänge des Donors angeregt wird, da der Farbstoff ein relativ breites Anregungsspektrum besitzt. Aus dem Vergleich der Intensitäten des Donors bei reiner Akzeptormarkierung und der Akzeptorintensität bei reiner Donormarkierung kann geschlossen werden, dass es nicht nur Streulicht sondern auch die Emission des jeweils anderen Farbstoffes zu dieser Intensität beiträgt. Bei der Doppeltmarkierung setzt sich das Donorsignal (Intensität auf der Emissionswellenlänge des Donors) aus den beiden Donorsignalen der Messungen an den einzelmarkierten LPS-Aggregaten zusammen. Dabei ist der Beitrag von dem Donorsignal bei nur mit dem Donor markierten LPS-Aggregaten größer als der Beitrag des Donorsignals bei alleiniger Markierung mit dem Akzeptor. Damit trägt der Donor bei getrennt mit Donor und Akzeptor markierten Aggregaten stärker zum Donorsignal bei als der Akzeptor selbst. Auch ein wesentlicher Einfluss durch Anregung des Akzeptors durch emittiertes

Licht des Donors kann durch diesen Vergleich ausgeschlossen werden ebenso wie ein wesentlicher Einfluss von Streulicht auf das Signal, da ansonsten die Addition der Einzelsignale ein um den Streulichtanteil, bzw. den Anteil durch NBD-Fluoreszenz, erhöhte Intensität ergeben müsste. Da das Akzeptorsignal der doppelmarkierten Aggregate ungefähr so hoch ist wie die Addition der Akzeptorsignale der einzelmarkierten Aggregate, gibt es nahezu keinen FRET-Effekt zwischen den getrennt markierten Aggregaten.

Durch den Peptideinfluss auf die Aggregate kommt es bei dem Donorsignal von nur Donormarkiertem LPS zu einem größeren Zuwachs als bei dem Akzeptorsignal bei nur Akzeptormarkiertem LPS. Daraus wird der Schluss gezogen, dass ein Dequenching-Effekt bei dem Donor NBD stärker als bei dem Akzeptor Rh zum Tragen kommt. Folglich ist die durch Peptidzugabe ausgelöste Änderung des  $I_A/I_D$ -Wertes negativ (bis ungefähr -0,15), wenn es nur zu einer Peptid-Aggregat-Interaktion kommt ohne einen FRET-Effekt. Wenn sich also ein Peptid in Aggregate einbaut ohne eine Aggregat-Aggregat-Interaktion zu bewirken, kommt es zu einem Dequenching-Effekt, wie an den Messungen mit einzelmarkierten LPS-Aggregaten gezeigt wurde. Da dieser für die beiden Fluorophore unterschiedlich ausfällt, erzeugt eine Insertion einen negativen Änderung von  $I_A/I_D$ .

### **Interpretation des $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert**

Ein negativer  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert kann dadurch entstehen, dass:

- i)  $I_A$  durch die Zugabe abfällt, während  $I_D$  ansteigt oder gleich bleibt
- ii)  $I_A$  stärker als  $I_D$  abfällt
- iii)  $I_A$  ansteigt oder gleich bleibt, während  $I_D$  stärker ansteigt.

Die drei Möglichkeiten lassen sich durch folgende Überlegungen interpretieren:

i) Bei ansteigendem  $I_D$ -Wert lässt sich dieses Verhalten mit einer Verringerung der FRET-Effizienz erklären. Da diese jedoch bei getrennt markierten LPS-Aggregaten sehr gering ist, würde dies allenfalls einen sehr geringen negativen Wert erklären. Wenn die Aggregate fusioniert sein sollten, also aufgrund der Vermischung der ehemals getrennt vorliegenden Fluorophore eine gewisse FRET-Effizienz vorliegen, ist kein Verhalten denkbar, dass zu einer Verringerung der FRET-Effizienz führt. Damit wird diese Möglichkeit ausgeschlossen. Das Verhalten, auch bei gleich bleibendem  $I_D$ -Wert, lässt sich durch eine Überlagerung des Verdünnungseffekts mit einem Dequenching-Effekt erklären. In dem Fall ist der Dequenching-Effekt beim Donor stärker als der Verdünnungseffekt, beim Akzeptor überwiegt aber der Verdünnungseffekt den Dequenching-Effekt, der wie hergeleitet beim Akzeptor nicht so stark ausgeprägt ist wie beim Donor. Damit wäre auch der  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert sehr gering negativ bei einem leichten Dequenching-Effekt.

ii) Dies lässt sich als ein verringernder Verdünnungseffekt (da gleichzeitig die FRET-Effizienz leicht herabgesetzt wird, sinkt Akzeptorsignal stärker als das Donorsignal, siehe unten) interpretieren, allerdings nur bei geringen negativen

$\Delta(I_A/I_D)$ -Wert ( $\sim 0,01$ , entsprechend der reinen Verdünnung). Ist der  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert negativer, ist entweder die FRET-Effizienz gesunken, was nur durch einen Verdünnungseffekt erklärt werden kann, oder durch Überlagerung von Verdünnungs- und Dequenching-Effekts sinkt der Donorwert nicht so stark wie der Akzeptorwert. Dabei wäre wiederum der Dequenching-Effekt sehr gering.

iii) Dies wird durch den unterschiedlich starken Dequenching-Effekt interpretiert, der bei NBD und Rh vorliegt. Dieser Effekt wird eventuell von einem leichten Anstieg der FRET-Intensität überlagert. Wenn  $I_A$  gleich bleibt, kompensiert der Dequenching-Effekt bei Rh den Verdünnungseffekt. Da dieser recht gering ist, muß davon ausgegangen werden, dass zusätzlich keine wesentliche Verbesserung der FRET-Effizienz vorliegt. Steigt  $I_A$  mit an, kann eine Überlagerung des Dequenching-Effekts mit einer Verbesserung der FRET-Effizienz vorliegen. Dieser würde den Betrag des negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert senken, daher wird bei negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert mit relativ hohem Betrag davon ausgegangen, dass keine wesentliche Verbesserung der FRET-Effizienz vorliegt, da durch den Dequenching-Effekt alleine ein minimaler  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert von ca.  $-0,15$  vorlag.

Damit liegt bei negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert in keinem Fall eine wesentliche Verbesserung der FRET-Effizienz vor, aber insbesondere bei relativ hohen Beträgen des negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wertes ein Dequenching-Effekt, also ein Einbau der Peptide in die LPS-Matrix.

Ein positiver  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert kann dadurch entstehen, dass:

- i)  $I_A$  durch die Zugabe ansteigt, während  $I_D$  abfällt oder gleich bleibt
- ii)  $I_A$  stärker als  $I_D$  ansteigt
- iii)  $I_A$  abfällt oder gleich bleibt, während  $I_D$  stärker abfällt.

Der geringe Verdünnungseffekt wird jeweils durch die beschriebenen Effekte überkompensiert.

i) Dieses Verhalten lässt sich durch eine verbesserte FRET-Effizienz erklären, welche  $I_A$  ansteigen und  $I_D$  abfallen lässt. Ist  $I_D$  durch die Peptidzugaben gleichgeblieben, so liegt noch eine Überlagerung mit einem Dequenching-Effekt vor.

ii) Dies wird durch eine verbesserte FRET-Effizienz mit einem überlagerten starken Dequenching-Effekt, der die  $I_D$  senkende Wirkung der verbesserten FRET-Effizienz überkompensiert, interpretiert.

iii) Ein solches Verhalten kann bei getrennt markierten Aggregaten nicht erklärt werden und trat auch nicht auf.

In allen Fällen bedeutet also ein positiver  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert, dass eine Verbesserung der FRET-Effizienz vorlag.

Sollten die Aggregate miteinander fusionieren, so würden mit beiden Farbstoffen markierte Aggregate vorliegen. In diesem Fall ändert z.B. auch ein Einbau des Peptides durch Vergrößerung des mittleren Abstandes von Akzeptor und Donor deren Intensitätsverhältnis, was zu einem negativen

$\Delta(I_A/I_D)$ -Wert führt. Dann kann nicht mehr in derselben Weise zwischen Peptid-Aggregat-Wechselwirkung und Aggregat-Aggregat-Wechselwirkung unterschieden werden.

Damit wird der spektroskopische FRET-Assay folgendermaßen gedeutet: bis zum ersten positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert werden negative  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte als Einbau des Peptids in die Aggregate gedeutet. Je stärker, bzw. je mehr Peptid sich einbaut, desto negativer ist der  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Der erste positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert wird als Fusionierung oder Aggregation der Aggregate interpretiert. Dabei müsste es jedoch bei einer Fusion zu einem wesentlich größerem positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert kommen. Wie später erläutert, zeigt sich aber durch Größenmessungen an Aggregaten (4.2.1.3. und 4.3.1.3.), dass die Aggregation der LPS-Aggregate zu keinem positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert führt. Daher kann ein positiver  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert als eine Fusion der Aggregate interpretiert werden. Negative  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte nach positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte werden als Einbau des Peptids in fusionierte Aggregate interpretiert.

### 4.2. Interaktion von PMB mit LPS

Das kationische membranaktive Decapeptid Polymyxin B (PMB), ein Stoffwechselprodukt des Gram-positiven Bakteriums *Bacillus polymyxa*, ist aufgrund eines Fettsäurerestes amphiphil und wirkt antibakteriell gegen Gram-negative Bakterienstämme. Außerdem besitzt das Peptid eine antiinflammatorische Aktivität bei einer LPS-induzierten Sepsis (Baldwin et al., 1991; Jiang et al., 2004; Ciornei et al., 2006). Aufgrund einer hohen Anzahl an bisherigen Untersuchungen und teilweisem Einsatz als Standardsubstanz für die Untersuchung antibakterieller Wirkung, wird es in dieser Arbeit als Modellsubstanz für die Interaktion von membranaktiven Peptiden und bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) eingesetzt.

Der Einfluss der LPS-Struktur (2.3.) auf die PMB-LPS Interaktion wurde mit biologischen und physikalischen Methoden sowohl an Bakterien als auch an rekonstituierten Modellmembranen aus aufgereinigtem LPS der entsprechenden Stämme (Tab. 4) charakterisiert. Es wurde auch ein inaktives Derivat (Polymyxin B Nonapeptid (PMBN), 2.10.1.) und drei Detergentien (3.1.) als Vergleichssubstanzen eingesetzt, um Rückschlüsse auf den vorgeschlagenen Detergensmechanismus (2.11.4.) für die antibakterielle Wirkung von PMB in Abhängigkeit unterschiedlicher LPS-Kernoligosaccharide (im Folgenden kurz als LPS-Glycostruktur bezeichnet) ziehen zu können.

Mit biologischen Tests wurden die antibakteriellen Aktivitäten von drei Detergentien an verschiedenen *S. minnesota* –Stämmen, die LPS mit unterschiedlicher Glykostruktur bilden, bestimmt. Für die Struktur-Abhängigkeit der Bindung von PMB an LPS-Modellmembranen wurde das Zeta-Potential von verschiedenen LPS-Aggregaten in Abhängigkeit des PMB : LPS –Verhältnisses

gemessen. Zusätzlich wurde an denselben Proben der Einfluss von PMB auf die Größe der Aggregate bestimmt. Beide Methoden wurden auch zur Untersuchung der Wirkung von PMBN und einem Detergens auf LPS angewandt. Außerdem wurde mithilfe der in 3.8.5. beschriebenen FRET-Spektroskopie die Auswirkung von PMB und PMBN auf die Interaktion von LPS-Aggregaten untereinander untersucht. Zum Schluss wird die Eignung der rekonstituierten Modellmembranen als Modell für die PMB-Wirkung auf Bakterien überprüft. Dazu wurde das Zeta-Potential von Bakterien in Abhängigkeit der PMB-Konzentration bestimmt und mit den Ergebnissen der Messungen an LPS-Aggregaten verglichen.

### 4.2.1. Ergebnisse

Die im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Versuche zur Interaktion von PMB mit LPS werden in diesem Teil aufgeführt und in 4.2.2. diskutiert.

#### 4.2.1.1. Antibakterielle Aktivität von PMB und Detergenzien

Zur Charakterisierung des Einflusses der LPS-Glycostruktur auf die antibakterielle Aktivität von Detergenzien wurden die MHK (4.2.1.1.) von verschiedenen Detergenzien (3.1.) gegen die Bakterienstämme der Glycostrukturreihe (siehe Tab. 3) wie in 3.7.1. angegeben bestimmt und in Tab. 4 angegeben. Die präsentierten Werte stammen aus mindestens drei unabhängigen Doppelmessungen. Wiesen mindestens vier Werte die gleiche Konzentration auf und maximal 2 der sechs Werte wichen um höchstens eine Verdünnungsstufe ab, wurde der Wert der vier gleichen Bestimmungen als MHK verwendet. Ansonsten wurde eine weitere unabhängige Doppelbestimmung durchgeführt. Bei der MHK von SDS gegen den *S. minnesota*-Stamm R5 schwankten die Werte zwischen den angegebenen. Im Allgemeinen werden MHK-Unterschiede als signifikant betrachtet, wenn sie um mindestens zwei Verdünnungsstufen auseinanderliegen. Da in den Versuchen eine serielle 1 : 2 –Verdünnung vorgenommen wurde, sind hier MHK-Werte signifikant unterschiedlich, die sich mindestens um den Faktor Vier unterscheiden.

Die unter identischen Bedingungen bestimmten MHK-Werte von PMB gegen die *S. minnesota*-Stämme sind ebenfalls dargestellt. Gegen den Stamm R45 besitzt PMB unter den in 3.7.1. beschriebenen Standardbedingungen eine MHK von 50 µM.

Stamm	PMB / nM	Detergenzien		
		DTPPB / nM	DTMAB / µM	SDS / %
<i>S. min.</i> R595	78	12,5	15,6	0,00078
<i>S. min.</i> R4	78	25	15,6	0,00078
<i>S. min.</i> R7	9,8	25	15,6	0,00078
<i>S. min.</i> Rz	78	50	125	0,00313
<i>S. min.</i> R5	4,9	12,5	7,8	0,00078 / 0,00156
<i>S. min.</i> R345	625	100	125	0,025
<i>S. min.</i> R60	156	100	250	0,025

Tabelle 4: MHK verschiedener Detergenzien und PMB gegen die Bakterienstämme der Glycostruktur-Gruppe. Die Detergenzien DTPPB, DTMAB und SDS sind in 3.1. beschrieben, PMB in 2.10.1. Die MHK wurde wie in 3.7.1. beschrieben mit 10.000 Bakterien in 100 µl 20 mM HEPES-Puffer mit 10% LB-Medium bestimmt. Die Ergebnisse resultieren aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen.

Die MHK vom kationischen DTPPB ist mit zunehmender Länge der Glycostruktur nahezu unverändert mit Ausnahme der MHK von R595 und R5, die aber nicht signifikant abweichen. Da Rz eine höhere MHK als R7 aufweist und die Stämme R345 und R60 sehr hohe MHK-Werte besitzen, scheint zusätzliche negative Ladung in der Glycostruktur eine antibakterielle Wirkung zu erschweren. Das ebenfalls positiv geladene DTMAB zeigt eine ähnliche Wirkung. Die Länge der Glycostruktur scheint kaum einen Einfluss zu haben, aber die MHK-Werte für Bakterien mit zusätzlicher negativer Ladung in der Kernregion (Rz, R345, R60) sind deutlich höher als für Bakterien ohne zusätzliche Ladung in der Kernregion. Das anionische SDS besitzt ebenfalls bei Bakterien mit Phosphatgruppen in der Kernregion eine deutlich erhöhte MHK und ebenso wenig eine Abhängigkeit von der Glycostruktur wie die anderen kationischen Detergentien. Das PMB-Analogon PMBN besitzt keine ausgeprägte antibakterielle Aktivität (Viljanen und Vaara, 1984).

Im Gegensatz dazu besitzt die antibakterielle Aktivität von PMB eine deutliche Abhängigkeit von der LPS-Glycostruktur. Je länger die Glycostruktur des LPS, desto aktiver ist PMB gegen die das LPS exprimierende Bakterien. Der qualitative Einfluss der Ladungen ist derselbe wie bei den Detergentien.

#### 4.2.1.2. Abhängigkeit des Zeta-Potentials von LPS-Aggregaten von der PMB-Konzentration

Nachdem die Charakterisierung der biologischen Effekte von PMB und den Detergentien auf die verschiedenen Bakterienstämme erfolgt war, sollten diese durch physikalische Untersuchungen an rekonstituierten Modellmembranen aus LPS der entsprechenden Stämme aufgeklärt werden.

Es erscheint offensichtlich, dass für die Interaktion kationischer Peptide mit anionischen oder polaren Lipiden die Ladung einer Membran einen starken Einfluss hat (Zasloff, 2002; Gutschmann et al., 2005). Eine unterschiedliche Ladung der Lipide bewirkt ein unterschiedliches Gouy-Chapman-Potential der Membran und kann dazu führen, dass sich ein Peptid besser oder überhaupt erst an eine Membran anlagern kann (Gutschmann, 1997). Das Zeta-Potential, eine messtechnisch gut zu erfassende Größe, ist ein Maß für das Oberflächenpotential eines Aggregats in einem definierten Puffer (3.8.1.). Dieses ist bei Aggregaten aus anionischen Lipiden stark negativ und ändert sich bei Bindung von kationischen Peptiden. Damit sind Aussagen über die Bindungsstärke von Peptiden an Aggregate aus LPS möglich.

Deshalb wurde die Auswirkung von PMB Zugaben auf das Zeta-Potential von Aggregaten aus LPS der Glycostruktur-Gruppe bestimmt. Dies wurde ebenfalls für die Substanzen PMBN und DTPPB durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 A) und B) dargestellt. Die farbliche Zuordnung der verwendeten LPS der Glycostruktur-Gruppe ist, wie auch bei folgenden Abbildungen, der Legende im unteren Teil der Darstellung zu entnehmen. Die dargestellten Werte sind die

Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen aus zwei Messungen an unabhängig präparierten Proben. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Zeta-Potential- und Größen-Messungen an Aggregaten oder Vesikeln wurden in einem Puffer mit 10 mM TRIS, 2 mM CsCl, pH = 7 bei 25°C durchgeführt. Die LPS-Aggregate wurden am ZetaSizer Nano mit einer Konzentration von 2 µM in Abhängigkeit von verschiedenen Wirkstoffen vermessen.

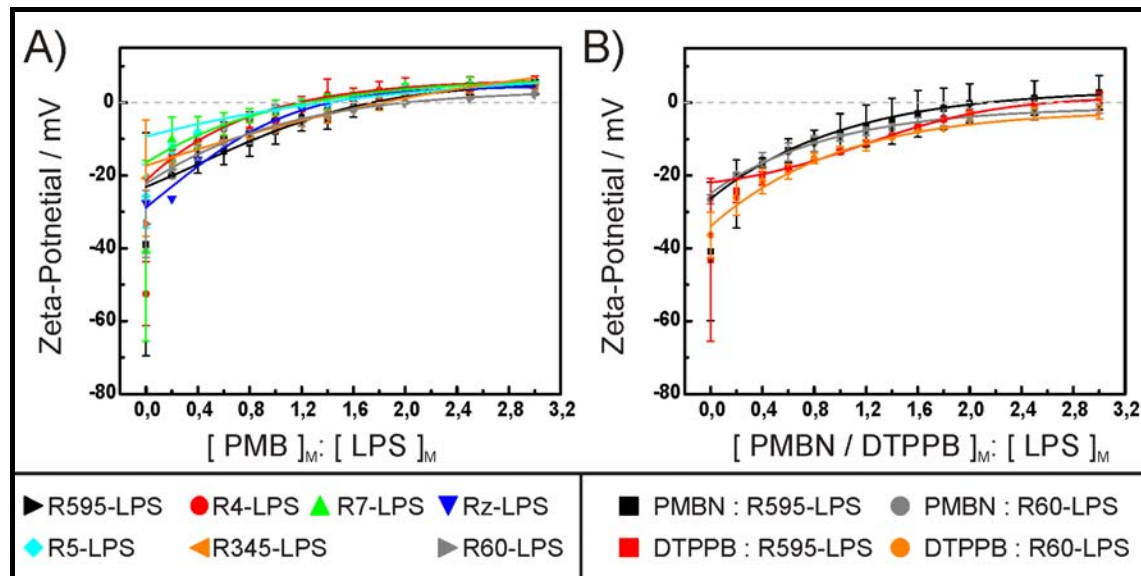


Abbildung 22: A) Verlauf des Zeta-Potentials von Aggregaten aus verschiedenen LPS über dem molaren Konzentrationsverhältnis von PMB : LPS. Die Messungen wurden wie beschrieben mit 2 µM LPS in 10 mM TRIS, 2 mM CsCl, pH = 7, T = 25 °C durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen. Sie wurden mit sigmoidalen Kurven angefüttet, die ebenfalls dargestellt sind.

B) Abhängigkeit des Zeta-Potentials von Aggregaten aus R595- und R60-LPS von der Konzentration an PMBN bzw. des Detergens DTPPB. Die Messungen wurden unter gleichen Bedingungen wie in A) beschrieben durchgeführt. Die Werte sind ebenfalls Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messreihen zusammen mit einer angefütteten sigmoidalen Kurve.

Wie aus Abb. 20 A) ersichtlich, sind die Zeta-Potentiale für pures LPS stark negativ und werden durch die Anwesenheit von PMB immer weniger negativ bis das Potential sogar positiv wird. ersichtlich, Ab einem bestimmten PMB : LPS Verhältnis ändert sich das Potential auch bei weiterer Peptid Zugabe nicht mehr signifikant. Die Messwerte wurden mit einer sigmoidalen Kurve angefüttet, da diese der theoretischen Bindungskurve entspricht (David, 2004). Diese sind für alle LPS passend, nur die Anfangswerte, die aber auch einen sehr großen Fehler aufweisen, liegen weit entfernt von den Kurven. Die Kurvenverläufe lassen, auch aufgrund der relativ großen Fehler, kaum einen Unterschied erkennen. Allenfalls sind bei molaren Konzentrationsverhältnissen von PMB zu LPS von 0,8 bis 2 Unterschiede in den Kurvenverläufen von R595-, R345- und R60-LPS zu den anderen LPS zu erkennen. Dies spiegelt sich auch darin



wieder, dass die angefitteten Kurven dieser drei LPS ein Potential von 0 mV bei einem molaren PMB zu LPS Verhältnis von 1,74 bis 2 besitzen, während die restlichen LPS dies bei einem Verhältnis von 1,16 bis 1,42 besitzen. Außerdem besitzt die Kure für R60-LPS einen niedrigeren Sättigungswert, was sich auch in den Sättigungswerten der sigmoidalen Fits zeigt. So besitzt R595-LPS mit 5,7 mV, R4-LPS mit 6,4 mV, R7-LSP mit 6,8 mV, Rz-LPS mit 4,5 mV, R5-LPS mit 9,3 mV und R345-LPS mit sogar 16,0 mV ein höheres Sättigungspotential als R60-LPS mit 3,5 mV.

Zum Vergleich der Wirkung von PMB mit anderen Substanzen wurde unter den gleichen Bedingungen an R595- und R60-LPS die Abhängigkeit des Zeta-Potentials vom molaren Verhältnis von PMBN bzw. DTPPB zu LPS gemessen und in Abb. 22 B) dargestellt. Aus zwei unabhängigen Messungen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Mittelwerte wurden ebenfalls mit einer sigmoidalen Kurve angefittet. Im Fall von R595-LPS-Aggregaten und Zugabe von DTPPB ergibt sich ein ungewöhnlicher Kurvenverlauf.

Der allgemeine Kurvenverlauf ist ähnlich wie bei PMB, unterscheidet sich jedoch in einigen Punkten. Die Reduzierung des Zeta-Potentials durch steigende Substanzkonzentrationen ist im Vergleich zu den Messungen mit PMB nicht so stark.

Außerdem können PMBN und DTPPB nur bei R595-LPS ein positives Sättigungspotential von 3,8 mV bzw. 1,6 mV bewirken, bei R60-LPS beträgt es -1,2 mV bzw. -2,2 mV.

#### 4.2.1.3. Größe von LPS-Aggregaten in Abhängigkeit von PMB, PMBN und DTPPB

Gebundene Peptide können Auswirkungen auf die Aggregatstruktur, bzw. deren Überstruktur besitzen. Um diese Auswirkungen von gebundenem PMB auf die LPS-Aggregate in Abhängigkeit unterschiedlicher Glycostrukturen vom LPS charakterisieren zu können, wurde die Größe von Aggregaten aus LPS der Glycostruktur-Gruppe in Abhängigkeit des molaren Verhältnis von PMB : LPS bestimmt. Zum Vergleich der Auswirkungen unterschiedlicher Substanzen wurde die Größe der Aggregate aus R595- und R60-LPS in Abhängigkeit der Konzentration von PMBN und DTPPB gemessen. Dies erfolgte, wie in 3.8.2. beschrieben, mit dem ZetaSizer an denselben Proben an denen auch das Zeta-Potential bestimmt wurde. Der Mittelwert und sein Fehler wurden aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt und in Abb. 23 A) und B) dargestellt.

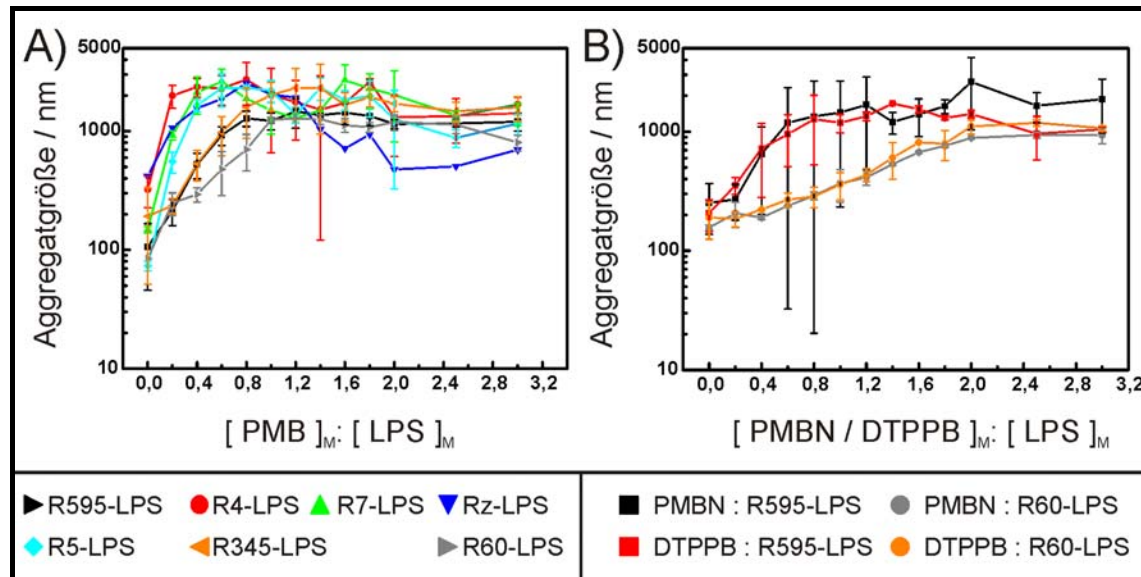


Abbildung 23: Halblogarithmische Darstellung der Größe von Aggregaten aus LPS der Glycostruktur-Gruppe über dem molaren Konzentrationsverhältnis von PMB zu LPS (A) bzw. PMB oder DTPPB zu LPS (B). Die Messungen wurden an denselben Proben wie die Zeta-Potential-Messungen in Abb. 22 durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen als Fehler aus zwei unabhängig voneinander präparierten Proben.

Wie aus Abb. 23 ersichtlich, besitzen alle reinen LPS-Aggregate eine Größe von einigen hundert nm. Sie werden mit zunehmendem PMB-Anteil größer bis zu einem bestimmten Verhältnis von PMB zu LPS und werden anschließend wieder kleiner. Es sind keine gravierenden Unterschiede oder Charakteristiken in den Kurvenverläufen zu erkennen. Der einzig erkennbare Unterschied besteht zwischen den Aggregaten aus R595-, R345- und R60-LPS zu den anderen in der Lage der Maxima. Die Größe der Aggregate aus R595-, R345- und R60-LPS besitzen ihren Maximalwert bei einem PMB zu LPS Verhältnis von ca. 1,2 und bleibt anschließend ungefähr gleich. Der Verlauf der Größe von Aggregaten aus R4-, R7-, Rz- und R5-LPS besitzt bei einem PMB: LPS Verhältnis von 0,6 bis 0,8 ein erstes Maximum. Anschließend nimmt die Größe ab, R7-LPS besitzt noch ein ausgeprägtes lokales Maximum bei einem Verhältnis von 1,6.

Auch bei den Messungen des Zeta-Potentials unterschieden sich die Kurvenverläufe von R595-, R345- und R60-LPS zu den anderen LPS darin, dass bei den drei genannten LPS-Aggregaten das Zeta-Potential bei einem molaren PMB : LPS Verhältnis von 1,7 bis 2,0 vollständig reduziert wurde, bei den anderen im Bereich von 1,2 bis 1,4.

Unter dem Einfluss von PMBN und DTPPB (Abb. 23 B) werden die Aggregate aus R595- und R60-LPS auch größer, allerdings wurden höhere Konzentrationen als bei PMB benötigt, um den gleichen Effekt zu erzielen. Die R595-LPS-Aggregate haben bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von PMBN, bzw. DTPPB : LPS von 1,4 ihre maximale Größe erreicht, die Aggregate

aus R60-LPS bei einem Verhältnis von 2,5. Im Anfangsbereich sind die Kurven für die unterschiedlichen LPS stark unterschiedlich, die vom R595-LPS ist deutlich steiler als die vom R60-LPS. Der Endbereich beider Kurven hingegen ist deutlich ähnlicher.

Damit ähneln sich die Kurvenverläufe von Aggregaten aus gleichem LPS für PMBN und DTPPB für das Zeta-Potential im Endverlauf und für die Aggregatgrößen. Sie unterscheiden sich deutlich von den entsprechenden Kurven für PMB.

#### 4.2.1.4. FRET-Spektroskopie

Um die Ursachen für die beobachteten Größenänderungen der Aggregate aufzuklären, wurde eine auf dem FRET-Effekt basierende spektroskopische Methode entwickelt und in 4.1. detailliert erklärt und eine Interpretation aufgezeigt.

Die Untersuchungen mit PMB und seinem Derivat PMBN wurde wie in 3.8.5. beschrieben durchgeführt. Die ermittelten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte der einzelnen Zugaben für Aggregate aus verschiedenen LPS sind in Abb. 24 dargestellt:

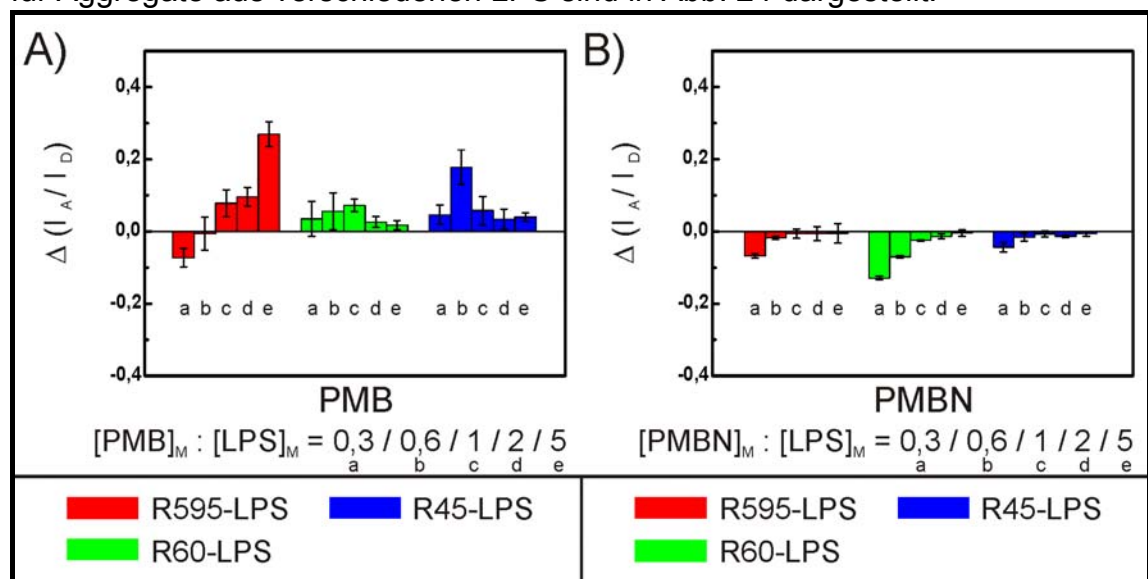


Abbildung 24: Änderung des Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten des Akzeptors und des Donors ( $\Delta(I_A/I_D)$ ) in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von PMB (A) bzw. PMBN (B) zu LPS für Aggregate aus LPS der Stämme R595, R60 und R45. Bei den in 3.8.5. beschriebenen Versuchen wird an fluoreszenzmarkierten LPS-Aggregaten gemessen, wobei je die Hälfte der Aggregate mit dem FRET-Donor NBD-PE oder mit dem FRET-Akzeptor Rh-PE markiert sind. Durch die Zugaben „a“ bis „e“ von jeweils 10  $\mu$ l Peptid-Lösung unterschiedlicher Konzentration wird in der Meßküvette ein schrittweiser Anstieg des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS erzielt. Aus den direkt gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor und Donor wurden die durch die einzelnen Zugaben ausgelöste Änderung des Verhältnis von Akzeptor- zu Donorintensität berechnet, wie oberhalb dieser Abbildung beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen als Fehler resultierend aus zwei Messungen.

Die PMB-Zugabe „a“ zu R595-LPS-Aggregaten bewirkte einen negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte von ca. -0,07, Zugabe „b“ einen nur sehr kleinen negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Die nächsten drei Zugaben erzeugen immer größer werdende positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte (Zugabe „d“:  $\Delta(I_A/I_D) = 0,27$ ). Die PMB-Zugaben auf R60-LPS bewirkten nur positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte, wobei die dritte mit  $\Delta(I_A/I_D) = 0,07$  die größte Änderung bewirkte. Die PMB-bedingten Änderungen bei Zugabe auf R45-LPS-Aggregate waren ebenfalls alle positiv, wobei die Zugabe „b“ die größte Änderung mit  $\Delta(I_A/I_D) = 0,18$  auslöste. Die anderen Änderungen betragen ca. 0,05.

Die PMBN-Zugaben bewirkten ein ganz anderes Verhalten. Bei allen eingesetzten LPS-Arten ergaben sich immer negative Änderungen des Intensitätsverhältnisses. Die Zugabe „a“ bewirkte bei den jeweiligen LPS immer die negativste Änderung, die folgenden Zugaben bewirkten betragsmäßig immer kleinere Werte. Die Zugabe „a“ bewirkte bei Aggregaten aus R595-LPS einen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert von -0,07, bei R60-Aggregaten betrug der entsprechende Wert -0,13, bei R45-LPS -0,04. Bei R595-LPS änderten sich die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte ab der Zugabe „c“ kaum noch und lag bei ca. -0,06. Bei R60-LPS nahmen mit den weiteren Zugaben die Beträge der  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte immer weiter ab und Zugabe „e“ bewirkte nur noch einen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert von ca. 0,006, der damit im Bereich der durch Verdünnung bewirkten Änderungen lag. Bei R45-LPS waren die Änderungen vom Betrag kleiner als bei R595- oder R60-LPS. Ab Zugabe „c“ änderten sich die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte nicht mehr stark und betragen für Zugabe „c“ ca. 0,007, für Zugabe „d“ ca. 0,014 und für Zugabe „e“ ca. 0,006.

### 4.2.1.5. Zeta-Potential von R595- und R60-Bakterien in Abhängigkeit der PMB-Konzentration

Nachdem Ergebnisse aus physikalischen Messungen zur Aufklärung biologischer Phänomene vorgestellt wurden, wird die Aussagekraft der LPS-Aggregate als Modellsystem überprüft. Dazu wurden Zeta-Potential-Messungen an Bakterien in Abhängigkeit der PMB-Konzentration durchgeführt und die Ergebnisse mit denen aus den Messungen an den entsprechenden LPS-Aggregaten verglichen.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Bindung von PMB an Bakterien mit unterschiedlicher LPS-Glycostruktur wurde das Zeta-Potential von Bakterien der *S. minnesota* Stämme R595 und R60 in Abhängigkeit von der PMB-Konzentration ermittelt und in Abb. 25 dargestellt. Die Messungen wurden an Bakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte von 0,04 bei 620 nm durchgeführt. Dies entspricht einer Konzentration von  $1,5 \times 10^7$  / ml. Die Experimente wurden in PBS-Puffer durchgeführt, da dieser Puffer im Gegensatz zum TRIS-Puffer ein Überleben der Bakterien ermöglichte.

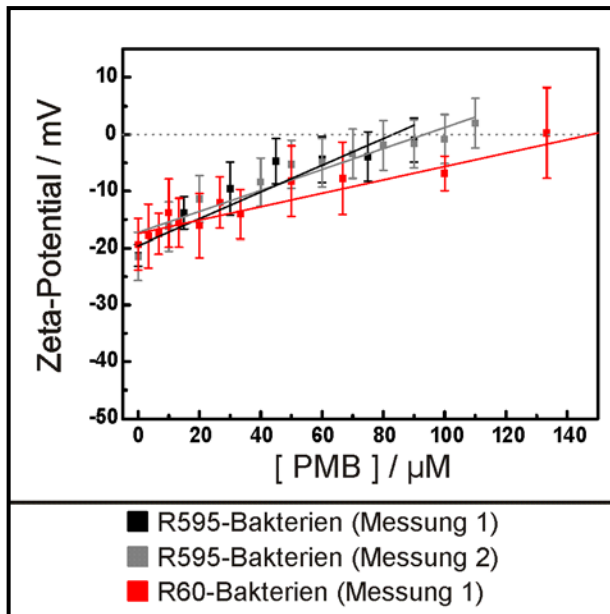


Abbildung 25: Verlauf des Zeta-Potentials von R595- und R60-Bakterien in Abhängigkeit von der PMB-Konzentration. Die dargestellten Werte aus drei unabhängigen Messreihen sind Mittelwerte aus 12 Einzelmessungen mit der Standardabweichung als Fehler. Die Werte sind mit Geraden angefüttet.

Aus Abb. 25 ist ersichtlich, dass die Bakterien ebenso wie die LPS-Aggregate ein negatives Potential besitzen, wie aufgrund ihrer äußeren Schicht aus anionischem LPS zu erwarten ist. In Kontrollmessungen konnte gezeigt werden, dass die Messungen ohne PMB keine Änderung der Viabilität der Bakterien und keine Reduktion dessen Zeta-Potentials verursachten. Allerdings wurde beobachtet, dass das Zeta-Potential der Bakterien stärker negativ wurde (von ca. -20 mV auf bis zu -28 mV). Da dies dem beobachteten Effekt der Reduktion des Zeta-Potentials durch PMB entgegenwirkt, ist es für die qualitative Aussage der Messung unkritisch. Weil der verwendete Zeta-Sizer leider funktionsunfähig wurde und am Ausweichgerät aus biologischen Sicherheitsgründen nicht mit den Bakterien gearbeitet werden durfte, konnte nicht die komplette Glycostruktur-Gruppe der Bakterien untersucht werden. Die dargestellten Werte stammen aus drei unabhängigen Messreihen und sind Mittelwerte aus jeweils 12 Einzelmessungen mit der Standardabweichung als Fehler. Sie wurden mit linear ansteigenden Kurven angefüttet, die sigmoidalen Fits konnten den Kurvenverlauf nicht wiedergeben.

Das negative Zeta-Potential ändert sich proportional zu der PMB Konzentration und bei einer bestimmten PMB-Konzentration ist das Zeta-Potential gleich Null und kann bei höherer PMB-Konzentration sogar positiv werden. Sowohl bei den Messungen an Bakterien als auch bei denen an LPS-Aggregaten (Abb. 22) liegen die R595-Kurven im Bereich bei höheren PMB-Konzentrationen oberhalb der R60-Kurven.

Die vollständige Kompensation des Zeta-Potentials erfolgte bei den R60-Bakterien bei einer 1,7-mal so hohen PMB-Konzentration wie bei R595-Bakterien. Die Steigung der Regressionsgeraden ist für R595-Bakterien 1,8-mal so hoch wie für R60-Bakterien. Aggregate aus R60-LPS benötigen ungefähr die 1,2-fache Menge an PMB wie R595-LPS-Aggregate, damit das Zeta-Potential komplett kompensiert wird.

#### 4.2.2. Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse der Untersuchungen zur Interaktion von PMB mit LPS werden im folgenden Teil der Arbeit interpretiert und die sich für das vorgeschlagene Detergens-Modell ergebenden Konsequenzen diskutiert.

##### 4.2.2.1. Antibakterielle Aktivität von PMB und Detergentien

Aus den Ergebnissen der MHK-Bestimmung der Detergentien gegen die *S. minnesota*-Stämme der Glycostruktur-Gruppe ergibt sich, dass die antibakterielle Aktivität aller drei getesteten Detergentien keine signifikante Abhängigkeit von der Länge der Glycostruktur des vom Bakterium exprimierten LPS besitzt. Negativ geladene Phosphatgruppen der Kernregion hemmen sowohl bei anionischem wie auch kationischem Detergens dessen Aktivität. Im Gegensatz dazu besitzt die antibakterielle Aktivität von PMB eine Abhängigkeit von der LPS-Glycostruktur. Je länger die Glycostruktur des LPS, desto weniger aktiv ist PMB gegen die das LPS bildende Bakterien. Der qualitative Einfluss der Ladungen ist derselbe wie bei den Detergentien.

Ist für die Wirkung der Peptide deren Bindung in der Lipid A- oder Kdo-Region von Bedeutung, könnten die Phosphatgruppen der Glycostruktur die Peptidaktivität dadurch hemmen, dass die kationischen Peptide an die Phosphatgruppen und somit nicht an die Lipid A- oder Kdo-Region binden. Für weitere Peptide stellen sie somit eine sterische Hinderung dar. Gegen das anionische Detergens SDS könnten sie ihre hemmende Wirkung durch die Vergrößerung des abstoßenden Potentials erzielen. Nach dem Detergensmodell müssen die Detergentien an der Membran Mizellenstrukturen bilden. Hierzu muß ihre Konzentration mindestens die CAC erreichen.

Aus dem Verhältnis von MHK zur CAC (DTMAB:  $\approx 2 \times 10^{-2}$ , DTPPB:  $\approx 10^{-4}$ ; PMB:  $\approx 2 \times 10^{-5}$  mit der MHK für R60) geht hervor, dass PMB für eine Mizellenbildung an der Oberfläche der LPS-Schicht stärker aufkonzentriert werden muß als die Detergentien, um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen. Da auch diskutiert wird, ob durch die Oberfläche der LPS-Schicht eine Aufkonzentration der Peptide bewirkt wird (ZITAT aus meiner Diplomarbeit), könnte dies eine Ursache für den unterschiedlichen Einfluss der LPS-Glycostruktur sein.

