

Entwicklung verschiedener Beschichtungstechniken zur Integration antimikrobieller Peptide

Dissertation
vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin
Susanne Grohmann

Kiel, 2010

Entwicklung verschiedener Beschichtungstechniken zur Integration antimikrobieller Peptide

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin

Susanne Grohmann

Kiel, 2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2010

Zum Druck genehmigt: _____

gez. Prof. Dr. rer. nat. Lutz Kipp, Dekan

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da ein Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.*

Sir Isaak Newton

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
Die postoperative Osteomyelitis	1
Besiedelung einer Implantatoberfläche	2
1.1 Immunsystem	4
1.1.1 Angeborene Immunität	5
1.1.2 Erworbene Immunität	5
1.2 Antimikrobielle Peptide	7
1.2.1 Funktion der AMP	10
1.2.2 Antimikrobieller Wirkmechanismus	11
1.2.3 Defensine	14
1.2.4 Cathelizidine	18
1.3 Biomaterialien	20
1.4 Übersicht über die Beschichtungstechniken	20
1.4.1 <i>Delivery</i> Systeme auf Basis bioabbaubarer Polymere	21
1.4.2 Das Polymer Poly-D,L,-Laktid (PDLLA)	22
1.4.3 <i>Delivery</i> Systeme auf Basis eines Fibringerüsts	23
1.4.4 Kovalente Bindung	26
1.5 Zielsetzung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Zellkultur	28
2.1.1 Verwendete Zelllinien	28
2.1.2 Kultivierung	29
2.1.3 Methoden zur Bestimmung der Zellzahl	31

2.2	Trennverfahren	35
2.2.1	Die RP-HPLC	35
2.2.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	39
2.3	Quantitative Proteinbestimmung	42
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	42
2.3.2	Der ELISA	43
2.3.3	Western-Blot	48
2.3.4	Bestimmung der Enzymaktivität	51
2.4	Mikrobiologische Untersuchungen	52
2.5	Beschichtung mit PDLLA	53
2.5.1	Arzneistoffträger/Polymer	53
2.5.2	Beschichtungstechnologie	53
2.6	Konjugation antimikrobieller Wirkstoffe an Fibrinogen	55
2.7	Kovalente Bindung	59
2.7.1	Mikrobiologische Aktivität kovalent gebundener AMP	62
2.8	Statistik	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Antimikrobielle Peptide: Stabilität und Wiederfindung	64
3.2	PDLLA-Beschichtung	66
3.2.1	Löslichkeit von AMP	67
3.2.2	Freisetzungskinetik und maximale Abgabemenge aus der PDLLA-Beschichtung	70
3.2.3	Auswirkung der PDLLA-Beschichtung auf SAOS-Zellen	71
3.2.4	Mikrobiologische Untersuchungen der beladenen PDLLA-Beschichtung	73
3.3	Fibrinogen-Kopplung	76
3.3.1	Aktivitätsbestimmung von Thrombin und Plasmin	76
3.3.2	Nachweis der Kopplung	77
3.3.3	Herstellung von Fibrinclots	78
3.3.4	Freisetzung von Vancomycin und AMP aus Fibrinclots	79
3.3.5	Auswirkung eines AMP-Fibrinclots auf SAOS-Zellen	81
3.3.6	Mikrobiologische Untersuchungen der Clots	82
3.4	Kovalente Bindung	85

4 Diskussion	88
4.1 Antimikrobielle Peptide: Stabilität und Wiederfindung	90
4.2 Kovalente Beschichtung	91
4.3 PDLLA	93
4.4 An Fibrinogen gebundene AMP	96
5 Ausblick	98
Zusammenfassung	100

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen, wie sie z.B. in der Liste der gebräuchlichen Abkürzungen unter Wikipedia (http://de.wikipedia.org/wiki/Portal:Abk%C3%BCrzungen/Gebr%C3%A4uchliche_Abk%C3%BCrzungen) aufgelistet sind, werden nicht gesondert erwähnt.

Internationale Einheiten und SI-Präfixe werden, wie in dem Faltblatt: „Die gesetzlichen Einheiten in Deutschland“ angegeben, verwendet (einzusehen unter: <http://www.ptb.de/de/publikationen/download/pdf/einheiten.pdf>).

a. dem.	aqua demineralisiert
a. dest.	aqua destillata auch Aquadest
AMP	antimikrobielle Peptide
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraesigsäure
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
FBS	fötales Rinderserum
*g	vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
hBD-2, -3	humanes β -Defensin-2, -3
HEPES	(4-(2Hydroxyethyl)-1-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IL-1	Interleukin-1

IL-6	Interleukin-6
LL-37	antimikrobielles Peptid
M	Molar
MW	Molekulargewicht
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDLLA	Poly-D,L-Laktid
PMMA	Polymethacrylat
POD	Peroxidase
RPM	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RNase	Ribonuklease
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
OD600	optische Dichte bei 600 nm

Teile dieser Arbeit wurden vorgestellt auf dem
Young Investigator Osteologie Symposium YIOSS, Köln (2006): *Antimikrobielle Peptide und Angiogenesefaktoren als neue Faktoren in der Beschichtungstechnologie von Implantaten*. S. Grohmann, R. Mentlein, C. J. Wruck, W. Petersen, E. Klostermeier, F. Birkenfeld, U. Mundt, B. Tillmann, T. Pufe, D. Varoga.

und auf der 101. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg (2006): *The antimicrobial peptides human beta defensin-2 and -3 (hBD-2 and -3) and the cationic antimicrobial protein LL-37 are expressed in healthy and inflamed human synovial membrane in-vivo and in-vitro*. S. Grohmann, D. Varoga, S. Kohrs, R. Mentlein, S. Lippross, E. Klostermeier, F. Paulsen, J. Harder, J. M. Schröder, S. Oestern, B. Tillmann, T. Pufe

und als Poster auf dem

3rd International Symposium „Interface Biology of Implants“, Rostock (2009): *Evaluation of the effect on biofunctionalised implant surfaces for antimicrobial activity*. S. Grohmann, R. Mentlein, D. Varoga.

Einleitung

Die Osteitis beschreibt eine bakterielle Infektion nach operativem Einsatz von Implantaten. Aufgrund ihrer schwierigen Therapiemöglichkeiten und der Rezidivgefahr ist die Osteitis eine schwerwiegende Komplikation in der Chirurgie des Bewegungsapparates. Dadurch verlängert sich der stationäre Aufenthalt um durchschnittlich 15 Tage und verursacht Mehrkosten in Höhe von 14.000€ pro Patient [Hofmann et al., 1997]. Nach endoprothetischem Ersatz tritt die Osteitis mit einer Häufigkeit zwischen 1-10 % auf (1-5 % in [Bauer and Schils, 1999], 2-8 % in [Ridgeway et al., 2005], 10 % in [Ahnfelt et al., 1990]). Die Beschwerden können außerdem erst viele Jahre nach dem Eingriff auftreten und die Erkrankung kann einen langwierigen Verlauf nehmen. Etwa 30 % der akuten Infektionen gehen trotz aller therapeutischer Bemühungen in eine chronische posttraumatische Osteitis über. Dabei sind Osteosynthesen¹ nach geschlossenen Frakturen mit 1-5 % betroffen [Schmelz et al., 2006]. Eine Therapie ist gerade bei der Behandlung von endoprothetischem Ersatz eine Herausforderung und oft langwierig. Neben einer systemischen Antibiotikabehandlung (mit kontrovers diskutierten Nebenwirkungen [Wood, 1996; Suter et al., 1994]) muss das infizierte Implantat und das nekrotische Gewebe gründlich entfernt werden. Erst im Anschluss (nach 8-12 Wochen) kann mit dem Aufbau des Gelenks begonnen werden.

In der Vergangenheit wurde das Infektionsrisiko durch technische Hygienemaßnahmen (z.B. der Einsatz von Luftfilteranlagen [Charnley and Eftekhar, 1969; Charnley, 1972] in den Operationssälen oder das Tragen von Ganzkörperanzügen [Lidwell et al., 1982]) und verbesserte Operationstechniken [Taylor, 1997] reduziert. Der Einsatz von lokalen Antibiotika beschränkt sich bisher nur auf die Applikation in Form von Polymethacrylat-Ketten [Ostermann et al., 1995], Kollagenschwämmen [Stemberger et al., 1997] oder Knochenzement [Hesaraki and Nemati, 2008; Garvin et al., 1994]. Zusätzlich wäre es sinnvoll, die Implantatoberfläche durch eine antimikrobielle Beschichtung steril zu halten.

¹Versorgung von Knochenbrüchen mit Implantaten

Pathomechanismen, die zur Besiedelung einer Implantatoberfläche führen

Eine Infektion des Implantats kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Bei der direkten Kolonisation können potentielle Erreger die Materialoberfläche bereits zum Zeitpunkt des Implantateinsatzes besiedeln. Solch eine Kontamination erfolgt meist über die Haut des Patienten (siehe Abbildung 1.1), da sogar nach einer Desinfektion bis zu 20 % der Standortflora in den Haarfolikeln und den Talgdrüsen verbleiben und nicht über lokale Desinfektionen erreichbar sind [Bencini et al., 1991]. Bei den Erregern, die zu einer implantatassoziierten Infektion führen, handelt es sich hauptsächlich um Staphylokokken (u.a. *St. epidermidis* oder *St. aureus*) und zudem um kommensale Mikroorganismen der Haut. Eine Infektion kann weiterhin „per continuitatem“ erfolgen, also durch Kontakt zu einer benachbarten bereits infizierten Stelle oder durch hämatogene oder lymphogene Aussaat von Bakterien.

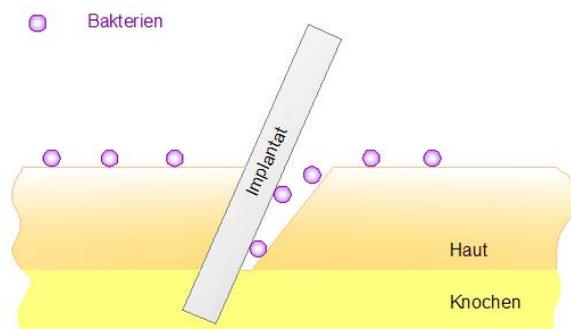


Abbildung 1.1: Unerwünschte Besiedelung einer Implantatoberfläche während des operativen Eingriffs.

Durch Berührung mit der Haut bleiben Bakterien an der Implantatoberfläche haften, gelangen in den Körper und können eine Osteitis verursachen.

Aus diesen Gründen kommt der Prophylaxe bei endoprothetischem Ersatz eine besondere Bedeutung zu. Eine systemische Antibiotikatherapie wird daher standardmäßig bei einer solchen Operation durchgeführt. Gerade die Patientengruppe, die oft einen künstlichen Gelenkersatz erhält, ist häufig durch andere Erkrankungen (Immunsuppression, rheumatoider Arthritis oder Diabetes mellitus) anfällig für Infektionen.

Die Interaktion zwischen dem Fremdmaterial, den bakteriellen Infektionserregern und bestimmten Faktoren des Patienten (lokale Abwehrbedingungen, systemische

Risikofaktoren) bilden die Grundlage einer Infektion. Der menschliche Organismus reagiert auf ein Implantat, indem er dessen Oberfläche mit einem *conditioning film* überzieht, der Proteine enthält (siehe Abbildung 1.2). Die Adsorption von zunächst Albumin und im weiteren Verlauf Fibronectin, Fibrinogen und Immunglobulinen begünstigt eine Bakterienbesiedelung, da viele dieser Moleküle die Adhäsion und Kolonisation von Bakterien erleichtern [Habash and Reid, 1999]. Bakterien, die über eine lokale Kontamination oder über den hämatogenen Weg zur Implantatoberfläche gelangt sind, können sich nun über spezifische Rezeptoren an die vorhandene Proteinmatrix anlagern. Die Bindungsaffinität der Bakterien hängt zudem vom Material des Implantates ab [Chang and Merritt, 1994]. So heften sich die Keime leichter an Stahl und Polymethacrylat (PMMA) als an Titanoberflächen. Haften die Bakterien fest am Material, regulieren sie nicht nur das Wachstum und die Abgabe von Virulenzfaktoren der Kolonie. Sie können ebenfalls die Produktion extrazellulärer Mucopolysaccharide steuern, die eine dreidimensionale gelartige Matrix bilden. Dieser Biofilm ist gegen eine systemische antibiotische Behandlung außerordentlich resistent.

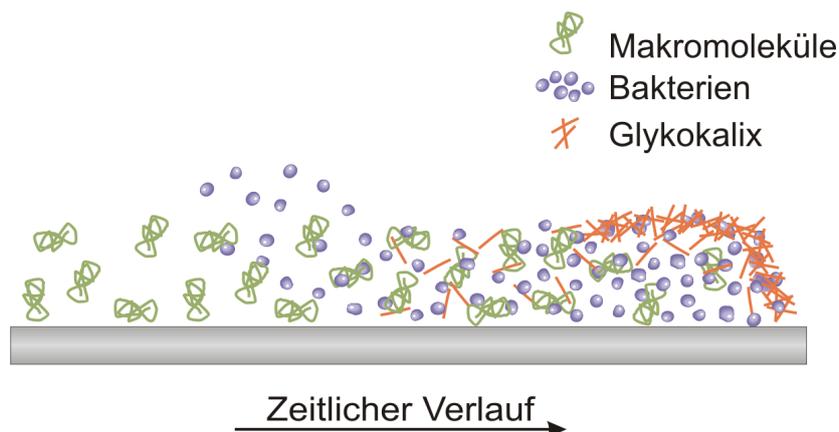


Abbildung 1.2: Ablauf einer Biofilmbildung auf Oberflächen.

Nach Implantation adsorbieren zunächst Moleküle wie Albumin und Fibrinogen an die Oberfläche. Bakterien lagern sich in diese Proteinmatrix ein und können durch die Abgabe von Mucopolysacchariden einen Biofilm bilden, der sie vor einem antibiotischen Wirkstoff schützen kann.

Nach der Adhäsion folgt die Ausbreitung der Mikroorganismen auf der Implantatoberfläche [Habash and Reid, 1999]. Um diesen Mechanismus zu unterbinden, muss schon früh die Adhäsion der Bakterien an das Implantat verhindert werden. Eine gängige Routinemaßnahme ist der Einsatz von Antibiotika in Knochenzement. Allerdings wird bis heute an einer Verbesserung des *drug delivery* Systems gearbeitet,

wobei die Bekämpfung multiresistenter Keime eine wichtige Rolle spielt.

1.1 Immunsystem

Der Mensch setzt sich ständig mit Einflüssen der belebten Umwelt auseinander, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Einige dieser Organismen sind für die Funktion und den Schutz des menschlichen Körpers essentiell (z.B. die kommensalen Bakterien der Hautflora), können aber auch Ursache schwerer Infektionen sein. Zur Regulation und zur Eliminierung dieser obligat pathogenen Erreger, stehen dem Menschen verschiedene Mechanismen der Immunabwehr zur Verfügung [Hahn et al., 2001]. An erster Stelle stehen hier die Epithelbarrieren, die eine Infektion verhindern sollen.

Die Bildung dieser Barrieren entstehen

- mechanisch: durch von „tight junctions“ zusammengehaltene Epithelzellen, durch einen Luft- oder Flüssigkeitsstrom entlang des Epithels, durch Schleimbewegung durch Cilien,
- chemisch: durch Fettsäuren der Haut
 - durch Enzyme wie z. B.
 - Lysozym im Speichel, Schweiß und in Tränen
 - durch einen niedrigen pH-Wert im Magen,
 - durch **antimikrobielle Peptide** wie z. B.
 - Defensine in der Haut und im Darm
- mikrobiologisch: durch kommensale Mikroorganismen, die um Nährstoffe und Bindungsstellen an Epithelzellen konkurrieren.

Zusätzlich verfügt das Immunsystem über zellvermittelte und humorale Abwehrmechanismen. Dabei werden unter humoralen Abwehrmechanismen diejenigen verstanden, die nicht von Zellen, sondern von löslichen Proteinen vermittelt werden. Weiterhin lässt sich das Immunsystem in zwei überlappende Bereiche aufteilen, das angeborene unspezifische und das erworbene spezifische Immunsystem.

1.1.1 Angeborene Immunität

Das angeborene, phylogenetisch ältere Immunsystem ist für die erste Phase der Pathogenabwehr zuständig. Hierzu zählen physikalische, chemische und biochemische Barrieren der Haut und Schleimhäute. Die Erkennung von Zielstrukturen verläuft unspezifisch über konservierte „allgemeine Muster“ von Krankheitserregern, die auch als „pathogen assoziierte Moleküle“ bezeichnet werden (*pathogen associated molecule*, PAM) [Janeway et al., 2002]. Zu den zellulären Mechanismen des angeborenen Immunsystems gehören die phagozytierenden Zellen wie die neutrophilen Granulozyten und die Makrophagen. Werden sie aktiviert, phagozytieren und/oder lysieren sie die Infektionserreger und aktivieren die spezifische Immunabwehr. Diese veranlasst über lösliche Proteinmediatoren (Zytokine), dass die vom Infektionsort umgebenden Gefäßwände durchlässiger, die Endothelzellen aktiviert und andere Immunzellen zum Entzündungsort angelockt werden. Das Komplementsystem ist ein Teil der humoralen Abwehr des angeborenen Immunsystems. Es besteht aus einer Reihe von löslichen Proteinen, die an die Oberfläche des Pathogens binden und so zu dessen Opsonierung führen. Die phagozytierenden Zellen erkennen über Rezeptoren die gebundenen Bestandteile des Komplementsystems und internalisieren diese. Antimikrobielle Peptide gehören ebenfalls zu den löslichen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems und sind in der Lage, Bakterien durch Porenbildung in deren Membranen zu töten. Die Trennung von angeborenem und erworbenem Immunsystem ist nicht ganzheitlich. Das angeborene System spielt eine große Rolle in der Aktivierungs- sowie in der Effektorphase des erworbenen, spezifischen Immunsystems.

1.1.2 Erworbene Immunität

Die Aktivierung des erworbenen Immunsystems kann durch die antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) erfolgen. Das adaptive, phylogenetisch jüngere Immunsystem ist eine durch T- und B-Lymphozyten (sog. Effektorzellen) vermittelte spezifische Abwehrreaktion, die mit der Bildung von Antikörpern einhergeht und häufig lebenslange Immunität hinterlässt [Hahn et al., 2001]. Das erworbene Immunsystem besitzt eine große Bandbreite der immunologischen Abwehr, da jede körperfremde Substanz von Immunzellen erkannt werden kann.

Die Lymphozyten lassen sich in B- und T-Lymphozyten (auch als B- und T-Zellen bezeichnet) unterteilen [Janeway et al., 2002]. Sie bewegen sich im Lymphsystem und wandern zu den sekundären lymphatischen Organen. Dort treffen die T-Zellen auf Zellen, die potentielle Antigene von Krankheitserregern präsentieren und diese so den Komponenten des angeborenen Immunsystems kenntlich machen. Die T-Zellen werden aktiviert und nach einer Proliferationsphase von 3-4 Tagen zu Effektorzellen. Die T-Zellen lassen sich in $CD4^+$ -T-Zellen (T-Helferzellen) und in $CD8^+$ -cytotoxische T-Zellen unterteilen. Die Subpopulationen der T-Helferzellen, die TH1- und TH2-Zellen nehmen im Entzündungsgeschehen unterschiedliche Funktionen wahr. Während die TH1-Zellen die Makrophagen aktivieren, stimulieren die TH2-Zellen, Mastzellen und Vorläuferzellen der eosinophilen Granulozyten. Beide Subklassen aktivieren B-Zellen. Diese werden nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren und zur humoralen Antwort des spezifischen Immunsystems beitragen.

Nach einer erfolgreichen Immunantwort bleiben die Informationen über die Pathogene erhalten, es bildet sich ein „immunologisches Gedächtnis“.

Tabelle 1.1: Einteilung der Immunabwehr

	angeborene Immunität	erworbene Immunität
Eigenschaften	unspezifisch phylogenetisch älter sofort verfügbar	spezifisch phylogenetisch jünger nach Antigenkontakt aktiv
zelluläres System	Neutrophile Granulozyten NK-Zellen Makrophagen Zytotoxische T-Zellen	T-Helferzellen T-Gedächtniszellen T-Suppressorzellen B-Zellen
humorales System	Komplement Zytokine Lysozym Antimikrobielle Peptide	Antikörper Zytokine

1.2 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Antimikrobielle Peptide wurden in vielen Organismen, einschließlich der Bakterien selbst, gefunden. Bei Eukaryoten konnten Peptide mit antimikrobieller Funktion in unterschiedlichsten Geweben beschrieben werden und stellen einen entwicklungs-geschichtlich konservierten Mechanismus dar, um den eigenen Organismus gegen aggressive Lebewesen zu schützen [Selsted and Ouellette, 2005; Schröder, 1999]. AMP sind niedermolekulare, oft kationische und amphiphile Peptide mit weniger als 100 Aminosäuren. Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur, Funktionsweise und dem Zielorganismus. Die aktiven Peptide entstehen aus Vorläuferpeptiden durch einen oder mehrere proteolytische Prozessierungsschritte.

Die AMP sind in der Lage, ein breites Spektrum von Bakterien, umhüllten Viren [Robinson et al., 1998], Protozoen [Arrighi et al., 2002], Pilzen [Fehlbaum et al., 1996; Kieffer et al., 2003] und sogar Tumorzellen [Suttman et al., 2008] abzutöten. AMP werden daher von Zellen exprimiert, die unmittelbar an der Immunabwehr beteiligt sind. Bei den Vertebraten sind dies die Makrophagen, Granulozyten und Blutplättchen sowie Epithelzellen der Haut, des Bronchialgewebes, des Darms und des männlichen und weiblichen Reproduktionstraktes. Seit der Entdeckung des Lysozym 1922 wurden bis heute mehr als 1228 vielfältige antimikrobielle Peptide dokumentiert (unter <http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm> und in der *antimicrobial data base* unter <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> über [Wang et al., 2009]).

Eine Einteilung der AMP gestaltet sich schwierig, da die Peptide deutlich verschieden sind (siehe Abbildung 1.3). Sie kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten, wie Größe, Struktur oder Zusammensetzung der Aminosäuren erfolgen. Aufgrund dieser Diversität und aufgrund dessen, dass immer neue Peptide mit antimikrobieller Aktivität gefunden werden, gibt es bisher noch keine einheitliche Einteilung. Bei einer Einordnung nach **Struktureigenschaften** erfolgt zunächst die Einteilung in kationische und nicht-kationische AMP.

Zu den **nicht-kationischen AMP** zählen Moleküle, die reich an Asparaginsäure sind und Moleküle, die sich von Neuropeptiden ableiten. Die Familie der nicht-kationischen AMP ist klein (der Mensch besitzt aus dieser Gruppe nur Dermicidin) und die antimikrobielle Aktivität ihrer Mitglieder gering.

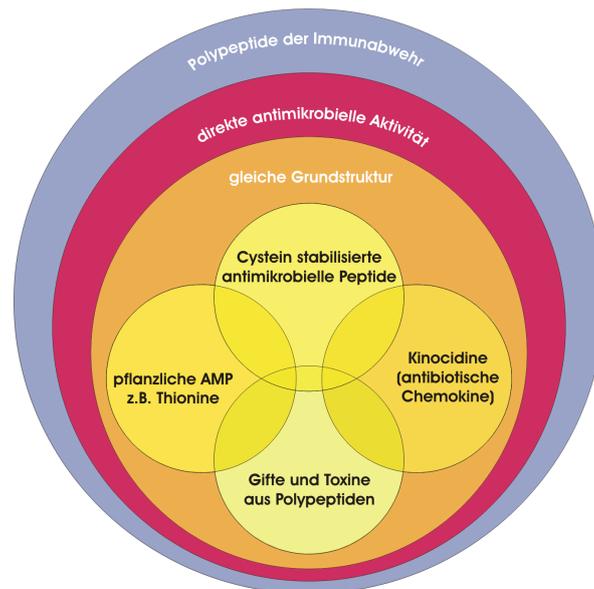


Abbildung 1.3: Eingliederung der antimikrobiellen Peptide in verschiedene Untergruppen und Darstellung der verwandtschaftlichen Nähe.

Die in dieser Arbeit behandelten Defensine gehören zu den Cystein stabilisierten AMP. Das Cathelizidin teilt mit den Defensinen die direkte antimikrobielle Aktivität und eine ähnliche Grundstruktur.

Die Gruppe der **kationischen Peptide** ist weitaus größer und beinhaltet die Defensine, Cathelizidine, Peptide mit Anreicherung von ein oder zwei Aminosäuren (Histatin), Cecropin und Magain (die nicht beim Menschen zu finden sind) und Peptide, die mit Histonen oder Laktoferrin verwandt sind. Die kationischen Peptide können nach weiteren Merkmalen der Sekundärstruktur in folgende Untergruppen eingeteilt werden:

- lineare kationische α -helikale Peptide
- Peptide mit einer **ausgedehnten (extended) Struktur** und Überexpression einer oder mehrerer Aminosäuren
- Peptide mit einer **Loop-Struktur**
- Peptide mit β -*Sheets*, die über eine unterschiedliche Anzahl von **Cysteinbrücken** zusammengehalten werden.

Die bei den Säugetieren gefundenen AMP können aufgrund ihrer **Nukleotidsequenz** in **Defensine** und **Cathelizidine** eingeteilt werden.

Eine Einteilung nach **Proteinfamilien** ist ebenfalls möglich. Zum einen ist die Familie der **Proteaseinhibitoren** zu nennen. Sie beugen durch bakterielle Proteasen einer

Gewebeschädigung vor, indem sie deren Funktion inhibieren. Die Serin-Protease-Inhibitoren Elafin und Antileuko-Protease (ALP) besitzen zusätzlich bakterizide Eigenschaften.

Die AMP können nach ihrem **Wirkmechanismus** grob in porenbildene Peptide, ionenbindene Peptide und Peptide mit enzymatischer Wirkung eingeteilt werden (siehe Tabelle 1.2). Der genaue Mechanismus **porenbildener** Peptide ist noch nicht vollständig verstanden, aber es existieren verschiedene Modelle, die in Abschnitt 1.2.2 auf Seite 11 beschrieben werden.

Tabelle 1.2: Humane AMP - Eine Übersicht. \oplus : grampositive Bakterien, \ominus : gramnegative Bakterien

Name	Vorkommen	Wirksam gegen	weitere Charakteristika	Referenz
Porenbildene Peptide				
LL-37	Leukozyten, Epithelzellen	\ominus, \oplus , Pilze	induzierbar, 37 AS, α -Helix, chemotaktisch für neutrophile, Monozyten, T-Zellen	[Gudmundsson et al., 1996; Schröder and Harder, 2006]
Defensine				
- α (HNP1-4)	Neutrophile	\oplus ,	induzierbar, β -Sheets	[Lehrer and Ganz, 1996]
- α (HD5,6)	Paneth-Zellen, Urogenitaltrakt	\ominus , Pilze	induzierbar, β -Sheets	
- β	alle Epithelzellen	$\ominus, (\oplus)$, Pilze	konstitutiv (hBD-1) und induzierbar, β -Sheets	[Harder et al., 1997a]
Ionenbindene Peptide				
Laktoferrin/ Laktoferricin	Darm	\oplus, \ominus , Pilze, Herpes Simplex Virus	proteolytisches Produkt aus dem Laktoferrin der Milch, 25 AS, Loop-Struktur, Depolarisation der Zytoplasmamembran, eisenbindendes Protein	[Jones et al., 1994; Välimaa et al., 2009]
Enzyme				
Antileuko-protease (ALP)	Epithelzellen der Lunge, Haut	\oplus, \ominus , Pilze	konstitutiv, Protease Inhibitor	[Hiemstra et al., 1996]

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Name	Vorkommen	Wirksam gegen	weitere Charakteristika	Referenz
RNase7	Haut	⊕, ⊖, Pilze	konstitutiv, Ribonuklease	[Harder and Schröder, 2002]
Lysozym	Drüsensekret (Speichel, Tränen), Epithelzellen	⊕, (⊖)	konstitutiv,	[Schröder and Harder, 2006]
sekretorische Phospholipase A2	Granulozyten, Epithelzellen	⊕	konstitutiv,	[Qu and Lehrer, 1998]
sonstige Mechanismen				
Histatin	Speichel	⊕, Pilze	7-38 AS, <i>extended coil</i> -Struktur	[Oppenheim et al., 1988; Ahmad et al., 2004; Andreu and Rivas, 1998; Kavanagh and Dowd, 2004]
Granulysin	T-Lymphozyten	<i>M. tuberculosis</i>	gehört zur Familie der Saposin-like Proteine	[Ernst et al., 2000]
Dermicidin	Epithelzellen, Schweißdrüsen	⊕, ⊖, Pilze	47 AS	[Schitteck et al., 2001]
Bactericidal Permeability Increasing Protein (BPI)	Granulozyten	⊖	neutralisiert LPS	
<i>platelet microbicidal Proteins</i> (PMP) AMP aus Plättchen	Thrombozyten	⊕, ⊖	umfassen sieben Peptide mit antimikrobieller Wirkung	[Yeaman and Bayer, 2006]

1.2.1 Funktion der AMP

Die Expression der AMP kann, abhängig von der Art und vom jeweiligen Gewebe, sowohl konstitutiv erfolgen, um als vorbeugenden Schutz gegen Infektionen zu dienen, als auch durch Bakterien bzw. deren Produkte (z.B. Lipopolysaccharid, LPS) induziert werden [Zasloff, 2002b; Harder et al., 1997a, 2000]. Die AMP stellen somit eine erste, wichtige Schutzbarriere gegen viele verschiedene Eindringlinge dar, indem sie in den ersten Stunden nach einer Infektion das Wachstum von Mi-

kroorganismen kontrollieren. Dabei werden Bestandteile der Mikroorganismen von membranständigen *Toll-like* Rezeptoren (TLR)² erkannt. Dadurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die den Transkriptionsfaktor NF- κ B freisetzt und zur Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und AMP führt. Die Produktion von AMP erfolgt durch de novo Synthese z.B. in den *lamellar bodies* der Keratinozyten [Oren et al., 2003] oder auch durch Proteolyse vorhandener Proteine, wie z.B. bei Laktoferrin oder Hämoglobin [Bellamy et al., 1993; Fogaca et al., 1999].

Ursprünglich wurden die AMP als natürliche Antibiotika beschrieben; jedoch stellt sich immer weiter heraus, dass diese Peptide zusätzlich immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Damit regulieren sie vielseitige und für die Immunantwort wichtige Aufgaben wie Chemotaxis [Yang et al., 2001a] und Stimulation der Zyto- und Chemokinproduktion [Bowdish and Hancock, 2005], Zellproliferation [Murphy et al., 1993] und Angiogenese [Li et al., 2000]. Indem die AMP Monozyten und dendritische Zellen anlocken, übernehmen sie eine wichtige **Funktion** bei der Mobilisierung des erworbenen Immunsystems. Zudem wird eine Beteiligung der AMP in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie M. Crohn [Wehkamp et al., 2003], zystischer Fibrose [Harder et al., 2007] und inflammatorischen Erkrankungen an den gelenkbildenden Strukturen des Menschen beschrieben (Knorpel: [Varoga et al., 2004], Knochen: [Varoga et al., 2008]).

1.2.2 Antimikrobieller Wirkmechanismus

Durch die amphiphatische Grundstruktur, mit einer hydrophoben und einer hydrophilen Seite, lassen sich die entsprechenden AMP einerseits in wässriger Phase lösen und können andererseits in die lipidreichen Membranen von Mikroorganismen eindringen und sie zerstören [Zasloff, 2002a].

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die zum Tod eines Bakteriums führen können. Die AMP können die Bakterienmembran permeabilisieren und bewirken damit einen Zusammenbruch des Membranpotentials oder sie binden an periplasmatische Rezeptoren oder intrazelluläre Moleküle wie Nukleinsäuren oder Enzyme und behindern somit deren Funktion.

²die u.a. auf Effektorzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert werden

Bakterienzellwand als Zielstruktur

Die AMP, die basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin enthalten, besitzen eine positive Ladung. Dadurch ist es ihnen möglich, über elektrostatische Interaktionen an negativ geladene Oberflächenmembranen der Bakterien zu binden. Die Bindung findet hierbei über die Lipopolysaccharide (LPS) der gramnegativen Bakterien, die Polysaccharide und Teichonsäuren der grampositiven Bakterien, sowie durch die Phospholipide in der inneren Membran von gramnegativen und -positiven Bakterien statt [Fujii et al., 1993; Lehrer et al., 1989]. Anschließend aggregieren die Peptide, wobei sich die hydrophoben Aminosäureketten nach außen lagern. So ist es ihnen durch die amphipatische Struktur möglich, in die Bakterienmembran einzudringen und Poren zu bilden. Diese Poren ermöglichen verschiedenen wasserlöslichen Substanzen den Durchgang durch die Membran, wodurch das Membranpotential zusammenbricht und zum Tod der Zelle führt. Diese Wirkungsweise wird in drei weitere theoretische Modelle unterteilt [Brogden, 2005] (siehe Abbildung 1.4).

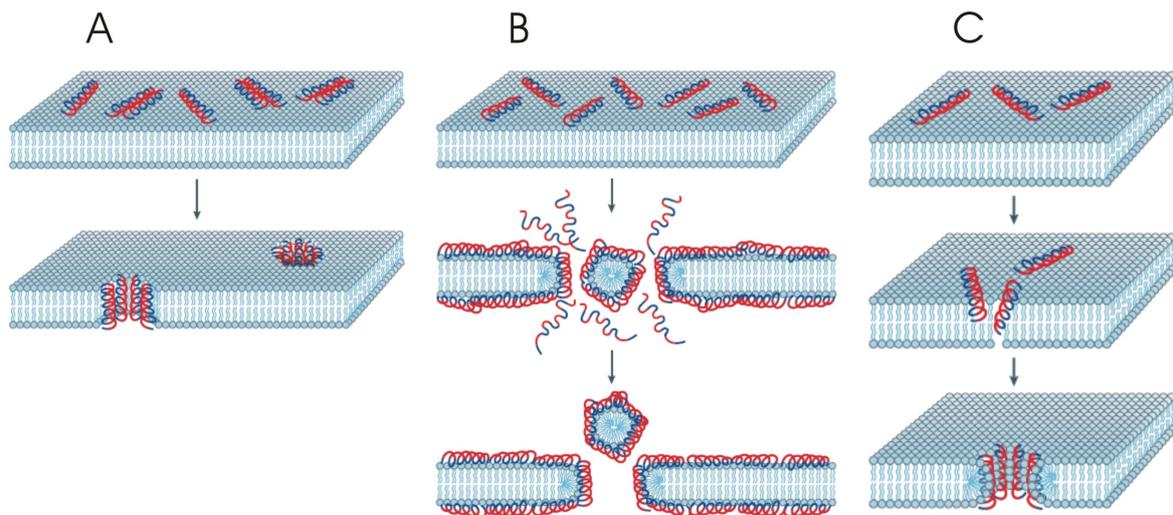


Abbildung 1.4: Modelle der Interaktion von AMP mit Membranen

Die Permeabilisierung der Bakterienmembran wird durch das A) *barrel-stave*-Modell, B) *carpet-like*-Modell und C) *toroidal-pore*-Modell beschrieben. Die **hydrophilen** Regionen der Peptide sind rot, die **hydrophoben** Regionen blau dargestellt (modifiziert nach [Brogden, 2005]).

