



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Zeta-Potential und Lichtstreuung zur
Charakterisierung von Phosphatidylserin- und
Lipopolysaccharid-haltigen Liposomen und ihrer
Wechselwirkung mit amphiphatischen Peptiden**

Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Anna Lena Iwohn

Matrikelnummer: 2005753

Hamburg-Bergedorf

28. August 2015

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW Hamburg)**
- 2. Gutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)**

Diese Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt in der AG Andrä der HAW
Hamburg

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Arbeit in der Bibliothek der Fakultät Life Sciences der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg ausgelegt sowie auf elektronischem Weg z.B. im Internet Interessenten zugänglich gemacht wird.

Hamburg, den 28. August 2015

(Anna Lena Iwohn)

Danksagung

Mit den folgenden Zeilen möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die meine Studienzeit um ein Vielfaches bereicherten und mich fachlich und mental bei der Erarbeitung der Abschlussarbeit unterstützten.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä, der mir ermöglichte, in ein solch spannendes und wichtiges Forschungsgebiet einsteigen zu können und mir durch fachliche Diskussionen hilfsbereit zur Seite stand.

Bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen möchte ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit bedanken.

Dominik Wilms möchte ich für das „Troubleshooting“ im Labor, die vielen hilfreichen Informationen und den unermüdlichen Spaß bei der Arbeit danken und wünsche ihm vom Herzen ein gutes Gelingen seiner Dissertation.

Der AG Andrä und Ullrich möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, auch an heißen Tagen, danken.

Meinem ehemaligen Kommilitonen Henning Wöllmer danke ich für die zahlreichen Stunden der Prüfungsvorbereitungen, den zusammen absolvierten Praktika und der gemeinsamen Zeit im Fachschaftsrat.

In Ursula Brachtl habe ich während des Studiums eine gute Freundin gefunden. Ich möchte mich für die gegenseitige Motivation bedanken, aus der ich die tägliche Kraft zum Vorwärtkommen schöpfen konnte.

Auch Pavel Truschow sei hier nicht unerwähnt. Auf den letzten Drücker gelang es gemeinsam immer Konzepte zu erarbeiten und Prüfungshürden zu meistern.

In meinem persönlichen Umfeld danke ich meinen Mitbewohnern für ein schönes zu Hause und meinen Freunden dafür, dass sie immer für mich da sind und mir täglich Rückhalt, Optimismus und ein einfach glückliches Leben schenken. Vielen Dank an Kiki, Jan und meine Mutter, die sich die Zeit nahmen, meine Arbeit kritisch zu beäugen und dabei den ein oder anderen Fehlerteufel entlarven konnten.

DANKSAGUNG

Meiner Familie danke ich ganz besonders dafür, mir auf meinem Lebensweg die alltäglichen Lasten abgenommen zu haben und dafür, dass sie mir geholfen hat, ein selbstsicherer und optimistischer Mensch werden zu können.

Meinem Freund Ingmar danke ich für seine Zuneigung, seine chaotisch-charmante Art und die bereichernde Gemeinsamkeit.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG UND THEORIE	1
1.1 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE.....	1
1.2 NK-LYSIN UND DAVON ABGELEITETE PEPTIDE.....	3
1.3 LIPOSOMEN	5
1.4 PHOSPHOLIPIDE.....	6
1.4.1 <i>L-α-Phosphatidylcholin (PC)</i>	6
1.4.2 <i>L-α-Phosphatidylserin e (PS)</i>	7
1.5 LIPOPOLYSACCHARIDE	7
1.6 CHARAKTERISIERUNG VON LIPOSOMEN	8
1.6.1 <i>Dynamische Lichtstreuung (Messung des Liposomendurchmessers)</i>	8
1.6.2 <i>Zeta-Potential der Liposomen</i>	10
1.7 ZIELSETZUNG	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIAL	13
2.1.1 <i>Labormaterialien</i>	13
2.1.2 <i>Chemikalien</i>	13
2.1.3 <i>Geräte</i>	14
2.1.4 <i>Phospholipide</i>	14
2.1.5 <i>Lipopolysaccharide</i>	14
2.2 METHODEN	15
2.2.1 <i>Liposomenpräparation Phosphatidylserin-haltiger Liposomen</i>	15
2.2.2 <i>Liposomenpräparation Lipopolysaccharid-haltiger Liposomen</i>	16
2.2.3 <i>Zetasizer-Messungen</i>	17
2.2.4 <i>Phospholipidbestimmung mittels optimiertem Stewart Assay</i>	18
3 ERGEBNISSE	21
3.1 CHARAKTERISIERUNG DER PRÄPARIERTEN L-A-PHOSPHATIDYLCHOLIN- UND L-A-PHOSPHATIDYLSERIN-HALTIGEN LIPOSOMEN	21
3.2 WECHSELWIRKUNGEN VON AMPHIPHATISCHEN PEPTIDEN MIT PRÄPARIERTEN LIPOSOMEN	22
3.2.1 <i>Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin...</i>	23
3.2.2 <i>Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin und L-α-Phosphatidylserin im Verhältnis 80 : 20</i>	24

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.3	<i>Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin und L-α-Phosphatidylserin im Verhältnis 50 : 50</i>	25
3.2.4	<i>Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylserin</i>	26
3.2.5	<i>Wechselwirkungen von Peptiden ohne Liposomen</i>	27
3.3	HERSTELLUNG UND STABILITÄTSTEST VON LPS-HALTIGEN LIPOSOMEN	27
3.4	ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG EINES TESTS ZUR KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PHOSPHOLIPIDEN	29
3.4.1	<i>Phosphat-Test für Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin</i>	31
3.4.2	<i>Phosphat-Test für Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin : L-α-Phosphatidylserin (80 : 20)</i>	34
4	DISKUSSION	37
4.1	WECHSELWIRKUNGEN NK-LYSIN ABGELEITETER PEPTIDE MIT PRÄPARIERTEN LIPOSOMEN DEFINIERTER LIPIDZUSAMMENSETZUNG	37
4.2	LPS-HALTIGE LIPOSOMEN	40
4.3	ETABLIERUNG EINES EINFACHEN, KOLORIMETRISCHEN TESTS ZUR GEHALTSBESTIMMUNG VON PHOSPHOLIPIDEN	41
5	ZUSAMMENFASSUNG	42
6	LITERATURVERZEICHNIS	43
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	47
8	TABELLENVERZEICHNIS	49
9	ANHANG	51
9.1	DURCHMESSER UND ZETA-POTENTIAL VON WECHSELWIRKUNGEN AMPHIPHATISCHER PEPTIDE MIT PC- UND PS-HALTIGEN LIPOSOMEN	51
9.1.1	<i>Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin</i>	51
9.1.2	<i>Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin und L-α-Phosphatidylserin im Verhältnis 80 : 20</i>	53
9.1.3	<i>Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylcholin und L-α-Phosphatidylserin im Verhältnis 50 : 50</i>	54
9.1.4	<i>Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L-α-Phosphatidylserin</i>	56
9.1.5	<i>Durchmesser und Zeta-Potential der amphiphatischen Peptide</i>	57
9.2	DURCHMESSER UND ZETA-POTENTIAL VON WECHSELWIRKUNGEN AMPHIPHATISCHER PEPTIDE MIT PC- UND LPS-HALTIGEN LIPOSOMEN	58
9.3	EXTINKTIONEN DER KALIBRIERSTANDARDS AUS PHOSPHOLIPIDEN	59
9.3.1	<i>Extinktionen der Kalibrierstandards aus PC</i>	59
9.3.2	<i>Extinktionen der Kalibrierstandards aus PC : PS (80 : 20)</i>	59

Abkürzungsverzeichnis

AEL	Ammonium-Eisenthiocyanat-Lösung
AMP	Antimikrobielle Peptide
AS	Aminosäure
cP	Centipoise = Pa · s/ 1000
D	Diffusionskoeffizient in Flüssigkeiten
DLS	dynamische Lichtstreuung
ELS	elektrophoretische Lichtstreuung
ϵ	Dielektrizitätskonstante
F	Verdünnungsfaktor
f (Ka)	Henry Funktion
k_B	Boltzmann-Konstante [$J \cdot K^{-1}$]
λ	Wellenlänge
LPS	Lipopolysaccharide
LPS Ra	Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella</i>
LPS Re	Lipopolysaccharid aus <i>E. coli</i>
LUV	large unilamellar vesicles
MLV	<u>multi</u> lamellare <u>V</u> esikel
mM	Millimolar
NIBS	<u>N</u> on- <u>I</u> nvasive <u>B</u> ack <u>S</u> catter
η	dynamische Viskosität des Lösungsmittels [$N \cdot s \cdot m^{-2}$]
PC	L- α -Phosphatidylcholin
PP	Polypropylen
PS	L- α -Phosphatidylserin
r	Partikelradius [m]
R ²	Bestimmtheitsmaß
RI	Brechungsindex
rpm	<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute
SOP	<u>S</u> tandard <u>O</u> perating <u>P</u> rocedure
SUV	<u>s</u> mall <u>u</u> nilamellar <u>v</u> esicles
U _E	elektrophoretische Beweglichkeit [$A \cdot N \cdot m$]
v:v:v	Volumen zu Volumen zu Volumen
WFR	Wiederfindungsrate [%]
z	Zeta-Potential

1 Einleitung und Theorie

Die Entdeckung neuartiger Wirkstoffe gegen pathogene Mikroorganismen spielt in der heutigen Zeit eine immer tragendere Rolle. So gibt es eine Reihe von Mikroorganismen, die bereits Resistenzen gegen unterschiedliche Antibiotika entwickelt haben. Zu diesen gehören *Staphylococcus aureus* mit Resistenzen gegen Methicillin, Vancomycin oder Vancomycin-ähnliche Stoffe, *Enterococcus faecium* mit Resistenz gegen Vancomycin und *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, welche gegen das Breitbandantibiotikum Cephalosporin Resistenzen aufweisen, um nur einige zu nennen (Norrby et al. 2009; Norrby et al. 2005). Die Zahl der gegen Antibiotika resistenten Bakterienstämme steigt immer weiter an und auch die Bildung multiresistenter Keime ist keine Seltenheit mehr.

Auch in der Krebstherapie wird noch immer nach neuen Mitteln zur Bekämpfung entarteter Zellen gesucht. Die Forschung an neuartigen Wirkstoffen zur Bekämpfung von Krebszellen und pathogenen Mikroorganismen gewinnt immer größere Bedeutung für das Gesundheitswesen. Eine Reihe antimikrobieller Peptide stellen für diese Anwendungsgebiete aussichtsreiche Kandidaten dar.

1.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind in der Natur in nahezu allen Organismen vertreten. So enthält „The Antimicrobial Peptide Database“ aktuell 2588 Peptide, welche von Tieren, Pflanzen, Bakterien, Pilzen und sogar von Protisten und Archeen abstammen (Wang 2015).

Natürliche AMP sind Teil der angeborenen Immunabwehr des jeweiligen Organismus und sind aus L-Aminosäuren zusammengesetzt (Zaslöf 2002). Zu den Eigenschaften der AMPs zählen unter anderem antibakterielle, antivirale, antifungale, antikanzerogene und antioxidative Eigenschaften (Wang 2015). Außerdem sind bestimmte Peptide in der Lage, Lipopolysaccharide (LPS), auch bekannt als Endotoxine Gram-negativer Bakterien, zu binden und damit zu deaktivieren (Matsumoto et al. 2010).

EINLEITUNG UND THEORIE

Die von Eukaryoten abstammenden AMPs sind zumeist sehr ähnlich aufgebaut. Die meisten AMP bestehen aus etwa 11-50 Aminosäuren (AS), sind amphiphil und besitzen eine positive Nettoladung von +2 bis +9 (Wang 2013; Yeaman und Yount 2003). An ihrer Oberfläche befinden sich polare und unpolare Zonen, die ihnen ermöglichen, sich in Zellmembranen zu verankern und mit diesen zu interagieren. In ihrer Sekundärstruktur liegen AMP vorwiegend α -helikal, wie bei Magaininen, welche aus Froschhaut stammen, oder in β -Faltblatt-Struktur, wie humane Defensine, vor (Bevins und Zasloff 1990; Zhang et al. 2010). Wie in Abbildung 1 zu sehen, kommen Peptide außerdem in Mischformen aus beiden Strukturen oder gestreckten Formen vor.

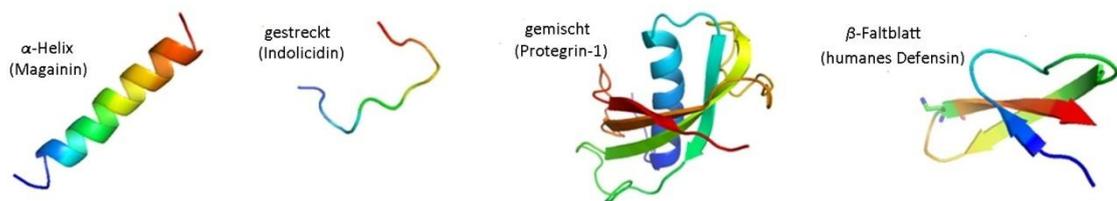


Abbildung 1: Unterschiedliche Peptidstrukturen anhand beispielhafter Peptide (verändert von Ymahn 2009)

Resistenzbildungen gegen AMP sind durch ihre Wirkweise eher unwahrscheinlich. Die kationischen AMP lagern sich durch elektrostatische Interaktion an negativ geladene Zellmembranen an, depolarisieren diese und sorgen durch physikalische Poration, Induktion von Zellwand-lyisierenden Enzymen, Veränderung der Lipidanordnung der Membranlipide oder Zerstörung bestimmter wichtiger Zellfunktionsstoffe nach Eindringen in die Zelle für den Zelltod der Zielzelle (Zasloff 2002; Gross et al. 2013). Diese Mechanismen laufen innerhalb von Minuten ab (Andrä et al. 2007). Abbildung 2 zeigt mögliche unterschiedliche Wirkweisen von AMP an der Zellmembran der Zielzelle.

EINLEITUNG UND THEORIE

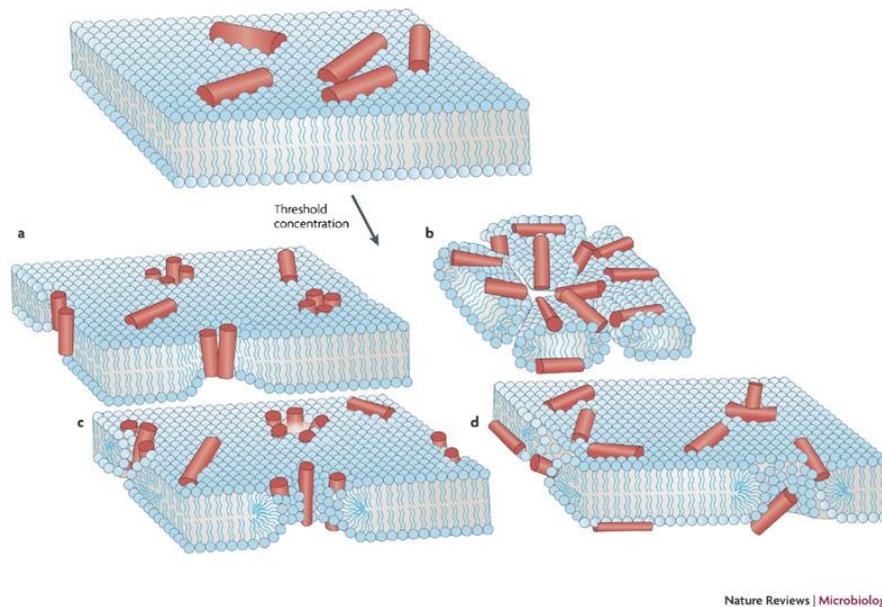


Abbildung 2: Mögliche Mechanismen der AMP nach Überschreiten der Grenzwertkonzentration (aus Melo et al. 2009): a) Bildung fassförmiger Membranporen (Barrel-stave-Modell), deren Innenwände aus AMP (rot) bestehen. b) Teppich-Mechanismus (Carpet-Modell): Die AMP sammeln sich auf der Membran an und zerstören sie aufgrund ihrer Zusammensetzung. c) toroidale Pore (Toroidal-pore-Modell): die AMP bilden zusammen mit Membranlipiden der Zelle ausgekleidete Poren. d) ungeordnete toroidale Pore: Die AMP induzieren Porenbildung, ohne die Poren selbst zu umspannen.

Dabei bestimmen Nettoladung und die durch die Sekundärstruktur vorgegebene sterische Ausrichtung wie gut sich AMP an ihre Zielzelle(n) anlagern. Die Hydrophobizität der AMP bestimmt wiederum, auf welche Weise sie sich an der Zellmembran ausrichten (Yeaman und Yount 2003).

1.2 NK-Lysin und davon abgeleitete Peptide

NK-Lysin ist ein kleines, 78 Aminosäuren umfassendes Protein aus dem Dünndarm des Schweins, das in der Granula von NK- und T-Zellen des angeborenen Immunsystems vorkommt und ein Homolog des humanen Granulysins ist (Andersson et al. 1995; Andrä et al. 2007). In wässrigen Lösungen bildet es fünf amphipatische α -Helices aus, die durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden (Liepinsh et al. 1997).

NK-2 wurde in dieser Arbeit mit seiner Leitstruktur als Hauptpeptid verwendet. Es ist ein α -helikales, amphipatisches antimikrobielles Peptid, welches das kationische Kerngebiet (Aminosäure 39 - 65) von NK-Lysin, die Helices 3 und 4, beinhaltet (Andrä et al. 2007). Es besteht aus 27 Aminosäuren und besitzt eine positive Nettoladung von +10 (Jacobs et al. 2003; Olak et al. 2008). Der C-Terminus von NK-2 ist amidiert (Andrä und Leippe 1999). Die hämolytische und zytotoxische Aktivität gegenüber gesunden Zellen des NK-2 ist gering (Andrä et al. 2007). NK-2 wirkt in mikromolaren Konzentrationen gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien

EINLEITUNG UND THEORIE

und neutralisiert bakterielle Endotoxine (Andrä et al. 2007; Brandenburg et al. 2010). Außerdem ist es aktiv gegen diverse Krebszellen wie Neuroblastom, Leukämie (Schröder-Borm et al. 2005), Prostatakrebs (Gross und Andrä 2012) und Equine Sarcoid Zellen (Gross et al. 2013). NK-2 liegt in wässrigen Lösungen zunächst unstrukturiert vor, während es in der Umgebung von Zellmembranen oder Membran-nachahmenden Modellsystemen wie Liposomen eine α -helicale Struktur ausbildet. Gegenüber L- α -Phosphatidylcholin (PC), einem Phospholipid, welches sich in eukaryotischen Zellenmembranen befindet, besitzt NK-2 nur eine sehr geringe Affinität (Andrä et al. 2007), wohingegen es beispielsweise gegen das einfach negativ geladene L- α -Phosphatidylserin (PS) aufgrund seiner kationischen Ladung eine hohe Affinität besitzt.