Damit scheint auch die wesentliche Kernaussage des Detergens-Mechanismus im Gegensatz zu den anderen in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismen für Peptide zuzutreffen, dass nämlich PMB für eine Wirkung an der Membran bis zur Mizellenbildung aufkonzentriert werden muß. Eine geänderte Glycostruktur am LPS scheint diesen Prozess derartig zu beeinflussen, dass eine längere Glycostruktur eine stärkere Aufkonzentrierung und folglich eine niedrigere MHK von PMB bewirkt.

#### 4.2.2.2. Abhängigkeit des Zeta-Potentials von LPS-Aggregaten von der PMB-Konzentration

Das Zeta-Potential ist das durch Oberflächenladungen hervorgerufenen Potential, welches in einem bestimmten Abstand zur Oberfläche, der Scherebene, herrscht. Gebundene kationische Substanzen reduzieren das negative Zeta-Potential von anionischen Lipidaggregaten. Da das Zeta-Potential aber in einem Abstand zur Oberfläche bestimmt wird, kann über die Reduktion des Zeta-Potentials keine Aussage darüber getroffen werden, ob die gebundene Substanz nur an die Oberfläche der Membran adheriert oder in diese inseriert.

Die Lage der Scherebene lässt sich aus dem Gouy-Chapman-Potential und den Zeta-Potentialwerten berechnen (Hagge et al., 2006). Aus einer Superposition von den Gouy-Chapman-Potentialen des Lipid A Bereichs mit den Kdo und den Gouy-Chapman-Potentialen der Phosphatgruppen im Kernoligosaccharid (Abstand zur Oberfläche 1,1 nm (Snyder et al., 1999)) lässt sich das Gouy-Chapman-Potential des LPS berechnen. Für die LPS der Glycostruktur-Gruppe ergeben sich die in (Hagge et al., 2006) publizierten Ergebnisse. Die Aggregate aus LPS ohne zusätzliche Ladung in der Kernregion besitzen Scherebenen im Abstand von 0,20 nm bis 0,40 nm, die mit Ladung in der Kernregion im Abstand von 1,04 nm bis 1,38 nm. Damit lässt sich, insbesondere bei den Rz-, R345- und R60-LPS, nicht unterscheiden, ob das Peptid an die Ladungen des Zuckers gebunden hat oder an den Lipid A Bereich. Die Reduktion des Zeta-Potentials wird deshalb als Maß für die Menge an adherierten Peptiden genutzt und nicht für Aussagen über ihren Bindungsort.

Allerdings zeigen manche Peptide eine Überkompensation des Zeta-Potentials von stark negativen Werten bis zu leicht positiven Werten. Damit wird mehr Substanz gebunden, als bei einer Bindung mit reiner Ladungsstöchiometrie, bzw. mehr positive Ladung nach außen präsentiert. Da dies elektrostatisch ungünstig ist, wird die über den Ladungsausgleich hinausgehende Bindung durch einen zweiten Effekt getrieben. Möglich ist, dass aufgrund eines starken hydrophoben Moments des Peptids eine Überkompensation der Ladung bewirkt wird. Dies könnte von einer Insertion der Acylkette von PMB in den Kohlenwasserstoffkettenbereich von der LPS-Schicht herrühren.

Aus der Reduktion des Zeta-Potentials von Aggregaten aus LPS der Stämme der Glycostruktur-Gruppe durch PMB folgt, dass sich PMB an alle LPS-Aggregate anlagert. Die komplette Reduktion des Potentials auf Null für Aggregate aus LPS der Stämme R595, R345 und R60 erfolgt bei höherer Peptidkonzentration als bei Aggregaten aus LPS von den anderen Stämmen der Glycostruktur-Gruppe. Dies wird als eine schwächere Bindung/Bindungsrate von PMB an diese LPS-Aggregate interpretiert.

Aus der Überkompensation des Zeta-Potentials folgt, dass neben der Ladungsinteraktion auch eine hydrophobe Wechselwirkung erfolgt. Dies könnte aus der Insertion der Fettsäure vom PMB in den hydrophoben Bereich der LPS-

Schicht resultieren. Die Insertion ist demnach für R60-LPS besonders schwach. Dies könnte die relativ hohe MHK vom Stamm R60 gegenüber PMB erklären. Allerdings war die Überkompensation für LPS vom noch unsensitiveren Stamm R345, wie die entsprechende Kurve zeigt, die höchste aller Messungen.

Auch die Substanzen PMBN und DTPPB lagern sich an alle LPS-Aggregate an. Die Verläufe der Zeta-Potentiale ähneln sich sehr und weisen eine größere Ähnlichkeit zueinander auf als zu der Kurve von PMB. Die Überkompensation durch DTPPB und PMBN ist wesentlich geringer als durch PMB, wobei das fettsäurelose PMBN sogar eine höhere Überkompensation bewirkt als das Detergens DTPPB.

### 4.2.2.3. Größe von Aggregaten in Abhängigkeit von PMB, PMBN und DTPPB

Aus den Messungen geht hervor, dass PMB Auswirkungen auf alle Aggregate aus LPS besitzt und offenbar deren Überstruktur ändern kann. Quantitativ wurden jedoch Unterschiede festgestellt.

Anscheint ist nicht nur die Bindung von PMB an Aggregate aus LPS der Stämme R595, R345 und R60 stärker, sondern auch die PMB-verursachte Größenänderung für diese LPS-Aggregate. Ob dies eine direkte Folge der erhöhten Bindungsrate von PMB ist, oder ob dies alleine durch die unterschiedlichen LPS bedingt wird, ist nicht zu unterscheiden.

Damit ist sowohl die Bindung von PMB an LPS-Aggregate als auch die Auswirkung auf die LPS-Aggregate abhängig von der Glycostruktur des LPS. Dabei unterscheidet sich das Verhalten für Aggregate aus R595-, R345- und R60-LPS von dem der anderen LPS in dem Sinne, dass bei den zuerst genannten sowohl die Bindung als auch die Auswirkung stärker sind.

Auch die durch PMB bewirkte Größenänderung der Aggregate unterscheidet sich deutlich von der durch PMBN und DTPPB bewirkten Größenänderungen. Nur bei den Messungen mit PMB zeigte sich schon bei geringer Konzentration eine starke Vergrößerung der Aggregate. PMBN verhält sich dagegen sehr vergleichbar zum Detergens DTPPB. Allen Substanzen bewirkten im Fall von LPS mit einer langen Glycostruktur (wie R345-LPS und R60-LPS) eine deutlich geringere Größenänderung.

Der Fettsäurerest von PMB hat demnach einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Anlagerung an LPS-Aggregate als auch auf die Größenänderung der Aggregate. Durch ihren Einfluss besitzt PMB ein anderes Verhalten auf LPS-Aggregate als das verwendete Detergens DTPPB. Da DTPPB ebenfalls auch einen Fettsäurerest besitzt, scheint das Zusammenspiel der Eigenschaften von Kopfgruppe und Fettsäurerest und damit auch die Aggregatform von entscheidender Bedeutung für die Aktivität von Detergentien und ähnlichen Substanzen zu sein.



#### 4.2.2.4. FRET-Spektroskopie

Mit der geschilderten Interpretation des FRET-Assays ergibt sich, dass die Peptide PMB und PMBN eine deutlich unterschiedliche Wirkung auf LPS-Aggregate ausüben, wie auch in den Messungen der Aggregatgrößen festgestellt wurde. Das antibakterielle PMB inseriert in die LPS-Schicht und führt zu einer Fusion der Aggregate, während das inaktive PMBN weder in den Acylkettenbereich der LPS-Schicht eindringen noch die Aggregate fusionieren kann. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Erkenntnissen aus den Zeta-Potential und Größenmessungen. Eine mögliche Schlussfolgerung daraus ist, dass die durch PMBN-induzierte Größenänderung durch Aggregation der LPS-Aggregate entstanden ist und dies nicht zu einem stark positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert führt, wie durch theoretische Überlegungen nicht auszuschließen ist. Möglicherweise sind an den Kontaktstellen der Aggregate die Abstände zwischen den LPS-Schichten noch so groß, dass es nicht zu einer Verbesserung der FRET-Effizienz kommt. Damit lässt sich ein positiver  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert zweifelsfrei als Fusion von Aggregaten deuten.

Aus den in Abb. 24 dargestellten Ergebnissen und der vorgestellten Interpretation des  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wertes ergibt sich, dass PMB bei den Aggregaten aus R595-, R60- und R45-LPS eine Fusionierung bewirkt. Diese Wirkung ist für Aggregate aus R595-LPS am stärksten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Größenänderung der Aggregate durch PMB (4.2.1.3.) zeigt sich an R60-LPS-Aggregaten eine geringere Fusionierung bzw. geringere Aggregation. Bei Aggregaten aus R45-LPS beginnt eine Fusion der Aggregate schon ab einem molaren Verhältnis von PMB zu LPS von 0,3. Das antibakteriell nicht wirksame Peptid PMBN kann bei keinem LPS-Aggregat eine Fusionierung bewirken. Die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte der Zugaben „c“, „d“ und „e“ liegen für Aggregate aus R595-LPS im Bereich der durch reine Verdünnung verursachten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte, für R60-LPS-Aggregate sind dies die Zugaben „d“ und „e“ und für R45-LPS-Aggregate die Zugaben „b“, „c“, „d“, und „e“. Die relativ starken negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert vor diesen Zugaben werden als Insertion gedeutet. Diese hat aber offenbar keine Fusion der Aggregate zur Folge.

Damit bewirkt das antibakteriell wirksame PMB ein anderes Verhalten der Aggregate untereinander als das antibakteriell nicht wirksame PMBN. Dieses ist nicht in der Lage LPS-Aggregate miteinander fusionieren zu lassen. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Größenmessungen an den Aggregaten in Abhängigkeit von PMB bzw. PMBN.

### 4.2.2.5. Zeta-Potential von R595- und R60-Bakterien in Abhängigkeit der PMB-Konzentration

Sowohl die Messungen an den rekonstituierten Membranen als auch an den Bakterien selbst zeigen einen stärkeren Einfluss von PMB auf R595-LPS als auf R60-LPS. Bei den Messungen an Bakterien trat er wesentlich deutlicher hervor als an den Messungen der LPS-Aggregate. Beide Messungen können die um Faktor 2 höhere antibakterielle Aktivität von PMB gegen den Stamm R60 als gegen den Stamm R595 erklären. Bei zweifachem Peptidüberschuss ist die Überkompensation des Potentials der Aggregate aus R595-LPS 1,9-mal so hoch wie an den R60-Aggregaten. Bei den Messungen an R60-Bakterien wird die 1,7-fache Menge an PMB im Vergleich zu R595-Bakterien benötigt, um das Potential zu kompensieren. Die von einem einzelnen PMB-Molekül bewirkte Reduktion ist 1,8-mal stärker im Falle von R595-Bakterien als bei R60-Bakterien.

Da die Messung des Zeta-Potentials an  $1,5 \times 10^7$  Bakterien pro ml durchgeführt wurde, entspricht eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  PMB einem molaren Verhältnis von PMB zu LPS von 100 (3.5.). Damit wird ein 850 facher Überschuss an PMB in Bezug auf LPS benötigt, um das Potential von R595-Bakterien unter den Versuchsbedingungen zu kompensieren. Bei R60-Bakterien wird ein Überschuss von mehr als 1000 benötigt. Bei der Bestimmung der MHK lag ein deutlicher LPS-Überschuss vor (3.7.1.). Offenbar sind für die antibakterielle Wirkung schon lokale Effekte von PMB auf die LPS-Schicht von Bedeutung, während durch die Zeta-Potential-Messungen globale Effekte bestimmt werden. Nichtsdestotrotz können diese auch Aufschlüsse über die Bindungsstärke von Peptiden an LPS-Schichten liefern. Die Bindungsstärke wiederum bestimmt die lokalen Effekte von PMB auf Bakterien.

Damit konnte der Einfluss von PMB durch physikalische Messungen direkt an Bakterien bestimmt werden. Außerdem konnte die Gültigkeit des Modellsystems verifiziert werden. Offenbar sind die Messungen des Einflusses von PMB auf LPS-Aggregate geeignet, um die unterschiedlichen antibakteriellen Aktivitäten gegen die korrespondierenden Stämme zu beschreiben. Dadurch kann die These, dass die Wechselwirkung von PMB mit den die Membran bildenden LPS eine entscheidende und bestimmende Rolle in Bezug auf die antibakterielle Aktivität von PMB einnimmt, bestätigt werden. Offensichtlich spielen andere Moleküle des Bakteriums nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die antibakterielle Wirkung von PMB.

### 4.3. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von LL-32 und LPS

Zur Ermittlung der Struktur-Wirkungsbeziehung von LPS und dem antibakteriellen und antiinflammatorischen Peptid LL-32 wurden sowohl verschiedene LPS, welche in der Glycostruktur oder den Substitutionen am Lipid A und K(d)o variieren (Tab. 3), als auch unterschiedliche Fragmente des LL-32 eingesetzt (Tab. 1). Die verwendeten Fragmente lassen sich in sechs Gruppen einteilen. Die jeweilige antibakterielle und antiinflammatorische Aktivität der Peptide wurde mit biologischen Methoden gegen verschiedene Bakterienstämme bzw. gegen die jeweils exprimierten LPS bestimmt. Ihre zytotoxische Aktivität gegen Erythrozyten wurde ebenfalls ermittelt. Mit physikalischen Methoden wurden verschiedene Parameter sowohl an Modellsystemen, rekonstituiert aus LPS der entsprechenden Bakterienstämme, als auch an lebenden Bakterien in Abhängigkeit von Peptidkonzentrationen bestimmt.

#### 4.3.1. Ergebnisse

##### 4.3.1.1. Charakterisierung der biologischen Aktivität der LL-32 Fragmente

Mit verschiedenen biologischen Tests wurde die antibakterielle, die antiinflammatorische und die zytotoxische Aktivität der LL-32 Fragmente in Abhängigkeit von der LPS-Glycostruktur und den Substitutionen am LPS bestimmt. Unter Verwendung des FRET-Effektes konnten mit einer spektroskopischen Methode Aussagen über die Auswirkung der LL-32 Fragmente auf Modellmembranen aus LPS getroffen werden.

Als Maß für die antibakterielle Aktivität wurde die letale Dosis  $LD_{90}$  verwendet. Dafür wirkten verschiedenen Peptidkonzentrationen 2h Stunden auf  $10^4$  bis  $10^5$  Bakterien in Natriumphosphat-Puffer. Durch Ausplattieren wurde die Peptidkonzentration ermittelt, die mindestens 90% der Bakterien getötet hat. Es wurden mindestens zwei unabhängige Versuchsreihen mit einer Doppelbestimmung durchgeführt, wobei eine Abweichung eines Werts von einer Verdünnungsstufe toleriert wurde. Die  $LD_{90}$ -Werte sind immer logarithmisch aufgetragen.  $LD_{90}$ -Werte von über 10  $\mu$ M wurden in den folgenden Graphen mit „>“ gekennzeichnet und die zugehörigen Peptide werden als inaktiv gegenüber diesem Stamm bezeichnet bzw. der Stamm als fast resistent gegenüber dem Peptid bezeichnet. Ist die  $LD_{90}$  im Bereich von 1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M wird das Peptid als schwach aktiv, bei 100 nM bis 1000 nM als normal aktiv und unterhalb von 100 nM als stark aktiv bezeichnet.

Die relative Inhibition der TNF- $\alpha$  Ausschüttung von LPS-aktivierten MNC durch die Peptide, diente als Maß für die antiinflammatorische Aktivität der Peptide. Die verwendeten Methoden und die Versuchsbedingungen sind unter 3.7.3. detailliert beschrieben. Aus mindestens drei unabhängigen

Doppelbestimmungen wurde der Relativwert zu den nur mit LPS durchgeführten Kontrollen berechnet. Aus diesen wurden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen gebildet. Aus Platzgründen wurden nur die Daten vom molaren Konzentrationsverhältnis von Peptid zu LPS von 400 : 1 dargestellt. Im Folgenden werden identisch erhobene Daten in identischer Art von anderen Peptiden gegen andere Bakterien, bzw. deren LPS, präsentiert. Im Weiteren wird auf eine Aufzählung der Versuchsbedingungen verzichtet und auf diesen Abschnitt verwiesen.

Als Maß für die zytotoxische Aktivität wurde die Eigenschaft, Erythrozyten zu lysieren, verwendet (3.7.2.). Aus drei unabhängigen Messreihen wurden die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen berechnet und als Werte und Fehler verwendet.

Aufgrund der biologischen Heterogenität besitzen viele Werte relativ große Fehler.

### Antibakterielle und antiinflammatorische Aktivität

Zur Ermittlung des Einflusses der LPS-Glycostruktur auf dessen Wechselwirkung mit LL-32 wurden die *S. minnesota* Stämme der Glycostruktur-Gruppe und deren extrahiertes LPS verwendet. Aufgrund der Vielzahl der Messungen wurde häufig nur eine Auswahl (R595 und R60) an LPS statt der gesamten Reihe verwendet. Um Hinweise auf den Einfluss der einzelnen Anteile der LL-32 Struktur zu erhalten, wurden die verschiedenen LL-32 Fragmente benutzt. In diesem Teil werden die Aktivitäten nach den Peptid-Gruppen getrennt vorgestellt. Dabei wird zuerst die antibakterielle Aktivität gegen Stämme der Glycostruktur-Gruppe und die antiinflammatorischen Aktivitäten gegen LPS der Glycostruktur-Gruppe vorgestellt und anschließend die entsprechenden Daten gegen die Stämme, bzw. deren LPS der Substitutions-Gruppe.

Durch die Bestimmung der antibakteriellen und antiinflammatorischen Aktivität der verschiedenen Fragmente wurde deren Wirkung charakterisiert, welche durch die physikalischen Messungen an den Modellsysteme erklärt werden sollen. Deshalb werden für jede Peptid-Gruppe die Ergebnisse aus der FRET-Spektroskopie nach der Präsentation der biologischen Aktivitäten dargestellt.

### Peptide der Basis-Gruppe

In dieser Gruppe sind zusätzlich zum LL-32 die Peptide LL-37 und rCAP18<sub>106-137</sub>. LL-32 selbst ist ein Fragment vom LL-37, welches am C-Terminus fünf Aminosäuren mehr besitzt. rCAP18<sub>106-137</sub> ist das LL-32 Pendant vom CAP18 des Kaninchens. Die Versuchsabläufe und -bedingungen sind in 3.7.1. beschrieben. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur antibakteriellen und antiinflammatorischen Aktivität sind für die Stämme, bzw. deren LPS, der Glycostruktur-Gruppe in Abb. 26, für die der Substitutionsgruppe in Abb. 27 dargestellt. Die Daten der FRET-Spektroskopie sind für alle verwendeten LPS in Abb. 28 dargestellt.

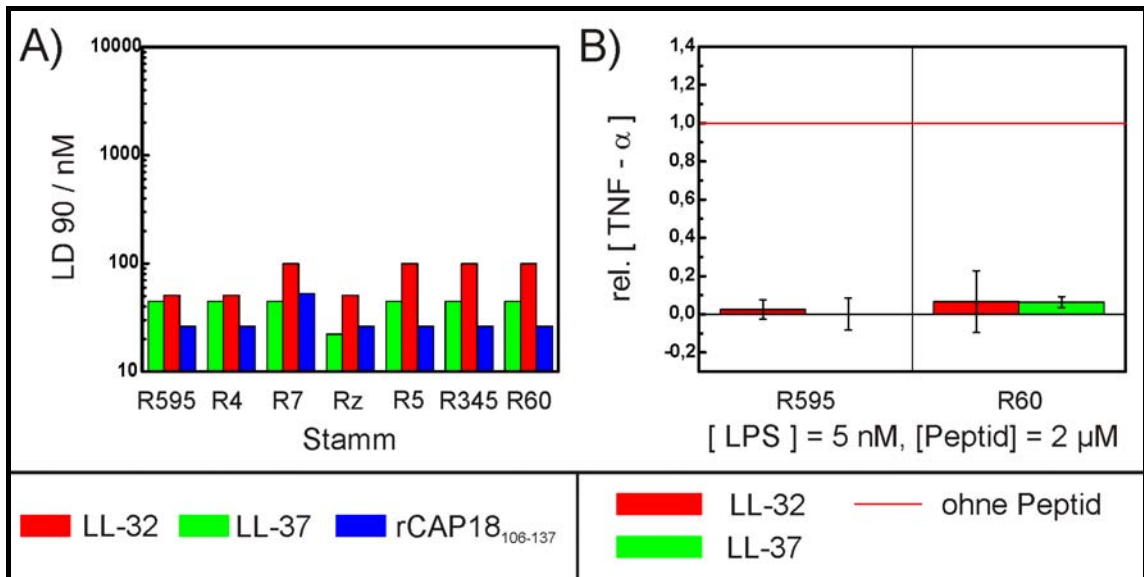


Abbildung 26: A) Antibakterielle Aktivität der Peptide der Basisgruppe (Tab. 1) gegen sieben verschiedene Bakterienstämme der Glycostruktur-Gruppe (Tab. 3). Ein wesentlicher Einfluss der Glycostruktur ist nicht zu erkennen. B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Basisgruppe auf die R595- und R60-LPS-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch MNC. Nach Vorinkubation des jeweiligen Peptids mit dem LPS wurden die MNC damit stimuliert. Die Konzentration des Peptids betrug 2  $\mu$ M, die von LPS 5 nM, damit ergab sich ein molares Verhältnis von 400 : 1.

Die Versuche zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität für die Basispeptide gegen die Stämme der Glycostruktur-Gruppe ergaben, dass LL-37 gegen fast alle *S. minnesota* Bakterien der Glycostrukturreihe die gleiche LD90 besaß, nur die LD90 gegen den Stamm Rz wich ab und war nur halb so hoch wie die anderen. Da im Allgemeinen bei derartigen Tests nur eine Abweichung von mehr als einer Verdünnungsstufe als signifikant bezeichnet wird, muss dies kein wirklicher Effekt sein. rCAP18<sub>106-137</sub> zeigte auch keinerlei Abhängigkeit in der Wirkung von der Glycostruktur, bis auf den doppelt so hohen Wert für den Stamm R7. Beim Peptid LL-32 waren die LD90-Werte für die Stämme R7, R5, R345 und R60 bei knapp 100 nM und damit doppelt so hoch wie die für R595, R4 und Rz. Alle Peptide sind stark aktiv gegen die getesteten *S. minnesota* Stämme.

Als Maß für die antiinflammatorische Eigenschaft eines Peptids wurde die durch das Peptid bewirkte Änderung der TNF- $\alpha$  Ausschüttung von MNC durch LPS-Stimulierung gewählt. Die Daten sind in Abb. 26 B) angegeben und eine Beschreibung der Versuche in 3.7.3.

Beide Peptide verhinderten bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von Peptid zu LPS von 400 : 1 bei R595-LPS eine vollständige und bei R60-LPS eine nahezu vollständige Inhibierung der TNF- $\alpha$  Ausschüttung. Damit wirken beide Peptide stark antiinflammatorisch gegen R595- und R60-LPS.

Für die Peptide der Gruppe „Basispeptide“ LL-32, LL-37 und rCAP<sub>106-137</sub> wurde die LD<sub>90</sub> für die Bakterien der Substitutions-Gruppe ermittelt und in Abb. 27 A) präsentiert. Die Versuche wurden mit einer Wirkzeit von 2 h in Natriumphosphat-Puffer, wie in 3.7.1. ausführlich beschrieben, durchgeführt. In der Abbildung ist auch die antiinflammatorische Aktivität bei Stimulation mit LPS der Substitutions-Gruppe dargestellt.

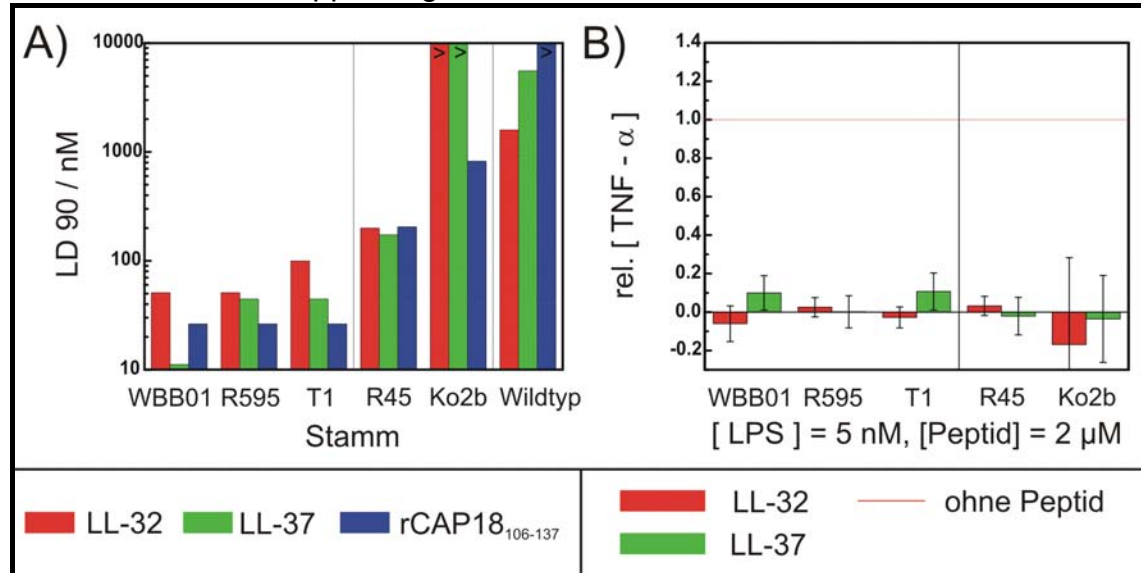


Abbildung 27: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „Basispeptide“ (Tab. 1) gegen die Stämme der Substitutionsgruppe (Tab. 3). Weitere Informationen sind unter 3.7.1. zu finden. Die Werte resultieren aus zwei unabhängigen Versuchen.

B) Relative TNF- $\alpha$  Konzentration als Maß für die antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „Basispeptide“. Weitere Informationen zu den Versuchen sind unter 3.7.3. beschrieben. Aus drei unabhängigen Messreihen wurden die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen berechnet und als Werte mit dazugehörigem Fehler verwendet.

LL-32 besitzt mit 50 nM eine gleich starke antibakterielle Aktivität gegen die Bakterienstämme WBB01 und R595, den beiden Stämmen mit der geringsten Anzahl an Substitutionen. Die LD<sub>90</sub> ist doppelt so hoch gegen den Stamm T1, was aber nur einer Verdünnungsstufe entspricht. Dieser Stamm besitzt eine hohe Anzahl an Substitutionen am membranverankernden Lipid A, aber keine an den weiter außen liegenden Kdo. Das Peptid LL-32 ist mit einer LD<sub>90</sub> von ungefähr 200 nM normal aktiv gegen den Stamm R45, der zwar eine geringe Anzahl an Substitutionen am Lipid A aufweist, allerdings eine Substitution am Kdo besitzt. Mit einer LD<sub>90</sub> von über 25  $\mu$ M ist der *B. cepacia* Stamm Ko2b weitestgehend resistent gegen LL-32. Dieser Stamm besitzt sowohl eine hohe Anzahl an Substitutionen am Lipid A wie auch eine am äußeren Ko, welches er anstelle eines Kdo besitzt. Gegen den eingesetzten Wildtypstamm von *B. cepacia* ist LL-32 zwar noch schwach aktiv, besitzt aber eine LD<sub>90</sub> von ca. 1,5  $\mu$ M. Anscheinend steigt die LD<sub>90</sub> von LL-32 an, wenn die Anzahl an Substitutionen am Lipid hoch ist. Einen größeren Einfluss haben aber offensichtlich die Substitutionen am Kdo, bzw. Ko.

Das Peptid LL-37 ist mit einer LD90 von 10 nM sehr stark aktiv gegen Bakterien des *E. coli* Stammes WBB01. Gegen die Stämmen R595 und T1 war LL-37 mit einer LD90 von 45 nM gleich aktiv, wogegen der Stamm R45 eine LD90 von 180 nM hat. Gegen den Stamm Ko2b war LL-37 ebenso wie LL-32 weitestgehend inaktiv, gegen den Wildtypstamm von *B. cepacia* betrug die LD90 einige  $\mu\text{M}$ . Tendenziell scheint LL-37 den gleichen Einflüssen wie LL-32 zu unterliegen. Allerdings ist LL-37 nur aktiver gegen Stämme ohne Substitution am Lipid A, LL-32 zusätzlich noch gegen Stämme mit einer geringen Anzahl. Das Peptid rCap18<sub>106-137</sub> besitzt bei allen Stämmen ohne Substitution am Kdo eine gleich starke antibakterielle Aktivität mit einer LD90 von 25 nM. Bei den Stämmen mit Substitution am Kdo, bzw. Ko beträgt die LD90 200 nM für R45 und 820 nM für den Stamm Ko2b. Bei der Wirkung von rCap18<sub>106-137</sub> scheinen die Substitutionen am Lipid A nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von welchem am K(d)o einen Einfluss zu besitzen. LL-32 zeigt eine etwas andere Abhängigkeit der Wirkung auf die verwendeten Bakterienstämmen als das um fünf Aminosäuren längere LL-37. Das als homolog zum LL-32 bezeichnete Fragment rCap18<sub>106-137</sub> besitzt ebenfalls ein etwas anderes Verhalten als LL-32.

Die durch Peptidzugabe („a“ bis „e“) von LL-32 oder LL-37 verursachten Änderungen im Verhältnis von Akzeptor- zu Donorintensität  $\Delta(I_A/I_D)$  von doppelmarkierten Aggregaten ist für jede der fünf Peptidzugaben in Abb. 28 dargestellt. Die exakten Versuchsbedingungen und die Entstehung dieses zusammenfassenden Graphen sind in 4.1. beschrieben.

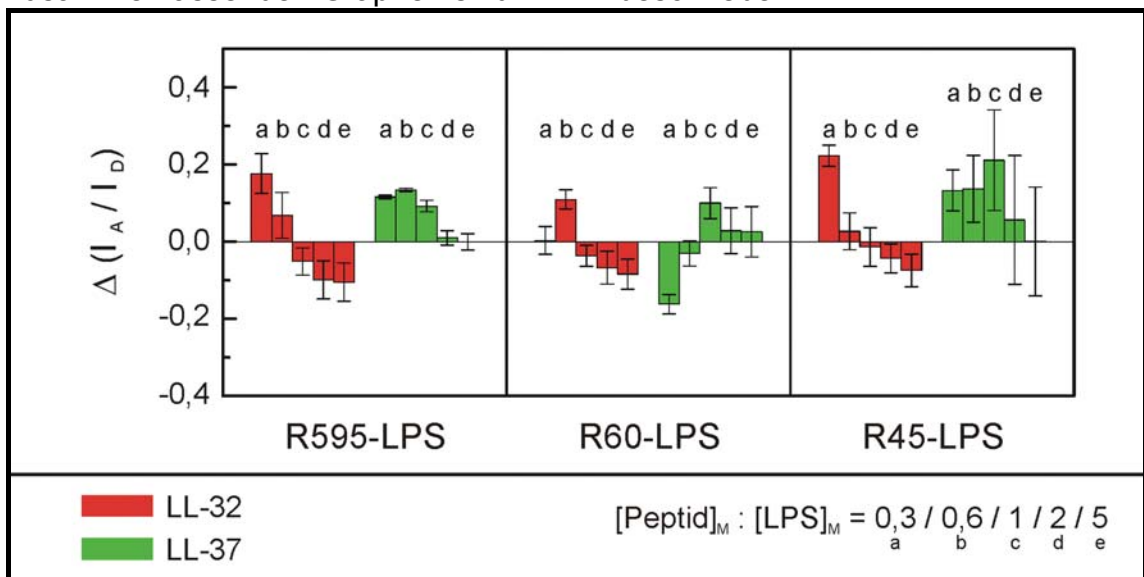


Abbildung 28: Änderung des Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten des Akzeptors und des Donors  $\Delta(I_A/I_D)$  in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS für die Peptide LL-32 und LL-37 und für R595-, R60- und R45-LPS. Die Änderung des  $I_A/I_D$ -Wertes, welcher durch die einzelnen Peptidzugaben bewirkt wurde, ist für jede Peptidzugabe angegeben. Die unter 3.8.6. beschriebenen Experimente wurden wie unter 4.1. beschrieben ausgewertet und zusammengefasst.

Das Peptid LL-32 verursacht bei R595-LPS-Aggregaten durch Zugabe „a“ einen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Zugabe „b“ führt zu einem weiteren, allerdings geringeren positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Die weiteren Zugaben bewirken einen zunehmend negativeren Wert. Bei Aggregaten aus R60-LPS bewirkt die Zugabe „a“ kaum einen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Erst Zugabe „b“ bewirkt eine positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Die weiteren Zugaben bewirken wie bei R595-LPS einen zunehmend negativeren  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert.

Die Zugaben von LL-32 auf R60-LPS-Aggregate bewirken erst ab Zugabe „b“ einen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Die weiteren Werte erzeugen stetig negativer werdende  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte.

Die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte der Zugaben auf R45-Aggregate sind ähnlich wie die bei Zugabe auf R595-LPS-Aggregate. Der positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert von Zugabe „a“ ist jedoch größer und die negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert vom Betrag her kleiner als bei den entsprechenden  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werten bei R595-LPS-Aggregaten.

Für das Peptid LL-37 zeigt sich ein größerer Einfluss des LPS. Bei Aggregaten aus R595-LPS die drei Zugabe einen stark positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert besitzen und die weiteren Zugaben „d“ und „e“ kaum noch eine Änderung von Akzeptor- und Donorintensität bewirken. Bei den Aggregaten aus R60-LPS bewirken die ersten beiden LL-37 Zugaben einen schwächer werdenden negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Erst die Zugabe „c“ bewirkt einen positiven Wert. Die weiteren Zugaben führen zu einem geringeren, aber positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Die Zugaben auf R45-LPS-Aggregate führten zu hohen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werten.

Die von LL-32 und LL-37 bewirkten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte unterscheiden sich deutlich. Nach dem ersten positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert folgen stärker werdende negative. Bei LL-37 folgend eventuell auftretenden negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert positive Werte. Bei beiden Peptiden waren die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte für Aggregate aus R45-LPS am positivsten und die für R60-LPS am geringsten positiv.

Das Peptid LL-32 besitzt ebenso wie das Peptid LL-37 starke antibakterielle Eigenschaften, allerdings nicht bei den *B. cepacia* Stämmen Ko2b, dem Wildtypstamm und bei *P. mirabilis* R45. Das Peptid rCAP<sub>106-137</sub> ist meist stärker aktiv, zeigt aber ebenfalls bei den *B. cepacia* Stämmen große Einbußen in der Aktivität. Es scheint, als ob mit steigender Anzahl der Substitutionen sowohl am Lipid A als auch am K(d)o die Aktivität abnimmt, wobei die K(d)o-Substitutionen einen wesentlich stärkeren inaktivierenden Einfluss haben.

Beide besitzen ausgeprägte antiinflammatorische Eigenschaften und erzeugen deutlich positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte. Diese sind für Aggregate aus LPS mit Substitution am Kdo größer als für LPS ohne Kdo-Substitution oder mit langer Glycostruktur.



### Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“

In Abb. 29 A) werden die ermittelten antibakteriellen Aktivitäten der Peptide LL-32, FF-28, SK-24 und IG-20 der Gruppe „N-terminale Deletion“ gegen die sieben *S. minnesota*-Stämme der Glycostruktur-Gruppe präsentiert. In Abb. 30 A) werden die Aktivitäten gegen die Stämme der Substitutions-Gruppe vorgestellt. Die LD<sub>90</sub>-Werte sind wie in 3.7.1. dargestellt ermittelt worden). In den Abbildungen sind die antiinflammatorischen Aktivitäten der Peptide bei Stimulation mit LPS der Glycostruktur-Gruppe (Abb. 29 B) und der Substitutions-Gruppe (Abb. 30 B) mit angegeben. Sie wurden wie in 3.7.3. beschrieben ermittelt. Zum Schluß werden die Daten der FRET-Spektroskopie in Abb. 31 vorgestellt.

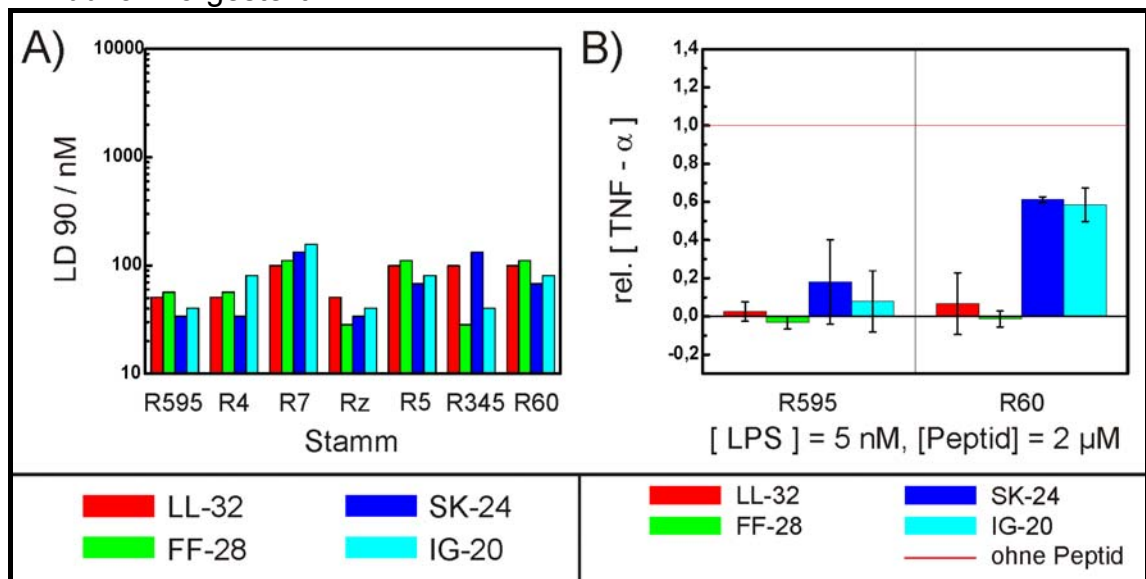


Abbildung 29: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „N-terminale Deletion“ (Tab. 1) gegen die sieben Stämme der Glykostruktur-Gruppe (Tab. 3). Als Maß für die Aktivität wurde die LD<sub>90</sub> verwendet. B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“. Die reduzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch MNC nach Stimulation mit vorinkubierten R595- und R60-LPS-Peptid-Gemischen wurde auf die TNF- $\alpha$  Freisetzung durch MNC nach Stimulation mit reinen R595- und R60-LPS-Aggregaten (rote Linie) normiert.

Die Versuche ergaben, dass die Peptide FF-28, SK-24 und IG-20 gegen alle getesteten Stämme eine starke bis normale Aktivität besitzen. Ansonsten wich kein LD-90 Wert deutlich (Unterschied größer als zwei Verdünnungsstufen) von dem LL-32 Wert ab. FF-28 scheint inaktiver gegen Bakterien mit LPS mit einer relativ langen ungeladenen Kernregion (R7 und R5) als gegen welche mit LPS mit einer kurzen Glycostruktur (R595 und R4). Danach müssten die Stämme Rz, R345 und R60 deutlich höhere LD<sub>90</sub>-Werte besitzen. Da diese LPS die einzigen verwendeten mit einer Netto-Ladung in der Glycostruktur sind, scheint dessen Ladung die Wirkung der Peptide zu begünstigen.

SK-24 scheint demselben Trend zu unterliegen, dies ist aber nicht so deutlich wie bei FF-28. Der Vergleich der Aktivitäten gegen die Stämme R7 und Rz zeigt, dass auch bei diesem Peptid die Wirkung durch Netto-Ladung der

Glycostruktur begünstigt wird. Rz und R7 besitzen die gleiche Kernregion, wobei die vom letzteren Stamm allerdings eine negative Netto-Ladung trägt.

IG-20 besitzt sehr vergleichbare LD90-Werte wie FF-28. Vermutlich ist die Glycostrukturabhängigkeit wie bei LL-32, eventuell ist die Verschlechterung der Wirkung durch eine lange ungeladene Glycostruktur noch stärker (Vergleich von R595, R4 und R7).

Insgesamt haben die Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“ eine starke bis normale antibakterielle Aktivität gegen die getesteten Bakterienstämme.

Die in Abb. 29 B) dargestellten antiinflammatorischen Aktivitäten der Peptide bei Stimulation mit LPS der Glycostruktur-Gruppe wurden, wie in 3.7.2. beschrieben, bei einem Peptid zu LPS Verhältnis von 400 : 1 bestimmt.

FF-28 inhibiert die TNF- $\alpha$  Ausschüttung vollständig und zeigt keinen Unterschied zwischen R595- und R60-LPS. SK-24 und IG-20 reduzieren die TNF- $\alpha$  Ausschüttung durch R595-LPS-Aggregate deutlich auf unter 20%, bei R60-LPS ist die Inhibierung jedoch auf 60% gefallen.

Die antibakterielle Aktivität der Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“ gegen die Stämme der Substitutions-Gruppe wurden, wie in 3.7.1. beschrieben, ermittelt und sind in Abb. 30 zusammen mit den antiinflammatorischen Aktivitäten bei Stimulation mit LPS der Substitutions-Gruppe dargestellt.

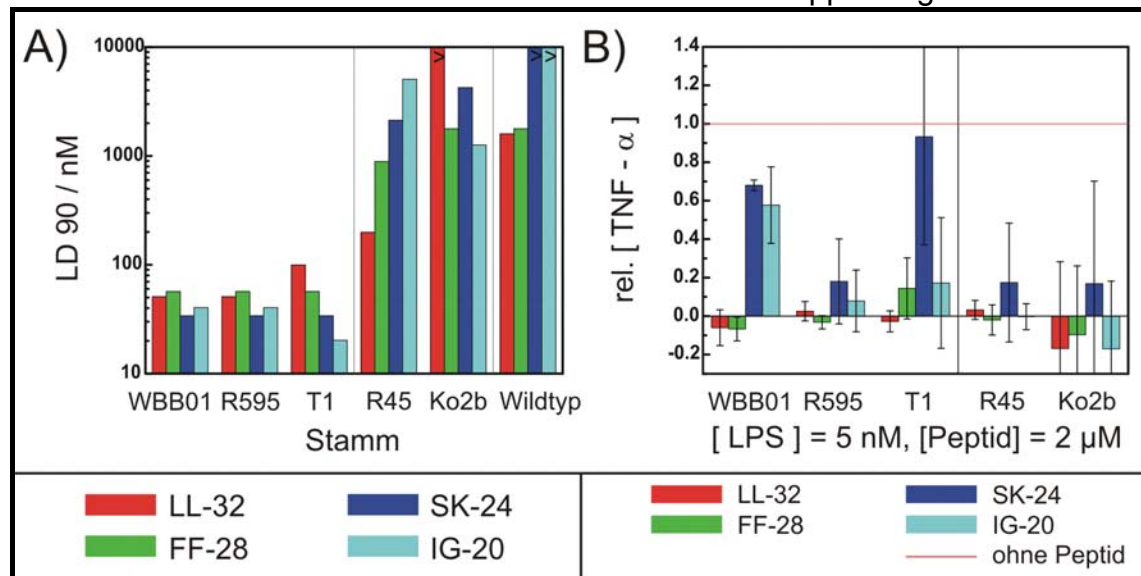


Abbildung 30: A) Antibakterielle Aktivität der Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“ gegen die Bakterienstämme der Substitutionsgruppe. Weitere Informationen sind unter 3.7.1. zu finden. Die dargestellten Werte stammen aus zwei Doppelmessungen.