- A) Das *barrel-stave* (Fassdauben)-Modell beschreibt die Bindung des hydrophoben Peptidanteils mit der Membran und die weitere Einlagerung in das Innere der Membran sowie die Bildung einer Transmembranpore.
- B) Beim *carpet-like* (Teppich)-Modell bedecken die Peptidmoleküle die bakterielle

Membranoberfläche und interagieren mit der Membran über den hydrophoben Peptidanteil. Wenn die Konzentration der Peptide auf der Membran so groß wird, dass die AMP sie fast wie ein Teppich bedecken, ist eine kritische Grenzkonzentration erreicht. Die Moleküle dringen ungeordnet in die Membran ein und zerstören die Integrität der Membran.

- C) Beim *toroidal-pore* (Ring-Poren)-Modell bilden sich zunächst AMP Aggregate auf der Membranoberfläche und dringen so in die Membran ein, dass die hydrophilen Seiten in das Poreninnere zeigen.

Durch einen variierenden Gehalt an Phosphatidylcholin in der Bakterienmembranen kommt eine Selektivität der einzelnen antimikrobiellen Peptide für Bakterien zustande [Weinberg et al., 1998].

Bindung an essentielle Moleküle oder Ionen

Die kationischen Defensine verdrängen kompetitiv zweiwertige Kationen wie zum Beispiel Ca^{2+} , Zn^{2+} oder Mg^{2+} aus ihrer Bindung in den Lipopolysacchariden. Werden die als Verbindung dienenden Ionen dort herausgelöst, lockert sich die Verbindung zwischen den einzelnen Lipopolysacchariden [Hancock, 1997]. Die so gestörte Barrierefunktion der Außenmembran fördert die Zusammenlagerung der einzelnen Defensinmonomere zu Oligomeren und die Ausbildung von Poren [Selsted and Ouellette, 2005; Hoover et al., 2000]. Dieser Mechanismus wird als „*self-promoted uptake*“ bezeichnet [Devine and Hancock, 2002; Zhang et al., 2000]. Die Poren steigern die Membranpermeabilität, was einen Ladungs- und Wasseraustausch zur Folge hat und zum osmotischen Zelltod führen kann. Außerdem können verschiedene antimikrobielle Peptide die DNA- oder RNA-Synthese hemmen, mit der Folge, dass eine Vermehrung des Bakteriums nicht möglich ist [Selsted and Ouellette, 2005].

Die Zellen der Eukaryoten haben einen hohen Anteil an Cholesterol und damit eine andere Membranzusammensetzung als Bakterien. Daher können die AMP nicht an die Lipidschicht körpereigenen Zellen binden, wodurch diese geschützt sind.

Aufgrund ihrer Wirkungsweise auf die Bakterienmembran und der inhibitorischen Wirkung auf die bakterielle Zellwandsynthese sind die Cathelizidine und Defensine ideale Kandidaten für die Einbringung in Beschichtungen.

Tabelle 1.3: Verschiedene Wirkweisen der AMP

AMP-Wirkung	AMP	Referenz
Aktivität auf die Bakterienmembran	hBD-2	[Morgera et al., 2008]
Aktivität auf die Bakterienmembran, Bindung an ribosomale Untereinheit 50S, Inhibition der DNA-, RNA- und Proteinsynthese	HNP-1	[Xiong et al., 1999]
Aktivität auf die Bakterienmembran nach dem <i>toroidal-pore</i> Modell	LL-37	[Henzler-Wildman et al., 2004]
Aktivität auf die Bakterienmembran, bindet Eisenionen	Laktoferrin	[Jones et al., 1994]
Inhibition bakterieller Enzyme	Histatin	[Oppenheim et al., 1988]
Inhibition der DNA-, RNA- und Proteinsynthese, Inhibition der Zellwandsynthese	hBD-3	[Sass et al., 2008]

1.2.3 Defense

Die Defense umfassen bislang mehr als 80 Peptide [Lehrer et al., 1993; Martin et al., 1995; Diamond and Bevins, 1998]. Ihre gemeinsamen Merkmale sind drei intramolekulare Disulfidbrücken und eine molekulare Größe von 3-5 kDa. Sie besitzen keine acetylierten oder glykolysierten Seitenketten und werden als Präproteine synthetisiert.

Die **Struktur** der Defense besteht aus einer kurzen N-terminalen α -Helix und einer dreisträngigen β -Faltblattstruktur [Ganz, 2003]. Aufgrund ihrer Struktur und der Anordnung der drei intramolekularen Disulfidbrücken (siehe Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite) werden die Defense der Säugetiere in drei Untergruppen eingeteilt: α -Defense, β -Defense und θ -Defense [Tossi and Sandri, 2002]. Die α - und β -Defense weisen Ähnlichkeiten in ihrer dreidimensionalen Struktur auf [Zimmermann et al., 1995], besitzen aber Unterschiede in der Bildung der Disulfidbrücken. Die α -Defense bilden Disulfidbrücken zwischen den Cysteinres-

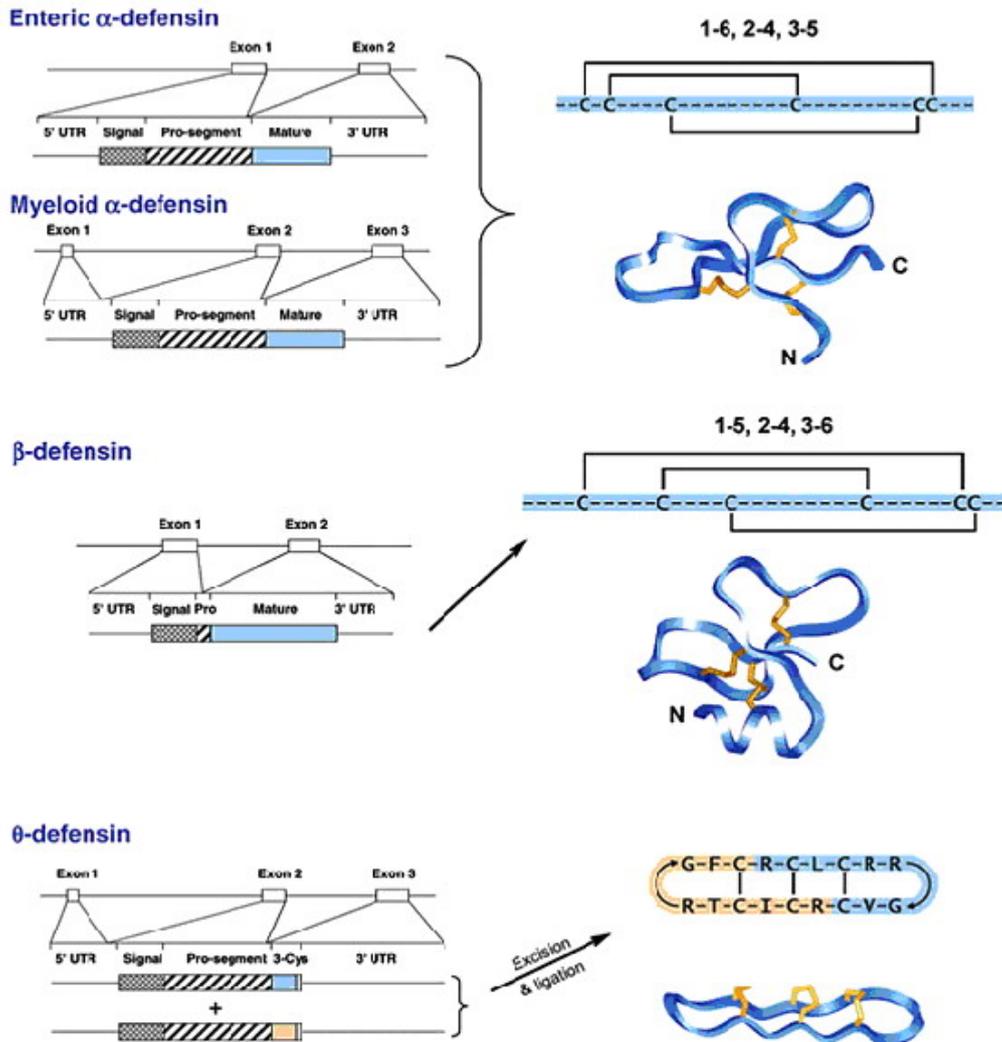


Abbildung 1.5: Biosynthese und Struktur der α -, β - und θ -Defensine.

Dargestellt ist außerdem die Anordnung der Disulfidbrückenbindungen sowie der dreidimensionalen Struktur der einzelnen Defensine. Alle Defensine besitzen drei antiparallele β -Faltblattstrukturen sowie drei konservierte Disulfidbrücken. Die β -Defensine besitzen im Gegensatz zu den α -Defensinen eine kleine aminoterminalen α -Helix-Struktur [Selsted and Ouellette, 2005].

α -Defensine

```

HNP-1  ----ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC----
HNP-2  ----CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC----
HNP-3  ----DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC----
HNP-4  ----VCSCRLVFCRRETELRVGNCLIGGVSFTYCCTRVD
HD-5   ---ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR---
HD-6   ---FTCHCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL---

```

 **β -Defensine**

```

hBD-1  -----DHYN-----CVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK-----
hBD-2  -GIG--DPVT-----CLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP-----
hBD-3  GIINTLQKYY-----CRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK-----
hBD-4  ----EFELDR-----ICGYGTARCRKK-CRSQEYRIGRCPNT-YACCLRKWDESLNRTKP
hBD-5  AGLDFSQPFPSGEFAVCESCKLGRGKCRKE-CLENEKPDGNCRLN-FLCCRQRI-----
hBD-6  PAKNAFFDEK-----CNKCLKGTCKNN-CGKNEELIALCQKS-LKCCRTIQCGSIID---

```

**Abbildung 1.6: Primärstruktur der α - und β -Defensine.**

Gelb markiert sind die konservierten Cysteine, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind.

ten 1-6, 2-4 und 3-5 aus, während bei den β -Defensinen die Cysteine 1-5, 2-4 und 3-6 miteinander verknüpft sind. Die Gene der α - und β -Defensine liegen in einem Cluster beisammen, daher nimmt man an, dass sie entwicklungsgeschichtlich einen gemeinsamen Ursprung haben. Die α -Defensine werden in den Granula der neutrophilen Lymphozyten, aber auch in den Epithelien des Dünndarms exprimiert. Die β -Defensine kommen im Gegensatz zu den α -Defensinen auch bei Vögeln und Pflanzen vor [Ganz, 2003]. Die θ -Defensine unterscheiden sich strukturell von den α - und β -Defensinen. Sie sind vermutlich aus mutierten α -Defensin-Genen entstanden und weisen einen zyklischen Aufbau auf. Bisher wurden sie ausschließlich in Phagozyten von Rhesusaffen beschrieben [Tang et al., 1999].

 β -Defensine

Für humane β -Defensine sind mit Hilfe der Bioinformatik 33 Gene identifiziert worden [Pazgier et al., 2006], die sich nicht nur in einem Cluster auf Chromosom 8 [Semple et al., 2005; Harder et al., 1997a], sondern auch auf den Chromosomen 6 und 20 befinden [Schutte et al., 2002]. Neben der Signalsequenz enthalten die Gene der β -Defensine ein Prosegment. Die AMP werden als Preproproteine synthetisiert,

aus denen die eigentlichen aktiven Peptide erst am Wirkort proteolytisch freigesetzt werden [Scocchi et al., 1992; Sørensen et al., 2001]. Es wird davon ausgegangen, dass diese Zusammensetzung die Grundstruktur während der Biosynthese und in proteasehaltiger Umgebung vor Proteolyse schützen [Wu et al., 2003]. Die gereiften Peptide sind zwischen 40 und 45 Aminosäuren lang.

Die β -Defensine besitzen ein breites antimikrobielles Spektrum gegen grampositive und -negative Bakterien, Pilze sowie Viren. Daneben zeigen humane β -Defensine auch chemotaktische und zytokinähnliche Funktionen [Chen et al., 2007].

Das erste humane β -Defensin (**hBD-1**) wurde 1995 im Blutplasma nachgewiesen [Bensch et al., 1995]. Es wird konstitutiv in Epithelien der Haut, des Urogenitaltraktes, des Gastrointestinal-, und Respirationstrakt exprimiert und zeigt eine starke bakteriozide Wirkung gegen gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) [Valore et al., 1998], aber nur eine geringe Aktivität gegen grampositive Bakterien, wie *St. aureus* [Zucht et al., 1998]. Zudem wird hBD-1 eine mögliche Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben [Sun et al., 2006].

Zwei weitere Defensine (hBD-2 und hBD-3) wurden aus den Zellen der Haut isoliert. Das **hBD-2** besteht aus 41 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 4 kDa. Zudem wurde es in Epithelzellen der Schleimhaut, des Gastrointestinaltraktes und des Respirationstraktes nachgewiesen. Es ist äußerst aktiv gegen gramnegative Bakterien wie *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) mit einer LD₉₀ von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [Schröder and Harder, 1999]. Eine bakteriostatische Wirkung gegen grampositive Erreger ist ebenfalls beschrieben worden [Harder et al., 1997b]. Neben einer geringen konstitutiven Expression lässt sich die Expression von hBD-2 durch verschiedene proinflammatorische Zytokine und Bakterien induzieren.

Von hBD-2 konnten über den Chemokinrezeptor CCR6 direkte Effekte auf unausgereifte dendritische Zellen nachgewiesen werden, die zur Ausreifung zu antigenpräsentierenden Zellen (APC) führten [Yang et al., 2001a,b]. hBD-2 wirkt chemotaktisch, indem es die Rekrutierung von Monozyten, T-Gedächtniszellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten veranlasst. Während der Epithelzelldifferenzierung bewirkt hBD-2 eine erhöhte Migration und Proliferation [Niyonsaba et al., 2007].

Das **hBD-3** ist ein 5 kDa großes, 45 Aminosäuren langes Peptid, welches gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt wurde [Garcia et al., 2001a; Harder

et al., 2001; Jia et al., 2001]. Es wird in Keratinozyten und Epithelien des Respirationstraktes [Dunsche et al., 2001, 2002] gebildet und hat eine breite antimikrobielle Aktivität nicht nur gegenüber grampositiven und -negative Erregern, sondern auch gegen Pilze wie *Candida albicans* [Garcia et al., 2001a]. Die Nettoladung mit +11 ist stark positiv, wodurch es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Bakterienmembran kommen kann. Auch multiresistente Staphylokokken und vancomycinresistente Enterokokken werden von hBD-3 bereits in geringer Konzentration abgetötet [Maisetta et al., 2006]. Für hBD-3 wird zudem eine mögliche Rolle während epithelialer Wundheilungsvorgänge diskutiert [Niyonsaba et al., 2007].

Bisher konnte das **hBD-4** [Garcia et al., 2001b] nur auf mRNA-Ebene charakterisiert und synthetisch hergestellt werden. Die Isolierung des Peptids aus Gewebe ist noch nicht beschrieben worden. Eine Expression der mRNA wurde in Keratinozyten und im Epithel der Atemwege nachgewiesen. Das hBD-4 besitzt insgesamt nur eine schwache antimikrobielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* und eine bakterio-statische Wirkung gegen *E. coli* sowie grampositive Bakterien.

Die zuletzt gefundenen β -Defensine **hBD-5** und **hBD-6** [Yamaguchi et al., 2002] wurden ebenfalls nur auf mRNA-Ebene beschrieben. Eine Expression konnte in Epithelzellen des männlichen Reproduktionstraktes nachgewiesen werden.

1.2.4 Cathelizidine

Die genomische Struktur der Cathelizidine besteht aus einer Signalsequenz, einer Proregion und einem Anteil für das aktive Peptid (siehe Abbildung 1.7). Der Name Cathelizidin leitet sich von der entwicklungsgeschichtlich hochkonservierten N-terminalen Proregion ab, die Cathelin genannt wird [Zanetti et al., 1995]. Die Proregion allein besitzt antimikrobielle Aktivität und inhibiert die Proteinase Cathepsin L [Zaiou et al., 2003]. Der C-terminale Anteil ist zwischen den Spezies variabel in der Struktur und stellt das eigentliche AMP dar. Beim Menschen ist nur ein Mitglied der Cathelizidine, das LL-37/hCAP18 (*human cationic antimicrobial peptide*) beschrieben. Der Name des aktiven AMP „LL-37“ stammt daher, dass es 37 Aminosäuren lang ist und mit 2 Leucinresten beginnt. Das Propeptid des kationischen AMP (hCAP) ist 18 kDa groß.

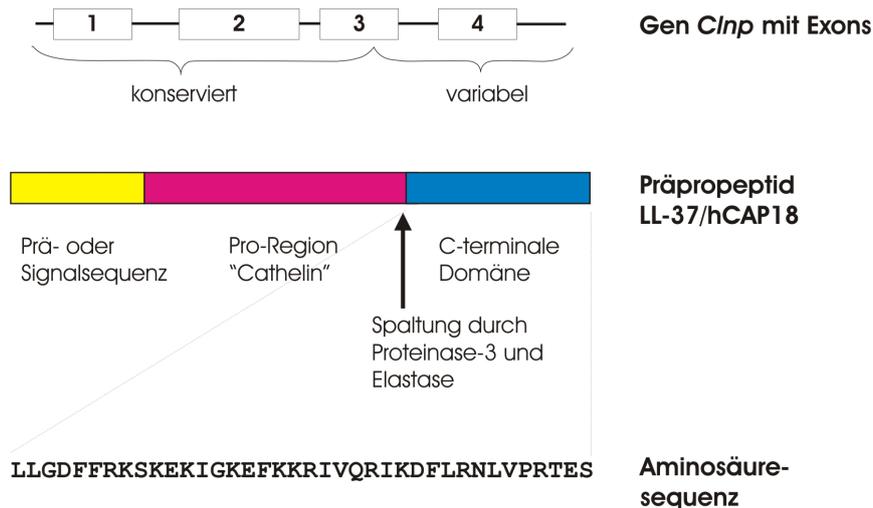


Abbildung 1.7: Genetische Struktur des Cathelizidins LL-37.

Aus den vier Exons des Cathelizidingsens entsteht ein Präproprotein, das neben der Signalsequenz eine als Cathelin bezeichnete Proregion und eine entwicklungsgeschichtlich variable C-terminale Domäne enthält. Das Propeptid wird in Granula der Neutrophilen gespeichert. Nach Aktivierung der Immunzellen wird das Protein proteolytisch in das Cathelin und das aktive Peptid gespalten.

Das LL-37 wird von NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten in Knochenmark und Hoden [Agerberth et al., 2000; Malm et al., 2000], im Epithel der Atemwege [Bals et al., 1998], des Darms [Hase et al., 2003] und der Haut [Nilsson et al., 1999] exprimiert. In den Granula der neutrophilen Granulozyten wird LL-37 als Propeptid gespeichert. Durch den negativ geladenen Propeptidanteil werden die kationischen Ladungen des reifen Peptids überdeckt, um die Aktivität des Peptids durch ladungsabhängige Interaktionen zu unterbinden. Erst nach Aktivierung wird das Peptid durch neutrophile Proteasen prozessiert (Elastase, sowie Protease 3) [Sørensen et al., 1999, 2000] und sezerniert.

Das LL-37 bildet eine amphipatische α -Helix aus und ist wirksam gegen ein breites Spektrum grampositiver und -negativer Keime, auch gegen vancomycinresistente Enterokokken und meticillinresistenten *St. aureus*. Bei grampositiven Bakterien liegt die minimale inhibitorische Konzentration zwischen 2,5 und 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, grampositive Bakterien sind nicht oder nur wenig empfindlich, hier sind höhere Konzentrationen bis zu 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nötig [Turner et al., 1998]. Zusätzlich kann es Endotoxine, das LPS gramnegativer und Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien binden und so eine Überreaktion des Immunsystems unterbinden. Außerdem kann LL-37 spezifisch an den FPRL-1-Rezeptor binden und dadurch chemotaktisch auf Neutrophile,

Monozyten und T-Zellen wirken [Yang et al., 2001a].

1.3 Biomaterialien

Die Verwendung von Biomaterialien für Implantate oder medizinische Zwecke geht 35.000 Jahre zurück, als die Menschen in der Lage waren große Wunden zu schließen. Heutzutage finden Biomaterialien Anwendung als vielfältiger Organersatz in Verbandmaterial, Kontaktlinsen, Gelenkersatz und künstlichen Herzklappen. Unter dem Begriff Biomaterialien sind natürliche oder synthetische Materialien zusammengefasst, die funktionell kompatibel mit dem zu ersetzenden Gewebe sein müssen. Da die Materialien in Wechselwirkung mit den Geweben des Körpers treten, ist die Biokompatibilität ein wichtiger Faktor, d.h. die verwendeten Materialien dürfen weder toxisch, karzinogen, mutagen noch antigenwirksam sein.

In den Fachbereichen Orthopädie und Unfallchirurgie hat der Einsatz von Biomaterialien als Wirkstoffträger an Bedeutung gewonnen und der Bedarf an biodegradierbaren Biomaterialien in der medizinischen Technologie ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie von Knochen- und Weichteilinfektionen haben sich biodegradierbare Stoffe (besonders Polymere), die permanent oder vorübergehend am Infektionsort eingebracht werden, als Antibiotikaträger in der Klinik bewährt [Winckler et al., 1992].

1.4 Übersicht über die Beschichtungstechniken

Ein Arzneistoffträger (*drug delivery System*) soll die Wirkstoffkonzentration im Organismus über einen langen Zeitraum innerhalb des therapeutischen Bereichs halten. Bei der Verwendung von Trägersystemen beruht die Langzeitwirkung auf einer verzögerten Freisetzung des Wirkstoffes (*sustained release*). Eine retardierte Freisetzung kann entweder lösungsmittelaktiviert oder diffusions- bzw. enzymatisch kontrolliert ablaufen. Meistens spielen bei der Freisetzung jedoch mehrere Komponenten eine Rolle, so dass von einer Kombination dieser Mechanismen ausgegangen werden kann.

In der Literatur werden unterschiedliche Ansätze für solche (*drug delivery*) Systeme diskutiert, die vorwiegend auf Polymer und Liposomenbasis stehen. Ebenso gibt es eine Vielzahl von Verfahren zur Vernetzung verschiedener Proteine und zur Bindung von Proteinen an Makromoleküle (vgl. Darstellung in Wong, S.S., „*chemistry of protein conjugation and cross linking*“, CRCs, INC. (1993)). Vorteile von Kopplungs- als auch von *drug delivery* Systemen sind die Möglichkeit, die Wirksubstanzen lokal einzubringen und damit Nebenwirkungen im Vergleich zu systemischen Anwendungen zu reduzieren. Des Weiteren können längere in-vivo-Halbwertzeiten der Proteine, eine verringerte Toxizität, eine verbesserte Stabilität und eine optimale Löslichkeit der Wirkstoffe erreicht werden.

Um die Belastung für den Organismus möglichst gering zu halten, sollten die in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffträger-Beschichtungen durch den Organismus resorbiert werden oder konstant am implantierten Material haften.

1.4.1 Delivery Systeme auf Basis bioabbaubarer Polymere

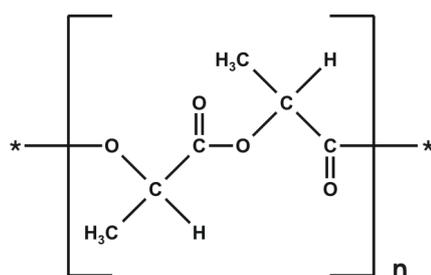
Bioresorbierbare Materialien, besonders Polymere, werden heutzutage in der Unfallchirurgie nicht nur als Osteosynthesematerialien verwendet, sondern auch als Nahtmaterial und als Arzneistoffträger-System für Wachstumsfaktoren und Antibiotika [Thoma and Schlutermann, 1991; Middleton and Tipton, 2000]. Insbesondere polymere Verbindungen vom Typ der Milch- und Glykolsäure haben mittlerweile große Bedeutung erlangt [Lendlein, 1999].

Im Körper werden diese bioabbaubaren Polymere durch physiologische Prozesse wie hydrolytische oder enzymatische Spaltung, degradiert. Man unterscheidet verschiedene Abbaumechanismen des Polymergerüsts. Bei resorbierbaren Polymeren kann man deren Zerfall nach Lendlein [1999] in einen Abbau der Masse (*bulk degradation*) und einen Oberflächenabbau (*surface erosion*) unterscheiden. Bei einem Abbau der Masse ist das Einströmen des Lösungsmittels in das Polymer schneller, als die hydrolytische Abspaltung der einzelnen Polymerbestandteile. Das Polymer nimmt Wasser auf, quillt und wird von Innen hydrolysiert und abgebaut. Die hydrolytische Spaltung greift die Quervernetzungen zwischen den einzelnen Polymerketten an und spaltet so Polymerseitenketten ab, die polare, geladene Gruppen besitzen. Erst wenn die Kettenbruchstücke so klein sind, dass sie wasserlöslich

werden, zerfällt das ganze Gerüst sehr schnell. Dadurch kann ein Wirkstoff lange gebunden bleiben, um erst beim kompletten Zerfall des Polymers sehr rasch freigesetzt zu werden. Bei dem Abbau durch Oberflächenspaltung hingegen werden kleine Bestandteile des Polymers nach und nach von der Oberfläche abgespalten. Das Wasseraufnahmevermögen ist nicht nur für den Polymerabbau von Bedeutung sondern auch für die Wirkstofffreisetzung [Thoma and Schlutermann, 1991]. Die hydrolytische Spaltung findet im gesamten Körper statt. Da die Verfügbarkeit von Wasser innerhalb der Gewebe und Patienten nicht sehr stark variiert, ist die Freisetzungskinetik eingearbeiteter Wirkstoffe nahezu gleich. Die enzymatische Spaltung hingegen ist an spezifische Organe gebunden, die die entsprechenden Enzyme besitzen. Daher können eingearbeitete Wirkstoffe auch gezielt, über einen enzymatischen Abbau, an einem definierten Wirkort freigesetzt werden (*drug targeting*).

1.4.2 Das Polymer Poly-D,L,-Laktid (PDLLA)

Das in dieser Arbeit verwendete Poly-D,L-Laktid (PDLLA) wurde mit dem Handelsnamen Resomer[®] R203 von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma KG hergestellt. Es ist ein weißes, geruchloses Pulver mit einem Molekulargewicht von 29,5 kDa und besteht aus einem Racemat aus D- und L- Enantiomeren der Milchsäure (Abbildung 1.8). Es ist unlöslich in Wasser und Methanol, aber löslich in Aceton, Chloroform und Ethylacetat [Thoma and Schlutermann, 1991].



(a) Strukturformel



(b) Makroskopische Aufnahme

Abbildung 1.8: Darstellung des Poly-D,L-Laktids (PDLLA) als Strukturformel (a) und eine makroskopische Aufnahme (b) des weißen geruchlosen Pulvers mit einem Molekulargewicht von 29,5 kDa. Durchmesser der Schale beträgt 6 cm

Das PDLLA wird im Organismus durch Hydrolyse gespalten und über einen langen Zeitraum langsam degradiert [Schakenraad and Dijkstra, 1991; Kohn et al., 2004; Pitt et al., 1981; Cutright et al., 1974]. Ab einer kritischen Molmasse von < 10 kDa wird das Polymer löslich [Schakenraad and Dijkstra, 1991] und letztlich vollständig vom Organismus metabolisiert. Dabei entstehen physiologische Monomere der Milchsäure [Thoma and Schlutermann, 1991]. L-Laktat, welches von den Zellen zu Pyruvat oxidiert wird, kann entweder zu Glukose umgewandelt oder enzymatisch zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut werden [Athanasίου et al., 1998; Middleton and Tipton, 2000]. Die Komponente D-Laktat kann ebenso metabolisiert werden. Die metallischen Implantate werden auf spezielle Weise, mittels kalter und steriler Beschichtungstechnologie, mit diesem Polymer beschichtet. Untersuchungen der Beschichtung auf metallischen Implantaten zeigten für PDLLA eine hohe mechanische Stabilität [Gollwitzer et al., 2003]. Des Weiteren konnten auch knochenheilungsfördernde Effekte der Poly-D,L-Laktid-Beschichtung nachgewiesen werden [Schmidmaier et al., 2001a; Gollwitzer et al., 2003].

Bisher gibt es noch kein ideales Biomaterial, das allen Anforderungen entspricht. Das Ziel aber ist die Weiterentwicklung und Veränderung von Materialien, mit dem Ergebnis, dass Fremdkörperreaktionen und Entzündungsreaktionen möglichst gering gehalten und reduziert werden. Deswegen werden körpereigene Stoffe nachgebildet und weiterentwickelt.

1.4.3 *Delivery* Systeme auf Basis eines Fibringerüstes

In Fibrinklebern sind körpereigenen Substanzen enthalten, daher kann das Fibringerüst auch von körpereigenen Enzymen lysiert werden. Aus diesem Grund ist die Anwendung im Inneren des Körpers besonders gut geeignet. Fibrinkleber ist ein physiologischer Zweikomponentenkleber biologischen Ursprungs. Die erste Komponente besteht aus Fibrinogen, Faktor XIII und Aprotinin, die zweite Komponente besteht aus einer Thrombin/Caliumchlorid-Lösung. Werden beide Komponenten vermischt, spaltet das Thrombin Fibrinogen in Fibrin und aktiviert den Faktor XIII. Der aktivierte Faktor führt zu einer Quervernetzung des Fibrins, was ein stabiles, reißfestes aber gleichzeitig auch elastisches Fibrinnetz ergibt. Dieser Vorgang entspricht dem letzten Abschnitt der natürlichen Blutgerinnung.

Experimente mit Fibrinklebern bei Implantaten und Experimente mit Fibrin als *drug carrier* System für Antibiotika gehen auf die 70er Jahre zurück. Die Antibiotika, wie Gentamycin wurden zu der Fibrinklebermischung gegeben und zum Teil auch klinisch mit unterschiedlichen Ergebnissen getestet.

Bildung eines Fibrinnetzes

Fibrinogen liegt im Blut in einer Konzentration von 3mg/mL vor. Es gehört zu den akut Phase Proteinen und die Konzentration kann bei einer Entzündung ansteigen. Fibrinogen besteht aus drei miteinander verdrillten Ketten, die als α -, β - und γ -Kette bezeichnet werden. Zwei durch Disulfidbrücken miteinander verknüpfte Dreierketten bilden ein Fibrinogenmolekül. Thrombin spaltet je zwei N-terminale Peptide der α - und β -Kette ab, die als Fibrinopeptide A und B bezeichnet werden. Die neuen Enden der Ketten lagern sich an die D-Region weiterer Fibrinmoleküle an. Die Fibrinmonomere polymerisieren spontan zu langen Fibrinketten, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Dieses lose Fibrinnetzwerk ist noch löslich, erst der Faktor XIII sorgt für eine kovalente Verknüpfung der Fibrine. Dieser aktive Faktor XIIIa bildet die kovalente Quervernetzung zwischen Lysin und Glutamin einer α - und γ - Kette oder von α -Ketten zweier benachbarter D-Domänen. Das resultierende Fibrin_i (=insoluble) stellt ein stabiles dreidimensionales Netzwerk dar, das nicht mehr löslich ist.

Das fibrinolytische System

Faktor XIIIa wird bei der Gerinnung in das Fibringerinnsel eingebaut und verzögert die Fibrinolyse in seiner natürlichen Funktion. Um aber auch unter schwierigen Bedingungen eine ausreichende Wundheilung zu gewährleisten, ist im Fibrinkleber zusätzlich Aprotinin enthalten. Aprotinin verzögert die Fibrinolyse durch Bindung an das Enzym Plasmin. Weil es sich dabei um eine reversible Bindung handelt, wird das Plasmin nicht unbrauchbar, sondern in seiner Funktion nur behindert. Dadurch verlangsamt sich die lysierende Wirkung. Plasmin kann ein Gerinnsel innerhalb weniger Tage wieder auflösen. Zur Aktivierung des Plasminogens, einer Vorstufe des Plasmins, sind zwei Aktivatoren t-PA und Urokinase vorhanden. Das Plasmin bindet an das Fibrin und zerschneidet es in kleine wasserlösliche Spaltprodukte. Dabei

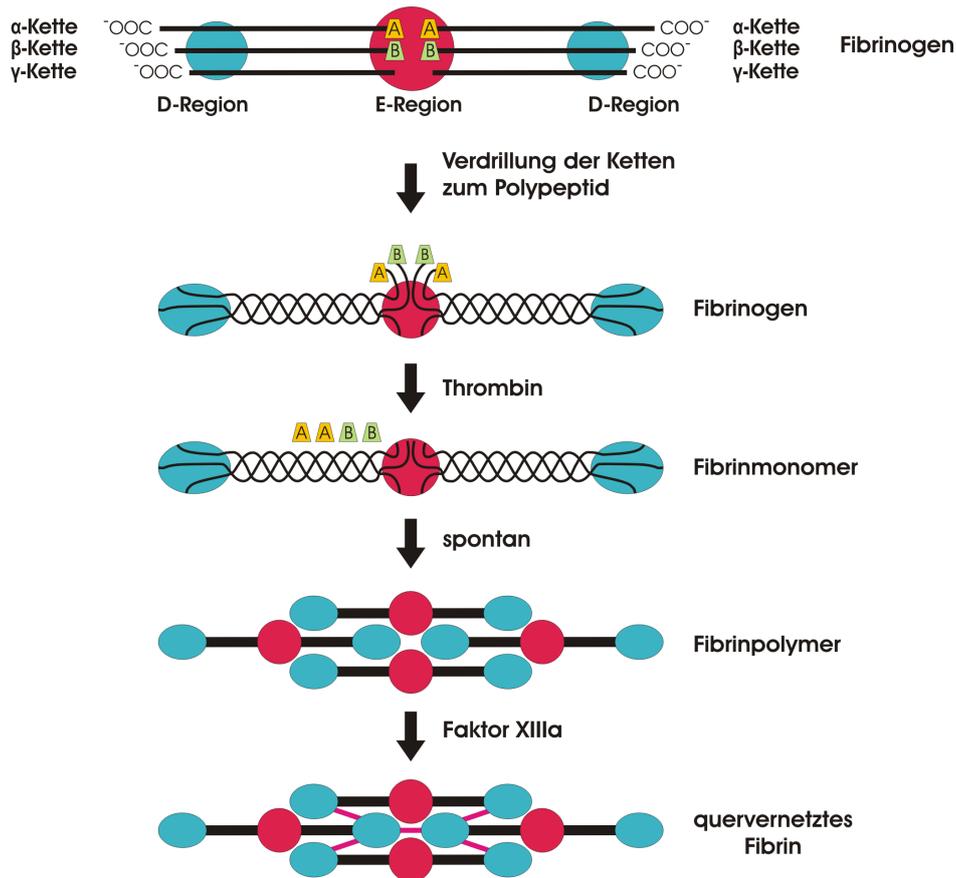


Abbildung 1.9: Bildung eines Fibrinnetzes

Ein Fibrinogenmolekül besteht aus drei miteinander verdrehten Ketten, wobei die C-terminalen Enden eine D-Domäne ausbilden. Die N-terminalen Enden zweier solcher Ketten verbinden sich und bilden die E-Domäne des Fibrinogenmoleküls. Dort befinden sich die durch Thrombin abspaltbaren Fibrinopeptide A und B. Nach Abspaltung der Fibrinopeptide lagern sich spontan Fibrinmonomere zu einem Fibrinpolymer zusammen. Dabei verbinden sich die A- und B-Enden der Ketten mit einer D-Domäne. Durch den Faktor XIIIa und Calcium werden D-Domänen kovalent miteinander verknüpft, so dass ein unlösliches Fibrinnetz entsteht.

entstehen die niedermolekularen Fibrinfragmente D und E, sowie ein Dimer von Spaltprodukt D, welches im Blut nachweisbar ist. Plasmin spaltet nicht nur Fibrin, sondern auch Fibrinogen. Bei der Lyse von Fibrinogen tritt kein D-Dimer auf.