Vom NK-2 abgeleitet wurde ein gekürztes, 11 Aminosäuren langes, biologisch inaktives Peptid mit nur 6 positiven Nettoladungen, das NK11, verwendet (Gross und Andrä 2012).

Desweiteren wurden NK-2 Varianten verwendet, in denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden. So wurde beim Peptid C7A die siebte Aminosäure (AS), das Cystein, gegen Alanin ausgetauscht. Dieser Austausch sollte eine Verbesserung der Widerstandsfähigkeit des Peptids gegen Oxidation bewirken. Eine zweite Variante bot das Peptid C7A-D21K, bei der neben dem Cystein-Alanin-Austausch ein zweiter Austausch von Asparginsäure gegen Lysin (AS 21 des Hauptpeptids NK-2) vorgenommen wurde. Durch diesen Tausch erhielt das Peptid zwei zusätzliche positive Nettoladungen, was die Aktivität gegenüber negativ geladenen Zellmembranen erhöhen sollte.

Melittin, welches Hauptbestandteil des Zell-lysierenden Bienengifts ist, diente als weitgehend unselektives AMP und gängiges Referenzpeptid (Dempsey 1990).

Alle in Tabelle 1 verwendeten Peptide wurden mittels Fmoc-Festphasensynthese von Rainer Bartels und Volker Grote am Forschungszentrum Borstel (Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften) hergestellt, über RP-HPLC gereinigt und mit einem amidierten C-Terminus synthetisiert. Bei den mit Fettdruck hervorgehobenen Buchstaben in der AS-Sequenz handelt es sich um die gegenüber dem Hauptpeptid NK-2 ausgetauschten AS und den amidierten C-Terminus. Die lyophilisierten Peptide wurden in einer Konzentration von 1 mM in 0,01 % TFA gelöst.

EINLEITUNG UND THEORIE

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Peptide

Peptid	Aminosäure-Sequenz in Single-Letter-Code	Länge	Ladung
NK-2	KILRGVCKKIMRTFLRRISKDILTGKK-NH ₂	27	+ 10
C7A	KILRGVAKKIMRTFLRRISKDILTGKK-NH ₂	27	+ 10
C7A-D21K	KILRGVAKKIMRTFLRRISKKILTGKK-NH ₂	27	+ 12
C7A-delta	KILRGVAKKIMRTFLRR ILTGKK-NH ₂	23	+ 10
NK11	KI SK R ILTGKK-NH ₂	11	+ 6
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	26	+ 5

1.3 Liposomen

Liposomen (aus dem Griechischen: *lipos* = Fett und *soma* = Körper), oder auch Lipid-Vesikel wurden das erste Mal 1961 in England durch Alec D. Bangham hergestellt. In dieser Arbeit wurden sie als Zellmembran imitierende Modellmembranen verwendet. Sie bestehen aus einem oder verschiedenen Phospholipiden und können die Eigenschaften natürlicher, biologischer Zellmembranen nachahmen. Um die Liposomen speziellen biologischen Zellmembranen weiter anzugleichen, können zusätzlich noch Modifizierungen vorgenommen werden (Jones 1995). Dazu zählt z.B. das Einfügen von Lipopolysaccharid (LPS), welches ein wesentlicher Bestandteil Gram-negativer Bakterien ist (Hammer et al. 2010), oder das Hinzufügen von Cholesterol (Wessinger 2010).

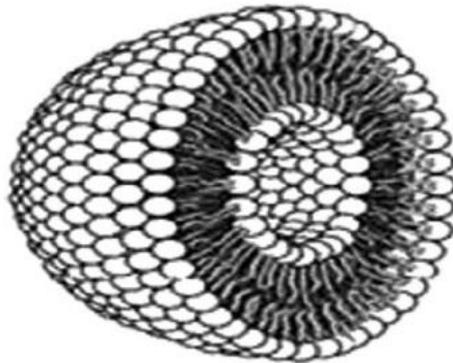


Abbildung 3: Dreidimensionaler Grundaufbau eines Liposoms im Querschnitt (verändert von Tiwari et al. 2012)

In wässrigen Lösungen neigen Liposomen dazu, sphärische, geschlossene und zumeist mehrschichtige, konzentrische Doppelschichten, sogenannte multilamellare Vesikel (MLV), zu bilden (Bangham und Horne 1964; Lasic und Needham 1995). Die Ausrichtung der einzelnen Phospholipide der Lipiddoppelschicht in wässriger Lösung ist dabei so gestaltet, dass die hydrophilen polaren Kopfgruppen nach außen in Richtung der wässrigen Lösung und nach innen zum wässrigen Kern des Liposoms orientiert

EINLEITUNG UND THEORIE

sind, während die Fettsäuren in das Innere der Doppelmembran zeigen und eine lipophile Phase bilden.

Die MLV können durch anschließende Präparationsschritte in große einschichtige Liposomen (englisch: large unilamellar vesicles = LUV) und in kleine einschichtige Liposomen (englisch: small unilamellar vesicles = SUV) überführt werden und zu einer homogenen Größe an LUV vereint werden (siehe 2.2.1). Liposomen können, je nach Präparation, Größen von unter 50 nm bis zu einigen Mikrometern erlangen (Wessinger 2010).

1.4 Phospholipide

Phospholipide bilden die Grundbausteine der Liposomen. Sie sind neben Proteinen, Cholesterol und LPS die Hauptbestandteile natürlicher biologischer Membranen. Phospholipide sind amphiphile Moleküle auf Basis des 1,2-Diacyl-sn-glycerol-3-phosphats, die eine mit dem Phosphatrest veresterte, hydrophile Kopfgruppe tragen. In dieser Arbeit wurden die Phospholipide PC und PS mit den Kopfgruppen Cholin und Serin verwendet.

1.4.1 L- α -Phosphatidylcholin (PC)

PC besteht aus einem Glycerol-Rückgrat, welches an den Positionen 2 und 3 mit je einer Fettsäure verestert ist. Position 1 ist mit Phosphorsäure (Phosphatidylsäure) verestert, welche wiederum mit Cholin verestert ist.

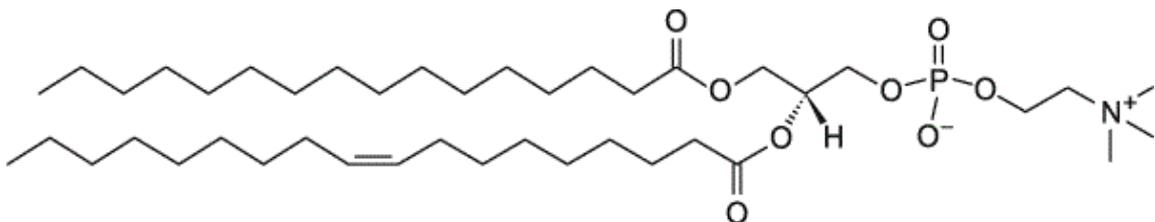


Abbildung 4: Vorherrschende Struktur von L- α -Phosphatidylcholin aus Hühnerei mit einer Reinheit > 99 % (verändert von Avanti Polar Lipids, Inc. (Hg.): Egg PC L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken). Online verfügbar unter <http://www.avantilipids.com/images/structures/840051s.gif>, zuletzt geprüft am 18.07.2015.)

PC ist zwitterionisch und bildet den Hauptbestandteil gesunder, tierischer Zellmembranen (Schröder-Borm et al. 2005).

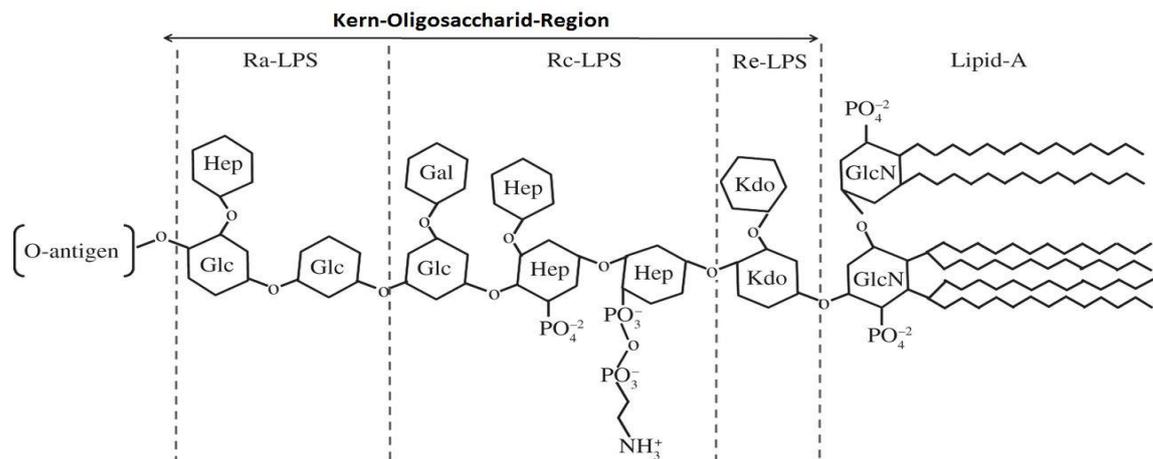


Abbildung 6: Darstellung der Struktur von LPS aus *E. Coli*. (verändert von Clifton et al. 2013). Dargestellt sind die drei Teilbereiche: Lipid-A, welches mit seinen Fettsäuren und N-Acetyl-Glucosamin (GlcN) in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien verankert ist, die Kern-Oligosaccharid-Region, welche an das Lipid-A gebunden und artspezifisch ist, jedoch hauptsächlich aus 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO), Galactose (Gal), Heptose (Hep) und Glucose (Glc) besteht und das O-Polysaccharid, welches aus weiteren spezifischen Hexose-Ketten besteht und als O-Antigen agiert.

Hierbei lassen sich LPS in drei Bereiche einteilen. Diese umfassen das Lipid-A, welches mit seinen Fettsäuren und N-Acetyl-Glucosamin als lipophiler Anteil des Moleküls in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien verankert ist, die Kern-Oligosaccharid-Region, welche hauptsächlich aus 2-Keto-3-desoxy-octonat, Galactose, Heptose und Glucose besteht und das O-Polysaccharid, welches aus weiteren artspezifischen Hexoseketten besteht (Clifton et al. 2013).

Alle drei LPS-Bereiche lassen sich im Wildtyp von Bakterien wiederfinden. LPS wie beispielsweise die Rauhmutter LPS Ra oder die Tiefrauhmutter LPS Re (siehe Abbildung 6), welche mit gekürzten Polysaccharidketten vorkommen, werden von mutierten Bakterienstämmen exprimiert (Clifton et al. 2013).

1.6 Charakterisierung von Liposomen

Die Liposomen und ihre Wechselwirkungen mit amphipatischen Peptiden wurden in dieser Arbeit mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung des Zeta-Potentials (ζ) bei unterschiedlichen Liposom- zu Peptid-Konzentrationen untersucht.

1.6.1 Dynamische Lichtstreuung (Messung des Liposomendurchmessers)

Der Durchmesser der Liposomen wird mittels Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) indirekt über dynamische Lichtstreuung (DLS) gemessen. Dabei wird die Brownsche Molekularbewegung der Teilchen (Liposomen) im Medium (Puffer) vom Gerät durch Bestrahlung der Lösung mit einem Laser und das daraus resultierende Streulicht erfasst. Kleinere Partikel besitzen

EINLEITUNG UND THEORIE

gegenüber größeren Partikeln eine höhere Beweglichkeit, was zu einer höheren Fluktuation des Streulichts führt. Der Detektor erfasst ein Interferenzmuster aus hellen und dunklen Punkten des Streulichts, welches sich durch Fluktuation der Partikel verändert.

Das Verhältnis zwischen Partikelgröße und Brownscher Molekularbewegung wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben. Dabei spielt die Viskosität des Mediums, welche eine Funktion der Temperatur ist, eine wichtige Rolle.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (\text{Gl. 1})$$

D	=	Diffusionskoeffizient in Flüssigkeiten [m ² ·s ⁻¹]
k _B	=	Boltzmann-Konstante [J·K ⁻¹]
T	=	absolute Temperatur [K]
π	=	Pi
η	=	dynamische Viskosität des Lösungsmittels [N·s·m ⁻²]
r	=	Partikelradius [m]

Der Zetasizer misst die Fluktuationen des Streulichts über bestimmte kurze Zeitintervalle. Je kleiner die Partikel und damit je höher die Fluktuation des Streulichts, desto schneller nimmt die Korrelation der über die Zeit gemessenen Signale ab. Eine perfekte Korrelation besitzt den Wert 1, keine Korrelation den Wert 0 (Uni Paderborn Department Chemie).

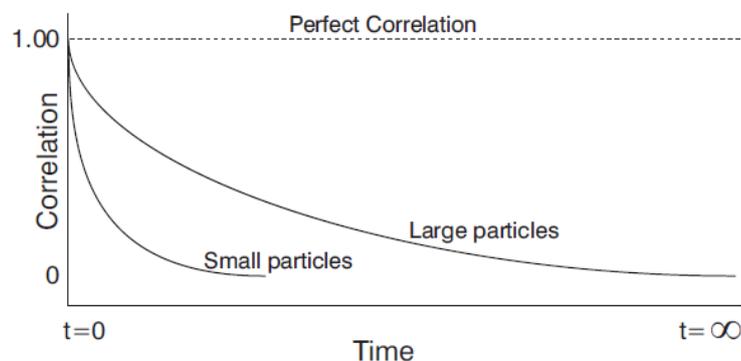


Abbildung 7: Korrelation kleiner und großer Partikel (aus Zetasizer Nano Series User Manual (Malvern Instruments))

Durch entsprechende Algorithmen kann damit sowohl Größe als auch Größenverteilung der Partikel gemessen werden (siehe Abbildung 8).

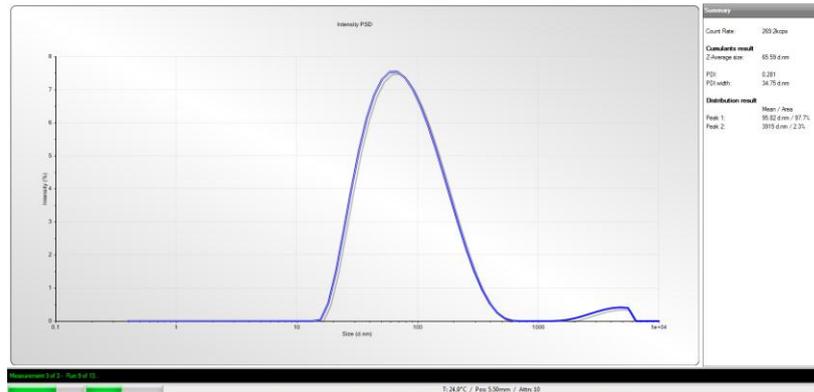


Abbildung 8: Gemessene Größenverteilung von PC80PS20-Liposomen: ~50 μ M Liposomen in Pufferlösung: 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl pH 7,4. Abgebildet ist die Größe in Abhängigkeit von der Intensität in %. Run duration = 10 Sekunden, Run 7 von 13 der ersten Durchmesser-Messung.

1.6.2 Zeta-Potential der Liposomen

Alle Partikel in einer Dispersion weisen ein Zeta-Potential, eine Oberflächenladung, auf. Durch die Messung des Zeta-Potentials eines Partikels lassen sich Vorhersagen über Stabilität und Interaktionen von Partikeln (Liposomen) mit Reaktionspartnern (Peptiden) treffen. Ist das Zetapotential der Partikel besonders positiv oder negativ, stoßen sie sich voneinander ab, was die Dispersion stabilisiert. Nähert sich das Zetapotential hingegen dem Nullpunkt, neigen die Partikel durch Van-der-Waals-Kräfte zu Aggregationen. Die Messung der Änderung des Zeta-Potentials durch Anlagerung von Peptiden an Liposomen in verschiedenen Liposom-Peptid-Verhältnissen dient der Untersuchung dieser Wechselwirkungen und damit der Charakterisierung von Liposomen (Escubed Ltd).

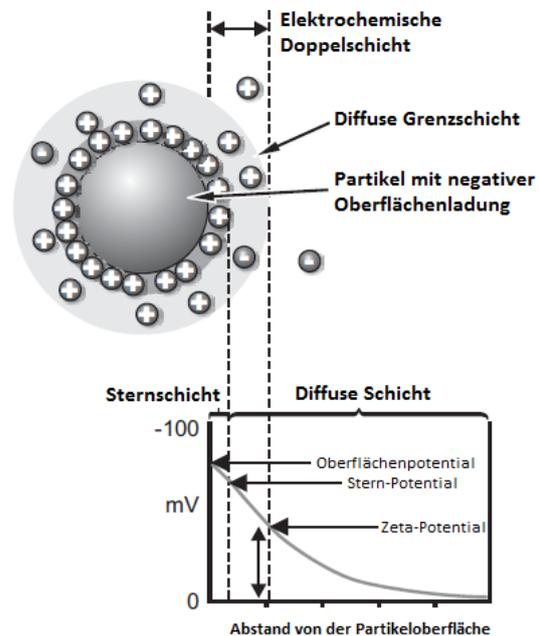


Abbildung 9: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht an der Oberfläche in Lösung befindlicher Partikel (verändert von Zetasizer Nano Series User Manual (Malvern Instruments))

Das Zeta-Potential wird über das elektrische Potential an der Grenzfläche einer festen Phase zu einer umgebenden flüssigen Phase (meist Wasser) gemessen. Es ist von der Zusammensetzung und Viskosität des umgebenden Mediums abhängig.

EINLEITUNG UND THEORIE

Flüssige und feste Phase nehmen entgegengesetzte Ladungen auf. Die Bindungsstärke der Ionen zur Oberfläche des Partikels hängt vom Abstand von Ion zu Partikel ab. Dabei wird sie stärker, je näher sich das Ion am Partikel befindet. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, bildet sich durch Anlagerung von Kationen eine Sternschicht um den Partikel, an der das Stern-Potential gemessen werden kann. Weitere, lockerer gebundene Ionen bilden eine diffuse Grenzschicht um diese Sternschicht. Beide Schichten zusammen werden auch als elektrochemische Doppelschicht oder als Helmholtz-Doppelschicht bezeichnet.

Bewegt sich der Partikel in der Dispersion durch Schwerkraft oder eine angelegte Spannung, entsteht durch Abscheren der locker gebundenen Ionen ein verändertes Ladungsverhältnis, ein Potential, das sog. Zeta-Potential.

Gemessen wird das Zeta-Potential am Zetasizer mittels elektrophoretischer Lichtstreuung (ELS). Dabei werden die Partikel durch eine angelegte Spannung in Bewegung versetzt. Die Fluktuation des Streulichts wird vom Detektor in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Partikel erfasst (elektrophoretische Beweglichkeit).

Zur Berechnung des Zeta-Potentials aus der detektierten elektrophoretischen Beweglichkeit wird die Henry-Gleichung herangezogen.