B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „Basispeptide“ gegen die fünf Stämme der Substitutionsgruppe und einen *B. cepacia* Wildtypstamm. Weitere Informationen zu den Versuchen sind unter 3.7.2. beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit ihren Standardabweichungen als Fehler.

Das Peptid FF-28 besitzt gegen alle Stämme ohne Substitution am K(d)o eine starke antibakterielle Aktivität mit einer LD90 von knapp über 50 nM. Die LD90 beträgt für den Stamm R45 fast 900 nM und für den Stamm Ko2b und den Wildtyp das Doppelte. Der Einfluss der Substitutionen scheint ein ähnlicher wie bei rCap18<sub>106-137</sub> zu sein.

Die antibakterielle Aktivität von SK-24 ist anscheinend unabhängig von Substitutionen am Lipid A des LPS der Stämme WBB01, R595 und T1 und noch höher als die von FF-28. Bei den Stämmen R45 und Ko2b mit zusätzlicher Substitution am K(d)o ist die Aktivität jedoch höher, wenn die Anzahl an an das Lipid A gebundenen Substitutionen ebenfalls höher ist. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Der hemmende Einfluß durch Substitutionen am K(d)o des LPS der entsprechenden Stämme auf die Aktivität von SK-24 überwiegt jedoch deutlich den Einfluss der Substitutionen am Lipid A. Dieser Einfluss ist stärker als der entsprechende für FF-28.

IG-20 besitzt beim Stamm T1 mit 20 nM eine halb so niedrige LD90 als bei den Stämmen WBB01 und R595. Bei dem Stamm R45, welcher eine Substitution am Kdo besitzt, beträgt die LD90 5 µM. Gegen den Stamm Ko2b, der zusätzlich noch eine hohe Anzahl an Substitutionen am Lipid A besitzt, ist IG-20 mit einer LD90 von 1250 nM dagegen viermal aktiver. Anscheinend haben bei IG-20 die Substitutionen am Lipid A anders als bei allen bisher vorgestellten Peptiden einen aktivitätsfördernden Einfluss auf das Peptid. Der hemmende Einfluss der Substitution am K(d)o bleibt allerdings auch beim IG-20 bestehen.

Die Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“ besitzen insgesamt eine höhere antibakterielle Aktivität als LL-32 gegen die Stämme ohne Substitutionen am K(d)o. Auch der gegen LL-32 nahezu resistente Stamm Ko2b ist zumindest schwach sensitiv gegen die Fragmente dieser Gruppe. Insbesondere bei dem Peptid IG-20 sind die erwähnten Eigenheiten besonders stark ausgeprägt. Allerdings steigt mit zunehmender Kürze der Fragmente deren Aktivität gegen den Stamm T1. Gegen den *B. cepacia* Wildtyp besitzt FF-28 eine etwa gleich hohe Aktivität wie LL-32, die kürzeren Peptide sind hingegen inaktiv.

Wie aus Abb. 30 B) ersichtlich, kann FF-28 die TNF- $\alpha$  Ausschüttung von MNC nach Stimulation mit LPS der Substitutions-Gruppe fast immer vollständig unterdrücken, nur bei T1-LPS wird noch ungefähr 15% der Menge wie ohne Peptid ausgeschüttet. Allerdings ist der Fehler auch größer als 15%.

Das Peptid SK-24 bewirkt keine vollständige TNF- $\alpha$  Reduktion, aber bei LPS von den Stämmen R595 und den beiden Stämmen mit Substitution am K(d)o kann die Ausschüttung auf rund 20% reduziert werden, bei WBB01- und T1-LPS dagegen nur auf 70% bzw. 95%.

Das kurze Fragment IG-20 kann bei Stimulation durch LPS der Stämme mit Substitution am K(d)o die TNF- $\alpha$  Freisetzung vollständig unterbinden. Bei Stimulation durch LPS mit Substitutionen am K(d)o, welches von den Stämmen

R45 und T1 ausgeschüttet wird, kann IG-20 die TNF- $\alpha$  Freisetzung vollständig unterdrücken. Eine Restfreisetzung von ungefähr 60% bleibt bei Stimulation mit WBB01-LPS, 10% bei R595-LPS und 20% bei T1-LPS.

Es scheint so, als ob die antiinflammatorische Aktivität der Peptide stärker ist, wenn das stimulierende LPS Substitutionen am K(d)o hat. Ein einheitlicher Trend der Aktivität von der Anzahl an Substitutionen am Lipid A ist nicht zu erkennen.

Die Daten aus der FRET-Spektroskopie mit den Peptiden der Gruppe „N-terminale Deletion“ sind für alle verwendeten LPS in Abb. 31 präsentiert. Sie wurden wie in 3.8.5. beschrieben ermittelt.

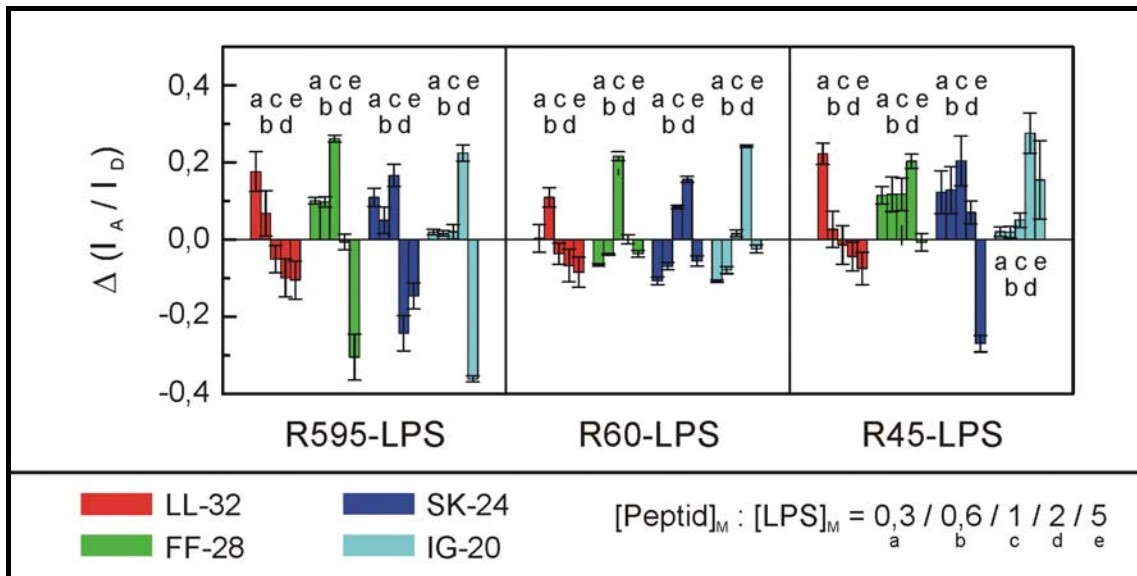


Abbildung 31: Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor und Donor ( $\Delta(I_A/I_D)$ ) in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS für die Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“. Bei den unter 3.8.5. beschriebenen spektroskopischen Versuchen wird durch insgesamt fünf Peptidzugaben („a“ bis „e“) das Verhältnis Peptid zu LPS erhöht. Die Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen als Fehler resultierend aus zwei Messungen.

In Abb. 31 sind die durch verschiedene Peptidzugaben („a“ bis „e“) verursachten Änderungen im Verhältnis von Akzeptor- zu Donorintensität ( $\Delta(I_A/I_D)$ ) von markierten Aggregaten aus R595- oder R60-LPS (4.1.) für die vier Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“ eingetragen.

Bei den Peptiden der Gruppe „N-terminale Deletion“ besitzt LL-32 die geringste Abhängigkeit von der LPS-Struktur. So unterscheiden sich die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte nur bei Zugabe „a“. Die drei anderen Peptide, FF-28, SK-24 und IG-20, zeigen ein deutlich unterschiedliches Verhalten an Aggregaten aus R595-LPS im Vergleich zu Aggregaten aus R60-LPS in Bezug auf die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte. FF-28 und SK-24 bewirken bei den Zugaben „a“, „b“ und „c“ auf R595-LPS-Aggregaten einen deutlich positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert, wobei Zugabe „c“ den höchsten Wert besitzt. Bei Aggregaten aus R60-LPS ist erst Zugabe „c“ positiv.

FF-28 bewirkt bei Zugabe „d“ sowohl im Fall von R595-LPS als auch von R60-LPS kaum eine Änderung, während SK-24 bei R60-LPS einen weiteren positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert besitzt und bei R595-LPS einen negativen Wert. IG-20 bewirkt noch eine Zugabe länger als FF-28 und SK-24 bei R595-LPS-Aggregaten einen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Wiederum ist der letzte positive Wert der größte. Bei Aggregaten aus R60-LPS zeigt IG-20 ein sehr ähnliches Verhalten wie SK-24. Bei Zugabe „e“ besitzen alle Peptide bei beiden LPS-Arten negative  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte. Bei FF-28, SK-24 und IG-20 sind die negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte bei R595-LPS-Aggregaten betragsmäßig am größten.

Bei den Aggregaten aus R45-LPS bewirkte nur das Peptid SK-24 bei der letzten Zugabe einen stark negativen Wert, FF-28 nur eine sehr kleine negative Änderung. Bei RK-20 waren alle Werte positiv. Bei FF-28 hat die Zugabe „c“ die größte Änderung bewirkt, bei SK-24 und RK-20 jeweils die Zugabe „d“.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Peptid FF-28 teilweise eine bessere Aktivität als LL-32 insbesondere gegen die *B. cepacia* Stämme besitzt. Auch das Peptid IG-20 besaß teilweise noch eine gute antibakterielle Aktivität. Der hemmende Einfluss der K(d)o-Substituenten schien insbesondere bei den kürzeren Peptiden dieser Gruppe geringer, wenn eine hohe Anzahl an Substituenten am Lipid A vorhanden ist. Die antiinflammatorischen Aktivitäten sind nur noch bei FF-28 sehr stark ausgeprägt. Gegen den Stamm R45 waren die antibakteriellen Aktivitäten nicht besonders gut ausgeprägt, aber gegen das R45-LPS besitzen die Peptide eine gute antiinflammatorische Eigenschaft.

#### Peptide der Gruppe „C-terminale Deletion“

Die für die Peptide LL-32 und LL-20 der Gruppe „N-terminale Deletion“ ermittelten antibakteriellen Aktivitäten gegen die sieben *S. minnesota*-Stämme der Glycostruktur-Gruppe werden in Abb. 32 zusammen mit ihren antiinflammatorischen Aktivitäten bei Stimulation mit R595- und R60-LPS-Aggregaten präsentiert. Die entsprechenden Daten für die Stämme der Substitutions-Gruppe und ihr LPS werden in Abb. 33 gezeigt. Anschließend wird in Abb. 34 die durch die Peptide ausgelösten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte dargestellt.

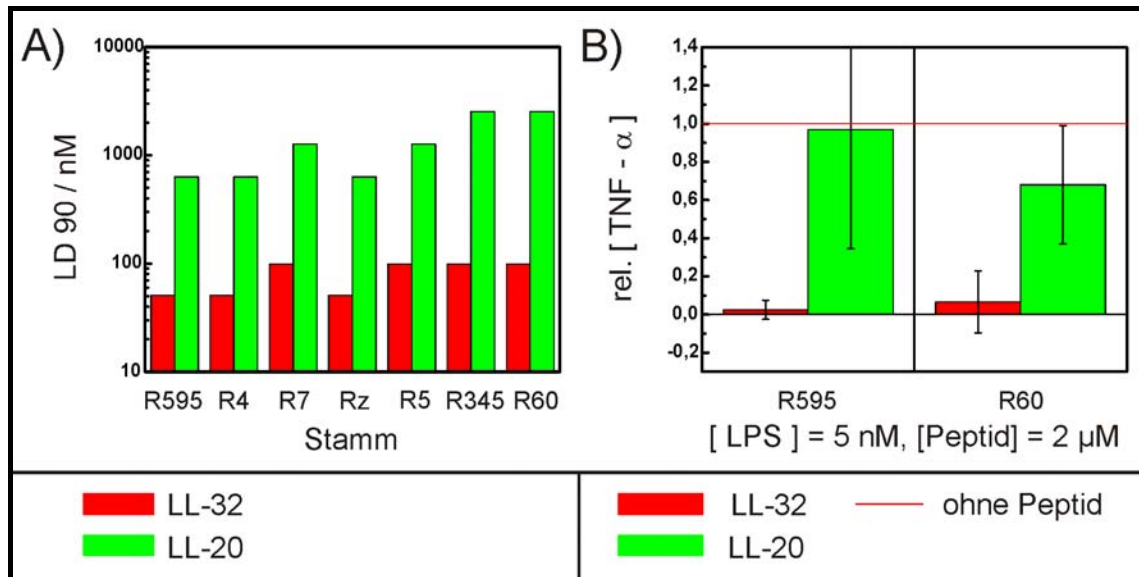


Abbildung 32: A) Antibakterielle Aktivität der Peptide LL-32 und LL-20 der Gruppe „C-terminale Deletion“ gegen die sieben Bakterienstämme der Glycostruktur-Gruppe.

B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „C-terminale Deletion“ auf die durch R595- und R60-LPS-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch MNC. Nach Vorinkubation des Peptids mit dem LPS wurden die MNC mit dem Gemisch stimuliert. Die Werte sind normiert worden auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch reine LPS-Aggregate.

Aus den ermittelten antibakteriellen Aktivitäten gegen die Stämme der Glycostruktur-Gruppe ergibt sich, dass LL-20 ungefähr um den Faktor 10 schwächer wirkt als LL-32. Außerdem scheint LL-20 mit zunehmender Länge der Kernregion zunehmend inaktiver (allerdings kein signifikanter Unterschied) zu werden, wobei negative Ladungen in der Glycostruktur wie bei Rz, R345 und R60 die Aktivität erhöhen. Wie an R345 und R60 zu sehen ist, scheint aber der Einfluss der Länge stärker zu sein. Gerade bei den Stämmen R345 und R60 wird eine hohe Konzentration benötigt, um die Bakterien abzutöten.

Eine antiinflammatorischen Aktivität von LL-20 ist nicht oder nur sehr schwach vorhanden (Abb. 32 B). So wird durch einen 400 fachen Peptidüberschuss bei R595-LPS-Aggregaten fast keine Änderung in der TNF- $\alpha$  Ausschüttung im Vergleich zur Messung mit reinen R595-LPS-Aggregaten stimulierten MNC bewirkt. Bei R60-LPS dagegen wird die Ausschüttung zumindest um ca. 40% reduziert.

Die für die Peptide LL-32 und LL-20 bestimmten LD90-Werte gegen Stämme der Substitutions-Gruppe wurden zusammen mit den antiinflammatorischen Aktivitäten bei Stimulation mit deren LPS in Abb. 33 dargestellt. Die Versuche wurden in 3.7.1. und 3.7.3. ausführlich beschrieben.

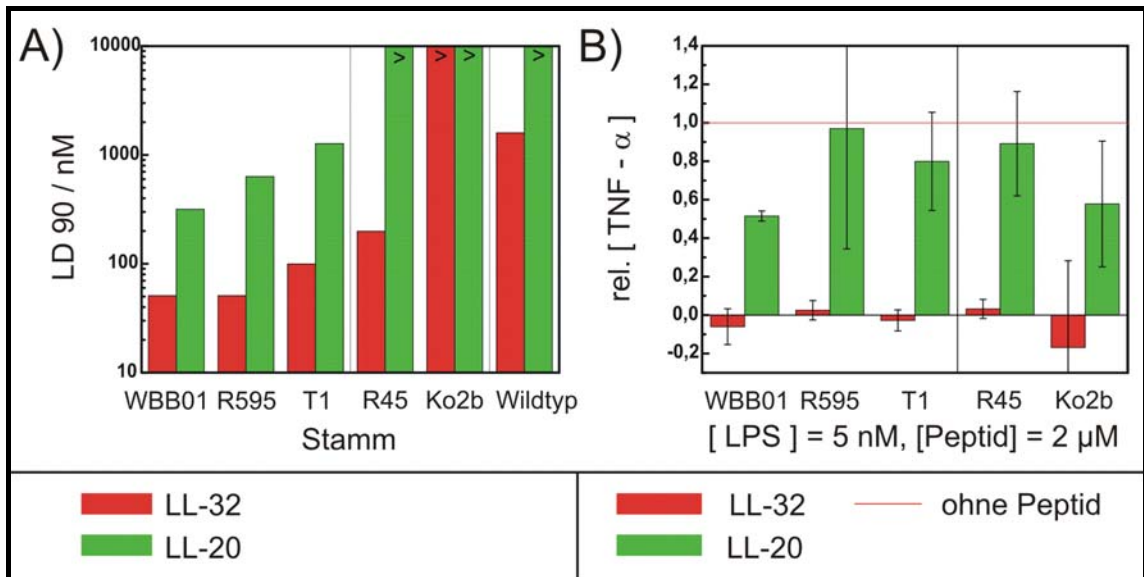


Abbildung 33: A) Antibakterielle Aktivität der Peptide LL-32 und LL-20 aus der Gruppe „C-terminale Deletion“ gegen die Stämme der Substitutionsgruppe und gegen einen *B. cepacia* Wildtypstamm. Informationen zum Versuchsablauf sind unter 3.7.1. zu finden. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen. B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „C-terminale Deletion“. Informationen zu den Versuchen sind unter 3.7.3. beschrieben. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit ihren Standardabweichungen als Fehler.

Das Peptid LL-20 besitzt bei den Stämmen ohne Substitution am K(d)o eine Aktivität mit einer LD90 von knapp über 300 nM für WBB01, 625 nM für R595 und 1300 nM. Die Stämme R45 und Ko2b mit Substitution am K(d)o des von ihnen gebildeten LPS sind weitestgehend resistent gegen LL-20, ebenso der Wildtypstamm. LL-20 wirkt grundsätzlich deutlich schlechter als LL-32, unterliegt aber dem gleichen Einfluss der Substitutionen wie LL-32. Deren Einfluss bei gleichzeitigem Vorhandensein von Substitutionen am K(d)o ist so stark, dass keine antibakterielle Aktivität mehr festgestellt werden konnte. Insgesamt ist die Aktivität von LL-20 in Bezug auf LL-32 in allen Belangen einer medizinischen Nutzung schlechter.

Das Peptid LL-20 besitzt keine ausgeprägte antiinflammatorische Eigenschaft. Bei keinem LPS ist die relative TNF- $\alpha$  Konzentration unter 50%.

Die durch die Peptide erzeugten  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte sind in Abb. 34 dargestellt und die Versuchsdurchführung in 3.8.5. beschrieben. Eine Interpretation der Daten ist in 4.1. dargestellt.



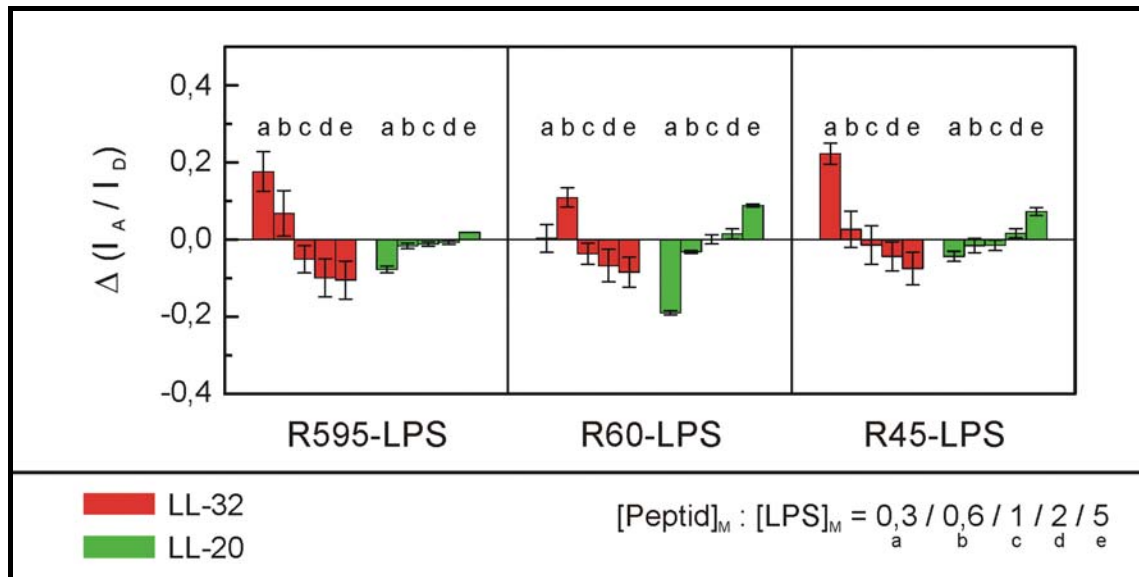


Abbildung 34: Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor und Donor  $\Delta(I_A/I_D)$  in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS für die Peptide der Gruppe „C-terminale Deletion“. Die beschriebenen Experimente wurden unter 3.8.5. beschrieben. Die Werte mit ihren Fehler sind Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Messreihen.

Die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte für LL-20 werden nach jeder Zugabe zu R595-LPS-Aggregaten größer. Dabei bewirken die ersten vier Zugaben noch negative Werte, erst die vierte Zugabe hat einen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Auch an R60-Aggregaten bewirkt LL-20 einen immer größer werdenden  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert, wobei aber schon die dritte Zugabe keinen negativen Wert mehr besitzt. Die kleineren  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte sind im Bereich der Verdünnungskontrolle (Abb. 21). Bei Zugabe auf R45-LPS-Aggregate waren die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert leicht positiver. So waren die negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte betragsmäßig kleiner und die positiven größer. Insgesamt sind die von LL-20 ausgelösten Änderungen im Falle von R60-LPS-Aggregaten am geringsten, die an R45-LPS-Aggregaten am größten.

Alles in allem ist LL-20 deutlich weniger aktiv bis inaktiv und bewirkt auch bei den Fluorophormarkierten LPS-Aggregaten die geringsten Änderungen.

Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“

Für die Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ wurde die antibakterielle Aktivität gegen die Stämme der Glycostruktur-Gruppe und die antiinflammatorische Aktivität bei Stimulation durch R595- und R60-LPS-Aggregate ermittelt und in Abb. 35 dargestellt. Die Versuche wurden wie unter 3.7.1. und 3.7.3. beschrieben durchgeführt. In Abb. 36 sind die entsprechenden Daten für die Stämme der Substitutions-Gruppe und ihrer LPS aufgetragen. Die Daten der FRET-Spektroskopie für die Peptide dieser Gruppe sind in Abb. 37 präsentiert.



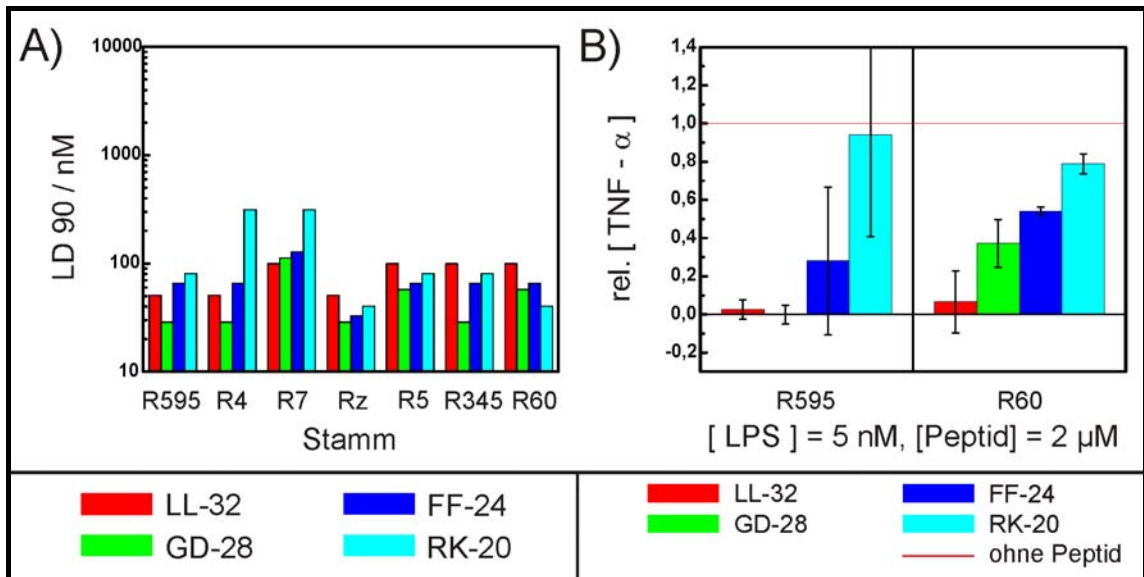


Abbildung 35: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ gegen die *S. minnesota* Stämme der Glycostruktur-Gruppe. Informationen zum Versuchsablauf sind unter 3.7.1. beschrieben.

B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“. Informationen zu den Versuchen sind unter 3.7.3. beschrieben.

Die Peptide GD-28, FF-24 und RK-20 besitzen eine starke bis normale antibakterielle Aktivität. Im Vergleich zu LL-32 und den anderen bisher vorgestellten antibakteriellen Aktivitäten besitzen die Peptide dieser Gruppe bei LPS mit einer langen Glycostruktur und/oder Ladungen in der Kernregion (Rz, R345, R60) eine bessere Aktivität. GD-28 scheint gegen fast alle getesteten Stämme eine stärkere Wirkung als LL-32 zu besitzen. Die Aktivität von FF-24 ist ähnlich wie die von LL-32, allerdings ist FF-24 leicht aktiver als LL-32 gegen Stämme deren LPS eine lange Glycostruktur oder eine Glycostruktur mit Netto-Ladung hat. RK-20 besitzt nur eine normale Aktivität gegen R4 und R7, wirkt aber insbesondere stark gegen die Stämme Rz und R60.

GD-28 inhibiert die TNF- $\alpha$  Ausschüttung durch R595-LPS stimulierte MNC vollständig, bei R60-LPS immerhin noch auf ungefähr ein Drittel. FF-24 inhibiert bei weitem nicht so gut, so wird die TNF- $\alpha$  Konzentration bei R595-LPS auf 28%, die durch R60-LPS verursachte auf 54% reduziert. Allerdings ist der Fehler gerade bei R595-LPS groß. RK-20 kann fast keine Inhibierung der sowohl durch R595- als auch durch R60-LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Ausschüttung bewirken. Insgesamt lässt sich sagen, dass mit zunehmender Deletion des N- und C-Terminus von LL-32 die antiinflammatorische Aktivität deutlich nachlässt.

In der folgenden Abbildung sind die Daten zur antibakteriellen Aktivität gegen die Stämme der Substitutions-Gruppe und die antiinflammatorische Aktivität bei

Stimulation mit ihren LPS dargestellt. Sie wurden wie in 3.7.1. und 3.7.3. beschrieben ermittelt.

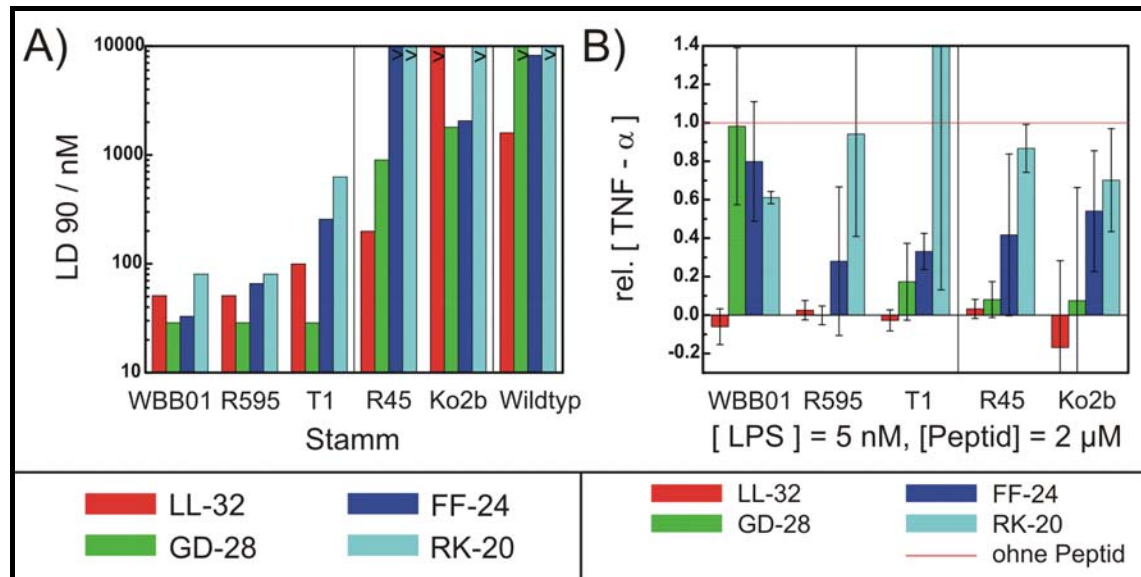


Abbildung 36: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ gegen die Stämme der Substitutionsgruppe und einen *B. cepacia* Wildtypstamm. Weiter Informationen sind unter 3.7.1. zu finden. Die Werte resultieren aus zwei Doppelbestimmungen. B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“. Informationen zu den Versuchen sind unter 3.7.3. beschrieben. Aus drei unabhängigen Versuchen wurde der Mittelwert und seine Standardabweichung berechnet und als Wert mit zugehörigem Fehler verwendet.

Die LD90 von GD-28 gegen die Stämme WBB01, R595 und T1 beträgt 30 nM, gegen den Stamm R45 900 nM und gegen den Stamm Ko2b 1800 nM. Der *B. cepacia* Wildtyp ist nahezu resistent gegen GD-28. Auch bei diesem Peptid ist erst der den LD90-Wert erhöhende Einfluss der Substitutionen am Lipid A zu beobachten, wenn auch Substitutionen am K(d)o vorhanden sind.

Das Peptid FF-24 hat mit 65 nM einen doppelt so hohen LD90-Wert gegen den Stamm R595 als gegen den Stamm WBB01. Gegen den Stamm T1 ist die Aktivität mit einer LD90 von etwa 260 nM schon deutlich geringer. Gegen den Stamm T1 ist GD-28 antibakteriell inaktiv, gegen den Stamm Ko2b mit einer LD90 von 8,2 μM allerdings noch schwach aktiv. Bei diesem Fragment ist ein hemmender Einfluss auf die Aktivität durch Substitutionen am Lipid A des LPS der jeweiligen Bakterienstämme zu erkennen. Bei Vorhandensein von Substitutionen am K(d)o scheinen die Lipid A Substitutionen jedoch einen entgegen gerichteten Einfluss zu besitzen.

Gegen die Stämme WBB01 und R595 besitzt RK-20 eine starke Aktivität mit einer LD90 von ungefähr 80 nM. Gegen den Stamm T1 ist die LD90 mit ca. 630 nM deutlich höher. Bei den Stämmen mit Substitution am K(d)o ist das Peptid inaktiv, genauso wie gegen den Wildtyp-Stamm von *B. cepacia*. Bei RK-20 scheint sich ein inaktivierender Effekt erst ab einer gewissen Anzahl an Substitutionen am Lipid A einzustellen, der dann allerdings auch recht

gravierend war. Durch Substitutionen am K(d)o wird RK-20 unwirksam gegen die jeweiligen Bakterien.

Nur das Peptid GD-28 zeigt insgesamt eine teilweise verbesserte Aktivität gegenüber LL-32, allerdings ist es gegen den *B. cepacia* Wildtypstamm inaktiv.

Das Peptid GD-28 besitzt bei Stimulation von MNC durch WBB01-LPS keine antiinflammatorische Aktivität, wohingegen bei Stimulation durch R595-LPS die TNF- $\alpha$  Freisetzung komplett verhindert wird. Bei T1-LPS beträgt die Reduktion 85%. Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  von MNC nach Stimulation durch LPS mit Substitutionen am K(d)o wird dagegen auf unter 10% reduziert.

FF-24 besitzt bei keinem LPS eine ausgeprägte antiinflammatorische Aktivität. Die relative TNF- $\alpha$  Konzentration betrug bei WBB01-LPS 80%, bei R595-LPS 28% und 33% bei T1-LPS. Auch bei LPS von den Stämmen R45 und Ko2b wurde die Freisetzung nur auf 40% und 50% reduziert.

RK-20 besitzt eine noch schlechtere antiinflammatorische Aktivität als FF-24 und kann die relative TNF- $\alpha$  Konzentration bei keinem Peptid auf unter 0,6 senken. Eventuell wird die Aktivität durch eine hohe Anzahl an Substitutionen am Lipid A reduziert. Bei Stimulation mit T1-LPS wurde eine proinflammatorische Wirkung festgestellt, da die relative TNF- $\alpha$  Konzentration 1,4 betrug. Der Fehler betrug allerdings 1,3.

Die von den Peptiden der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ hervorgerufenen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte sind wie in 4.1. beschrieben bestimmt worden und in Abb. 37 dargestellt.

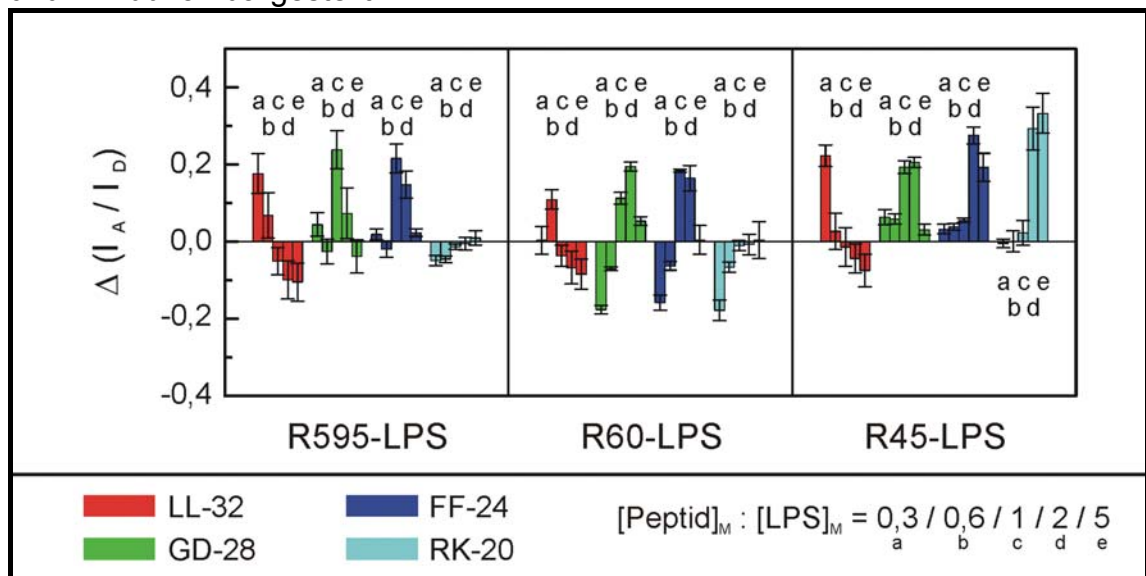


Abbildung 37: Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor und Donor  $\Delta(I_A/I_D)$  in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS für die Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ und für R595- und R60-LPS. Die unter 3.8.5. beschriebenen Experimente wurden wie unter 4.1. beschrieben ausgewertet und zusammengefasst. Die Werte mit ihren Fehler sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

In der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ zeigen GD-28 und FF-24 ein ähnliches Verhalten, welches sich vom LL-32 Verhalten unterscheidet. Während bei Aggregaten aus R595-LPS die ersten beiden Zugaben schwankende  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte erzeugen, sind die zur Zugabe „c“ und „d“ gehörigen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte positiv. GD-28 erzeugte bei Zugabe „e“ im Gegensatz zu FF-24 einen negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Die Zugaben „a“ und „b“ der beiden Peptide auf R60-LPS-Aggregate bewirkten negative Werte, die vom Betrag kleiner wurden. Die nächsten Zugaben bewirkten dann positive Werte bis auf die FF-24 Zugabe „e“, die kaum eine Änderung erzeugte. Die Wirkung von RK-20 auf Aggregate aus R595-LPS ähnelt der von LL-20, wobei RK-20 ab Zugabe „d“ einen leicht positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert bewirkt. Die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte gegen R595-LPS sind ähnlich wie die der Verdünnungskontrolle (Abb. 21). Bei Zugabe zu Aggregaten aus R60-LPS sind die Werte ähnlich, aber insbesondere die ersten beiden Zugaben erzeugen betragsmäßig höhere Werte. Die Peptidzugaben zu R45-LPS bewirkten durchgehend positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte, bis auf Zugabe „a“ von RK-20, der aber vom Betrag kleiner als die der Verdünnungskontrolle war. Die größten Änderungen entstanden bei Zugabe „d“ (bei RK-20 Zugabe „e“).

Insgesamt sind die Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ mit abnehmender Länge auch weniger aktiver gegen Bakterien und besitzen eine abnehmende antiinflammatorische Aktivität. RK-20 ist nahezu inaktiv. Die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte sind bei Verwendung von R45-LPS alle positiv. Das Peptid GD-28 besitzt eine gute, zu LL-32 teilweise verbesserte, antibakterielle Aktivität und mäßige antiinflammatorische Eigenschaften.

### Peptide der Gruppe „Interne Deletion“

Die antibakterielle Aktivität der Peptide der Gruppe „Interne Deletion“ gegen die Stämme der Glycostruktur-Gruppe und antiinflammatorische Wirkung bei Stimulation mit deren LPS wurden wie in 3.7.1. und 3.7.3. beschrieben ermittelt und die Ergebnisse in Abb. 38 präsentiert. Die auf gleiche Weise ermittelten Daten für die Stämme, bzw. das LPS der Substitutions-Gruppe sind in Abb. 39 dargestellt. Die Ergebnisse der FRET-Spektroskopie für die Peptide dieser Gruppe sind in Abb. 40 präsentiert.

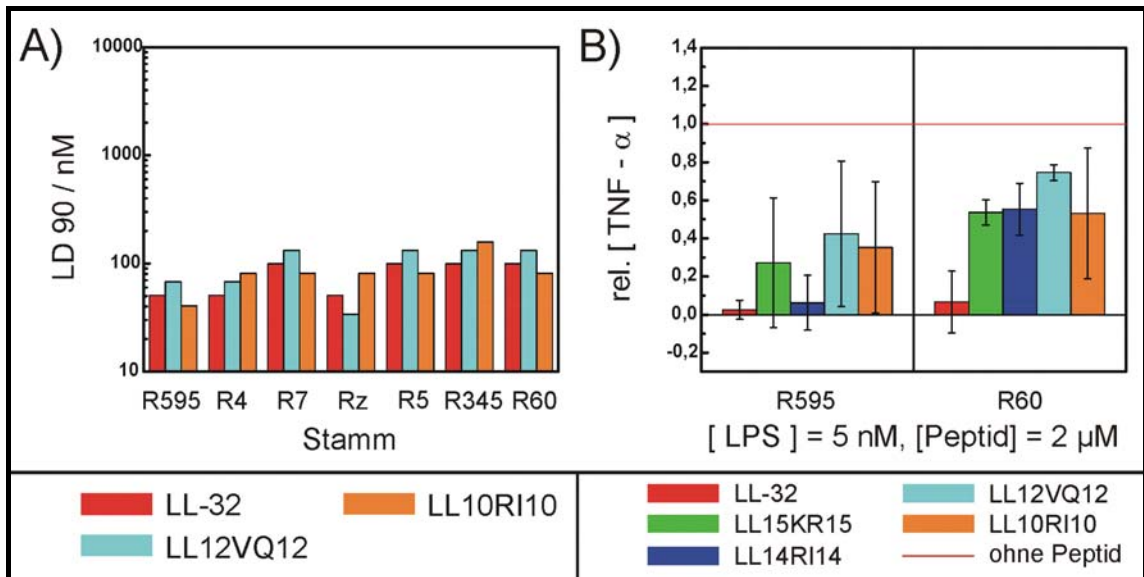


Abbildung 38: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „interne Deletion“ gegen die Stämme der Glycostruktur-Gruppe. Die LD<sub>90</sub> wurde als Maß für die Aktivität verwendet. Die Versuchsdurchführung ist in 3.7.1. beschrieben.

B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „interne Deletion“. Die Inhibition der TNF- $\alpha$  Freisetzung durch MNC nach Stimulation mit vorinkubierten R595- und R60-LPS-Peptid-Gemischen wurde auf die TNF- $\alpha$  Freisetzung nach Stimulation mit reinen R595- oder R60-LPS-Aggregaten normiert. Informationen zum Versuch sind in 3.7.3. dargestellt.

Das Peptid LL12VQ12 zeigt ein ähnliches Verhalten wie LL-32 in Hinblick auf die Abhängigkeit von der LPS-Glycostruktur. Bei allen Stämmen außer Rz besitzt LL12VQ12 eine leicht erhöhte LD<sub>90</sub> gegenüber LL-32. Nur bei Rz wirkt LL12VQ12 leicht stärker. Insgesamt besitzt LL12VQ12 eine starke Aktivität gegen die getesteten Stämme. Das Peptid LL10RI10 besitzt ebenfalls gegen alle getesteten Stämme eine starke Aktivität. Die Abhängigkeit von der LPS-Struktur scheint eine andere zu sein als bei LL-32. So bewirken Ladungen in der LPS-Glycostruktur (Rz, R345, R60) anscheinend keine Verbesserung der Wirkung, auch scheint der Einfluss der Länge der Glycostruktur kaum einen Einfluss zu haben. Gegen die Stämme R345 und R595 besitzt LL10RI10 eine andere Aktivität als gegen die anderen Stämme. Diese beträgt aber nur eine Verdünnungsstufe, wird also im Allgemeinen als nicht-signifikant bewertet.

Als Maß für die antiinflammatorischen Aktivitäten wurde die Fähigkeit der Peptide verwendet, die TNF- $\alpha$  Produktion von LPS-aktivierten MNC zu reduzieren. Das Peptid LL14RI14 ist bei Aktivierung durch R595-LPS in der Lage, die TNF- $\alpha$  Ausschüttung auf unter 10% zu reduzieren, die anderen Peptid LL15KR15, LL12VQ12 und LL10RI10 dagegen reduzieren die Ausschüttung nur auf 27%, 42% bzw. 35%. Im Fall von Aktivierung durch R60-LPS konnte kein Peptid die Ausschüttung um mehr als 50% senken. LL12VQ12 besitzt die geringste Aktivität.

Die antibakterielle Aktivität gegen Bakterienstämme der Substitutions-Gruppe ist zusammen mit der antiinflammatorischen Aktivität bei Stimulation mit deren LPS wie in 3.7.1. und 3.7.3. beschrieben ermittelt worden und in Abb. 39 dargestellt.