1.4.4 Kovalente Bindung antimikrobieller Peptide an Titan bzw. Edelstahl

Um die biologische Funktion eines Biomaterials zu verändern, können Moleküle an deren Oberfläche gebunden werden. Bisher wurden schon viele verschiedene Moleküle, wie Cytochrom [Hong et al., 1994] oder Antikörper [Bhatia et al., 1989] an Oberflächen immobilisiert. Moleküle können durch physikalische Eigenschaften an Materialien haften bleiben, indem die Oberfläche einfach mit den organischen Molekülen inkubiert wird. Bei dieser Methode ist eine einheitliche Aktivität der adsorbierten Moleküle nicht gesichert und die Moleküle denaturieren schnell von der Oberfläche. In diese Arbeit wurden daher Moleküle über eine chemische Bindung an die Implantatoberfläche gekoppelt. Dazu wurde die Implantatoberfläche zunächst mit einer Säurelösung aktiviert. Daran wurde ein heterobifunktionaler Linker (Silan) mit verschiedenen reaktiven Gruppen ($-\text{NH}_2$ oder $-\text{OH}$) an beiden Enden gebunden. Mit Hilfe dieser reaktiven Gruppen wurden die AMP gebunden. Dadurch, dass die AMP an der Bakterienoberfläche wirken (siehe Abschnitt 1.2.2), sind sie ideale Kandidaten für eine feste Bindung an Metall. Die AMP können sich ebenfalls entweder über eine reaktive NH_2- oder $\text{OH}-$ Gruppe an der Bindung beteiligen. Das hBD-2 und -3 bringen jeweils eine, das LL-37 drei reaktive Aminogruppen für eine Bindung mit. Sowohl beide β -Defensine, als auch das LL-37 besitzen jeweils drei Hydroxy-Gruppen für eine Bindung. Titan und Edelstahl wurden als Implantatsmaterial gewählt, weil Methoden biologisch aktive Moleküle über ein Silan an eine Titanoberfläche zu binden, verfügbar sind [Rezania et al., 1999]. Um die antimikrobiellen Wirkstoffe an die Metallimplantate zu binden, wurden unterschiedliche *Linker* getestet.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener Techniken zur lokalen Unterbindung des Bakterienwachstums auf Implantatoberflächen, wobei eine Resistenzbildung möglichst zu vermeiden ist. Für die Herstellung und Optimierung einer geeigneten Technik, um AMP auf Implantaten zu immobilisieren, kamen folgende Methoden in betracht:

- Eine mit antimikrobiellen Peptiden beladene PDLLA-Beschichtung,
- mit antimikrobiellen Peptiden gekoppeltes Fibrinogen im Fibrinkleber oder
- eine kovalente Bindung von antimikrobiellen Peptide an Metalloberflächen.

Die entwickelten Arzneistoffträgersysteme sollen hinsichtlich der Gewebeverträglichkeit und antimikrobiellen Wirksamkeit im Hinblick auf Medizinprodukte- und Arzneimittelgesetz zunächst *in vitro* getestet werden. Ein derartiges Trägersystem sollte mechanisch stabil und vollständig resorbierbar sein und darf im Organismus zu keinen unerwünschten Reaktionen führen.

Zur Herstellung der PDLLA-Beschichtung müssen die antimikrobiellen Peptide mit dem PDLLA im selben Lösungsmittel gelöst werden. Daher muss zunächst ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden. Für die Fibrinogen-Kopplungs-Methode soll zunächst der Nachweis der Kopplung an Fibrinogen mittels Western-Blot erbracht werden. Anschließend wird die Eignung der beiden *drug delivery* Systeme im Hinblick auf eine antimikrobielle Aktivität überprüft, dabei sollen folgende Punkte untersucht werden:

- Charakterisierung der Abgabe: Messung der abgegebenen Wirkstoffe mittels ELISA und Aufzeichnung einer Freisetzungskinetik,
- Bestimmung der In-vivo-Verträglichkeit über in-vitro-Proliferationstests
- Überprüfung der Eignung von Beschichtungen im Hinblick auf eine antimikrobielle Aktivität: Mikrobiologische Untersuchungen

Die Kovalente Beschichtung soll auf eine antimikrobielle Wirkung hin untersucht werden. Dazu soll nach Inkubation die Anzahl toter Bakterien auf beschichteter und unbeschichteter Fläche verglichen werden.

Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien, Pufferlösungen und Geräte sind der jeweiligen Methode zugeordnet. Allgemein gebräuchliche Laborgeräte, wie Pipetten und Glaswaren, werden nicht gesondert aufgeführt.

2.1 Zellkultur

Arbeiten mit Zellkulturen unterliegen speziellen Sicherheitsvorschriften. Sie gelten sowohl zum Schutz der Kulturen vor Kontaminationen, als auch des Experimentators. Infolgedessen werden alle Tätigkeiten im Rahmen der Kultivierung unter dem Schutz einer Sterilbank durchgeführt und ausschließlich sterile Materialien verwendet.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

- ***hFOB1.19*: humane fetale Osteoblasten**
stammen von LGC Promochem (Batch No.2634910; Product Code: ATCC-CRL-11372). Bei diesen Zellen handelt es sich um SV40 T transfizierte Osteoblasten, die von einer spontanen Fehlgeburt gewonnen wurden [Harris et al., 1995; Subramaniam et al., 2002]. Die Zellen wurden bei 34 °C in Osteoblastenmedium kultiviert.
- **SAOS-2: humane Osteosarcoma Zelllinie**
Die Zellen stammen aus der American Type Culture Collection (ATCC). Die SAOS-2 Zelllinie wurden 1973 aus dem osteogenen Sarkom einer 11 Jahre alten kaukasischen Frau gewonnen [Fogh et al., 1977; Rodan et al., 1987]. Die Kultivierung fand in Osteoblastenmedium statt.

Tabelle 2.1: Kultivierungsbedingungen der Zelllinien:

Zelllinien	Zellzahl in Flaschen mit 75 cm ² Fläche	Zeit bis zur Konfluenz
hFOB1.19	2 Millionen	7 Tage
SAOS-2	2,5 Millionen	2-3 Tage
K4IM	1-2 Millionen	4 Tage
HSE	2 Millionen	4 Tage

- **K4IM: humane Synovialfibroblasten**

Diese SV40 immortalisierte Zelllinie stellte freundlicherweise Herr Christian Kaps, Charite Berlin, zur Verfügung. Sie stammen von einem gesunden Spender und wurden nach einem etablierten Protokoll in Normalmedium bei 37°C kultiviert [Haas et al., 1997].

- **HSE: humane Synovialfibroblasten**

Diese SV40 immortalisierte Zelllinie stellte freundlicherweise Herr Christian Kaps, Charite Berlin, zur Verfügung. Sie stammen von einem Patienten mit rheumatoider Arthritis und wurden nach einem etablierten Protokoll in Normalmedium bei 37°C kultiviert.

Für die genaue Zusammensetzung der Medien siehe Tabelle 2.2.

2.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte bei 37 °C in 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in einem Zellkulturschrank. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen TC-75 cm² gehalten. Die Routinemethoden zur allgemeinen Handhabung und Subkultivierung von Zellkulturen wurden, wie in dem Buch *Zell- und Gewebekultur* [Lindl, 2002] beschrieben, durchgeführt. Bei Erreichen des Konfluenzstadiums, der möglichst dichten Anordnung der Zellen als Monolayer, wurde die gewünschte Anzahl an Zellen für eine neue Subkultur oder für die Versuche nach Tabelle 2.1 ausgesät (passagiert). Dabei erfolgte die Subkultivierung bei einem konfluenten Wachstum der Zellen durch Ablösen mit einer Accutase-Lösung. Dafür wird zunächst das alte Medium entfernt und die Zellen mit sterilem PBS-Puffer

Tabelle 2.2: Medien für die Zellkultur

Medien	Zusammensetzung
Normalmedium:	500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 58 mL fetales Rinderserum (FBS) (entsprechen 10 % (v/v)) 17 mL 3 %ige (w/v) L-Glutaminlösung (entsprechend einer Endkonz. von 5 mM) 6 mL 1 %ig (w/v) Penicillin/Streptomycin
Osteoblastenmedium:	500 mL McCoy's 5A 93 mL FBS (entsprechen 15 % (v/v)) 19 mL 3 %ige (w/v) L-Glutaminlösung (entsprechend einer Endkonz. von 5 mM) 6 mL 1 %ig (w/v) Penicillin/Streptomycin
3 %ige (w/v) L-Glutaminlösung:	14,6 g L-Glutamin ad 500 mL a.dem.

Tabelle 2.3: Materialien für die Zellkultur

Material	Herkunft	Artikelnr.
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D	L11-007
Brutschrank	Forma Scientific, Mansfield, USA	
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, D	42430082
FBS - <i>Fetal Bovine Serum</i> Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D	A15-151
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	632 -2
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, <i>phosphate-buffered saline</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D	14190169
Pen./ Strep. (10 U Penicillin und 10 µg Streptomycin/mL)	Invitrogen, Karlsruhe, D	15140122
TC-Flasche T-75	Sarstedt, Nümbrecht, D	83.1813.002
TC-Platte 24Well F Cell+	Sarstedt, Nümbrecht, D	82.1.581

gespült. Die auf 37 °C erwärmte Accutase-Lösung wurde auf die Zellen gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und wieder abgesaugt. Um die Zellen abzulösen, wurden sie fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop betrachtet. Hatten sich alle Zellen von der Kulturflasche abgelöst, wurden sie mit Medium vom Boden abgespült. Durch das im Medium enthaltene Serum wurde gleichzeitig die Accutaseaktivität inhibiert.

2.1.3 Methoden zur Bestimmung der Zellzahl

Für die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und somit für die gesamte Zellkultivierung ist es notwendig, die Ausgangszellzahl zu kennen. Die verschiedenen Zelllinien zeigen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten und werden unterschiedlich weiterkultiviert (siehe Tabelle 2.1). Die genaue Bestimmung der Zellzahl als Kontrolle des Zellwachstums ist nicht nur für optimale Kulturbedingungen wichtig. Es ist außerdem entscheidend, dass die gleiche Anzahl Zellen pro Versuchsansatz verwendet wird, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Um einen Einfluss der für die Beschichtung verwendeten Substanzen auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde die Zellzahl mittels *CyQuant Cell Proliferation Assay* oder in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Alle Zellen wurden während der Experimente unter den gleichen Bedingungen kultiviert, sodass die gemessenen Effekte nur auf die verwendeten Stimulantien zurückzuführen sind. Zunächst wurden 400.000 Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und ihnen einen Tag Zeit zum Anwachsen gegeben. Die Wachstumsgeschwindigkeit hängt von der Kultur und der Zahl der Subkultivierungen ab. Das Medium wurde gewechselt und durch neues, je nach Versuch modifiziertes, ersetzt. Die Stimulantien oder zu testenden Substanzen wurden zugegeben und über verschiedene Zeiten inkubiert. Bei diesen Experimenten sind Zellen als Negativ-Kontrolle verwendet worden, die ohne Zusatz von Stimulantien, nur mit Normalmedium kultiviert worden sind.

Die NEUBAUER-Zählkammer

Bei dieser Methode werden durch das Trypanblau Zellproteine toter Zellen und Zellen mit beschädigter Zellwand blau angefärbt. Der Farbstoff gelangt durch die geschädigte Zellwand in die Zelle. Für eine Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter, werden 30 μL Zellsuspension mit 30 μL Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden die nicht angefärbten, hell erscheinenden Zellen in vier Großquadraten ausgezählt. Das Zählnetz der Neubauer-Zählkammer zeigt 9 Großquadrate von je 1 mm^2 . Das Großquadrat in der Mitte ist in 16 Gruppenquadrate mit je 0,2 mm Seitenlänge unterteilt. Fünf Gruppenquadrate werden zur Zählung verwendet; sie werden von der Äußeren von drei Grenzlinien begrenzt. Die Zellzahl pro Mikroliter wird mit folgender Formel berechnet:

Bei einer Zählung von 5 der Gruppenquadrate:

$$\text{Zellzahl pro } \mu\text{l} = (\text{gezählte Zellen} \times a \times b \times c) / d$$

oder bei Zählung der vier Großquadraten in den Ecken:

$$\text{Zellzahl pro } \mu\text{l} = (\text{gezählte Zellen} \times a \times b) / d$$

a = Umrechnung der Kammertiefe von 0,1 mm auf 1 mm (Faktor 10)

b = Verdünnungsfaktor

c = Anzahl der Gruppenquadrate pro Großquadrat (Bei der Neubauer Zählkammer = 16 und bei der Neubauer-improved Zählkammer = 25)

d = Anzahl der gezählten Quadrate

Für eine neue Subkultur oder für Versuche wurde die gewünschte Anzahl vitaler Zellen (siehe Tabelle 2.1) in frischem Medium aufgenommen und neu ausgesät.

Um einen Einfluss verschiedener Substanzen auf die Zellproliferation zu bestimmen, wurde die Anzahl der Zellen sowohl für die Kontrolle (unbehandelte Zellen), als auch für die behandelten Zellen ermittelt. Anschließend wurden die Zellzahlen der verschiedenen Proben miteinander verglichen.

Tabelle 2.4: Materialien zur Bestimmung der Zellzahl

Material	Herkunft	Artikelnr.
Deckgläser für Haematocytometer 20×26 mm	Hecht	4157
Neubauer-Zählkammer	Assistent, D	719606
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T8154

Die CyQuant-Methode

Zur Untersuchung des proliferativen Verhaltens verschiedener Zellen wurde der *CyQuant[®] Cell Proliferation Assay* verwendet. Dabei handelt es sich um eine schnelle Methode zur Bestimmung der Zellzahl, bei der nach Lyse der Zellen ein grün fluoreszierender Farbstoff (CyQuant GR) an zelluläre Nukleinsäuren bindet. Dies bewirkt eine Zunahme des Fluoreszenzsignals, welches mit einem Fluoreszenzspektrometer gemessen werden kann. Der Detektionsbereich liegt zwischen 50 und 50.000 Zellen in 200 µL Volumen. In diesem Bereich ist die eingesetzte DNA-Menge proportional zur Fluoreszenzintensität. Dabei entsprechen 50 ng DNA in etwa 10.000 Zellen.

Durchführung:

Für den Proliferationsassay wurden 40.000 der entsprechenden Zellen pro Vertiefung in eine 24-Well Platte ausgesät und einen Tag lang kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe der einzelnen Stimulantien. Nach einer versuchsabhängigen Stimulationszeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und die Platten anschließend trocken bei -20 °C eingefroren. Am Tag der DNA-Bestimmung wurden die Platten aufgetaut und die im Kit enthaltenen Reagenzien verdünnt. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Für jede Probe wurde 200 µL Lysis-Puffer sowie 250 µL CyQuant-Farbreagenz benötigt. Für 50 Proben wurden die im Kit befindlichen Stocklösungen wie folgt verdünnt:

- 2,1 mL Lysis-Konzentrat mit 40 mL Wasser (a. dest.),
- die CyQuant GR Farblösung mit dem frisch angesetzten Lysispuffer, sodass eine zweifach konzentrierte Lösung entsteht, indem 75 µL CyQuant-Konzentrat zu 14,25 mL des Lysis Puffers gegeben wird,

- um einen Standard zu erhalten, 5 μL der im Kit enthaltenen Bakteriophagen- λ DNA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit 245 μL Lysis-Puffer und 250 μL zweifach konzentrierter CyQuant-Farblösung,
- 10 mg RNase A (DNase frei) wurden in 1 mL Wasser gelöst (0,8 U/ μL) und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Hiervon wurden vor Gebrauch 20 μL mit 180 μL sterilem H_2O (1:10) verdünnt.

Tabelle 2.5: Herstellung der Standardwerte für die Bestimmung nach der CyQuant-Methode (Angaben in μL)

	Lysat	DNA-Standard	Lysispuffer	2x CyQuant-Farblösung
Leerwert	–	–	250 μL	250 μL
Standard 25 ng	–	25 μL	225 μL	250 μL
Standard 50 ng	–	50 μL	200 μL	250 μL
Standard 100 ng	–	100 μL	150 μL	250 μL
Standard 200 ng	–	200 μL	50 μL	250 μL
Probe	50 μL	–	200 μL	250 μL

Entsprechend dem Detektionsbereich wurden zu den 40.000 Zellen pro Vertiefung, 250 μL des Lysis-Puffers und 5 μL der RNase-Lösung gegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Überstand in Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Für die folgende DNA Bestimmung wurden 50 μL Aliquots dieser Lysate, vier Ansätze mit unterschiedlichen Mengen des λ -DNA Standards und ein Leerwert eingesetzt.

Zur Messung des DNA-Gehaltes wurden jeweils 200 μL des Lysis-Puffers in Eppendorf-Reagiergefäße vorgelegt und die restlichen Reaktionskomponenten laut Tabelle 2.5 zugegeben. Nach kurzem Mischen aller Ansätze wurden diese lichtgeschützt fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz im Spektrometer gemessen. Dabei sind nachfolgende Parameter im Photometer einzustellen:

- Anregungswellenlänge von $\lambda = 480\text{ nm}$
- Emissionswellenlänge von $\lambda = 520\text{ nm}$
- Die Vorspannung der Lampe betrug 400 Volt

Die Ergebnisse der unbehandelten Zellen (Kontrollen) wurden gleich 100 % gesetzt und alle weiteren Proben darauf bezogen.

Tabelle 2.6: Materialien für den CyQuant-Test

Material	Herkunft	Artikelnr.
CyQuant [®] Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D	C-7026
RNase A (DNase frei)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	R-6513
Fluoreszenzspektrophotometer F-2000	HITACHI	n. v.

2.2 Trennverfahren

2.2.1 Die

Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*reversed phase-high performance liquid chromatography* RP-HPLC)

Die *Chromatographie* ist ein Trennverfahren, bei dem die Aufspaltung eines Substanzgemisches durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase erfolgt. Mit diesem Verfahren, werden Substanzen nicht nur getrennt oder aufgereinigt, sondern sie können über Standards auch identifiziert und quantifiziert werden.

Bei der Säulenchromatographie kommt der instrumentellen Ausrüstung eine wesentliche Bedeutung zu. Bei der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) wird die Trennsäule unter erhöhtem Druck von der mobilen Phase (Eluent) durchströmt. Die in dieser Arbeit verwendete HPLC-Anlage ist das Smart-System (Amersham pharmacia), das in Abbildung 2.1 dargestellt ist. Es bestehend aus einer Pumpe, einem Einspritzsystem (Probenauftrag), einer Trenneinheit (Säule), einem Detektor mit Auswertsystem und einem Fraktionssammler. Die Säule

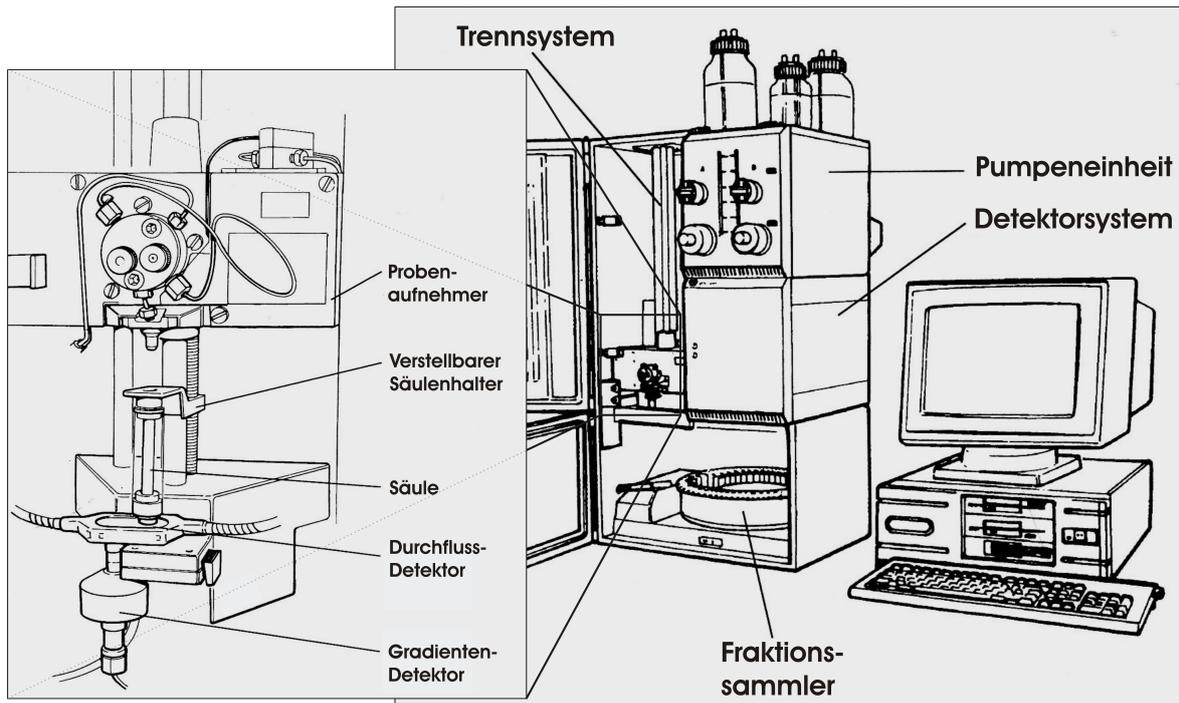


Abbildung 2.1: Aufbau einer HPLC-Anlage. Das SMART-System (Amersham pharmacia)

le ist das Kernstück des chromatographischen Systems. Sie besteht aus einem Stahlrohr mit Kieselsäure als Füllmaterial. Eine Trennsäule hat ein etwa 100mal größeres Trennvermögen als die „normalen“ Säulenchromatographie. Für die *reversed phase*-Chromatographie wurde die Säule μ RPC C2/C18 SC 2.1/10 verwendet. Kieselsäure erweist sich aufgrund seiner mechanischen Stabilität, großer spezifischer Oberfläche und relativ geringer chemischer Reaktivität gegenüber organischen Lösungsmitteln als vorteilhaft. Im Gegensatz zu der üblichen polaren stationären Phase, wird bei der *reversed phase* (Umkehrphasen-) Chromatographie eine unpolare feste Phase eingesetzt. Hierfür werden Kieselgele benutzt, welche mit Alkylketten von $-\text{CH}_2 - \text{CH}_3$ (Ethyl) bis $-(\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$ (*n*-Octadecyl) substituiert wurden. Durch die unpolaren Gruppen erhält das Trägermaterial der Säule stark hydrophoben Charakter und das hat zur Folge, dass Wechselwirkungen zwischen Analytmolekülen und unpolare stationärer Phase stattfinden. Die hieraus resultierende Bindung des Analyten an die stationäre Phase ist proportional zur unpolaren Oberfläche des Analyten. Je unpolarer die Oberfläche der Probemoleküle ist, umso schwächer sind ihre Wechselwirkungen mit polaren Lösungsmitteln, wie z.B. Wasser.

Um den Analyten von einer *reversed phase* (RP)-Säule zu eluieren, wird ein Gemisch

aus Wasser und Acetonitril verwendet. Dabei konkurrieren die unpolaren organischen Lösungsmittel mit dem Analyten um die Bindung, mit dem Ergebnis, dass dieser sich von der Säule löst. Je mehr Acetonitril zur mobilen Phase zugesetzt wird, desto schneller wird die Substanz von der Säule eluiert (kürzere Retentionszeit). Bei der Gradientenelution wird dieser Effekt automatisch ausgenutzt, da sich die Polarität der mobilen Phase während der Analyse ändert.

Des Weiteren spielen strukturelle Eigenschaften des zu analysierenden Moleküls eine wichtige Rolle bei der Retention. Im Allgemeinen besitzt ein Analyt mit großer hydrophober Oberfläche (z.B. C – H oder S – S) eine längere Retentionszeit, da die unpolare Oberfläche nicht mit dem Wasser interagieren kann. Auf der anderen Seite reduzieren polare Gruppen, wie OH, NH₂, COO⁻ oder NH₃⁺ die Retentionszeit, da sie eine sehr gute Wechselwirkung mit Wasser aufzeigen. Auch der pH-Wert der mobilen Phase hat einen Einfluss auf die Retentionszeit, da dieser die Hydrophobizität des Analyten beeinträchtigen kann. Daher verwenden die meisten Methoden eine Pufferlösung um den pH-Wert zu kontrollieren.

Durchführung:

Um einen HPLC-Lauf zu starten, muss als erstes ein Eluent an die Anlage angeschlossen werden. Es wurde ein Gradientenlauf gewählt, daher wurden zwei Lösungsmittel benötigt. Diese wurden während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt, wobei die Menge des Lösungsmittel B anstieg. Der Eluent bestand aus den folgenden beiden Komponenten:

- Lösungsmittel A: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser (pH 3,5)
- Lösungsmittel B: 0,1 % Trifluoressigsäure, 80 % Acetonitril in Wasser (pH 3,5).

Das Wasser, mit dem die mobile Phase hergestellt wird, sollte reinst und für die HPLC geeignet sein, ebenso wie die anderen Lösungsmittel, Salze und Puffer. Alle Lösungen sollten entgast und gefiltert (0,22 µm) sein. Die Anlage vermischt die beiden Lösungsmittel und bringt sie mit einer konstanten Flussrate auf die Säule auf.

Bevor ein neuer Lauf gestartet werden konnte, mussten eventuell vorhandene Verunreinigungen von der Säule gespült werden. Dazu wurde die Anlage so lange

mit Lösungsmittel A gespült, bis sie ins Gleichgewicht kam (Equilibrierung). Dieses dauerte einige Minuten, bis die UV-Linie gerade verläuft.

Die Proben wurden im Eluenten gelöst oder verdünnt, sodass sich ein Probenvolumen von 100 μL ergab. Bei der Probenaufgabe wurde die Probe zunächst drucklos in eine Probenschleife injiziert, die sich an einem Vier-Wege-Ventil befand. Durch Umschalten wurde der Elutionsmittelstrom durch die Probenschleife geführt, wodurch die Probe mit dem Eluenten vermischt wurde und in die Säule gelangte. Nach der Probeninjektion wurde die mobile Phase über die Chromatographiesäule geleitet und gelangte zum Detektor. Der Fluss über die Säule betrug 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, wobei ein Gradient von 0 % Acetonitril auf 80 % Acetonitril über 30 Minuten angelegt wurde. Das entspricht einer Zunahme von 3 % Acetonitril pro Minute. Zur Detektion wurde ein UV/VIS-Spektrometer und ein Leitfähigkeitsdetektor mit einer Durchflusszelle eingesetzt. Die Bestimmung der UV-Absorption erfolgte bei Wellenlängen von 214 nm, 257 nm und 280 nm. Die Darstellung der Ergebnisse der Stofftrennung erfolgte in Form eines Chromatogrammes, bei dem die Menge der eluierten Substanz in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wurde. Verschiedene Stoffe haben unterschiedliche Retentionszeiten. Die Gesamtretentionszeit setzt sich aus der Netoretentionszeit (Aufenthalt in der stationären Phase) und der Durchflusszeit der mobilen Phase (ohne Retention) zusammen.

Tabelle 2.7: Materialien für die HPLC

Material	Herkunft	Artikelnr.
Acetonitril	Walter CMP, Kiel, D	MER 100030
Trifluoressigsäure	Fluka über Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, D	91699

2.2.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Analyse der Protein-Konjugate wurden die Proteine zunächst mittels der diskontinuierlichen Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend der angekoppelte Wirkstoff mit einem speziellen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen.

Als Elektrophorese wird die gerichtete Bewegung geladener Teilchen (Proteine) im elektrischen Feld beschrieben. Die Mobilität von Proteinen in einem elektrischen Feld wird von ihrer Eigenladung, die durch die Zusammensetzung der Aminosäuren bestimmt wird, und der Molekülform (Größe) beeinflusst. Um die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld dahingehend zu beeinflussen, dass eine Auftrennung nach Größe erreicht wird, wird SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) in der Probenvorbereitung verwendet. Hierbei handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen der Proteine überlagert und den Proteinen eine negative Nettoladung verleiht. Gleichzeitig denaturiert das im Proben-Puffer enthaltene SDS die Proteine in der Probe, indem es Sekundär- und Tertiärstrukturen auflöst. Bei der verwendeten diskontinuierlichen Elektrophorese wird die Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt: Das großporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Unterschiede im pH-Wert und der Acrylamidkonzentration beider Gele führen dazu, dass die Proteine im Sammelgel durch den Stacking-Effekt in engen Banden konzentriert werden. Auf diese Weise entstehen schärfere Banden, da die Proteine langsam in das Trenngel übertreten und nicht mehr aggregieren. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in der Tabelle 2.8 zusammengefasst.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels bei der SDS-Gelelektrophorese

	mögliche Trenngele			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4,5 %
Gelpuffer I	2,6 mL	2,5 mL	2,5 mL	–
Gelpuffer II	–	–	–	2,6 mL
Acrylamid	3,33 mL	4,17 mL	5,0 mL	1,67 mL
a. bidest.	4,29 mL	3,29 mL	2,46 mL	5,79 mL
APS (10%ig)	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
TEMED	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Puffer für die Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
<i>Gelpuffer I:</i>	45,43 g Tris/HCL(entsprechen 1,5 M) 1 g SDS (entsprechen 0,4 %) ad 250 mL mit a. dem. pH 8,8
<i>Gelpuffer II:</i>	15,14 g Tris/HCL (entsprechen 0,5 M) 1 g SDS (entsprechen 0,4 %) ad 250 mL mit a. dem. pH 6,8
<i>Probenpuffer:</i>	0,23 g SDS in 3,25 mL a. dem. lösen 1,25 mL Gelpuffer II 5 mL Glycerin 0,1 mL Bromphenolblau ad 10 mL mit a. dem.
<i>10%ige APS-Lösung:</i>	0,1 g APS und 0,9 mL H ₂ O frisch ansetzen
<i>Färbelösung:</i>	400 mL Methanol 100 mL Eisessig 1g Servablue R250 ad 500 mL mit a. dem.
<i>Entfärber:</i>	25 mL Methanol 25 mL Eisessig ad 200 mL mit a. dem.

Durchführung:

Ein Trenngel geeigneter Porengröße wurde angesetzt. Dabei variierte die Acrylamidkonzentration der verwendeten Trenngel mit dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine.

Alle Komponenten des Trenngels wurden in ein geeignetes Gefäß gegeben und gemischt. Das Trenngel wurde zu $\frac{3}{4}$ in eine Gelkammer (bestehend aus zwei Glasplatten) gegossen und mit 100%igem Isopropanol überschichtet. Nach etwa 15-20 Minuten war die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen und das Sammelgel wurde hergestellt. Das Isopropanol wurde entfernt und das Sammelgel vorsich-

Tabelle 2.10: Materialien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material	Herkunft	Artikelnr.
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe, D	9592.2
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe, D	2367.1
Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (30 %, w/v, 3,3 %)	Serva, Heidelberg, D	10687.01
Elektrophoreseapparatur	BioRAD, München, D	
PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D	SM0671
Electrophoresis Power Supply	GE Healthcare, München, D	EPS1001
Bromphenolblau	Merck Chemicals, Darmstadt, D	108122
Eisessig	Merck Chemicals, Darmstadt, D	632500
Methanol	Roth, Karlsruhe, D	8388
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe, D	5136.1
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D	3783.1

tig auf das Trenngel aufgegossen. Um Auftragstaschen für die Proteinlösungen zu erhalten, wurde ein Probenkamm in das noch flüssige Gel eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurden die Kämmen wieder entfernt und die Geltaschen mit a. bidest gespült, um Gelreste zu entfernen. Die mit Polyacrylamid-Gel befüllten Gelkammern konnten nun in die Elektrophoreseapparatur eingespannt werden.

Die Proben wurden nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Probenpuffer vermischt und fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Pro Tasche wurden jeweils 20 µL Proteinlösung (etwa 5 µg Gesamtprotein) aufgetragen. Um einerseits das Molekulargewicht des zu charakterisierenden Proteins zu bestimmen und der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine zu folgen, wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard (7 µL) mitgeführt. Sowohl die Geltaschen, als auch die innere Kammer der Elektrophoreseapparatur wurden vorsichtig mit Laufpuffer gefüllt. In das innere Kompartiment (anodischer Teil der Kammer) wurde zusätzlich noch ein Tropfen Bromphenolblau gegeben, welches als Lauffrontmarkierung dient. Der Molekulargewichtsmarker kann ebenfalls als Anzeige für das Fortschreiten der Elektro-

phorese genutzt werden. Die Elektrophorese dauerte etwa 50 Minuten und erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V, einer Stromstärke von 110 mA und die Leistung wurde auf maximal 25 W begrenzt.

Die Proteine wurden mit Coomassie-Brillantblau angefärbt, wenn das Gel nicht für den Western-Blot verwendet wurde. Dazu wurde das Gel 30 Minuten in die Farblösung gelegt und ständig bewegt. Um die überschüssige Farbe zu entfernen, wurde das Gel einmal fünf Minuten, zweimal zehn Minuten und anschließend über Nacht in die Entfärbelösung gelegt.

2.3 Quantitative Proteinbestimmung

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford wurde der blaue, saure Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 465 \text{ nm}$ verwendet [Bradford, 1976]. Bindet dieser Farbstoff an Aminosäuren der Proteine, verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu $\lambda = 595 \text{ nm}$, was mit einem Photometer gemessen wurde. Gleiche Mengen verschiedener Proteine können unterschiedliche Adsorptionskoeffizienten ergeben. Daher war für die Standardreihe ein geeignetes Protein zu wählen. Die Proteine in Elektrophoresegelen wurden ebenfalls mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. Deshalb wurde eine Stammlösung aus 0,1 % Farbstoff, 40 % Ethanol und 10 % Säure in a. dest. angesetzt.

Durchführung:

Für die Proteinbestimmung wurden die Proben nach der folgenden Tabelle 2.11 angesetzt und gut gemischt:

Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Ansätze im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen. Die Extinktion des Leerwertes wurde subtrahiert und dieser Wert mit dem Standard verglichen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Proteingehalt } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{\text{OD}_{595}(\text{Probe}) - \text{OD}_{595}(\text{Leerwert})}{\text{OD}_{595}(\text{Standard}) - \text{OD}_{595}(\text{Leerwert})} \times 2$$

Tabelle 2.11: Herstellung der Proben für die Proteinbestimmung nach Bradford

	Probe	Standard	Leerwert
Fibrinogenkonjugat	5 μL	–	–
Fibrinogen-Lösung 1 mg/mL	–	10 μL	–
Biorad-Reagenz	200 μL	200 μL	200 μL
H ₂ O bidest.	795 μL	790 μL	800 μL

2.3.2 Der ELISA

(*enzym-linked immunosorbent assay*)

Beim ELISA handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren für Biomoleküle und kleine chemische Moleküle, bei dem die Bindung eines spezifischen Antikörpers durch eine enzymgebundene Farbreaktion gemessen wird. Zum sensitiven Nachweis von antimikrobiellen Peptiden und kleinen chemischen Molekülen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Sandwich-ELISA verwendet. Beim Sandwich-ELISA binden zwei Antikörper an unterschiedliche Stellen des nachzuweisenden Antigens. Der erste Antikörper wird als Fangantikörper oder *capture Antibody* bezeichnet. Er ist an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) gebunden, der andere Detektionsantikörper vermittelt eine enzymgebundene Farbreaktion. Hierbei entsteht ein farbiges Produkt, dessen Menge proportional zur gebundenen Antigenmenge ist und mit Hilfe parallel durchgeführter Standardreihen ermittelt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzymimmunoassays wurden z.T. neu etabliert. Allerdings wurden im Laufe der Arbeit auch markierte hBD-3- und LL-37-Antikörper kommerziell erhältlich, sodass das ursprünglich entwickelte Protokoll angepasst wurde. Zur Messung von Vancomycin wird beim ELISA das Antigen an die feste Phase adsorbiert. Ein spezifischer Antikörper wird im Überschuss zugegeben. An diesen Antikörper bindet ein markierter zweiter Antikörper, der gegen den spezifischen Erstantikörper gerichtet ist. Über die Markierung und eine Farbreaktion wird wie beim Sandwich-ELISA eine Quantifizierung des Antigens möglich.