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot z \cdot f(Ka)}{3 \cdot \eta} \quad (Gl. 2)$$

U_E	=	elektrophoretische Beweglichkeit [A·N·m]
ε	=	Dielektrizitätskonstante [A·s·V ⁻¹ ·m ⁻¹]
z	=	Zeta-Potential [V]
$f(Ka)$	=	Henry Funktion
η	=	dynamische Viskosität des Lösungsmittels [N·s·m ⁻²]

Bei großen Teilchen in wässriger Umgebung mit dünner Doppelschicht wird für die Henry-Funktion $f(Ka)$ der Wert 1,5 eingesetzt. Damit geht die Henry-Gleichung in die Smoluchowski-Gleichung über, mit welcher die Software des Zetasizers arbeitet.

$$U_E = \frac{z \cdot \varepsilon}{\eta} \quad (Gl. 3)$$

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Liposomen definierter Zusammensetzung als Modellsysteme für unterschiedliche Zelltypen präpariert und charakterisiert werden. Liposomen aus PC dienten hierbei als Modellmembran gesunder Zellen. PC- und PS-haltige Liposomen in verschiedenen Verhältnissen zueinander sollten die Oberfläche unterschiedlicher Krebszellen nachbilden. LPS-haltige Liposomen sollten als Modell für die äußere Membran Gram-negativer Zellen verwendet werden.

Ausgewählte amphiphatische Peptide, welche bereits Wirksamkeit in biologischen Tests gezeigt hatten, sollten anschließend hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit den präparierten Liposomen untersucht werden. Hierzu dienten Messungen des Durchmessers und des Zeta-Potentials der Liposomen in verschiedenen Liposom-Peptid-Verhältnissen.

Abschließend sollte, vorbereitend für weitere Arbeiten, ein einfacher, kolorimetrischer Test zur Bestimmung des Phospholipidgehalts der Liposomen etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labormaterialien

Als Verbrauchsmaterialien dienten 100 µl, 2 ml und 5ml Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen für 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl Kolbenhubpipetten der Marke Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg), verschließbare 2 ml Glasvials aus Borosilikat der Firma Roth (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe), 1 ml „Injekt-F“ Spritzen von Braun (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), FCC DTS 1070-Küvetten (gefaltete Einweg-Kapillar-Zellen) von Malvern (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, England), Spritzenfilter mit Porengröße 0,22 µm und Durchmesser von 25 mm von Roth (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe), 15 ml und 50 ml Falcons aus Polypropylen, verschließbare 10 ml Proberöhrchen aus Glas und Nitrilhandschuhe.

Außerdem wurde eine Kolbenhubpipette (0,5-10 µl) der Marke Eppendorf, eine Kolbenhubpipette (10-100 µl) von Brand (Brand GmbH + Co KG, Wertheim), eine Kolbenhubpipette (100-1000 µl) von Gilson (Gilson, Inc., Middleton, USA), wiederverwendbare Quarzglasküvetten SUPRASIL® mit einer Schichtdicke von 10 mm der Marke Hellma® (Hellma® Analytics Müllheim), ein Exsikkator der Glaswerke Wertheim, Kühlboxen, sowie Ständer für Test Tubes und Falcons verwendet.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Molare Masse in g/mol	Hersteller	Artikelnummer	Charge
CH ₃ OH	Pro analysis	32,04	Merck, Darmstadt	1.060.09.1000	-
CHCl ₃	pro analysis	119,38	Merck, Darmstadt	1.024.452.2500	K1287545
FeCl ₃ * 6H ₂ O	pro analysis, ACS, Reag. Ph Eur	270,32	Merck, Darmstadt	1.039.430.250	B130143734
HEPES, PUFFERAN®	≥ 99,5%	238,31	Roth, Karlsruhe	6763.2	133196836
NaCl	≥ 99,5% for analysis, ACS, ISO	58,44	Roth, Karlsruhe	9265.1	473205342
NH ₄ SCN	pro analysis, ACS, ISO, Reag. Ph Eur	76,12	Merck, Darmstadt	1.012.130.500	A972213836
TFA	-	114,02	-	-	-

MATERIAL UND METHODEN

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Photometer	Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Zetasizer	Nano ZS	Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, England
Zentrifuge	miniSpin plus	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex	Reagenzglasschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt
Schüttler	Rocking Platform	VWR International GmbH, Darmstadt
Sonotrode	Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Wasserbad	-	-
pH-Meter	766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

2.1.4 Phospholipide

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Phospholipide

Phospholipid	Herkunft	Mittlere Molmasse (MW) in g/mol	Hersteller	Artikelnummer	Charge-nummer
L- α -Phosphatidylcholin	from chicken egg, powder	770,12	Avanti Polar Lipids Inc., USA/Kanada	840051P	EPC-605
L- α -Phosphatidylserin	from porcine brain in sodium salt, powder	812,05	Avanti Polar Lipids Inc., USA/Kanada	840032P	BPS811

2.1.5 Lipopolysaccharide

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharid	Herkunft	Mittlere Molmasse (MW) in g/mol	Hersteller
LPS Ra (Raummutante)	aus <i>Salmonella enterica</i> (Serovar Minnesota) Stamm R60	4000	Forschungszentrum Borstel, Leibnitz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
LPS Re (Tiefraummutante)	aus <i>E. coli</i> K-12 WBB 01 HL 162 (Stamm ohne Heptosyltransferase)	2500	Forschungszentrum Borstel, Leibnitz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

2.2 Methoden

2.2.1 Liposomenpräparation Phosphatidylserin-haltiger Liposomen

Vor der Präparation von Liposomen wurden alle verwendeten Glasvials mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 gespült und getrocknet, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen.

Die verwendeten Phospholipide wurden in einem ersten Schritt in Chloroform : Methanol im Volumenverhältnis 2 : 1 gelöst und auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt. Anschließend wurden sie in den für die jeweiligen Liposomen gewünschten Volumenverhältnissen (siehe Tabelle 6) zusammen gegeben und durch kurzes Vortexen homogen im Lösungsmittelgemisch verteilt.

Tabelle 6: Übersicht präparierter PS-haltiger Liposomen

Liposom	PC	PS
PC 100	100 %	-
PC : PS (80 : 20)	80 %	20 %
PC : PS (50 : 50)	50 %	50 %
PS 100	-	100 %

Das Lösungsmittelgemisch wurde danach durch Stickstoffbegasung abgedampft, sodass ein dünner, gleichmäßig verteilter Lipidfilm am verwendeten Vial verblieb. Um das Lösungsmittel vollständig vom Lipidfilm zu entfernen, wurde dieser im offenen Vial über Nacht unter Vakuum im Exsikkator getrocknet.

Am Folgetag wurde der wässrige Puffer für die Präparation von Liposomen aus 20 mM HEPES und 150 mM NaCl mit einem pH-Wert von 7,4 auf den Lipidfilm in das Vial gegeben. Das verschlossene Vial wurde eine Minute gevortext, wobei sich der hydratisierte Lipidfilm löste und ein trübes Gemisch multilamellarer Vesikel (MLV) entstand, welche sich aus den Phospholipiden in Form von Phospholipiddoppelschichten bildeten.

In einem weiteren Schritt wurden die MLV durch Energieeintrag mittels Ultraschall in unilamellare Liposomen (SUV) umgeformt. Hierfür wurde die Sonotrode in die Lipidlösung eingetaucht, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Sonotrode weder den Rand, noch den Boden des Vials berührte. Die Suspension wurde mittels Branson Sonifire 250 (200 W Output) bei 15 % Output über einen Zeitraum von zwei Minuten mit konstantem Ultraschalleintrag (Duty Cycle: constant) behandelt, bis eine

MATERIAL UND METHODEN

klare Dispersion zu erkennen und eine gleichmäßige Frequenz der Sonotrode zu hören war. Der Durchmesser der entstandenen unilamellaren Liposomen hing von der Lipidzusammensetzung, der Lipidkonzentration, dem Volumen der Lipiddispersion sowie der Stärke und Dauer des Energieeintrags der Sonotrode ab.

Um möglichst homogene und stabile Liposomen (LUV) zu erhalten, wurde der Behandlung mit Ultraschall ein Temperaturzyklus angehängt. Dabei wurde die Liposomendispersion dreimal aufeinander folgend für jeweils 30 min im Wasserbad auf 62 °C erwärmt und für 30 min auf Eis gekühlt. Während der Wärmebehandlung mittels Thermozyklus brachen die Phospholipiddoppelschichten der unilamellaren Liposomen auf und fügten sich erneut zusammen. SUV neigten dabei aufgrund ihrer hohen Oberflächenspannung dazu, sich mit anderen Liposomen zu vereinen, bis sich ein Gleichgewicht von stabileren LUV einstellte (Castile und Taylor 1999; Akbarzadeh et al. 2013).

Zuletzt wurden die Liposomen vor dem weiteren Gebrauch für eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Diese Ruhezeit sorgte ebenfalls für eine Vereinheitlichung und Stabilisierung der Liposomen.

2.2.2 Liposomenpräparation Lipopolysaccharid-haltiger Liposomen

Lipopolysaccharide sind aufgrund ihres hohen Anteils an polaren Zuckerketten im Vergleich mit Phospholipiden schlechter in Chloroform lösbar. Aus diesem Grunde wurde zunächst untersucht, wie sich die LPS am besten lösen ließen. Nach eingehender Untersuchung wurde entschieden, dem organischen Lösungsmittelgemisch aus Chloroform und Methanol, wie es für die Herstellung von Phosphatidylserin-haltigen Liposomen verwendet wurde, deionisiertes Wasser hinzuzufügen. Das Verhältnis von Chloroform zu Methanol zu deionisiertem H₂O betrug hierbei 12 : 6 : 1 (v : v : v). Die LPS wurden durch Vortexen und fünfminütiges Erhitzen auf 50 °C 1 mM in diesem Gemisch gelöst. Auch das PC wurde zu 1 mM im gleichen Lösungsmittelgemisch gelöst. Anschließend wurden die LPS- und die PC-haltigen Lösungen zu den in Tabelle 7 angegebenen Verhältnissen zusammen gegeben und durch Vortexen homogenisiert. Die Liposomen wurden jeweils einmal mit LPS aus *Salmonella* (LPS Ra) und einmal mit LPS aus *E. coli* (LPS Re) hergestellt.

Tabelle 7 Übersicht präparierter LPS-haltiger Liposomen: Als LPS wurde für die Zusammensetzungen (90 : 10) und (80 : 20) jeweils einmal LPS Ra und einmal LPS Re verwendet. Die Zusammensetzung PC : LPD (70 : 30) erfolgte ausschließlich mit LPS Re

Liposom	PC	LPS
PC : LPSRa/ PC : LPSRe (90 : 10)	90 %	10 %
PC : LPSRa/ PC : LPSRe (80 : 20)	80 %	20 %
PC : LPSRe (70 : 30)	70 %	30 %

Die folgenden Präparationsschritte erfolgten wie in 2.2.1 beschrieben.

2.2.3 Zetasizer-Messungen

Am Zetasizer wurden die Messungen von Durchmesser und Zeta-Potential der in der Dispersion befindlichen Liposomen vorgenommen. Da eine zu hohe Salzkonzentration die Messungen beeinflusst, wurden die hergestellten Liposomen 1 : 20, und der Liposomenpuffer 1 : 15 verdünnt. Hierzu wurden 933 µl Reinstwasser, 16,7 µl Liposomenpuffer und 50 µl Liposomendispersion zusammen gegeben. Somit lagen die Liposomen final in einer Konzentration von 50 µM in 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,4 vor.

Mittels einer „Injekt-F“ 1 ml Spritze wurde die verdünnte Liposomendispersion in eine FCC DTS 1070-Küvette überführt. Die gefüllte Küvette wurde im Zetasizer platziert.

Die Messungen für Durchmesser und Zeta-Potential erfolgten nach je einer „Standard Operating Procedure“ (SOP). Diese sind Tabelle 8 und Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 8: Verwendete SOP für den Durchmesser

SOP Größe	
Material	Polystyrol -Latex; RI 1,590 = Brechungsindex des Materials; die Verteilung der Intensität muss basierend auf dem Volumen oder der Anzahl geändert werden. Im Falle des Rayleigh-Streuers ist RI nicht kritisch
Dispersion	1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl pH 7,4; Temperatur: 25 °C; Viskosität: 0,8417 cP; RI: 1,331; die Dispersionsviskosität wird als Probenviskosität verwendet
Temperatur	25 °C ; Äquilibrierungszeit bei erster Messung 180 s, danach 30 s
Messung	Winkel: 173° Backscatter; NIBS Standard; Dauer: 10 s; Läufe: 13; Zahl der Messungen: 3
Weitere Messdauer	Erweiterte Messdauer für große Partikel -> nein
Messeinstellungen	Positionsmethode: Nach optimaler Position suchen; Automatische Dämpfungsauswahl -> ja
Datenverarbeitung	Analysemodel: genereller Zweck (normale Auflösung)

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9: Verwendete SOP für das Zeta-Potential

SOP Zeta-Potential	
Material	Polystyrol -Latex; RI 1,590 = Brechungsindex des Materials; die Verteilung der Intensität muss basierend auf dem Volumen oder der Anzahl geändert werden. Im Falle des Rayleigh-Streuers ist RI nicht kritisch
Dispersion	1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl pH 7,4; Temperatur: 25 °C; Viskosität: 0,8417 cP; RI: 1,331; Dielektrische Konstante: 78,5
Generelle Optionen	Model: Smoluchowski; f (Ka)-Wert: 1,5; die Dispersionsviskosität wird als Probenviskosität verwendet
Temperatur	25 °C ; Äquilibrierungszeit: 20 s
Zelle	Einfach gefaltete Kapillarzelle DTS 1070
Messung	Manuell: Läufe: 20; Zahl der Messungen: 6
Messeinstellungen	Positionsmethode: Nach optimaler Position suchen; Automatische Dämpfungsauswahl -> ja; Spannung -> 15 V
Datenverarbeitung	Analysemodell: automatischer Modus

Die zu messenden Peptide wurden in steigenden Konzentrationen von 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM und 30 µM zu der Liposomendispersion gegeben. Nach jeder Peptidzugabe wurden erneut eine Messung des Durchmessers und eine Messung des Zeta-Potentials vorgenommen.

2.2.4 Phospholipidbestimmung mittels optimiertem Stewart Assay

Auf Grundlage des Stewart Assays (Stewart 1980) wurde eine einfache kolorimetrische Methode etabliert, die den Phosphatgehalt von Liposomen in Lösung bestimmt. Der Assay basiert auf der Grundlage, dass Phospholipide mit Ammonium-Eisenthiocyanat-Lösung einen farbigen Komplex eingehen. Im Gegensatz zur Ammonium-Eisenthiocyanat-Lösung ist dieser Komplex in Chloroform löslich. Ein weiterer Vorteil dieses Assays besteht darin, dass anorganisches Phosphat keinen störenden Einfluss auf die Messungen hat und somit auch phosphathaltiger Puffer verwendet werden könnte. Der farbige Phospholipidkomplex kann in der Chloroformphase photometrisch in einem weiten Bereich zwischen etwa 380 nm und 520 nm erfasst werden (siehe 3.4). Dabei wurden die Extinktionen in einer Schrittweite von 1 nm ermittelt.

Zu Beginn wurde die beschriebene Methode nach Stewart (Stewart 1980) mit PC im Labor etabliert. Dabei wurden zunächst alle verwendeten Glasgeräte mit Chloroform gespült, um Störreaktionen durch Verunreinigungen auszuschließen. Eine wässrige Ammonium-Eisenthiocyanat-Lösung (AEL) aus 0,4 M NH₄SCN und 0,1 M FeCl₃ · 6H₂O

MATERIAL UND METHODEN

wurde hergestellt. Die Standards der Standardreihe wurden in verschließbaren 10 ml Proberöhrchen aus Glas angesetzt. Für die Standardreihe wurde mit Chloroform eine 90 µg/ml Stocklösung aus PC angesetzt. Daraus wurden Standards zu je 3 ml der Konzentrationen 3 µg/ml, 6 µg/ml, 12 µg/ml, 18 µg/ml, 24 µg/ml, 30 µg/ml, 36 µg/ml, 42 µg/ml, 48 µg/ml und 60 µg/ml hergestellt.

Zu jedem Standard wurden 3 ml der wässrigen AEL gegeben. Anschließend wurden die beiden Phasen (Chloroformphase und wässrige Phase) für 3 min auf dem Schüttler vermischt.

100 µl der 1 mM Liposomenlösungen wurden zu je 3 ml der wässrigen Phase gegeben, anschließend mit 3 ml Chloroform versetzt und ebenfalls für 3 min geschüttelt. Bei dieser Verdünnung der Probe wurde eine Konzentration der Liposomen von 24,8 µg/ml in der Chloroformphase erwartet, was in etwa der mittleren Konzentration der Standardreihe entspricht.

Die Extinktionen der Chloroformphasen ausgewählter Standards wurden zwischen 200 nm und 800 nm ermittelt, um λ_{\max} zu bestimmen. Die Chloroformphase der übrigen Standards und der PC-haltigen Liposomen wurden anschließend bei λ_{\max} gemessen.

Im weiteren Verlauf des Tests wurden die 10 ml Glas-Proberöhrchen der Kalibrierstandards und der Liposomen durch 5 ml Reaktionsgefäße von Eppendorf aus Polypropylen ersetzt. Dieses Vorgehen spart einen Spülschritt mit Chloroform und das Abwaschen der Proberöhrchen und Deckel.

Außerdem wurde das eingesetzte Volumen der Standardreihe und der Probe mit 2 ml auf 2/3 des ursprünglichen Volumens reduziert. Dieses Vorgehen vermindert den anfallenden Abfall an halogenhaltigem Lösungsmittel und Schwermetall. Auch wird durch diese Änderung weniger Liposomendispersion verbraucht. Eine weitere Volumenreduzierung war aufgrund des für die Quarzglasküvetten benötigten Volumens nicht praktikabel.

Außer der Volumenänderung wurden die Massenkonzentrationen der Standardreihe auf molare Konzentrationen abgeändert, um die Ergebnisse im späteren Verlauf mit unterschiedlichen Phospholipiden und Phospholipidgemischen direkt vergleichen zu können.

MATERIAL UND METHODEN

Die Messung der PC-Standardreihe erfolgte in Doppelbestimmung. Zunächst wurde mit Chloroform eine 100 μM Stocklösung aus PC hergestellt, mit welcher anschließend je zwei Standards in den Konzentrationen 0 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 24 μM , 32 μM , 40 μM , 48 μM , 56 μM , 64 μM und 80 μM zu 2 ml angesetzt wurden.

Den Standards wurden entsprechend jeweils 2 ml frisch angesetzter wässriger AEL hinzugefügt. Die beiden Phasen wurden auf dem Schüttler für 3 min vermischt.

Präparierte, PC-haltige Liposomen, welche in einer definierten Konzentration von 1 mM vorlagen, wurden verwendet, um die Wiederfindungsrate (WFR) der Phospholipide zu bestimmen. Hierfür wurden zum einen 50 μl Liposomendispersion in 2 ml der wässrigen Phase gegeben und zum anderen 50 μl Liposomendispersion zweimal in 1 ml Chloroform ausgeschüttelt, zentrifugiert und die Chloroformphasen vereint. Anschließend wurden die Phospholipid-Standards und Liposomen mit wässriger und Chloroformphase für 3 min geschüttelt (je Ansatz 2 ml Chloroformphase und 2 ml wässrige Phase). Es wurde angenommen, dass die Liposomenkonzentrationen durch die Verdünnung von 1 : 40 mit einer finalen Konzentration an Liposomen von 25 μM im ersten Drittel der Standardreihe liegen würden.