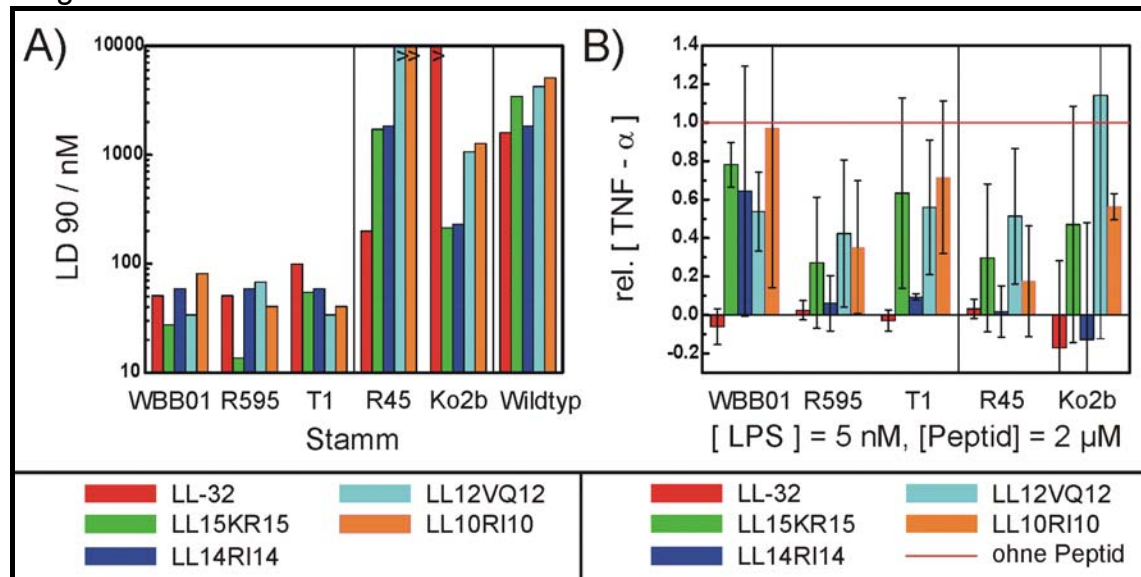


Abbildung 39: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „interne Deletion“ gegen die Tiefrauhmutantenstämme der Substitutionsgruppe und einem Wildtypstamm der Spezies *B. cepacia*. Weitere Informationen sind unter 3.7.1. zu finden. Die dargestellten Werte stammen aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen. B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „interne Deletion“. Die Versuche wurden unter 3.7.3. beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit ihren Standardabweichungen als Fehler.

Das Peptid LL15KR15 besitzt gegen die Stämme WBB01, R595 und T1 eine starke Aktivität mit LD<sub>90</sub>-Werten von 27 µM, 14 µM und 55 nM. Es ist gegen beide Stämme mit Substitutionen am K(d)o aktiv mit LD-90 Werten von 1,7 µM für T1 und 210 nM für Ko2b. Gegen den Wildtypstamm ist LL15KR15 halb so aktiv wie gegen T1. Wie bei LL-32 hemmen auch bei LL15KR15 die Substitutionen am K(d)o des LPS stark die Aktivität, der Einfluss von den Substitutionen am Lipid A ist aber ein anderer als bei LL-32.

LL14RI14 besitzt gegen die Stämme ohne Substitutionen am Lipid A, WBB01, R595 und T1, eine LD<sub>90</sub> von 60 nM. Gegen die Stämme T1 und Ko2b ist es ähnlich aktiv wie LL15KR15. Gegen den *B. cepacia* Wildtyp besitzt es die gleichen LD<sub>90</sub> wie gegen den Stamm T1. Die Substitutionen am Lipid A haben alleine keinen Einfluss auf die antibakterielle Aktivität von LL14RI14, sie verringern anscheinend aber den stark inaktivierenden Einfluss der Substitutionen am K(d)o.

Das Fragment LL12VQ12 besitzt gegen den Stamm WBB01 eine LD<sub>90</sub> von 35 nM, gegen R595 eine LD<sub>90</sub> von 70 nM und gegen T1 eine LD<sub>90</sub> von 35 nM. Das Peptid wirkt gegen den Stamm R45 kaum noch, die LD<sub>90</sub> betrug 17 µM. Gegen den Stamm Ko2b zeigt LL12VQ12 noch eine Aktivität mit einer LD<sub>90</sub>



von 1  $\mu\text{M}$ . Damit ist bei LL12VQ12 der Einfluss der Substitutionen am Lipid A des LPS auf die Aktivität gegen die entsprechenden Stämme ein anderer als bei LL-32. Substitutionen am K(d)o hemmen die Aktivität von den beiden Peptiden.

LL10RI10 besitzt gegen die Stämme WBB01, R595 und T1 eine starke Aktivität mit LD90-Werten von 80 nM, 40 nM und 40 nM. Die LD90 gegen den Stamm R45 lag knapp über 10  $\mu\text{M}$ , gegen Ko2b betrug die LD90 1  $\mu\text{M}$ . Der *B. cepacia* Wildtyp besaß eine LD90 von 4  $\mu\text{M}$ . Das kurze Peptid scheint durch eine hohe Anzahl an Substitutionen am Lipid A eine stärkere Aktivität zu entwickeln. Der die Aktivität mindernde Einfluss der Substitutionen am K(d)o überwiegt aber auch bei diesem Peptid.

Insgesamt zeigen die Fragmente der Gruppe „interne Deletion“ teilweise eine im Vergleich zu LL-32 verbesserte antibakterielle Aktivität. Allerdings bei gleichzeitiger Verschlechterung der Wirkung gegen den Stamm R45. Bei den Peptide LL15KR15 und LL12VQ12 liegt eine andere Abhängigkeit der Aktivität gegen Stämme, die LPS mit Substitutionen am Lipid A exprimieren vor, als bei den anderen Peptiden dieser Gruppe.

Die relative TNF- $\alpha$  Konzentration, welche nach 5 Stunden Stimulation mit Peptid aus der Gruppe „interne Deletion“ versetzten LPS-Aggregaten im Vergleich zur Stimulation mit reinen LPS-Aggregaten von  $10^6$  MNC ausgeschüttet wurde, ist in Abb. 39 B) dargestellt.

Das Peptid LL15KR15 besitzt gegen kein LPS eine starke antiinflammatorische Aktivität. Die relative TNF- $\alpha$  Konzentration betragen bei Stimulation mit WBB01-LPS 78%, mit R595-LPS 27% und mit T1-LPS 63%. Auch bei Stimulation mit LL15KR15-versetztem LPS der Stämme mit K(d)o-Substitution wird die Zytokinkonzentration nur auf 30% bzw. 47% der TNF- $\alpha$  Konzentration bei Stimulation mit reinem R45- bzw. Ko2b-LPS reduziert. Es ist keine direkte Abhängigkeit von den Substitutionen zu erkennen. Insgesamt besitzt das Peptid nur eine sehr mäßige antiinflammatorische Aktivität.

LL14RI14 kann die durch LPS hervorgerufenen TNF- $\alpha$  Ausschüttung von MNC bei allen getesteten LPS außer bei WBB01-LPS nahezu vollständig unterdrücken. Bei WBB01-LPS wird die TNF- $\alpha$  Produktion durch das Peptid auf 64% gesenkt, bei R595-LPS auf 6% und bei T1-LPS auf 9%. Die Zytokinproduktion, ausgelöst durch LPS, kann von dem Peptid LL14KR14 bei R45-LPS auf 2% gesenkt werden und bei Ko2b-LPS vollständig.

Das Fragment LL12VQ12 ist bei keinem LPS in der Lage, die durch Stimulation von MNC freigesetzte TNF- $\alpha$  Konzentration maßgeblich zu reduzieren. Durch die Stimulation mit Peptid-versetzten LPS-Aggregaten wird im Vergleich zur Stimulation ohne Peptid bei WBB01-LPS 54%, bei R595-LPS 42%, bei T1-LPS 56% und bei R45-LPS 51%. Bei Ko2b-LPS wirkt es mit 114% sogar leicht proinflammatorisch.

LL10RI10 kann bei R595- und R45-LPS die TNF- $\alpha$  Produktion auf immerhin 35% bzw. 18% zu reduzieren. Die TNF- $\alpha$  Produktion wird bei Stimulation mit

WBB01-LPS auf 97%, bei T1-LPS auf 72% und bei Ko2b-LPS auf 56% durch das Peptid reduziert.

Die Messergebnisse aus der FRET-Spektroskopie sind in Abb. 40 dargestellt. Sie wurden wie in 3.8.5. beschrieben bestimmt. Die Bedeutung der Werte wurde in 4.1. erläutert.

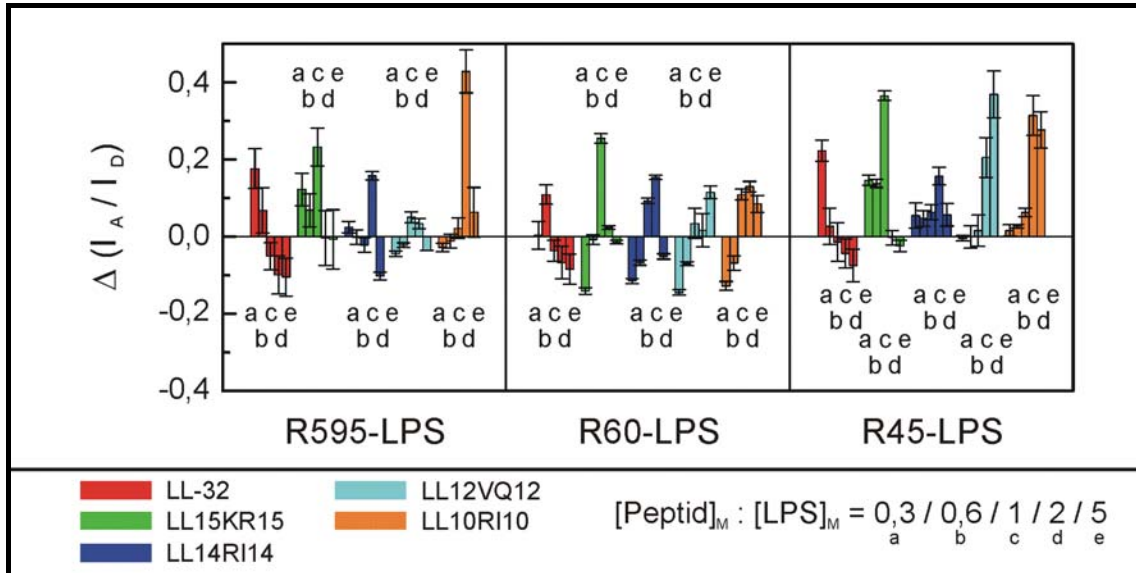


Abbildung 40: Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor und Donor  $\Delta(I_A/I_D)$  in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS für die Peptide der Gruppe „interne Deletion“. Die unter 3.8.5. beschriebenen Experimente wurden wie unter 4.1. beschrieben ausgewertet und zusammengefasst.

Bei dieser Gruppe ergeben sich die bisher stärksten Unterschiede bei den  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werten. LL15KR15 bewirkt bei R595-LPS-Aggregaten bis zu einem Peptid zu LPS Verhältnis von 1 eine positive Änderung, bei den weiteren Zugaben kaum noch eine Änderung. Bei Aggregaten aus R60-LPS bewirkt erst die dritte Zugabe einen deutlich positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. LL14RI14 zeigt bei R595-LPS-Aggregaten bei Zugabe „a“ bereits einen leicht positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert, bei Zugabe „d“ einen deutlich positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. Bei Aggregaten aus R60-LPS bewirken die ersten beiden Zugaben einen deutlich negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert, Zugabe „c“ und „d“ aber einen relativ großen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert. LL12VQ12 bewirkt bei R595-LPS-Aggregaten insgesamt nur relativ kleine Änderungen, wobei die durch die Zugaben „a“, „b“ und „e“ negativ sind, die anderen beiden positiv. Bei Aggregaten aus R60-LPS sind die Änderungen größer. Auch hier ist Zugabe „c“ die erste, die einen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert verursacht. Die weiteren Zugaben bewirkten weiterhin positive Werte. LL10RI10 weist einen sehr großen positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert bei Zugabe „d“ auf. Die vorherigen Zugaben bewirkten nur kleine Änderungen, wobei die dritte bereits leicht positiv war. Bei den R45-Aggregaten bewirkte nur Zugabe „d“ und „e“ von LL15KR15 einen sehr geringen negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert und die Zugabe „a“ und „b“ von LL12VQ12. Diese lagen allerdings alle im Bereich der reinen



Verdünnungswerte (Abb. 21). Die größten positiven Werte wurden bei LL15KR15 durch Zugabe „c“, bei LL14RI14 durch „d“, bei LL12VQ12 durch „e“ und bei LL10RI10 durch Zugabe „d“ erzeugt.

Das Peptid bewirkt an R60-LPS-Aggregaten ein Verhalten, welches umgekehrt zu dem von LL-32 an R595-LPS-Aggregaten ist. Die ersten beiden Zugaben bewirkten eine geringer werdende negative Änderung des Quotienten aus den Intensitäten der Fluorophore, die folgenden allesamt eine ausgeprägte positive Änderung. Die  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte bei Zugabe der Peptide auf R45-LPS-Aggregate waren deutlich positiver als die bei Zugabe auf Aggregate aus R595- oder R60-LPS.

Insgesamt besitzen die Peptide dieser Gruppe ein divergenteres Verhalten als die Peptide der anderen Gruppen. Dabei zeigt besonders das Peptid LL15KR15 ein anderes Verhalten. LL14RI14 ist dagegen relativ vergleichbar mit LL-32 oder anderen Peptiden wie GD-28.

#### Peptide der Gruppe „Interne Substitution“

Zum Abschluss werden die antibakteriellen und antiinflammatorischen Aktivitäten der Peptide der Gruppe „Interne Substitution“ präsentiert. In Abb. 41 sind die Aktivitäten gegen die Stämme der Glycostruktur-Gruppe, bzw. deren LPS dargestellt, in Abb. 42 entsprechend gegen die der Substitutions-Gruppe. Die Versuche sind in 3.7.1. und 3.7.3. beschrieben. Anschließend werden die wie in 3.8.5. beschrieben ermittelten Daten aus der FRET-Spektroskopie in Abb. 43 aufgetragen.

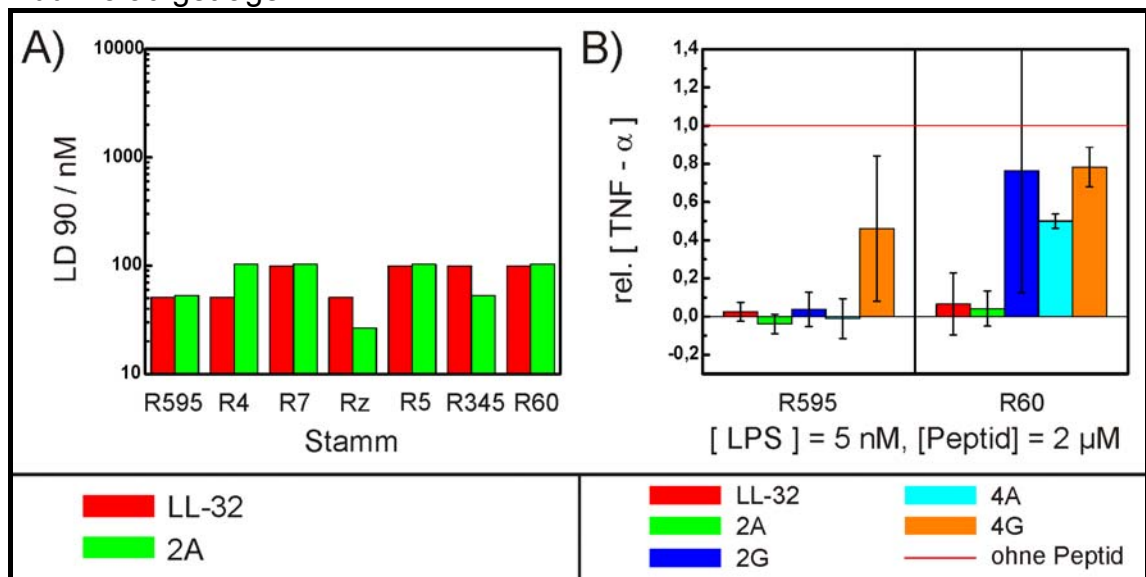


Abbildung 41: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „interne Substitution“ gegen die *S. minnesota* Stämme der Glycostruktur-Gruppe. Weitere Informationen sind unter 3.7.1. zu finden. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen.

B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „interne Substitution“. Weitere Informationen zu den Versuchen sind unter 3.7.3. beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit ihrer Standardabweichung als Fehler.

Das Peptid 2A besitzt eine sehr ähnliche antibakterielle Aktivität wie LL-32, nur bei den Stämmen Rz und R345 wurden nicht-signifikante Unterschiede festgestellt. 2A besitzt starke antibakterielle Eigenschaften. Da insgesamt sehr viele Aktivitäten bestimmt wurden, wurden nur die antibakteriellen Aktivitäten von 2A und LL-32 bestimmt.

Die Peptide 2A, 2G und 4A besitzen eine ähnlich starke antiinflammatorische Aktivität bei R595-LPS-Stimulation wie LL-32. Das Peptid 4G besitzt eine schwache Aktivität und kann die TNF- $\alpha$  Konzentration nur auf 46% reduzieren. Bei Stimulation durch R60-LPS ist lediglich das Peptid 2A in der Lage die TNF- $\alpha$  Konzentration sehr deutlich auf 4% zu reduzieren. 4A besitzt von den übrigen Peptiden noch die stärkere Aktivität und kann die TNF- $\alpha$  Ausschüttung auf 50% reduzieren, während 2G sie auf 76% und 4G auf 78% reduziert.

Die für die Stämme der Substitutions-Gruppe ermittelten antibakteriellen Aktivitäten sind zusammen mit den antiinflammatorischen Aktivitäten bei Stimulation mit deren LPS in Abb. 42 dargestellt. Sie wurden wie in 3.7.1. und 3.7.3. beschrieben bestimmt.

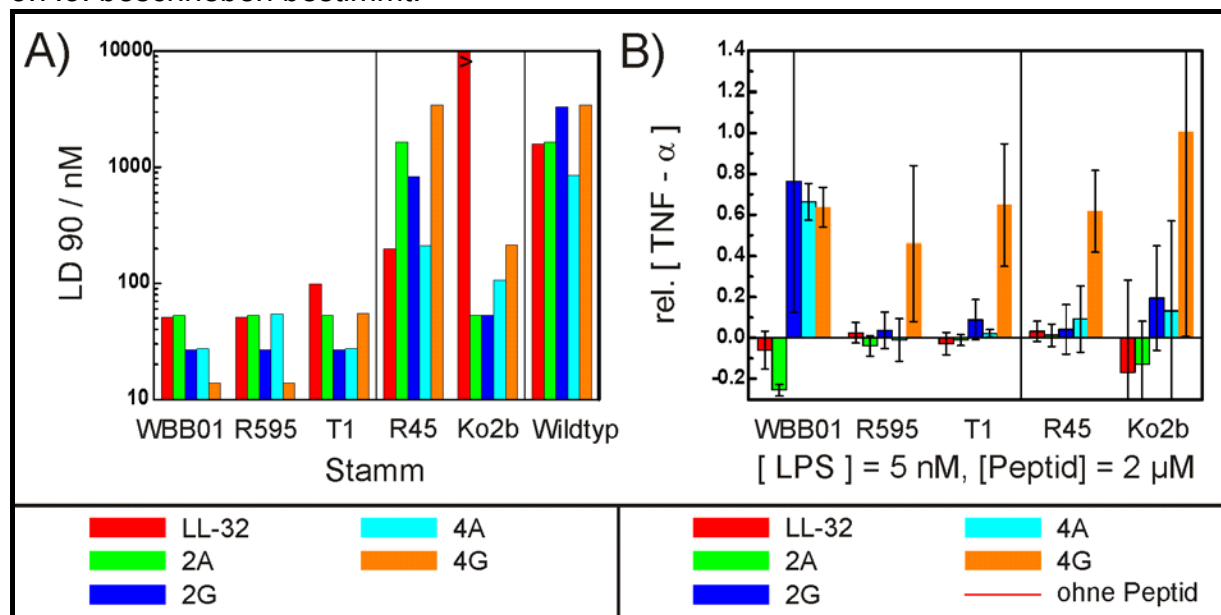


Abbildung 42: A) Antibakterielle Aktivität der Fragmente der Gruppe „interne Substitution“ gegen die verschiedenen Stämme der Substitutionsgruppe und gegen einen *B. cepacia* Wildtyp. Die Versuchsdurchführung wurde in 3.7.1. beschrieben. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen.

B) Antiinflammatorische Aktivität der Peptide der Gruppe „interne Substitution“. Weitere Informationen zu den Versuchen in 3.7.3. angegeben. Die Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen als Fehler resultierend aus drei unabhängigen Messungen.

Das Peptid 2A besitzt gegen alle Stämm ohne Substitution am K(d)o eine starke Aktivität mit einer LD90 von 50 nM. Gegen beide Stämme mit Substitution am K(d)o war das Peptid ebenfalls aktiv, die LD90 gegen R45

betrug 1,6  $\mu\text{M}$ , die gegen Ko2b nur 50 nM entsprechend den LD90-Werten für die Stämme ohne K(d)o-Substitution. Gegen den *B. cepacia* Wildtypstamm lag die LD90 noch unterhalb von 1  $\mu\text{M}$ . Die Aktivität vom Peptid 2A scheint keinem Einfluss von Substitutionen am Lipid A zu unterliegen. Der aktivitätsmindernde Einfluss der Substitution am K(d)o wird teilweise wieder durch eine hohe Anzahl an Substitutionen am Lipid A aufgehoben.

Das Peptid 2G ist gegen die Stämme WBB01 und T1 antibakteriell aktiver als LL-32. Gegen den Stamm R595 ergaben sich uneinheitliche Werte. Gegen den Stamm R45 lag die LD90 bei unter 1  $\mu\text{M}$ , gegen Ko2b war das Peptid sogar stark aktiv mit einer LD90 von nur 50 nM. Das Peptid zeigt ein ähnliches Verhalten wie 2A, besitzt aber eine noch bessere antibakterielle Aktivität.

4A besaß gegen die Stämme WBB01, R595 und T1 eine höhere oder ähnliche Aktivität wie LL-32 mit LD90-Werten von 25 nM, 50 nM und 25 nM. Gegen die Stämme R45 und Ko2b wies die LD90 sehr geringe Werte von ca. 210 nM bzw. 105 nM auf.

Das Peptid 4A besitzt die besten antibakteriellen Aktivitäten der getesteten LL-32 Fragmente. Die Aktivität wird durch Substitutionen am K(d)o gemindert, eine zusätzlich vorhandene hohe Anzahl an Substitutionen am Lipid A verringert diesen Effekt.

Das Peptid 4G besaß gegen die Stämme WBB01, R595 und T1 LD90-Werte von nur 14 nM, 14 nM und 55 nM. Gegen die Stämme R45 und K02b betragen sie 3,5  $\mu\text{M}$  und ca. 210 nM. Gegen den Wildtyp besaß 4G eine LD90 von 3,5  $\mu\text{M}$ . Erst ab einer hohen Anzahl, wie beim T1-LPS, bewirken Substitutionen am Lipid A einen aktivitätsmindernden Einfluss auf das Peptid. Der die Aktivität verringernder Einfluss der Substitutionen am K(d)o wird durch eine hohe Anzahl an Lipid A Substitutionen teilweise reduziert. Insgesamt besitzt 4G eine gegenüber LL-32 verbesserte Aktivität. Gegen die Stämme mit Substitution am K(d)o ist sie aber geringer aktiv als die von den Peptiden 2A, 2G und 4A.

Das Peptid 2A der Gruppe „interne Substitution“ kann die TNF- $\alpha$  Freisetzung von MNC nach Stimulation von allen getesteten LPS vollständig unterdrücken.

2G ist nur bei WBB01-LPS mit einer relativen TNF- $\alpha$  Konzentration von 76% nicht in der Lage die Zytokin Ausschüttung wirksam zu unterbinden. Bei R595-, T1- und R45- und Ko2b-LPS ist die Reduktion auf 4%, 9%, 4% bzw. 19% sehr stark.

Das Derivat 4A besitzt recht ähnliche antiinflammatorische Eigenschaften in Bezug auf die getesteten LPS. Es ist auch bei WBB01-LPS mit einer durch das Peptid reduzierten TNF- $\alpha$  Konzentration auf 66% schwach aktiv, während es bei den anderen eine starke Aktivität besitzt. Bei R595- und T1-LPS Stimulation kann es die TNF- $\alpha$  Produktion nahezu vollständig verhindern, bei Stimulation mit LPS von Stämmen mit K(d)o-Substitution hingegen nur sehr stark auf 9% bei R45-LPS und auf 13% bei Ko2b-LPS reduzieren.

Das Peptid 4G ist bei keinem LPS in der Lage die TNF- $\alpha$  Produktion wirksam zu unterbinden. Es kann die Produktion bei Stimulation mit WBB01-LPS auf

64%, bei R595-LPS auf 46%, bei T1-LPS auf 65% und bei R45-LPS auf 62% reduzieren. Bei Ko2b-LPS bewirkt es gar keine Änderung der von den MNC produzierten Menge an TNF- $\alpha$ .

Ein direkter Einfluss der Substitutionen am LPS ist auch bei dieser Gruppe nicht zu sehen, allerdings sind die meisten Peptide dieser Gruppe besonders gegen das keine Substitutionen besitzende LPS vom Stamm WBB01 besonders inaktiv. Der Austausch von nur zwei Aminosäuren vom LL-32 zum 2G bewirkt, im Gegensatz zum Peptid 2A, eine sehr starke Reduzierung der antiinflammatorischen Aktivität gegen WBB01-LPS. Der Austausch von vier Aminosäuren des LL-32, die zum Peptid 4G führen, bewirkt eine starke Minderung der antiinflammatorischen Aktivität. Beim Peptid 4A betrifft dies fast nur die Aktivität gegen WBB01-LPS und ein wenig die Aktivität gegen LPS mit Substitution am K(d)o.

In Abb. 43 sind die durch verschiedene Peptidzugaben („a“ bis „e“) verursachten Änderungen im Verhältnis von Akzeptor- zu Donorintensität  $\Delta(I_A/I_D)$  von markierten LPS-Aggregaten (4.1.) für die Peptide der Gruppe „interne Substitution“ eingetragen.

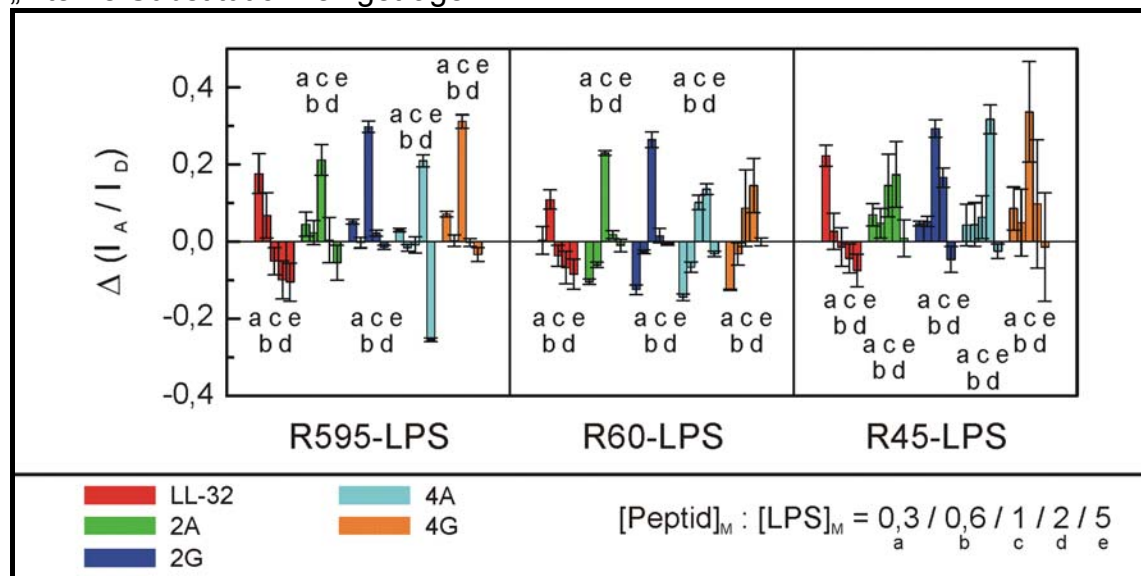


Abbildung 43: Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor und Donor  $\Delta(I_A/I_D)$  in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses von Peptid zu LPS für die Peptide der Gruppe „interne Substitution“. Die unter 3.8.5. beschriebenen Experimente wurden wie unter 4.1. beschrieben ausgewertet und zusammengefasst. Die Werte mit ihren Fehler sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Doppelbestimmung.

Die Peptide der Gruppe „interne Substitution“ 2A, 2G, 4A und 4G bewirken fast ausschließlich positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte bei R595-LPS-Aggregaten bis auf die Zugaben „e“. Bei 4A bewirken auch die Zugaben „b“ und „c“ eine sehr schwache negative Änderung des  $(I_A/I_D)$ -Wertes. Alle vier Peptide besitzen bei der dritten Zugabe einen hohen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert.

Bei der Interaktion mit Aggregaten aus R60-LPS zeigen die Peptide 2A, 2G, 4A und 4G ein ähnliches Verhalten, welches unterschiedlich zu dem von LL-32 ist. Die vier Peptide zeigen erst ab der dritten Zugabe, ab der ein 1 : 1 Verhältnis von Peptid zu LPS herrscht, eine positive ( $I_A/I_D$ )-Änderung. Der Betrag des negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werts nach der Zugabe „b“ war für alle Peptide jeweils geringer als bei Zugabe „a“. Die Zugabe „d“ bewirkte bei den Peptiden 2A und 2G einen geringeren positiven  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert als bei den Peptiden 4A und 4G. Der  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert der letzten Zugabe war bei allen Peptiden leicht negativ oder fast Null.

An R45-LPS-Aggregaten bewirken die Peptide der Gruppe „interne Substitution“ bis auf die Zugaben „e“ durchweg positive  $\Delta(I_A/I_D)$ -Werte. Bei den Peptiden mit dem die  $\alpha$ -Helix flexibilisierende Aminosäure Glycin (G) sind die Änderungen betragsmäßig größer als bei den Peptiden mit den die  $\alpha$ -Helix stabilisierende Alanin (A).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Peptide mit Aminosäuresubstitution sehr starke antibakterielle Eigenschaften besitzen, allerdings bis auf 2A auch eine schwächere antiinflammatorische Aktivität. Die Zytotoxizität ist relativ hoch, wobei die beiden Peptide mit Alaninsubstitution höhere Werte als die mit Glycinsubstitution besitzen.

#### Zytotoxische Aktivität

Der prozentuale Anteil an durch LL-32 und seine Fragmente lysierten Erythrozyten wurden wie in 3.7.2. beschrieben für unterschiedliche Peptidkonzentration ermittelt. Er wird als Maß für die zytotoxische Aktivität des jeweiligen Peptids verwendet und wird nach Peptidgruppen (Tab. 1) getrennt im Folgenden vorgestellt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit ihren Standardabweichungen als Fehler. Zur deutlicheren Darstellung wurden die Werte mit einer sogenannten „Spline“-Kurve angefügt.

Die ermittelten zytotoxischen Aktivitäten der Peptide der Basisgruppe, LL-32, LL-37 und rCAP18<sub>106-137</sub>, sind in Abb. 44 zusammen mit denen für die Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“, LL-32, FF-28, SK-24 und IG-20, dargestellt. Dazu wurde der prozentuale Anteil an lysierten Zellen über der eingesetzten Peptidkonzentration aufgetragen.

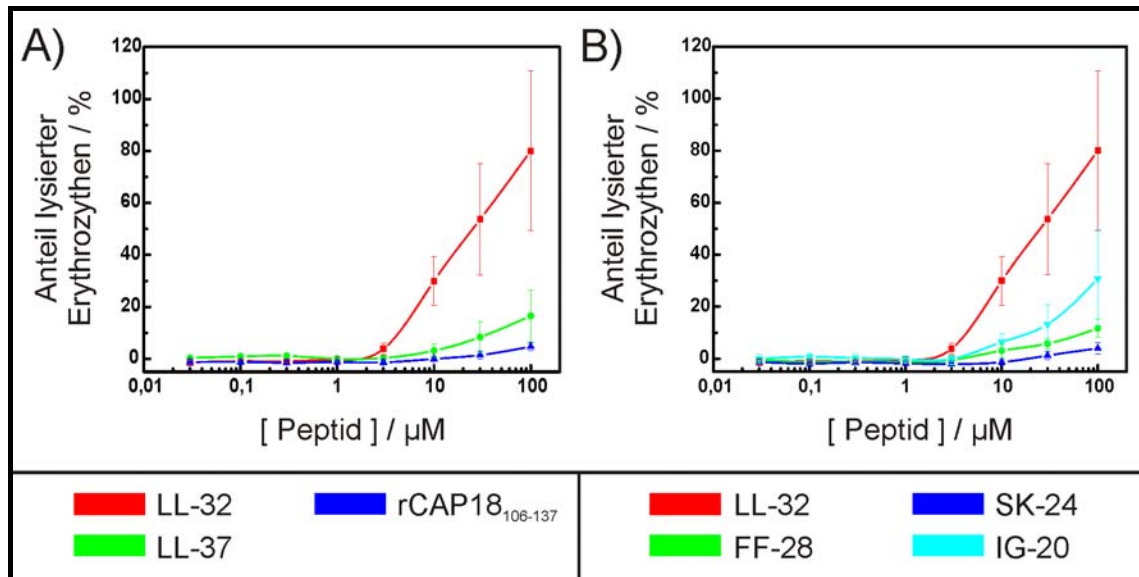


Abbildung 44: Zytotoxische Aktivität von Peptiden der Basisgruppe (A) und der Gruppe „N-terminale Deletion“. Der prozentuale Anteil der lysierten Erythrozyten wurde mit verschiedenen Peptidkonzentrationen gegen  $10^8$  Zellen in 100 µl PBS wie unter 3.7.2. beschrieben ermittelt. Als Ausgleichskurve wurde eine „Spline“-Kurve gewählt.

Bis zu einer Konzentration von 3 µM hat keines der drei Basisgruppen-Peptide Erythrozyten lysiert. Bei höheren Konzentrationen lysieren alle drei Peptide Erythrozyten, jedoch LL-32 wesentlich stärker als LL-37 oder rCAP18<sub>106-137</sub>. Bei 100 µM lysiert LL-32 80% der Zellen, LL-37 16% und rCAP18<sub>106-137</sub> 5%.

Auch die Peptide der Gruppe „N-terminale Deletion“ lysieren die Erythrozyten bis zu einer Konzentration von 3 µM nicht. Bei höheren Konzentrationen lysieren die Peptide die Erythrozyten in unterschiedlich starkem Maße, wobei IG-20 eine stärkere zytotoxische Aktivität als FF-28 besitzt. SK-24 ist das Peptid dieser Gruppe mit der geringsten Zytotoxizität. Bei einer Peptidkonzentration von 100 µM lysiert LL-32 80% der Zellen, FF-28 12%, SK-24 4% und IG-20 31%.

Die C-terminalen Aminosäuren von LL-37 bewirken anscheinend eine hemmende Wirkung für die Aktivität gegen Erythrozyten, ebenso die 9. bis 12. Aminosäure von LL-32. Die ersten acht dagegen bewirken anscheinend eine erhöhte Zytotoxizität von LL-32.

In Abb. 45 A) sind die für die Peptide LL-32 und LL-20 der Gruppe „C-terminale Deletion“ ermittelten zytotoxischen Aktivitäten dargestellt, in B) die für die Peptide der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ LL32, GD-28, FF-24 und RK-20.

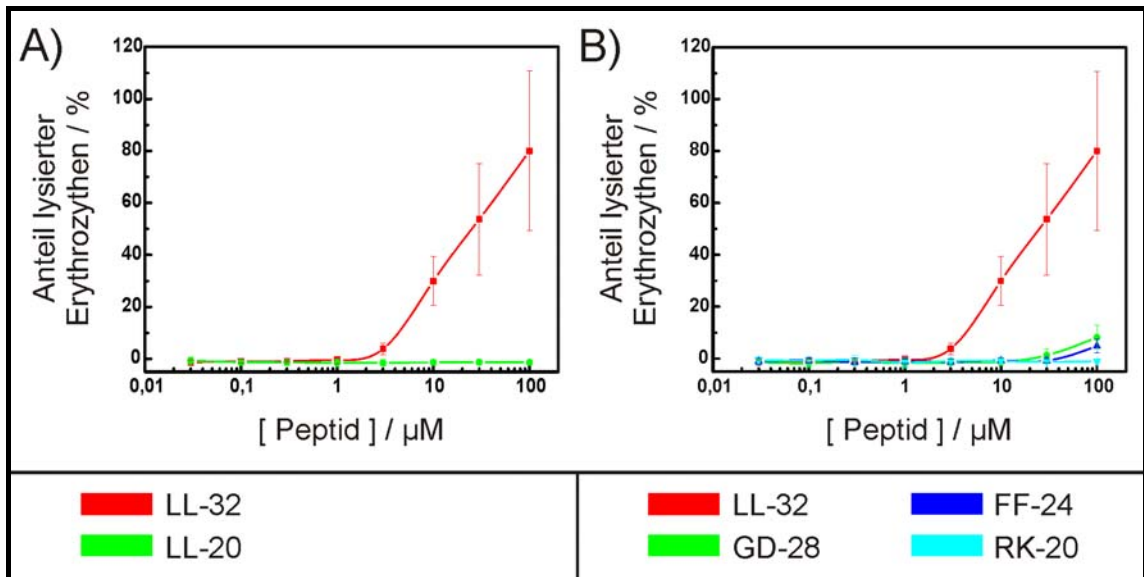


Abbildung 45: Zytotoxische Aktivität der Peptide LL-32 und LL-20 der Gruppe „C-terminale Deletion“ (A) und von Peptiden der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ (B). Der Anteil der lysierten Erythrozyten wurde wie unter 3.7.2. beschrieben ermittelt.

Im Gegensatz zu den bisher untersuchten zytotoxischen Aktivitäten bewirkt das Peptid LL-20 auch bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine Lyse der Erythrozyten.

Auch in der Gruppe „N- und C-terminalen Deletion“ besitzt LL-32 die höchste zytotoxische Aktivität. Während bei LL-32 ab 3  $\mu\text{M}$  die Erythrozyten zu lysieren beginnen, findet dies bei GD-28 und FF-24 erst bei der zehnfachen Konzentration statt. LL-32 lysiert bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  80% der Zellen, GD-28 8% und FF-24 3%. RK-20 zeigt genauso wie LL-20 (Abb. 45 A) keinerlei zytotoxische Aktivität.

Sowohl die Deletion um 12 Aminosäuren vom C-Terminus als auch die gemeinsame Deletion von 12 Aminosäuren von N- und C-Terminus führt zu einem nicht zytotoxischen Peptid. Da die Deletion der vier endständigen Aminosäuren die Aktivität ähnlich stark verringert wie die Deletion der ersten vier Aminosäuren, scheinen insbesondere die beiden N-terminalen Aminosäuren für die starke zytotoxische Aktivität von LL-32 eine essentielle Rolle zu spielen.

Die für die Peptide der Gruppe „interne Deletion“ gemessenen zytotoxischen Aktivitäten wurden in Abb. 46 A) über der logarithmisch skalierten Peptidkonzentration aufgetragen, die der Gruppe „interne Substitution“ in B).



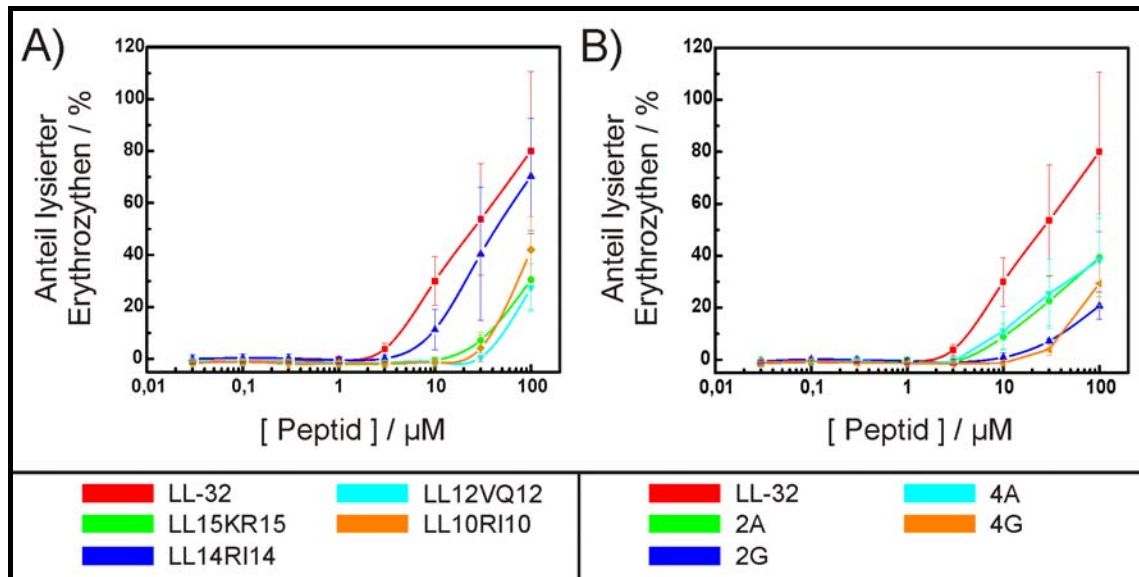


Abbildung 46: A) Zytotoxische Aktivität der Peptide der Gruppe „interne Deletion“ und der Gruppe „interne Substitution“. Der prozentuale Anteil an Erythrozyten, die durch verschiedene Peptidkonzentrationen lysiert wurden, wurde wie unter 3.7.2. beschrieben mit  $10^8$  Zellen in 100 µl PBS durchgeführt.

Auch die Peptide dieser Gruppe besitzen wie alle zuvor getesteten eine geringere zytotoxische Aktivität als LL-32. LL14RI14 zeigt die bisher höchste Lyseaktivität aller Fragmente, die bereits bei 3 µM einsetzt, während LL15KR15, LL12VQ12 und LL10RI10 erst ab 30µM beginnen Erythrozyten zu lysieren.

Auch bei den zur Gruppe „interne Substitution“ gehörenden Peptiden besitzt keins eine stärkere zytotoxische Aktivität als LL-32. Die Peptide 2A und 4A besitzen eine sehr ähnliche zytotoxische Aktivität und sind in der Lage bei einer Peptidkonzentration von 100 µM 40% der Zellen zu lysieren. Die Peptide 2G und 4G besitzen ebenfalls sehr ähnliche Kurvenverläufe und lysieren bei 100 µM ein Viertel der Zellen.

Wie an den Daten für die Peptide LL15KR15 und den mit Substitution zu erkennen ist, ist die Bedeutung einer definierten  $\alpha$ -Helix für die zytotoxische Aktivität geringer als die einzelner Aminosäuren, wie durch die Daten von GD-28 gut veranschaulicht wird.