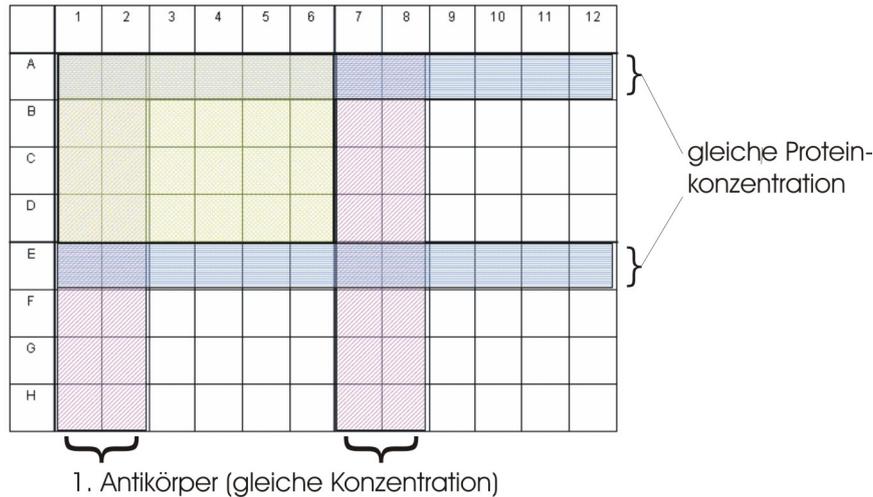


Abbildung 2.2: Schema zur Etablierung eines ELISA. Farbig dargestellt sind jeweils gleiche Konzentrationen: **violett** - des ersten Antikörpers, **blau** - des Proteins, **gelb** - des zweiten Antikörpers

Entwicklung eines ELISA

Bei den zu etablierenden Assays zur Detektion von Vancomycin bzw. LL-37 wurde für jeden Antikörper in Vorversuchen die optimale Konzentration ermittelt. Dazu wurden die Mikrotiterplatten in verschiedene Bereiche unterteilt. Der erste Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen in jeweils zwei Spalten gegeben und eine absteigende Proteinkonzentration in verschiedene Reihen zugegeben. Vier unterschiedliche Konzentrationen des zweiten Antikörpers wurden jeweils auf einem Viertel der Platte verteilt. So konnten von jeder Konstellation Doppelwerte gemessen werden (siehe Abbildung 2.2). Die Inkubationszeiten und die Detektion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde analog bereits etablierter Protokolle durchgeführt. Auf diese Weise konnte die optimale Antikörperkonzentration festgelegt und der Detektionsbereich eingegrenzt werden. Die letztlich optimale und eingesetzte Verdünnung kann der Tabelle 2.12 entnommen werden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden zehn Ansätze mit dem Nullwert der Standardkurve gemessen. Von diesen Werten wurde der Mittelwert gebildet und die dreifache Standardabweichung hinzuaddiert.

Bei der Durchführung des ELISA wurde immer 100 μ L Flüssigkeit pro Vertiefung eingesetzt.

Tabelle 2.12: Antikörper und rekombinante Proteine für den ELISA.

Antikörper (α) / Peptid	erzeugt in	Herkunft	Bestell- nummer	Menge	eingesetzte Verdünnung
α hBD-2	Ziege	Acris Antibodies, Herford, D	PP1125P1	50 ng	1:1000
α hBD-2 – Biotin markiert	Ziege	Acris Antibodies, Herford, D	PP1125B1	25 ng	1:1000
hBD-2	E.coli	Biochemisches Institut, Uni Kiel	—	—	0-6 μ g
α hBD-3	Kaninchen	Acris Antibodies, Herford, D	PP1229P1	50 ng	
α hBD-3 – Biotin markiert	Kaninchen	Acris Antibodies, Herford, D	PP1229B1	25 ng	
hBD-3	E.coli	Biochemisches Institut, Uni Kiel	—	—	0-1,5 μ g
α LL-37	Kaninchen	Innovagen AB, Lund, SE	PA-LL37100	100 ng	
α LL-37 – Biotin markiert	Kaninchen	Innovagen AB, Lund, SE	PA-LL37100BT	100 ng	
LL-37	synthetisch	Innovagen AB, Lund, SE	SP-LL37-1	1mg	0-1 μ g
α Vancomycin	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK	ab19968	2,5 mg	
α Kaninchen- Biotin	Ziege	Acris Antibodies, Herford, D	R1364B	2 mg	
Vancomycin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	861987	1g	0-10 μ g

Sandwich-Assay:

Die Methode startete mit der Adsorption eines spezifischen Antikörpers an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte (über Nacht bei 4 °C). Dieser *capture-Antibody* hatte mit hoher Affinität an ein Epitop des zu untersuchenden Antigens gebunden und konzentrierte so das Antigen auf der Trägeroberfläche. Anschließend wurden die Vertiefungen geleert und unspezifische Bindungsstellen der Platte mit Blockpuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur belegt. Die Testplatte wurde gewaschen und die Proben zusammen mit Standardwerten (Kontrollen mit bekannter Antigenmenge) zugegeben. Das Antigen wurde in PBS-Puffer + 0,1 % BSA oder Zellkulturmedium (abhängig von den Proben) so angesetzt, dass die Standardreihe den optimalen Messbereich abdeckt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur ist das Antigen aus den Proben an die Antikörper gebunden. Durch drei weitere Waschschrte wurden ungebundene Substanzen entfernt und ein mit Biotin konjugierter zweiter Antikörper (*detection-Antibody*) zugegeben. Dieser bindet an das immobilisierte Antigen und blieb somit selbst in der Vertiefung der Platte hängen. Nach erneuter Inkubation und wiederholten Waschschrten wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat durch Ausnutzung der Biotin-Streptavidin Wechselwirkung angebunden (20 Minuten bei Raumtemperatur). Die Trägerplatte wurde erneut gewaschen, um ungebundenes Peroxidase-Konjugat zu entfernen und das farblose Substrat TMB zugegeben. Durch enzymatischen Umsatz der gebundenen Peroxidase entstand aus dem TMB ein blaues Produkt. Die Farbin-tensität gab die Menge des umgesetzten Substrats wieder, welche proportional zum gebundenen Molekül war. Die Farbreaktion wurde mit Zugabe von gleichem Volumen H₂SO₄ abgebrochen. Die Farbe der Lösung ändert sich dabei von blau zu gelb. Die Extinktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ bestimmt.

Vancomycin-ELISA:

Um das Vancomycin an die Mikrotiterplatte zu binden, wurden die Proben zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Versuchsreihe enthielt außerdem eine Negativkontrolle sowie Standardwerte in ansteigender Konzentration zur Anfertigung einer Standardreihe. Die Standardreihe wurde im optimalen Messbereich in PBS-Puffer + 0,1 % BSA angesetzt. Anschließend wurde die Vertiefung geleert und

Tabelle 2.13: Zusammensetzung der Puffer für den ELISA

Puffer	Zusammensetzung
<i>Carbonatpuffer:</i>	0,318 g Na ₂ CO ₃ 0,84 g NaHCO ₃ ad 800 mL a. dem. pH 9,6
<i>10xPBS-Puffer:</i>	2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 21,6 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 80 g NaCl ad 1 L a. dem., pH 7,4
<i>Waschpuffer:</i>	PBS-Puffer + 0.1 % Tween20 [®]
<i>Blockpuffer:</i>	1 % BSA in PBS-Puffer
<i>Stopplösung:</i>	1M H ₂ SO ₄

Tabelle 2.14: Materialien für den ELISA; n. v. = nicht vorhanden

Material	Herkunft	Artikelnr.
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	A6003
H ₂ SO ₄	Merck Chemicals, Darmstadt, D	101833
KCl	Merck Chemicals, Darmstadt, D	104936
KH ₂ PO ₄	Merck Chemicals, Darmstadt, D	104873
Na ₂ CO ₃	Merck Chemicals, Darmstadt, D	106395
NaHCO ₃	Merck Chemicals, Darmstadt, D	137013
NaCl	Merck Chemicals, Darmstadt, D	106404
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	Merck Chemicals, Darmstadt, D	106580
TMB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T0440
Tween20 [®]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	P2287
Streptavidin-POD	Roche Diagnostics, Mannheim, D	345345346
96-well Flachboden Mikrotiterplatten	Corning	3590
ELISA Reader	SLT, Crailsheim, D	n. v.

unspezifische Bindungsstellen auf der Platte, mit 1 % BSA in PBS-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur, blockiert. Die Platte wurde kurz mit Waschpuffer gespült und ein spezifischer Antikörper zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur hat der Antikörper an das Antigen aus den Proben gebunden. Durch drei weitere Waschschriffe wurden ungebundene Antikörper entfernt und ein mit Biotin konjugierter zweiter Antikörper zugegeben. Nach erneuter Inkubation und wiederholten Waschschriffen wurde eine Peroxidase an das Biotin gebunden (20 Minuten bei Raumtemperatur). Nach gründlichem Abspülen der überschüssigen Peroxidase wurde das farblose Substrat TMB zugegeben. Durch enzymatischen Umsatz der gebundenen Peroxidase entstand ein blaues Produkt. Die Farbintensität gab die Menge des umgesetzten Substrats wieder, welche proportional zum gebundenen AMP war. Die Farbreaktion wurde mit Zugabe von gleichem Volumen H_2SO_4 abgebrochen, wobei sich die Farbe der Lösung von blau zu gelb ändert. Die Extinktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ bestimmt.

2.3.3 Western-Blot

Die Western-Blot Methode dient zur Identifizierung spezifischer Proteine. Dabei werden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Polymermembran übertragen und einzelne Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Für den elektrophoretischen Transfer ist das Semidry-Blot System verwendet worden. Diese Apparatur besteht aus zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden zwischen denen sich das Gel und die Blot-Membran befinden. Durch hydrophobe Wechselwirkungen wurden die Proteine auf der PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran fixiert. Dabei blieb das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Das an den Proteinen angelagerte SDS wurde hierbei ausgewaschen. Die Proteine renaturierten und nahmen zum Teil ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder ein, sodass sie später von Antikörpern erkannt wurden. Nach dem Transfer auf die PVDF-Membran mussten die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da die Antikörper sonst an diesen haften und kein spezifischer

Tabelle 2.15: Zusammensetzung der Puffer für den Western-Blot

Puffer	Zusammensetzung
<i>Transferpuffer:</i>	30,2 g Tris (entsprechen 50 mM) 142,6 g Glycin (entsprechen 380 mM) 1 L Methanol (20 % v/v) auf 5 L mit a.dem. auffüllen. Den pH-Wert (ca. pH 8,7) nicht einstellen.
<i>TBST (Tris-buffered Saline Tween):</i>	12,1g Tris (entsprechen 20 mM) 10 mL 0,5 M EDTA-Lösung (entsprechen 1 mM) 40,9 g NaCl (entsprechen 140 mM) 1ml Tween (0,1 % v/v) auf 5 L mit a.dem. auffüllen. Den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

Nachweis möglich wäre. Zum Blocken der Membran eignen sich z.B. BSA oder Milchpulver. Der Nachweis der spezifischen Bindung der Antikörper erfolgte über einen mit HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelten Sekundärantikörper durch Chemilumineszenz.

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für fünf Minuten in eiskaltem Transferpuffer (die Zusammensetzung ist in Tabelle 2.15 in angegeben) äquilibriert, was ein Schrumpfen beim Protein-Transfer verhindert. Anschließend wurden die in einer SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurden vier Lagen dickes Blottingpapier in Transferpuffer getränkt und die Elektroden des Blot-Apparates mit Transferpuffer benetzt. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde auf Größe des Gels zugeschnitten, kurz in 100%igem Methanol gelegt und anschließend zehn Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Nacheinander wurden zwei Lagen Blottingpapier, die PVDF-Membran, das von den Glasplatten gelöste Gel und zwei weitere Lagen Blottingpapier auf die Anodenseite der Blottapparatur gelegt. Möglicherweise entstande-

Tabelle 2.16: Materialien für den Western-Blot

Material	Herkunft	Artikelnr.
Eisessig	Merck Chemicals, Darmstadt, D	632500
Methanol	Roth, Karlsruhe, D	8388
Blottingpapier, extra dick Protean®	Bio-Rad	1703969
Hyperfilm ECL, 18×24 cm	GE Healthcare, München, D	RPN3103K
PVDF-Membran Hybond-P	GE Healthcare, München, D	RPN1416F
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T1378
Glycin	Roth, Karlsruhe, D	3908.2
EDTA (Ethylendiamintetra- essigsäure)	Fluka über Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D	03680
NaCl	Merck Chemicals, Darmstadt, D	106404
Tween20®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	P2287
Semi-Dry-Blotter Trans Blot	BioRAD, München, D	

ne Luftblasen, die den Transfer stören könnten, wurden entfernt und der Kontakt zur Kathodenseite geschlossen. Bei einer konstanten Stromstärke von ca. 1,5 mA pro cm² Gel wurde über 45 Minuten „geblottet“. Die Spannung wurde auf maximal 25 V begrenzt. Für die Detektion des Proteins wurde die Membran in Blockin-greagenz überführt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Dazu wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 5%iger BSA-Lösung gelegt. Anschließend wurde ein in einem Milliliter 5%ige BSA-Lösung verdünnter spezifischer Antikörper auf die Membran gegeben und in einer Folie eingeschweißt über Nacht bei 4 °C liegen gelassen. Die Membran wurde dreimal je zehn Minuten in reichlich TBST-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.15) ge-waschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der zweite mit Merrettich-Peroxydase versehene Antikörper wurde in einer geeigneten Verdünnung in TBST-Puffer auf die Membran gebracht. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur und ständiger Bewegung wurde die PVDF-Membran erneut in TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der am Protein haftenden Antikörper erfolgte mit dem *ECL Western Blot Detection Kit*. Dazu wurden zwei Milliliter Lösung A (enthält eine Peroxidlösung und Phenole) mit 50 µL Lösung B (enthält Luminol) ge-

mischt, auf eine Membran gegeben und inkubiert. Dabei wurde Luminol, das als Substrat für die Peroxydase fungiert, in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Übergang in den Grundzustand wurden Lichtquanten emittiert. Nach fünf Minuten wurde überschüssiges Reagenz abgekippt, der Blot zum Schutz in eine Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde zur Detektion der Lumineszenz ein spezieller Film aufgelegt. Nach einigen Sekunden Belichtungszeit wurde der Film einige Minuten entwickelt, kurz in Wasser gespült und fixiert. An den Stellen, an denen emittiertes Licht auf den Film traf, sind schwarze Banden entstanden.

2.3.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Thrombin ist eine Serinprotease, die Peptidbindungen zwischen Arginin-|-X¹, bevorzugt Arginin-|-Prolin spaltet. Plasmin ist ebenfalls eine Serinprotease und spaltet Peptidbindungen zwischen Lysin-|-X und Arg-|-X. Um die Aktivität dieser beiden Enzyme zu überprüfen, wurde das Substrat N-(p-Tosyl)-Glycin-Prolin-Lysin-4-Nitroanilid verwendet. Für die Messung wurden 100 mM Substrat in DMSO gelöst und ein 0,2 M Tris/NaHCO₃-Puffer (pH 7) angesetzt. Vor der Messung wurden 100 µL der Substratlösung und 9,9 mL Puffer frisch gemischt (entsprechend einer Endkonzentration von 0,01mM Substrat). Von dieser Substrat-Pufferlösung wurden 500 µL und 498 µL a. dem. in einer Halbmikroküvette auf 37 °C temperiert. Die Umsetzung des Substrats wurde durch Zugabe von 2 µL Enzym gestartet und die Extinktion 1-5 Minuten bei 390 nm registriert. Die Extinktionsänderung pro Minute wurde ermittelt. Der Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute entspricht 1 U.

¹wobei X für eine beliebige Aminosäure steht

Tabelle 2.17: Materialien zur Bestimmung der Enzymaktivität

Material	Herkunft	Artikelnr.
Thrombin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T42650
Plasmin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	P1867
N-(p-Tosyl)-Glycin-Prolin-Lysin-4-Nitroanilid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T6140
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	T1378
NaHCO ₃	Merck Chemicals, Darmstadt, D	137013

2.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt. Der Radial-Diffusions-Hemmtest ist eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis der antimikrobiellen Wirkung. Dazu wurden Bakterien (*St. aureus* ATCC 6538) in 8 mL TSB (*Tryptic Soy Broth*)-Boullion eingepflegt und über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 100 µL in 8 mL TSB-Boullion gegeben und drei Stunden bei 37 °C als Standkultur inkubiert. Während dieser Inkubation wurde der Müller Hinton-Agar (MH-Agar) verflüssigt und auf 46 °C abgekühlt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 10 mL MH-Agar in 30 mL Zentrifugenröhrchen gegeben, mit 70 µL der Bakteriensuspension gut gemischt und in Petrischalen gegossen. Nachdem sich der Agar abgekühlt hatte, wurde der Metalldraht auf die Platte gelegt und mit 100 µL Bakteriensuspension in 15 mL MH-Agar mit übergossen. So ist der Draht von Agar umschlossen. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die entstandenen trübungsfreien Hemmhöfe dienen als Indikator für die antimikrobielle Wirkung der aufgetragenen Substanzen.

2.5 Beschichtung mit dem Poly-D,L-Laktid (PDLLA)

2.5.1 Arzneistoffträger/Polymer

Als Trägermaterial dient das in Pulverform vorliegende Poly-D,L-Laktid Resomer[®] R203 (Firma Boehringer, Ingelheim) mit einem Molekulargewicht von 29.5 kDa und der chemischen Summenformel $(C_6H_8O_4)_n$. Um einem hydrolytischen Abbau und einer Zerstörung des Polymergerüsts vorzubeugen, hat die Lagerung absolut kühl und trocken zu erfolgen.

In die Beschichtung wurden die antimikrobiellen Peptide hBD-2, -3 und LL-37, sowie Vancomycin als Kontrolle eingearbeitet. Als organisches Lösungsmittel wurde Ethylacetat verwendet. Als Ersatz für orthopädische Implantate werden runde Deckgläschen, sowie eine 0,5 mm dicke Folie bzw. Kirschnerdraht aus rostfreien Stahl (Legierungstyps CrNi 878) verwendet. Ausgangsstoffe der resorbierbaren Osteosynthesematerialien sind Milch- und Glykolsäuren (Polylaktid bzw. Polyglykolid) und deren Kopolymere. Aufgrund eines chiralen Kohlenstoffatoms existieren zwei optisch aktive Konfigurationen der Milchsäure, L-Laktat und D-Laktat. L-Laktat ist mechanisch sehr stabil, wird aber nur langsam resorbiert, D-Laktat ist dagegen weniger stabil, wird jedoch schneller resorbiert. Aus der Kombination beider Formen kann eine Vielzahl unterschiedlicher Polymere und Polymermischungen hergestellt werden. Zur Herstellung von Osteosynthesematerialien wurde zunächst Poly-L-Laktid (PLLA) verwendet, das zu einem hohen Grad kristallin ist. Kristalline Stoffe neigen nach anfänglichem Abbau zu einer Rekristallisation, welche zu Fremdkörperreaktionen führen kann. Im Gegensatz hierzu soll bei intrinsisch amorphen Polymeren wie Poly-D,L-Laktid (PDLLA) keine Rekristallisation vorliegen. Einen Kompromiss bilden Mischformen kristalliner und amorpher Polymere, die teilkristallinen Kopolymere von Poly-L-Laktid und Poly-D,L-Laktid (PLDLLA) [4-6].

2.5.2 Beschichtungstechnologie

Die Beschichtung wurde in einem Kaltbeschichtungsverfahren, wie von Gollwitzer et al. [2003] beschrieben, durchgeführt. Das in Pulverform vorliegende Polylaktid

Resomer R203 wurde über Nacht in Ethylacetat gelöst (133 mg/mL). Die Beschichtung der Implantate erfolgt unter „lamina-air-flow“-Bedingungen in einer Sterilwerkbank. In ein Gefäß mit lyophilisiertem Vancomycin wurde, über einen lösungsmittelresistenten Sterilfilter, das vollständig aufgelöste Polymer eingebracht. Durch gutes Mischen wurde eine homogene Suspension hergestellt, die dann in ein steriles Reagenzglas mit Schliffstopfen überführt wurde. Das zu beschichtende Deckglas bzw. der Kirschnerdraht wurde in die Suspension eingetaucht und anschließend an der Luft getrocknet. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden für die Elutionsversuche eine definierte Menge der Beschichtungslösung und damit auch des Wirkstoffs auf ein Deckglas gegeben. Die Lagerung erfolgte eingeschweißt im Kühlschrank.

Das Vancomycin kann in einer bis zu 10%igen Konzentration im PDLLA vorliegen, wodurch die Trägersubstanz maximal beladen ist. Für die Defensine hBD-2 und LL-37 konnten diese hohen Mengen an eingesetzter Substanz nicht realisiert werden. Für hBD-2 konnten maximal 75 µg pro Milliliter gelöstem PDLLA eingesetzt werden, was einer Beladung von 0,06 % entspricht. Das synthetisch hergestellte LL-32 konnte maximal mit 150 µg pro Milliliter gelöstem PDLLA bzw. einer Beladung von 0,12 % hergestellt werden.

Tabelle 2.18: Materialien für die PDLLA-Beschichtung

Material	Herkunft	Artikelnr.
<i>Stainless Steel foil</i> Type 304	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, D	041585
hBD-2	Biochemisches Insitut, Kiel, D	—
LL-32	Forschungszentrum Borstel, D	—
Poly-D,L-Laktid		
Resomer [®] R203	Boehringer, Ingelheim, D	59732
Ethylacetat	Merck Chemicals, Darmstadt, D	9623
Spitzenvorsätze Steril	Sartorius, Hannover, D	17575-ACK

2.6 Konjugation antimikrobieller Wirkstoffe an Fibrinogen

Die im Folgenden erstmals vorgestellte Verbindung beschreibt ein Konjugat aus Fibrinogen und einem antimikrobiellen Wirkstoff. Das Fibrinogen ist dabei über einen Linker kovalent an den Wirkstoff gebunden. Sowohl Fibrinogen als auch AMP wurden dafür mit einer aktiven Gruppe versehen, welche nachfolgend kovalent an die kopplungsfähige Gruppe des Reaktionspartners gebunden wird. Als *cross-linker* wurde Sulfo-SMCC (*sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat*) eingesetzt. Es enthält N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) und Maleimidgruppen, die eine Konjugation sowohl mit Amino-, als auch mit Sulfhydryl-Gruppen erlauben. Die Kopplung wurde in drei Schritten durchgeführt, das Reaktionsschema ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

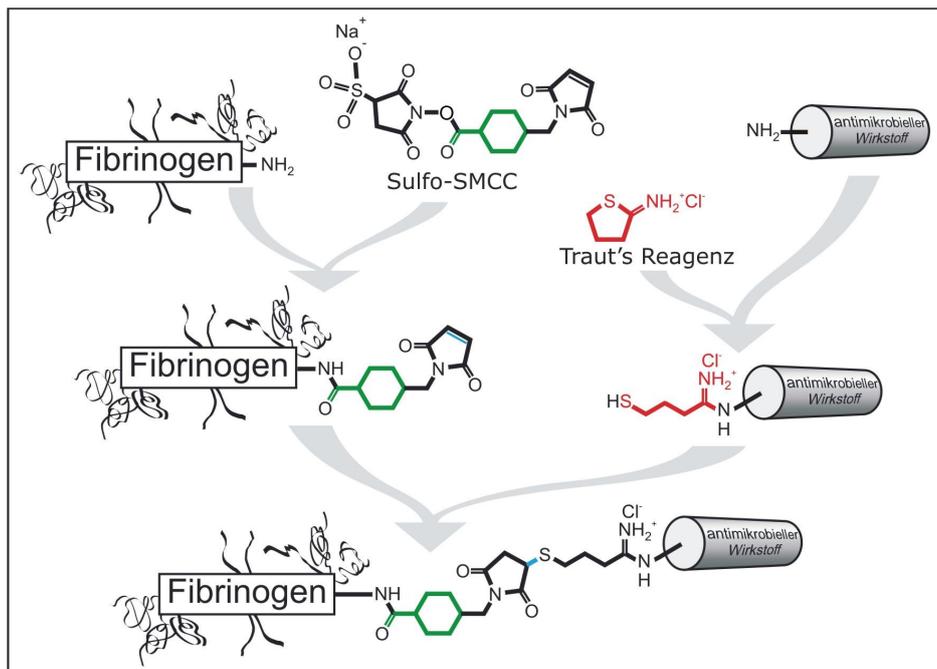


Abbildung 2.3: Kopplung von Wirkstoffen an Fibrinogen. Auf der linken Seite ist die Kopplung des Fibrinogens an den Linker Sulfo-SMCC gezeigt. Auf der rechten Seite ist dargestellt, wie die primären Aminogruppen des antibiotischen Wirkstoffes mit Traut's Reagenz (2-Iminothiolan) zu einer freien SH-Gruppe reagieren. Die Maleimide reagieren mit den Sulfhydrylgruppen und bilden stabile Thioether-Bindungen.

1. *Kopplung des Fibrinogens an den Linker*

(Umsetzen einer primären Aminogruppe mit einer Estergruppe)

Fibrinogen stellt durch die Aminosäure Lysin mehrere N-terminale Aminogruppen für die Bindung zur Verfügung. Diese wurden mit der N-Hydroxysuccinimid-Estergruppe umgesetzt. Die bei leicht alkalischem pH-Wert ungeladenen primären Amine greifen das Kohlenstoffatom der Estergruppe an. Durch diesen nucleophilen Angriff entsteht eine stabile Amidbindung. Die Reaktion verläuft schnell unter milden Bedingungen ab. Die Hydrolyse des NHS-Esters ist dabei die konkurrierende Reaktion. Durch das Einstellen des passenden pH-Wertes ist eine Beeinflussung in eine Richtung möglich. Es wurde ein PBS- bzw. NaHCO₃-Puffer verwendet, da der Puffer keine primären Amine besitzen darf, die ebenfalls reagieren könnten. In der Reaktionslösung waren 4 mg Fibrinogenlösung in 0,9 % NaCl und ein 10-facher molarer Überschuss an SMCC in 0,1 M NaCl, 20 mM HEPES; pH-Wert 7 enthalten. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Überschüssiges Reagenz wurde mit den Spin-Columns (siehe Abschnitt auf Seite 58) abgetrennt.

2. *Einführung von SH-Gruppen*

Um eine Bindung an die Maleimidgruppe des Linkers zu erreichen, wurden SH-Gruppen in die Wirkstoffe eingeführt. Dazu wurden die primären Aminogruppen mit Traut's Reagenz (2-Iminoethanol) modifiziert. Die primären Aminogruppen des Vancomycin sind der Strukturformel in Abbildung 2.4 zu entnehmen. Die Aminosäurestruktur der AMP ist in Abbildung 1.6 auf Seite 16 gezeigt. Je nachdem in welchem Verhältnis die Wirkstoffe enthalten sein sollten, wurden 17 µg oder 170 µg hBD-2 bzw. Vancomycin mit einem 20fachen molaren Überschuss an Traut's Reagenz in 0,1 M NaCl und 20 mM HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 8 bei Raumtemperatur über 15 Minuten inkubiert. Durch den Angriff des Stickstoffatoms der Aminogruppe auf das C-Atom des 2-Iminoethanol wird das Ringsystem aufgebrochen, wodurch eine Verbindung mit einer Sulfhydrylgruppe entsteht. Bei Verwendung des im Forschungszentrum Borstel synthetisierten C-LL-32 entfiel dieser Schritt, da das zusätzliche Cystein bereits eine SH-Gruppe enthält. Zur Abtrennung der überschüssigen Kopplungsreagenzien wurden Spin Columns verwendet. Aufgrund der Porengröße des eingesetzten Sephadexgels wurde überschüssi-

ges Traut's Reagenz mit 137g/mol bzw. Sulfo-SMCC mit 436g/mol zurückgehalten, während sich das Konjugat im Durchlauf befand.

3. Konjugation der beiden Reaktionspartner

Die Maleimide reagieren mit den Thiolgruppen bei einem pH-Wert von 6.5-7.5 und bilden stabile Thioether-Bindungen. Die Maleimidgruppe des Konjugats reagiert mit der durch Traut's Reagenz eingeführten Thiolgruppe zum gewünschten Produkt. Konjugationen mit diesem *Crosslinker* sollten laut Herstellerangaben bei pH-Wert von 7.2 bis 7.5 stattfinden. Die beiden Konjugate wurden bei Raumtemperatur im gewünschten Verhältnis (1+1, 10+1 oder 30+1) vereinigt und anschließend mittels der Ultrafiltration (s.u.) konzentriert, wobei das anfängliche Volumen auf ein Zehntel verringert werden konnte.

Die Zentrifuge wurde auf 4 °C gekühlt, um einen Abbau durch Proteasen zu vermeiden. Die Lagerung des Kopplungsreagenzes erfolgte bei -20 °C. Die Proteinkonzentration der hergestellten Konjugate wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.1).

Für die Analyse der Konjugate wurde die Western-Blot-Methode verwendet. Dazu wurden die Proteine mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.2) und anschließend der gekoppelte Wirkstoff mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

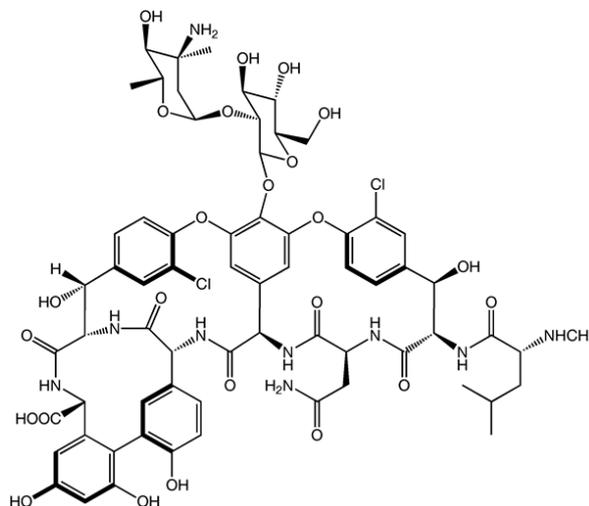


Abbildung 2.4: Strukturformel Vancomycin

Spin Columns

Zur Abtrennung der überschüssigen Kopplungsreagenzien wurden Spin Columns als kleine Sephadex Säulen verwendet. Sie bestehen aus kleinen Plastiksäulen mit einem Polyethylenfilter am Boden, die in ein zwei Milliliter Reagiergefäß passen. Diese Spin Columns wurden mit 250 µL Sephadex G25 Lösung (s.u.) gefüllt, eine Minute bei 1000 *g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Zwischen 25 µL und 125 µL Konjugat wurde auf die Mitte des Gelbettes gegeben und erneut zentrifugiert (1000 *g, 2 Minuten). Nur das Eluat wurde für die weitere Kopplungsreaktion eingesetzt (Trennbereich 1.000 - 5.000Da). Moleküle, die größer sind als die größten Poren der Sephadexmatrix werden aus dieser ausgeschlossen und verlassen die Säule als erstes. Moleküle, die kleiner sind dringen in die Poren ein. So haben sie einen größeren Zugang zum Säulenvolumen und verlassen die Säule nach den großen Molekülen.

Herstellung der Sephadex G-25 Lösung:

10 g Sephadex G-25 wurden in 160 mL a. dem. 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend vier Minuten bei 400 g zentrifugiert. Das Sephadex wurde zweimal mit aqua dem. gewaschen und erneut zentrifugiert. Aufbewahrt wurde das Sephadex im Verhältnis Sephadex-Phase : H₂O = 3:1.

Ultrafiltration

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung der Proben wurden die Proteinlösungen je nach Menge mit Microcon oder Amicon Filtereinheiten mit einer 10 kDa-Membran konzentriert. Dabei wurden alle Moleküle, die größer als 10 kDa waren, durch die Membran zurückgehalten.

Zunächst wurde die Membran mit Hepes-Puffer gespült. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die Filtereinheit gegeben. Durch 10-20 Minuten Zentrifugation bei 4000 *g wurde überschüssiges Vancomycin oder AMP durch die Membran gedrückt. Das in der Filtereinheit zurückgebliebene konjugierte Fibrinogen wurde für die Versuche eingesetzt.