Die Extinktionen der Chloroformphasen der Standards und der Liposomen wurden photometrisch zwischen den Wellenlängen 300 nm und 700 nm in einer Schrittweite von 1 nm gemessen, wobei λ_{max} ermittelt wurde.

Das verbesserte Vorgehen für PC-haltige Liposomen wurde mit einer Mischung aus den beiden Phospholipiden PC und PS in (80 : 20) wiederholt. Die präparierten PS -haltigen Liposomen aus PC : PS (80 : 20) mit einer bekannten Konzentration von 1 mM dienten als Überprüfung des Tests hinsichtlich der Wiederfindung. Die Liposomendispersionen wurden zu jeweils 50 μl in die wässrige Phase und in weiteren Ansätzen zu 50 μl direkt in die Chloroformphase, zu 50 μl viermal in je 0,5 ml Chloroform ausgeschüttelt, zweimal ausgeschüttelt in je 1 ml Chloroform und einmal ausgeschüttelt in 2 ml Chloroform, gegeben, um die beste Vorgehensweise zu ermitteln. Die Ausschüttel-Schritte erfolgten mittels Vortex für jeweils 1 min. Nach den Ausschüttel-Schritten wurden die Phasen durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm getrennt und die Chloroformphasen vereint. Das weitere Vorgehen erfolgte wie beim vorherigen Test beschrieben (Phasen schütteln, Extinktion der Chloroformphase messen).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der präparierten L- α -Phosphatidylcholin- und L- α -Phosphatidylserin-haltigen Liposomen

Die präparierten Liposomen wurden mittels Zetasizer hinsichtlich ihres Durchmessers und Zeta-Potentials untersucht. Die ermittelten Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Durchmesser und Zeta-Potential der präparierten PC-- und PS-haltigen Liposomen

Liposom	Mittelwert ϕ [nm]	Standard-abweichung ϕ	Mittelwert z [mV]	Standard-abweichung z
PC 100	103,7	11,0	-5,8	3,8
PC : PS (80 : 20)	65,8	3,1	-51,5	7,5
PC : PS (50 : 50)	76,0	12,4	-59,7	5,1
PS 100	52,9	4,6	-52,3	10,6

Die Werte stammen aus jeweils zwei Präparationen zu je sieben Doppelbestimmungen. Pro Bestimmung wurden der Durchmesser dreimal und das Zeta-Potential sechsmal gemessen. Final ergeben sich die Werte also aus 84 Durchmesser- und 168 Zeta-Potential-Messungen je Liposomenart.

Das Zeta-Potential nimmt bei allen Liposomen mit PS-Anteilen einen ähnlichen Wert an. Bei den Liposomen ohne PS ist das Zeta-Potential sehr gering und annähernd bei null, was möglicherweise zu dem etwas größeren Durchmesser geführt hat.

3.2 Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit präparierten Liposomen

Die Charakterisierung der präparierten Liposomen hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Peptiden erfolgte mittels Messungen von Durchmesser und Zeta-Potential. Hierbei wurden die Peptide in ansteigenden Konzentrationen zu den Liposomen gegeben und diese nach jeder Peptidzugabe am Zetasizer gemessen. Die Anlagerung von Peptiden an der Oberfläche von Liposomen führt zu messbaren Veränderungen der ursprünglichen Werte von Durchmesser und Zeta-Potential.

Der Durchmesser der Liposomen wird vom Zetasizer über die Messung der Brownschen Molekularbewegung durch „Dynamische Lichtstreuung“ (DLS) und unter Verwendung der durch Mark-Houwink etablierten Gleichung ermittelt. Partikel mit größerem Durchmesser bewegen sich in einer Flüssigkeit langsamer als kleine Partikel, sodass über schnell aufeinanderfolgende Momentaufnahmen die Bewegung und damit der Durchmesser der in Lösung befindlichen Liposomen bestimmt wird.

Das Zeta-Potential wird durch eine Kombination von Elektrophorese mit der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Bei Anlegen einer Spannung bewegen sich die im Medium befindlichen Teilchen durch elektrostatische Anziehung mit einer bestimmten Geschwindigkeit in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Über diese elektrophoretische Beweglichkeit im elektrischen Feld und die Smoluchowski-Gleichung für Partikel in wässrigen Medien wird das Zeta-Potential bestimmt. Dabei gilt: Je höher die elektrophoretische Beweglichkeit, desto höher das Zeta-Potential.

3.2.1 Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin

Die Liposomen, die ausschließlich aus PC präpariert wurden sind zwitterionisch und besitzen keine negative Nettoladung. Dies hat zur Folge, dass zwischen den kationischen Peptiden und den Liposomen so gut wie keine elektrostatischen Wechselwirkungen auftreten.

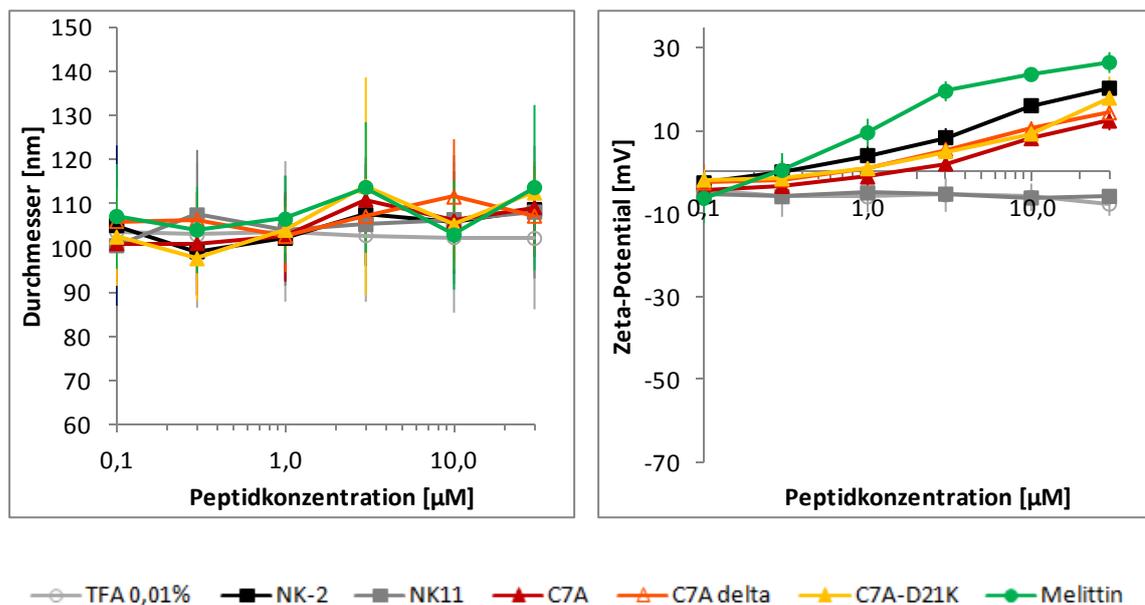


Abbildung 10: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung: Die Liposomen und Peptide wurden in einem Puffer aus 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Die Peptide NK-2, NK11, C7A, C7A delta, C7A-D21K, und Melittin sowie des Peptidpuffers TFA 0,01 % wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1,0 μM , 3,0 μM , 10,0 μM und 30,0 μM zu den Liposomen gegeben. Die Liposomen lagen in einer Konzentration von 50 μM vor; die Bestimmungen der Werte der Durchmesser erfolgten mit zwei unabhängigen Präparationen zu je drei Messungen; die Bestimmungen der Werte der Zeta-Potentiale mit zwei unabhängigen Präparationen zu je sechs Messungen.

Abbildung 10 zeigt beim Zeta-Potential, dass das unspezifisch wirkende Melittin, gefolgt vom NK-2, am stärksten mit den Liposomen wechselwirkt. Das biologisch inaktive NK11 und der Peptidpuffer TFA gingen hingegen keine Wechselwirkungen mit den Liposomen ein. Insgesamt findet zwischen den aktiven Peptiden und den Liposomen nur geringe Wechselwirkung statt. Die Durchmesser der Liposomen schwankten zwischen etwa 85 nm und 150 nm, veränderten sich jedoch über die Messungen nur unwesentlich. Das Zeta-Potential änderte sich bei den Wechselwirkungen der kationischen Peptide der C7A-Varianten und NK-2 mit den Liposomen von leicht negativ bis hin zu Werten von 10 mV bis 20 mV.

3.2.2 Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 80 : 20

Durch ihren Anteil an PS besitzen Liposomen mit einem Verhältnis PC : PS (80 : 20) eine negative Nettoladung, was dazu führt, dass sich die positiv geladenen Peptide durch elektrostatische Anziehungskräfte besser an die Oberfläche der Liposomen anlagern können.

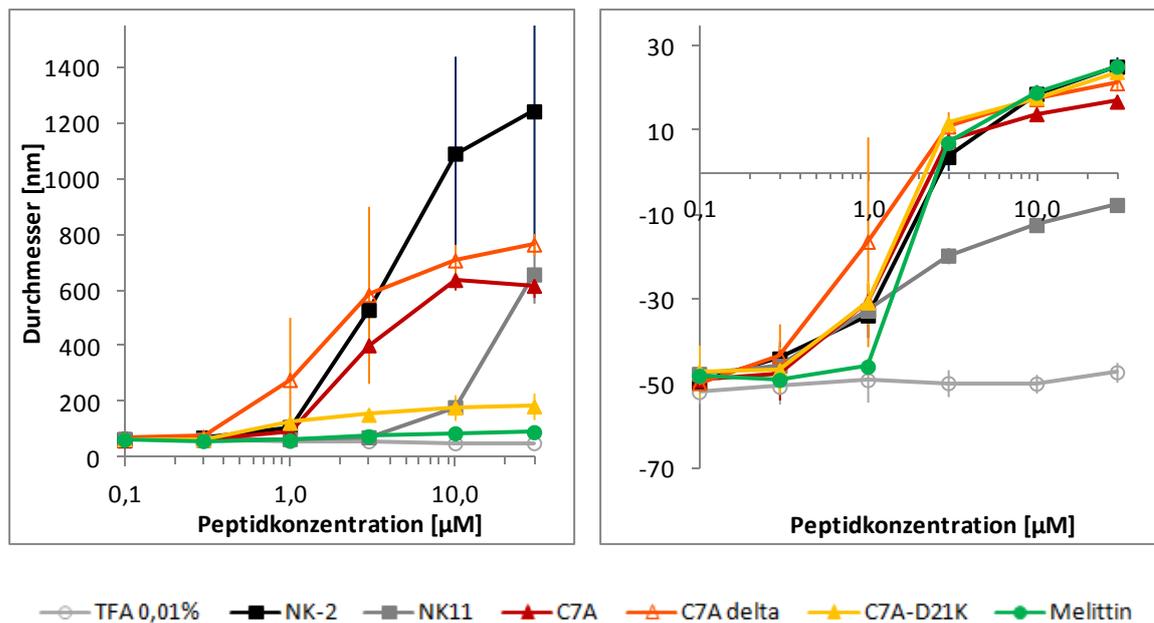


Abbildung 11: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis PC : PS (80 : 20) mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung: Die Liposomen und Peptide wurden in einem Puffer aus 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Die Peptide NK-2, NK11, C7A, C7A delta, C7A-D21K und Melittin sowie des Peptidpuffers TFA 0,01 % wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1,0 μM , 3,0 μM , 10,0 μM und 30,0 μM zu den Liposomen gegeben. Die Liposomen lagen in einer Konzentration von 50 μM vor; die Bestimmungen der Werte der Durchmesser erfolgten mit zwei unabhängigen Präparationen zu je drei Messungen, die Bestimmungen der Werte der Zeta-Potentiale mit zwei unabhängigen Präparationen zu je sechs Messungen.

Alle Peptide lagern bereits bei einer Konzentration zwischen 1 μM und 3 μM an die Liposomen an und verändern dabei das Zetapotential signifikant bis hin zur Ladungsumkehr (bis auf das biologisch inaktive NK11, welches lediglich die Negativität des Zeta-Potentials etwas verringert). Ab einem Zeta-Potential von etwa 0 mV beginnen die Liposomen, besonders bei NK-2, C7A-delta, C7A und NK11, einen größeren Durchmesser anzunehmen, was vermutlich auf Aggregationen durch Van-der-Waals-Kräfte zurück geführt werden kann.

3.2.3 Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 50 : 50

Die Liposomen aus PC : PS (50 : 50) starten bei einem noch geringeren Zeta-Potential als die Liposomen aus PC : PS (80 : 20), was auf den größeren Anteil an PS zurückgeführt werden kann.

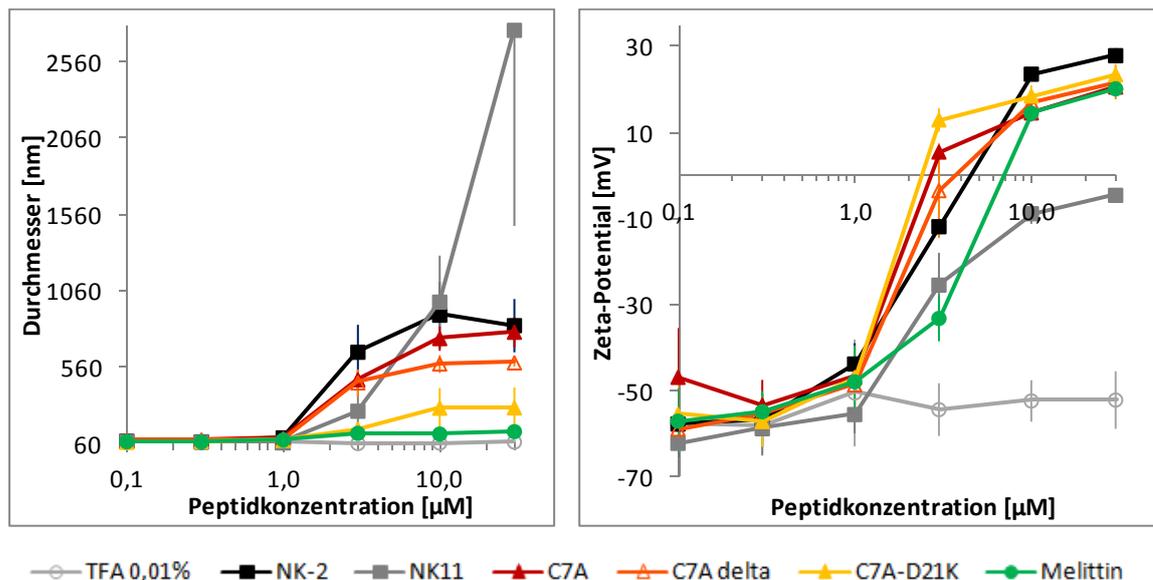


Abbildung 12: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis PC:PS (50:50) mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung: Die Liposomen und Peptide wurden in einem Puffer aus 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Die Peptide NK-2, NK11, C7A, C7A delta, C7A-D21K und Melittin sowie des Peptidpuffers TFA 0,01 % wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1,0 μM , 3,0 μM , 10,0 μM und 30,0 μM zu den Liposomen gegeben. Die Liposomen lagen in einer Konzentration von 50 μM vor; die Bestimmungen der Werte der Durchmesser erfolgten mit zwei unabhängigen Präparationen zu je drei Messungen, die Bestimmungen der Werte der Zeta-Potentiale mit zwei unabhängigen Präparationen zu je sechs Messungen.

Auch bei diesen Liposomen ist zwischen den Peptidkonzentrationen 1 μM und 3 μM ein deutlicher Sprung des Zeta-Potentials zu erkennen, wobei das biologisch inaktive NK11 zwar auch mit den Liposomen zu interagieren scheint, jedoch wesentlich geringer. Bei Erreichen eines Zeta-Potentials von 0 mV ist auch hier ein deutlicher Anstieg des Liposomendurchmessers zu erkennen. Besonders fällt hier die Aggregation der Liposomen mit einer Peptidzugabe von 30 μM NK11 auf.

3.2.4 Wechselwirkungen von amphiphatischen Peptiden mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylserin

Die Liposomen, die ausschließlich aus PS präpariert wurden, enthalten ausnahmslos negative Nettoladungen. Dennoch beginnen sie bei einem ähnlichen Zeta-Potential wie die Liposomen aus PC : PS (50 : 50).

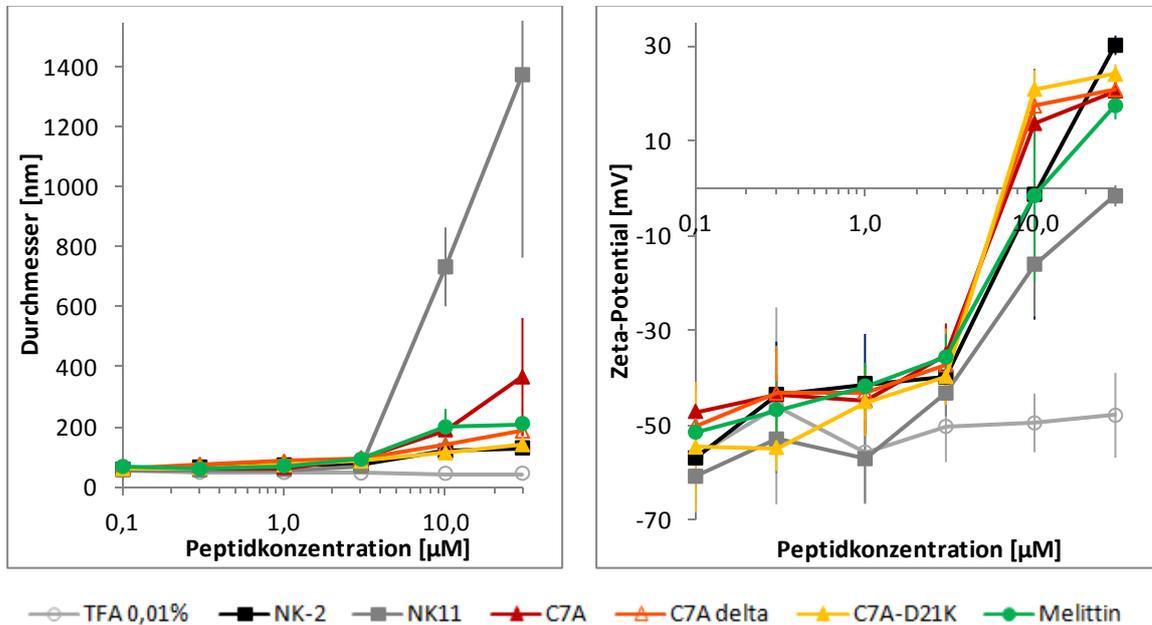


Abbildung 13: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylserin mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung: Die Liposomen und Peptide wurden in einem Puffer aus 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Die Peptide NK-2, NK11, C7A, C7A delta, C7A-D21K und Melittin sowie des Peptidpuffers TFA 0,01 % wurden in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1,0 μM , 3,0 μM , 10,0 μM und 30,0 μM zu den Liposomen gegeben. Die Liposomen lagen in einer Konzentration von 50 μM vor; die Bestimmungen der Werte der Durchmesser erfolgten mit zwei unabhängigen Präparationen zu je drei Messungen, die Bestimmungen der Werte der Zeta-Potentiale mit zwei unabhängigen Präparationen zu je sechs Messungen.