#### 4.3.1.2. Das hydrophobe Moment von LL-32 und den Fragmenten

Um die biologischen Befunde durch physikalische Größen deuten zu können, wurden die hydrophoben Momente der Peptide wurden wie in 3.8.6. beschrieben mit einem Programm (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel>) ermittelt und sind ihrer Größe nach sortiert in der folgenden Tabelle angegeben.



Peptid	Hydrophobes Moment kJ / mol	Peptid	Hydrophobes Moment kJ / mol
LL-37	59,41	rCAP18 <sub>106-137</sub>	45,43
2G	53,63	FF-24	41,70
LL-32	53,21	LL12VQ12	39,31
2A	52,75	SK-24	38,48
GD-28	50,24	IG-20	33,49
LL14RI14	48,23	LL-20	33,33
FF-28	47,52	RK-20	33,20
4A	46,85	LL10RI10	26,92
4G	46,56	LL15KR15	2,68

Tabelle 5: Hydrophobe Momente in kJ / mol der LL-32 Fragmente sortiert nach ihrer Größe. Die Momente wurden wie in 3.8.6. beschrieben mit einem frei verfügbaren Programm bestimmt. Für die Peptidbezeichnung siehe Tab. 1.

Auffällig ist, dass LL15KR15 ein sehr geringes hydrophobes Moment besitzt. Dies ist dadurch erklärbar, dass durch die Deletion von 2 Aminosäuren das N-terminale Ende um 200° gegenüber dem C-Terminus verdreht ist. Damit befinden sich die hydrophoben Aminosäuren nicht mehr auf derselben Seite des Peptids und demzufolge sinkt das hydrophobe Moment auf nahezu Null. Die Fragmente mit 20 Aminosäuren besitzen ebenfalls relativ geringe Momente. Die Fragmente mit 24 Aminosäuren sind die Gruppe mit den nächst niedrigeren Momenten. Zwischen Peptiden mit 28 oder 32 Aminosäuren gibt es nicht so eine klare Trennung nach den hydrophoben Momenten.

#### 4.3.1.3. Zeta-Potential und Größe von LPS-Aggregaten in Abhängigkeit von LL-32 und LL-20

Die Wirkung von LL-32 auf ein Membranmodell aus verschiedenen LPS wurde mit physikalischen Größen beschrieben. Dazu wurde das Zeta-Potential und die Größe von LPS-Aggregaten in Abhängigkeit der LL-32 Konzentration bestimmt. An einigen LPS wurde auch das Fragment LL-20 getestet.

#### Zeta-Potential von Aggregaten aus LPS der Glycostrukturreihe in Abhängigkeit von LL-32 und Aggregaten aus R595- und R60-LPS in Abhängigkeit von LL-20

Zur Ermittlung des Einflusses der LPS-Glycostruktur auf die Bindung von LL-32 an LPS wurde das Zeta-Potential von Aggregaten aus LPS der Glycostrukturreihe in Abhängigkeit von LL-32 gemessen. Zusätzlich wurde das Zeta-Potential von R595- und R60-LPS-Aggregaten in Abhängigkeit der LL-20 Konzentration bestimmt. Aus Vergleich mit den LL-32 Daten lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungsbeziehung des Peptids ziehen.

Beide Messreihen wurden unter den Standardbedingungen gemessen (3.8.1.) und die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen mit ihren Standardabweichungen als Fehler. Die Werte wurden mit einer sigmoidalen Kurve angefitet.

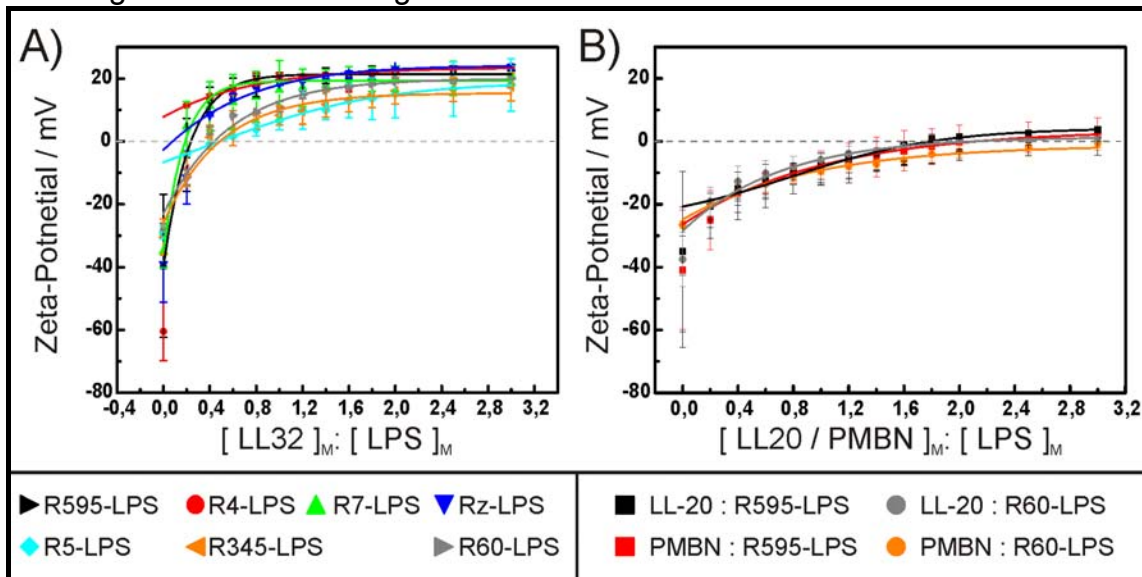


Abbildung 47: A) Änderung des Zeta-Potentials von Aggregaten aus LPS der Glycostrukturreihe in Abhängigkeit der LL-32 Konzentration. Gemessen wurde unter den Standardbedingungen (3.8.1.). Die präsentierten Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen als Fehler aus zwei unabhängigen Messreihen. B) Einfluss von LL-20 auf das Zeta-Potential von Aggregaten aus R595- und R60-LPS. Es wurde unter den Standardbedingungen (3.8.1.) gearbeitet. Die Werte sind ebenfalls Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen. Zum Vergleich sind die Werte von PMBN gegen R595- und R60-LPS (Abb. 22 B) eingetragen.

Der Verlauf des Zeta-Potentials in Abhängigkeit von LL-32 ähnelt prinzipiell dem Verlauf in Abhängigkeit von PMB (Abb. 22 A). Die Überkompensation des Zeta-Potentials ist jedoch bei LL-32 bedeutend größer und wird spätestens ab einem Verhältnis von LL-32 zu LPS von 0,4 erreicht. Damit ist insbesondere der anfängliche Anstieg der sigmoidalen Kurve noch stärker. Die Kurven von R345-, R60- und R5-LPS besitzen insbesondere im Anfangsbereich eine geringere Steigung und liegen unterhalb der anderen Kurven.

Die Sättigungswerte betragen für die verwendeten LPS 21,4 mV (R595), 23,5 mV (R4), 19,2 mV (R7), 24,2 mV (Rz), 19,0 mV (R5), 15,3 mV (R345), und 19,9 mV (R60). Auffallend ist, dass die sigmoidalen Bindungskurven nicht so gut passend sind, wie bei den PMB-Daten. Insbesondere die Datenpunkte zu  $LL32 : LPS = 0$  passen nicht in den Fit. Bei der R5-LPS-Kurve musste der Punkt sogar für den Fit weggelassen werden und auch der Fit für R4-LPS passiert den großen Fehlerbereich des Anfangswerts nicht einmal.

In Abb. 47 B) ist das Zeta-Potential von R595- und R60-LPS-Aggregaten über dem molaren Konzentrationsverhältnis von LL-20 zu LPS aufgetragen. Der

Kurvenverlauf ähnelt dem von den Messungen mit PMBN und DTPPB insbesondere bei Aggregaten aus R595-LPS. Diese Werte von PMBN sind zum Vergleich mit in den Graphen eingetragen. Bei den Messungen von LL-20 wurden folgende Sättigungswerte erreicht: 4,2 mV für R595-LPS und 1,5 mV für Aggregate aus R60-LPS; bei den Messungen mit PMBN wurden 3,8 mV für R595- und -1,2 mV für R60-LPS-Aggregate erreicht, bei den mit DTPPB 1,6 mV für R595-LPS und -2,2 mV für R60-LPS.

#### Aggregatgrößen von LPS der Glycostrukturgruppe in Abhängigkeit der LL-32 und LL-20 Konzentration

Um den Einfluss der Glycostruktur auf die Wirkung von LL-32 auf LPS-Aggregate zu untersuchen, wurde von Aggregaten, welche aus LPS der Glycostruktur-Gruppe bestanden, die Größe in Abhängigkeit der molaren LL-32 zu LPS Konzentration gemessen. Die Proben von der Bestimmung des Zeta-Potentials von Aggregaten aus Glycostruktur-Gruppen-LPS in Abhängigkeit der LL-32 Konzentrationen wurden hierzu verwendet. Wie bei allen Zeta-Potential- und Größenbestimmungen an LPS-Aggregaten wurde in einem Puffer mit 10 mM TRIS, 2 mM CsCl, pH = 7 und bei 25°C gemessen. Die präsentierten Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen von zwei unabhängig präparierten Proben. Die Mittelwerte wurden mit Geraden zur besseren Sichtbarkeit verbunden.

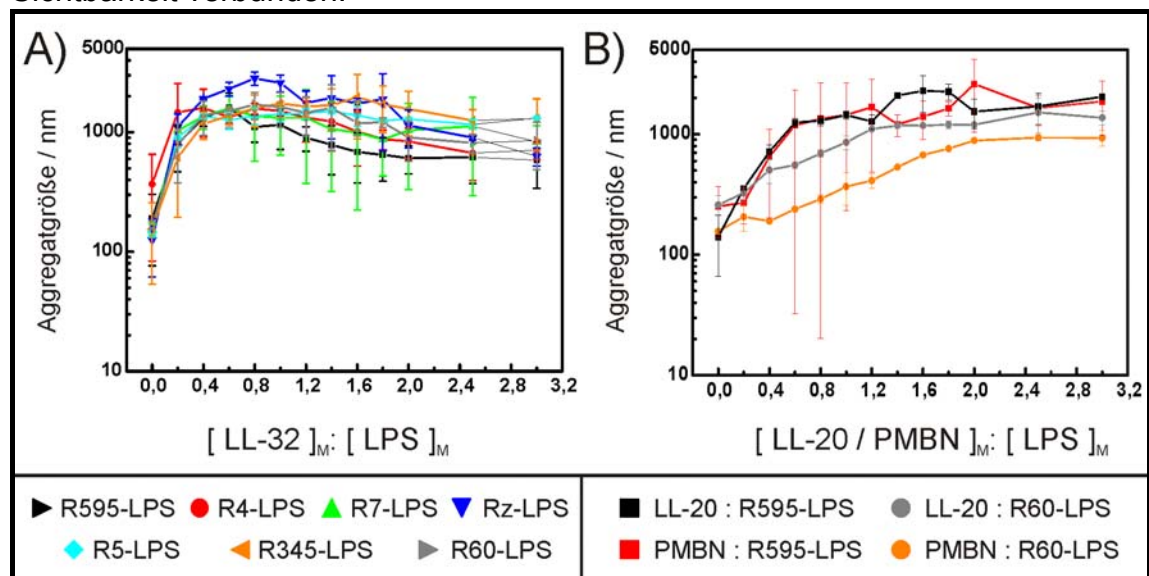


Abbildung 48: Abhängigkeit der Größe der Aggregate aus LPS der Glycosstrukturreihe von dem molaren Konzentrationsverhältnis von A) LL-32 und b) LL-20 oder PMBN mit logarithmischer Abszisse. Die Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen als Fehler. Gemessen wurde an denselben Proben die für die Zeta-Potential-Messungen in Abb. 27 verwendet wurden.

Die Aggregatgröße ändert sich unter dem Einfluss von LL-32 von einigen Hundert nm auf bis zu Tausende nm. Aggregate aus R595-LPS besitzen ihre maximale durchschnittliche Größe von 1600 nm bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von LL-32 zu LPS von 0,4, R4-LPS bei einem

Verhältnis von 0,2 eine Größe von 1600, R7-LPS bei 0,6 1585 nm, Rz-LPS bei 0,8 2825 nm, R5-LPS bei 0,4 1495 nm, R345-LPS bei 1,0 1965 nm und R60-LPS bei 0,8 1710 nm. Nach ihren Maximalwerten fallen die Graphen für R595-, R7- und R60-LPS leicht ab, die für Rz-LPS stark ab und für R5-, R4- und R345-LPS bleibt die Größe ungefähr gleich.

Insgesamt sind die Kurvenverläufe jedoch sehr ähnlich. Im Vergleich zu den entsprechenden Messungen mit PMB in Abb. 23 steigt die Größe der Aggregate durch LL-32 schneller an.

Unter dem Einfluss von LL-20 (Abb. 48 B) werden die Aggregate aus R595- und R60-LPS auch größer, allerdings erst bei höheren Konzentrationen als von LL-32. Die R595-LPS-Aggregate haben bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von LL-20 : LPS von 1,6 ihre maximale Größe von 2290 nm erreicht, die Aggregate aus R60-LPS bei einem Verhältnis von 2,5 mit einer Größe von 936 nm. Im Anfangsbereich sind beide Kurven stark unterschiedlich, die vom R595-LPS ist deutlich steiler als die vom R60-LPS. Der Endbereich beider Kurven hingegen ist ziemlich ähnlich.

Die größte Gemeinsamkeit besitzen aber die Kurven der Aggregatgrößen aus R595-LPS in Abhängigkeit von LL-20 mit denen von PMBN (Abb. 48 B). Im Vergleich zu der Kurve von der Größe der Aggregate aus R60-LPS in Abhängigkeit von DTPPB liegt die entsprechende Kurve von LL-20 immer im gleichen Abstand (allerdings beachte man den logarithmischen Maßstab) oberhalb von ihr. Dies gilt auch für die unabhängigen Startwerte.

#### 4.3.1.4. Bindung von LL-32 an Bakterien und die Auswirkung auf die Membranintegrität

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Bindung von fluoreszenzmarkiertem LL-32 an Bakterien und dessen Auswirkung auf die Integrität der bakteriellen Zellhülle untersucht. Dazu wurde das Fluorophor NBD an LL-32 gebunden. Biologische Tests ergaben keinen Unterschied im antibakteriellen Verhalten zwischen dem so genannten NBD-LL-32 und LL-32. Die farbstoffmarkierte Variante wurde eingesetzt um die Bindung von LL-32 an Bakterien zu charakterisieren. Außerdem wurde Propidiumjodid (PI) verwendet ein rot fluoreszierender Farbstoff, der an die DNA bindet. Da dieser nicht membrangängig ist, kann er nur durch Membran die ihre Integrität verloren haben. Die Menge von PI, die in die Zelle eindiffundieren konnte, ist damit ein Maß für den Integritätsverlust. Da er selbst nicht an die Membran bindet, ist sein Fluoreszenzsignal ein Maß für die Menge an intrazellulärem PI und somit ein Maß für den Verlust der Membranintegrität. Es wurden verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Peptid und Bakterienkonzentrationen durchgeführt. Die Daten in Abb. 49 zeigen eine repräsentative Messung.

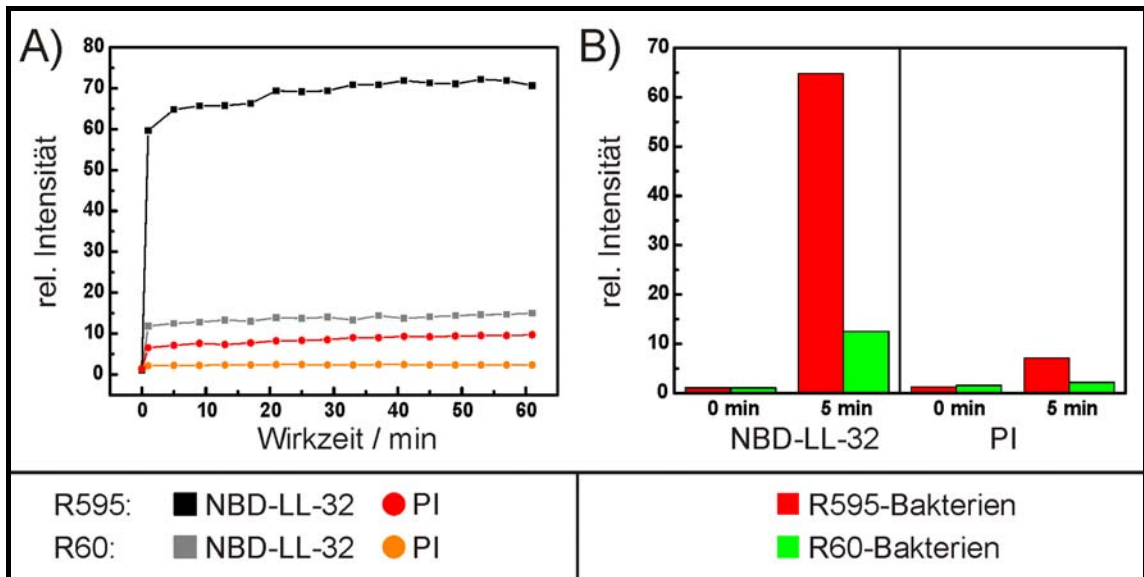


Abbildung 49: A) Änderung der relativen Fluoreszenzintensität von R595- und R60-Bakterien verursacht von NBD-LL-32 oder Propidiumjodid (PI) in Abhängigkeit von der Wirkzeit. Bereits nach 1 min ist die maximale Intensität bei allen Werten fast erreicht. Der Graph stellt eine repräsentative Messung dar. Die LL-32 Konzentration betrug  $50 \mu\text{M}$ , davon waren 50% mit NBD markiert. Es wurden  $120 \mu\text{l}$  PI auf  $3250 \mu\text{l}$  PBS verwendet. Die Intensitäten wurden auf die Eigenfluoreszenzen von R595-Bakterien normiert. B) Darstellung der Werte aus A) im direkten Vergleich der Bakterien. Sowohl NBD-LL-32 als auch PI zeigen eine erhöhte Bindung an R595-Bakterien als an R60-Bakterien.

Die Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Emissionsbereiche von NBD und PI wurden auf R595-Bakterien ohne einen der Stoffe normiert, d.h. diese Werte gleich Eins gesetzt. Die R60-Bakterien besaßen eine fast identische Eigenfluoreszenz im aufgenommenen Emissionbereich von NBD, im Bereich von PI jedoch einen etwas erhöhten.

In Abb. 49 A) ist die Kinetik der Bindung von NBD-LL-32 und des Einstromes von PI in die *S. minnesota* Bakterienstämme R595 und R60 dargestellt. Bereits nach 1 min Wirkzeit von NBD-LL-32 ist die Bindung sowohl an den R595- wie auch an den R60-Bakterien fast vollständig abgeschlossen. Auch der Wesentliche Teil von PI ist bereits zu diesem Zeitpunkt in die Bakterien gelang. Von 1 min bis 61 min bindet an R595-Bakterien noch weitere 21% NBD-LL-32 und noch 49% mehr PI gelang in die Bakterien. Bei den R60-Bakterien waren es +27% NBD-LL-32 und +60% PI.

In Abb. 49 B) sind die Werte die nach 5 min erreicht worden, im direkten Vergleich zwischen den beiden Stämmen dargestellt. Zusätzlich sind die 0 min-Werte, also die ohne NBD-LL-32, aber mit PI aufgenommen wurden. NBD-LL-32 bindet stärker an R595-Bakterien als an R60-Bakterien, auch ist der Einstrom von PI größer. Die unterschiedliche Eigenfluoreszenz der Bakterienstämme im Emissionsbereich von PI wirkt dem beobachteten Effekt entgegen.



4.3.1.5. Kalorimetrie-Messungen an den Bakterienstämmen R595 und R60 und an Aggregaten aus deren LPS

Mit der Methode der Isothermen Titrationskalometrie wurde die Wärmeänderung aufgrund der Wechselwirkung von LL-32 mit Bakterien der *S. min*-Stämme R595 sowie R60 und mit Aggregaten aus deren LPS gemessen. Dabei wurden insgesamt 30 Injektionen à 3 µl 1,5 mM Peptid in 0,01%-iger Essigsäure zu 1,5 ml 50 µM LPS-Aggregaten gegeben. Die durch die Volumenzugabe der Essigsäure verursachte Verdünnungswärme wurde in Kontrollmessungen bestimmt und von der Wärmeänderung der Messung abgezogen. Zu lebenden Bakterien wurde fünfmal 20 µl mit einer LL-32 Konzentration von 0,8 mM oder 0,08 mM dazugegeben, zu abgetöteten Bakterien fünfmal 20 µl mit 0,8 mM LL-32. Beide Messungen wurden bei 37° C und in PBS durchgeführt.

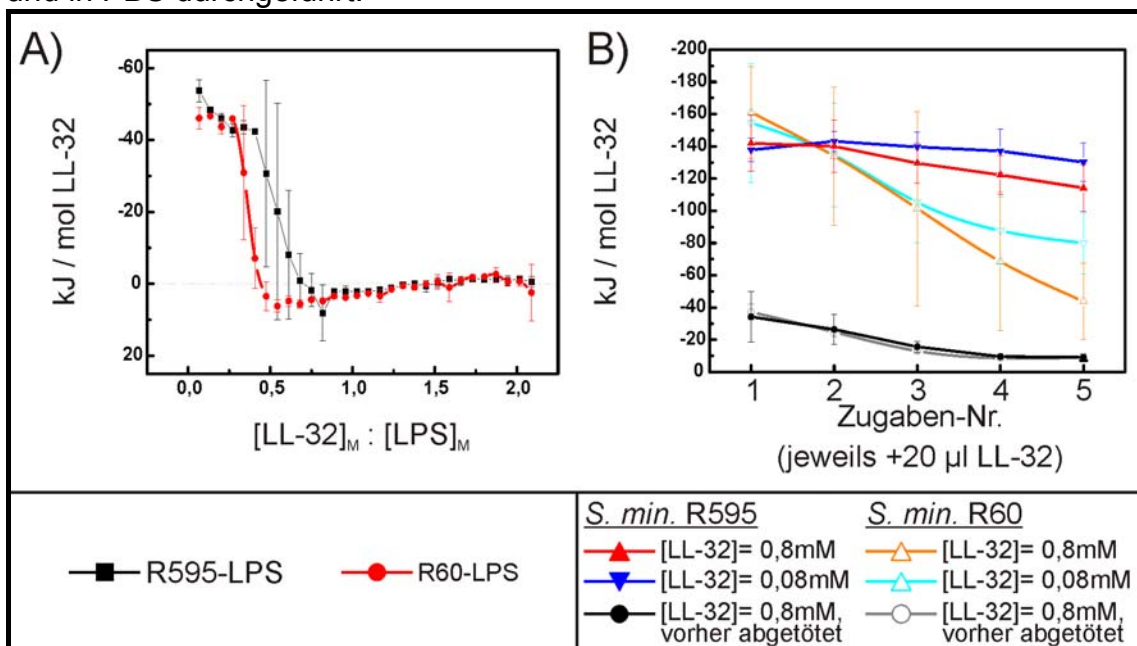


Abbildung 50: A) Wärmefreisetzung durch Zugaben von LL-32 auf Aggregate aus LPS der Stämme R595 und R60.

B) Wärmefreisetzung durch Zugaben von LL-32 auf lebende und abgetötete Bakterien der *S. minnesota*-Stämme R595 und R60. Die ITC-Messungen wurden wie in 3.8.3. beschrieben mit einer Bakteriensuspension mit einer OD<sub>620nm</sub> von 0,5 in PBS bei 37° C durchgeführt. Vor der Messung wurde den Bakterien 1 bis 1,5 Stunden Zeit gegeben, sich an die neuen Umgebungsparameter zu gewöhnen (Lag-Phase). Die durch die fünf Zugaben à 20 µl von LL-32 verschiedener Konzentration ausgelöste Wärmeentwicklung von lebenden oder toten Bakterien wurde in kJ pro mol LL-32 über dem zugegebenen Gesamtvolumen an LL-32 aufgetragen.

In Abb. 50 A) ist die durch LL-32 Zugaben auf Aggregate aus R595- und R60-LPS entstandene Energie dargestellt. Dabei besitzen exotherme Reaktionen negative Werte. Die Kurve für R595-LPS fällt ab einem molaren Verhältnis von 0,27 von einem Wert von -45 kJ pro mol injiziertes LL-32 auf -8 kJ/mol bei einem Verhältnis von 0,53. Die R60-Kurve fällt bei dem Verhältnis von 0,40 von

ebenfalls ungefähr -45 kJ/mol auf -8 J/mol bei einem Verhältnis von 0,83. Ab einem Verhältnis von 1 bewirkten weitere LL-32 Zugaben keine weitere Wärmeentwicklung bei den Aggregaten. Die erste Zugabe bewirkte auf R595-LPS-Aggregate eine höhere Wärmeentwicklung als bei R60-Aggregaten.

In Abb. 50 B) ist die durch LL-32 Zugabe entstandene Wärme von den *S. minnesota*-Stämmen R595 und R60 dargestellt. Die ITC-Messungen wurden wie in 3.8.3. beschrieben an 1,5 ml in PBS suspendierten Bakterien ( $OD_{620nm} = 0,5$ ) bei 37° C nach einer Wartezeit von 1 Stunde bis 1,5 Stunden durchgeführt. Die 5 Zugaben an LL-32 mit der Konzentration 0,8 mM bewirkten somit eine LL-32 Konzentrationserhöhung von je 10,7  $\mu$ M und somit lag die Konzentration in der Messzelle nach der letzten Injektion bei 53,3  $\mu$ M. Bei den Zugaben der 0,08 mM LL-32 Lösung entsprechend zu 1,07  $\mu$ M Zunahme pro Injektion. Die Messdauer betrug 30 min. Ein Ausplattieren der Bakteriensuspension nach der Messung ergab, dass nicht alle Bakterien durch die LL-32 Zugaben abgetötet worden waren. Durch Bestimmung der Lebendkeimzahl in PBS nach verschiedenen Zeiten, konnte bestimmt werden, dass sich beide Stämme in PBS nicht vermehren oder absterben. Nach der Wartezeit war der Heizstrom der Messzelle konstant, d.h. es lag keine schwankende Wärmeentwicklung vor. Da auch nach mehreren Stunden in der Messzelle ohne LL-32 Zugabe die Bakteriensuspension eine unveränderte OD aufwies, wird davon ausgegangen, dass die Bakterien während der Wartezeit aus der Lag-Phase aufgrund der Anpassung an das neue Medium und Umgebung in eine Statische Phase (stark runterregulierter Stoffwechsel, keine Zellteilung) übergegangen ist. Abgetötet wurden die Bakterien mit 0,1% Natriumhypochlorit in PBS mit einer Wirkzeit von 2h. Nach dieser Zeit konnten die Bakterien keine Kolonien mehr auf *Brain-Heart-Infusion-Agar*-Platten bilden und wurden somit als tot betrachtet.

Die Zugabe von 5 mal 20  $\mu$ l 0,8 mM LL-32 bewirkt bei lebenden und mit Natriumhypochlorit abgetöteten Bakterien sowohl beim Stamm R595 als auch beim Stamm R60 eine Wärmeentwicklung anderer Größenordnung. Während bei den toten Bakterien maximal -38 kJ / mol LL-32 Wärme pro Zugabe entwickelt wird, ist es bei den lebenden Bakterien im Bereich von -150 kJ / mol LL-32. Die Zugaben der höheren 0,8 mM LL-32 Konzentration bewirkten bei den lebenden Bakterien eine niedrigere Wärmefreisetzung als bei den niedrigeren 0,08 mM Konzentrationen. Im Verlauf der Zugaben verringerte sich die freigesetzte Wärmeenergie pro Injektion bei dem Stamm R60 stark um ca. 2/3, die beim Stamm R595 dagegen nur um ca. 10%. Bei beiden Stämmen bewirkt die höhere Konzentration eine stärkere Reduzierung der Wärmefreisetzung im Verlauf der Zugaben als die niedrigere. Bei dem Stamm R595 ergibt sich ab der dritten LL-32 Injektion ein Unterschied zwischen den Verläufen, beim Stamm R60 ab der 4. Injektion. Während durch alle Injektionen an den lebenden Bakterien Wärmeenergie freigesetzt wurde, kam es ab der 4. Zugabe (42,7  $\mu$ M) auf die abgetöteten Bakterien zu einer endothermen Reaktion von LL-32 und den toten Bakterien. Die freigesetzte Wärmeenergie verringert sich bei den

abgetöteten R60-Bakterien stärker als bei den abgetöteten R595-Bakterien, wobei sie gegen denselben Endwert von  $-9 \text{ kJ / mol LL-32}$  laufen.

### 4.3.2. Diskussion

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen dem Peptid LL-32 und Lipopolysacchariden interpretiert. Dabei wird zuerst auf die Ergebnisse aus den biologischen Tests zur Charakterisierung der Aktivitäten von LL-32 und seinen Fragmenten eingegangen. Aus ihnen können Rückschlüsse auf die Bedeutung einiger Aminosäurecluster der LL-32 Sequenz für dessen biologische Aktivitäten gezogen werden. Anschließend werden die ermittelten Aktivitäten von LL-32 durch Interpretation der physikalische Untersuchungen an aus LPS rekonstituierten Modellmembranen und Bakterien gedeutet.

#### Folgerungen aus den biologischen Aktivitäten der Peptide

Aus den Daten zur antibakteriellen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Aktivität von LL-32 und den Fragmenten wird deutlich, dass einem Peptid nicht eine bestimmte Aktivität zugeordnet werden kann, sondern diese stark von den jeweiligen Bakterienstämmen abhängt. Außerdem ist die Bedeutung einiger Aminosäurecluster der LL-32 Sequenz für dessen Aktivitäten beschrieben worden (4.3.1.1.). Zur Verdeutlichung dieser beiden Ergebnisse, sind die in dieser Arbeit ermittelten LD90-Werte gegen die verschiedenen Bakterienstämme für die Fragmente in Relation zu denen von LL-32 gesetzt worden. Sie sind in Prozent angegeben und der Versuchsablauf in 3.7.1. dargestellt. Für die, wie in 3.7.3. beschrieben, ermittelten relativen TNF- $\alpha$  Konzentrationen wurden entsprechende Werte berechnet. Die in Abb. 51 ebenfalls mitangegebene zytotoxische Aktivität ist auf die von LL-32 normiert. Sie wurde bei einer Peptidkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  wie in 3.7.2. beschrieben ermittelt. Dabei wurde ein Farbschema verwendet, dass allen Peptiden mit einer LD90, die kleiner als 25% von der LD90 von LL-32 ist, die Farbe „Grün“ zuweist und bei einer mehr als viermal so hohen LD90 die Farbe „Rot“. Die weiteren Farbzusordnungen sind der Legende der einzelnen Tabellen zu entnehmen. Da der Stamm Ko2b gegen LL-32 resistent ist, besitzen auch Peptide mit einer schwachen Aktivität gegen diesen Stamm eine deutliche Verbesserung gegenüber LL-32 und sind dementsprechend „Grün“ markiert. Die Höhe der Verbesserung ist an den Prozentwerten abzulesen.



Antibakterielle Aktivität												
Peptid	Bakterienstamm											
	R595	R4	R7	Rz	R5	R345	R60	WBB01	T1	R 45	Ko2b	Wildtyp
LL-32	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	>>>	100
LL-37	87	87	45	44	45	45	45	22	45	87	>>>	349
rCAP18 <sub>106-137</sub>	52	52	53	52	26	26	26	52	26	103	<3	1651
FF-28	111	111	111	56	111	29	111	111	57	446	<7	111
SK-24	67	67	133	67	68	133	68	67	34	1067	<17	1065
IG-20	79	159	159	79	81	41	81	79	20	2542	<5	1269
LL-20	1241	1241	1275	1241	1275	2550	2550	620	1275	>20398	>>>	>2546
GD-28	56	56	113	56	58	29	58	56	29	451	<7	1801
FF-24	129	129	129	64	66	66	66	66	258	8268	<8	516
RK-20	158	615	316	79	81	81	40	158	631	>20225	>>>	>2524
LL15KR15	14							54	55	862	<1	215
LL14RI14	59							116	59	927	<1	116
LL12VQ12	133	133	133	66	133	133	133	66	34	8523	<4	266
LL10RI10	80	159	82	159	82	159	82	159	41	5099	<5	318
2A	104	202	104	52	104	53	104	104	53	830	0	104
2G	27							52	27	418	0	209
4A	54							53	27	107	0	53
4G	14	26-75 %	75-125 %	126-200 %	201-400 %	401% <		27	56	1737	<1	217

Antiiinflammatorische Aktivität												
Peptid	Bakterienstamm											
	R595	R60	WBB01	R 595	T1	R 45	Ko2b					
LL-32	3	7	-6	3	-3	3	-17					
LL-37												
rCAP18 <sub>106-137</sub>	0	6	10	0	11	11	-4					
FF-28	-3	-1	-7	-3	14	-2	-10					
SK-24	18	61	68	18	93	17	17					
IG-20	8	58	58	8	17	0	-17					
LL-20	97	68	52	97	80	89	58					
GD-28	0	37	98	0	17	8	8					
FF-24	28	54	80	28	33	42	54					
RK-20	94	79	61	94	140	87	70					
LL15KR15	27	54	78	27	63	30	47					
LL14RI14	6	55	64	6	9	2	-13					
LL12VQ12	42	75	54	42	56	51	114					
LL10RI10	35	53	97	35	72	18	56					
2A	-4	4	-25	-4	-1	1	-13					
2G	4	76	76	4	9	4	19					
4A	-1	50	66	-1	2	9	13					
4G	46	78	64	46	65	62	100					
	<0%	1-25 %	25-50 %	50-75 %	76-100 %	100% <						

Zytotoxische Aktivität												
Peptid	Peptid-Konzentration 100 µM											
	LL-32	100										
LL-37	21											
rCAP18 <sub>106-137</sub>	6											
FF-28	15											
SK-24	5											
IG-20	38											
LL-20	-2											
GD-28	10											
FF-24	6											
RK-20	-1											
LL15KR15	38											
LL14RI14	88											
LL12VQ12	34	<0 %										
LL10RI10	52	1-5 %										
2A	49	5-15 %										
2G	26	15-25 %										
4A	48	25-50 %										
4G	37	50% <										

Abbildung 51: Übersicht über die in dieser Arbeit ermittelten Daten zur antibakteriellen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Aktivität der LL-32 Fragmente (Tab. 1). Die dargestellten Werte für die antibakterielle Aktivität sind die relativen LD90-Werte der Fragmente zu den LD90-Werten von LL-32, angegeben in Prozent. Die Versuchsdurchführung ist in 3.7.1. beschrieben. Bei inaktiven Peptiden wurde die höchste getestete nicht-letale Konzentration mit „>“ gekennzeichnet. Nicht berechenbare Werte wurden mit „>>>“ gekennzeichnet und die Peptide sind inaktiv. Die Werte für die antiinflammatorische Aktivität sind die relativen TNF-α Konzentrationen, die wie in 3.7.3. dargestellt bestimmt wurden. Die dargestellten Werte für die zytotoxische Aktivität sind die in 4.3.1.1. beschriebenen Werte für 100 µM Konzentration der Fragmente in Relation zu den für LL-32, angegeben in Prozent.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist z.B. die antibakterielle Aktivität stark von den verschiedenen Stämmen, bzw. Serovaren abhängig. Deshalb sollte immer der Stamm oder Subtyp berücksichtigt werden. Selbst einzelne Mutanten, die eine veränderte LPS-Struktur besitzen, haben häufig ebenfalls eine veränderte Suszeptibilität gegen die Peptide. Da aber die antibakterielle Aktivität nicht für jede einzelne Unterart von Bakterien ermittelt werden kann, sollte zumindest der Einfluss wichtiger Strukturen auf die Aktivität bekannt sein. Dies kann förderlich sein, um bei Infektionen das am besten geeignete Antibiotikum gegen den infektiösen Erreger zu ermitteln. Dies gilt ebenso für die antiinflammatorische Aktivität, auch sie ist stark von dem Herkunftsstamm des stimulierenden LPS abhängig.

Für die antibakterielle Aktivität von LL-32 und die meisten seiner Fragmente besitzen Substitutionen am von den Stämmen exprimierten LPS einen wesentlich größeren Einfluss als Unterschiede in der Glycostruktur der LPS. Die Auswirkungen auf die Aktivität sind jedoch für die verschiedenen Fragmente unterschiedlich. Damit scheinen die einzelnen Aminosäuren oder ihre Bedeutung für die Wirkung der Gesamtstruktur einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität und ihre Abhängigkeiten zu besitzen. Verallgemeinert lässt sich jedoch für LL-32 und die meisten Fragmenten ein die Aktivität stark hemmender Einfluss von Substitutionen am K(d)o feststellen. Der Einfluss der Substitutionen am Lipid A ist divergenter, aber geringer als der der Substitutionen am K(d)o. Weitere Untersuchungen sollten feststellen, ob dies ebenso für andere membranaktive kationische Peptide gilt.

Der Einfluss der unterschiedlichen Variationen der LPS-Struktur ist auf die antiinflammatorische Aktivität ein anderer. Wie aus den Daten hervorgeht, besitzt in diesem Fall eine veränderte Glycostruktur einen stark hemmenden Einfluss. Auffällig ist besonders, dass fast alle Peptide eine stark verminderte antiinflammatorische Aktivität gegen LPS ohne Substitutionen besitzen. Ansonsten scheint die Anzahl und Position der Substitutionen für diese Aktivität von nicht entscheidender Bedeutung zu sein. Dies lässt einen anderen Wirkmechanismus für die antiinflammatorische und antibakterielle Aktivität vermuten.

Aus Abb. 51 lässt sich die Bedeutung einzelner Aminosäurecluster gut erkennen. Bereits der Austausch von zwei Aminosäuren bewirkt z.B. dass das Peptid 2A gegen LL-32 resistente Bakterienstamm Ko2b stark sensitiv ist. Die Deletion der 12 N-terminalen Aminosäuren (LL-20) bewirkt eine deutlich schwächere antibakterielle und antiinflammatorische Aktivität, eine Deletion der vier C-terminalen Aminosäuren (FF-28) bewirkt jedoch meistens eine Verbesserung der Aktivitäten. Allerdings ist es gegen den Stamm R45 deutlich inaktiver als LL-32. Dies gilt auch für fast alle anderen Peptide, nur das Peptid 4A besitzt eine vergleichbare Aktivität, ist aber gegen den Stamm Ko2b besonders aktiv. Dies gilt für alle Peptide der Gruppe „Interne Substitution“, insbesondere für 2A. Offenbar ist spezielle für die Wirkung gegen den Stamm

R45 eine definierte  $\alpha$ -Helix nicht von Bedeutung. Dies scheint auch für die Aktivität gegen die anderen Stämme gültig zu sein.

Die antiinflammatorische Aktivität wird von allen Aminosäuren wesentlich mitbestimmt. Nur der Austausch von Aminosäuren zum Peptid 2A bewirkt eine vergleichbar starke antiinflammatorische Aktivität wie LL-32 gegen alle getesteten LPS.

Für die zytotoxische Aktivität besitzen die acht endständigen Aminosäuren offenbar eine essentielle Bedeutung, wie den Daten für GD-28 und FF-24 zu entnehmen ist. Alle Fragmente besitzen eine geringere zytotoxische Aktivität als LL-32.

Aus der Gesamtheit der Daten ergibt es, dass es sehr schwierig bis unmöglich ist, ein für alle Belange optimales Peptid zu entwickeln. So besitzt LL-32 zwar mit die beste antiinflammatorische Aktivität, jedoch auch eine starke zytotoxische Aktivität. Erfolgversprechender scheint es, viele Peptide zu entwickeln, die auf die antibakterielle und antiinflammatorische Aktivität gegen einen Bakterienstamm oder Gruppe, bzw. seinem LPS zu optimieren, z.B. würden sich die Peptide FF-28, GD-28, 2A und 4A gut in ihren Aktivitäten ergänzen. Denkbar wäre es, je nach zu bekämpfenden Stamm eins von ihnen auszuwählen oder alle zusammen einzusetzen. Bei der gemeinsamen Verabreichung gegen invasive Pathogene würden die noch relativ hohen zytotoxischen Effekte von 2A und 4A durch die gesenkte Einzelkonzentration nicht so wesentlich sein. Eventuelle synergistische Effekte dieser vier Peptide sollten in zukünftigen Tests ermittelt werden. Ebenso sollte probiert werden, die zytotoxische Aktivität der Peptide 2A und 4A z.B. durch Deletion der vier endständigen Aminosäuren zu verringern, ohne die antiinflammatorischen Eigenschaften im Allgemeinen und die antibakterielle Aktivität insbesondere gegen die Stämme Ko2b und R45 wesentlich zu verschlechtern. Damit kann diese Untersuchung zu der Entwicklung neuer Peptid-Antibiotika beitragen.

#### 4.3.2.1. Korrelation der biologischen Aktivitäten der LL-32 Fragmente mit globalen physikalischen Parametern

Um zu überprüfen, ob die antibakteriellen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Aktivitäten mit den hydrophoben Momenten oder den Ladungen der Peptide korrelieren, wurden die jeweiligen Aktivitäten in den folgenden Graphen über der Ladung und dem hydrophoben Moment aufgetragen. Ein Einfluss der Ladung ist aufgrund der entgegengesetzten Ladung der Peptide und deren potentiellm Bindungspartner LPS zu vermuten. In der Literatur ist die Bedeutung des hydrophoben Moments für die potentiellen Wirkmechanismen von LL-32 beschrieben (Henzler-Wildman et al., 2004). Der globale Parameter hydrophobes Moment als Mittel der einzelnen hydrophoben Momente der Aminosäuren ist laut Literatur kein geeigneter Parameter (Gutsmann et al., 2001b).

Die verschiedenen Aktivitäten (4.3.1.1.) und die beiden globalen Parameter hydrophobes Moment (4.3.1.2.) und Ladung (Tab. 1) sind für LL-32 und die Fragmente bereits vorgestellt worden. In der Abb. 52 sind die antibakteriellen Aktivitäten über die beiden physikalischen Größen aufgetragen.