Tabelle 2.19: Materialien für die Kopplung an Fibrinogen

Material	Herkunft	Artikelnr.
<i>Stainless Steel foil</i> Type 304	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, D	041585
hBD-2	Biochemisches Insitut, Kiel, D	—
LL-32	Forschungszentrum Borstel, D	—
Vancomycin		
Fibrinogen, <i>Human Plasma</i>	Merck Chemicals, Darmstadt, D D	1341576
hBD-3	Biochemisches Insitut, Kiel, D	—
Traut's Reagenz	Pierce, Rockford, USA	
Microcon <i>centrifugal Filters</i>	Millipore, Bedford, USA	42413
ultracel YM Membran		
Zeba™, Desalt Spin Columns	Pierce, Rockford, USA	98980
Sephadex G-25 Superfine		
Sulpho-SMCC (<i>sulosuccinimidyl</i> <i>4-(N-maleimidomethyl)</i> <i>cyclohexane-1-carboxylate</i>)	Pierce, Rockford, USA	22322
Amicon <i>Ultrafiltration Cell</i>	Millipore, Bedford, USA	UFC 801024

2.7 Kovalente Bindung antimikrobieller Peptide an Titan bzw. Edelstahl

Durchführung:

Die verwendeten Metalldrähte wurden zur Reinigung zunächst über Nacht in 70%igen Ethanol gelegt und anschließend autoklaviert. Zur Aktivierung der Oberfläche wurde eine „Piranha-Lösung“ (Peroxomonoschwefelsäure) hergestellt. Dazu wurden 30%iges Wasserstoffperoxid und konzentrierte Schwefelsäure zu gleichen Teilen auf Eis gemischt. Die Drähte wurden eine Stunde in diese Lösung gelegt, wobei die Oberfläche oxidiert wurde. An diese aktivierte Oberfläche wurden verschiedene Silane gekoppelt.

a) (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTS)

Das Reaktionsschema hierzu ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Für diese Kopp-

Tabelle 2.20: Zusammensetzung der Lösungen für die kovalente Bindung

Puffer	Zusammensetzung
<i>0,1 M Carbonatpuffer:</i>	8,4 g NaHCO ₃ ad 1000 mL a. dem. pH 8,0-8,2
<i>Proteinlösung:</i>	
Vancomycin (Positivkontrolle)	0,25 mg/mL in 0,1 M Carbonatpuffer
Glycin (Negativkontrolle)	0,25 mg/mL in 0,1 M Carbonatpuffer
LL-32	20 µg/mL in 0,1 M Carbonatpuffer
<i>aktivierte Proteinlösung:</i>	0,02 g Ammoniumperoxodisulfat (APS) 0,02 mL N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 5 mg Wirkstoff ad 10 mL 0,1 M Carbonatpuffer

Tabelle 2.21: Materialien für die kovalente Bindung an Metall

Material	Herkunft	Artikelnr.
Spickdraht	Darco, Raisting, D	NO 2228-318
hBD-2	Biochemisches Insitut, Kiel, D	—
LL-37	Forschungszentrum Borstel, D	—
APTS	Fluka über Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, D	09324
EGS	Fluka über Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, D	73912-250mg-F
Aceton	Roth, Karlsruhe, D	5025.5
Methanol	Roth, Karlsruhe, D	8388
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	D2650
Triethylamin	Merck Chemicals, Darmstadt, D	808352
MEMO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	440159
APS	Roth, Karlsruhe, D	9592.2
TEMED	Roth, Karlsruhe, D	2367.1

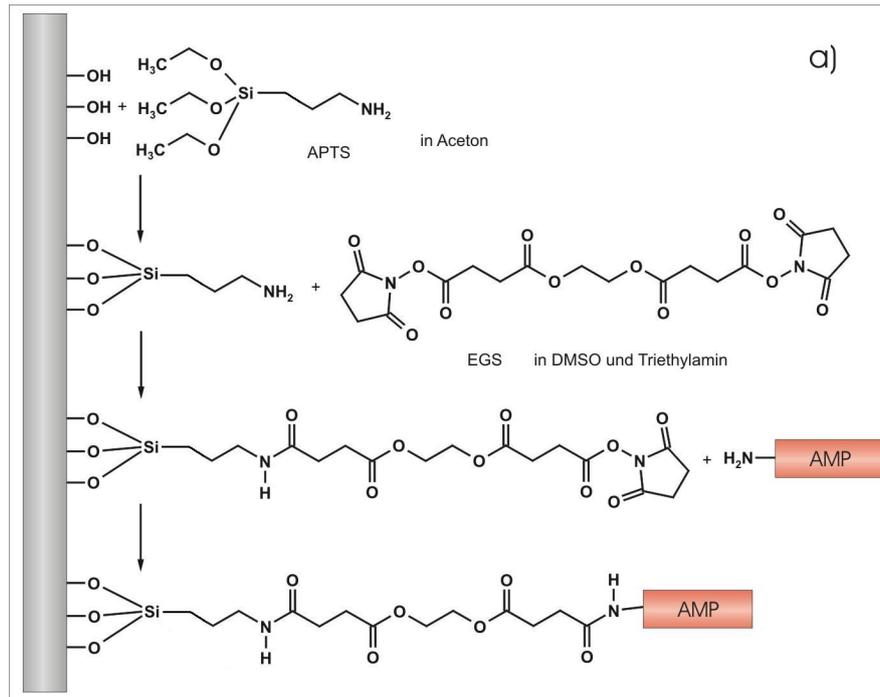


Abbildung 2.5: Kopplung von Wirkstoffen über APTS

APTS = (3-Aminopropyl)triethoxysilane; EGS = Ethyleneglycolbis(succinimidyl succinate)

Metallimplantate wurden zunächst für zwei Stunden in eine 2%ige APTS-Lösung gelegt. Anschließend wurden die Stäbe in Aceton und Methanol gründlich gespült und eine Stunde bei 80 °C getrocknet. Die Implantate wurden in eine Lösung aus 1 mg/mL EGS in DMSO und 0,5 % (v/v) Triethylamin gegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Stäbe mit DMSO gewaschen wurden, inkubierten sie zwei Stunden mit einer Wirkstofflösung, wurden gut mit Carbonatpuffer gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und verschlossen gelagert.

lung wurden die Drähte nach der oben beschriebenen Vorbehandlung kurz in Aceton gespült und in einer Lösung aus 2%igen APTS in Aceton 3 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen der Drähte mit Aceton und Methanol wurden sie eine Stunde bei 80 °C getrocknet. An das Silan wurde der Linker Ethyleneglycolbis(succinimidyl succinate) (EGS) gebunden. Dazu wurden 1 mg EGS in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und 0.5 % (v/v) Triethylamin hinzugegeben. Nach drei Stunden Inkubation in dieser Lösung bei Raumtemperatur wurden die Drähte mit DMSO gewaschen und für 2 Stunden in eine Proteinlösung (siehe Tabelle 2.20) gelegt. Zum Schluß wurden die Drähte gründlich im Carbonatpuffer (siehe Tabelle 2.20) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und verschlossen gelagert.

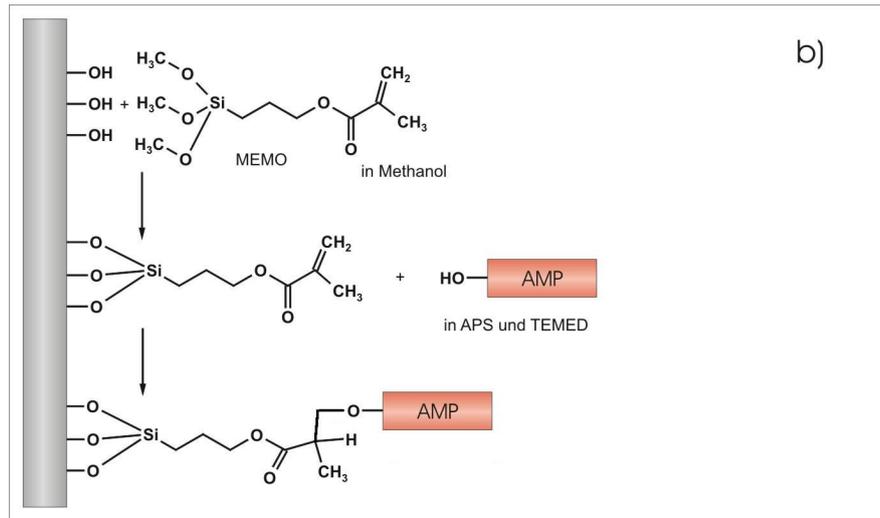


Abbildung 2.6: Kopplung von Wirkstoffen über MEMO

MEMO = 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylat; APS = Ammonium peroxodisulfat; TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin

Zunächst wurden Metallimplantate für 45 Minuten in eine Lösung aus 0,1%igem MEMO in Methanol gelegt. Anschließend wurden die Stäbe mit Methanol und a. dest. gründlich gespült und eine Stunde mit einer aktivierten Proteinlösung (siehe Tabelle 2.20) inkubiert. Die Stäbe wurden mit Carbonatpuffer gewaschen und verschlossen bei 4 °C gelagert.

b) 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylat (MEMO)

Das Reaktionsschema hierzu ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Für diese Kopplung wurden die Drähte nach der oben beschriebenen Vorbehandlung kurz in Aceton gespült und in einer Lösung aus 0,1%igem MEMO in Methanol 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Drähte mit Methanol und a. dest. wurden sie eine Stunde in eine aktivierte Proteinlösung (siehe Tabelle 2.20) gelegt. Zum Schluß wurden die Drähte gründlich im Carbonatpuffer gewaschen und verschlossen bei 4 °C gelagert.

2.7.1 Untersuchungen zur mikrobiologischen Aktivität kovalent gebundener AMP

Um die Überlebensfähigkeit der Bakterien auf den Implantaten zu überprüfen wurde das Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL;L-7012) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die DNA der Bakterien wird

dabei mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff SYTO 9 markiert. Der zweite rot-fluoreszierende Farbstoff Propidiumjodid kann nur durch eine zerstörte Zellwand eindringen. Daher erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop lebende Bakterien grün und tote rot.

In einem anderen Test wurden die Implantate mit kovalent gebundenen AMP zur Bestimmung der mikrobiologischen Aktivität über verschiedene Zeiten mit einer Bakterienlösung inkubiert. Nachdem lose assoziierte Bakterien kurz in a. dest. abgespült wurden, wurde der Stab und über einen MH-Agar (Herstellung siehe Abschnitt 2.4) gerollt. Nach 24 Stunden Bebrütung wurden die gewachsenen Bakterienkolonien gezählt.

2.8 Statistik

Für die grafische Zusammenfassung der Werte wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Der Standardfehler (SEM) liefert eine Aussage über die Güte des Mittelwertes. Mit dem ANOVA-Test wurde ermittelt, ob sich zwei Messgruppen signifikant unterscheiden. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$ wurde mit „***“, $p < 0,005$ mit „**“ und $p < 0,01$ mit „*“ gekennzeichnet.

Ergebnisse

3.1 Stabilität und Wiederfindung der antimikrobiellen Peptide *in vitro*

Die in eine Beschichtung eingebrachten antimikrobiellen Peptide sollen das Implantat während und in den ersten kritischen Stunden nach der Operation vor Bakterienwachstum schützen. Daher ist es bedeutsam zu wissen, ob die AMP ausreichend stabil sind. Die Stabilität wurde, da ein Teil der *in vitro*-Experimente in Zellkultur stattfanden, sowohl in Zellkulturmedium (DMEM), als auch in Serum analysiert. Für diesen Versuch wurden jeweils 25 ng hBD-2, hBD-3 und LL-37 in DMEM pur, in DMEM mit Zusatz von 1% BSA bzw. 10% FBS (Hitzeinaktiviert, 30min, 56 °C), und in humanes Serum gegeben. Innerhalb der folgenden 24 Stunden wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und der Gehalt an AMP mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse der Stabilitätsmessungen sind in Abbildung 3.1 zusammenfassend dargestellt.

Im Zellkulturmedium ohne AMP-Zusatz (Negativkontrolle) konnten keine AMP gemessen werden.

Die zugefügten 25 ng hBD-2, und hBD-3 konnten im Medium nicht detektiert werden (Abbildung 3.1 (A) und (B)). Die Wiederfindung dieser beiden Defensine steigerte sich zum Teil deutlich durch den Zusatz von Serumalbumin (BSA) bzw. fetalem Rinderserum (FBS). Wurden dem Medium 1% BSA bzw. 10% FBS zugesetzt, konnten 20% des eingesetzten hBD-2 detektiert werden (A). Nach Zugabe von 10% FBS zum Medium blieb das hBD-3 über Die Menge an hBD-3 blieb nach Zugabe von FBS zum Medium über 24 Stunden annähernd konstant (B). Vom eingesetzten LL-37 konnten im Medium zu 50% gemessen werden (Abbildung 3.1 (C)). Auch hier führte der Zusatz von BSA bzw. FBS zu einer besseren Wiederfindung, nach den ersten Stunden konnten 80% und nach 10 und 24 Stunden 60% des eingesetzten LL-37 detektiert werden.

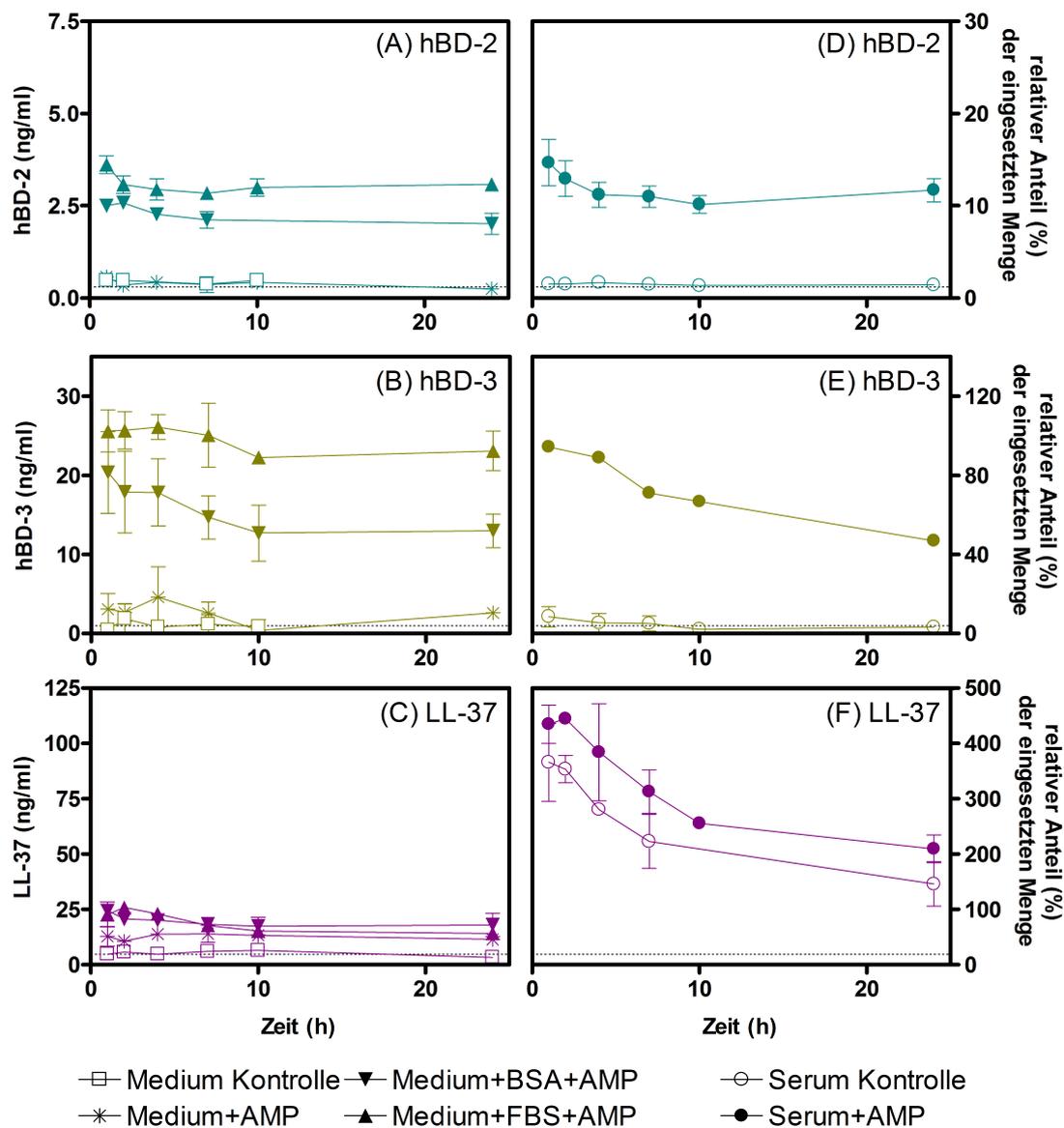


Abbildung 3.1: Stabilität der Defensine hBD-2, -3 und von LL-37 über 24 Stunden. 25 ng der antimikrobiellen Peptide wurden in Zellkulturmedium, in Medium mit Zusatz von 1 % BSA bzw. 10 % FBS und in humanem Serum angesetzt. Nach 1, 2, 4, 7, 10 und 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der Peptidgehalt mit dem ELISA bestimmt. Nachweis im Medium: (A) hBD-2, (B) hBD-3, (C) LL-37; Nachweis im Serum: (D) hBD-2, (E) hBD-3, (F) LL-37. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze des Immunoassays an. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM für n=4

Im Serum ohne Zusatz von AMP konnten keine Defensine nachgewiesen werden, während für LL-37 90 ng/mL gemessen wurden. Wurden 25 ng hBD-2 ins Serum gegeben, so konnten über den gesamten Zeitraum zwischen 10 % und 15 % der eingesetzten AMP nachgewiesen werden (D). Die Konzentration von hBD-3 sank nach 24 Stunden auf annähernd 50 % (E). Nach 24 Stunden konnten für LL-37 17 ng/mL und damit noch annähernd 70 % des zugesetzten Peptids detektiert werden. Die Messwerte von LL-37 im Serum sind unter der Berücksichtigung der Serumnormalwerte stabil. Allerdings war der Ausgangsmesswert deutlich höher, als die Menge an zugesetztem Peptid (F).

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass den in Zellkultur stattfindenden Versuchen 10 % FBS zugesetzt werden sollte, um die Wiederfindung zu verbessern. Alle antimikrobiellen Peptide waren über den gemessenen Zeitraum von 24 Stunden in Medium nahezu stabil und konnten daher für die Beschichtungen und die folgenden in-vitro-Versuche verwendet werden.

3.2 Untersuchung der Poly-D,L,-Laktid Beschichtung als Trägersystem für AMP hinsichtlich seiner Wirksamkeit und Gewebeverträglichkeit in vitro

Eine Beschichtung mit einem resorbierbaren Arzneistoffträger auf der Basis von Polymilchsäure (Resomer R203®), die mit verschiedenen Wirkstoffen versetzt wurde, soll hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Verhinderung bakterieller Knocheninfektionen untersucht werden.

Das für die Beschichtung verwendete Poly-D,L,-Laktid (PDLLA) ist in verschiedenen Lösungsmitteln löslich. Um herauszufinden, welches dieser Lösungsmittel für die eingesetzten Wirkstoffe am geeignetsten ist, wurde die Löslichkeit überprüft. Im Weiteren wurden verschiedene antimikrobielle Peptide sowie Vancomycin (als Positivkontrolle) in die PDLLA-Beschichtungslösung eingebracht. Mit dieser Lösung wurden Metallstäbchen aus medizinischem Stahl und Deckgläschen unter sterilen Bedingungen beschichtet und die Elution der Wirkstoffe aus dem Trägermaterial mittels ELISA untersucht. Eine mögliche toxische Wirkung auf huma-

ne SAOS-Zellen und Synovialfibroblasten wurde mit Hilfe von Proliferationstesten (CyQuant[®]-Assay und manuelle Zählung) bestimmt. Zum Nachweis der bakteriziden Eigenschaften wurden Radial-Diffusions-Hemmteste durchgeführt.

3.2.1 Löslichkeit von AMP in verschiedenen Lösungsmitteln

Zur Herstellung der resorbierbaren Beschichtung wird PDLLA als Trägermaterial verwendet. Das geeignete Lösungsmittel, sowohl für die eingearbeiteten Wirkstoffe, insbesondere die kationischen Defensine, als auch das Polylaktid musste zunächst gefunden werden. Daher wurde die Löslichkeit der eingesetzten Stoffe in dem folgenden Versuch überprüft. Als Lösungsmittel wurden H₂O, H₂O mit 50 % in Ethylacetat gelöstem PDLLA, 0,1%ige Essigsäure (in dem die Defensine standardmäßig gelöst sind), 0,1%ige Essigsäure mit 50 % in Ethylacetat gelöstem PDLLA, Ethylacetat, Chloroform und Aceton verwendet. Jeweils 1 µg hBD-2 und LL-32 und 0,1 µg hBD-3 wurden in 100 µl Lösungsmittel gegeben und durch Mischen gut gelöst. Anschließend wurden die Lösungen in neue Gefäße überführt, bei Raumtemperatur eingetrocknet, mit 120 µl 0,1%iger Essigsäure aufgenommen und die Konzentration des AMP mittels ELISA bestimmt.

Bei der Annahme, dass sich 100 % der eingesetzten Peptide lösen, sollten für hBD-2 und LL-37 maximal 8,3 µg/mL und für hBD-3 maximal 830 mg/mL gemessen werden.

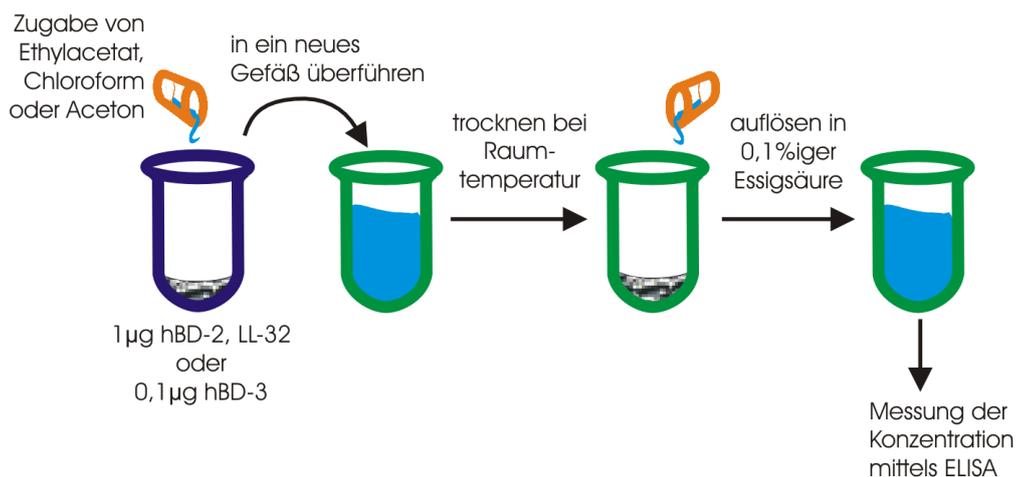


Abbildung 3.2: Versuchsdurchführung des Löslichkeitsversuchs

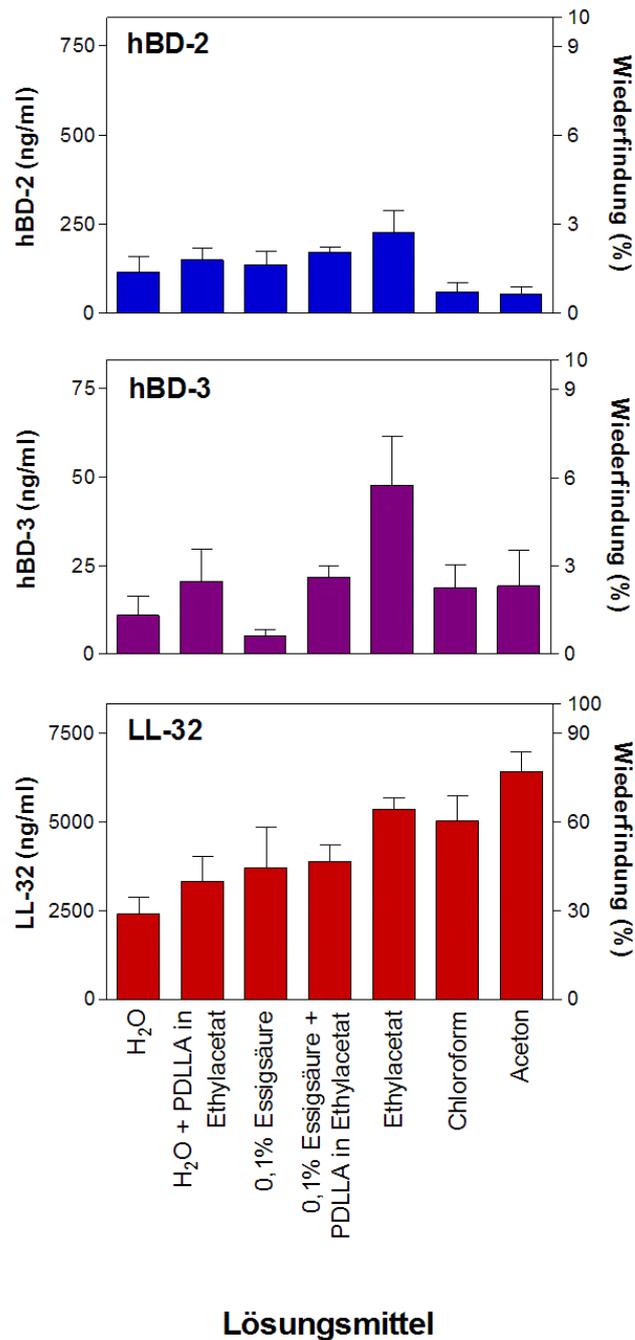


Abbildung 3.3: Löslichkeit von AMP in verschiedenen Lösungsmitteln. Jeweils 1 µg der AMP wurde in je 100 µl H₂O, H₂O mit 50 % PDLLA in Ethylacetat gelöst, 0,1 % Essigsäure, 0,1 % Essigsäure mit 50 % PDLLA in Ethylacetat gelöst, Ethylacetat, Chloroform oder Aceton gelöst, in ein neues Gefäß überführt, eingetrocknet und mit 120 µl 0,05 % Essigsäure aufgenommen. Die Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Eingesetzte Konzentrationen: für hBD-2 und LL-37: 8,3 µg/mL (100%), für hBD-3 830 µg/mL (100%). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM

Die Abbildung 3.3 auf der vorherigen Seite zeigt, wie viel ng/mL bzw. Prozent der anfänglich vorhandenen Peptide sich in den Lösungsmitteln gelöst haben.

Das hBD-2 löste sich in allen Lösungsmitteln nahezu gleich, allerdings konnten weniger als 5 % des eingesetzten Peptides nachgewiesen werden. Auch hBD-3 löste sich in allen getesteten Lösungsmitteln schlecht. Ebenso konnte für LL-32 beobachtet werden, dass die Löslichkeit in nicht-wässrigen Lösungsmitteln besser war. Die Menge des überführten Peptids war mit bis zu 80 % am größten in Aceton. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Defensine hBD-2 und -3 weniger als 5 % bzw. 10 % der eingesetzten Menge nachgewiesen werden konnte, während bei LL-37 bis zu 80 % des Peptids in den Lösungsmitteln gelöst hatte.

Da sich die Löslichkeit der getesteten AMP in den verschiedenen Lösungsmitteln nicht wesentlich unterscheidet, wird Ethylacetat in den folgenden Versuchen als Lösungsmittel verwendet.

Bei makroskopischer Betrachtung war zu erkennen, dass sich hBD-2 nicht in Ethylacetat löst, da ein Bodensatz zurückbleibt. In der Abbildung 3.3 zu erkennen, dass sich die eingesetzten Defensine in H₂O und 0,1 %iger Essigsäure genauso gut lösen, wie in Ethylacetat. Allerdings ist die Gesamtmenge von 3 % nicht groß. Dies könnte an der Versuchsdurchführung liegen. Für die Beschichtungstechnik ist es nicht notwendig, dass die Wirkstoffe gelöst vorliegen, ebenso lässt sich eine Suspension auftragen. Hierbei werden beim Trocknen größere Zwischenräume im Polylaktidgerüst entstehen. Mit einsetzender Hydrolyse würde schneller eine größere Menge Defensin freigesetzt werden, was ein Vorteil beim Einsatz als Implantatbeschichtung wäre. Es wurde bei der Herstellung der Beschichtungslösung für weitere Untersuchungen darauf geachtet, dass das hBD-2 in einer gut durchmischten Dispersion in der Beschichtungslösung vorlag. Als nächstes wurde überprüft, wie die in eine PDLLA-Beschichtung eingebrachten AMP freigesetzt werden.

Die Beschichtung sollte bereits nach 24 Stunden genügend AMP abgegeben haben, um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen. In die Beschichtungslösung lassen sich unterschiedliche Konzentrationen von Wirkstoffen einarbeiten, dabei beträgt die maximale Wirkstoffmenge 10 % (w/w) Wirkstoff/PDLLA.

3.2.2 Bestimmung der Freisetzungskinetik und der maximalen Abgabemenge aus der PDLLA-Beschichtung

Um die Freisetzungsmenge von AMP aus der PDLLA-Beschichtung zu bestimmen, wurde ein Elutionsversuch durchgeführt. Zunächst wurde eine PDLLA-Gebrauchslösung hergestellt, in der 1330 mg des Polylaktids in 10 mL Ethylacetat gelöst wurden. Anschließend wurden die verschiedenen Wirkstoffe zu einem Gewichtsprozent in die Beschichtung eingearbeitet, indem jeweils 1,34 mg des getrockneten Wirkstoffs in der PDLLA-Gebrauchslösung aufgenommen wurden. Eine gleiche Menge der Beschichtungslösung wurde auf die Deckgläschen pipettiert. Die Deckgläschen wurden in ein mit Normalmedium gefülltes Falcon-Röhrchen hinein gegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach ¼, 1, 6, 12, 48 Stunden, 4 und 6 Tagen wurden Proben à 200 µl entnommen und der AMP-Gehalt in der Probe mittels ELISA bestimmt. Eingesetzt wurden 1 % (w/w) hBD-2 bzw. LL-32/PDLLA und 10 % (w/w) LL-37/PDLLA.

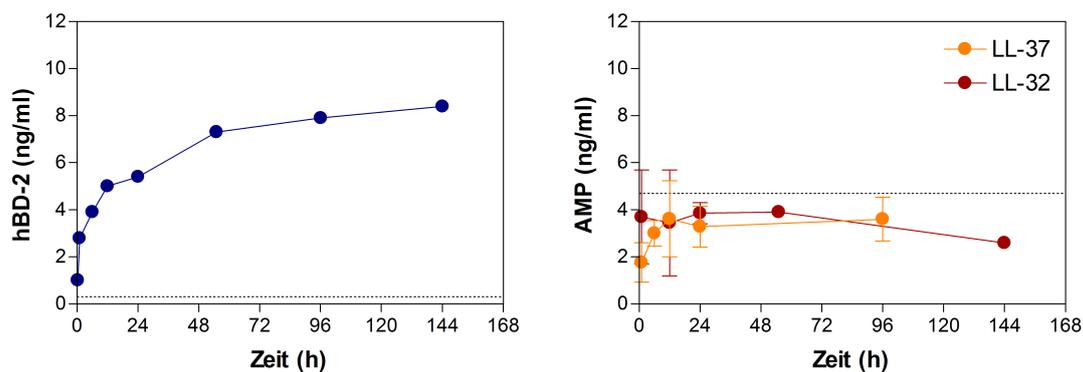


Abbildung 3.4: Freisetzung von AMP aus der PDLLA-Beschichtung. In die PDLLA-Beschichtung wurden 1 % (w/w) hBD-2 bzw. LL-32/PDLLA und 10 % (w/w) LL-37/PDLLA integriert. Mit diesen Lösungen wurde Deckgläschen beschichtet und bei 37 °C in Normalmedium inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung der AMP erfolgte mittels ELISA nach ¼, 1, 6, 12, 48 Stunden, 4 und 6 Tagen Elutionszeit. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze an. Es ist zu erkennen, dass innerhalb der ersten 12 Stunden eine relativ große Menge an hBD-2 freigesetzt wird, danach verlangsamt sich die Abgabe des hBD-2. Die maximale Abgabemenge nach 6 Tagen betrug 8,4 ng/mL Medium. Eine Freisetzung von LL-32 und LL-37 aus der PDLLA-Beschichtung konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Abbildung 3.4 zeigt die Freisetzung von AMP über die Zeit. Die Daten des Elutionsversuches zeigen eine anfänglich starke Zunahme von hBD-2 im Medium bis zu einem Zeitpunkt von 12 Stunden. Danach vermindert sich die Abgabe von

hBD-2 aus der Beschichtung über die Zeit. Die Abgabemenge nach 6 Tagen betrug 8,4 ng/mL Medium. Eine Freisetzung von LL-32 und LL-37 aus der PDLLA-Beschichtung konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 Auswirkung der PDLLA-Beschichtung auf SAOS-Zellen

Proliferationsstudien mit CyQuant[®]-Assay

Im Rahmen der Versuche sollte eine mögliche toxische Eigenschaft der in dem Beschichtungsverfahren verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden. Zur Untersuchung eines Einflusses auf die Proliferationsrate von Synovialfibroblasten und SAOS-Zellen in Anwesenheit der Beschichtungen wurde der CyQuant[®]-Assay verwendet. Zunächst wurden in jedes Well einer 48-Well Platte 40.000 SAOS-Zellen ausgesät und einen Tag kultiviert. Die Zellen wurden den verschiedenen Komponenten für die Beschichtungsmethode über einen Zeitraum von 24 Stunden ausgesetzt. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und die Platten bei -20 °C eingefroren. Für die Messung der Zellzahl wurde das CyQuant Cell Proliferation Assay Kit wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, verwendet.

Nach Messung der DNA-Menge der unterschiedlich behandelten Zellen ist in Abbildung 3.5 zu erkennen, dass nach 24 Stunden Stimulation mit 24 µg hBD-2 und mit 20 µg LL-32 keine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums stattfindet. Die Zugabe von AMPs hatte keine wesentlichen Auswirkungen auf die Proliferation der SAOS-Zellen. Für die Prüfung der für die Beschichtung relevanten Substanzen wurde in jeweils ein Well ein unbeschichtetes Deckglas zur Kontrolle, ein mit Ethylacetat, 20 µl PDLLA-Lösung, 20 µl PDLLA+hBD-2 und 20 µl PDLLA+LL-37 beschichtetes Deckglas gegeben. Auch die Zugabe der für die Beschichtung verwendeten Substanzen hatte keinen relevanten Einfluss auf das Zellwachstum. Die Ergebnisse zeigen, wie in der Abbildung 3.5 dargestellt, dass alle verwendeten Substanzen keine negativen Effekte auf die Zellproliferation ausüben und somit nicht zytotoxisch sind.

Um den Einfluss der Beschichtung auch über einen längeren Zeitraum zu bestimmen, wurden neben den humanen SAOS-Zellen humane Synovialfibroblasten der

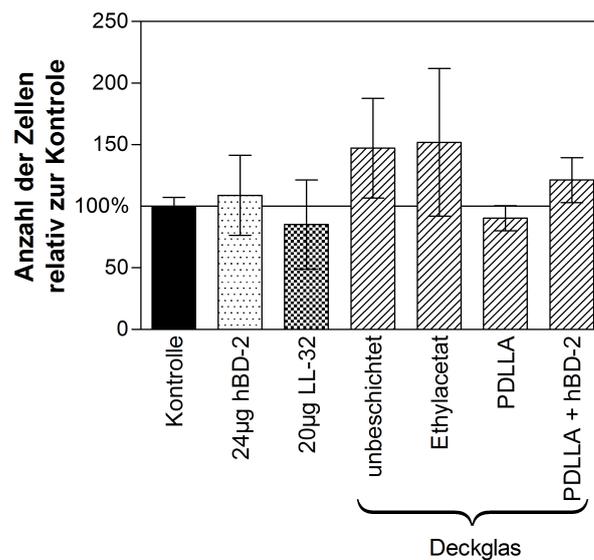


Abbildung 3.5: Einfluss der PDLLA-Beschichtung auf das Zellwachstum von SAOS-Zellen.

Die SAOS-Zellen wurden mit den einzelnen Komponenten und der fertigen Beschichtung 24 Stunden inkubiert. Dazu wurden 24 µg hBD-2, 20 µg LL-32 und jeweils ein Deckglas unbeschichtet, mit Ethylacetat, mit PDLLA und mit PDLLA + hBD-2 beschichtet zu den ausgesäten Zellen gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte über die Messung der DNA-Menge mittels CyQuant Assay. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert dieser Werte \pm SEM für $n=3$. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass sich die Zellzahlen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Zelllinie HSE verwendet. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden wurden folgende Substanzen zugegeben:

- Deckglas
- Deckglas beschichtet mit PDLLA-Lösung (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2)
- Deckglas beschichtet mit 13 µg hBD-2 in der PDLLA-Lösung
- Deckglas beschichtet mit 29 µg LL-32 in der PDLLA-Lösung

Die Auswertung erfolgte nach einem Tag bzw. nach drei Tagen durch Auszählung der Zellen im Haematozytometer (siehe Abschnitt 2.1.3). Auch nach drei Tagen ist bei den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle kein unterschiedliches Wachstum zu erkennen. Daher ist eine Beeinflussung des Zellwachstums durch das Lösungsmittel und das Polylaktid auszuschließen.