Die Peptide beginnen sich trotz ihrer positiven Nettoladung erst bei höheren Konzentrationen von 3 μM bis 10 μM an die Liposomen anzulagern, was möglicherweise mit ihrer ungünstigeren sterischen Ausrichtung durch das Fehlen von PC in den Liposomen zu erklären ist. Eine Ausnahme hinsichtlich des Durchmessers bildet hier das biologisch inaktive NK11, welches bei diesen Liposomen ähnlich wechselwirkt, wie die anderen Peptide. Es scheint bereits bei einem negativen Zeta-Potential zu starker Aggregatbildung mit den Liposomen zu neigen.

3.2.5 Wechselwirkungen von Peptiden ohne Liposomen

Werden die Peptide ohne Liposomen in den Liposomenpuffer gegeben, bilden sie, vermutlich durch ihre amphiphile Struktur bedingt, Aggregate in einer Größenordnung von etwa 100 nm bis 300 nm aus, die sich bei steigender Peptidkonzentration auf einen, dem Peptid spezifischen, energetisch günstigen Wert einpendeln.

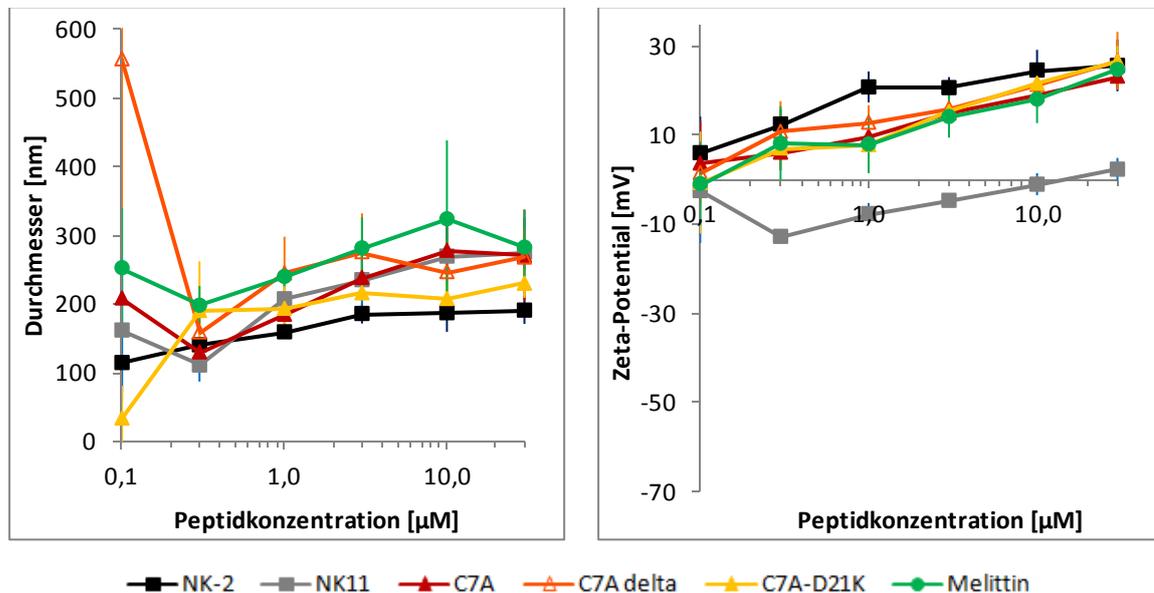


Abbildung 14: Messungen der Peptide in ohne Liposomen mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung: Die Peptide wurden in einem Puffer aus 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Die Peptide NK-2, NK11, C7A, C7A delta und C7A-D21K wurden in den Konzentrationen 0,1 µM, 0,3 µM, 1,0 µM, 3,0 µM, 10,0 µM und 30,0 µM in den Puffer gegeben. Die Bestimmungen der Werte der Durchmesser erfolgten mit zwei unabhängigen Präparationen zu je drei Messungen, die Bestimmungen der Werte der Zeta-Potentiale mit zwei unabhängigen Präparationen zu je sechs Messungen.

Zu erkennen ist, dass das Zeta-Potential der Peptide etwa proportional zu ihrem Aggregat-Durchmesser zunächst leicht ansteigt und sich dann auf einen Wert einpendelt.

3.3 Herstellung und Stabilitätstest von LPS-haltigen Liposomen

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht, Liposomen aus PS mit einer Rauhmutter (Ra) und einer Tiefrauhmutter (Re) von LPS herzustellen. Begonnen wurde hierbei mit den Liposomen, welche LPS Ra enthielten und durch ihre noch relativ lange Zuckerkette ein mittleres Molekulargewicht von etwa 4000 g/mol besaßen.

Das Lösen in Chloroform- und Methanol-haltigen Lösungsmitteln stellte sich aufgrund des langen hydrophilen Zuckerketten-Anteils als schwierig heraus. Bei den Verhältnissen Chloroform : Methanol 2 : 1, 1 : 1 und 1 : 2 (v : v) ließ sich das LPS weder mit Wärmebehandlung von 50 °C über einen Zeitraum von 5 min noch mittels

zusätzlicher Ultraschallbehandlung lösen. Erst nach Zugabe eines geringen Anteils an deionisiertem H₂O in einem Volumenverhältnis von Chloroform : Methanol : deionisiertem H₂O von 12 : 6 : 1 und fünfminütigem Erhitzen auf 50 °C ließ sich das LPS Ra weitestgehend lösen, wobei ein Rest unlösbares LPS Ra an der Glaswandung des Vials verblieb.

Mit diesem Lösungsmittelgemisch wurde das kurzkettigere LPS Re, welches ein mittleres Molekulargewicht von etwa 2500 g/mol besitzt, bei 50 °C über einen Zeitraum von 5 min vollständig gelöst.

Beide zu 1 mM gelösten LPS wurden in den Verhältnissen PC90LPS10, PC80LPS20 (LPS Re zusätzlich im Verhältnis PC70LPS30) mit 1 mM, ebenfalls in diesem Lösungsmittelgemisch gelöstem, PC zusammen gegeben. Anschließend wurde das Gemisch aus PC und LPS wie in 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben weiter behandelt.

Von den wässrigen Liposomdispersionen wurden nach 2, 5 und 7 Tagen Größe und Zeta-Potential gemessen. Die gemessenen Werte sind in Abbildung 15 zu sehen.

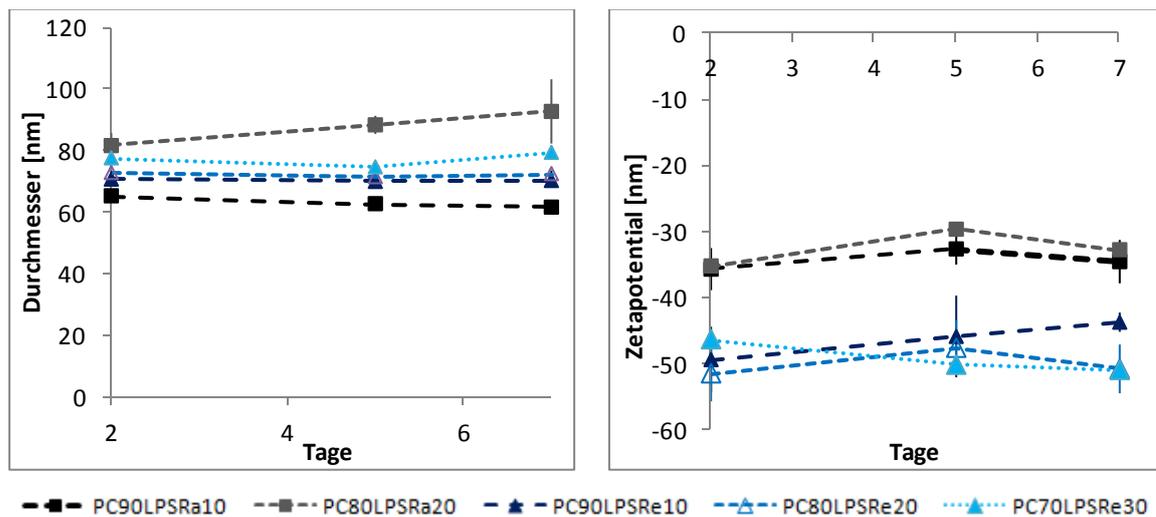


Abbildung 15: Stabilitätstest der LPS-haltigen Liposomen mittels Messung des Durchmessers in nm (links) und des Zeta-Potentials in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung: die Liposomen wurden in einer Konzentration von 50 µM in 1,33 mM HEPES + 10 mM NaCl bei pH 7,4 nach zwei, fünf und sieben Tagen gemessen.

Der Durchmesser aller präparierten Liposomen liegt zwischen 60 nm und 95 nm. Dabei stiegen die Durchmesser der Liposomen mit steigendem Anteil an LPS leicht an. Im Zeta-Potential unterscheiden sich die Liposomen der jeweiligen LPS-Variante kaum. Die Zeta-Potentiale der LPS Ra-haltigen Liposomen lagen zwischen etwa -30 mV und -38 mV, während die Zeta-Potentiale der LPS Re-haltigen Liposomen mit negativeren Werten zwischen -45 mV und -53 mV gemessen wurden.

3.4 Etablierung und Optimierung eines Tests zur Konzentrationsbestimmung von Phospholipiden

Für die bisher in dieser Arbeit beschriebenen Messungen an Liposomen wurde die Lipidkonzentration durch eine exakte Einwaage festgelegt. Eine Konzentrationsbestimmung erübrigte sich daher.

Weiterführende Arbeiten, in denen Liposomen zum Beispiel extrudiert oder über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt werden, machen eine Konzentrationsbestimmung jedoch unerlässlich. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein kolorimetrischer Test etabliert, mit dessen Hilfe, angelehnt an das Phosphatassay nach Stewart (Stewart 1980), die Lipidkonzentrationen PC- und PS-haltiger Liposomen bestimmt werden können.

Der Test wurde, wie in 2.2.4 beschrieben, hinsichtlich der eingesetzten Volumina und verwendeten Materialien sowie der Art der Liposomenzugabe den für die Messungen benötigten Anforderungen angepasst. Außerdem wurden für die Standardreihen der Phospholipide Stoffmengenkonzentrationen statt Massenkonzentrationen verwendet. Der Gehalt an Phospholipiden in den gemessenen, präparierten Liposomen ließ sich auf diese Weise zuverlässig nachweisen.

Ein einheitliches Vorgehen bei der Durchführung des Tests wurde festgelegt:

- Alle Glasgeräte werden vor Gebrauch mit Chloroform gespült.
- Ammonium-Eisenthioocyanat-Lösung wird aus 0,4 M NH_4SCN und 0,1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mit deionisiertem H_2O angesetzt.
- Stocklösung wird aus 100 μM in Chloroform gelösten Phospholipiden hergestellt.
- Aus der Stocklösung und Chloroform werden Standards mit den Konzentrationen 0 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 24 μM , 32 μM , 40 μM , 48 μM , 56 μM , 64 μM und 80 μM zu je 2 ml hergestellt.
- 50 μl der 1 mM Liposomendispersion werden nacheinander zweimal mit 1 ml Chloroform für 1 min ausgeschüttelt (gevortext), 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und beide Phasen vereint
- Auf die Standards und die ausgeschüttelten Liposomendispersionen werden 2 ml wässrige Ammonium-Eisenthioocyanat-Lösung geben.
- Die Chloroformphase und die wässrige Phase der Standards und Liposomen werden für 3 min auf dem Schüttler vermischt (auf Abbildung 16 ist eine auf diese Weise behandelte, exemplarische Standardreihe zu sehen).



Abbildung 16: Exemplarische Standardreihe von PC : PS (80 : 20): Konzentration der Phospholipide von links nach rechts $0\ \mu\text{M}$, $4\ \mu\text{M}$, $8\ \mu\text{M}$, $16\ \mu\text{M}$, $24\ \mu\text{M}$, $32\ \mu\text{M}$, $40\ \mu\text{M}$, $48\ \mu\text{M}$, $56\ \mu\text{M}$, $64\ \mu\text{M}$ und $80\ \mu\text{M}$. Die Phospholipide wurden in Chloroform gelöst, mit gleichem Volumen wässriger AEL zusammen gegeben und für 3 min bei höchster Stufe auf dem Schüttler geschüttelt.

- Die Extinktionen der Chloroformphasen der Standards und der ausgeschüttelten Liposomen werden in Quarzglasküvetten zwischen den Wellenlänge 300 nm bis 700 nm mit einer Schrittweite von 1 nm gemessen.
- Das Extinktionsmaximum und die Geradengleichung der Standardreihe beim Extinktionsmaximum werden ermittelt. Die Liposomenkonzentration wird anhand von Extinktion und Geradengleichung der Standards ermittelt.

Anschließend wurden die Extinktionen der Standards in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 700 nm mit einer Schrittweite von 1 nm photometrisch gemessen. Die Extinktionsmaxima der Standards wurden je Liposomenart separat ermittelt. Bei dem zugehörigen Wellenlängen-Maximum wurde die Kalibrierreihe jeweils erstellt.

Die Konzentrationen der Phospholipide in den Liposomen wurden anhand der Messungen der Extinktionen der behandelten Liposomdispersionen über die Geradengleichung der Kalibrierreihe ermittelt.

3.4.1 Phosphat-Test für Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin

In Abbildung 17 sind die Extinktionen der eingewogenen, in Chloroform gelösten und nach 2.2.4 aufgearbeiteten L- α -Phosphatidylcholin-Standards zwischen den Wellenlängen 300 nm und 700 nm zu sehen.

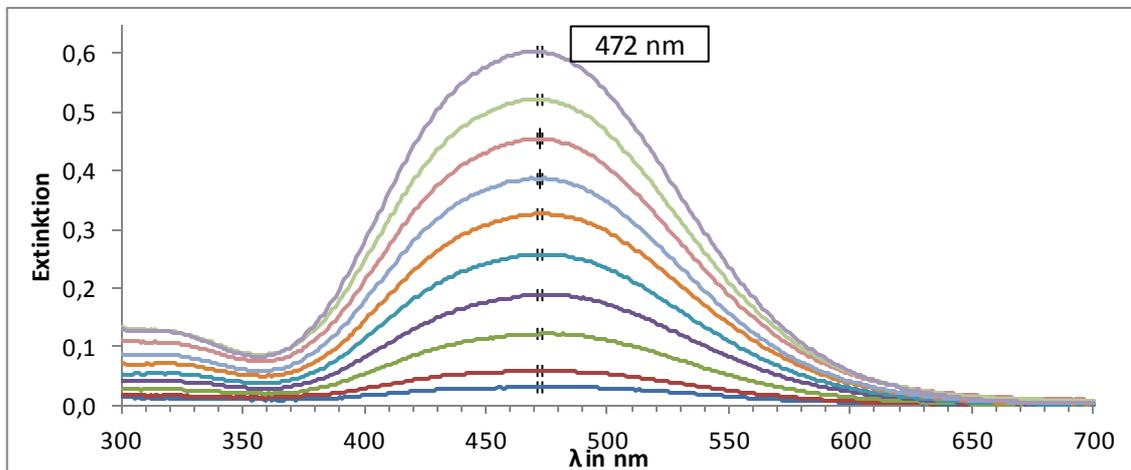


Abbildung 17: Photometrische Aufnahme der Standards von L- α -Phosphatidylcholin: Eine Präparation mit zwei unabhängigen Messungen über die Wellenlängen 300 nm bis 700 nm mit einer Schrittweite von 1 nm (Standard 80 μ M wurde nur einmal erfasst); Das Phospholipid wurde eingewogen, entsprechend der Standardkonzentrationen mit Chloroform verdünnt, 3 min mit AEL im Verhältnis Chloroform : AEL (50 :50) gemischt und in der Chloroformphase photometrisch erfasst; Die Standards enthielten (im Diagramm von unten nach oben) folgende Konzentrationen an Phospholipid: 4 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 24 μ M, 32 μ M, 40 μ M, 48 μ M, 56 μ M, 64 μ M und 80 μ M; das Extinktionsmaximum wurde bei der Wellenlänge 472 nm ermittelt.

Das Extinktionsmaximum von in Chloroform gelöstem L- α -Phosphatidylcholin wurde bei einer Wellenlänge von 472 nm festgestellt. Der Wellenlängenbereich, in welchem die Extinktionen von Standards derselben Wellenlänge annähernd proportional zur Konzentration verlaufen, ist verhältnismäßig breit und liegt zwischen etwa 450 nm und 500 nm.

Die bei 472 nm aufgenommene Kalibrierreihe der PC-Standards ist in Abbildung 18 zu sehen. Es wurde ein Mittelwert aus zwei unabhängigen Präparationen mit je zwei unabhängigen Messungen vorgenommen.

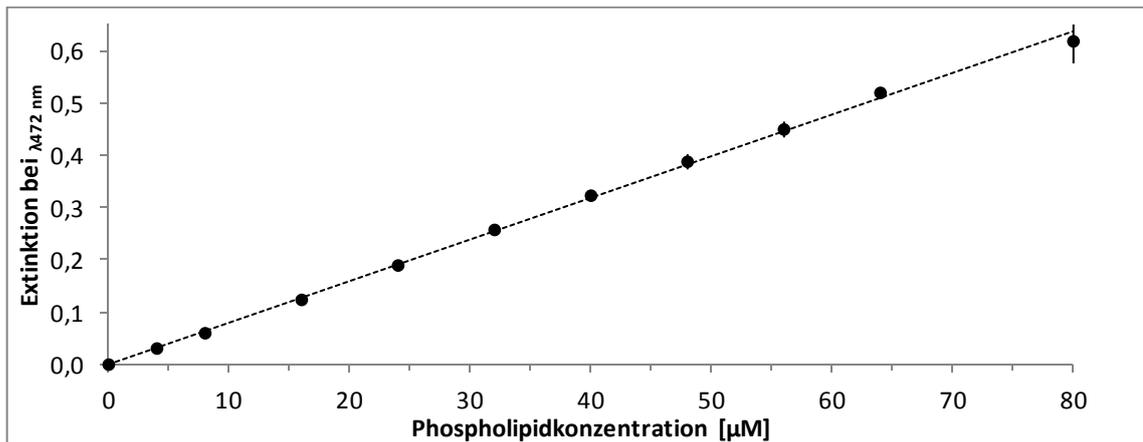


Abbildung 18: Kalibrierreihe von L- α -Phosphatidylcholine bei einer Wellenlänge von 472 nm: Die Standards wurden zu folgenden Konzentrationen an Phospholipid hergestellt: 4 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 24 μ M, 32 μ M, 40 μ M, 48 μ M, 56 μ M, 64 μ M und 80 μ M; Die Kalibrierreihe wurde in zwei unabhängigen Präparationen mit je zwei unabhängigen Messungen bei Wellenlänge 472 nm erfasst; die Geradengleichung der Kalibrierreihe beträgt $y = 0,008 x$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9998$.