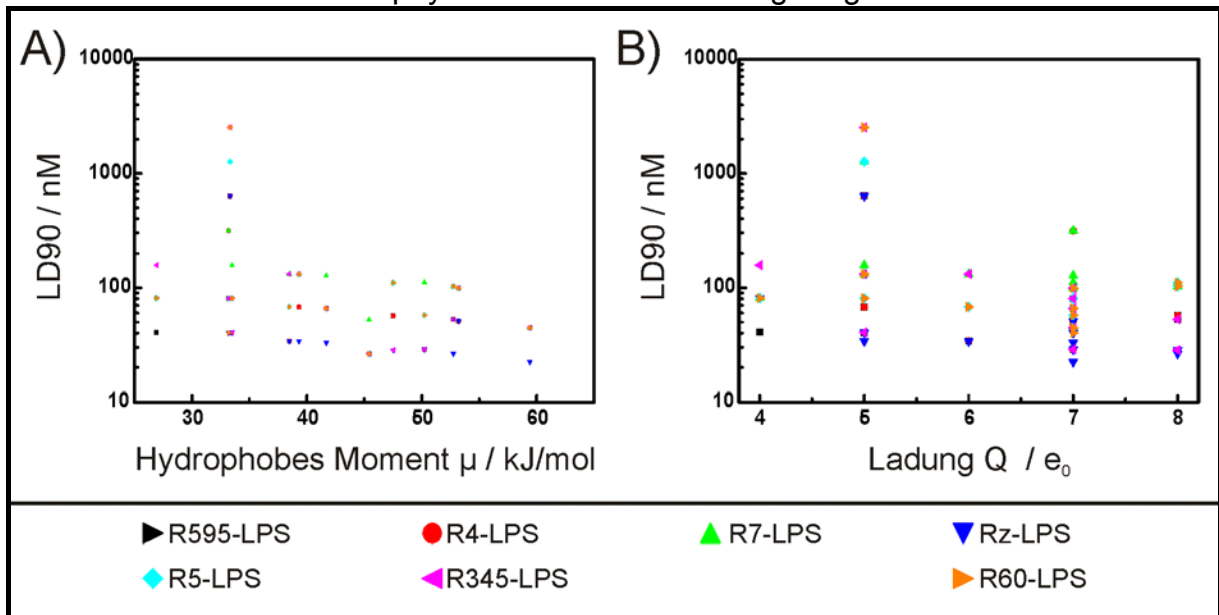


Abbildung 52: Korrelation der hydrophoben Momente (A) und der Ladung (B) der verschiedenen LL-32 Fragmente mit ihrer antibakteriellen Aktivität gegen die *S. minnesota* Stämme der Glycostruktur-Gruppe.

Wie gut zu erkennen ist, lässt sich die antibakterielle Aktivität nicht mit den beiden physikalischen Größen korrelieren. Dies gilt auch für die antiinflammatorische und zytotoxische Aktivität und für die Stämme der Substitutions-Gruppe, wie es aus den im Anhang abgebildeten entsprechenden Graphen (5.6.) ersichtlich ist. Offenbar besitzen die einzelnen Aminosäuren einen Einfluss auf die Aktivität von LL-32 der über ihren Einfluss auf die Ladung oder das hydrophobe Moment hinausgeht. Ist für eine antibakterielle Wirkung eine Bindung an das LPS von entscheidender Bedeutung, dann haben einzelne Aminosäuren und ihre Position bzw. Orientierung im Molekül einen wesentlichen Einfluss auf diese.

Wie im Folgenden gezeigt, werden die verschiedenen Aktivitäten von LL-32 mithilfe der Ergebnisse der physikalischen Untersuchungen gedeutet und Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus gezogen. Diese Untersuchungen könnten zukünftig auch mit den LL-32 Fragmenten durchgeführt werden, um die Gründe für die Einflüsse der Aminosäuren herauszufinden. Aufgrund der Vielzahl der dafür notwendigen Messungen könnte dies aber auch mit einer computergestützten Simulation erfolgen. Dafür könnten die in dieser Arbeit ermittelten Daten als Grundlage dienen.

#### 4.3.2.2. Deutung der biologischen Befunde durch physikalische Untersuchungen

Mithilfe der Ergebnisse der FRET-Spektroskopie, der Bestimmung des Zeta-Potentials und der Größe von LPS-Aggregaten, der Durchflusszytometrie und der Kalorimetrie werden die biologischen Befunde für LL-32 diskutiert. Die Erkenntnisse daraus für die Wirkmechanismen werden in einer abschließenden Diskussion dargestellt.

Die antiinflammatorischen Aktivitäten können mithilfe des FRET-Assays erklärt werden, allerdings ist dies nicht für geringe Unterschiede in den antiinflammatorischen Aktivität möglich. Für inaktive und aktive Peptid kann jedoch deren Verhalten gut beschrieben werden.

Von den Fragmenten mit einer 20 AS langen Sequenz besitzt nur IG-20 eine starke antibakterielle Aktivität. Es ist auch das einzige dieser Peptide, welches eine Fusion der LPS-Aggregate (positiver  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert mit nachfolgendem negativen  $\Delta(I_A/I_D)$ -Wert) bewirkt. Die Peptide LL-20 und RK-20 können sich weder stark in die LPS-Aggregate einbauen noch diese miteinander fusionieren lassen. Gegen R60-LPS-Stimulation kann IG-20 nur sehr stark eingeschränkt die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  unterbinden und die R60-Aggregate nicht miteinander fusionieren, sondern lediglich aggregieren lassen. Dies spiegelt sich zumindest für LL-20 auch in den Daten zur Größenbestimmung der LPS-Aggregate in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration wieder. Es kann nur deutlich schlechter als LL-32 die Größe der Aggregate ändern. Auch die potentiell nicht antiinflammatorisch wirkenden Stoffe PMBN und DTMAB können die Größe der LPS-Aggregate nicht so stark ändern wie die der antiinflammatorisch wirkenden Peptide PMB und LL-32.

Das aus der Gruppe „N-terminale Deletion“ stammende Peptid FF-28 kann die TNF- $\alpha$  Ausschüttung nach Stimulation durch R595-, R60- oder R45-LPS vollständig unterdrücken und lässt auch Aggregate aus R595- und R45-LPS, also mit Substitutionen, ab einem Peptid zu LPS Verhältnis von 0,3 miteinander fusionieren, Aggregate aus R60-LPS erst ab einem molaren Verhältnis von 1 : 1. Das Peptid SK-24 besitzt gegen R60-LPS eine wesentlich stärker eingeschränkte antiinflammatorische Aktivität als gegen R595- und R45-LPS und kann auch die entsprechenden Aggregate erst zwei Zugaben (Verhältnis Peptid zu LPS 1) später miteinander fusionieren, bei geringeren Konzentrationen baut sich das Peptid bloß ein.

Das Peptid GD-28 aus der Gruppe „N- und C-terminale Deletion“ kann bei Stimulation mit R595-LPS die TNF- $\alpha$  Ausschüttung vollständig unterdrücken, bei R60-LPS um zwei Drittel und bei R45-LPS fast vollständig. Dies spiegelt sich auch in dem FRET-Assay wieder, in dem bei R60-LPS-Aggregaten erst ein Einbau und ab einem molaren Verhältnis von Peptid zu LPS von 1 eine Aggregation oder Fusion stattfand. Das Peptid FF-24 bewirkt bei keinem LPS eine vollständige Inhibierung und kann bei den FRET-Assays erst ab einem Verhältnis von 1 eine Fusion bewirken.

Aus den Daten der Peptide der Gruppe „Interne Deletion“ lassen sich aufgrund der weder vollständigen noch komplett nicht vorhandenen Fähigkeit die TNF- $\alpha$

Ausschüttung zu unterbinden keine genauen Aussagen gewinnen. Jedoch ist bei allen die Inhibitionsfähigkeit in Bezug auf R60-LPS am geringsten ausgeprägt und auch das Fusionsverhalten der R60-LPS-Aggregate.

Die Peptide der Gruppe „Interne Substitution unterdrücken die TNF- $\alpha$  Expression bei Stimulation durch R595- oder R45-LPS vollständig und fusionieren auch die entsprechenden LPS-Aggregate bereits ab einem molaren Verhältnis von Peptid zu LPS von 0,3. Nur bei den R60-LPS-Aggregaten kommt es bei den ersten Zugaben zu einem bloßen Einbau und die Peptide sind antiinflammatorisch aktiv gegen R60-LPS-Aggregate. Die hohe antiinflammatorische Aktivität gegen R60-LPS von 2A ist aber nicht durch die FRET-Spektroskopie erklärbar.

Insgesamt fällt deutlich auf, dass eine längere Glycostruktur einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Fragmente besitzt und dass gegen das LPS gänzlich ohne Substitution, WBB01-LPS, die antiinflammatorischen Aktivitäten schlechter ausgeprägt sind. Dies spiegelt sich in den Daten der FRET-Spektroskopie durch das Fusionsverhalten wieder. Die Peptide können größtenteils erst ab einer höheren Konzentration R60-LPS-Aggregate im Vergleich zu R595-LPS-Aggregaten fusionieren. Bei den Größenmessungen konnte teilweise ebenfalls ein hemmender Effekt der längeren Glycostruktur auf die Vergrößerung der Aggregate festgestellt werden. Offenbar wird durch die Zuckerstruktur eine Fusion der Aggregate erschwert. Dies könnte an ihrer sterischen Hinderung liegen.

Substitutionen am LPS hingegen erhöhen die Fähigkeit Fusionierungen zu induzieren geringfügig. Da LL-32 die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  bei Stimulation mit R595- und R45-LPS vollständig unterdrückte, ist der Einfluss der Substitution auf die antiinflammatorische Aktivität nicht ermittelbar.

Damit ist für die antiinflammatorische Aktivität von LL-32 und seiner Fragmente deren Fähigkeit Fusionen von LPS-Aggregaten zu induzieren von entscheidender Bedeutung. Die antiinflammatorische Aktivität der Peptide wurde bei einem 400-fachem Peptidüberschuss bestimmt. Bei diesen Konzentrationen sind die physikalischen Untersuchungen nicht durchführbar, da die Peptide sowohl ausfallen als auch sehr große Substanzmengen benötigt würden. Auf die Bedeutung dieses hohen Peptidüberschuss wird in der Diskussion der Wirkmechanismen eingegangen (4.5.).

Aus der Kompensation des Zeta-Potentials geht hervor, dass LL-32 in der Lage ist an LPS-Aggregate zu binden, unabhängig von der Glycostruktur. An Aggregate aus LPS mit längerer Glycostruktur wie R5-, R345- und R60-LPS ist die Bindung nicht so stark zu sein wie an den LPS mit kürzerem Zucker, da die Bindungskurve im Anfangsbereich steiler verläuft und die vollständige Reduktion des Zeta-Potentials von Aggregaten aus LPS mit den drei längsten Glycostrukturen erst bei einem höheren molaren Verhältnis von 0,4 anstatt 0,2 erfolgte.

Aus der Überkompensation des Zeta-Potentials wird der Schluss gezogen, dass LL-32 mit seinem hydrophoben Bereich in die Membran inseriert und so aufgrund des hydrophoben Moments einen energetisch günstigeren Zustand einnehmen kann. Dies wurde für das Mutterpeptid LL-37 gezeigt (Henzler-Wildman et al., 2004). Da die Überkompensation bei den LPS mit längerer Glycostruktur am geringsten ist, wird vermutet, dass LL-32 aufgrund der längeren Glycostruktur nicht so gut in die LPS-Schicht inserieren kann. Negative Ladungssubstituenten in der Glycostruktur, wie bei Rz-, R345- und R60-LPS scheinen eine leicht stärkere Überkompensation zu bewirken, wobei der Einfluss der längeren Glycostruktur überwiegt.

Da die Bindung und Insertion an bzw. in die LPS-Schicht eine wichtige Bedeutung für die antibakterielle Aktivität von LL-32 haben, wie in 4.5.1. ausführlich erläutert wird, könnte dies die doppelt so hohen Konzentrationen an LL-32 erklären, die benötigt werden um 90% der Bakterien vom Stamm R60, im Bezug auf den Stamm R595, abzutöten.

Auf die Fähigkeit, die Größe der Aggregate zu ändern, hat die Glycostruktur aber offenbar fast keinen Einfluss. Eine Größenänderung der Aggregate in der beobachteten Größenordnung kann nur dann erfolgen, wenn das Peptid in der Lage ist LPS-Schichten aufzureißen und neu zu organisieren (und damit eine Fusion der Aggregate bewirkt) oder die Aggregate aggregieren zu lassen. Die dabei entstehenden neuen Aggregatformen können sich deutlich von den ursprünglichen LPS-Aggregatformen unterscheiden.

Es ist möglich, dass die Fähigkeit von LL-32, die Größe von LPS-Aggregate zu vergrößern, die antiinflammatorische Aktivität erklären kann, wie in 4.5.2. ausführlich erläutert. Dies würde die glycostrukturunabhängige antiinflammatorische Aktivität von LL-32 erklären.

LL-20, das eine stark eingeschränkte antibakterielle und antiinflammatorische Aktivität im Vergleich zu LL-32 besitzt und nicht zytotoxisch wirkt, bindet deutlich schwächer als LL-32 an die LPS-Aggregate. Die Bindungskurve ist wesentlich flacher und auch die Überkompensation des Zeta-Potentials ist wesentlich geringer als bei LL-32. Diese Effekte sind stärker als es aufgrund der verminderten Ladung oder des verminderten hydrophoben Moments zu erwarten wäre (erwartete Kompensation bei 0,6 molarem Verhältnis). Die Bindungskurve verläuft für Aggregate aus R595-LPS gleich wie für welche aus R60-LPS. Es kann in LPS-Schichten mit längerer Glycostruktur schwächer inserieren, wie an der Überkompensation bei R595-LPS und der nicht vollständigen Kompensation des Zeta-Potentials bei R60-LPS-Aggregaten zu sehen ist. Kurvenverlauf von LL-20 ähnelt dem für inaktives PMBN, welches nicht mit einem hydrophoben Bereich in die Membran inserieren kann. Damit kann die im Vergleich zu LL-32 stark reduzierte antibakterielle Aktivität durch eine verminderte Bindung und Insertion erklärt werden, wie in 4.5.1. besprochen wird. Das kleine Peptid LL-20 kann nur noch stark vermindert die Größe der Aggregate aus LPS vergrößern, wobei es nur eine geringe

Abhängigkeit von der Glycostruktur gibt. Da in biologischen Tests ebenfalls keine Abhängigkeit von der Glycostruktur registriert wurde, kann damit die glycostrukturunabhängige wesentlich schwächere antiinflammatorische Aktivität von LL-20 gegenüber LL-32 erklärt werden, wie in 4.5.2. dargelegt wird.

Aus den Daten der durchflusszytometrischen Messungen an Bakterien geht hervor, dass die Kinetik der Bindung von LL-32 an Bakterien und die darauf folgende Bildung von Läsionen in deren Zellhülle sehr stark ist. Nach 5 min war ein Großteil der LL-32 Moleküle gebunden und das PI ins Bakterium diffundiert. Die Läsionsbildung konnte bei R60-Bakterien nicht so schnell wie bei R595-Bakterien erfolgen, da nach 5 min ein geringerer Anteil an PI in R60-Bakterien diffundiert ist, wie in R595-Bakterien. Das Verhältnis von innerbakteriellem PI zu gebundenem NBD-LL-32 ist für R60-Bakterien höher als für R595-Bakterien. Dies könnte bedeuten, dass entweder für eine Läsionsbildung bei R60-Bakterien weniger LL-32 Moleküle benötigt werden, oder das für eine maximale Läsionsbildung nur eine geringe Menge an Molekülen benötigt wird. Die Glycostruktur des LPS besitzt einen Einfluss auf die Bildung der Läsionen von gebundenem LL-32. Dies konnte bereits für PMB gezeigt werden (Hammer, 2004). Damit wurde gezeigt, dass die antibakterielle Aktivität von LL-32 mit seiner Bindung an Bakterien korreliert. Dies ist in Übereinstimmung mit den Zeta-Potential Messungen an Bakterien mit PMB.

Damit korreliert die antibakterielle Aktivität von LL-32 mit dessen Fähigkeit, Läsionen in der bakteriellen Zellhülle zu induzieren.

Aus den kalometrischen Messungen an R595- und R60-LPS-Aggregaten und LL-32 Zugaben, wird deutlich, dass durch die LL-32 Zugaben auf R595-LPS in Bezug auf R60-LPS-Aggregate schon bei einer ca. halb so hohen Peptidkonzentration ein energetischer Endzustand angenommen wurde. Dies könnte bedeuten, dass eine R595-LPS-Schicht bei einer geringeren LL-32 Konzentration als eine Schicht aus R60-LPS kollabiert oder mizelliert wird.

Die Messungen unterstützen die Hypothese, dass LL-32 an die LPS-Schicht der äußeren Membran bindet, da die Bindungskurven für R595-LPS und R60-LPS denen von abgetöteten R595-Bakterien und R60-Bakterien ähneln.

Für die Wirkung an den toten Bakterien wird allerdings ungefähr die 500-fache Menge an Peptid wie an den LPS-Aggregaten benötigt. Der Grund ist nicht genau bekannt, aber das Phänomen ist häufig bei biologischen Tests anzutreffen. So ist z.B die MIC oder LD90 unabhängig von der eingesetzten Bakterienkonzentration. Eine mögliche Ursache wäre die stark verringerte Deby-Länge von PBS im Gegensatz zum 20 mM HEPES-Puffer. Damit würden weniger Peptide binden.

Die Zugabe von nicht tödlichen Mengen an LL-32 bewirkt eine wesentlich größere Wärmeproduktion an lebenden Bakterien als bei einer reinen LPS-Bindung. Offenbar wird der Stoffwechsel der Bakterien, aufgrund der Gefährdung für deren Überleben, schnell hochgefahren. Dies könnte durch eine



Läsionsbildung durch LL-32 in der bakteriellen Zellhülle ausgelöst werden. Da durch die Läsion der Konzentrationsgradient von Salzen und die Spannung über der Membran abzunehmen droht, muss das Bakterium durch aktive Prozesse wie Natrium und Kaliumpumpen dem entgegenwirken. Bei höheren Zugaben von LL-32 wird nicht mehr so viel Wärme produziert. Dies könnte daran liegen, dass einige Bakterien bereits abgestorben sind. Warum offenbar mehr R60-Bakterien abgestorben sind als R595-Bakterien kann nicht geklärt werden, eine mögliche Ursache sind aber die unterschiedlichen Versuchbedingungen zu den antibakteriellen Tests insbesondere der unterschiedliche Salzgehalt des Puffers.

#### Salzabhängigkeit der LD90

Die im Anhang gezeigten Ergebnisse der biologischen Untersuchungen zur Salzabhängigkeit der LD90 von LL-32 wurden wie unter 3.7.1. beschrieben durchgeführt. Dabei wurden Puffer mit unterschiedlichem Salzgehalt eingesetzt. Die hemmende Wirkung einer erhöhten Ionenkonzentration im Medium auf die Aktivität der Peptide wird dadurch erklärt, dass durch die Ionen die Anlagerung von Peptiden erschwert wird.

Die Debye-Länge wird durch eine höhere Salzkonzentration reduziert (F5) und dadurch fällt das Gouy-Chapman-Potential der negativen Bakterienoberflächenladung stärker ab. Dass Bakterien ein negatives Oberflächenpotential besitzen, wurde durch die Bestimmung des Zeta-Potentials von Bakterien (4.2.2.5.) gezeigt. Durch eine höhere Salzkonzentration wirkt auf die kationischen Peptide in der Umgebung des Bakteriums ein geringeres attraktives Potential. Der energetische Vorteil, den angelagerte Peptid gegenüber nicht-angelagerten besitzen, ist somit nicht mehr so stark. Da das Verhältnis von angelagerten zu nicht-angelagerten Peptiden (Gleichgewichtskonstante) von deren energetischen Zustand abhängt, ist somit der Anteil an gebundenen Peptiden bei einer höheren Salzkonzentration geringer.

Da die zweiwertigen Ionen eine doppelt so starke Reduzierung der Debye-Länge wie die einwertigen bewirken (F3 und F5), die Hemmung von +2 mM  $MgCl_2$  aber stärker war als von +125 mM NaCl, wird davon ausgegangen, dass die zweiwertigen Ionen nicht nur durch die Reduktion des Oberflächenpotentials eine hemmende Wirkung besitzen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sie mit zwei benachbarten LPS eine Bindung über die Ladung von Lipid A-Phosphat oder Kdo eingeht und damit für eine Quervernetzung/Verbrückung der LPS miteinander sorgt. Dafür spricht, dass die Hemmung der Peptidaktivität durch  $MgCl_2$  für R45-Bakterien nicht so stark ausgeprägt ist, wie für die Bakterien ohne Substitution der Ladungen. Wegen der Ladungssubstitution kann demnach eine Verbrückung der LPS nur schlechter erfolgen. Dies könnte erklären, warum die Induktion einer Fusion von R45-LPS-Aggregaten im Gegensatz zu welchen aus R595-LPS bei einer niedrigeren Peptidkonzentration erfolgt.

#### 4.4. Untersuchungen zur antitumoralen Aktivität von LL-32

Zur Fragestellung, ob LL-32 spezifisch gegen Tumorzellen wirkt, wurden verschiedene Experimente an Modellmembranen aus Phospholipiden und an zwei Zelllinien, der Keratinozytenzelllinie HaCaT und an der Tumore-bildenden Zelllinie HTB-43, durchgeführt.

Die Bindung von LL-32 an rekonstituierte Modellzellmembranen aus unterschiedlichen Phospholipiden wurde durch Zeta-Potential-Messungen bestimmt. Mithilfe der Durchflusszytometrie und durch Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop wurde die relative Bindungsstärke und der Bindungsort von LL-32 an die beiden Zelllinien ermittelt. Außerdem wurde dabei die Auswirkung von LL-32 auf die Integrität der Zellmembran quantitativ und qualitativ bestimmt. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob LL-32 in den HTB-43 Zellen Apoptose induziert.

##### 4.4.1. Ergebnisse

###### 4.4.1.1. Zytotoxische Aktivität LL-32 gegen die verwendeten Zelllinien

Die Daten zur Aktivität von LL-32 gegen Zellen der HaCaT- und HTB-43-Zelllinie wurden von Kooperationspartnern geliefert werden. In Abb. 53 ist der Anteil an lysierten Zellen der HaCaT- und HTB-43-Zelllinien über der logarithmisch skalierten LL-32 Konzentration aufgetragen. Die Werte stammen aus 3 unabhängigen Versuchen.

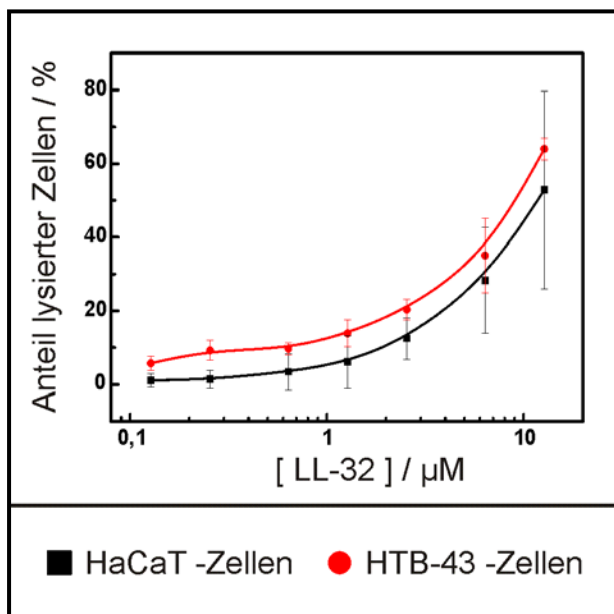


Abbildung 53: Anteil an lysierter Zellen der HaCaT- und HTB-43-Zelllinien über der molaren LL-32 Konzentration. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen.

Wie der Abbildung zu entnehmen, wird durch LL-32 ein höherer Anteil an HTB-43-Zellen lysiert als an HaCaT-Zellen, insbesondere im Bereich unter 1  $\mu\text{M}$  LL-32 Konzentration.

## 4.4.1.2. Bindung von LL-32 an Modellmembranen

Um zu ermitteln, ob das kationische LL-32 stärker an Membranen bestehend aus anionischen Lipiden oder ungeladene Lipiden bindet, wurde das Zeta-Potential von unterschiedlichen Phospholipid-Vesikeln in Abhängigkeit der LL-32 Konzentration bestimmt. Die Vesikel wurden nach der unter 3.3. beschriebenen Methode hergestellt, der Versuchsablauf ist in 3.8.1. beschrieben. Das Zeta-Potential ist ein Maß für das Oberflächenpotential in einem gewissen Abstand zum Aggregat und ändert sich, wenn gegensätzlich geladene Partikel ans Aggregat binden.

In Abb. 54 ist das Zeta-Potential von fünf unterschiedlichen Vesikeln aus Phospholipiden über dem molaren Konzentrationsverhältnis von LL32 zu Phospholipid aufgetragen.

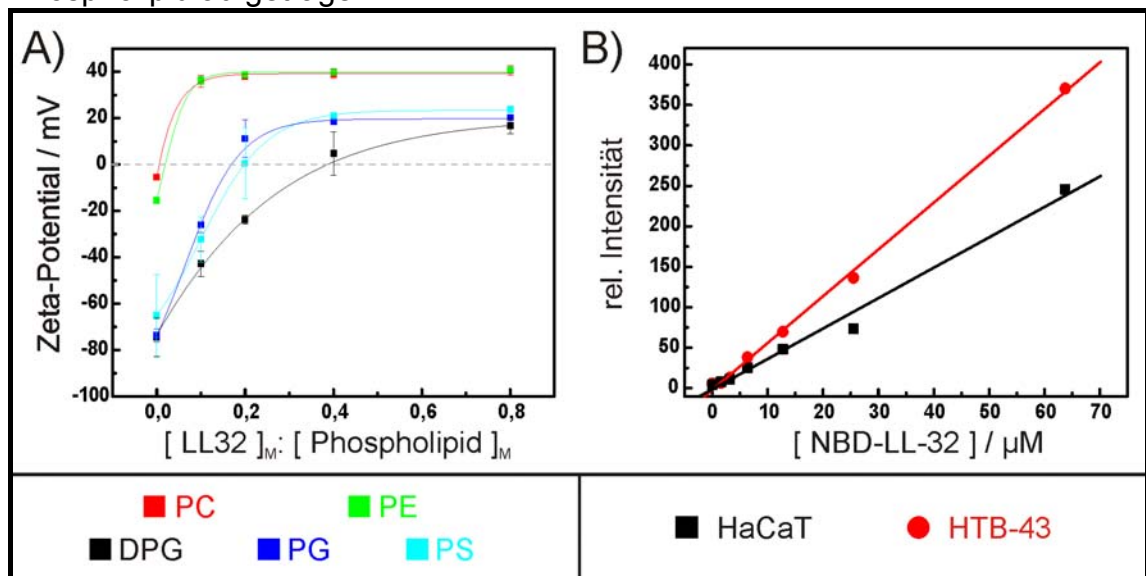


Abbildung 54 A) Verlauf des Zeta-Potentials der verwendeten natürlichen Phospholipide PC, PE, PS, PG und DPG in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis der LL-32 Konzentration zur Phospholipidkonzentration. Die Messungen wurden mit Vesikeln aus  $10 \mu M$  Phospholipid und mit einem ansteigenden molekularen Anteil an LL-32. Die Messungen wurden in einem Puffer mit  $10 \text{ mM TRIS}$ ,  $2 \text{ mM CsCl}$ ,  $\text{pH} = 7$  bei einer Temperatur von  $25^\circ \text{ C}$  durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 12 Einzelmessungen an drei unabhängigen Titrationsreihen. Diese wurden mit sigmoidialen Kurven angefüttet.

B) Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität von HaCaT und HTB-43 Zellen in Abhängigkeit von der mit NBD fluoreszenzmarkierten LL-32 Konzentration.  $5 \times 10^5$  Zellen befanden sich vor der durchflusszytometrischen Bestimmung  $20 \text{ h}$  in  $1 \text{ ml PBS}$  bei  $4^\circ \text{ C}$  mit verschiedenen Konzentrationen von NBD-LL-32. Die angegebenen Werte entstammen einer repräsentativen Messung und wurden mit einer linearen Regression ( $R > 0.99$ ) angefüttet.

Wie aus Abb. 54 A) ersichtlich ist, besitzen die negativ geladenen Phospholipide PS, PG und DPG nahezu das gleiche negative Zeta-Potential von ungefähr  $-50 \text{ mV}$ . Denn obwohl DPG doppelt so stark geladen ist, so ist auch seine Platzbedarf (Hagge et al., 2006) doppelt so groß und damit besitzt

es auch theoretisch dasselbe Oberflächenpotential wie PG und PS. Die zwitterionischen Phospholipide PE und PC haben ein geringes negatives Zeta-Potential von -5 mV und -15 mV. Mit steigendem Anteil von LL-32 wird das Zeta-Potential immer positiver, bis es einen Sättigungswert erreicht. Dieser ist bei PE und PC bei dem Verhältnis von 0,2 mit einem Zeta-Potential-Wert von +40, bzw. +39 mV erreicht. Bei den Phospholipiden mit einfacher negativer Nettoladung PS und PG ist er ab einem Verhältnis von 0,4 bei einem Potential von +23 mV bzw. +20 mV erreicht. Die Kurve für DPG erreicht den Sättigungswert von +20 mV erst bei einem Verhältnis von  $\geq 0,8$ .

### 4.4.1.3. Bindung von LL-32 an die HaCaT- und HTB-43-Zellen

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Bindung von LL-32, das mit dem Fluorophor NBD markiert wurde, an den HaCaT- und HTB-43-Zellen in Abhängigkeit von der NBD-LL-32 Konzentration bestimmt und in Abb. 54 B) dargestellt.

Bei den durchflusszytometrischen Versuchen wurde die gemessene Intensität eines Wellenlängen-Emissionsspektrum von NBD über der NBD-LL-32 Konzentration eingetragen, der die verschiedenen Zellen eine bestimmte Zeit lang ausgesetzt waren. Die Intensität ist eine einheitenlose relative Größe, da sie von verschiedenen Faktoren wie Fluoreszenzausbeute oder Verstärkereinstellungen abhängt. Deshalb wurde als Vergleich immer eine unbehandelte Kontrolle mitgemessen.

Die in Abb. 54 B) gezeigten Werte entstammen einer repräsentativen Messreihe, in der jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen nach 20 h in 1 ml PBS-Puffer bei 4° C mit unterschiedlicher Konzentration an NBD-LL-32 gemessen wurden. Die unbehandelte Kontrolle ist als 0  $\mu$ M NBD-LL-32 Wert eingetragen. Die Werte wurden durch eine lineare Regression angefitet, die im Graphen als Gerade eingezeichnet ist. Die Regressionen weisen einen Koeffizienten von  $R > 0,99$  (HaCaT) bzw.  $R > 0,999$  (HTB-43) auf.

Die Steigung der Geraden der Fluoreszenzintensität von HTB-43-Zellen ist 1,5-mal größer als die der entsprechenden Geraden für die HaCaT-Zellen.

### 4.4.1.4. Wirkung von LL-32 auf die Zelllinien

Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen am FACSCalibur wurde die Durchlässigkeit der Membranen von HaCaT- und HTB-43-Zellen bestimmt. Außerdem wurde getestet, ob LL-32 in HTB-43-Zellen Apoptose induziert. Dabei wurden neben NBD-LL-32 zwei weitere fluoreszierende Moleküle verwendet. Dies war Annexin V-FITC, ein mit dem gelb-grünen Fluorophor FITC markiertes Molekül, welches spezifisch an Phosphatidylserin bindet und Propidiumjodid (PI), ein rot emittierender Fluorophor, welcher nur passiv in die Zelle diffundieren kann und dort an DNA bindet. Damit ist er ein Maß für die Integrität der Zellmembran.

Die Auswirkung von LL-32 auf die Integrität der Zellmembran wurde an HaCaT- und HTB-43-Zellen, welche sich 12 Stunden in PBS mit 1  $\mu\text{M}$  NBD-LL-32 befanden, durchgeführt. Sie wurden mit einer PI-haltigen Lösung versetzt und nach einer bestimmten Zeit die relative Intensität von PI gemessen. Die Intensität des Kanals, mit dem das PI-Emissionsspektrum gemessen wird, ist ein relatives Maß für die Menge an internalisiertem PI. In Abb. 55 A) sind die relativen Fluoreszenzintensitäten von NBD-LL-32 und PI der beiden Zelltypen zusammen mit den FSC- und SSC-Intensitäten, welche Aufschluss über die Morphologie der Zelle liefert, als Blockdiagramme grafisch dargestellt. Die Intensitäten wurden auf Kontrollen, welche bis auf die NBD-LL-32-Wirkung gleichbehandelt wurden, normiert. Dieser Normwert von Eins ist im Graph als rote Gerade eingezeichnet. Die eingetragenen Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

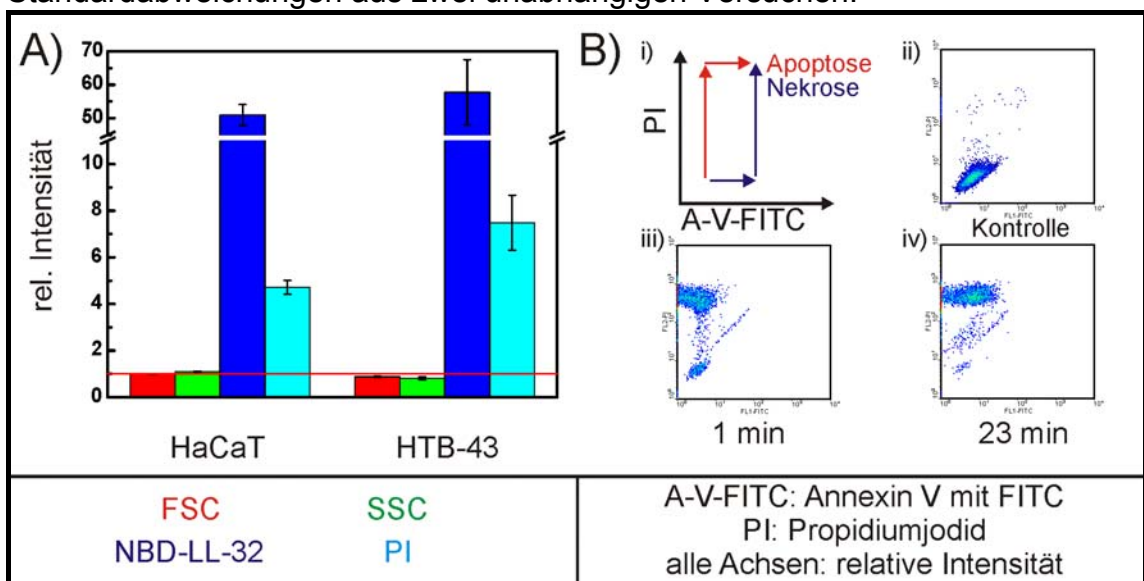


Abbildung 55 A) Durchflusszytometrisch bestimmte relative Intensität der FSC- (rot) und SSC- (grün) Kanäle und die Fluoreszenzintensität von NBD-LL-32 (blau) und Propidiumjodid (PI) (cyan) von HaCaT- und HTB-43-Zellen. Diese befanden sich vor der Messung 12 Stunden in PBS mit 1  $\mu\text{M}$  NBD-LL-32. Die Intensitäten wurden auf die gleichbehandelte Kontrolle ohne Peptid normiert, welche als rote Gerade eingezeichnet ist. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

B) Graphen zum Test auf apoptotisches Verhalten. i) In einem Diagramm, welches die Propidiumjodid (PI) Konzentration in Abhängigkeit von der Konzentration von Annexin V-FITC, zeigt sich ein Unterschied von Zellen welche durch Apoptose (blau) oder Nekrose (rot) absterben. Apoptotische Zellen binden erst mehr Annexin V und anschließend kann PI in die Zelle gelangen, während bei der nekrotischen Zelle eine PI-Internalisierung vor einer erhöhten Annexin V-Bindung stattfindet. Fluoreszenzintensitätsverteilung von HTB-43-Zellen ohne (ii) und mit 25  $\mu\text{M}$  LL-32 nach 1 min (iii) bzw. 23 min (iv). Dabei ist jeder Punkt eine gemessene Zelle, die Helligkeit gibt die Häufigkeit an. X- und y-Achse sind die relativen Intensitäten des fluoreszierenden Annexin V-FITC bzw. PI.

Während die FSC- und SSC- Werte von NBD-LL-32 ausgesetzten Zellen nur eine geringe Änderung im Vergleich zur Kontrolle zeigten, änderten sich die relativen Intensitäten für Grün-fluoreszentes NBD-LL-32 und PI deutlich. Der FSC-Wert der HaCaT-Zellen blieb unverändert, während der der HTB-43-Zellen leicht sank. Der SSC-Wert der HaCaT-Zellen stieg leicht, während der der HTB-43-Zellen sank. Die Anstiege der Fluoreszenzintensitäten waren im Fall der HTB-43-Zellen, sowohl bei denen von NBD-LL-32 (+13%) als auch bei denen von PI (+59%) verursachten, höher als im Fall der HaCaT-Zellen.

Die Fragestellung, ob LL-32 Apoptose in HTB-43-Zellen induziert, wurde mithilfe der Farbstoffe PI und Annexin V-FITC untersucht. Annexin V-FITC bindet vermehrt an Phosphatidylserin und somit ist die Menge an gebundenem Annexin V-FITC ein Maß für die Ladung der Membran. Im Frühstadium der Apoptose wird vermehrt das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin in die Außenseite der Membran transferiert und anschließend wird die Integrität der Membran zerstört, während bei der Nekrose zuerst die Zellhülle permeabel wird und dadurch eine erhöhte Anzahl an negativ geladenen Lipiden zugänglich wird. Damit unterscheidet sich die zeitliche Abfolge der beiden Prozesse in einem Diagramm, welches die Menge an internalisiertem PI über der Menge an gebundenen Annexin-V-FITC angibt (Abb. 55 B). Die Graphen (ii) bis (iv) in der Abbildung sind sogenannte Dot-Blots und stellen die Verteilung der gemessenen Zellen in einem Diagramm dar. Dabei ist bei allen drei Graphen die Abszisse die relative Fluoreszenzintensität von Annexin V-FITC und die Ordinate die von PI. Jeder Punkt in den Graphen repräsentiert die zwei Parameter einer gemessenen Zelle und die Helligkeit gibt die Messhäufigkeit an. Die drei Dot-Blots stammen aus einer repräsentativen Messung mit 25  $\mu\text{M}$  LL-32 auf  $10^6$  HTB-43-Zellen pro ml. Auch bei sehr geringen LL-32 Konzentrationen ergab sich ein grundsätzlich gleiches Verhalten. Die unbehandelte Zellpopulation aus (ii) zeigt nach 1 min (iii) bereits eine erhöhte PI-Färbung, während die Intensität der Fluoreszenz von Annexin V-FITC nicht ansteigt. Nach 23 min (iv) sind die allermeisten Zellen maximal mit PI gefärbt. Nun ergibt sich auch eine leichte Erhöhung der durchschnittlichen Annexin V-FITC Fluoreszenz. Damit löst LL-32 in HTB-43-Zellen Nekrose aus.

Mithilfe der konfokalen Mikroskopie wurden Fluoreszenzaufnahmen von Zellen der Zelllinien HaCaT und HTB-43 mit einer Kern -und Membranfärbung angefertigt. Zu diesen Zellen wurde fluoreszenzmarkiertes LL-32 gegeben, um deren Bindungsort und dessen Wirkung auf die Zelle zu bestimmen. Die Versuche sind in 3.8.4. beschrieben.

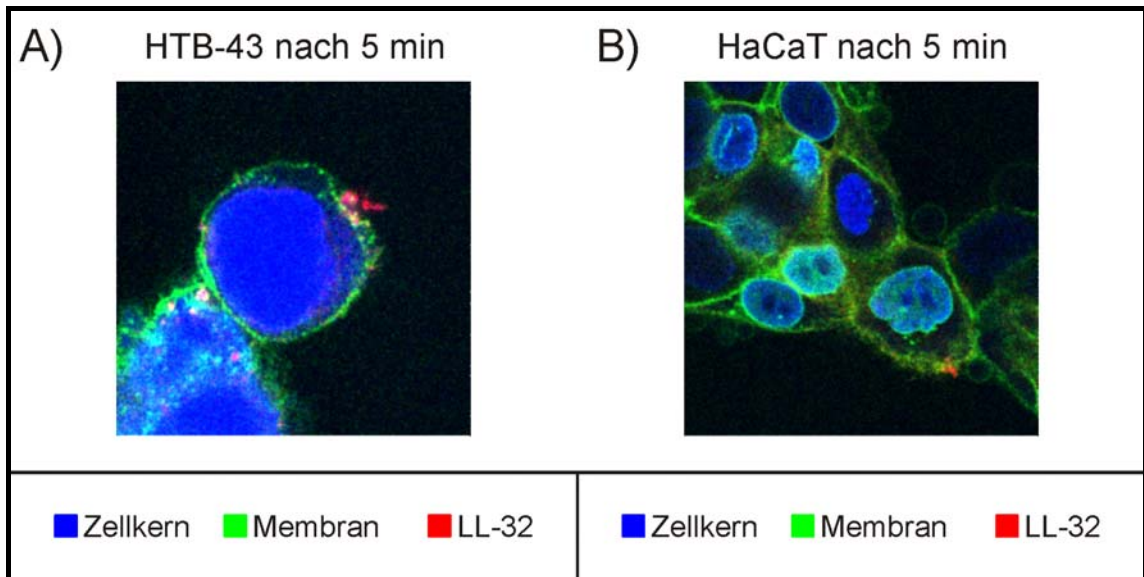


Abbildung 56: A) Konfokale Aufnahme einer HTB-43 Zelle mit fluoreszenzmarkierter Membran und Zellkern. Das fluoreszenzmarkierte LL-32 lag mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  vor. Die Inkubationszeit von LL-32 betrug 5 min.

B) Konfokale Aufnahme einer HaCaT-Zelle mit den gleichen Bedingungen wie in A).

Aus den Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop wurden zwei repräsentative ausgewählt und in Abb. 56 dargestellt. Wie zu erkennen, bindet LL-32 bereits nach 5 min Wirkzeit vornehmlich an die Membran der beiden Zelllinien und führt dort zu Läsionen und einer Zerstörung der Membranintegrität. Außerdem ist zu erkennen, wie kleinere Membranfragmente durch LL-32 aus der Membran gelöst werden. Ein Unterschied in der Bindefähigkeit konnte nicht sicher festgestellt werden, die Aussagen aus diesem Versuch beschränken sich auf den Bindungsort von LL-32 und die dortige Wirkung.

#### 4.4.2. Diskussion

##### 4.4.2.1. Bindung von LL-32 an Modell- und Zellmembranen

Durch die Daten zur Lysefähigkeit von LL-32 gegen die HaCaT- und HTB-43-Zellen geht eine antitumorale Aktivität von LL-32 hervor. Diese ist allerdings nicht besonders stark ausgeprägt.

Aus den in Abb. 54 dargestellten Zeta-Potential-Verläufen von als Modellmembranen benutzten Vesikeln aus verschiedenen Phospholipiden geht hervor, dass eine Sättigung der LL-32 Bindung bei Lipiden ohne Nettoladung (PC und PE) schon bei einem molaren Konzentrationsverhältnis von Peptid zu LPS von 0,2 eintritt. Bei den Lipiden mit einfacher Nettoladung (PG, PS und DPG) dagegen tritt eine Sättigung des Zeta-Potentials erst bei einem molaren Verhältnis von 0,4 auf. Damit können doppelt so viele LL-32 Moleküle an die

geladenen Lipide binden wie an die ungeladenen. Das zweifach geladene Lipid DPG kann mindestens die doppelte Anzahl an LL-32 Molekülen binden wie die einfach geladenen. Demnach ist die Bindung von LL-32 stark von der Ladung der Lipidmoleküle abhängig und je mehr Ladung das Lipid besitzt, desto mehr LL-32 kann es binden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Befunden für LL-37 (Neville et al., 2006).