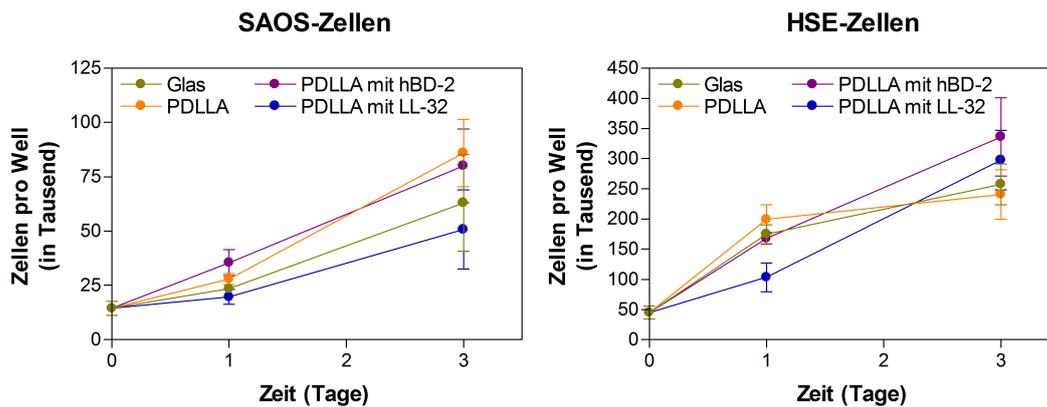


Abbildung 3.6: Proliferation von SAOS- und HSE-Zellen nach Zugabe von Reagenzien der PDLLA-Beschichtung. In die Vertiefungen von 24-Well Zellkulturplatten wurden humane SAOS-Zellen oder humane Synovialfibroblasten (HSE) ausgesät und mit unbeschichteten Deckgläschen oder mit PDLLA-Lösung allein, mit einer 13 μg hBD-2 bzw. 29 μg LL-32 enthaltenen PDLLA-Beschichtung inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Haematocytometer. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert dieser Werte \pm SEM für $n=4$. Die Zellzahlen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, damit zeigt sich kein Einfluss auf die Proliferation

3.2.4 Mikrobiologische Untersuchung der mit verschiedenen Wirkstoffen beladenen PDLLA-Beschichtung

Für die mikrobiologische Austestung wurden zunächst Kirschnerdrähte mit PDLLA und mit 10,7% bzw. 3,6% Vancomycin in PDLLA beschichtet. Zum Nachweis der antimikrobiellen Wirkung wurde der Radial-Diffusions-Hemmtest im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt. Die über Nacht bei 37 °C entstandenen trübungsfreien Hemmhöfe dienen als Indikator für die antimikrobielle Wirkung der aufgetragenen Substanzen. Ein Bild der Drähte nach der Bebrütung ist in Abbildung 3.7 zu sehen.

Die PDLLA-Beschichtung zeigt keine hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum (Abbildung 3.7 Bild (A) und (B)), werden aber 10 mg/mL Vancomycin in die Beschichtung eingearbeitet, so bilden sich ein deutlicher Hemmhof um das beschichtete Stäbchen. In Bild (C) ist zu erkennen, dass die Hemmhöfe eine unregelmäßige Begrenzung besitzen. Dies kommt durch ein ungleichmäßiges Auftragen der Beschichtungslösung auf den Draht zustande. Um dieses Problem zu umgehen und um eine Bestimmung des Hemmhofdurchmessers vornehmen zu können, wurde der Versuch mit beschichteten Deckgläschen wiederholt (siehe Abbildung 3.7 (B))

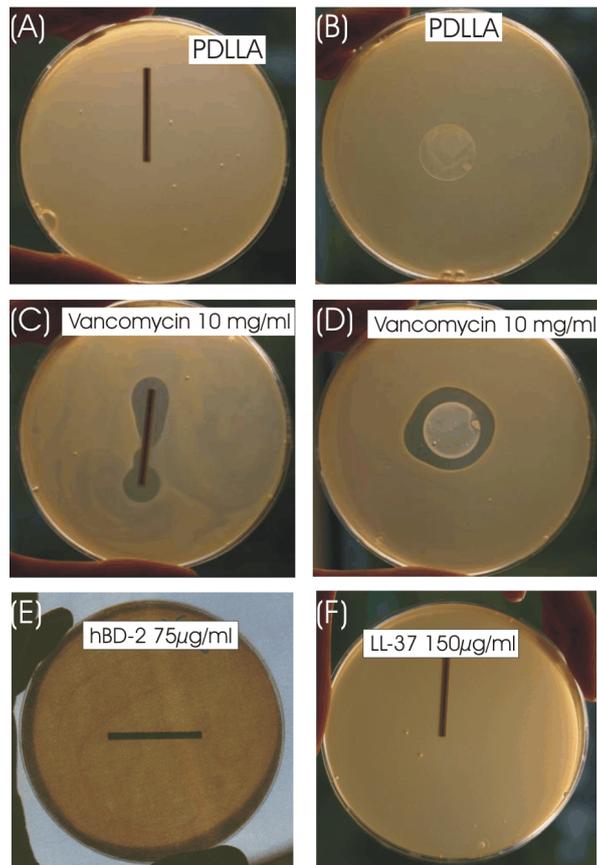


Abbildung 3.7: Bildung von Hemmhöfen durch abgegebene Wirkstoffe aus der PDLLA-Beschichtung. (A) Kirschnerdraht und (B) Deckglas mit PDLLA-Beschichtung als Negativkontrollen; (C) Kirschnerdraht und (D) Deckglas mit 10,7% Vancomycin in PDLLA; (E) Kirschnerdraht mit 0,06% hBD-2 und (F) Kirschnerdraht mit 0,12% LL-32 in PDLLA. Der Draht wurde in einen mit *St. aureus* (ATCC 6538) infizierten Müller Hinton-Agar (MH-Agar) eingegossen oder die Deckgläschen aufgelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

und (D)). Bei beschichteten Stäbchen, bei denen bis zu 75 µg hBD-2 integriert wurde (entspricht einer Beladung von 0,6% (w/w)), konnten keine Hemmhöfe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.7 (E)). Auch bei einer Beschichtung mit bis zu 150 µg (entsprechen 0,12%) LL-32 konnte weder bei beschichteten Stäbchen (F), noch bei beschichteten Deckgläschen (nicht gezeigt) eine Ausbildung von Hemmhöfen beobachtet werden.

Für eine antimikrobielle Aktivität sollte eine Konzentration von 2,5 µg AMP/ml ausreichend sein. Von der in die Beschichtung eingebrachten Menge an AMP wurde (wie in Abbildung 3.4 zu sehen) ein 30stel freigesetzt, was für eine antimikrobielle Aktivität nicht ausreichend ist. Daher soll herausgefunden werden, warum keine antimikrobielle Aktivität des LL-32 nachweisbar ist, obwohl eine ausreichende

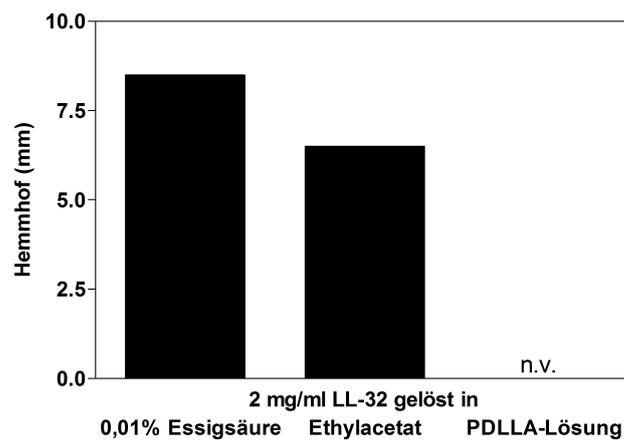


Abbildung 3.8: Hemmung der antimikrobiellen Aktivität von LL-32 durch die PDLLA-Lösung. 2 mg/mL LL-32 wurden in 0,01% Essigsäure, Ethylacetat sowie PDLLA-Lösung gelöst und in eine Vertiefung einer Agarplatte gegeben. Dargestellt ist der Hemmhofdurchmesser nach 24 Stunden Inkubation. n.v. = nicht vorhanden

Menge LL-32 in einer PDLLA-Lösung gelöst wurde. Dazu wurden jeweils 2 mg/mL LL-32 in 0,01% Essigsäure, Ethylacetat und PDLLA-Lösung gelöst. Diese Ansätze wurden in die Vertiefungen einer Agarplatte gegeben. Nach 24 Stunden Bebrütung wurden die Hemmhöfe ausgemessen. Die Ergebnisse sind in der Grafik 3.8 dargestellt. Der Radial-Diffusions-Hemmtest zeigt, dass die antimikrobielle Aktivität von LL-32 in Anwesenheit von Ethylacetat und insbesondere von Polylaktid-Lösungen gehemmt wird, und bestätigt das Ausbleiben einer antimikrobiellen Aktivität und damit das Fehlen eines Hemmhofes in Abbildung 3.7 (F).

3.3 Untersuchung eines Fibrinclots mit Fibrinogen als Carrier für kovalent gebundenes AMP

Nach dem Vorbild der natürlichen Blutgerinnung und in Anlehnung an den bereits in der Klinik eingesetzten Fibrinkleber sollte ein Fibrinclot als Träger für AMP eingesetzt werden. Bei dieser Methode wurde der antimikrobielle Wirkstoff an Fibrinogen gekoppelt. Mit Hilfe des Enzyms Thrombin entsteht aus diesem Fibrinogen ein Fibrinclot. Mit der physiologischen Auflösung des Fibrinclots durch das Enzym Plasmin werden ggf. auch die Wirkstoffe freigesetzt.

Um herauszufinden, ob die Kopplung verschiedener antimikrobieller Wirkstoffe an Fibrinogen erfolgreich war, wurden die gekoppelten Wirkstoffe mit speziellen Antikörpern nachgewiesen. Clots mit gekoppeltem AMP wurden hergestellt und die Freisetzung der Wirkstoffe aus dem Clot mittels ELISA untersucht. Eine mögliche toxische Wirkung auf humane SAOS-Zellen wurde mit Hilfe von Proliferationstesten (CyQuant[®]-Assay) bestimmt. Zum Nachweis der bakteriziden Eigenschaften wurden Radial-Diffusions-Hemmteste durchgeführt.

3.3.1 Aktivitätsbestimmung von Thrombin und Plasmin

Die Aktivität der eingesetzten Enzyme Thrombin und Plasmin ist von Bedeutung für die Herstellung und die spätere Auflösung des Gerinnsels. Zur Bestimmung der Aktivität wurde das Substrat N-(p-Tosyl)-Glycin-Prolin-Lysin-4-Nitroanilid verwendet. Bei der Spaltung dieses Substrats durch Thrombin oder Plasmin entsteht 4-Nitroanilin welches im Photometer bei einer Wellenlänge von 390nm detektiert werden kann. Die Bildung des 4-Nitroanilin wurde über eine Minute aufgezeichnet (siehe Abbildung 3.9). Über die Zunahme des chromogenen Produktes innerhalb einer bestimmten Zeit kann die Aktivität des Enzyms bestimmt werden. Dabei entspricht der Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute 1 U. Die Berechnung ergab für ein Milligramm Thrombin eine Enzymaktivität von 1,5 U und für ein Milligramm Plasmin eine Enzymaktivität von 13 U.

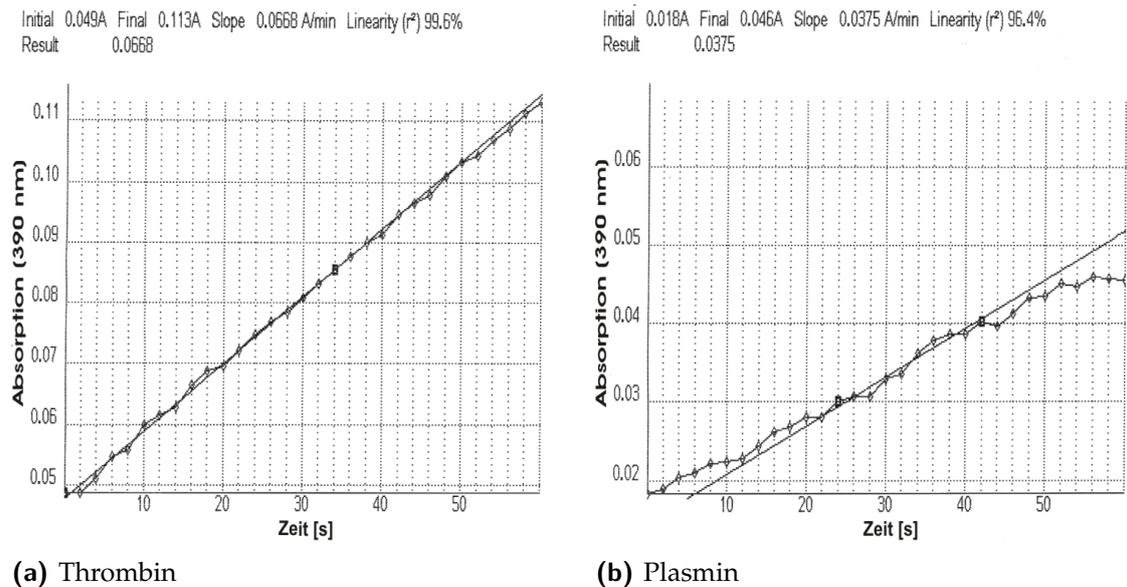


Abbildung 3.9: Bestimmung der Enzymaktivität von Plasmin und Thrombin. Bei der Spaltung des Substrates N-(p-Tosyl)-Glycin-Prolin-Lysin-4-Nitroanilid durch die Enzyme (a) Thrombin und (b) Plasmin entsteht eine chromogene Substanz (4-Nitroanilin), die im Photometer bei einer Wellenlänge von 390 nm detektiert werden kann. Die Absorption des Nitroanilins bei 390 nm wurde über die Zeit aufgetragen. Zu erkennen ist eine lineare Zunahme des Spaltproduktes.

3.3.2 Nachweis der Kopplung

Um diese neue Methode zu etablieren, wurde zunächst Vancomycin verwendet, welches für spätere Versuche eine Positivkontrolle darstellt. Anschließend wurden auch die AMP wie im Abschnitt 2.6 beschrieben an Fibrinogen gekoppelt. Nach Auftrennung des Fibrinogenkonjugats in einem SDS-Gel sind drei Proteinbanden entsprechend den Fibrinogenuntereinheiten zu erkennen. Mit Hilfe der Western-Blot Methode konnten die an Fibrinogen gekoppelten Wirkstoffe mit spezifischen Antikörpern dargestellt werden. Die Antikörper waren gegen den Wirkstoff gerichtet, das unkonjugierte Fibrinogen wurde von den Antikörpern nicht erkannt. Die Ergebnisse in Abbildung 3.10 zeigen, dass sich der gekoppelte Wirkstoff in den Fibrinogenbanden nachweisen lässt. Daraus lässt sich schließen, dass die Kopplung von Vancomycin, hBD-2 und LL-32 an Fibrinogen erfolgreich war.

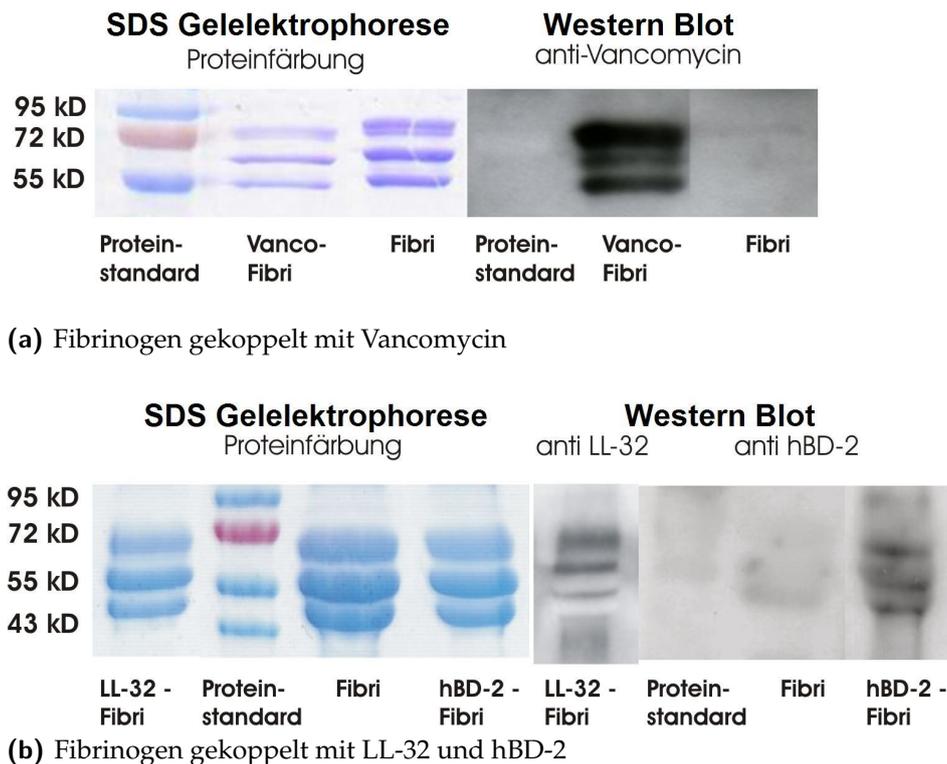


Abbildung 3.10: Nachweis der Wirkstoffkonjugation an Fibrinogen mit der Western-Blot Technik. Auf ein SDS Gel wurden neben einem Proteinstandard je 5 µg des Fibrinogens (Fibri) und des mit Wirkstoff gekoppelten Fibrinogens (Vanco-Fibri, hBD-2-Fibri) aufgetragen. Nach Färbung mit Coomassie Blue sind die Fibrinogenuntereinheiten als Banden sichtbar (linke Seite). Die Proteine wurden auf eine PVDF Membran geblottet und anschließend über einen spezifischen Antikörper (anti-Vancomycin oder anti-hBD-2) mittels Lumineszenz nachgewiesen (rechte Seite).

3.3.3 Herstellung von Fibrinclots

Zur Herstellung eines Clots werden zunächst alle Reagenzien auf 37 °C erwärmt. Durch Zugabe von Thrombin und Ca^{2+} zu 1 mg Fibrinogen entstand nach wenigen Sekunden eine trübe, gelartige Masse, die mit einer Nadel zu einem Clot aufgedreht werden konnte (siehe Abbildung 3.11 Reihe A). Wurde der Ansatz stattdessen auf einen Rüttler gestellt, so bildete sich eine trübe, feste Schicht aus (Reihe B). Testweise wurde zunächst mit unterschiedlichen Mengen Vancomycin gekoppeltes Fibrinogen zur Herstellung der Clots verwendet. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, unterscheiden sich die mit Vancomycin (1+1) gekoppelten Clots nicht von den ungekoppelten Fibrinclots (Kontrolle). Allerdings nehmen die Größe der Clots und die Festigkeit des Fibrinnetzes ab, je mehr Wirkstoff an das Fibrinogen gekoppelt wurde (10+1, 30+1, 60+1). Weiterhin wurde mit AMP gekoppeltes Fibrinogen zur

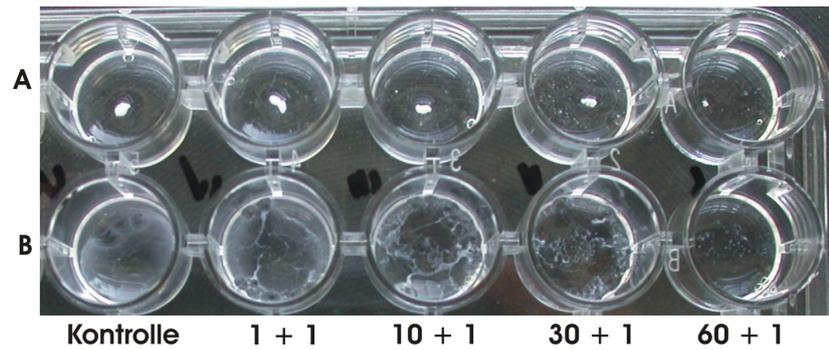


Abbildung 3.11: Darstellung von Clots. Vancomycin wurde in unterschiedlichen Verhältnissen an Fibrinogen gekoppelt und Clots aus 1 mg Fibrinogen (Kontrolle) sowie 1 mg mit Vancomycin gekoppelten Fibrinogen hergestellt. Die Gerinnsel wurden entweder mit einer Nadel zu einem Clot aufgedreht (Reihe A) oder auf einem Rüttler stehen gelassen (Reihe B). Die Kopplung von Vancomycin an Fibrinogen dient in diesem Test als Beispiel für gekoppelte Clots. Die Clots aus Fibrinogen mit gekoppeltem AMP unterscheiden sich nicht von den mit Vancomycin gekoppelten Clots. Allerdings wurden die mit LL-32 gekoppelten Clots nicht so fest.

Herstellung von Clots verwendet, die sich äußerlich nicht von den mit Vancomycin gekoppelten Clots unterschieden. Die mit LL-32 gekoppelten Clots wurden nicht so fest, wie die übrigen und zerfielen schneller in kleinere Partikel. Mit 60-90 sec. war die Gerinnungszeit (Thrombinzeit) für das gekoppelte Fibrinogen ein wenig verlängert.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass sich aus dem mit antimikrobiellen Wirkstoffen gekoppeltem Fibrinogen Clots herstellen lassen, die mit Clots aus ungekoppeltem Fibrinogen vergleichbar sind. Für die weiteren Versuche wurden Kopplungen maximal im Verhältnis 30+1 eingesetzt und aufgedrehte Clots verwendet, da diese sich besser in andere Gefäße überführen lassen als das Fibrinnetz.

3.3.4 Freisetzung von Vancomycin und AMP aus Fibrinclots

Dieser Abgabeversuch wurde durchgeführt, um die freigesetzte Menge von AMP aus den Clots zu bestimmen. Die antimikrobiellen Peptide wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils in einem Verhältnis von 1+1 und 10+1) an das Fibrinogen gekoppelt. Aus diesem gekoppelten Fibrinogen wurden zunächst wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben Clots hergestellt. Diese Clots wurden über mehrere Stunden bei 37 °C mit Plasmin inkubiert. Anschließend wurde die abgegebene Peptidmenge mit dem ELISA bestimmt.

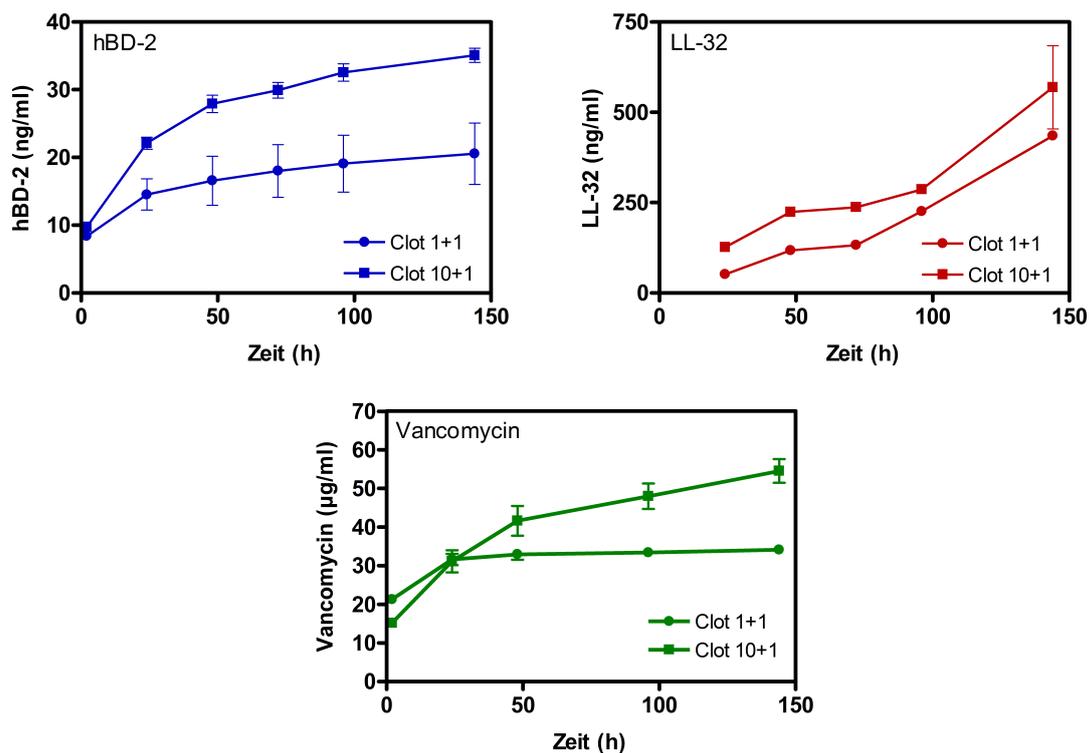


Abbildung 3.12: Freisetzung von immunreaktivem Vancomycin und AMP aus einem Fibrinclot. Aus konjugiertem Fibrinogen (hBD-2 oder LL-32 jeweils in einem Verhältnis von 1+1 und 10+1) wurden Clots hergestellt. Zur Freisetzung der Peptide wurden die Clots mit Plasmin bei 37 °C über mehrere Stunden inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 6, 24, 48, 72 Stunden, 4 und 6 Tagen mittels ELISA. Es ist zu erkennen, dass die Peptidfreisetzung von hBD-2 innerhalb der ersten 24 Stunden am größten ist und nach 6 Tagen 35 µg/ml betrug. Die Abgabemenge von LL-32 nimmt nach 4 Tagen zu und betrug nach 6 Tagen 800 ng/ml.

Die Freisetzung von AMP über die Zeit ist in der Abbildung 3.12 gezeigt. Die Daten des Freisetzungsvorganges für hBD-2 zeigen bis zu 24 Stunden eine starke Zunahme des Peptids im Medium. Danach vermindert sich die Freisetzung von hBD-2 aus dem Clot über die Zeit. Bei einem Kopplungsverhältnis von 10+1 beträgt die Abgabemenge nach 6 Tagen 35 µg/ml. Die Abgabekurve von Vancomycin sieht ähnlich aus, auch hier ist die freigesetzte Menge innerhalb der ersten 24 Stunden am größten. Für LL-32 zeigt sich nur eine schwache Zunahme des Peptids. Erst nach 72-96 Stunden nimmt die Abgabemenge über die Zeit zu. Für beide Peptide ist aus der Abgabekurve zu erkennen, dass über einen Zeitraum von sechs Tagen die Abgabemenge größer ist, je mehr AMP an Fibrinogen gekoppelt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Plasmin in der Lage ist die AMP aus den Clots

wieder freizusetzen.

3.3.5 Auswirkung eines AMP-Fibrinclots auf SAOS-Zellen

Proliferationsstudien mit CyQuant[®]-Assay

In diesem Versuch sollte eine mögliche toxische Eigenschaft der zur Herstellung eines Clots verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden. Zur Untersuchung eines Einflusses auf die Proliferationsrate von SAOS-Zellen in Anwesenheit von Fibrinclots wurde der CyQuant[®]-Assay verwendet. Zunächst wurden in jedes Well einer 48-Well Platte 40.000 SAOS-Zellen ausgesät und einen Tag kultiviert. Anschließend wurden die Zellen den verschiedenen Bestandteilen zur Herstellung eines Gerinnsels über einen Zeitraum von 24 Stunden ausgesetzt. Zusätzlich blieben Zellen als Negativkontrolle unbehandelt. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und die Platten bei -20 °C eingefroren. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde das CyQuant Cell Proliferation Assay Kit wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, verwendet.

In Abbildung 3.13 ist nach Messung der DNA-Menge zu erkennen, dass nach 24 Stunden Stimulation mit 24 µg hBD-2 und mit 20 µg LL-32 keine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums stattfindet.

Die Zugabe von AMPs hatte keine wesentlichen Auswirkungen auf die Proliferation der SAOS-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass alle verwendeten Substanzen keine negativen Effekte auf die Zellproliferation ausüben und somit nicht zytotoxisch sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Zellen gleich stark proliferierten. Somit hat die Zugabe von hBD-2, LL-32 oder des Clots keine wesentliche Auswirkungen auf die Proliferation der SAOS-Zellen. Auch die Zugabe der für die Herstellung eines Clots verwendeten Substanzen Fibrinogen, Thrombin und Plasmin hat keinen relevanten Einfluss auf das Zellwachstum.

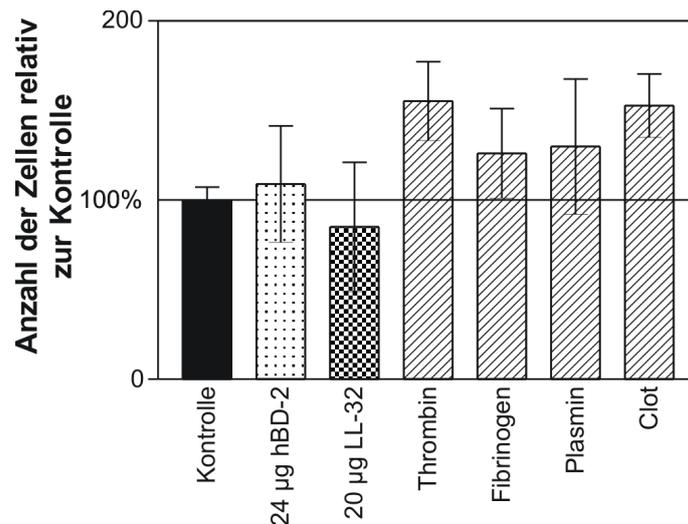


Abbildung 3.13: Einfluss eines Clots auf das Zellwachstum von SAOS-Zellen. Die zur Herstellung eines Clots benötigten Substanzen und ein fertiger Clot wurden 24 Stunden mit SAOS-Zellen inkubiert. Dazu wurden 24 µg hBD-2, 20 µg LL-32, Thrombin, Fibrinogen, Plasmin und ein ungekoppelter Clot zu den Zellen gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte über die Messung der DNA-Menge mittels CyQuant Assay. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert dieser Werte \pm SEM für $n=3$. Die Zellzahlen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

3.3.6 Mikrobiologische Untersuchungen der mit antimikrobiellen Wirkstoffen gekoppelten Clots

Für die mikrobiologische Austestung wurden zunächst Clots aus mit verschiedenen Wirkstoffen gekoppeltem Fibrinogen hergestellt. Die Durchführung der Radial-Diffusions-Hemmteste erfolgte im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. In die dort vorbereiteten Agarplatten wurden Vertiefungen eingestanzt, in die Substanzen zur Herstellung eines Fibringerinnsels sowohl einzeln und auch als Clot gegeben wurden. Die über Nacht bei 37 °C entstandenen trübungsfreien Hemmhöfe dienen als Indikator für die antimikrobielle Wirkung der aufgetragenen Substanzen.

Die Abbildung 3.14 zeigt ein Beispiel einer Agarplatte nach 24-stündiger Inkubation. In der Mitte der quadratischen Unterteilung ist das Stanzloch mit einem Durchmesser von 4mm zu erkennen. Überschreiten die Hemmhofdurchmesser eine Größe von ca. 16 mm sind sie von einem eventuell benachbarten Hemmhof nicht mehr klar zu unterscheiden, weshalb hier eine Obergrenze liegt. Die Auswertung der Hemmhofdurchmesser (siehe Abbildung 3.15, A) zeigt, dass sich beim Vorhandensein von 0,01% Essigsäure (Negativkontrolle), Thrombin und bis zu 130 µg Fibrinogen keine

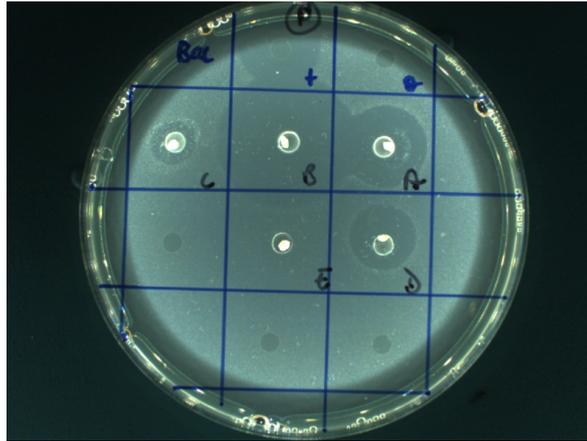


Abbildung 3.14: Radial-Diffusions-Hemmtest. Die Clots mit integriertem AMP wurden für 24 Stunden auf eine Vertiefung einer infizierten Agarplatte gelegt und bei 37°C inkubiert. Ein quadratisch markiertes Feld enthält ein Stanzloch mit einer Testsubstanz oder einem Clot. Ø) Wasser; +) 500 ng/mL Lysozym; Clots mit gekoppelten Wirkstoffen und Verhältnisangaben: A) Vancomycin 1+1, B) Vancomycin 10+1, C) hBD-2 1+1, D) hBD-2 10+1, E) LL-32 1+1

Hemmhöfe gebildet haben. Für 50 ng Vancomycin (Positivkontrolle) ist ein Hemmhof von 13 mm zu erkennen. Bei einer Kopplung von Vancomycin an Fibrinogen (im Verhältnis 1+1 und 10+1) sind 10 und 15 mm Durchmesser große Hemmhöfe entstanden. Die Versuche wurden 2-mal wiederholt. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis. Da die Hemmhöfe aufgrund der unterschiedlichen Clotgröße unterschiedlich ausfallen, ist die Berechnung einer Standardabweichung nicht sinnvoll. Die Hemmhofdurchmesser der mit AMP gekoppelten Clots sind in Abbildung 3.15, B dargestellt. Zum Vergleich wurde der Hemmhof von 12,4 µg hBD-2 mit 17 mm herangezogen (Positivkontrolle). Bei Clots, denen kein Plasmin zugegeben wurde, konnten keine Hemmhöfe nachgewiesen werden. Es bildeten sich lediglich kleine Beulen aus, die nicht eindeutig als Hemmhof identifiziert wurden. Bei Zugabe von Plasmin bilden die Clots mit gekoppelten hBD-2 (im Verhältnis 1+1, 10+1 und 30+1) einen genauso großen Hemmhof aus wie 12,4 µg hBD-2. Beim Clot mit gekoppelten LL-32 (im Verhältnis 10+1) konnte ein Hemmhofdurchmesser von 7 mm gemessen werden.

Mit Hilfe des Radial-Diffusions-Hemmtests konnten bei Thrombin und Plasmin keine Hemmhöfe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen daher, dass der aus den Clots freigesetzte Wirkstoff eine antimikrobielle Aktivität besitzt. Dabei erzeugten größere Mengen des antimikrobiellen Wirkstoffs auch größere Hemmhöfe.

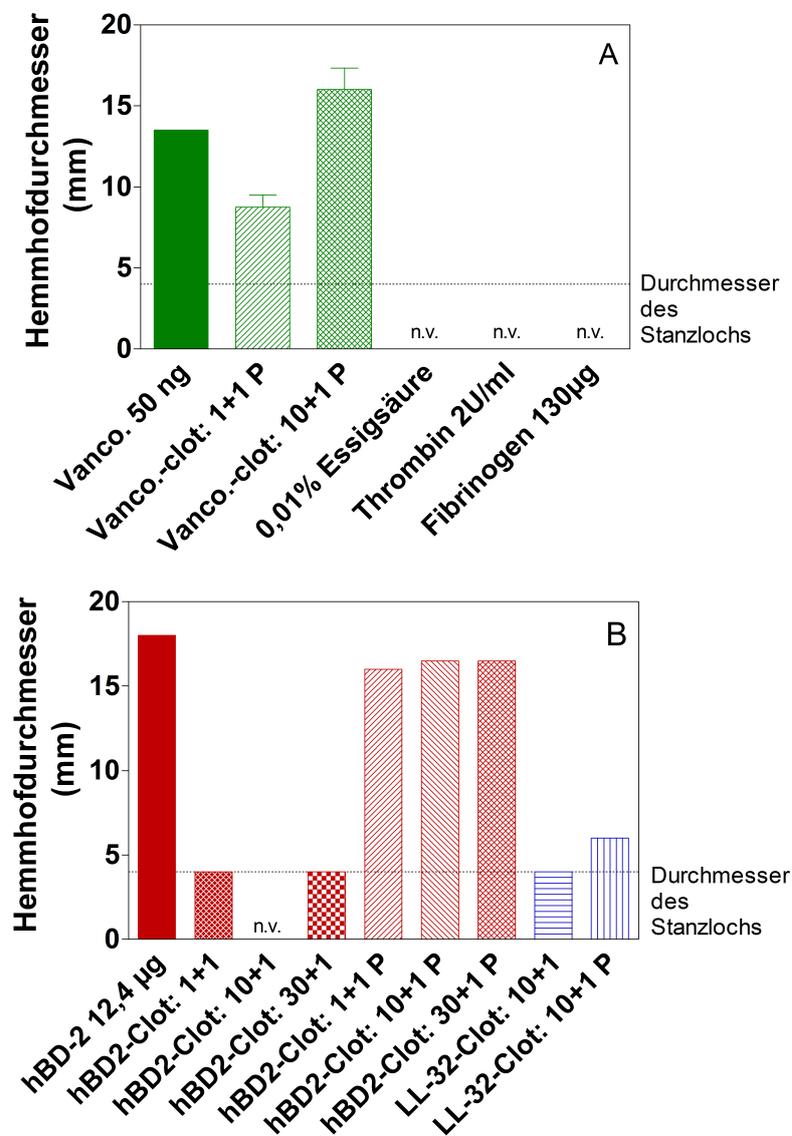


Abbildung 3.15: Grafische Darstellung der Hemmhöfe nach 24-stündiger Inkubation. P=Zugabe von Plasmin; Vanco.=Vancomycin; die Clots sind mit dem gekoppelten Wirkstoff benannt, dahinter steht jeweils das Kopplungsverhältnis. A) Die Negativkontrollen 0.01% Essigsäure, Thrombin und Fibrinogen zeigen keine Hemmhöfe. Die Hemmhofdurchmesser von 50 ng Vancomycin und von Clots mit gekoppeltem Vancomycin sind vergleichbar. B) Wird den Clots kein Plasmin zugegeben, bilden sich keine Hemmhöfe aus. Clots mit im Verhältnis 1+1, 10+1 und 30+1 gekoppeltem hBD-2 bilden bei Zugabe von Plasmin einen genauso großen Hemmhof aus wie 12,4 µg hBD-2. Typisches Ergebnis aus 2 Versuchen.