Der lineare Zusammenhang von Standardkonzentration zur Extinktion konnte im gewählten Konzentrationsbereich gut belegt werden.

Die Liposomen wurden vor der Messung unterschiedlich behandelt. So wurde die wässrige Liposomenlösung zum einen direkt in die wässrige Phase und zum anderen zunächst durch zweimaliges Ausschütteln mit Chloroform in die Chloroformphase gebracht. Bei beiden Vorgehensweisen betrug der Verdünnungsfaktor der 1 mM Liposomendispersion $F = 40$. Die Lösungen wurden mit der jeweils anderen Phase (wässrige Phase bzw. Chloroformphase) für drei Minuten gemischt. Der dadurch in die Chloroformphase übergegangene Farbkomplex aus Ammonium-Eisenthiocyanat und Phospholipid ließ sich anschließend photometrisch erfassen. Es wurden jeweils zwei unabhängige Messungen aus zwei Liposomen-Präparationen vorgenommen. Über die Geradengleichung, F und die Extinktion der gemessenen Phospholipid-Farbkomplexe der Liposomen ließ sich die Konzentration der Liposomen ermitteln und mit der durch die Einwaage der Liposomen angenommenen Konzentration von 1 mM vergleichen (Wiederfindung in %). Das Ergebnis hierzu ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Photometrische Messung der Liposomen aus PC bei 472 nm aus zwei unabhängigen Präparationen und je zwei unabhängigen Messungen

Behandlung	Mittelwert Extinktion bei $\lambda_{472 \text{ nm}}$	Standardabweichung Extinktion	F	c Messung in mM			c Präp. in mM	WFR in %
direkt in wässrige Phase gegeben	0,168	0,0092	40	0,84	+ -	0,05	1,00	84
2 x in 1 ml Chloroform aus-geschüttelt	0,226	0,0176	40	1,13	+ -	0,09	1,00	113

Die Abweichung der gemessenen Konzentrationen von der durch die Einwaage der Liposomenpräparation angenommenen Konzentration von 1 mM ist bei beiden Behandlungsweisen etwa gleich groß. Allerdings liegt sie bei der direkten Zugabe der Liposomen zu der wässrigen Phase unterhalb, während sie bei den zuvor in Chloroform ausgeschüttelten Liposomen etwas oberhalb der erwarteten Konzentration von 1 mM liegt. Dies ließ vermuten, dass die Liposomen vollständiger erfasst werden konnten, welche, wie die Phospholipide der Kalibrierstandards, zunächst vollständig in Chloroform gelöst wurden.

3.4.2 Phosphat-Test für Liposomen aus

L- α -Phosphatidylcholin : L- α -Phosphatidylserin (80 : 20)

Die Standards aus L- α -Phosphatidylcholin : L- α -Phosphatidylserin (80 : 20) wurden in zwei unabhängigen Präparationen mit je zwei unabhängigen Messungen über einen Wellenlängenbereich von 300 nm bis 700 nm aufgenommen und sind in Abbildung 19 dargestellt.

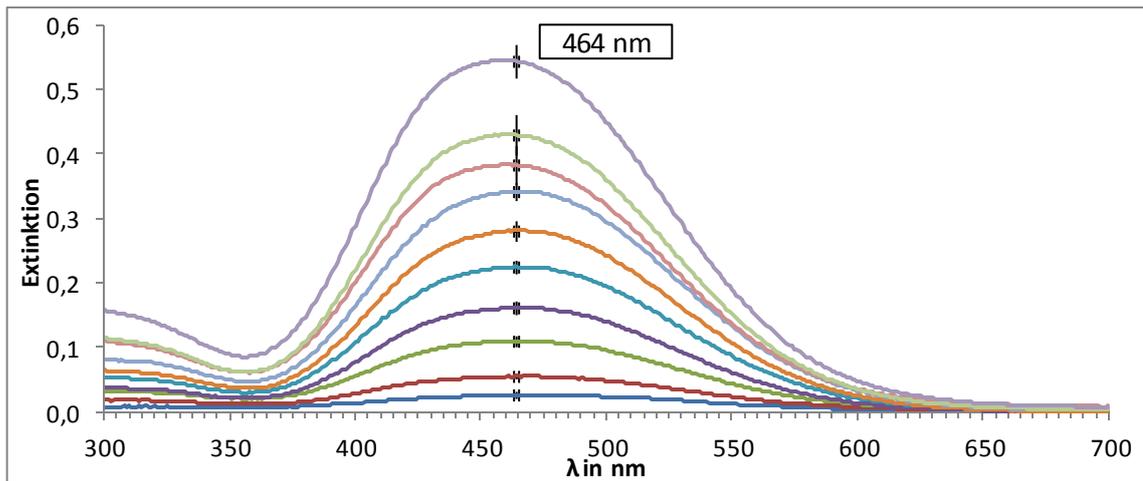


Abbildung 19: Photometrische Aufnahme der Standards von PC: PS (80 : 20): Zwei unabhängige Präparationen in zwei unabhängigen Messungen über die Wellenlängen 300 nm bis 700 nm mit einer Schrittweite von 1 nm; Die Phospholipide wurde eingewogen, im Verhältnis PC : PS (80 : 20) gemischt, entsprechend der Standardkonzentrationen mit Chloroform verdünnt, 3 min mit AEL im Verhältnis Chloroform : AEL (50 : 50) gemischt und in der Chloroformphase photometrisch erfasst; Die Standards enthielten (im Diagramm von unten nach oben) folgende Phospholipid-Konzentrationen: 4 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 24 μ M, 32 μ M, 40 μ M, 48 μ M, 56 μ M, 64 μ M und 80 μ M; das Extinktionsmaximum wurde bei der Wellenlänge 464 nm ermittelt.

Das Extinktionsmaximum der Standards wurde bei 464 nm ermittelt und für die in Abbildung 20 dargestellte Kalibrierreihe verwendet. Auch bei dieser Messung zeigt sich ein relativ großer Wellenlängenbereich von 440 nm bis 495 nm, in dem die Standardkonzentration proportional zur Standardextinktion verläuft.

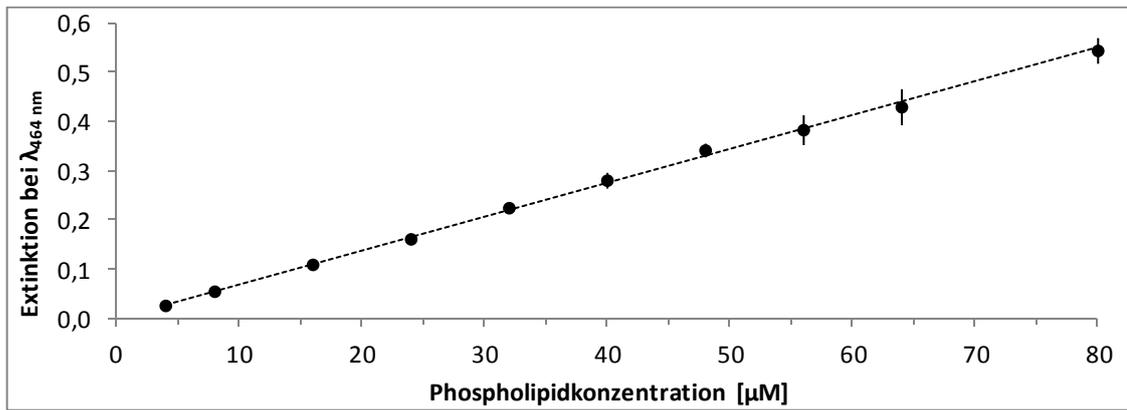


Abbildung 20: Kalibrierreihe von L-α-Phosphatidylcholine : L-α-Phosphatidylserin (80 : 20) bei einer Wellenlänge von 464 nm; Die Standards wurden zu folgenden Konzentrationen an Phospholipid hergestellt: 4 µM, 8 µM, 16 µM, 24 µM, 32 µM, 40 µM, 48 µM, 56 µM, 64 µM und 80 µM; Die Kalibrierreihe wurde in zwei unabhängigen Präparationen mit je zwei unabhängigen Messungen bei Wellenlänge 464 nm erfasst; die Geradengleichung der Kalibrierreihe beträgt $y = 0,0069 \cdot x$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9986$.

Die Konzentrationen der Standards der Kalibrierreihe liegen proportional zu den Extinktionswerten vor und weichen in den einzelnen Messungen vernachlässigbar gering voneinander ab. Daher kann die Steigung der Kalibrierreihe für die Konzentrationsbestimmung der Liposomen verwendet werden.

Wie die Liposomen aus PC, wurden auch die Liposomen PS : PS (80 : 20) zum einen direkt in die wässrige Phase gegeben und zum anderen vorher 1 min in Chloroform ausgeschüttelt. Diesmal wurden die Anzahl der Ausschüttelschritte und Volumina, wie in Tabelle 12 beschrieben, variiert. Außerdem wurde die Liposomenlösung direkt in die Chloroformphase gegeben, ohne darin vorher ausgeschüttelt zu werden. Alle Messungen erfolgten anhand einer unabhängigen Präparation in Doppelbestimmung.

Tabelle 12: Photometrische Messung der PC80PS20-Liposomen bei 464 nm aus zwei unabhängigen Präparationen und zwei unabhängigen Messungen

Behandlung	Mittelwert Extinktion bei $\lambda_{464 \text{ nm}}$	Standardabweichung Extinktion	F	c Messung in mM			c Präp. in mM	WFR in %
direkt zu Chloroform gegeben	0,024	0,0247	40	0,14	+-	0,14	1,00	14
direkt zu AEL gegeben	0,054	0,0078	40	0,31	+-	0,05	1,00	31
1 x mit 2 ml Chloroform ausgeschüttelt	0,169	0,0007	40	0,98	+-	0,00	1,00	98
2 x mit 1 ml Chloroform ausgeschüttelt	0,178	0,0035	40	1,03	+-	0,02	1,00	103
4 x mit 0,5 ml Chloroform ausgeschüttelt	0,191	0,0156	40	1,11	+-	0,09	1,00	111

Es zeigte sich, dass die Liposomenlösungen, welche vorher in Chloroform ausgeschüttelt wurden, die besten Wiederfindungen im Vergleich zur durch die Liposomenpräparation angenommenen Konzentration von 1 mM aufwiesen, wobei die gemessenen Extinktionen von Ausschüttelschritt zu Ausschüttelschritt leicht anstiegen. Dies kann zum einen auf die Ausschüttelschritte an sich (Nernstsches Verteilungsgesetz) und zum anderen auf die Verdunstung von Chloroform bei Raumtemperatur zurückzuführen sein. Die wässrige Liposomenlösung hingegen direkt in die Chloroformphase zu geben erzielte die geringste Wiederfindung. Auch direkte Zugabe von Liposomenlösung zur wässrigen AEL erzielte hier eine sehr geringe Wiederfindung von lediglich 31 %. Für weitere Konzentrationsbestimmungen von Liposomen sollte die Liposomenlösung daher zunächst in Chloroform ausgeschüttelt werden.

4 Diskussion

4.1 Wechselwirkungen NK-Lysin abgeleiteter Peptide mit präparierten Liposomen definierter Lipidzusammensetzung

Die Untersuchung der Wirkmechanismen von in dieser Arbeit verwendeten, dem NK-Lysin abgeleiteten, amphiphatischen Peptiden mittels Liposomen definierter Lipidzusammensetzung stellt eine geeignete Vorgehensweise dar, einen Beitrag zur Aufklärung der Wechselwirkungen dieser Substanzen zu leisten. In dieser Arbeit wurde die Erfassung des Durchmessers und des Zeta-Potentials eigens präparierter, PC-, PS- und LPS-haltiger Liposomen mit und ohne Zugabe ausgewählter amphiphatischer Peptide fokussiert.

PC-haltige Liposomen mit unterschiedlichen PS-Anteilen und Liposomen, welche ausschließlich aus PS präpariert wurden, sollten die Oberfläche menschlicher Krebszellen nachahmen. Liposomen aus PC ohne PS-Anteil stellten dagegen ein Modell für gesunde Zellen dar. Wie sich in früheren Untersuchungen bereits herausstellte, beträgt der Anteil an PS bis zu 10 % der Gesamtmenge an Phospholipiden an der Oberfläche von Krebszellen und ist damit gegenüber gesunden Zellen um ein vielfaches höher (Utsugi et al. 1991; Schröder-Borm et al. 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten PS-haltigen Liposomen sollten für einen möglichst guten Vergleich vor der Zugabe von Peptiden einen annähernd einheitlichen Durchmesser aufweisen und als LUV vorliegen. Um dies zu erreichen, wurden sie, angelehnt an ein 1999 von Castile und Taylor beschriebenes Verfahren (Castile und Taylor 1999), bei der Präparation einem Temperaturzyklus unterworfen. Die Durchmesser aller präparierten PS-haltigen Liposomen lagen in einem Bereich zwischen etwa 50 nm und 66 nm nahe beieinander. Damit wurde die Zielsetzung, einheitliche LUV zu präparieren, hinsichtlich der PS-haltigen Liposomen gut erfüllt.

Die Wechselwirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurde bereits in einer Arbeitsgruppe um Maletzki (Maletzki et al. 2014) *in vitro* an langsam wachsenden Zelllinien kolorektaler Karzinome, die von Patienten stammten und einen Anteil an PS an ihrer Oberfläche enthielten, untersucht. Dabei zeigten gerade die Peptide C7A-D21K und C7A-delta ein hohes Potential, die Krebszellen zu töten. *In vivo* wurden die Peptide C7A, C7A-D21K und NK11 an mit HROC24 Zellen infizierten

Mäusen untersucht. Dabei zeigten die Peptide keine Nebenwirkungen wie Hämolyse oder Giftigkeit gegenüber Lymphozyten. C7A und C7A-D21K führten zur Wachstumsinhibition und Apoptose der Krebszellen. Auch das vermeintlich biologisch inaktive NK11 beeinträchtigte das Zellwachstum der Krebszellen auf noch ungeklärte Weise.

Anhand von Modellmembranen sollten in dieser Arbeit die Wechselwirkungen dieser Peptide mit unterschiedlichen Konzentrationen an PS untersucht werden. Das Zeta-Potential gab über das Adsorptionsverhalten der Peptide und damit ihr Lysepotential hinsichtlich der unterschiedlichen Membranoberflächen Auskunft. Das Zeta-Potential der PC-haltigen Liposomen ohne PS-Anteil veränderte sich entgegen den Erwartungen von fast neutraler Ladung ins Positive. Betrachtet man den Verlauf des Zeta-Potentials der Peptide ohne Liposomen, so kann man eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Verlauf des Zeta-Potentials der PC-haltigen Liposomen ohne PS-Anteil erkennen. Das lässt vermuten, dass bei der Messung des Zeta-Potentials der PC-haltigen Liposomen ohne PS-Anteil möglicherweise nur das Zeta-Potential der Peptide erfasst wurde. Da der gemessene Durchmesser der Liposomen in 3.2.1 jedoch kleiner als der Durchmesser der Peptid-Aggregate in 3.2.5 war, ist es wahrscheinlich, dass sich keine Peptid-Aggregate gebildet haben und das Zeta-Potential der Liposomen mit den angelagerten Peptiden gemessen wurde. Entgegen der Wechselwirkungen der Peptide mit PS-haltigen Liposomen sind die Wechselwirkungen und die damit verbundenen Zeta-Potential-Änderungen der Peptide mit dem PC-haltigen Liposomen ohne PS-Anteil aber eher gering und erst ab einer Konzentration von 1 μM überhaupt richtig erkennbar. Bei höheren Peptidkonzentrationen spielen bezüglich der Adsorption der Peptide vermutlich hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran der Liposomen eine Rolle. Das unspezifisch wirkende Melittin interagiert von allen Peptiden am stärksten mit der Liposomenoberfläche, danach folgt das NK-2 und erst zuletzt die C7A-Varianten. NK11 bleibt gänzlich inaktiv. Biologische Membranen gesunder tierischer Zellen enthalten neben dem Phospholipid PC auch noch andere Bestandteile, wie beispielsweise Cholesterol, die die Aktivität der Peptide im Allgemeinen zusätzlich reduzieren (Zaslouff 2002). Dies kann den Unterschied zu der in vivo durchgeführten Studie von Maletzki et. al., in der die Peptide keine Aktivität gegenüber gesunden Zellen zeigten, erklären.

Die Messkurven der Peptide (mit Ausnahme des biologisch inaktiven NK11) mit den PS-haltigen Liposomen weisen einen sigmoidalen Verlauf auf: Während sich das Zeta-Potential mit steigendem Peptidgehalt zunächst nur wenig ändert, folgt ein Bereich mit starker Änderung des Zeta-Potentials, bis schließlich eine Sättigung der Kurve erreicht wird. Der erste Abschnitt dieser Kurve ist, je nach Liposomenart, unterschiedlich lang. Er endet bei den Liposomen mit einem Anteil von 20 % PS bereits bei einer Peptidkonzentration von 0,3 μM , bei den Liposomen mit einem PS-Anteil von 50 % bei einer Peptidkonzentration von 1 μM und bei den Liposomen aus 100 % PS sogar erst bei einer Peptidkonzentration von 3 μM . Die Sättigung der Kurven erfolgt jeweils kurz nach der Überkompensation, also nach einer Umkehr der Vorzeichen des Zeta-Potentials. Dieser Bereich befindet sich bei den Liposomen mit einem Anteil von 20 % PS bei allen Peptiden außer NK11 bei einer Peptidkonzentration von 3 μM . Bei den Liposomen mit einem PP-Anteil von 50 % variiert dieser Bereich zwischen 3 μM und 10 μM . Das Peptid C7A-D21 erreicht diesen Bereich vor C7A, gefolgt von C7A-delta. Als Letztes erreichen NK-2 und Melittin die Überkompensation und anschließende Sättigung. Bei den Liposomen mit einem PS-Anteil von 100 % zeigte sich ein ähnliches Bild in dieser Abfolge. Der Konzentrationsbereich der Peptide erhöhte sich aber auf Werte zwischen 10 μM und 30 μM . Der Anteil an PC in der Membran scheint diesen Ergebnissen zufolge einen Einfluss auf die Affinität der Peptide zur Zelloberfläche zu haben. Die abgeschwächte Adsorption der Peptide an der Oberfläche nach Erreichen der Überkompensation lässt sich damit erklären, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Peptide durch die Umkehr des Zeta-Potentials in den positiven Bereich nicht mehr vorlagen. Die Peptide lagerten sich nur noch aufgrund ihrer amphiphatischen Struktur durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Lipiddoppelschicht an.