Sowohl bei den ungeladenen als auch bei den geladenen Lipiden bewirkt LL-32 eine sehr starke Überkompensation des Zeta-Potentials, wobei das der ungeladenen Lipide mit +40 mV doppelt so hoch ist wie das der geladenen. LL-32-Aggregate besitzen ein Zeta-Potential von etwa +40 mV (Daten werden aus Platzgründen nicht gezeigt). Bei den geladenen überlagert sich folglich deren eigenes negatives Potential mit dem von LL-32, was damit auch eine geringere Überkompensation erwarten lässt. Bei den ungeladenen spielt nur das Potential von den LL-32 Molekülen eine Rolle. Insgesamt wird durch LL-32 das Zeta-Potential von geladenen Lipiden um 100 mV geändert, das der ungeladenen nur um 50 mV. Damit ergibt sich wiederum, dass doppelt so viele LL-32 Moleküle an geladene Lipide binden können wie an ungeladenen.

Damit ist gezeigt, dass die Bindung von LL-32 an die Modellmembranen stark ladungsabhängig ist und dass LL-32 an einfach geladene Lipidmembranen anteilmäßig doppelt so stark bindet wie an ungeladenen.

Eigene Tests ergaben, dass die zytotoxische Aktivität gegen Erythrozyten von NBD-LL-32 identisch zu der Aktivität von LL-32 ist.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von LL-32 an HaCaT und HTB-43 Zellen zeigt, dass das fluoreszenzmarkierte LL-32 an den als Tumorzelllinien verwendeten HTB-43-Zellen ab einer LL-32 Konzentration von ca. 8  $\mu\text{M}$  anteilmäßig 1,5-mal so stark bindet wie an die Zellen der HaCaT-Zelllinie. Unterhalb dieser Konzentration ist kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Offenbar kann bei geringen Konzentrationen und damit niedrigen molaren Verhältnissen von LL-32 zu Lipiden der Zellmembran LL-32 noch vollständig von beiden Zellen gebunden werden. Außerdem ist der Anteil an gebundenem LL-32 bis zu einer Konzentration von ca. 65  $\mu\text{M}$  proportional zur eingesetzten LL-32 Konzentration, was dafür spricht, dass es kein spezifisches Rezeptormolekül für LL-32 auf den Zellmembranen gibt. Dies spricht demnach auch für eine Bindung der LL-32 Moleküle an Lipide der Membran.

Aus den Ergebnissen lässt sich der Schluß ziehen, dass eine ladungsabhängige Bindung von LL-32 an die Phospholipide der Zellmembran die Ursache für die erhöhte Bindung an einer tumorbildenden Zelllinie ist. Tumorbildende Zellen weisen einen erhöhten Anteil an negativen Phospholipiden in der äußeren Schicht der Zellmembran gegenüber normalen körpereigenen Zellen auf (Schröder-Borm et al., 2005).



#### 4.4.2.2. Wirkung von LL-32 auf die Zellmembran von HaCaT- und HTB-43-Zellen

Bei der Untersuchung der Wirkung von LL-32 wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  LL-32 eingesetzt. Bei dieser Konzentration lag nur ein geringer, aber nicht signifikanter Unterschied in der Anzahl an gebundenem LL-32 bei den beiden Zelllinien vor. Dieses Verhalten ist stimmig mit dem zuvor ermittelten. Aber die an HTB-43 gebundenen LL-32 Moleküle bewirkten einen höheren Influx von PI und damit eine größere Lochbildung in der Zellmembran von HTB-43 als von HaCaT. Durch Gate-Setzung wurde erreicht, dass nur Zellen mit einer ursprünglichen Morphologie (FSC und SSC-Werte bleiben unverändert) gemessen wurden. Damit wurde auch gezeigt, dass die Permeabilisierung der Membran eine Folge der LL-32 Bindung ist und nicht durch das Absterben der Zellen verursacht wird. Aus dem Verhältnis von eindiffundiertem PI und gebundenem LL-32 geht hervor, dass die gleiche Anzahl gebundener LL-32 Moleküle bei den HTB-43 Zellen eine stärkere Permeabilisierung der Zellmembran hervorruft als bei den HaCaT-Zellen. Bei den durchflusszytometrischen Messungen an Bakterien zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Damit ist nicht nur die Bindung von LL-32 bei HTB-43 Zellen stärker als bei HaCaT-Zellen, sondern auch die Läsionsbildung pro gebundenem LL-32 Molekül.

Um zu überprüfen, ob LL-32 bei den verwendeten Zelllinien den nekrotischen oder den apoptotischen Zelltod auslöst, wurde ein sogenannter Apoptosis Detection Kit verwendet und dessen Kinetik nach Zugabe von LL-32 aufgenommen. Das Fragment FR-27 (5.1.) induziert Apoptose beim schuppigen Mundzellkarzinom (Okumura et al., 2004).

LL-32 wirkt nicht apoptotisch, sondern verursacht einen nekrotischen Zelltod, wie aus dem zeitlichem Verlauf der Bindung von Annexin V an und dem Einfluss von PI in die Zelle eindeutig hervorgeht. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den im konfokalen Mikroskop beobachteten Effekten auf die Zellmembran.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungen eine antitumorale Aktivität von LL-32 zeigen d.h. die abtötende Aktivität gegen die tumorbildende Zelllinie ist größer als die gegen die Keratinozytenzelllinie. Die Grundlage für diese Wirkung scheint die festgestellte ladungsabhängige Bindung von LL-32 an die Phospholipide der Zellmembran zu sein. Dieses Verhalten wurde für das Mutterpeptid LL-37 bereits gezeigt (Neville et al., 2006). Gebundenes LL-32 führt dort zu einer Läsionsbildung, wie dies auch bei Bakterien der Fall ist. Dabei kann an die Zellmembran der HTB-43 Zellen gebundenes LL-32 eine stärkere Läsionsbildung hervorrufen als das an die HaCaT Zellen gebundene. Dieses Verhalten konnte auch bei den elektrophysiologischen Patch-Messungen an HaCaT- und HTB-43-Zellen

beobachtet werden. Diese Messungen wurden aus Platzgründen nicht dargestellt. Die Ladung der Lipide der Zellmembran scheint nicht nur die Bindung von LL-32 zu beeinflussen, sondern auch die Läsionsbildungsfähigkeit. Ein derartiges Verhalten wurde auch in den Untersuchungen zur Bindung und Wirkung gegen Bakterien festgestellt. Außerdem führt LL-32 offenbar zu einer Mizellierung und Zerstörung der Membran, wie aus den konfokalen Aufnahmen hervorgeht. Die nekrotische Wirkung konnte durch den Ausschluss einer Induktion von Apoptose bestätigt werden.

Das vorgeschlagene *Carpet*-Modell kann somit für die Wirkung gegen tumorbildende und nicht-tumorbildende Zellen bestätigt werden. Die quantitativen Wirkungsunterschiede sind durch die erhöhte Bindung von LL-32 an negative Phospholipide und der daraus resultierenden erhöhten Läsionsbildung in der Zellhülle zu erklären. Die Erkenntnisse sind übereinstimmend mit denen aus den Versuchen mit Bakterien.

Um die nicht stark ausgeprägte antitumorale Aktivität von LL-32 zu steigern, sollten die Untersuchungen mit den LL-32 Fragmenten wiederholt werden. Aus den Ergebnissen könnten dann, wie in dieser Arbeit für die antibakterielle Aktivität gezeigt, Rückschlüsse für eine in Hinblick auf eine antitumorale Aktivität optimierte Peptidstruktur gezogen werden.

## 4.5. Diskussion der Wirkmechanismen

Im vorherigen Kapitel wurden die Ergebnisse der Untersuchung zur antitumoralen Aktivität von LL-32 und der Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen PMB, bzw. LL-32 und LPS einzeln interpretiert. Dabei wurde bereits umfassend auf die Bedeutung der biologischen Aktivitäten der LL-32 Fragmente für eine Optimierung der LL-32 Aminosäuresequenz in Hinblick auf eine medizinische Nutzung und starke Stammabhängigkeit der antibakteriellen Aktivitäten eingegangen.

In dieser abschließenden Diskussion wird der vorgeschlagene antibakterielle Wirkmechanismus für die Peptide anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und der Literatur diskutiert. Außerdem wird ein möglicher Wirkmechanismus für die antiinflammatorische Aktivität in Bezug auf die Inhibierung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Ausschüttung aufgezeigt.

### 4.5.1. Antibakterieller Wirkmechanismus

Da die antibakterielle Wirkung aller getesteten Peptid bei einem Peptid-Unterschuss und nicht wie die antiinflammatorische Aktivität bei einem großen Überschuss stattfindet, scheint nicht ein globaler Effekt auf die gesamte LPS-Schicht vonnöten zu sein, um das Bakterium abzutöten. Die in der Literatur beschriebenen Modelle gehen entweder von einer letal wirkenden Läsionsbildung aus (2.11.) oder von einer durch Läsionsbildung selbstvermittelten Aufnahme der Peptide aus (Hancock, 1997; Matsuzaki, 1999; Brogden, 2005). Für LL-32 ist der weitestgehend akzeptierte Wirkmechanismus durch das *Carpet*-Modell beschrieben. Durch die Bindung oder Insertion von Peptidn wird ein Stress auf die LPS-Schicht ausgeübt, der sie letztendlich kollabieren lässt. Dabei schnürt sich die Lipiddoppelschicht bis zur Verbindung beider Einzelschichten ein und es entstehen Läsionen und herausgelöste Mizellen.

Dafür muss das Peptid schon bei einem deutlichen Unterschuss zum LPS an die LPS-Schicht binden und inserieren können. Damit sollte diese Eigenschaft mit der antibakteriellen Aktivität korreliert sein (Gutsmann et al., 2005). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl an aus LPS rekonstituierten Modellsystemen, als auch an Bakterien gezeigt.

Die Bindung an LPS-Aggregate ist sowohl für das antibakterielle Peptid PMB als auch für das antibakterielle Peptid LL-32 gezeigt worden, dabei war die Bindung von LL-32 an LPS-Aggregaten von einem sensitiveren Stamm auch stärker als an Aggregaten aus dem LPS von einem nicht so sensitiven Stamm. Dies war für PMB nicht der Fall. Für beide Peptide konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Bakterien mit der antibakteriellen Aktivität gegen diese korreliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Peptide mit einer geringeren

antibakteriellen Aktivität auch an Aggregate aus LPS der entsprechenden Stämme deutlich schlechter binden konnten.

Aus den durchflusszytometrischen Messungen geht hervor, dass LL-32 bei Gram-negativen Bakterien innerhalb kürzester Zeit an die Zellhülle bindet und infolgedessen Läsionen verursacht. Eine längere Glycostruktur scheint die Läsionsbildung durch gebundenes LL-32 zu verringern. Literaturangaben zu einer durchflusszytometrischen Bestimmung der Bindung von antibakteriellen Peptiden an Bakterien sind dem Autor nicht bekannt. Eine Läsionsbildung in LPS-Schichten durch PMB ist in der Literatur belegt (Bhor et al., 2005), sie wird durch die Glycostruktur des LPS beeinflusst (Hammer, 2004). Die Bildung von Läsionen in rekonstituierten asymmetrischen Membranen durch LL-32 ist beschrieben worden (David, 2004).

Auch wenn die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen an Zellen und nicht an LPS-haltigen Bakterien angefertigt worden sind, so ist nach Inkubationszeiten von einigen Minuten eine Mizellenbildung deutlich zu erkennen, ebenso wie die gestörte Zellmembran (Abb. 56). Außerdem ist die Bindung von LL-32 an die Zellmembran zu erkennen.

Die Läsionen sind noch nicht sofort tödlich, wie an den ITC-Messungen an Bakterien deutlich wird, die Bakterien können noch im begrenztem Maße durch Hochregulation des Stoffwechsels gegen die für sie negativen Auswirkungen angehen. Ob LL-32 infolge der Läsionsbildung und einer selbst vermittelten Aufnahme eine intrazelluläre Zielstruktur erreichen kann und deshalb tödlich wirkt, oder ob ab einer gewissen Anzahl bzw. Größe der Läsionen in der Zytoplasmamembran die letale Wirkung von LL-32 eintritt, kann nicht entschieden werden. Dies sollte jedoch zukünftig durch molekularbiologische Versuche aufgeklärt werden. In beiden Fällen korreliert aber die Fähigkeit zu binden und Läsionen zu bilden mit der letalen Fähigkeit. Dies konnte für LL-32 gezeigt werden und damit auch dessen unterschiedliche antibakterielle Fähigkeit gegen Bakterienstämme mit unterschiedlicher Glycostruktur am LPS.

Aus den vorliegenden Ergebnissen zu den antibakteriellen Aktivitäten der Peptide geht eindeutig hervor, dass eine Substitution am K(d)o die antibakterielle Aktivität hemmt. Eine Substitution am Lipid A wirkt sich nur für einige der Peptide negativ aus. Offenbar ist eine mögliche Bindung an die Ladungen am Lipid A nicht so essentiell für eine antibakterielle Wirkung wie eine Bindung am K(d)o. Zukünftige Arbeiten könnten jedoch diesen Aspekt weiter aufklären.

Vermutet wird, dass die LPS untereinander durch zweiwertige Ionen verbrückt werden. Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass die antibakterielle Aktivität von LL-32 in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und insbesondere  $Ca^{2+}$  ( $K^+$  hemmt ebenfalls stärker als  $Na^+$ ) deutlich geringer ist als in Abwesenheit der beiden Ionen (5.5.). Sind die Ladungen substituiert, fällt auch die Verbrückung und damit verbundene Stabilisierung der LPS-Schicht schwächer aus. Demnach

müssen die Peptide einen geringeren Stress auf die LPS-Schicht ausüben, bevor diese aufreißt und sich Läsionen bilden. Dies könnte mithilfe der Durchflusszytometrie und dem Farbstoff PI an Bakterien in unterschiedlichen Puffern überprüft werden. Das Verhältnis von gebundenem NBD-LL-32 und PI sollte bei einem Puffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  höher als bei einem Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  sein. Die gehemmte Aktivität von membranaktiven Peptiden durch die Stabilisierung der LPS-Schicht kann durch das *Carpet*-Modell erklärt werden.

Dadurch dass beide Peptide mit den als Helix-Brechern bezeichneten Glycin großteils besser als LL-32 wirken, scheint für eine antibakterielle Wirkung keine bestimmte Orientierung vom N-Terminus zum C-Terminus nötig zu sein. Das Fragment LL15KR15 besitzt keine durchgehende hydrophile bzw. hydrophobe Seite mehr. Seine ausgeprägte antibakterielle Aktivität spricht gegen das Toroidal-Modell als Wirkmechanismus, da dort die entstehenden Poren von der hydrophilen Seite eines Peptids gebildet werden. Diese Erkenntnis ist in guter Übereinstimmung mit dem in der Literatur favorisiertem *Carpet*-Modell (Shai und Oren, 2001).

Das für PMB vorgeschlagene Detergens-Modell fordert im Gegensatz zum *Carpet*-Modell die Aufkonzentration der Peptide an der Membranoberfläche bis mindestens zur CAC. Als Mizellen vorliegend können die Peptide in die LPS-Schicht inserieren. Diese Aufkonzentrierung könnte durch eine längere Glycostruktur des LPS gefördert werden, wie in 4.2.2. beschrieben.

#### **4.5.2. Antiinflammatorischer Wirkmechanismus**

In dieser Arbeit konnte die antiinflammatorische Aktivität von LL-32 anhand der Inhibierung der  $\text{TNF-}\alpha$  Ausschüttung von MNC nach LPS-Stimulation gezeigt werden. Die für LL-37 gezeigte  $\text{TNF-}\alpha$  Inhibierung ist in der Literatur beschrieben (Zughaier et al., 2005). Für die antiinflammatorische Wirkung von Peptiden existiert bislang kein Modell.

LPS-Aggregate, nicht Monomere, sind die biologisch aktive Form von LPS (Mueller et al., 2004). Damit ist es gut möglich, dass die Aggregatform relevant für die inflammatorische Aktivität des LPS ist, dass das Aggregat bildet. Wird die Aggregatform, wie die Größe, durch Aggregation oder Fusionierung mehrerer Aggregate geändert, könnte dies eine aktivitätsändernde Wirkung besitzen und damit eine mögliche Erklärung für die antiinflammatorische Aktivität von LL-32 sein.

Die Erkennung von LPS-Aggregaten durch das Immunsystem wird wahrscheinlich durch Bindung von LBP initiiert. Anschließend wird wahrscheinlich durch LBP der Einbau der LPS-Aggregate in MNC vermittelt (Gutsmann et al., 2007).

Damit wird die Signalkaskade zur Zytokinproduktion der Zelle gestartet (2.4.). Möglich ist, dass die Bindungs- und Insertionsfähigkeit von LBP durch vorher ans LPS-Aggregat gebundene Peptide verloren geht. Dies könnte zum einen

daran liegen, dass das Gouy-Chapman-Potential der LPS-Schicht durch die Anlagerung von kationischen Peptiden kompensiert wurde. Da aber bei allen verwendeten Substanzen und LPS Unterschiede bei einem molaren Verhältnis von 0 bis 2 auftraten, und die inflammatorische Aktivität bei einem molaren Peptid-Überschuß von 400 Unterschiede aufweist, ist dies eher unwahrscheinlich. Auch die beobachteten Größenänderungen waren zwar für antiinflammatorisch wirksame Peptide bei geringerer Konzentration größer, aber bei hohen Peptidkonzentration nahezu ähnlich. Jedoch könnte die Fähigkeit, auch bei geringer Konzentration die Aggregatform zu ändern, von einer starken Bindungsfähigkeit oder stärkerer Insertion des hydrophoben Bereichs der Peptide bewirkt werden.

Binden ausgesprochen viele Peptide an ein LPS-Aggregat und können mit ihren hydrophoben Teilbereichen in die Kohlenwasserstoffkettenbereiche der LPS-Schicht eindringen, könnte es sein, dass das LBP anschließend an die abgesättigten Stellen nicht mehr binden kann, weil es nicht mehr mit den Acylketten vom LPS interagieren kann. Da die Bindung von LBP vermutlich auch durch einen hydrophoben Teilbereich unterstützt wird, müsste dieser nicht mehr in eine LPS-Schicht eindringen, sondern eher in eine Peptidschicht mit darin enthaltenem LPS. Dafür muss das Peptid die LPS-Schicht jedoch völlig umstrukturiert haben. Die Bindung in diese Peptid-LPS-Schicht wäre ein völlig anderer Insertionsprozess und könnte daher nicht möglich sein. Da durch die Erhöhung der Bindungsenergie der einzelnen LPS Moleküle in den gemischten Aggregaten die LPS-Aggregate einen energetisch günstigeren Zustand im Vergleich zu ihrer Konformation ohne Peptid eingenommen haben, müsste die LBP Bindung eine wesentlich größere Energieminimierung des Systems bewirken, um die LPS-Aggregate in MNC einbauen zu können. Dabei müsste LBP die von hunderten Peptiden bewirkte Aggregatform ändern. Dies wäre energetisch kaum denkbar. Sowohl die Verhinderung der hydrophoben Wechselwirkung als auch der Lamellarisierung setzen einen massiven Überschuss an Peptid voraus. Da nur wenige LBP-Moleküle an ein LPS-Aggregat binden müssten, müssen alle Bindungsplätze abgesättigt sein. Die Bindung von LBP an LPS-Schichten mit der daraus resultierenden Lamellarisierung ist ein energetisch äußerst günstiger Prozess, deshalb müssten auch hier viele Peptidmoleküle vorher gebunden haben.

In beiden Fällen müssen die Peptidmoleküle jedoch in der Lage sein, die Form eines Aggregates nicht nur zu ändern, sondern auch Aggregate miteinander fusionieren zu lassen und die LPS-Schichten neu zu organisieren. Dieser Zusammenhang konnte durch die Daten aus dem FRET-Assay belegt werden (4.3.1.1.). Dabei hemmt die Glycostruktur des LPS die antiinflammatorische Aktivität stärker als Substitutionen am LPS.

Auch mit dem vorgeschlagenen antibakteriellen Wirkmechanismus des *Carpet*-Modells sind diese Befunde in Übereinstimmung. Es ist sehr gut vorstellbar, dass nach einer Läsionsbildung die Mizellierung der LPS-Schicht bei einer

höheren Peptidkonzentration immer stärker zunimmt. Bei einem großen Überschuss könnte sich die gesamte LPS-Schicht in kleine Mizellen aus Peptid mit LPS umorganisiert haben und diese lagern sich zu großen Aggregaten zusammen. Nach der obigen Wirkweise wäre somit die antiinflammatorische Wirkung von LL-32 erklärbar und mit physikalischen Daten belegt.

#### 4.5.3. Zytotoxischer Wirkmechanismus

Es wird davon ausgegangen, dass der Wirkmechanismus gegen körpereigene Zellen wie Erythrozyten ein ähnlicher ist wie bei den Bakterien und auch mit einem *Carpet*-Mechanismus beschrieben werden kann. Eine entscheidende Rolle für die Wechselwirkung mit Lipidmembran scheint die Ladung der Lipide zu spielen. Dies wird im Allgemeinen für membranaktive kationische Peptide vermutet (Zaslouff, 2002) (und konnte auch für LL-37 gezeigt werden (Neville et al., 2006)). Die membranaktive Wirkung und Mizellierung der zellulären Membran wird durch die konfokalen Aufnahmen und der durchflusszytometrischen Daten an den HaCaT-Zellen belegt. Vermutlich muß LL-32 für eine membranaktive Wirkung tief genug in den Acylkettenbereich der Membran eindringen können, um eine Läsionsbildung zu induzieren (Henzler-Wildman et al., 2004).

Da deren Membran jedoch nur wenige geladene Lipide nach außen präsentiert, scheint eine Ladungswechselwirkung von LL-32 mit dem Lipid nicht essentiell zu sein. Wie die Wirkung gegen die tumorbildende HTB-43 Zelllinien jedoch zeigt, steigert die Ladungswechselwirkung die LL-32 Wirkung deutlich. Wie jedoch besonders an den Peptiden LL15KR15 und 2G zu sehen ist, ist das hydrophobe Moment des Peptids auch nicht alleine ausschlaggebend.

Aus den Ergebnissen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von LL-32 ist ebenfalls zu erkennen, dass einzelne Aminosäurebereiche eine wichtige Rolle bei der zytotoxischen Wirkung spielen. Einen wesentlichen Einfluss auf die geringere Aktivität gegen Körperzellen könnte deren Cholesterolgehalt und die damit reduzierte Insertion sein ((Henzler-Wildman et al., 2004)). Dies könnte durch physikalische Untersuchungen an Modelllipidmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt verifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen den Peptiden Polymyxin B und LL-32 mit LPS untersucht. Die membranaktive Wirkung beider Peptide konnte gezeigt werden. Durch vergleichbare Messungen an Bakterien, bzw. Zellen und Modellmembranen konnte sowohl die Gültigkeit der Modelle bestätigt werden, als auch eine direkte Korrelation der biologischen Aktivität durch physikalische Messungen erzielt werden. So ist z.B. die durch LL-32 induzierte Läsionsbildung in HTB-43-Zellen und in R595-Bakterien größer als in den nicht so sensitiven HaCaT-Zellen und R60-Bakterien. Die Glycostruktur vom LPS und Substitutionen am LPS beeinflussen die Bindung und die folgende Läsionsbildung.

Aus der Charakterisierung der antibakteriellen, antiinflammatorischen und zytotoxischen Aktivität von verschiedenen LL-32 Fragmenten konnten Aminosäurecluster identifiziert werden, die für die unterschiedlichen Aktivitäten von essentieller Bedeutung sind. Dies könnte Bedeutung für zukünftige Neuentwicklung von Therapeutika haben, da eine zielgerichtete Strukturverbesserung möglich ist.



## 5 Appendix

Im Anhang dieser Arbeit befinden sich Ergebnisse aus Versuchen und Methoden, die nicht im Hauptteil dieser Arbeit besprochen bzw. abgebildet wurden, aber in der Diskussion verwendet wurden. Außerdem wird ein Überblick über die Ergebnisse aus der Literatur für Fragmente von LL-37 geliefert und das Zeta-Potential wird hergeleitet.

### 5.1. LL-37 Fragmente

Für einige Fragmente von LL-37 konnten ähnliche Eigenschaften gezeigt werden wie für LL-37 selbst. Andere Fragmente allerdings besaßen verbesserte, gar keine oder stark reduzierte Eigenschaften. In den Aminosäuresequenzen sind die im Vergleich zum LL-37 fehlenden Aminosäuren durchgestrichen.

Für das Fragment LL-29 ( LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL ~~RN LV PR TE S~~) konnte gezeigt werden, dass es eine antibakterielle Aktivität bei einer Konzentration von 40 µM gegen den *E. coli* Stamm K12 besitzen (Li et al., 2007).

Bei LL-23 ( LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI ~~KD FL RN LV PR TE S~~) konnte auch bei einer Konzentration von 150 µM keine antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* K12 festgestellt werden (Li et al., 2007).

LL-21 (LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI ~~VQ RI KD FL RN LV PR TE S~~) besitzt ähnliche chemotoxische Wirkung auf Granulozyten wie LL-37, kann aber nicht die Produktion von LPS-induzierten vaskulären Stickoxiden unterbinden (Sigurdardottir et al., 2006).

Das Bruchstück GD-35 (~~LL~~ GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) besitzt eine geringere antibakterielle und hämolytische Aktivität als LL-37 (Johansson et al., 1998; Murakami et al., 2004; Yamasaki et al., 2006).

Für FF-33 (~~LL GD~~ FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) wurde beschrieben, dass es eine höhere Salzkonzentration als LL-37 benötige, um eine  $\alpha$ -Helix auszubilden, und deshalb auch eine geringere Aktivität gegen den *E. coli* Stamm D21 besitzt (Johansson et al., 1998). Andere Untersuchungen ergaben aber, dass FF-33 eine ähnliche antibakterielle Aktivität wie LL-37 aufweist, aber halb so hämolytisch ist, da FF-33 in zwitterionischen Membranen nicht dimerisiert und diese nicht permeabilisiert (Oren et al., 1999).

Das Peptid SK-29 ( ~~LL GD FF RK~~ SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) zeigt antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* K12 bei einer Konzentration von 80 µM (Li et al., 2007) und benötigt eine höhere Salzkonzentration um eine  $\alpha$ -Helix auszubilden (Johansson et al., 1998). Im Vergleich zu LL-37 wirkt es gegen den *E. coli* Stamm D21 schlechter (Johansson et al., 1998).

KI-26 ( ~~LL GD FF RK SK EK~~ IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) ist nicht lytisch gegen Erythrozyten und Keratinozyten, besitzt aber eine antibakterielle Aktivität gegen Wildtypstämme (Lopez-Garcia et al., 2007).

Für KR-20 ( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE FK~~ RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) konnte gezeigt werden, dass es gegen *E. coli* K12 ab 60 µM antibakteriell wirkt (Li et al., 2007), eine antibakterielle Aktivität gegen Wildtypstämme zeigt, aber nicht lytisch gegen Erythrozyten und Keratinozyten wirkt (Lopez-Garcia et al., 2007).

Die Substanz FK-21 ( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE~~ FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S) besitzt mit LL-37 vergleichbare chemotaxische Eigenschaft auf Granulozyten, konnte aber nicht die Produktion von LPS-induzierten vaskulären Stickoxiden unterbinden (Sigurdardottir et al., 2006).

Das Fragment FR-27 ( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S~~) und zwei modifizierte Varianten mit einer erhöhten Hydrophobizität zeigten im Vergleich zu LL-37 sowohl eine erhöhte antibakterielle Aktivität als auch eine stärkere LPS-Bindung (Isogai et al., 2003a; Isogai et al., 2003b). Außerdem soll FR-27 beim schuppigen Mundzellenkarzinom (*Oral squamous cell carcinoma*) Apoptose induzieren (Okumura et al., 2004).

Das Peptid RK-21( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S~~) besitzt im Vergleich zu LL-37 eine geringere antibakterielle und hämolytische Aktivität. (Johansson et al., 1998; Murakami et al., 2004; Yamasaki et al., 2006). Eine andere Gruppe beschrieb, dass RK-21 erst durch eine Membranumgebung eine  $\alpha$ -helikale Struktur ausformen soll und ebenso wie LL-37 ein breites antibakterielles Spektrum besitzt, aber spezifischer gegen spezielle bakterielle Stämme wirkt (Dürr et al., 2006).

Für IG-22 ( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S~~) wurden optimale antibakterielle und LPS-bindende Eigenschaften mit niedriger proinflammatorischer und zytotoxischer Aktivität beschrieben (Nell et al., 2006).

GK-21 ( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S~~) besitzt eine breitere antimikrobielle Aktivität als LL-37 und diese ist eventuell sogar etwas stärker ausgeprägt. Auch die chemotaxische Wirkung auf Granulozyten ist vergleichbar, aber nur GK-21 konnte die Produktion von LPS-induzierten vaskulären Stickoxiden unterbinden. Außerdem ist GK-21 weniger hämolytisch und Apoptose-induzierend in kultivierten humanen glatten Muskelzellen als LL-37 (Sigurdardottir et al., 2006).

Das Fragment KE-18 ( ~~LL GD FF RK SK EK IG KE FK RI VQ RI KD FL RN LV PR TE S~~) besitzt antimikrobielle (Nagaoka et al., 2005) und LPS-bindende (Nagaoka et al., 2002) Eigenschaften. Zwei Varianten mit größeren hydrophoben Winkeln und einer erhöhten Polarität zeigten ähnliche oder stärkere antibakterielle und LPS-bindende Eigenschaften, wirkten allerdings auch verstärkt hämolytisch (Nagaoka et al., 2002; Nagaoka et al., 2005). Eine weitere modifizierte Variante von KE-18 mit einer hydrophoberen Aminosäure zeigte ebenfalls erhöhte Hämolyse (Ciornei et al., 2005).

Umfangreichere Untersuchungen an 14 verschiedenen Fragmenten zur Identifizierung von den Regionen, die für die immunstimulierende Wirkung und für die antibakteriellen Eigenschaften verantwortlich sind, kamen zu dem Ergebnis, dass die Fragmente KS-30 und RK-31 die stärksten antibakteriellen Eigenschaften besitzen. Außerdem ließ das Herausschneiden des als Zentralelement bezeichneten EK-20 die antibakteriellen Eigenschaften stark verschlechtern. Auch konnte keine Korrelation zwischen der Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 und der antibakteriellen Aktivität gezeigt werden. Die immunstimulatorischen Eigenschaften scheinen im N-Terminus von LL-37 zu liegen. Dieser Teil soll auch keine  $\alpha$ -Helix ausbilden (Andersson et al., 2004; Braff et al., 2005).

## 5.2. Herleitung Zeta-Potential

Das Zeta-Potential lässt sich allgemein aus den auftretenden Kräften, die auf ein bewegtes Partikel wirken und dem Gouy-Chapman-Potential herleiten. Die das Partikel beschleunigende effektive Kraft  $F_{eff}$  ist abhängig von folgenden Kraftkomponenten (Nitzsche und Simon, 1997; Hofmann, 2003) :

$$(F14) \quad F_{eff} = F_E - F_{Reibung} - F_{Retard} - F_{Relax}$$

mit  $F_E$  : Kraftwirkung des elektrischen Feldes auf das geladene Partikel,  
 $F_{Reibung}$  : Kraftwirkung aufgrund von Reibung,  
 $F_{Retard}$  : elektrophoretische Retardation aufgrund der Gegenbewegung der Gegenionen und ihrer Hydrathüllen  
 $F_{Relax}$  : Kraftkomponente aufgrund des Relaxationseffekts, also der Verzerrung der sphärischen Partikelladungswolke.

Liegt eine niedrige Elektrolytkonzentration und eine niedrige Partikelgeschwindigkeit vor, können Retardations- und Relaxationseffekte vernachlässigt werden. Dann gilt:

$$(F15) \quad F_{eff} = F_E - F_{Reibung}$$

Nach einer Beschleunigungsphase und nachdem das Partikel seine diffuse Schicht bis zur Schergrenze des Zeta-Potentials abgeschert hat, hat das Partikel seine Endgeschwindigkeit erreicht und bewegt sich gleichförmig im elektrischen Feld mit der sogenannte elektrophoretischen Geschwindigkeit  $v$ . Damit wirkt keine beschleunigende Kraft  $F_{eff}$  mehr auf das Partikel und es liegt ein Kräftegleichgewicht vor.

$$(F16) \quad F_E = F_{\text{Reibung}}$$

Mit der Kraft eines elektrischen Feldes  $E$  auf eine Ladung  $q$

$$(F17) \quad F_E = E \cdot q$$

und unter der Annahme Stoke'scher Reibung

$$(F18) \quad F_{\text{Reibung}} = 6\pi\eta r v \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} v: \text{ Partikelgeschwindigkeit} \\ r: \text{ Partikelradius} \\ \eta: \text{ Viskosität des Suspensionsmediums} \end{array}$$

ergibt sich:

$$(F19) \quad E \cdot q = 6\pi\eta r v$$

Es wird die elektrophoretische Beweglichkeit  $\mu_e$  eingeführt um eine Messgröße zu erhalten, die vom angelegten elektrischen Feld unabhängig ist. Mit (F6) ergibt sich:

$$(F20) \quad \mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r v}$$

Die Partikelladung  $q$  wird durch die Ladungen im Suspensionsmedium kompensiert. Es gilt:

$$(F21) \quad q = -4\pi \int_r^\infty a^2 \rho \, da \quad \text{mit } a: \text{ Partikelradius } r \text{ und Dicke der diffusen Schicht } 1/\kappa$$

$\rho$ : Raumladungsdichte der diffusen Schicht.

Allgemein wird die Raumladungsdichte  $\rho$  in der diffusen Schicht durch die Poisson-Gleichung beschrieben:

$$(F22) \quad \rho = \varepsilon_r \varepsilon_0 \cdot \text{div}(-\text{grad}\Psi) \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} \varepsilon_0: \text{ Dielektrizitätskonstante,} \\ \varepsilon_r: \text{ relative Dielektrizität des} \\ \text{ Suspensionsmedium,} \\ \psi: \text{ elektrisches Potential.} \end{array}$$

Weil eine analytische Integration nicht möglich ist, wird nach Debye und Hückel genähert:

$$(F23) \quad \rho \approx -\varepsilon_r \varepsilon_0 k^2 \Psi$$

Der Betrag des elektrischen Potentials  $\Psi$  fällt nach dem Gouy-Chapman-Stern-Modell exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche ab:

$$(F24) \quad \Psi(a) = \Psi_0 \frac{r}{a} \exp(-k(a-r)) \quad \text{mit } \Psi_0: \text{ Oberflächenpotential}$$

Die Partikelladung ergibt sich durch Integration von (F21) zu:

$$(F25) \quad q = 4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r ((1+kr)\Psi_0)$$

Da das Zeta-Potential immer kleiner als das Oberflächenpotential ist, wird eine Korrekturfunktion  $f(\kappa r)$  eingeführt. Sie ist abhängig vom Partikelradius und Dicke der diffusen Schicht:

$$(F26) \quad (1+kr)\Psi = \zeta f(kr)$$

Der Zusammenhang zwischen elektrophoretischer Mobilität und Zeta-Potential wird durch die allgemeine Henry-Gleichung beschrieben. Sie ergibt sich durch Einsetzen von (F25) und (F26) in die Definition der elektrophoretischen Beweglichkeit (F20):

$$(F27) \quad \mu_e = \frac{v}{E} = \frac{2\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta f(kr)}{3\eta}$$

Die Korrekturfunktion  $f(\kappa r)$  lässt sich für zwei verschiedene Grenzfälle entwickeln.

### 1. Grenzfall ( $r \ll 1/\kappa$ )

Ist die diffuse Schicht sehr viel größer als das Partikel ( $1/\kappa \gg r$ ), kann der Grenzwert der Korrekturfunktion nach Hückel genähert werden. Diese Bedingungen sind bei schwachen Elektrolyten erfüllt.

$$(F28) \quad \lim_{a \rightarrow \infty} (f(kr)) = 1$$

Das Zeta-Potential ergibt sich aus der allgemeinen Henry-Gleichung (F14) in der Hückel-Näherung. Es gilt:

$$(F29) \quad \zeta = \frac{3v\eta}{2E\epsilon_r\epsilon_0}$$

### 2. Grenzfall ( $\kappa r \gg 1$ )

Bei sehr starken Elektrolyten ist die diffuse Schicht vernachlässigbar im Vergleich zur Partikelgröße. Es gilt dann für die Grenzfunktion:

$$(F30) \quad \lim_{a \rightarrow 0} (f(\kappa r)) = 1,5$$

Das Zeta-Potential wird dann durch die Smoluchowski-Gleichung beschrieben:

$$(F31) \quad \zeta = \frac{v\eta}{E\epsilon_r\epsilon_0}$$

## 5.3. Generationszeiten der Bakterien

Bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Bakteriendichte von der OD wurde auch die Wachstumsrate von einigen verwendeten Bakterien bestimmt. Aus Sicherheitsgründen (kein S2 Labor) konnten nicht für alle Bakterien die Generationszeiten bestimmt werden. Für die Bakterienstämme R595, R60, R45 und WBB01 ergaben sich Generationszeiten von  $29 \pm 1$  min,  $33 \pm 2$  min,  $24 \pm 1$  min bzw.  $32 \pm 2$  min unter den Standardbedingungen bei der Kultivierung von  $37^\circ \text{C}$ , einer Schüttlergeschwindigkeit von 160 U/min und Verwendung von LB-Medium.

Die Gleichheit der Generationszeiten der Bakterien lässt sich als Hinweis deuten, dass die inneren Vorgänge in den Bakterien ähnlich sind. Falls die verwendeten Peptide ihre letale Wirkung erst in Zytoplasma entfalten sollten, lässt sich somit vermuten, dass die dortigen Prozesse ähnlich sind. Zur wirklichen Verifikation sollten aber unbedingt weitergehende biologische Untersuchungen vorgenommen werden, die jedoch im Rahmen dieser biophysikalischen Arbeit nicht zu leisten war.

## 5.4. Einfluss der LL-32 Fragmente auf die Viabilität von MNC

Mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung wurde überprüft, ob die LL-32 Fragmente MNC abtöten. Dabei wurde eine Peptidkonzentration von  $2 \mu\text{M}$  eingesetzt. Dies entspricht der Peptidkonzentration die in den Versuchen zur Inhibition der LPS induzierten TNF- $\alpha$  Produktion verwendet wurden. Bei allen Fragmenten ist der Anteil an toten Zellen  $\leq 5\%$  (Daten werden aus Platzgründen nicht gezeigt).

Damit ist sichergestellt, dass bei den immunologischen Nachweisen zur TNF- $\alpha$  Induktion nicht eine verminderte Anzahl an MNC für eine geringere TNF- $\alpha$  Expression verantwortlich ist.

### 5.5. Salzabhängigkeit der LD90

Zur Ermittlung der Salzabhängigkeit der antibakteriellen Aktivität wurde die LD90 von LL-32 gegen verschiedene Bakterienstämme beschrieben in Puffern mit unterschiedlichem Salzgehalt ermittelt. Ansonsten wurden die Experimente wie in 7.3.1. beschrieben durchgeführt.

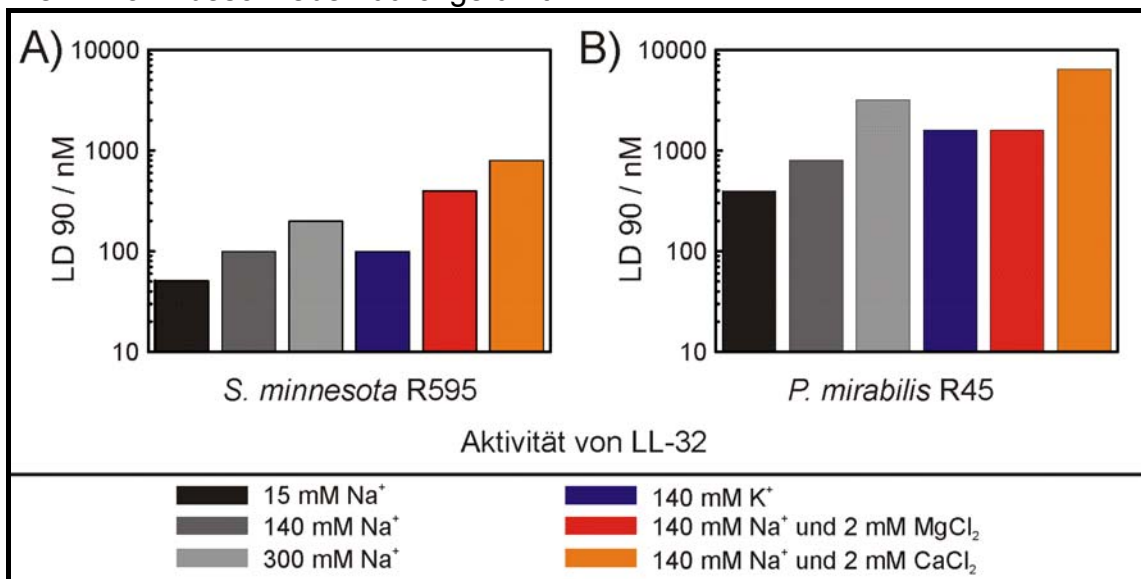


Abbildung 57: Abhängigkeit der LD90 von LL-32 gegen die Stämme *S. minnesota* R595 und *P. mirabilis* R45 vom Salzgehalt des Mediums. Die Versuchsdurchführung ist in 3.7.1. beschrieben. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Doppelbestimmungen.

### 5.6. Korrelation der biologischen Aktivitäten mit globalen physikalischen Parametern

Die zuvor ermittelten Daten sind in ähnlicher Weise dargestellt wie in Abb. 52. Weitere Informationen sind in 4.3.2.1. beschrieben.