3.4 Untersuchung einer kovalenten Bindung antimikrobieller Peptide an Titan bzw. Edelstahl hinsichtlich seiner Wirksamkeit

Als weitere Methode sollten AMP kovalent und unter Beibehaltung antibiotischer Aktivität an Implantatoberflächen immobilisiert werden. Von der Aktivierung der Metalloberfläche hängt es ab, wieviel Linker und damit wieviel Wirkstoff gebunden wird. Zur Aktivierung der Metalloberfläche kam eine Behandlung der Stäbe mit einer Lösung aus H_2O_2 und H_2SO_4 (1:1) oder mit 30 % HNO_3 in betracht. Die durch das APTS entstandenen freien Aminogruppen wurden mit dem Reagenz Ninhydrin nachgewiesen. Dazu wurden die Stäbe in 2 mL einer vorbereiteten Ninhydrinlösung gelegt. Die Extinktion bei 570 nm wurde gemessen und anhand einer APTS-Standardlösung die freien Aminogruppen ermittelt. Es stellte sich heraus, dass eine Vorbehandlung mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:1) mehr NH_2 -Gruppen produzierte. Ebenso wurde für den APTS-Linker die optimalen Bedingungen von 2 % APTS in Aceton und eine Einwirkzeit von 3 h bei 80 °C ermittelt. Bei dieser Technik wurden keine Wirkstoffe abgegeben und daher auch keine Abgabekinetik gemessen. Die Detektion antimikrobieller Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Live/Dead Kits. Dazu wurden die Implantate mit gebundenem Wirkstoff 24 Stunden mit *E. coli DH5 α* inkubiert. Anschließend wurden die Stäbe mit 0,85 % NaCl gewaschen und mit der Färbelösung des Live/Dead Kits behandelt. Die Stäbe wurden erneut in 0,85 % NaCl gewaschen und die auf dem Implantat haftenden Bakterien unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und detektiert.

In der Abbildung Abbildung 3.16 ist jeweils ein typisches Bild des Nachweises von Bakterien mit dem Live/Dead Kit dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Bakterienlösung größere rote Farbpartikel enthält (A), während auf einem unbeschichteten Stab (B) überwiegend grün gefärbte (lebende) Bakterien zu erkennen sind. Wurde MEMO als Linker ohne Bakterienbehandlung unter dem Mikroskop betrachtet, so zeigt sich eine Autofluoreszenz (C). Der Einfluss der kovalent gebundenen Wirkstoffe auf das Bakterienwachstum für Kopplungen mit APTS als Linker zeigen die Bilder E+G, für Kopplungen mit MEMO als Linker ist in den Bildern F+H dargestellt.

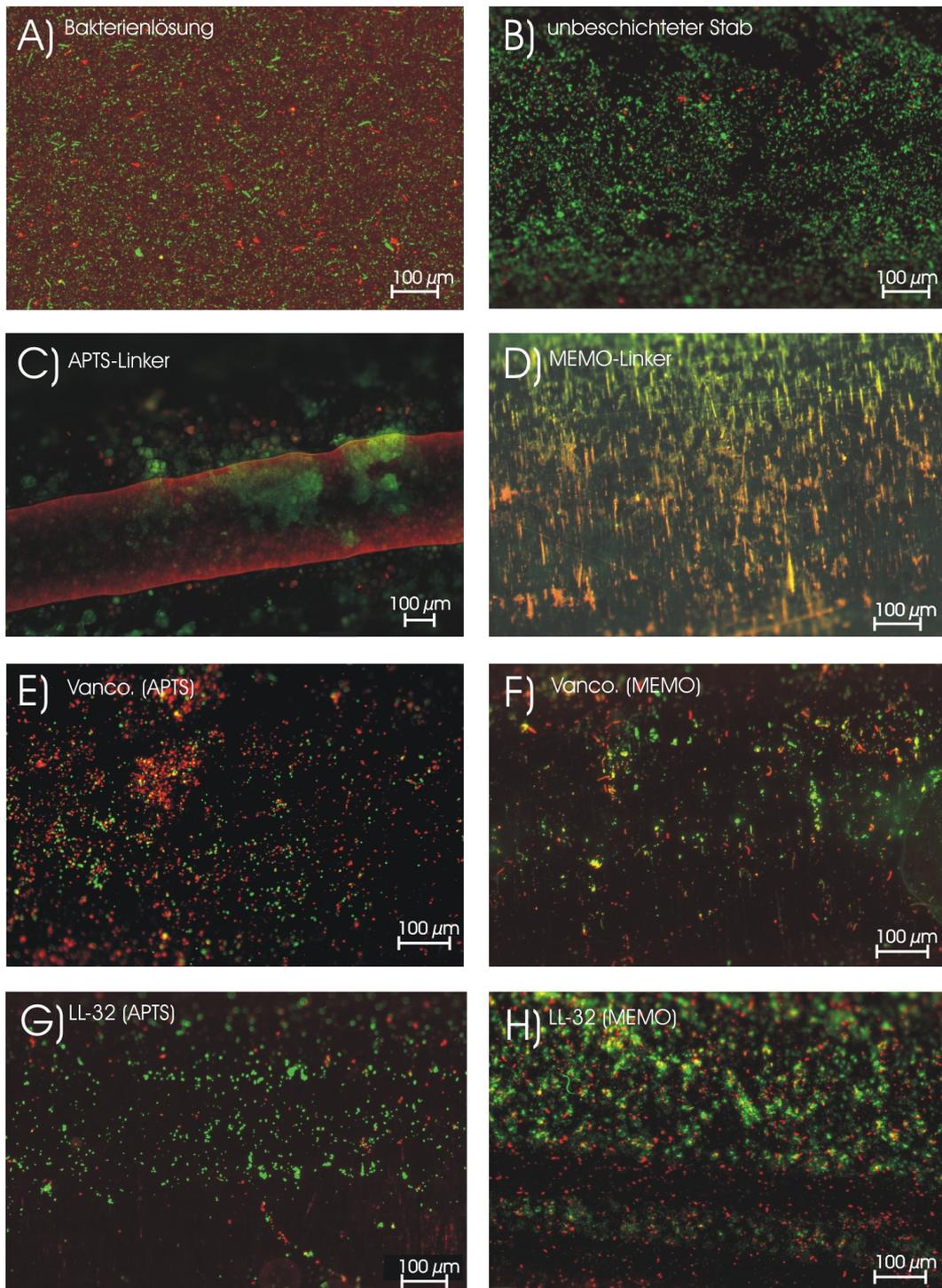


Abbildung 3.16: Nachweis von Bakterien mit dem Live/Dead Kit. Lebende Bakterien sind grün dargestellt, tote Bakterien rot. Die Bakterienlösung selbst (A) enthält größere rote Farbpartikel. Auf einem unbeschichteten Stab (B) sind nur wenige tote Bakterien zu erkennen. Der APTS-Linker (C) zeigt keine, der MEMO-Linker (D) eine starke Autofluoreszenz. Bei einer Kopplung von Vancomycin sind sowohl mit dem APTS- (E), als auch mit dem MEMO-Linker (F) vermehrt rot gefärbte Bakterien zu erkennen. Wird LL-32 über APTS (G) oder MEMO (H) angekoppelt, sind ebenfalls tote Bakterien zu erkennen.

Tabelle 3.1: Auswertung der Färbung mit dem LIVE/DEAD Kit. Aufgelistet ist die Ratio (das Verhältnis) der lebenden zu toten Bakterien auf Stäben mit kovalent gekoppelten Wirkstoffen.

Wirkstoff	Linker	Ratio
unbeschichteter Stab	—	13
Vanco	APTS	$\frac{1}{2}$
Vanco	MEMO	1
LL-32	APTS	5
LL-32	MEMO	1

Um die Wirkung des gekoppelten Wirkstoffs zu quantifizieren, wurde das Verhältnis von grünen zu roten Bakterien gebildet. Eine Auswertung erfolgte, indem in mehreren Gesichtsfeldern rote und grüne Bakterien gezählt wurden. Anschließend wurde das Verhältnis von grünen zu roten Bakterien ermittelt (Ratio). Dabei bedeutet eine Ratio größer eins, dass die grünen Bakterien, eine Ratio kleiner eins, dass die toten, rot gefärbten Bakterien überwiegen. In der Tabelle Tabelle 3.1 sind die zu den verschiedenen Wirkstoffen und Linkern gehörenden Ratio angegeben. Der unbehandelte Stab mit einer Ratio von $R_{unbehandelt}=13$ wurde als Bezug festgelegt. Aus der Tabelle ist zu erkennen, dass eine kovalente Bindung von Wirkstoff an einen Metallstab die Anzahl toter Bakterien erhöht. Im Vergleich zum unbehandelten Stab sind bei den mit Wirkstoff gekoppelten Stäben die Anzahl der toten Bakterien um mind. 150% gestiegen. Die Etablierung dieser Beschichtungstechnik wurde zunächst mit Vancomycin durchgeführt. Bei einer Kopplung von Vancomycin mit dem APTS-Linker überwog die Anzahl der toten Bakterien ($R_{Vanco/APTS}=0,5$; Abbildung 3.16 E). Bei Verwendung des MEMO-Linkers sind gleich viele rote und grüne Bakterien vorhanden ($R_{Vanco/MEMO}=1$; Abbildung 3.16 F). Wurde LL-32 angekoppelt, betrug die Ratio mit dem APTS-Linker $R_{LL-32/APTS}=5$ (Abbildung 3.16 G). Bei Verwendung des MEMO-Linkers entsprach die Ratio von gekoppelten LL-32 mit $R_{LL-32/MEMO}=1$ der von gekoppelten Vancomycin (Abbildung 3.16 H).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kovalente Kopplung von Wirkstoffen die Anzahl toter Bakterien im Vergleich zu einem unbehandelten Stab deutlich erhöht.

Diskussion

Die in Verbindung mit implantierten Materialien auftretenden Infektionen des Knochens stellen nicht nur ein medizinisches, sondern auch ein weitreichendes ökonomisches Problem dar. Die im Falle einer infizierten Hüftprothese auftretenden Komplikationen und die darauf folgenden Therapiemaßnahmen können die Behandlungskosten auf 400-600% der vorgesehenen Ausgaben ansteigen lassen [Jansen and Peters, 1993; Sugarman and Young, 1989]. Daher ist eine effektive Infektprophylaxe ein notwendiges Ziel zur Verhinderung bakterieller Knocheninfektionen. Bisher konnte trotz des routinemäßigen Einsatzes einer systemischen Antibiotikatherapie das Risiko einer Infektion beim künstlichen Hüftgelenkersatz nicht vollständig reduziert werden [Heck et al., 1995; Jackson and Schmalzried, 2000]. Die Verbindung von Osteosynthesematerialien mit einer antiinfektiven Beschichtung kann als innovative Maßnahme zur Vorbeugung von Infektionen angesehen werden. Die in dieser Arbeit entwickelten Verfahren sind als Präventivmethode gedacht, mit der die Infektionshäufigkeit drastisch reduziert werden soll. Nach der Adhäsion folgt die Ausbreitung der Mikroorganismen auf der Implantatoberfläche [Habash and Reid, 1999]. Werden die eingeschleppten Bakterien erst später durch eine systemische Antibiotikabehandlung getötet, können sich die toten Zellen und ihre Abbauprodukte ansammeln. Aufgrund dieser Mechanismen ist es wichtig frühzeitig zu handeln und die Implantate vor, während und in der ersten Zeit nach der Operation keimfrei zu halten.

Daher war es Ziel dieser Arbeit eine Biosubstanz zu entwickeln, die eine solche Adhäsion verhindert. Dabei wurden verschiedene Strategien gewählt (siehe Abbildung 4.1). Die AMP können zum einen kovalent an eine Metalloberfläche gebunden werden (a). Sie überziehen das gesamte Trägermaterial gleichmäßig und verhindern eine Bakterienbesiedelung. Hierbei sollten die Wirkstoffe langfristig an eine Oberfläche gebunden bleiben. Im Gegensatz zum ersten Verfahren gibt es auch die Möglichkeit Wirkstoffe in eine Beschichtung einzuarbeiten. Die Beschichtung dient hierbei als Depot für die AMP, aus der sie nach und nach herausgelöst werden.

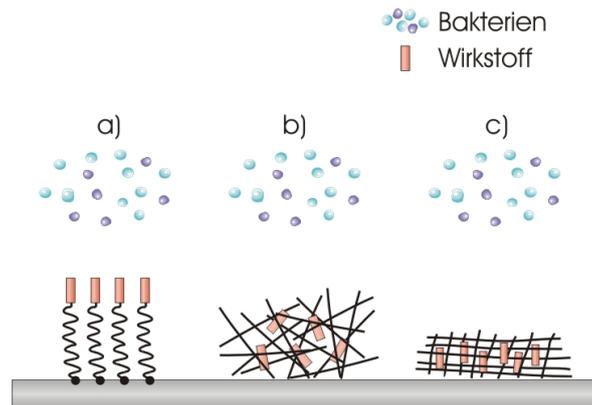


Abbildung 4.1: Wirkstoffe können auf verschiedene Weise an ein Trägermaterial gebunden werden. a) In einem Fibrinnetz eingeschlossener Wirkstoff durch Bindung an Fibrinogen, b) kovalente Bindung an das Trägermaterial über ein Linkermolekül, c) Einlagerung in ein Polypeptid

Bis heute wird an einer Verbesserung von *drug delivery* Systemen gearbeitet, wobei auch die Bekämpfung multiresistenter Keime eine Rolle spielt [Effenberger et al., 2008]. Daher wurde als zweites ein Verfahren gewählt, bei dem die AMP in eine biodegradierbare Beschichtung eingebracht werden (b). Im dritten Ansatz wurden die AMP zunächst kovalent an Fibrinogen gebunden. Dieses modifizierte Fibrinogen kann durch das Enzym Thrombin zur Gerinnung gebracht werden (c). Beim physiologischen Abbau des Fibrins durch Plasmin wurden die Wirkstoffe herausgeschnitten.

Beim Einsatz neuer Antibiotika im Knochen sind immer die schädlichen Effekte und die mechanischen Eigenschaften des Knochens zu berücksichtigen. [Baleani et al., 2008] daher wurden neben den Elutionsversuchen und mikrobiologischen Tests zusätzlich Zytotoxizitätsteste durchgeführt.

4.1 Stabilität und Wiederfindung der antimikrobiellen Peptide *in vitro*

In den letzten Jahren wurden zunehmend biologisch aktive Peptide und Proteine entdeckt, die ein interessantes therapeutisches Potential besitzen. Bisher haben es jedoch nur wenige geschafft in medizinische Anwendung zu kommen. Der Grund liegt in den Anforderungen an die Applikation. Die Wirkstoffe müssen während der Lagerung eine maximale Stabilität (*shelf life*) aufweisen und eine gute Freisetzung im Körper (*delivery*) gewährleisten. Ein großes Problem spielt hierbei die begrenzte chemische und physikalische Stabilität der Peptide. Viele therapeutisch interessante Substanzen besitzen *in vivo* extrem kurze Halbwertszeiten von wenigen Minuten. Die neu zu entwickelnde Applikationsform soll die chemische und physikalische Stabilität der Peptide und die biologische Aktivität nach der Applikation erhalten. Daher wurden zunächst die Stabilität und Wiederfindung verschiedener AMP in Medium mit verschiedenen Zusätzen geprüft. Dabei war zu beobachten, dass die Wiederfindung der Peptide sich verbesserte, wenn weitere Proteine (wie Albumin) vorhanden waren.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die antimikrobiellen Peptide über einen Zeitraum von 24 Stunden im Medium nahezu stabil waren. Im Serum nahm die Konzentration der antimikrobiellen Peptide über einen Zeitraum von 24 Stunden um annähernd 50% ab. Die schlechte Wiederfindung der Defensine lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die antimikrobiellen Peptide mit ihrer kationischen Ladung am Material der Untersuchungsgefäße hängen bleiben. Durch den Zusatz von BSA bzw. FKS wurden einige dieser Bindungen blockiert, so dass eine größere Menge der Defensine im Medium gemessen wurde. Die Wiederfindung konnte nochmals gesteigert werden, wenn das Medium vor der Probenahme mit 0,01% Essigsäure versetzt wurde, da sich durch den leicht sauren pH-Wert die Peptide besser lösen.

Im Serum war die Wiederfindung von hBD-2 gering und die Stabilität von hBD-3 nur mäßig. Auch die Konzentration von LL-37 im Serum nimmt ab, allerdings bleibt die zugegebene Menge (entspricht abzüglich Serumnormalwert) innerhalb von 24 Stunden stabil. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das zugegebene LL-37

eine weniger kationische Struktur besitzt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gemessene Stabilität der Defensine im Serum ausreicht, um das Implantat die ersten 24 Stunden nach OP zu schützen. Allerdings ist die mäßige Freisetzung bei der Einarbeitung dieser Wirkstoffe in die Beschichtung zu berücksichtigen. Einerseits muss, um eine Abgabe im Wirkungsbereich zu erhalten, eine entsprechende höhere Konzentration in die Beschichtung eingearbeitet werden. Andererseits können die in die Beschichtung integrierten AMP eine verlängerte Lebensdauer aufweisen, da sie durch die Beschichtung vor Abbau geschützt werden. Das Verhalten der Defensine am Wirkort *in vivo* bleibt zu untersuchen.

4.2 Kovalente Beschichtung auf Titan

Die Immobilisierung von Wirkstoffen ist ein neuer Ansatz, um Materialoberflächen mit antimikrobiellen Eigenschaften auszustatten. Das Ziel dieser Arbeit war es Biosubstanzen mit entsprechenden Eigenschaften zu entwickeln. Eine bakterizide Aktivität von kovalent an Biosubstanzoberflächen gebundenen Ammoniaksalzen wurde bereits beschrieben [Tiller et al., 2001]. Des Weiteren eignen sich solche Moleküle zur Immobilisierung, die mit der Bakterienmembran interagieren. Diese Peptid-Lipid Interaktionen können über die vorübergehende Bildung von Membran assoziierten Poren zu einer Membranpermeabilisierung und damit zu einer antimikrobiellen Aktivität führen. Die antimikrobiellen Peptide wirken auf diese Weise und sind daher ideale Kandidaten für eine kovalente Bindung an ein Metallimplantat. Dazu müssen die AMP unter Beibehaltung der antimikrobiellen Aktivität mittels kovalenter Bindung immobilisiert werden. Titan (Ti) wurde als Implantatmaterial gewählt, weil Methoden biologisch-aktive Moleküle mittels silanization an eine Titanoberfläche zu binden leicht verfügbar sind [Xiao et al., 1997; Rezania et al., 1999; Nanci et al., 1998].

Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine lokalen Wirkspiegel erzielt werden müssen. Daher kommt diese Methode mit einer sehr niedrigen Konzentration an Wirkstoff aus.

Um eine effektive antimikrobiellen Aktivität zu ermöglichen, muss der immobilisierte Wirkstoff zunächst an ein Spacermolekül konjugiert werden, um ein Eindrin-

gen der Peptidmoleküle in die Lipiddoppelschicht der Mikrobenmembran zu ermöglichen. Daher müssen die Spacer eine gewisse Mobilität und Länge aufweisen. Um ein Vermehren der Bakterien zu verhindern müssen die aufgebrachten Peptidmoleküle in die richtige Richtung orientiert sein. Die antimikrobiellen Peptide benötigen eine parallele Anordnung, um die Interaktionen der Peptidmoleküle untereinander sicherzustellen und die Bildung von Membranporen zu ermöglichen. Diese Annahmen wurden indirekt durch das Fehlen bakterizider Tätigkeit der immobilisierten LL-37 bestätigt.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Annahmen zu prüfen und zu erweitern. Gegebenenfalls ist die biomedizinische Anwendung dieser antibakteriellen Oberflächenänderung an einem breiteren Spektrum der pathogenen Mikroorganismen zu prüfen.

Neueste Untersuchungen [Sass et al., 2008] zeigen, dass die Membranintegrität bei hBD-3 Behandlung erhalten bleibt und das Membranpotential kaum beeinträchtigt wird. Allerdings wird die Nukleotid-, Protein- und Zellwandsynthese in wachsenden *St. aureus* komplett durch hBD-3 blockiert.

Daher ist anzunehmen, dass diese Art der Beschichtung nur eine Vermehrung der Bakterien verhindert, aber nicht die Besiedelung auf einem Implantat [Gabriel et al., 2006].

4.3 PDLLA

Das in dieser Studie verwendete Material besteht aus reinem Poly-D,L-Laktid. Beschichtungen aus diesem Polymer zeigen eine gute Resorbierbarkeit und eine hohe mechanische Stabilität auf metallischen Implantaten [Schmidmaier et al., 2001b; Gollwitzer et al., 2003]. Aus der Literatur ist nicht ersichtlich, ob das Degradationsverhalten von biodegradierbaren Implantaten ausschließlich auf hydrolytischen Mechanismen basiert, oder ob auch enzymatische Vorgänge bei diesem Prozess eine Rolle spielen. Es hat sich in einer in-vitro-Studie gezeigt, dass bei bakterieller Inokulation von PLA-Implantaten keine Rückschlüsse auf einen beschleunigten, bakteriell bedingten, enzymatischen Abbau gezogen werden konnten [Hofmann et al., 1990]. Des Weiteren konnten auch knochenheilungsfördernde Effekte der Poly-D,L-Laktid-Beschichtung nachgewiesen werden [Schmidmaier et al., 2001a; Gollwitzer et al., 2003]. Das Ziel der Untersuchungen sollte die Beurteilung des Elutionsvermögens antimikrobieller Peptide und die zytotoxische Wirkung dieses Beschichtungssystems sein.

Neben den chemischen Eigenschaften von Polymer und Wirkstoff bestimmen Wirkstoffkonzentration und Partikelgröße die Freisetzungskinetik [Langer, 1995]. Die Struktur der Beschichtung und somit auch die Art der Wirkstoffabgabe werden bestimmt vom Verhältnis des Lösungsmittels zu PDLLA aber auch von der Menge an zugesetztem Wirkstoff. Weiterhin hat auch die Löslichkeit einen Einfluss auf die Wirkstoffabgabe, denn der Wirkstoff kann als Suspension vorliegen oder sich in dem Ethylacetat lösen. Liegt er als Suspension vor, sind in dem Polymergerüst größere Poren enthalten, so dass der Wirkstoff schneller herausdiffundieren kann. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Löslichkeit von AMP in verschiedenen Lösungsmitteln (Abschnitt 3.2.1) und das trübe Erscheinungsbild der Beschichtungslösung deuten darauf hin, dass die Defensine als Suspension im Ethylacetat vorliegen. Der Verlust der AMP könnte schon im ersten Schritt, bei dem die AMP in den verschiedenen Lösungsmitteln gelöst wurden, erfolgt sein. aufgrund ihrer Ladung könnten die AMP an der Glasoberfläche hängen bleiben und damit beim Transfer in das neue Gefäß verloren gehen. Auch in dem zweiten Gefäß könnte sich erneut ein gewisser Anteil an die Glasfläche anlagern und so die letztendlich gemessene Konzentration mindern.

Bei der Freisetzung von Peptiden spielt zunächst die Wirkstoff- und Wasserdiffusion eine Rolle. Bei dem *initial burst*-Effekt werden die auf oder in der Nähe der Oberfläche lokalisierten Wirkstoffmoleküle freigesetzt. In der darauf folgenden Zeitperiode wird aufgrund der schlechten Diffusionsmöglichkeit des Wirkstoffs durch die PDLLA Matrix nur sehr wenig Wirkstoff abgegeben. Erst mit einsetzender Polymererosion wird die Freisetzung durch die sich ausbildenden Porenvolumina wieder beschleunigt. Dabei spielt die Beschichtungsdicke bei der Pharmakokinetik eine untergeordnete Rolle.

Dieses spiegelt sich auch in der gemessenen Freisetzungskinetik der antimikrobiellen Peptide wieder. Die Daten des Elutionsversuches in Abbildung 3.4 zeigen eine anfänglich starke Zunahme von PDLLA im Medium bis zu einem Zeitpunkt von 12 Stunden, die dem *initial burst* entsprechen. Danach vermindert sich die Abgabe von hBD-2 aus der Beschichtung über die Zeit. Durch den anfänglichen Peak innerhalb der ersten Stunde entsteht bereits kurze Zeit nach der Implantation ein lokal wirksamer Antibiotikaspiegel, der der Bakterienbesiedelung entgegenwirkt. Das nach der Operation geschwächte Immunsystem kann so unterstützt werden. Die Vermehrung mit dem Implantat eingeschleppter Erreger wird verhindert. Eine weitere Freisetzung in den darauf folgenden Tagen erfolgt durch Diffusion der Partikel aus tieferen Schichten.

Allerdings dauert ein Abbau *in vivo* länger als *in vitro*. Dies lässt sich durch eine höhere Verfügbarkeit von Wasser *in vitro* und der Bildung einer Pseudokapsel *in vivo* erklären.

Einen Einfluss oder toxische Wirkung auf das Wachstum von humanen SAOS-Zellen konnte durch den Einsatz von Proliferationstesten nicht nachgewiesen werden. In der Literatur sind Untersuchungen von Biokompatibilität und Gewebereaktionen beschichteter Implantate bei verschiedenen Spezies mehrfach beschrieben. Abgesehen von leichten, reversiblen Entzündungen sind als direkte Reaktion auf Polylaktide, eine ungestörte Knochenheilung sowie reduzierte Kallusformationen nach elf Wochen zu beobachten [Leenslag et al., 1987b,a]. Die akute Toxizität der durch den Abbau der Implantatbeschichtung entstehenden Monomere im Körper ist als gering einzuschätzen. Langzeiteffekte oder chronischen Gewebeveränderungen treten nicht auf. Auch über einen längeren Zeitraum von einem Jahr konnte bestätigt werden, dass der Einsatz von Polylaktiden als resorbierbare Implantate

keine Knochenresorption in der Implantat-Umgebung hervorgerufen hat. Es wurde lediglich neuer Knochen um die Implantate gebildet.

Als resorbierbare Beschichtung von implantierten Schrauben scheinen die Polymere vermutlich keinen bakteriostatischen oder bakteriziden Einfluss auf eine schon bestehende Infektion zu haben [Mainil-Varlet et al., 2001]. Dies stimmt mit den in (Abschnitt 3.2.4) gefundenen Ergebnissen überein. Weiterhin konnte mit Hilfe des Radial-Diffusions-Hemmtests (Abschnitt 3.2.4) gezeigt werden, dass schon Ethylacetat die Defensinwirkung hemmt und dass mit dem Polylaktid keinerlei Wirkung mehr feststellbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass von dem im PDLLA eingelagerten LL-32 keine Diffusion in den Agar stattfindet. Oder dass, wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, durch hydrolytische Abspaltung von Polymerseitenketten, geladene Gruppen entstehen, die das ebenfalls geladene LL-32 binden und dadurch vollständig inhibieren.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zur Integration von AMP in eine PDLLA-Beschichtung lassen darauf schließen, dass die Stabilität der Peptide in der PDLLA-Beschichtung nicht gegeben ist. Ein Problem hierbei könnte die Denaturierung sein, in deren Folge die Tertiärstruktur verloren geht und die Moleküle aggregieren. Abschließend lässt sich sagen, dass das Verfahren zur Einbettung der Wirkstoffe sich als problematisch erwies, da die Aktivität der kationischen Peptide durch die Beschichtungslösung (PDLLA) inaktiviert wurde.

Die Suche nach einer geeigneten Form für lokale Applikation von antimikrobiellen Peptiden gestaltet sich schwierig. Die besprochene Technik der PDLLA-Beschichtung scheint aufgrund der Verwendung von organischem Lösungsmittel und der damit verbundenen Denaturierung der Peptide keine geeignete Grundlage zu sein. Außerdem werden beim Abbau des Polymers saure Oligo- und Monomere freigesetzt, so dass die Wirkstoffe mit zunehmendem Polymerabbau andere Bedingungen vorfinden und dadurch deren Wirksamkeit beeinträchtigt wird. Es wurde beschrieben, dass eine partielle Hydratation eines *delivery* Systems auf Basis eines hydrophoben Polymers zu einer irreversiblen Aggregation der darin enthaltenen Wirkstoffe führen kann [Costantino et al., 1994]. Zusätzlich wird das PDLLA offenbar für eine antimikrobielle Wirkung zu langsam abgebaut. Daher wurde im nächsten Ansatz ein *delivery* System verwendet, das den Eigenschaften des Peptids besser gewachsen ist. Dazu wurde das natürliche Polymer Fibrin als Trägermaterial

gewählt, das enzymatisch schneller abgebaut wird.

4.4 An Fibrinogen gebundene AMP

Fibrin, ist ein natürliches Biomaterial, das innerhalb von 2 bis 4 Wochen vollständig resorbiert wird. Dieses Polymer weist große wässrige Poren auf, die eine schnelle diffusionskontrollierte Freisetzung von Peptiden ermöglicht. In der Literatur sind Studien beschrieben, in denen Cafotaxime zum Fibrinkleber gemischt wurden und bei Patienten mit Osteitis in eine infizierte Knochenhöhle gegeben wurden. Die Messung der Antibiotika-Konzentration in Blut und Wunddrainage ergab geringe Serumlevel nach 12 Stunden, aber hohe Konzentrationen in der Drainageflüssigkeit über die nächsten 3 Tage [Zilch and Lambiris, 1986]. Noch ist keine Standardmethode entwickelt worden, wie das Antibiotikum dem Fibrinkleber zugegeben wird. Daher wurden die Peptide in diesem Ansatz kovalent an das Fibrinogen gebunden. Die erfolgreiche Kopplung von Wirkstoffen an Fibrinogen konnte mit der Western-Blot-Technik nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.10).

Die verschiedenen Wege der Fibrinkleber-Herstellung haben einen Einfluss auf die Festigkeit des Clots und damit auch auf die Abgabe der Antibiotika. Nach Zugabe der Antibiotika Cefotaxim und Mezlocillin [Greco et al., 1991] konnte keine Clotbildung beobachtet werden, die Zugabe von Gentamicin und Neomycin verzögerte die Clotbildung. Normalerweise beträgt die Zeit bis zur Ausbildung von Fibrinfäden (Thrombinzeit) 10-15 Sekunden und ist abhängig von der verwendeten Thrombinkonzentration. Für das gekoppelte Fibrinogen war die Zeit bis zur Clotbildung mit 30-45 Sekunden leicht verlängert, dennoch war eine Herstellung von Clots möglich. Die aus den Clots herausgelösten Wirkstoffe zeigten keine antimikrobielle Aktivität. Möglicherweise wurde durch die Kopplung an Fibrinogen die Bindung der AMP an die Bakterienmembran verhindert. So wurde beispielsweise der Verlust der Bindungsaktivität von Antikörpern und deren Fragmenten nach Kopplung an PEG beschrieben [Kitamura et al., 1991; Pedley et al., 1994].

Fibrin besitzt nicht nur eine Bindungsstelle für Plasmin, sondern auch für weitere Proteine. Dazu gehören Proteine, die an der Regulation der Fibrinolyse beteiligt sind wie

- Leukozyten Integrine (Mac-1), die Monozyten und Leukozyten stimulieren und daher wichtig sind für die Immunantwort,
- Fibronectin, das wichtig ist für die Anbindung von Fibrinogen und Fibrinmolekülen in die extrazelluläre Matrix,
- „*Fibroblast growth factor-2*“ (FGF-2, bFGF) und „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), die eine Proliferation von Endothelzellen fördern.

Dadurch, dass Fibrinogen und Fibrin auch eine Rolle bei der Immunantwort besitzen unterstützen die antimikrobiellen Clots zusätzlich eine Heilung des umliegenden Gewebes. Auch die Aktivierung der extrazellulären Matrix und die Stimulation der Kapillarneubildung wird zusätzlich einen positiven Effekt auf die Proliferation von Knorpel und Knochenzellen haben und damit auf das Anwachsen auf dem Implantat.

Ausblick

In Zukunft werden Biomaterialien weiter entwickelt, wobei die Resorbierbarkeit und Bioaktivität im Vordergrund steht. Das Ziel ist, Materialien zu entwickeln, die dem Körper helfen, sich selbst zu heilen (Hench u. Polak, 2002; Claes u. Ignatius, 2002). Dies können beispielsweise Beschichtungen auf einem Implantat sein, welches antimikrobielle oder osteointegrative Eigenschaften besitzt. Auch die Beschichtung selbst kann aus körpereigenen Substanzen oder deren Imitate (z.B. Polylactide, Fibrinogen) bestehen (Koskikare et al., 1998; Nordstrom et al., 1998; Paivarinta et al., 1993; Schmidmaier et al., 2001; Lind et al., 1999; Anderson et al., 1997; Ignatius et al., 2001; Moroni et al., 1998) und so die allgemein Fremdkörperreaktionen reduzieren.

Fibrinkleber werden in Deutschland zum Verschluss von Wundrändern und verletztem Gewebe, anstelle einer klassischen chirurgischen Naht, und zur Blutstillung eingesetzt. Zur Verbesserung des Behandlungserfolges der herkömmlichen Methoden, wird die Anwendung von Fibrinklebern auf immer wieder neuen Gebieten erprobt.

Eine weitere Herausforderung ist es den Einsatz von Antibiotika zu verringern. Beim Einsatz von AMP ist darauf zu achten, dass die verschiedenen Bakterien unterschiedlich auf AMP ansprechen. Bei einem profilaktischen Einsatz könnte dies dadurch umgangen werden, indem verschiedenartige Wirksubstanzen zusammengebracht werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Beschichtung mit Induktoren der antimikrobiellen Peptide, um die Komplikationen, die sich aus der Struktur ergeben (Ladung) zu umgehen. Als Induktoren kommen Cytokine, wie Interleukin (Il)-1 α , Il-1 β , Il-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interferon- γ in betracht [Harder et al., 2000].