Auffällig bei den Messungen ist das verwendete, biologisch inaktive Peptid NK11. Es zeigte bei den PS-haltigen Liposomen, wenn auch abgeschwächt gegenüber den anderen Peptiden, Aktivität. Dabei kam es innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs nicht zu Überkompensation. Jedoch führte es, gerade bei Konzentrationen ab 10 μM , zu einem erheblichen Anstieg des Durchmessers der PS-haltigen Liposomen. Diese Messwerte lassen auf eine Stabilitätsabschwächung der Liposomenmembranen schließen.

Anhand der Messungen von Durchmesser und Zeta-Potential lassen sich zwar Aussagen über das Adsorptionsverhalten und das damit verbundene Lysepotential der Peptide gegenüber den Modellmembranen treffen, eine sichere Einsicht in den lytischen Mechanismus der Peptide kann aber nicht erlangt werden. Sinnvoll wäre es, an dieser Stelle weitere Untersuchungen durchzuführen. Beispielsweise mittels Liposomen definierter Lipidzusammensetzung, in denen bei der Präparation Calcein eingeschlossen wird. Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Diehl und Markuszewski 1989), der, in den Liposomen eingeschlossen, nicht messbar ist. Bei Beschädigung der Liposomenmembran, zum Beispiel durch Peptidzugabe, wird er freigesetzt und führt zu einer messbaren Emission. Eine durch ein Peptid verursachte Zell-Lyse könnte auf diese Weise nachgewiesen werden. Da es sich bei der Messung um eine Messung über eine gewisse Zeit handelt, würde sie auch eine Aussage über die Wirkgeschwindigkeit der Peptide geben. Auch könnten weitere Liposomen mit kleineren Anteilen an PS, zum Beispiel zwischen 3 % und 10 %, präpariert und untersucht werden, da der PS-Anteil der Oberfläche von Krebszellen etwa diesen Bereich abdeckt (Schröder-Borm et al. 2005).

4.2 LPS-haltige Liposomen

Die Wechselwirkungen der NK-Lysin abgeleiteten Peptide mit Zellmembranen Gram-negativer Bakterien sollen anhand präparierter Modellmembranen, welche definierte Mengen an LPS enthalten, in weiteren Arbeiten untersucht werden. In dieser Arbeit wurden zunächst PC- und LPS-haltige Liposomen präpariert. Das PC diente als Gerüst für die Doppelmembran der Liposomen, in der sich die hydrophobe Kopfgruppe des LPS verankern sollte. Bei dem verwendeten LPS handelte es sich zum einen um eine Rauhumutante und zum anderen um eine Tiefrauhmutante. Durch Bestimmung von Durchmesser und Zeta-Potential nach vorgegebenen Zeitintervallen von zwei, fünf und sieben Tagen wurde die Stabilität dieser Liposomen untersucht.

Das LPS der Rauhumutante (LPS Ra) ließ sich bereits bei der Präparation nicht vollständig lösen. Die unterschiedlichen Durchmesser bei gleichem negativen Zeta-Potential (ein höherer Anteil an LPS führte zu einem größeren Durchmesser) lassen vermuten, dass sich dieses LPS nicht mit dem Phospholipid PC zu Liposomen zusammengefügt hat, sondern Aggregate mit anderen LPS bildete.

Die Tiefrauhmutante des LPS (LPS Re) ließ sich bei der Präparation vollständig lösen. Die gemessenen, etwa gleichgroßen Durchmesser der unterschiedlichen PC- und LPS-Verhältnisse lassen vermuten, dass sich Liposomen gebildet haben. Das Zeta-Potential war bei den putativen Liposomen mit höherem LPS-Gehalt etwas niedriger als bei denen mit kleinerem Anteil an LPS, was diesen Verdacht erhärtet. Als nächster Schritt könnte ein NK-Lysin abgeleitetes Peptid, beispielsweise NK-2, wie bei den PC- und PS-haltigen Liposomen in ansteigenden Konzentrationen zu den putativen LPS-Liposomendispersionen gegeben werden.

4.3 Etablierung eines einfachen, kolorimetrischen Tests zur Gehaltsbestimmung von Phospholipiden

In dieser Arbeit wurde ein einfacher kolorimetrischer Test für die Bestimmung der Phospholipidkonzentration von PC-haltigen Liposomen und Liposomen mit einer Lipidzusammensetzung von PC : PS (80 : 20) etabliert (siehe 3.4.). Anhand der Durchführung des Tests mit Liposomen definierter Lipidzusammensetzung und Konzentration wurde die Nachweisbarkeit der Konzentrationsbestimmung überprüft. Gegenüber einer herkömmlichen Nachweismethode, bei der die Liposomen mit heißer H_2SO_4 verascht werden mussten (Bartlett 1959), bietet dieser Test eine einfachere und ungefährlichere Vorgehensweise. Da sich herausstellte, dass das Extinktionsmaximum für die beiden Lipidzusammensetzungen variierte und auch die Geradengleichungen der Standards jeweils eine für die Lipidzusammensetzung spezifische Steigung aufwiesen, sollte der Test für die übrigen Liposomenzusammensetzungen ebenfalls noch etabliert werden. Außerdem könnte überlegt werden, den Test in ein 96-well-Format zu übertragen, um die Versuchszeit und den anfallenden Abfall an halogenhaltigem Lösungsmittel und Schwermetall zu reduzieren. Erschwert wird diese Aufgabe allerdings dadurch, dass die zu messende Chloroformphase die meisten Materialien angreift. Wie sich durch die Verwendung von Reaktionsgefäßen aus Polypropylen herausstellte, bieten 96-well-Platten aus diesem Material möglicherweise eine Lösung dieses Problems.

5 Zusammenfassung

PC- und PS-haltige Liposomen konnten in dieser Arbeit erfolgreich präpariert werden.

Die Wechselwirkung der amphiphilen, kationischen Peptide NK-2, NK11, C7A, C7A-delta und C7A-D21K mit diesen Liposomen wurden mittels Messungen von Durchmesser und Zeta-Potential untersucht und mit Ergebnissen bereits in vitro und in vivo durchgeführter Studien an Krebszellen verglichen.

Die Präparation LPS-haltiger Liposomen wurde mit einer Rauhmutter und einer Tiefrauhmutante von LPS durchgeführt. Zunächst wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, das pulverförmig vorliegende LPS in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch zu lösen. Nach der Präparation folgten Stabilitätstests der putativen Liposomen mittels Messung von Durchmesser und Zeta-Potential nach vorgegebenen Intervallen und eine Bewertung der Ergebnisse.

Abschließend wurde ein einfacher kolorimetrischer Test, der weiterführenden Arbeiten dienlich sein sollte, für die Konzentrationsbestimmung von Phospholipiden in Liposomen etabliert. Der Test wurde für zwei unterschiedlich zusammengesetzte Liposomen überprüft.

6 Literaturverzeichnis

Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y. et al. (2013): Liposome: classification, preparation, and applications. In: *Nanoscale research letters* 8 (1), S. 102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102.

Andersson, M.; Gunne, H.; Agerberth, B.; Boman, A.; Bergman, T.; Sillard, R. et al. (1995): NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. In: *The EMBO Journal* 14 (8), S. 1615–1625.

Andrä, J.; Leippe, M. (1999): Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores and NK-lysin. In: *Medical microbiology and immunology* 188 (3), S. 117–124.

Andrä, J.; Monreal, D.; de Martinez T., Guillermo; Olak, C.; Brezesinski, G.; Gomez, S. S. et al. (2007): Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens. In: *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2007 (20), S. 14719–14728. DOI: 10.1074/jbc.M608920200.

Bangham, A. D.; Horne, R. W. (1964): Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-active Agents as observed in the Electron Microscope. In: *Journal of molecular biology* (8), S. 660–668.

Bartlett, G. R. (1959): Phosphorus assay in column chromatography. In: *The Journal of Biological Chemistry* 234 (3), S. 466–468.

Bevins, C. L.; Zasloff, M. (1990): Peptides from frog skin. In: *Annual review of biochemistry* 59, S. 395–414. DOI: 10.1146/annurev.bi.59.070190.002143.

Brandenburg, K.; Garidel, P.; Fukuoka, S.; Howe, J.; Koch, M. H. J.; Gutschmann, T.; Andrä, J. (2010): Molecular basis for endotoxin neutralization by amphipathic peptides derived from the alpha-helical cationic core-region of NK-lysin. In: *Biophysical chemistry* 2010 (1-3), S. 80–87. DOI: 10.1016/j.bpc.2010.01.009.

Castile, J. D.; Taylor, K. M. (1999): Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion. In: *International journal of pharmaceutics* 188 (1), S. 87–95.

Clifton, L. A.; Skoda, M. W. A.; Daulton, E. L.; Hughes, A. V.; Le Brun, A. P.; Lakey, J. H.; Holt, S. A. (2013): Asymmetric phospholipid: lipopolysaccharide bilayers; a Gram-negative bacterial outer membrane mimic. In: *Journal of The Royal Society Interface* 10 (89). DOI: 10.1098/rsif.2013.0810.

- Dannert, H. (2005): Einfluss von Phosphatidylserin auf den durch Glycolipidtransferprotein katalysierten Gluco- und Galactocerebrosidtransfer zwischen Liposomen. Eberhard-Karls-Universität, Medizinische Fakultät Tübingen. Online verfügbar unter https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/handle/10900/44743/pdf/Doktorarbeit_Hans_8112005_Druckversion.pdf?sequence=1&isAllowed=y, zuletzt geprüft am 14.08.2015.
- Dempsey, C. E. (1990): The actions of melittin on membranes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1031 (2), S. 143–161.
- Diehl, H.; Markuszewski, R. (1989): Studies on fluorescein-VII The fluorescence of fluorescein as a function of pH. In: *Talanta* 36 (3), S. 416–418.
- Escubed Ltd (Hg.): Zeta Potential - Electrophoresis. Leeds Innovation Centre. Online verfügbar unter <http://www.escubed.co.uk/zeta-potential>, zuletzt geprüft am 15.08.2015.
- Gross, S.; Andrä, J. (2012): Anticancer peptide NK-2 targets cell surface sulphated glycans rather than sialic acids. In: *Biological chemistry* 393 (8), S. 817–827. DOI: 10.1515/hsz-2012-0136.
- Gross, S.; Wilms, D.; Krause, J.; Brezesinski, G.; Andrä, J. (2013): Design of NK-2-derived peptides with improved activity against equine sarcoid cells. In: *Journal of peptide science* 2013 (10), S. 619–628. DOI: 10.1002/psc.2540.
- Hammer, M. U.; Brauser, A.; Olak, C.; Brezesinski, G.; Goldmann, T.; Gutschmann, T.; Andrä, J. (2010): Lipopolysaccharide interaction is decisive for the activity of the antimicrobial peptide NK-2 against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. In: *The Biochemical journal* 2010 (3), S. 477–488. DOI: 10.1042/BJ20091607.
- Jacobs, T.; Bruhn, H.; Gaworski, I.; Fleischer, B.; Leippe, M. (2003): NK-Lysin and Its Shortened Analog NK-2 Exhibit Potent Activities against *Trypanosoma cruzi*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (2), S. 607–613. DOI: 10.1128/AAC.47.2.607-613.2003.
- Jones, M. N. (1995): The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 54, S. 93–128. DOI: 10.1016/0001-8686(94)00223-Y.
- Lasic, D. D.; Needham, D. (1995): The "Stealth" liposome: A prototypical biomaterial. In: *Chemical Reviews* 95 (8), S. 2601–2628.
- Liepinsh, E.; Andersson, M.; Ruyschaert, J. M.; Otting, G. (1997): Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. In: *Nature structural biology* 4 (10), S. 793–795.

- Maletzki, C.; Klier, U.; Marinković, S.; Klar, E.; Andrä, J.; Linnebacher, M. (2014): Host defense peptides for treatment of colorectal carcinoma - a comparative in vitro and in vivo analysis. In: *Oncotarget* 5 (12), S. 4467–4479.
- Matsumoto, M.; Horiuchi, Y.; Yamamoto, A.; Ochiai, M.; Niwa, M.; Takagi, T. et al. (2010): Lipopolysaccharide-binding peptides obtained by phage display method. In: *Journal of microbiological methods* 82 (1), S. 54–58. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.04.002.
- Melo, M. N.; Ferre, R.; Castanho, M. A. R. B. (2009): Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (3), S. 245–250. DOI: 10.1038/nrmicro2095.
- Norrby, R.; Powell, M.; Aronsson, B.; Monnet, D. L.; Lutsar, I.; Bocsan, I. S. et al. (2009): The bacterial challenge. Time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and development of new antibacterial agents. Luxembourg.
- Norrby, S. R.; Nord, C. E.; Finch, R. (2005): Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. In: *The Lancet. Infectious diseases* 5 (2), S. 115–119. DOI: 10.1016/S1473-3099(05)01283-1.
- Olak, C.; Muentner, A.; Andrä, J.; Brezesinski, G. (2008): Interfacial properties and structural analysis of the antimicrobial peptide NK-2. In: *Journal of peptide science* 14 (4), S. 510–517. DOI: 10.1002/psc.954.
- Schröder-Borm, H.; Bakalova, R.; Andrä, J. (2005): The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. In: *FEBS letters* 579 (27), S. 6128–6134. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.09.084.
- Stewart, J. C. (1980): Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. In: *Analytical biochemistry* 104 (1), S. 10–14.
- Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; P., S.; Pandey, P.; Bannerjee, S. K. (2012): Drug delivery systems: An updated review. In: *International journal of pharmaceutical investigation* 2 (1), S. 2–11. DOI: 10.4103/2230-973X.96920.
- Uni Paderborn Department Chemie (Hg.): Zetasizer. Arbeitskreis Technische Chemie. Online verfügbar unter <https://chemie.uni-paderborn.de/arbeitskreise/technische-chemie/cmp/ausstattung/zetasizer/>, zuletzt geprüft am 15.08.2015.
- Utsugi, T.; Schroit, A. J.; Connor, J.; Bucana, C. D.; Fidler, I. J. (1991): Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. In: *Cancer Research* (51), S. 3062–3066.

- Wang, G. (2013): Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. In: *Pharmaceuticals* 6 (6), S. 728–758. DOI: 10.3390/ph6060728.
- Wang, G. (2015): The Antimicrobial Peptide Database. Online verfügbar unter <http://aps.unmc.edu/AP/>, zuletzt aktualisiert am 06.08.2015, zuletzt geprüft am 10.08.2015.
- Wessinger, B. (2010): Lipopeptidmodifizierte Liposomen und ihre Effekte auf Dendritische Zellen. Dissertation. Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie.
- Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. In: *Pharmacological reviews* 55 (1), S. 27–55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2.
- Ymahn (2009): Various AMP structures. Created by using Pymol and downloaded original PDB files from PDB bank. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1QXQ>. Online verfügbar unter https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Various_AMPs.png, zuletzt geprüft am 10.08.2015.
- Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. In: *Nature* 415 (6870), S. 389–395. DOI: 10.1038/415389a.
- Zhang, Y.; Doherty, T.; Li, J.; Lu, W.; Barinka, C.; Lubkowski, J.; Hong, M. (2010): Resonance assignment and three-dimensional structure determination of a human alpha-defensin, HNP-1, by solid-state NMR. In: *Journal of molecular biology* 397 (2), S. 408–422. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.01.030.
- Zwaal, R. F. A.; Schroit, A. J. (1997): Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. In: *Blood* 89 (4), S. 1121–1132.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterschiedliche Peptidstrukturen anhand beispielhafter Peptide.....	2
Abbildung 2: Mögliche Mechanismen der AMP nach überschreiten der Grenzwertkonzentration.	3
Abbildung 3: Dreidimensionaler Grundaufbau eines Liposoms im Querschnitt.....	5
Abbildung 4: Vorherrschende Struktur von L- α -Phosphatidylcholin aus Hühnerei mit einer Reinheit > 99 %.....	6
Abbildung 5: Vorherrschende Struktur von L- α -Phosphatidylserin aus Schweinegehirn als Natriumsalz mit einer Reinheit > 99 %.....	7
Abbildung 6: Darstellung der Struktur von LPS aus <i>E. Coli</i>	8
Abbildung 7: Korrelation kleiner und großer Partikel.....	9
Abbildung 8: Gemessene Größenverteilung von PC80PS20-Liposomen.....	10
Abbildung 9: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht an der Oberfläche in Lösung befindlicher Partikel	10
Abbildung 10: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung.	23
Abbildung 11: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis PC : PS (80 : 20) mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung.....	24
Abbildung 12: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis PC : PS (50 : 50) mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung.....	25
Abbildung 13: Charakterisierung der Liposomen aus L- α -Phosphatidylserin mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung.....	26
Abbildung 14: Messungen der Peptide in ohne Liposomen mittels Durchmesser in nm (links) und Zeta-Potential in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung.....	27

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 15: Stabilitätstest der LPS-haltigen Liposomen mittels Messung des Durchmessers in nm (links) und des Zeta-Potentials in mV (rechts) in halblogarithmischer Darstellung.	28
Abbildung 16: Exemplarische Standardreihe von PC : PS (80 : 20)	30
Abbildung 17: Photometrische Aufnahme der Standards von L- α -Phosphatidylcholin.	31
Abbildung 18: Kalibrierreihe von L- α -Phosphatidylcholine bei einer Wellenlänge von 472 nm.	32
Abbildung 19: Photometrische Aufnahme der Standards von PC: PS (80 : 20)	34
Abbildung 20: Kalibrierreihe von L- α -Phosphatidylcholine : L- α -Phosphatidylserin (80 : 20) bei einer Wellenlänge von 464 nm.	35

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Peptide.....	5
Tabelle 2: Übersicht verwendete Chemikalien	13
Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte.....	14
Tabelle 4: Übersicht verwendeter Phospholipide.....	14
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Lipopolysaccharide.....	14
Tabelle 6: Übersicht präparierter PS-haltiger Liposomen.....	15
Tabelle 7 Übersicht präparierter LPS-haltiger Liposomen.	17
Tabelle 8: Verwendete SOP für die Größe	17
Tabelle 9: Verwendete SOP für das Zeta-Potential	18
Tabelle 10: Durchmesser und Zeta-Potential der präparierten L- α -Phosphatidylcholin- und L- α -Phosphatidylserin-haltigen Liposomen.....	21
Tabelle 11: Photometrische Messung der PC100-Liposomen bei 472 nm	33
Tabelle 12: Photometrische Messung der PC80PS20-Liposomen bei 464 nm	35
Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von PC100-Liposomen in Wechselwirkung mit Peptiden.....	51
Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 80:20 in Wechselwirkung mit amphiphatischen Peptiden	53
Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 50:50 in Wechselwirkung mit amphiphatischen Peptiden	54
Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von Liposomen aus L- α -Phosphatidylserin in Wechselwirkung mit Peptiden.....	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials amphiphatischer Peptide	57
Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von LPS-haltigen Liposomen	58

9 Anhang

Die gesamten Rohdaten der Einzelmessungen sind der beigefügten CD-ROM zu entnehmen.