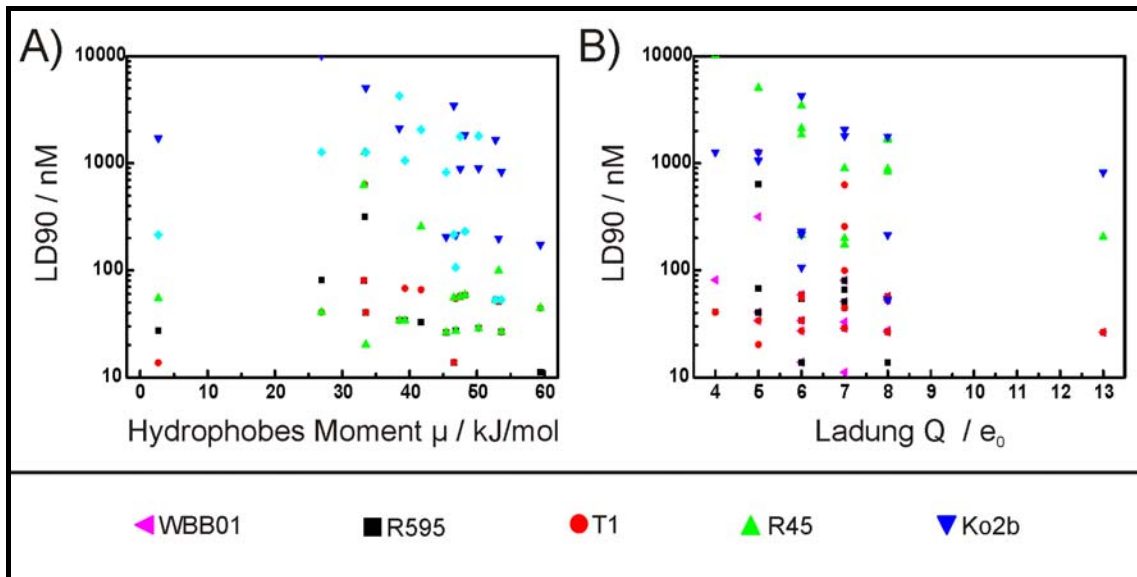


Abbildung 58: Korrelation der hydrophoben Momente und der Ladung der verschiedenen LL-32 Fragmente mit ihrer antibakteriellen Aktivität gegen die bakteriellen Stämme der Substitutions-Gruppe. Die Abbildung ist ähnlich wie Abb. 52. Die Bestimmung der LD90 ist in 3.7.1. beschrieben.

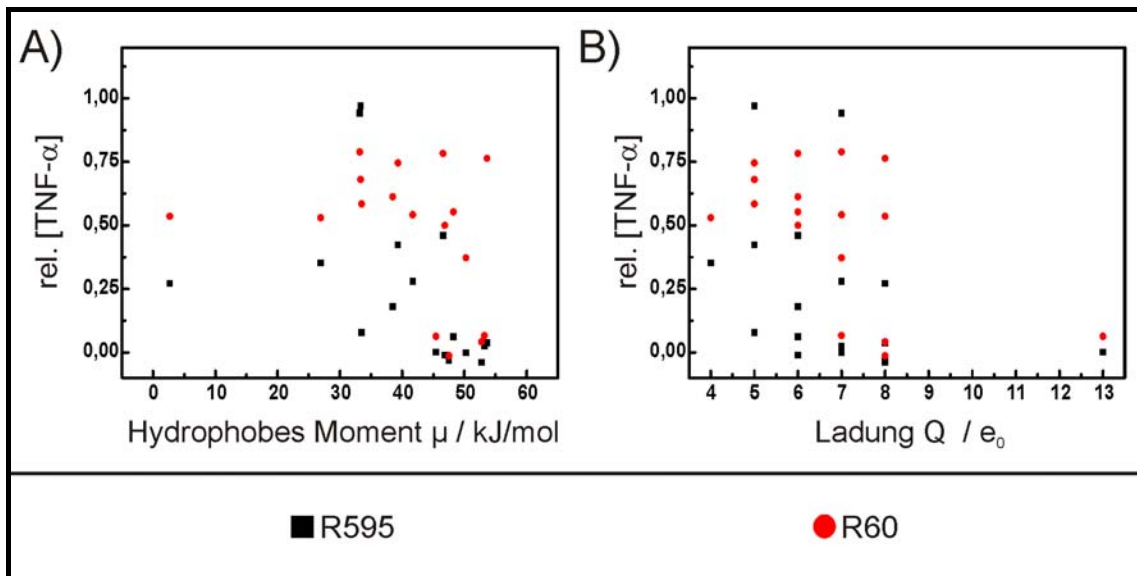


Abbildung 59: Korrelation der hydrophoben Momente und der Ladung der verschiedenen LL-32 Fragmente mit ihrer antiinflammatorischen Aktivität bei Aktivierung von MNC durch LPS der *S. minnesota* Stämme R595 und R60. Weitere Informationen zu der Korrelation sind in 4.3.2.1. zu finden. Die relative TNF- $\alpha$  Konzentration wurde wie in 3.7.3. beschrieben ermittelt.



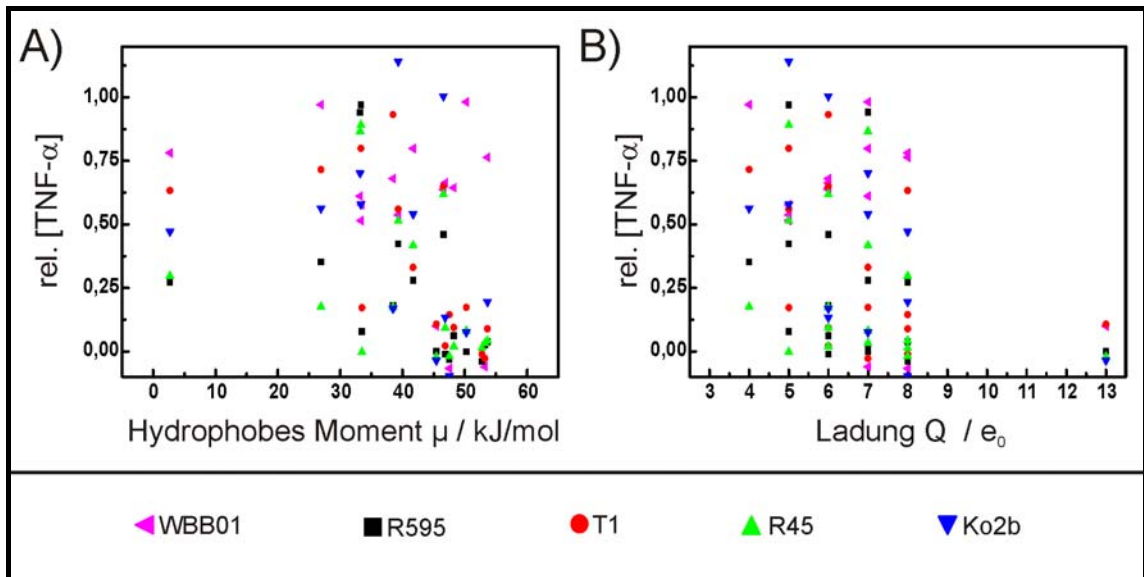


Abbildung 60: Korrelation der hydrophoben Momente und der Ladung der verschiedenen LL-32 Fragmente mit ihrer antiinflammatorischen Aktivität bei Aktivierung von MNC durch LPS verschiedener Stämme (Tab. 3). Die relative TNF- $\alpha$  Konzentration wurde wie in 3.7.3. beschrieben ermittelt. Weitere Informationen zu der Korrelation sind in 4.3.2.1. zu finden.

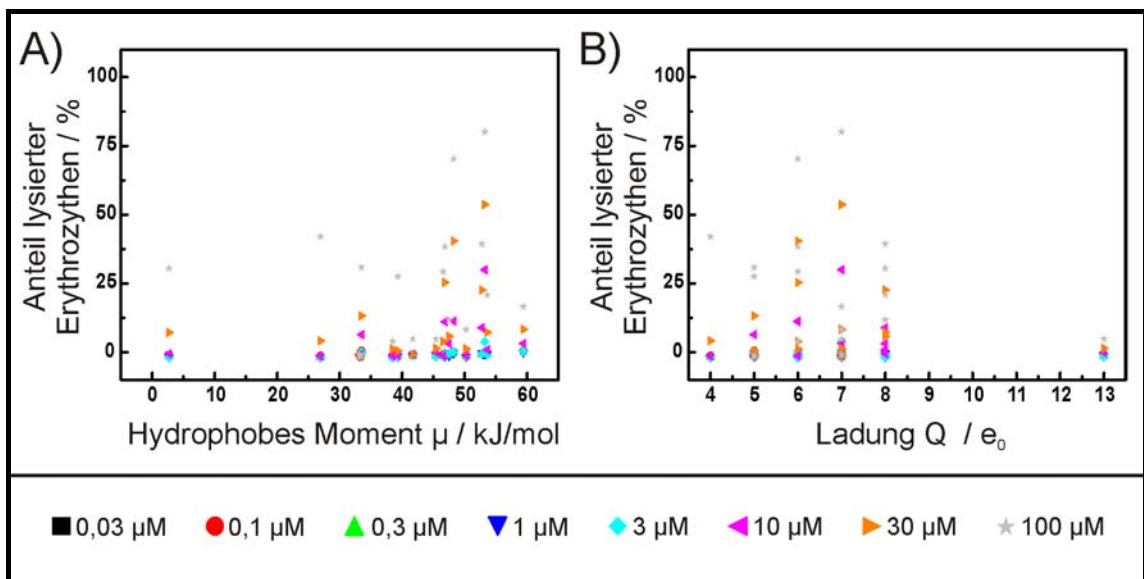


Abbildung 61: Korrelation der hydrophoben Momente und der Ladung der verschiedenen LL-32 Fragmente mit ihrer zytotoxischen Aktivität bei verschiedenen Peptidkonzentrationen. Weitere Informationen zu der Korrelation sind in 4.3.2.1. zu finden. Die zytotoxische Aktivität wurde wie in 3.7.2. beschrieben ermittelt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Handbuch ZetaSizer 4. 1996. Malvern.
2. Adam,G., P.Läuger, and G.Stark. 1995. Physikalische Chemie und Biophysik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
3. Agerberth,B., J.Charo, J.Werr, B.Olsson, F.Idali, L.Lindbom, R.Kiessling, H.Jornvall, H.Wigzell, and G.H.Gudmundsson. 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha- defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96:3086-3093.
4. Agerberth,B., J.Grunewald, E.Castanos-Velez, B.Olsson, H.Jornvall, H.Wigzell, A.Eklund, and G.H.Gudmundsson. 1999. Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160:283-290.
5. Agerberth,B., H.Gunne, J.Odeberg, P.Kogner, H.G.Boman, and G.H.Gudmundsson. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:195-199.
6. Alvarez-Barrientos,A., J.Arroyo, R.Canton, C.Nombela, and M.Sanchez-Perez. 2000. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:167-195.
7. Andersson,E., V.Rydengard, A.Sonesson, M.Morgelin, L.Bjorck, and A.Schmidtchen. 2004. Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *Eur. J. Biochem.* 271:1219-1226.
8. Andrä,J., O.Berninghausen, and M.Leippe. 2004. Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett.* 564:109-115.
9. Angus,D.C., W.T.Linde-Zwirble, J.Lidicker, G.Clermont, J.Carcillo, and M.R.Pinsky. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303-1310.
10. Annane,D., V.Sebille, C.Charpentier, P.E.Bollaert, B.Francois, J.M.Korach, G.Capellier, Y.Cohen, E.Azoulay, G.Troche, P.Chaumet-Riffaut, and E.Bellissant. 2002. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 288:862-871.
11. Baldwin,G., G.Alpert, G.L.Caputo, M.Baskin, J.Parsonnet, Z.A.Gillis, C.Thompson, G.R.Siber, and G.R.Fleisher. 1991. Effect of polymyxin B on experimental shock from meningococcal and *Escherichia coli* endotoxins. *J. Infect. Dis.* 164:542-549.

12. Bals,R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 1:141-150.
13. Bals,R., X.Wang, M.Zasloff, and J.M.Wilson. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:9541-9546.
14. Bals,R., D.J.Weiner, A.D.Moscioni, R.L.Meegalla, and J.M.Wilson. 1999. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* 67:6084-6089.
15. Baranska-Rybak,W., A.Sonesson, R.Nowicki, and A.Schmidtchen. 2006. Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:260-265.
16. Bernard,G.R., J.L.Vincent, P.F.Laterre, S.P.LaRosa, J.F.Dhainaut, A.Lopez-Rodriguez, J.S.Steingrub, G.E.Garber, J.D.Helterbrand, E.W.Ely, and C.J.Fisher, Jr. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 344:699-709.
17. Beutler,B. 2002. LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment. *J. Endotoxin. Res.* 8:329-335.
18. Bhor,V.M., C.J.Thomas, N.Surolia, and A.Surolia. 2005. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol. Biosyst.* 1:213-222.
19. Blunck,R., O.Scheel, M.Muller, K.Brandenburg, U.Seitzer, and U.Seydel. 2001. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K<sup>+</sup> channel in transmembrane signaling. *J. Immunol* 166:1009-1015.
20. Bone,R.C., C.J.Fisher, Jr., T.P.Clemmer, G.J.Slotman, C.A.Metz, and R.A.Balk. 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 17:389-393.
21. Bonner,W.A., H.R.Hulett, R.G.Sweet, and L.A.Herzenberg. 1972. Fluorescence activated cell sorting. *Rev. Sci. Instrum.* 43:404-409.
22. Boon,J.M. and B.D.Smith. 2002. Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Med. Res. Rev.* 22:251-281.
23. Braff,M.H., M.A.Hawkins, A.Di Nardo, B.Lopez-Garcia, M.D.Howell, C.Wong, K.Lin, J.E.Streib, R.Dorschner, D.Y.Leung, and R.L.Gallo. 2005. Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *J. Immunol.* 174:4271-4278.
24. Brandenburg,K. and A.Wiese. 2004. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr. Top. Med. Chem.* 4:1127-1146.

25. Brehm-Stecher, B.F. and E.A. Johnson. 2004. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:538-559.
26. Brogden, K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.
27. Buschner, S. 1999. Bestimmung der kritischen Aggregatkonzentrationen von Lipiden: Implikationen für die biologische Wirksamkeit von Endotoxinen. *Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität.*
28. Cardullo, R.A. 2007. Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods Cell Biol.* 81:479-494.
29. Cevc, G. 1990. Membrane electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta* 1031:311-382.
30. Chen, C., R. Brock, F. Luh, P.J. Chou, J.W. Larrick, R.F. Huang, and T.H. Huang. 1995. The solution structure of the active domain of CAP18—a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett.* 370:46-52.
31. Chen, F.Y., M.T. Lee, and H.W. Huang. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* 84:3751-3758.
32. Chen, X., F. Niyonsaba, H. Ushio, D. Okuda, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa. 2005. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Dermatol. Sci.* 40:123-132.
33. Christophers, E. and T. Henseler. 1987. Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 279 Suppl:S48-S51.
34. Ciornei, C.D., T. Sigurdardottir, A. Schmidtchen, and M. Bodelsson. 2005. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2845-2850.
35. Ciornei, C.D., H. Tapper, A. Bjartell, N.H. Sternby, and M. Bodelsson. 2006. Human antimicrobial peptide LL-37 is present in atherosclerotic plaques and induces death of vascular smooth muscle cells: a laboratory study. *BMC. Cardiovasc. Disord.* 6:49.
36. Cirioni, O., A. Giacometti, R. Ghiselli, C. Bergnach, F. Orlando, C. Silvestri, F. Mocchegiani, A. Licci, B. Skerlavaj, M. Rocchi, V. Saba, M. Zanetti, and G. Scalise. 2006. LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1672-1679.

37. Coenye, T. and P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5:719-729.
38. Cowland, J.B., A.H. Johnsen, and N. Borregaard. 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 368:173-176.
39. Cox, A.D. and S.G. Wilkinson. 1991. Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* 5:641-646.
40. David, A. Biophysikalische Charakterisierung der Wechselwirkung des antimikrobiellen humanen Cathelicidins hCAP18 mit Modellmembranen. 2004. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
41. Dean, P.N., D. Pinkel, and M.L. Mendelsohn. 1978. Hydrodynamic orientation of sperm heads for flow cytometry. *Biophys. J.* 23:7-13.
42. Di Nardo, A., A. Vitiello, and R.L. Gallo. 2003. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J. Immunol.* 170:2274-2278.
43. Donati, M., A. Di Francesco, R. Gennaro, M. Benincasa, S. Magnino, S. Pignanelli, A. Shurdhi, A. Moroni, C. Mazzoni, G. Merialdi, R. Baldelli, and R. Cevenini. 2007. Sensitivity of *Chlamydia suis* to cathelicidin peptides. *Vet. Microbiol.* 123:269-273.
44. Dorschner, R.A., V.K. Pestonjamas, S. Tamakuwala, T. Ohtake, J. Rudisill, V. Nizet, B. Agerberth, G.H. Gudmundsson, and R.L. Gallo. 2001. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J. Invest Dermatol.* 117:91-97.
45. Drabick, J.J., A.K. Bhattacharjee, D.L. Hoover, G.E. Siber, V.E. Morales, L.D. Young, S.L. Brown, and A.S. Cross. 1998. Covalent polymyxin B conjugate with human immunoglobulin G as an antiendotoxin reagent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:583-588.
46. Dürr, U.H., U.S. Sudheendra, and A. Ramamoorthy. 2006. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:1408-1425.
47. Duwe, A.K., C.A. Rupa, G.B. Horsman, and S.I. Vas. 1986. In vitro cytotoxicity and antibiotic activity of polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:340-341.
48. Egorova, E.M., A.S. Dukhin, and I.E. Svetlova. 1992. Some problems of zeta potential determination in electrophoretic measurements on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1104:102-110.

49. El Mashak, E.M. and J.F. Tocanne. 1980. Polymyxin B-phosphatidylglycerol interactions A monolayer ( $\pi$ ,  $\Delta V$ ) study. *Biochim. Biophys. Acta* 596:165-179.
50. Elverdam, I., P. Larsen, and E. Lund. 1981. Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B and E by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 218:653-661.
51. Evans, M.E., D.J. Feola, and R.P. Rapp. 1999. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann. Pharmacother.* 33:960-967.
52. Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell, and G.H. Gudmundsson. 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 272:15258-15263.
53. Frohm, M., H. Gunne, A.C. Bergman, B. Agerberth, T. Bergman, A. Boman, S. Liden, H. Jornvall, and H.G. Boman. 1996. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur. J. Biochem.* 237:86-92.
54. Galanos, C., O. Luderitz, and O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245-249.
55. Ganz, T. 2002. Epithelia: not just physical barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:3357-3358.
56. Gawrisch, K., D. Ruston, J. Zimmerberg, V.A. Parsegian, R.P. Rand, and N. Fuller. 1992. Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys. J.* 61:1213-1223.
57. Geerdes, H.F., D. Ziegler, H. Lode, M. Hund, A. Loehr, W. Fangmann, and J. Wagner. 1992. Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clin. Infect. Dis.* 15:991-1002.
58. Glauser, M.P., G. Zanetti, J.D. Baumgartner, and J. Cohen. 1991. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338:732-736.
59. Goldmann, D.A. and J.D. Klinger. 1986. Pseudomonas cepacia: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108:806-812.
60. Govan, J.R. and J.W. Nelson. 1992. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br. Med. Bull.* 48:912-930.
61. Gronow, S., C. Noah, A. Blumenthal, B. Lindner, and H. Brade. 2003. Construction of a deep-rough mutant of Burkholderia cepacia ATCC 25416 and characterization of its chemical and biological properties. *J. Biol. Chem.* 278:1647-1655.

62. Gudmundsson, G.H., B.Agerberth, J.Odeberg, T.Bergman, B.Olsson, and R.Salcedo. 1996. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* 238:325-332.
63. Gutschmann, T. 1997. Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen zwischen polykationischen antimikrobiellen Substanzen und rekonstituierten Membranmodellen. *Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität.*
64. Gutschmann, T., N.Haberer, U.Seydel, and A.Wiese. 2001a. Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol. Chem.* 382:425-434.
65. Gutschmann, T., S.O.Hagge, A.David, S.Roes, A.Bohling, M.U.Hammer, and U.Seydel. 2005. Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *J. Endotoxin. Res.* 11:167-173.
66. Gutschmann, T., S.O.Hagge, J.W.Larrick, U.Seydel, and A.Wiese. 2001b. Interaction of CAP18-Derived Peptides with Membranes Made from Endotoxins or Phospholipids. *Biophys. J.* 80:2935-2945.
67. Gutschmann, T., M.Muller, S.F.Carroll, R.C.MacKenzie, A.Wiese, and U.Seydel. 2001c. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect. Immun.* 69:6942-6950.
68. Gutschmann, T., A.B.Schromm, and K.Brandenburg. 2007. The physicochemistry of endotoxins in relation to bioactivity. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:341-352.
69. Hagge, S.O., M.U.Hammer, A.Wiese, U.Seydel, and T.Gutschmann. 2006. Calcium adsorption and displacement: characterization of lipid monolayers and their interaction with membrane-active peptides/proteins. *BMC. Biochem.* 7:15.
70. Hammer, M.U. 2004. Korrelation zwischen der Suszeptibilität verschiedener Bakterienstämme gegenüber Polymyxin B und biophysikalischen Daten an rekonstituierten Modellmembranen. *Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.*
71. Hancock, R.E. 1984. Alterations in outer membrane permeability. *Ann. Rev. Microbiol.* 38:237-264.
72. Hancock, R.E. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* 349:418-422.
73. Harder, J., J.Bartels, E.Christophers, and J.M.Schröder. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861.

74. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schröder. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276:5707-5713.
75. Heilborn, J. D., M. F. Nilsson, G. Kratz, G. Weber, O. Sorensen, N. Borregaard, and M. Stahle-Backdahl. 2003. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J. Invest Dermatol.* 120:379-389.
76. Helenius, A. and K. Simons. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79.
77. Henseler, T. and E. Christophers. 1995. Disease concomitance in psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32:982-986.
78. Henzler Wildman, K. A., D. K. Lee, and A. Ramamoorthy. 2003. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42:6545-6558.
79. Henzler-Wildman, K. A., G. V. Martinez, M. F. Brown, and A. Ramamoorthy. 2004. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 43:8459-8469.
80. Herzenberg, L. A., D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, and L. A. Herzenberg. 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem.* 48:1819-1827.
81. Hofmann, M. P. Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzement *Dissertation an der Julius-Maximilian-Universität, Würzburg.* 2003.
82. Holmberg, S. D., J. G. Wells, and M. L. Cohen. 1984. Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant Salmonella: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. *Science* 225:833-835.
83. Howell, M. D., J. F. Jones, K. O. Kisich, J. E. Streib, R. L. Gallo, and D. Y. Leung. 2004. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J. Immunol.* 172:1763-1767.
84. Huang, H. W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39:8347-8352.
85. Isogai, E., M. Hirata, H. Isogai, K. Matuo, K. Kimura, K. Yokota, K. Oguma, M. Tojo, F. Kaneko, S. Kotake, and S. Ohno. 2003a. Antimicrobial activity of synthetic human CAP18 peptides to *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 528:195-200.
86. Isogai, E., H. Isogai, K. Matuo, K. Hirose, Y. Kowashi, K. Okumuara, and M. Hirata. 2003b. Sensitivity of genera *Porphyromonas* and *Prevotella* to



- the bactericidal action of C-terminal domain of human CAP18 and its analogues. *Oral Microbiol. Immunol.* 18:329-332.
87. Israelachvili, J.N. 1991. Intermolecular and surface forces. Academic Press, London.
88. Jacobs, R.E. and S.H. White. 1989. The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry* 28:3421-3437.
89. Jiang, Z., Z. Hong, W. Guo, G. Xiaoyun, L. Gengfa, L. Yongning, and X. Guangxia. 2004. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. *Int. Immunopharmacol.* 4:527-537.
90. Johansson, J., G.H. Gudmundsson, M.E. Rottenberg, K.D. Berndt, and B. Agerberth. 1998. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273:3718-3724.
91. Jones, A.M., M.E. Dodd, and A.K. Webb. 2001. Burkholderia cepacia: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *Eur. Respir. J.* 17:295-301.
92. Kamtekar, S., J.M. Schiffer, H. Xiong, J.M. Babik, and M.H. Hecht. 1993. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* 262:1680-1685.
93. Karima, R., S. Matsumoto, H. Higashi, and K. Matsushima. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today* 5:123-132.
94. Kleinig, H. 1999. Die äußere Membran gramnegativer Bakterien. *In* Zellbiologie. H. Kleinig and U. Maier, editors. G. Fischer, Stuttgart.
95. Kristian, S.A., A.M. Timmer, G.Y. Liu, X. Lauth, N. Sal-Man, Y. Rosenfeld, Y. Shai, R.L. Gallo, and V. Nizet. 2007. Impairment of innate immune killing mechanisms by bacteriostatic antibiotics. *FASEB J.* 21:1107-1116.
96. Kunin, C.M. and A. Bugg. 1971. Binding of polymyxin antibiotics to tissues: the major determinant of distribution and persistence in the body. *J. Infect. Dis.* 124:394-400.
97. Ladbury, J.E. and B.Z. Chowdhry. 1996. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem. Biol.* 3:791-801.
98. Lagaly, G. 1984. Energetische Wechselwirkung in Dispersionen und Emulsionen. *In* Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen. Wiss. Verl. Ges., editor. Stuttgart. 31-61.
99. Langerman, N. and R.L. Biltonen. 1979. Microcalorimeters for biological chemistry: applications, instrumentation and experimental design. *Methods Enzymol.* 61:261-286.

100. Larrick, J.W., M.Hirata, R.F.Balint, J.Lee, J.Zhong, and S.C.Wright. 1995a. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63:1291-1297.
101. Larrick, J.W., M.Hirata, Y.Shimomoura, M.Yoshida, H.Zheng, J.Zhong, and S.C.Wright. 1993. Antimicrobial activity of rabbit CAP18-derived peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2534-2539.
102. Larrick, J.W., M.Hirata, J.Zhong, and S.C.Wright. 1995b. Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology.* 1:65-72.
103. Larrick, J.W., J.G.Morgan, I.Palings, M.Hirata, and M.H.Yen. 1991. Complementary DNA sequence of rabbit CAP18--a unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:170-175.
104. Lee, J.D., K.Kato, P.S.Tobias, T.N.Kirkland, and R.J.Ulevitch. 1992. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Exp. Med.* 175:1697-1705.
105. Leung, D.Y. 2003. Infection in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Pediatr.* 15:399-404.
106. Leung, D.Y., M.Boguniewicz, M.D.Howell, I.Nomura, and Q.A.Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest* 113:651-657.
107. Li, Y., X.Li, and G.Wang. 2007. On-resin cleavage of bacterially expressed fusion proteins for purification of active recombinant peptides SK-29, KR-20, LL-29, and LL-23 from human sweat or skin. *Protein Expr. Purif.*
108. Livingstone, J.R. 1996. Antibody characterization by isothermal titration calorimetry. *Nature* 384:491-492.
109. Lodish, H.A., S.L.Berk, P.Zipursky, D.Matsudaira, Baltimore, and J.Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York.
110. Lohner, K. and E.J.Prenner. 1999. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:141-156.
111. Lopez-Garcia, B., W.Ubhayasekera, R.L.Gallo, and J.F.Marcos. 2007. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356:107-113.
112. Lüderitz, O., M.A.Freudenberg, C.Galanos, V.Lehmann, E.T.Rietschel, and D.H.Shaw. 1982. Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. *Curr. Top. Membr. Transp.* 17:79-151.

113. Madigan, M., J. Martinko, and J. Parker. 1979. Brock: Biology of Microorganisms. Prentice Hall International, New Jersey.
114. Martineau, A.R., K.A. Wilkinson, S.M. Newton, R.A. Floto, A.W. Norman, K. Skolimowska, R.N. Davidson, O.E. Sorensen, B. Kampmann, C.J. Griffiths, and R.J. Wilkinson. 2007. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J. Immunol.* 178:7190-7198.
115. Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:1-10.
116. Matsuzaki, K., S. Yoneyama, O. Murase, and K. Miyajima. 1996. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochemistry* 35:8450-8456.
117. McGowan, J.E., Jr. 2006. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am. J. Infect. Control* 34:S29-S37.
118. McLaughlin, S. 1977. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. In *Current Topics in Membrane and Transport*. F. Bronner and A. Kleinzeller, editors. Academic Press, New York. 71-144.
119. McLaughlin, S. 1989. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:113-136.
120. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, and R.V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
121. Mookherjee, N., K.L. Brown, D.M. Bowdish, S. Doria, R. Falsafi, K. Hokamp, F.M. Roche, R. Mu, G.H. Doho, J. Pistolic, J.P. Powers, J. Bryan, F.S. Brinkman, and R.E. Hancock. 2006a. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol.* 176:2455-2464.
122. Mookherjee, N., H.L. Wilson, S. Doria, Y. Popowych, R. Falsafi, J.J. Yu, Y. Li, S. Veatch, F.M. Roche, K.L. Brown, F.S. Brinkman, K. Hokamp, A. Potter, L.A. Babiuk, P.J. Griebel, and R.E. Hancock. 2006b. Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* 80:1563-1574.
123. Mueller, M., B. Lindner, S. Kusumoto, K. Fukase, A.B. Schromm, and U. Seydel. 2004. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279:26307-26313.
124. Müller, R.H. 1996. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Stuttgart.

125. Murakami, M., B. Lopez-Garcia, M. Braff, R.A. Dorschner, and R.L. Gallo. 2004. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J. Immunol.* 172:3070-3077.
126. Murakami, M., T. Ohtake, R.A. Dorschner, B. Schitteck, C. Garbe, and R.L. Gallo. 2002. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J. Invest Dermatol.* 119:1090-1095.
127. Nagaoka, I., S. Hirota, F. Niyonsaba, M. Hirata, Y. Adachi, H. Tamura, S. Tanaka, and D. Heumann. 2002. Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 9:972-982.
128. Nagaoka, I., K. Kuwahara-Arai, H. Tamura, K. Hiramatsu, and M. Hirata. 2005. Augmentation of the bactericidal activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by amino acid substitutions. *Inflamm. Res.* 54:66-73.
129. Nell, M.J., G.S. Tjabringa, A.R. Wafelman, R. Verrijck, P.S. Hiemstra, J.W. Drijfhout, and J.J. Grote. 2006. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides* 27:649-660.
130. Neumecke, B. and P. Läuger. 1969. Nonlinear electric effects in lipid bilayer membranes II. Intergation of the generalized Nernst-Planck equations. *Biophys. J.* 9:1160-1170.
131. Neville, F., M. Cahuzac, O. Konovalov, Y. Ishitsuka, K.Y. Lee, I. Kuzmenko, G.M. Kale, and D. Gidalevitz. 2006. Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptide LL-37: insight into mechanism of action. *Biophys. J.* 90:1275-1287.
132. Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593-656.
133. Nikaido, H. and M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
134. Nitzsche, R. and F. Simon. 1997. Bestimmung des Zetapotentials aus Messungen der elektrophetischen Mobilität. *Technisches Messen* 64:106-113.
135. Niyonsaba, F., I. Nagaoka, and H. Ogawa. 2006. Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Crit Rev. Immunol.* 26:545-576.
136. Nizet, V., T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R.A. Dorschner, V. Pestonjasp, J. Piraino, K. Huttner, and R.L. Gallo. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414:454-457.

137. Nomura, I., E. Goleva, M.D. Howell, Q.A. Hamid, P.Y. Ong, C.F. Hall, M.A. Darst, B. Gao, M. Boguniewicz, J.B. Travers, and D.Y. Leung. 2003. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J. Immunol.* 171:3262-3269.
138. Okumura, K., A. Itoh, E. Isogai, K. Hirose, Y. Hosokawa, Y. Abiko, T. Shibata, M. Hirata, and H. Isogai. 2004. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.* 212:185-194.
139. Ong, P.Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R.L. Gallo, and D.Y. Leung. 2002a. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347:1151-1160.
140. Ong, P.Y., T. Ohtake, C. Brandt, I. Strickland, M. Boguniewicz, T. Ganz, R.L. Gallo, and D.Y. Leung. 2002b. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347:1151-1160.
141. Oren, Z., J.C. Lerman, G.H. Gudmundsson, B. Agerberth, and Y. Shai. 1999. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* 341 ( Pt 3):501-513.
142. Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi, and J. Carson. 1972. Mechanism and assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 247:3962-3972.
143. Otten, H, Plempel, M, and Siegenthaler, W. Antibiotika Fibel. 1975. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
144. Perron, G.G., M. Zasloff, and G. Bell. 2006. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. Biol. Sci.* 273:251-256.
145. Prince, A. 1986. Antibiotic resistance of *Pseudomonas* species. *J. Pediatr.* 108:830-834.
146. Raetz, C.R.H. 1993. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.* 175:5745-5753.
147. Rietschel, E.T., T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Di Padova, and . 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217-225.
148. Rifkind, D. 1967. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. *J. Bacteriol.* 93:1463-1464.
149. Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, J. Ressler, A. Muzzin, B. Knoblich, E. Peterson, and M. Tomlanovich. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 345:1368-1377.

150. Schaller-Bals,S., A.Schulze, and R.Bals. 2002. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165:992-995.
151. Schiffer,M. and A.B.Edmundson. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7:121-135.
152. Schoch,P. and D.F.Sargent. 1976. Surface potentials of asymmetric lipid bilayers. *Experientia* 32:811.
153. Schröder,G., K.Brandenburg, and U.Seydel. 1992. Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* 31:631-638.
154. Schröder,J.M. and J.Harder. 2006. [Innate antimicrobial peptides in the skin]. *Med. Sci. (Paris)* 22:153-157.
155. Schröder-Borm,H., R.Bakalova, and J.Andrä. 2005. The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. *FEBS Lett.* 579:6128-6134.
156. Schromm,A.B., K.Brandenburg, E.T.Rietschel, H.D.Flad, S.F.Carroll, and U.Seydel. 1996a. Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 399:267-271.
157. Schromm,A.B., K.Brandenburg, E.Th.Rietschel, H.-D.Flad, S.F.Carroll, and U.Seydel. 1996b. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 399:267-271.
158. Schumann,R.R., S.R.Leong, G.W.Flaggs, P.W.Gray, S.D.Wright, J.C.Mathison, P.S.Tobias, and R.J.Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.
159. Sen,K., J.Hellman, and H.Nikaido. 1988. Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 263:1182-1187.
160. Seydel,U., O.Scheel, M.Muller, K.Brandenburg, and R.Blunck. 2001. A K<sup>+</sup> channel is involved in LPS signaling. *J. Endotoxin. Res.* 7:243-247.
161. Shai,Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236-248.
162. Shai,Y. and Z.Oren. 2001. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22:1629-1641.
163. Shaykhiev,R., C.Beisswenger, K.Kandler, J.Senske, A.Puchner, T.Damm, J.Behr, and R.Bals. 2005. Human endogenous antibiotic LL-37

- stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 289:L842-L848.
164. Shimomura,H., M.Matsuura, S.Saito, Y.Hirai, Y.Isshiki, and K.Kawahara. 2003. Unusual interaction of a lipopolysaccharide isolated from *Burkholderia cepacia* with polymyxin B. *Infect. Immun.* 71:5225-5230.
  165. Sigurdardottir,T., P.Andersson, M.Davoudi, M.Malmsten, A.Schmidtchen, and M.Bodelsson. 2006. In silico identification and biological evaluation of antimicrobial peptides based on human cathelicidin LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2983-2989.
  166. Singer,S.J. and G.L.Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
  167. Snyder,S., D.Kim, and T.J.McIntosh. 1999. Lipopolysaccharide bilayer structure: effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature. *Biochemistry* 38:10758-10767.
  168. Sorensen,O.E., P.Follin, A.H.Johnsen, J.Calafat, G.S.Tjabringa, P.S.Hiemstra, and N.Borregaard. 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97:3951-3959.
  169. Tanke,H.J. and K.M.van der. 1993. Selection of defined cell types by flow-cytometric cell sorting. *Trends Biotechnol.* 11:55-62.
  170. Tindall,B.J., P.A.Grimont, G.M.Garrity, and J.P.Euzeby. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:521-524.
  171. Tobias,P.S. and R.J.Ulevitch. 1994. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide- dependent activation of cells. *Chest* 105 Suppl.:48S-50S.
  172. Turner,J., Y.Cho, N.N.Dinh, A.J.Waring, and R.I.Lehrer. 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2206-2214.
  173. Vaara,M. 1983. Polymyxin B nonapeptide complexes with lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol. Lett.* 18:117-121.
  174. Vaara,M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56:395-411.
  175. Vaara,M. and T.Vaara. 1983. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature* 303:526-528.
  176. Van Amersfoort,E.S., T.J.Van Berkel, and J.Kuiper. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:379-414.

177. Varoga,D., T.Pufe, R.Mentlein, S.Kohrs, S.Grohmann, B.Tillmann, J.Hassenpflug, and F.Paulsen. 2005. Expression and regulation of antimicrobial peptides in articular joints. *Ann. Anat.* 187:499-508.
178. Vereb,G., J.Szollosi, J.Matko, P.Nagy, T.Farkas, L.Vigh, L.Matyus, T.A.Waldmann, and S.Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:8053-8058.
179. Viljanen,P. and M.Vaara. 1984. Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25:701-705.
180. Vinnicombe,J. and T.A.Stamey. 1969. The relative nephrotoxicities of polymyxin B sulfate, sodium sulfomethyl-polymyxin B, sodium sulfomethyl-colistin (colymycin), and neomycin sulfate. *Invest Urol.* 6:505-519.
181. Walker,K.E., S.Moghaddame-Jafari, C.V.Lockatell, D.Johnson, and R.Belas. 1999. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol. Microbiol.* 32:825-836.
182. Warren,J.W., J.H.Tenney, J.M.Hoopes, H.L.Muncie, and W.C.Anthony. 1982. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. *J. Infect. Dis.* 146:719-723.
183. Wiseman,T., S.Williston, J.F.Brandts, and L.N.Lin. 1989. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179:131-137.
184. Wright,S.D., R.A.Ramos, P.S.Tobias, R.J.Ulevitch, and J.C.Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
185. Wurfel,M.M., S.T.Kunitake, H.Lichenstein, J.P.Kane, and S.D.Wright. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J. Exp. Med.* 180:1025-1035.
186. Yabuuchi,E., Y.Kosako, H.Oyaizu, I.Yano, H.Hotta, Y.Hashimoto, T.Ezaki, and M.Arakawa. 1992. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36:1251-1275.
187. Yamasaki,K., J.Schauber, A.Coda, H.Lin, R.A.Dorschner, N.M.Schechter, C.Bonnart, P.Descargues, A.Hovnanian, and R.L.Gallo. 2006. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J.* 20:2068-2080.
188. Yang,D., A.Biragyn, D.M.Hoover, J.Lubkowski, and J.J.Oppenheim. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and



- eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22:181-215.
189. Yang, D., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* 192:1069-1074.
190. Yang, L., T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, and H. W. Huang. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81:1475-1485.
191. Zähringer, U., B. Lindner, and E. T. Rietschel. 1994. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 50:211-276.
192. Zaiou, M., V. Nizet, and R. L. Gallo. 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J. Invest Dermatol.* 120:810-816.
193. Zanetti, M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 75:39-48.
194. Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374:1-5.
195. Zanetti, M., R. Gennaro, M. Scocchi, and B. Skerlavaj. 2000. Structure and biology of cathelicidins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 479:203-218.
196. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
197. Zimet, D. B., B. J. Thevenin, A. S. Verkman, S. B. Shoet, and J. R. Abney. 1995. Calculation of resonance energy transfer in crowded biological membranes. *Biophys. J.* 68:1592-1603.
198. Zughayer, S. M., W. M. Shafer, and D. S. Stephens. 2005. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell Microbiol.* 7:1251-1262.

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

---

Malte U. Hammer,  
Borstel, den 23.10.2007

## **Danksagung**

Bei Herrn PD Dr. Thomas Gutschmann bedanke ich mich herzlichst für die exzellente Betreuung, ein gutes Arbeitsklima und nicht zuletzt für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Auch dafür, dass mir viele Freiheiten gewährt wurden. Ich hoffe ich konnte deine Erwartungen erfüllen. Vielen Dank!

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Seydel möchte ich mich für die Einführung ins Fachgebiet Biophysik danken und seinem Engagement, auch nach Erreichen des Rentenalters. Es war eine gute Entscheidung zu dir nach Borstel zu kommen.

Herr Prof. Dr. Klaus Brandenburg, bitte immer so bleiben! Vielen Dank für die fachlichen Ratschläge und die Motivation die du vermittelst.

Bei Herrn PD Dr. Buko Lindner möchte ich mich für die massenspektrometrischen Untersuchungen und physikalischen Ratschlägen bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Jörg Andrä und Frau PD Dr. Andra Schromm bedanke ich mich für die chemische und biologische Beratung.

Bei Frau Dr. Catharina Crone bedanke ich mich für die ästhetische Beratung, und bei den Herren Dipl. Phys. Arne Böhling, Jörg Howe und Göran Hübner nicht nur für viele interessante Diskussionen, sondern besonders für die gute Zeit mit ihnen. Laßt uns niemals alt werden!

Bei allen Mitgliedern der Laborgruppe "Biophysik" möchte ich mich für die nette und produktive Arbeit bedanken. Ihr habt mir alle nicht nur viel Freude bereitet, sondern auch maßgeblich mit zu der Qualität meiner Arbeit beigetragen! Besonderen Dank gilt dabei Frau Christine Hamann, Frau Sabrina Groth, Frau Kerstin Stephan und Herr Gerold von Busse für die technische Hilfe die sie mir gewährt haben.

Vielen Dank an euch alle! Ich werde wohl lange an diese schöne Zeit denken.

Herrn Rainer Bartels möchte ich für die bereitgestellten Peptide danken.

Den Kooperationspartnern Herrn PD Dr. Jens Mayer, Herrn Dr. Christoph Diedrich, Frau Dr. Sabine Gronow und ganz besonders Herrn Prof. Dr. Rainer Podschun und Frau Silvia Voss danke ich für die bereitgestellten Daten und Kulturen. Die Zusammenarbeit war nicht nur produktiv, sondern hat mir auch einen guten Einblick in andere Fachbereiche gegeben. Wat de Buur nich kennt, dat freet he nich!

Herrn Prof. Dr. Matthias Winterhalter von der Jacobs University Bremen gilt mein besonderer Dank sowohl für die freundliche Bereitstellung seines ZetaSizers als auch für die angenehme und lehrreiche Zeit in seiner tollen Laborgruppe. Es hat mir ausgesprochen gut in Bremen gefallen. Und der Kaffee natürlich auch!

Meinen Freunden danke ich für die Abwechslung und Ablenkung während der Freizeit. Ebenso für interessante Diskussionen, die sich nicht auf die Themen Physik und Biologie beziehen.

Doch besonderen Dank gilt vor allem meinen Eltern Maren und Uvo Hammer für die immer noch von ihnen gewährte Unterstützung. Auf euch kann ich mich verlassen.

Und natürlich bedanke ich mich bei meiner großartigen persönlichen biologischen Beraterin, Frau Dr. Mareike Müller, für die großartige Unterstützung während meiner Doktoranden-Zeit.

## Lebenslauf

Name	Malte Uvo Hammer
Anschrift	Kurhaus Str. 46 D-23795 Bad Segeberg
Geboren	06.03.1978                      Kiel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Hochschulausbildung	
1998	Beginn des Studium der Elektrotechnik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1999	Beginn des Studium der Physik an der an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2004	Abschluss des Physik-Studiums mit Diplom, Note „sehr gut“
Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Seydel, Forschungszentrum Borstel, Laborgruppe Biophysik; „Korrelation zwischen der Suszeptibilität verschiedener Bakterienstämme gegenüber Polymyxin B und biophysikalischen Daten an rekonstituierten Modellmembranen“	
seit 2004	Promotion am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie, Laborgruppe Biophysik im Fach Biophysik
Schulausbildung	
1984	Herman-Ehlers-Grundschule, Preetz
1983	Friedrich-Schiller-Gymnasium, Preetz
1997	Beendigung der schulischen Ausbildung mit Abitur
Wehrdienst:	1998