Es gibt bereits Studien, die eine therapeutische Nutzbarkeit antimikrobieller Peptide untersuchen (Informationen auf den Internetseiten: www.mbiotech.com, www.intrabiotics.com, www.xoma.com, www.magain.com/home.htm.) So zeigt

das ein künstlich generierte antimikrobielle Peptid MBI-226, eine effektive Reduzierung der kutanen Besiedlung durch *Candida albicans* und verschiedene Erreger katheter-assozierter Infektionen (Hancock und Patrzykat, 2002; Sader et al., 2004). Weitere Studien untersuchen die Anwendung bei Pneumonien (Steinberg, 1997), septischen Schock (Kirikae et al., 1998) und oraler Mukositis (Loury et al., 1999). Neben der synthetischen Herstellung antimikrobieller Peptide werden auch die Möglichkeiten gentherapeutischen Vorgehens diskutiert und experimentell erprobt. So gelang in einem Mausmodell mit hBD-2 transfizierten Tumorzellen die Induktion einer bakteriozid wirksamen Konzentration dieses antimikrobiell wirksamen Defensins (Huang et al., 2002). Auch bei der Herstellung künstlicher Hauttransplantate zur Versorgung von Brandwunden werden überexpressierende Zellen als Schutz vor Infektionen und resultierenden Transplantatversagen erprobt (Carretero et al., 2004).

Gegen AMP sind bisher wenige Resistenzen beschrieben worden. Dabei handelt es sich um Bakterien, die AMP proteolytisch spalten können, (wie *St.aureus*), AMP-bindende Moleküle besitzen, (wie *E.coli*) oder die elektrostatischen Eigenschaften der bakteriellen Zelloberfläche verändert haben [Kraus and Peschel, 2006].

Eine antibiotische Prophylaxe soll eine ausreichend hohe lokale Gewebekonzentration eines Antibiotikums erreichen. Die Abgabe des Antibiotikums sollte schnell erfolgen und die Nebenwirkungen möglichst vermieden werden. Dabei ist insbesondere der Bereich um das Implantat betroffen, da hier durch das Trauma und die Anwesenheit eines Fremdmaterials das Immunsystem geschwächt wird, indem die Funktion und Proliferation von Abwehrzellen gehemmt wird [Wang et al., 1996b,a].

Zusammenfassung

Pro Jahr werden in Deutschland 350.000 Hüft- und Knieimplantate eingesetzt. Eine Komplikation, die im Zusammenhang mit diesen implantierten Materialien auftritt, ist die Knocheninfektion (Osteitis). Eine solche Infektion ist mit systemischer Antibiotikatherapie schlecht zu behandeln, da Bakterien in der Lage sind einen Biofilm auszubilden, der vor dem Antibiotikaangriff schützt. 1,9% der eingesetzten Implantate müssen sogar reoperiert werden. Bei ca. 25.000 € pro Implantat entstehen so erhebliche Kosten. Oberstes Ziel zur Verhinderung bakterieller Knocheninfektionen ist eine effektive Infektprophylaxe, die die Anheftung der Bakterien schon im frühen und entscheidenden Stadium des Infektionsprozesses blockiert. Eine wirkungsvolle Möglichkeit ist die Implantatoberfläche antiinfektiv zu gestalten. Die besorgniserregende Zunahme der antibiotikaresistenten Bakterien macht die Suche nach neuen Möglichkeiten, Infektion zu verhindern nötig. Die Aufgabe dieser Arbeit war es eine Beschichtung oder Biosubstanz zu entwickeln, die eine Kolonisation des Implantats verhindert.

In der vorliegenden Studie sollen verschiedene Beschichtungen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Verhinderung bakterieller Knocheninfektionen untersucht werden. Es stehen Implantate aus medizinischem Stahl zur Verfügung. Als antimikrobielle Wirkstoffe (AMP) wurden zwei verschiedene Defensine und das Cathelizidin LL-37 verwendet. Hierbei handelt es sich um körpereigene Antibiotika, die antimikrobiellen Peptide. Der Vorteil solcher Peptide liegt darin, dass sie als körpereigene Substanzen keine Nebenwirkungen verursachen und bisher sind kaum Resistenzen bekannt. Zum Aufbringen dieser Peptide auf das Implantat kommen verschiedene Methoden in Frage. Bei einer Beschichtung mit einem resorbierbaren Arzneistoffträger auf der Basis von Polymilchsäure (Resomer R203®) wurden die AMP und Vancomycin in dieses Polylaktid (PDLLA)-Gerüst eingelagert und auf Metallstäbchen

aufgebracht. Versuche zur Elution zeigten, dass innerhalb der ersten 12 Stunden am meisten Defensin freigesetzt wurde und sich danach die Abgabemenge verringert. Beim Nachweis der bakteriziden Eigenschaften der Beschichtung bildete sich in der mikrobiologischen Untersuchung ein Bakterienhemmhof bei einer Beschichtung mit integriertem Vancomycin.

Eine weitere Möglichkeit AMP aufzubringen basiert auf der Grundlage des menschlichen Gerinnungssystems. Nach der erfolgreichen Kopplung von AMP an Fibrinogen wurde dies mit Hilfe des Enzyms Thrombin zur Gerinnung gebracht. Zur Freisetzung der Wirkstoffe wurden die Gerinnsel mit dem Enzym Plasmin inkubiert. Dadurch löste sich das Gerinnsel auf und es konnte eine stetig wachsende Abgabe von Vancomycin, hBD-2 und LL-37 mit bakterizider Wirkung nachgewiesen werden.

Ein grundlegend verschiedener Ansatz Wirkstoffe auf eine Metalloberfläche zu bringen, wurde mit der kovalenten Beschichtung verfolgt. Hierbei werden die Wirkstoffe über Spacermoleküle auf der Metalloberfläche immobilisiert. Bei dieser Technik erfolgt keine Abgabe der Wirkstoffe. Der bakterizide Einfluss der an der Oberfläche gebundenen Wirkstoffe wurde mikrobiologisch untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle drei Beschichtungstechniken in der Lage waren ein Bakterienwachstum zu hemmen. Im Zusammenhang mit AMP ist sowohl die Beschichtung mit Fibrinogen, als auch die kovalente Beschichtung am besten geeignet. Da durch die Alterung der Gesellschaft der Einsatz von Prothesen zunehmen wird, ist es sinnvoll den Ansatz der Implantatbeschichtung weiter zu verfolgen.

Literaturverzeichnis

- B. Agerberth, J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96:3086–3093, 2000.
- M. Ahmad, M. Piludu, F. G. Oppenheim, E. J. Helmerhorst, and A. R. Hand. Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands. *J Histochem Cytochem*, 52:361–370, 2004.
- L. Ahnfelt, P. Herberts, H. Malchau, and G. B. J. Andersson. Prognosis of total hip-replacement - A Swedish multicenter study of 4,664 revisions. *Acta Orthop Scand Suppl.*, 238:1–26, 1990.
- D. Andreu and L. Rivas. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 47:415–433, 1998.
- R. B. Arrighi, C. Nakamura, J. Miyake, H. Hurd, and J. G. Burgess. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malaras. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:2104–2110, 2002.
- K. A. Athanasiou, C. M. Agrawal, F. A. Barber, and S. S. Burkhart. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthroscopy*, 14:726–737, 1998.
- M. Baleani, C. Persson, C. Zolezzi, A. Andollina, A. M. Borrelli, and D. Tigani. Biological and biomechanical effects of Vancomycin and Meropenem in acrylic bone cement. *J Arthroplasty*, 23:1232–1238, 2008.
- R. Bals, X. R. Wang, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 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, 1998.
- T. W. Bauer and J. Schils. The pathology of total joint arthroplasty - II. mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol*, 28:483–497, 1999.
- W. R. Bellamy, H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita. Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. *J Appl Bacteriol*, 75:478–484, 1993.

- P. L. Bencini, M. Galimberti, M. Signorini, and C. Crosti. Antibiotic-prophylaxis of wound infections in skin surgery. *Arch Dermatol*, 127:1357–1360, 1991.
- K. W. Bensch, M. Raida, H. J. Magert, P. Schulz-Knappe, and W. G. Forssmann. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*, 368:331–335, 1995.
- S. K. Bhatia, L. C. Shriverlake, K. J. Prior, J. H. Georger, J. M. Calvert, R. Bredehorst, and F. S. Ligler. Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces. *Anal Biochem*, 178:408–413, 1989.
- D. M. Bowdish and R. E. Hancock. Anti-endotoxin properties of cationic host defence peptides and proteins. *J Endotoxin Res*, 11:230–236, 2005.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- K. A. Brogden. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3:238–250, 2005.
- C. C. Chang and K. Merritt. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. *J Orthop Res*, 12:526–531, 1994.
- J. Charnley. Postoperative infection after total hip replacement with special reference to air contamination in operating room. *Clin Orthop Relat Res*, 87:167–187, 1972.
- J. Charnley and N. Eftekhari. Postoperative infection in total prosthetic replacement arthroplasty of hip-joint. With special reference to bacterial content of air of operating room. *Br J Surg*, 56:641–649, 1969.
- X. Chen, F. Niyonsaba, H. Ushio, M. Hara, H. Yokoi, K. Matsumoto, H. Saito, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol*, 37:434–444, 2007.
- H. R. Costantino, R. Langer, and A. M. Klibanov. Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin. *Pharm Res*, 11:21–29, 1994.
- D. E. Cutright, B. Perez, J. D. 3rd Beasley, W. J. Larson, and W. R. Posey. Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 37:142–152, 1974.
- D. A. Devine and R. E. Hancock. Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Curr Pharm Des*, 8:703–714, 2002.
- G. Diamond and C. L. Bevins. Beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol*, 88:221–225, 1998.

- A. Dunsche, Y. Acil, R. Siebert, J. Harder, J. M. Schröder, and S. Jepsen. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med*, 30:154–158, 2001.
- A. Dunsche, Y. Acil, H. Dommisch, R. Siebert, J. M. Schröder, and S. Jepsen. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci*, 110:121–124, 2002.
- H. Effenberger, S. Rehart, M. D. Zumstein, and A. Schuh. Financing in knee arthroplasty: a benchmarking analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*, 128:1349–1356, 2008.
- W. A. Ernst, S. Thoma-Uszynski, R. Teitelbaum, C. Ko, D. A. Hanson, C. Clayberger, A. M. Krensky, M. Leippe, B. R. Bloom, T. Ganz, and R. L. Modlin. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol*, 165:7102–7108, 2000.
- P. Fehlbaum, P. Bulet, S. Chernysh, J. P. Briand, J. P. Roussel, L. Letellier, C. Hetru, and J. A. Hoffmann. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:1221–1225, 1996.
- A. C. Fogaca, Jr. da Silva, P. I., M. T. Miranda, A. G. Bianchi, A. Miranda, P. E. Ribolla, and S. Daffre. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*, 274:25330–25334, 1999.
- J. Fogh, J. M. Fogh, and T. Orfeo. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 59:221–226, 1977.
- G. Fujii, M. E. Selsted, and D. Eisenberg. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci*, 2:1301–1312, 1993.
- M. Gabriel, K. Nazmi, E. C. Veerman, A. V. N. Amerongen, and A. Zentner. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjug Chem*, 17:548–550, 2006.
- T. Ganz. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3:710–720, 2003.
- J. R. Garcia, F. Jaumann, S. Schulz, A. Krause, J. Rodriguez-Jimenez, U. Forssmann, K. Adermann, E. Kluver, C. Vogelmeier, D. Becker, R. Hedrich, W. G. Forssmann, and R. Bals. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 306:257–264, 2001a.

- J. R. Garcia, A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, and W. G. Forssmann. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, 15:1819–1821, 2001b.
- K. L. Garvin, B. G. Evans, E. A. Salvati, and B. D. Brause. Palaces gentamicin for the treatment of deep periprosthetic hip infections. *Clin Orthop Relat Res*, 298:97–105, 1994.
- H. Gollwitzer, K. Ibrahim, H. Meyer, W. Mittelmeier, R. Busch, and A. Stemberger. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother*, 51:585–591, 2003.
- F. Greco, L. de Palma, N. Spagnolo, A. Rossi, N. Specchia, and A. Gigante. Fibrin-antibiotic mixtures: an in vitro study assessing the possibility of using a biologic carrier for local drug delivery. *J Biomed Mater Res*, 25:39–51, 1991.
- G. H. Gudmundsson, B. Agerberth, J. Odeberg, T. Bergman, B. Olsson, and R. Salcedo. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*, 238:325–332, 1996.
- C. Haas, W. K. Aicher, A. Dinkel, H. H. Peter, and H. Eibel. Characterization of SV40T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol Int*, 16:241–247, 1997.
- M. Habash and G. Reid. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmacol*, 39:887–898, 1999.
- H. Hahn, D. Falke, S.H. Kaufmann, U. Ullmann, and K. Miksits, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, 4. korr. edition, 2001.
- R. E. Hancock. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J Med Microbiol*, 46:1–3, 1997.
- J. Harder and J. M. Schröder. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 277:46779–46784, 2002.
- J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schröder. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387:861, 1997a.
- J. Harder, R. Siebert, Y. Zhang, P. Matthiesen, E. Christophers, B. Schlegelberger, and J. M. Schröder. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, 46:472–475, 1997b.
- J. Harder, U. Meyer-Hoffert, L. M. Teran, L. Schwichtenberg, J. Bartels, S. Maune, and J. M. Schröder. Mucoïd pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22:714–721, 2000.

- J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schröder. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276:5707–5713, 2001.
- J. Harder, R. Glaser, and J. M. Schröder. The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 7:75–82, 2007.
- S. A. Harris, R. J. Enger, B. L. Riggs, and T. C. Spelsberg. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res*, 10:178–186, 1995.
- K. Hase, M. Murakami, M. Iimura, S. P. Cole, Y. Horibe, T. Ohtake, M. Obonyo, R. L. Gallo, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 125:1613–1625, 2003.
- D. Heck, A. Rosenberg, M. Schink-Ascani, S. Garbus, and T. Kiewitt. Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty*, 10:470–475, 1995.
- K. A. Henzler-Wildman, G. V. Martinez, M. F. Brown, and A. Ramamoorthy. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry*, 43:8459–8469, 2004.
- S. Hesaraki and R. Nemati. Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 89B:342–352, 2008.
- P. S. Hiemstra, R. J. Maassen, J. Stolk, R. Heinzl-Wieland, G. J. Steffens, and J. H. Dijkman. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun*, 64:4520–4524, 1996.
- G. O. Hofmann, H. Liedtke, G. Ruckdeschel, and G. Lob. The influence of bacterial contaminations on the biodegradation of PLA implants. *Clin Mater*, 6:137–150, 1990.
- G. O. Hofmann, T. Bär, and V. Bühren. [The osteosynthesis implant and early post-operative infection: healing with or without removal of the material?]. *Chirurg*, 68:1175–1180, 1997.
- H. G. Hong, M. Jiang, S. G. Sligar, and P. W. Bohn. Cysteine-specific surface tethering of genetically-engineered cytochromes for fabrication of metalloprotein nanostructures. *Langmuir*, 10:153–158, 1994.
- D. M. Hoover, K. R. Rajashankar, R. Blumenthal, A. Puri, J. J. Oppenheim, O. Chertov, and J. Lubkowski. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem*, 275:32911–32918, 2000.

- W. O. Jackson and T. P. Schmalzried. Limited role of direct exchange arthroplasty in the treatment of infected total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res*, 381: 101–105, 2000.
- CA. Janeway, Paul Travers, Simon Hunt, and Mark Walport. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2 edition, 2002.
- B. Jansen and G. Peters. Foreign body associated infection. *J Antimicrob Chemother*, 32 Suppl A:69–75, 1993.
- H. P. Jia, B. C. Schutte, A. Schudy, R. Linzmeier, J. M. Guthmiller, G. K. Johnson, B. F. Tack, J. P. Mitros, A. Rosenthal, T. Ganz, and Jr. McCray, P. B. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 263:211–218, 2001.
- E. M. Jones, A. Smart, G. Bloomberg, L. Burgess, and M. R. Millar. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J Appl Bacteriol*, 77:208–214, 1994.
- K. Kavanagh and S. Dowd. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol*, 56:285–289, 2004.
- A. E. Kieffer, Y. Goumon, O. Ruh, S. Chasserot-Golaz, G. Nullans, C. Gasnier, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *Faseb J*, 17:776–778, 2003.
- K. Kitamura, T. Takahashi, T. Yamaguchi, A. Noguchi, A. Noguchi, K. Takashina, H. Tsurumi, M. Inagake, T. Toyokuni, and S. Hakomori. Chemical engineering of the monoclonal antibody A7 by polyethylene glycol for targeting cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 51:4310–4315, 1991.
- J. Kohn, S. Abrahamson, and R. Langer. Bioresorbable and bioerodible materials. In Buddy D. Rattner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, and Jack E. Lemons, editors, *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, pages 115–126. Elsevier Academic Press, San Diego, London, 2 edition, 2004.
- D. Kraus and A. Peschel. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306:231–250, 2006.
- R. Langer. 1994 whitaker lecture: polymers for drug delivery and tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 23:101–111, 1995.
- J. W. Leenslag, A. J. Pennings, R. R. Bos, F. R. Rozema, and G. Boering. Resorbable materials of poly(L-lactide). VII. in vivo and in vitro degradation. *Biomaterials*, 8: 311–314, 1987a.
- J. W. Leenslag, A. J. Pennings, R. R. Bos, F. R. Rozema, and G. Boering. Resorbable materials of poly(L-lactide). VI. plates and screws for internal fracture fixation. *Biomaterials*, 8:70–73, 1987b.

- R. I. Lehrer and T. Ganz. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann N Y Acad Sci*, 797:228–239, 1996.
- R. I. Lehrer, A. Barton, K. A. Daher, S. S. Harwig, T. Ganz, and M. E. Selsted. Interaction of human defensins with escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest*, 84:553–561, 1989.
- R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, and T. Ganz. Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*, 11:105–128, 1993.
- A. Lendlein. Polymere als implantatwerkstoffe. *Chemie in Unserer Zeit*, 33:279–295, 1999.
- J. Li, M. Post, R. Volk, Y. Gao, M. Li, C. Metais, K. Sato, J. Tsai, W. Aird, R. D. Rosenberg, T. G. Hampton, F. Sellke, P. Carmeliet, and M. Simons. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med*, 6:49–55, 2000.
- O. M. Lidwell, E. J. Lowbury, W. Whyte, R. Blowers, S. J. Stanley, and D. Lowe. Effect of ultraclean air in operating rooms on deep sepsis in the joint after total hip or knee replacement: a randomised study. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 285:10–14, 1982.
- T. Lindl. *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 5 überarb. und erw. edition, 2002.
- P. Mainil-Varlet, C. Hauke, V. Maquet, G. Printzen, S. Arens, T. Schaffner, R. Jerome, S. Perren, and U. Schlegel. Polylactide implants and bacterial contamination: An animal study. *J Biomed Mater Res*, 54:335–343, 2001.
- G. Maisetta, G. Batoni, S. Esin, W. Florio, D. Bottai, F. Favilli, and M. Campa. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:806–809, 2006.
- J. Malm, O. Sørensen, T. Persson, M. Frohm-Nilsson, B. Johansson, A. Bjartell, H. Lilja, M. Stahle-Backdahl, N. Borregaard, and A. Egesten. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infection and Immunity*, 68:4297–4302, 2000.
- E. Martin, T. Ganz, and R. I. Lehrer. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol*, 58:128–136, 1995.
- J. C. Middleton and A. J. Tipton. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21:2335–2346, 2000.
- F. Morgera, N. Antcheva, S. Pacor, L. Quaroni, F. Berti, L. Vaccari, and A. Tossi. Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes. *J Pept Sci*, 14:518–523, 2008.

- C. J. Murphy, B. A. Foster, M. J. Mannis, M. E. Selsted, and T. W. Reid. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 155:408–413, 1993.
- A. Nanci, J. D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal, and M. D. McKee. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res*, 40:324–335, 1998.
- M. F. Nilsson, B. Sandstedt, O. Sørensen, G. Weber, N. Borregaard, and M. Stahle-Backdahl. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infection and Immunity*, 67:2561–2566, 1999.
- F. Niyonsaba, H. Ushio, N. Nakano, W. Ng, K. Sayama, K. Hashimoto, I. Nagao-ka, K. Okumura, and H. Ogawa. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol*, 127:594–604, 2007.
- F. G. Oppenheim, T. Xu, F. M. McMillian, S. M. Levitz, R. D. Diamond, G. D. Offner, and R. F. Troxler. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on candida albicans. *J Biol Chem*, 263:7472–7477, 1988.
- A. Oren, T. Ganz, L. Liu, and T. Meerloo. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol*, 74:180–182, 2003.
- P. A. W. Ostermann, D. Seligson, and S. L. Henry. Local antibiotic-therapy for severe open fractures - a review of 1085 consecutive cases. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 77B:93–97, 1995.
- M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, and J. Lubkowski. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci*, 63:1294–1313, 2006.
- R. B. Pedley, J. A. Boden, R. Boden, R. H. Begent, A. Turner, A. M. Haines, and D. J. King. The potential for enhanced tumour localisation by poly(ethylene glycol) modification of anti-CEA antibody. *Br J Cancer*, 70:1126–1130, 1994.
- C. G. Pitt, M. M. Gratzl, G. L. Kimmel, J. Surles, and A. Schindler. Aliphatic polyesters 2. The degradation of poly(DL-Lactide), poly(epsilon-caprolactone), and their copolymers invivo. *Biomaterials*, 4:215–220, 1981.
- X. D. Qu and R. I. Lehrer. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun*, 66:2791–2797, 1998.
- A. Rezania, R. Johnson, A. R. Lefkow, and K. E. Healy. Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. surface characterization and cell response. *Langmuir*, 20:6931–6939, 1999.

- S. Ridgeway, J. Wilson, A. Charlet, G. Kafatos, A. Pearson, and R. Coello. Infection of the surgical site after arthroplasty of the hip. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 87B:844–850, 2005.
- Jr. Robinson, W. E., B. McDougall, D. Tran, and M. E. Selsted. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J Leukoc Biol*, 63:94–100, 1998.
- S. B. Rodan, Y. Imai, M. A. Thiede, G. Wesolowski, D. Thompson, Z. Bar-Shavit, S. Shull, K. Mann, and G. A. Rodan. Characterization of a human osteosarcoma cell line (SAOS-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res*, 47:4961–4966, 1987.
- V. Sass, U. Pag, A. Tossi, G. Bierbaum, and H. G. Sahl. Mode of action of human beta-defensin 3 against staphylococcus aureus and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. *Int J Med Microbiol*, 298:619–633, 2008.
- J. M. Schakenraad and P. J. Dijkstra. Biocompatibility of poly (DL-lactic acid/glycine) copolymers. *Clin Mater*, 7:253–269, 1991.
- B. Schitteck, R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schröder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner, and C. Garbe. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*, 2, 2001.
- A. Schmelz, L. Kinzl, and T. Einsiedel. [Osteitis. Infections of the locomotive system]. *Chirurg*, 77:943–61, 2006.
- G. Schmidmaier, B. Wildemann, H. Bail, M. Lucke, T. Fuchs, A. Stemberger, A. Flyvbjerg, N. P. Haas, and M. Raschke. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*, 28:341–350, 2001a.
- G. Schmidmaier, B. Wildemann, A. Stemberger, N. P. Haas, and M. Raschke. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*, 58:449–455, 2001b.
- J. M. Schröder. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci*, 56:32–46, 1999.
- J. M. Schröder and J. Harder. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 645–651, 1999.
- J. M. Schröder and J. Harder. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63:469–486, 2006.
- B. C. Schutte, J. P. Mitros, J. A. Bartlett, J. D. Walters, H. P. Jia, M. J. Welsh, T. L. Casavant, and Jr. McCray, P. B. Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:2129–2133, 2002.

- M. Scocchi, B. Skerlavaj, D. Romeo, and R. Gennaro. Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial bactericins. *European Journal of Biochemistry*, 209:589–595, 1992.
- M. E. Selsted and A. J. Ouellette. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, 6:551–557, 2005.
- C. A. Semple, A. Maxwell, P. Gautier, F. M. Kilanowski, H. Eastwood, P. E. Barran, and J. R. Dorin. The complexity of selection at the major primate beta-defensin locus. *BMC Evol Biol*, 5:32, 2005.
- O. Sørensen, A. H. Johnsen, P. Follin, J. Calafat, and N. Borregaard. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is activated by extracellular cleavage by elastase. *Blood*, 94:209a, 1999.
- O. E. Sørensen, P. Follin, A. H. Johnsen, J. Calafat, G. S. Tjabringa, P. S. Hiemstra, and N. Borregaard. The human cathelicidin, hCAP-18, is processed extracellularly to the antimicrobial peptide LL-37 by proteinase 3. *Blood*, 96:607a, 2000.
- O. E. Sørensen, P. Follin, A. H. Johnsen, J. Calafat, G. S. Tjabringa, P. S. Hiemstra, and N. Borregaard. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97:3951–3959, 2001.
- A. Stemberger, H. Grimm, F. Bader, H. D. Rahn, and R. Ascherl. Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge. *European Journal of Surgery*, 163:17–26, 1997.
- M. Subramaniam, S. M. Jalal, D.J. Rickard, S.A. Harris, M.E. Bolander, and T.C. Spelsberg. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ERalpha cells: Bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization, 2002.
- B. Sugarman and E. J. Young. Infections associated with prosthetic devices: magnitude of the problem. *Infect Dis Clin North Am*, 3:187–198, 1989.
- C. Q. Sun, R. Arnold, C. Fernandez-Golarz, A. B. Parrish, T. Almekinder, J. He, S. M. Ho, P. Svoboda, J. Pohl, F. F. Marshall, and J. A. Petros. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 66:8542–8549, 2006.
- F. Suter, A. Avai, U. Fusco, M. Gerundini, S. Caprioli, and F. Maggiolo. Teicoplanin versus cefamandole in the prevention of infection in total hip-replacement. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13:793–796, 1994.
- H. Suttman, M. Retz, F. Paulsen, J. Harder, U. Zwergel, J. Kamradt, B. Wulich, G. Unteregger, M. Stockle, and J. Lehmann. Antimicrobial peptides of the cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol*, 8:5, 2008.

- Y. Q. Tang, J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Ouellette, and M. E. Selsted. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*, 286:498–502, 1999.
- E. W. Taylor. Surgical infection: Current concerns. *European Journal of Surgery*, 163: 5–9, 1997.
- K. Thoma and B. Schlutermann. [Biodegradable polymers as retardation excipients for drugs]. *Pharmazie*, 46:821–830, 1991.
- J. C. Tiller, C. J. Liao, K. Lewis, and A. M. Klibanov. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:5981–5985, 2001.
- A. Tossi and L. Sandri. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr Pharm Des*, 8:743–761, 2002.
- J. Turner, Y. Cho, N. N. Dinh, A. J. Waring, and R. I. Lehrer. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:2206–2214, 1998.
- E. V. Valore, C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, Jr. McCray, P. B., and T. Ganz. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 101:1633–1642, 1998.
- D. Varoga, T. Pufe, J. Harder, U. Meyer-Hoffert, R. Mentlein, J. M. Schröder, W. J. Petersen, B. N. Tillmann, E. Proksch, M. B. Goldring, and F. P. Paulsen. Production of endogenous antibiotics in articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50:3526–3534, 2004.
- D. Varoga, M. Tohidnezhad, F. Paulsen, C. J. Wruck, L. Brandenburg, R. Mentlein, S. Lippross, J. Hassenpflug, L. Besch, M. Müller, C. Jürgens, A. Seekamp, L. Schmitt, and T. Pufe. The role of human beta-defensin-2 in bone. *J Anat*, 213: 749–757, 2008.
- H. Välimaa, J. Tenovuo, M. Waris, and V. Hukkanen. Human lactoferrin but not lysozyme neutralizes HSV-1 and inhibits HSV-1 replication and cell-to-cell spread. *Virology*, 6:53, 2009.
- G. Wang, X. Li, and Z. Wang. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*, 37:D933–7, 2009.
- J. Y. Wang, D. T. Tsukayama, B. H. Wicklund, and R. B. Gustilo. Inhibition of T and B cell proliferation by titanium, cobalt, and chromium: Role of IL-2 and IL-6. *J Biomed Mater Res*, 32:655–661, 1996a.
- J. Y. Wang, B. H. Wicklund, R. B. Gustilo, and D. T. Tsukayama. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials*, 17:2233–2240, 1996b.

- J. Wehkamp, J. Harder, M. Weichenthal, O. Mueller, K. R. Herrlinger, K. Fellermann, J. M. Schröder, and E. F. Stange. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 9:215–223, 2003.
- A. Weinberg, S. Krisanaprakornkit, and B. A. Dale. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9:399–414, 1998.
- S. Winckler, E. Brug, R. Meffert, C. Teupe, W. Ritzerfeld, and P. Tormala. [Resorbable antibiotic delivery systems in local treatment of chronic osteitis–polyglycolic acid/poly-l-lactide as drug carrier. experimental studies in vitro]. *Langenbecks Arch Chir*, 377:112–117, 1992.
- M. J. Wood. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 37:209–222, 1996.
- Z. Wu, D. M. Hoover, D. Yang, C. Boulegue, F. Santamaria, J. J. Oppenheim, J. Lubkowski, and W. Lu. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:8880–8885, 2003.
- S. J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, and H. Sigrist. Immobilization of the cell-adhesive peptide arg-gly-asp-cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Mater Sci-Mater Med*, 8:867–872, 1997.
- Y. Q. Xiong, M. R. Yeaman, and A. S. Bayer. In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against staphylococcus aureus are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:1111–1117, 1999.
- Y. Yamaguchi, T. Nagase, R. Makita, S. Fukuhara, T. Tomita, T. Tominaga, H. Kurihara, and Y. Ouchi. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol*, 169:2516–2523, 2002.
- D. Yang, O. Chertov, and J. J. Oppenheim. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol*, 69:691–697, 2001a.
- D. Yang, O. Chertov, and J. J. Oppenheim. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci*, 58:978–989, 2001b.
- M. R. Yeaman and A. S. Bayer. Antimicrobial peptides versus invasive infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306:111–152, 2006.
- M. Zaiou, V. Nizet, and R. L. Gallo. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *Invest Dermatol*, 120:810–816, 2003.

- M. Zanetti, R. Gennaro, and D. Romeo. Cathelicidins - a novel protein family with a common proregion and a variable c-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, 374:1–5, 1995.
- M. Zasloff. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med*, 347:1199–1200, 2002a.
- M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415:389–395, 2002b.
- L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, and R. E. Hancock. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:3317–3321, 2000.
- H. Zilch and E. Lambiris. The sustained release of cefotaxim from a fibrin-cefotaxim compound in treatment of osteitis. pharmacokinetic study and clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg*, 106:36–41, 1986.
- G. R. Zimmermann, P. Legault, M. E. Selsted, and A. Pardi. Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry*, 34:13663–13671, 1995.
- H. D. Zucht, J. Grabowsky, M. Schrader, C. Liepke, M. Jurgens, P. Schulz-Knappe, and W. G. Forssmann. Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med Res*, 7: 315–323, 1998.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Unerwünschte Besiedelung einer Implantatoberfläche	2
1.2	Ablauf einer Biofilmbildung auf Oberflächen	3
1.3	Untergruppen der antimikrobiellen Peptide	8
1.4	Modelle der Interaktion von AMP mit Membranen	12
1.5	Struktur der Defensine	15
1.6	Primärstruktur der α - und β -Defensine	16
1.7	Struktur des Cathelizidins LL-37	19
1.8	Poly-D,L-Laktid (PDLLA): Strukturformel	22
1.9	Bildung eines Fibrinnetzes	25
2.1	Aufbau einer HPLC-Anlage	36
2.2	Etablierung eines ELISA	44
2.3	Kopplung von Wirkstoffen an Fibrinogen	55
2.4	Strukturformel Vancomycin	57
2.5	Kopplung mittels APTS	61
2.6	Kopplung mittels MEMO	62
3.1	Stabilität der antimikrobiellen Peptide über 24 Stunden	65
3.2	Versuchsdurchführung des Löslichkeitsversuchs	67
3.3	Löslichkeit von AMP in verschiedenen Lösungsmitteln	68
3.4	Freisetzung von AMP aus der PDLLA-Beschichtung	70
3.5	Einfluss der PDLLA-Beschichtung auf das Zellwachstum	72
3.6	Einfluss auf das Zellwachstum über mehrere Tage	73
3.7	Hemmhofbildung durch abgegebene Wirkstoffe	74
3.8	PDLLA-Lösung hemmt die antimikrobielle Aktivität	75
3.9	Enzymaktivität von Plasmin und Thrombin	77
3.10	Nachweis der Wirkstoffkonjugation an Fibrinogen	78
3.11	Darstellung von Clots	79
3.12	Freisetzung von AMP aus einem Fibrinclot	80
3.13	Einfluss eines Clots auf das Zellwachstum	82
3.14	Radial-Diffusions-Hemmtest	83
3.15	Grafische Darstellung der Hemmhöfe nach 24 Stunden Bebrütung	84
3.16	Nachweis von Bakterien mit dem Live/Dead Kit	86
4.1	Bindung von Wirkstoffen an ein Trägermaterial	89

Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der Immunabwehr	6
1.2	Humane AMP: Übersicht	9
1.3	Verschiedene Wirkweisen der AMP	14
2.1	Zelllinien: Kultivierungsbedingungen	29
2.2	Zellkultur: Medien	30
2.3	Zellkultur: Materialien	30
2.4	Zellzahl: Materialien	33
2.5	CyQuant-Methode: Herstellung der Standardwerte	34
2.6	Materialien für den CyQuant-Test	35
2.7	HPLC: Materialien	38
2.8	SDS-Gele: Zusammensetzung	39
2.9	Zusammensetzung der Puffer für die Gelelektrophorese	40
2.10	Materialien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.11	Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.12	ELISA: Antikörper und rekombinante Proteine	45
2.13	ELISA: Zusammensetzung der Puffer	47
2.14	ELISA: Materialien	47
2.15	Western-Blot: Zusammensetzung der Puffer	49
2.16	Western-Blot: Materialien	50
2.17	Western-Blot: Materialien	52
2.18	PDLLA-Beschichtung: Materialien	54
2.19	Materialien für die Kopplung an Fibrinogen	59
2.20	Kovalente Bindung: Zusammensetzung der Lösungen	60
2.21	Kovalente Bindung: Materialien	60
3.1	Auswertung der Färbung mit dem LIVE/DEAD Kit	87

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Leuten bedanken, die mich bei der Doktorarbeit und ansonsten über das ganze Studium hinweg unterstützt haben.

Ein großes Dankeschön an Prof. Mentlein für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Seine vielseitige Unterstützung und die detaillierten Besprechungen waren sehr hilfreich.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Varoga für die Vergabe dieser interessanten Aufgabenstellung, die Einführung in das Thema und die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Herrn Prof. Beitz danke ich für die problemlose Übernahme des Koreferats.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Gutschmann aus der Forschergruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel für die Bereitstellung von LL-37 und LL-32, ohne die ein Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Prof. Podschun bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft und dafür, dass der Mikrobiologische Teil dieser Arbeit in den Räumen des Instituts für Infektionsmedizin durchgeführt werden konnte.

Danke an die Arbeitsgruppe und an alle MTA, besonders an Inka (auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit), Sonja, Martina und Bettina für die Weitergabe ihrer Laborerfahrung und für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Ein Dank an alle Mitstreiter in dieser Zeit; besonders an Manuela, mit der ich um die Wette getippt habe; Stefanie und Inga für die Lernabende; Inken mit ihrem objektiven Blick auf die Dinge und an alle anderen für viele anregende und konstruktive Gespräche und aufmunternde Worte.

Ein besonderes Dankeschön meiner Familie für die Zeit, in der sie auf mich verzichtet haben. Danke an Johanna und Christoph, dass sie meinen Blick auf das Wichtigste gelenkt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit -abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer- selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben.

Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Kiel, 25. September 2010 _____
Susanne Grohmann