9.1 Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit PC- und PS-haltigen Liposomen

9.1.1 Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin

Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von PC100-Liposomen in Wechselwirkung mit Peptiden

Peptid	Peptid-konzentration (μM)	Mittelwert ϕ (nm)	Standard-abweichung ϕ	Mittelwert z (mV)	Standard-abweichung z
Peptidpuffer	0,0	105,0	14,90	-4,38	2,71
TFA 0,01%	0,1	103,6	16,04	-4,58	2,41
	0,3	102,9	16,40	-5,86	4,91
	1,0	103,7	15,90	-5,96	3,70
	3,0	102,8	14,98	-5,49	4,08
	10,0	102,3	16,99	-6,06	3,31
	30,0	102,1	16,02	-7,70	2,82
NK-2	0,0	104,2	8,51	-4,63	2,19
	0,1	105,1	18,14	-2,59	2,57
	0,3	99,1	9,92	0,06	2,76
	1,0	102,2	9,51	3,99	2,39
	3,0	107,5	11,53	8,31	2,31
	10,0	105,7	11,63	16,03	1,48
	30,0	108,7	10,67	20,23	2,03
NK11	0,0	107,1	14,17	-6,42	3,09
	0,1	100,5	8,93	-5,55	2,64
	0,3	107,4	14,72	-5,92	1,68
	1,0	103,9	12,48	-5,00	1,73
	3,0	105,3	8,74	-5,30	1,33
	10,0	106,4	14,56	-6,23	1,77
	30,0	108,1	15,00	-5,84	1,72
C7A	0,0	100,8	10,53	-5,86	3,38
	0,1	101,0	8,89	-4,22	1,94
	0,3	101,0	11,66	-3,43	2,38
	1,0	102,5	10,19	-1,18	4,18
	3,0	110,9	9,65	1,96	1,42
	10,0	106,1	8,98	8,07	1,69
	30,0	109,1	9,33	12,32	2,24
C7A delta	0,0	102,3	10,16	-4,69	3,20
	0,1	106,0	4,78	-2,58	4,54

	0,3	106,4	6,35	-1,84	2,10
	1,0	102,6	8,10	0,78	2,43
	3,0	107,1	3,84	5,47	1,58
	10,0	111,5	13,09	10,37	1,86
	30,0	107,2	8,62	14,30	1,90
C7A-D21K	0,0	103,2	7,95	-5,41	3,04
	0,1	102,4	11,05	-1,91	2,54
	0,3	97,5	9,51	-1,56	2,41
	1,0	104,0	5,25	0,89	3,19
	3,0	113,9	24,62	4,99	2,54
	10,0	105,1	9,98	9,22	1,95
	30,0	112,4	6,87	17,85	5,21
C7A-M11L-D21K-NH ₂	0,0	110,4	2,1	-4,8	1,216
	0,1	108,8	2,0	-0,9	0,807
	0,3	107,7	4,0	-1,3	0,442
	1,0	116,6	2,7	-0,4	1,424
	3,0	110,0	2,0	1,4	1,368
	10,0	120,8	15,9	6,4	1,531
	30,0	114,1	2,8	13,7	1,797
C7A-M11L-D21K-COOH	0,0	112,6	4,2	-4,5	2,215
	0,1	109,1	4,3	-3,7	1,822
	0,3	108,8	2,6	-2,8	1,300
	1,0	126,2	24,6	-0,8	1,516
	3,0	116,7	16,4	1,5	1,811
	10,0	115,5	3,9	7,8	2,234
	30,0	119,0	5,5	12,3	1,507
Melittin	0,0	103,0	13,61	-9,16	6,24
	0,1	107,1	11,86	-6,33	5,93
	0,3	104,0	9,74	0,43	4,16
	1,0	106,5	9,79	9,50	3,37
	3,0	113,7	14,79	19,51	2,42
	10,0	102,9	12,36	23,54	1,52
	30,0	113,6	18,72	26,43	2,51

9.1.2 Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 80 : 20

Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 80 : 20 in Wechselwirkung mit amphiphatischen Peptiden

Peptid	Peptid-konzentration (μ M)	Mittelwert ϕ (nm)	Standard-abweichung ϕ	Mittelwert z (mV)	Standard-abweichung z
Peptidpuffer	0,0	66,4	3,91	-44,63	9,48
TFA 0,01%	0,1	69,6	4,01	-52,04	4,63
	0,3	65,5	3,64	-50,79	4,14
	1,0	59,7	3,25	-49,19	6,58
	3,0	58,9	2,62	-49,92	5,49
	10,0	51,8	1,77	-50,04	4,88
	30,0	52,2	0,90	-47,34	3,81
NK-2	0,0	66,3	2,23	-50,96	5,58
	0,1	66,1	1,65	-49,77	2,69
	0,3	71,8	1,79	-44,08	4,07
	1,0	109,4	20,41	-33,85	5,24
	3,0	529,7	108,21	3,73	3,19
	10,0	1089,7	349,18	18,70	2,22
	30,0	1241,2	451,17	25,14	2,36
NK11	0,0	67,2	4,29	-52,67	2,19
	0,1	65,7	7,72	-47,73	4,43
	0,3	64,4	8,60	-45,82	5,09
	1,0	66,5	4,01	-32,73	4,37
	3,0	73,1	2,49	-19,66	1,92
	10,0	180,7	27,54	-12,41	0,82
	30,0	656,6	102,83	-7,65	1,21
C7A	0,0	67,5	3,98	-57,50	6,43
	0,1	61,8	4,02	-49,16	3,65
	0,3	64,8	1,65	-47,52	6,39
	1,0	90,0	2,54	-30,53	4,33
	3,0	402,7	105,74	7,61	2,03
	10,0	636,9	35,79	13,88	1,17
	30,0	615,9	41,71	16,87	1,08
C7A delta	0,0	63,2	1,22	-54,50	3,83
	0,1	69,0	5,90	-49,88	3,08
	0,3	75,3	10,12	-43,54	7,70
	1,0	278,5	224,35	-16,37	24,88
	3,0	583,5	317,35	10,98	3,49
	10,0	707,0	57,85	17,47	1,74
	30,0	763,9	39,73	21,22	1,37
C7A-D21K	0,0	65,2	2,53	-48,39	9,93

	0,1	65,6	2,08	-47,16	6,30
	0,3	65,3	3,60	-46,83	5,48
	1,0	124,8	17,67	-30,77	5,16
	3,0	153,5	25,53	11,65	1,02
	10,0	179,7	46,10	17,78	2,19
	30,0	183,7	47,58	23,88	1,88
Melittin	0,0	64,7	0,94	-52,08	5,73
	0,1	63,8	4,30	-48,18	10,07
	0,3	59,4	1,66	-49,15	3,62
	1,0	61,7	2,29	-46,01	5,10
	3,0	76,4	4,04	7,06	2,10
	10,0	87,2	6,79	18,99	2,96
	30,0	91,3	5,35	25,18	2,66

9.1.3 Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 50 : 50

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von Liposomen aus L- α -Phosphatidylcholin und L- α -Phosphatidylserin im Verhältnis 50 : 50 in Wechselwirkung mit amphiphatischen Peptiden

Peptid	Peptid-konzentration (μ M)	Mittelwert ϕ (nm)	Standard-abweichung ϕ	Mittelwert z (mV)	Standard-abweichung z
Peptidpuffer	0,0	75,4	12,14	-59,44	7,87
TFA 0,01%	0,1	69,6	18,14	-57,72	5,84
	0,3	70,7	18,97	-58,24	6,20
	1,0	71,3	16,32	-50,44	12,42
	3,0	62,5	20,20	-54,32	6,13
	10,0	66,0	27,69	-52,31	4,83
	30,0	72,4	32,98	-52,09	6,69
NK-2	0,0	72,6	15,90	-57,94	4,24
	0,1	78,2	5,97	-57,67	7,72
	0,3	73,7	11,21	-56,79	6,18
	1,0	100,0	6,13	-43,71	4,84
	3,0	660,6	179,58	-11,79	2,13
	10,0	903,2	218,88	23,67	1,20
	30,0	834,5	174,42	27,97	1,73
NK11	0,0	80,0	11,65	-59,89	4,77
	0,1	76,4	12,59	-62,15	10,44
	0,3	71,7	10,24	-58,75	6,25
	1,0	67,0	11,51	-55,46	4,35
	3,0	274,3	180,40	-25,38	7,54

	10,0	988,5	304,69	-8,77	2,35
	30,0	2767,8	1280,69	-4,50	1,31
C7A	0,0	80,9	5,79	-60,53	4,28
	0,1	77,4	15,02	-46,82	11,48
	0,3	84,6	11,27	-53,29	5,89
	1,0	96,6	5,69	-46,78	3,92
	3,0	479,7	57,73	5,56	0,87
	10,0	749,9	79,92	14,66	1,45
	30,0	791,2	97,69	20,67	1,58
C7A delta	0,0	79,6	13,52	-60,13	4,53
	0,1	80,3	17,92	-58,84	5,21
	0,3	83,2	17,31	-55,19	4,46
	1,0	91,2	11,92	-48,56	7,05
	3,0	459,6	88,78	-3,41	11,00
	10,0	583,6	58,29	17,13	2,98
	30,0	590,9	23,65	21,75	3,92
C7A-D21K	0,0	72,6	12,13	-60,66	4,93
	0,1	70,4	10,21	-55,48	8,88
	0,3	76,1	11,03	-57,08	5,89
	1,0	83,8	14,39	-46,88	6,86
	3,0	156,0	19,92	13,02	2,71
	10,0	294,1	131,82	18,60	2,47
	30,0	296,3	133,68	23,54	2,51
C7A-M11L-D21K-NH2	0,0	84,6	1,0	-52,9	1,261
	0,1	82,9	0,5	-52,4	1,462
	0,3	86,6	1,2	-51,2	2,029
	1,0	96,7	0,2	-45,6	3,321
	3,0	155,3	1,9	-27,9	4,016
	10,0	177,1	6,6	17,7	1,879
	30,0	208,1	2,6	22,3	0,862
C7A-M11L-D21K-COOH	0,0	87,1	0,9	-57,7	6,082
	0,1	85,1	1,1	-59,0	8,492
	0,3	80,6	0,6	-52,1	1,407
	1,0	89,6	0,6	-49,0	4,246
	3,0	667,6	108,4	-6,9	0,848
	10,0	904,8	23,6	16,4	0,806
	30,0	1025,2	48,3	21,7	0,754
Melittin	0,0	71,0	15,48	-59,17	5,19
	0,1	74,3	18,01	-57,00	7,69
	0,3	73,1	20,92	-54,80	4,81
	1,0	85,9	28,51	-47,86	8,46
	3,0	129,5	14,15	-33,12	5,31
	10,0	124,8	11,37	14,60	1,95
	30,0	140,7	14,80	20,26	1,49

9.1.4 Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit Liposomen aus L- α -Phosphatidylserin

Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von Liposomen aus L- α -Phosphatidylserin in Wechselwirkung mit Peptiden

Peptid	Peptid-konzentration (μM)	Mittelwert ϕ (nm)	Standard-abweichung ϕ	Mittelwert z (mV)	Standard-abweichung z
Peptidpuffer	0,0	52,0	3,64	-43,17	9,90
TFA 0,01%	0,1	54,9	7,32	-56,83	15,39
	0,3	47,1	5,25	-46,05	20,76
	1,0	46,5	4,84	-55,83	10,52
	3,0	44,5	5,76	-50,39	7,54
	10,0	43,5	5,53	-49,67	6,19
	30,0	43,8	6,64	-48,04	8,94
NK-2	0,0	50,0	4,84	-50,93	11,92
	0,1	57,5	9,11	-57,04	9,44
	0,3	64,5	13,32	-43,63	11,12
	1,0	71,6	8,49	-41,35	10,48
	3,0	75,2	10,87	-39,99	5,87
	10,0	118,4	19,81	-1,43	26,43
	30,0	128,5	21,15	30,03	2,07
NK11	0,0	52,4	1,40	-56,16	13,05
	0,1	55,3	2,71	-60,91	11,50
	0,3	54,8	1,04	-53,07	7,22
	1,0	56,8	8,61	-57,20	9,54
	3,0	68,1	25,23	-43,35	4,90
	10,0	732,1	131,59	-16,17	11,02
	30,0	1373,2	610,21	-1,77	2,23
C7A	0,0	55,7	5,66	-54,89	8,08
	0,1	60,9	3,61	-47,23	5,89
	0,3	63,5	5,90	-43,65	4,24
	1,0	63,5	5,90	-44,93	7,32
	3,0	90,9	9,98	-35,15	6,48
	10,0	188,7	63,64	13,52	5,23
	30,0	365,0	196,79	20,39	2,75
C7A delta	0,0	55,9	2,24	-50,25	7,62
	0,1	61,6	16,05	-50,18	7,49
	0,3	73,8	11,87	-43,36	9,99
	1,0	84,1	15,57	-43,15	5,75
	3,0	96,0	18,29	-37,38	7,69
	10,0	140,2	12,46	17,21	2,64
	30,0	183,8	16,23	20,66	2,48
C7A-D21K	0,0	53,7	6,63	-60,03	7,35
	0,1	59,0	3,69	-54,77	13,79

	0,3	62,7	6,51	-54,84	4,96
	1,0	71,7	6,12	-45,15	7,25
	3,0	84,4	2,16	-39,87	6,02
	10,0	111,8	5,35	20,74	4,08
	30,0	139,2	9,88	23,92	2,12
Melittin	0,0	51,1	4,21	-55,07	4,67
	0,1	66,5	8,87	-51,60	3,69
	0,3	58,1	17,96	-46,84	5,97
	1,0	68,7	20,61	-41,88	4,90
	3,0	90,9	13,19	-35,76	4,90
	10,0	198,5	60,64	-1,71	18,15
	30,0	209,9	25,43	17,29	2,91

9.1.5 Durchmesser und Zeta-Potential der amphiphatischen Peptide

Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials amphiphatischer Peptide

Peptid	Peptid-konzentration (µM)	Mittelwert ø (nm)	Standard-abweichung ø	Mittelwert z (mV)	Standard-abweichung z
NK-2	0,1	114,0	43,84	5,94	8,13
	0,3	139,9	9,43	12,38	3,25
	1,0	158,7	8,43	20,71	3,48
	3,0	185,4	14,61	20,55	2,36
	10,0	186,6	27,81	24,50	4,53
	30,0	190,3	20,14	25,54	5,83
NK11	0,1	161,3	106,66	-2,58	11,76
	0,3	110,4	24,06	-12,85	1,30
	1,0	206,9	32,54	-7,74	2,37
	3,0	234,6	43,29	-4,77	1,47
	10,0	268,9	55,34	-1,14	2,48
	30,0	274,8	49,66	2,24	2,52
C7A	0,1	208,0	54,55	3,61	9,42
	0,3	129,5	20,56	6,06	4,08
	1,0	184,2	23,74	9,63	2,31
	3,0	237,9	32,88	14,87	1,97
	10,0	277,4	34,76	19,02	2,76
	30,0	270,1	66,56	23,13	2,81
C7A delta	0,1	556,0	285,57	1,48	7,29
	0,3	158,7	29,82	10,73	6,77
	1,0	244,4	52,67	12,78	3,81
	3,0	275,4	55,78	15,93	3,50
	10,0	246,3	46,76	21,29	2,88
	30,0	267,6	39,80	26,61	6,47

C7A-D21K	0,1	33,2	46,90	-0,77	11,45
	0,3	189,8	71,60	7,02	2,05
	1,0	193,0	39,06	7,74	2,77
	3,0	215,4	8,47	15,20	3,47
	10,0	207,2	24,96	21,55	3,13
	30,0	229,4	21,28	26,47	3,43
Melittin	0,1	252,1	86,75	-1,00	9,42
	0,3	197,5	28,03	8,06	8,30
	1,0	239,3	14,38	7,89	6,56
	3,0	280,9	44,24	14,07	4,75
	10,0	323,3	114,06	17,98	5,41
	30,0	282,0	54,13	24,63	2,17

9.2 Durchmesser und Zeta-Potential von Wechselwirkungen amphiphatischer Peptide mit PC- und LPS-haltigen Liposomen

Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers und des Zeta-Potentials von LPS-haltigen Liposomen

	Tag	Mittelwert ø [nm]	Standard- abweichung ø	Mittelwert z [mV]	Standard- abweichung z
PC : LPS Ra (90 : 10)	2	65,23	0,73	-35,73	3,18
	5	62,67	1,29	-32,68	2,36
	7	61,55	0,21	-34,60	3,28
PC : LPS Ra (80 : 20)	2	81,51	4,07	-35,25	3,67
	5	88,24	2,94	-29,70	3,08
	7	92,60	10,43	-32,80	2,84
PC : LPS Re (90 : 10)	2	70,63	1,05	-49,40	4,97
	5	69,88	1,64	-45,90	6,17
	7	70,20	1,07	-43,75	1,46
PC : LPS Re (80 : 20)	2	72,78	0,58	-51,47	4,25
	5	71,44	0,79	-47,60	4,13
	7	72,42	1,03	-50,80	3,68
PC : LPS Ra (70 : 30)	2	77,54	1,97	-46,32	6,00
	5	74,62	0,29	-50,17	4,85
	7	79,34	1,30	-50,95	3,79

9.3 Extinktionen der Kalibrierstandards aus Phospholipiden

Die gesamten Rohdaten, einschließlich der Messungen über die Wellenlängen 300 nm bis 700 nm sind der beigelegten CD-ROM zu entnehmen.

9.3.1 Extinktionen der Kalibrierstandards aus PC

Tabelle 19: Extinktionen der Kalibrierstandards aus PC bei 472 nm

Extinktionsmessungen der Standardreihen I bis VI bei λ 472 nm						
c in μ M	Standard I	Standard II	Standard III	Standard IV	Mittelwert	Standard-abweichung
0	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001	0,0010
4	0,032	0,033	0,031	0,030	0,032	0,0013
8	0,064	0,062	0,058	0,059	0,061	0,0028
16	0,125	0,130	0,123	0,120	0,125	0,0042
24	0,191	0,194	0,190	0,186	0,190	0,0033
32	0,256	0,263	0,254	0,260	0,258	0,0040
40	0,321	0,322	0,328	0,324	0,324	0,0031
48	0,387	0,395	0,369	0,403	0,389	0,0145
56	0,447	0,445	0,472	0,437	0,450	0,0151
64	0,519	0,520	0,520	0,522	0,520	0,0013
80	0,627	0,643	0,648	0,557	0,619	0,0421

9.3.2 Extinktionen der Kalibrierstandards aus PC : PS (80 : 20)

Tabelle 20: Extinktionen der Kalibrierstandards aus PC : PS (80 : 20) bei 464 nm

Extinktionsmessungen der Standardreihen I bis IV bei λ 464 nm						
c in μ M	Standard I	Standard II	Standard III	Standard IV	Mittelwert	Standard-abweichung
4	0,021	0,024	0,030	0,033	0,027	0,005
8	0,051	0,056	0,060	0,056	0,056	0,004
16	0,103	0,103	0,118	0,117	0,110	0,008
24	0,147	0,162	0,170	0,169	0,162	0,011
32	0,214	0,221	0,227	0,239	0,225	0,011
40	0,258	0,285	0,286	0,295	0,281	0,016
48	0,326	0,336	0,350	0,357	0,342	0,014
56	0,357	0,374	0,376	0,427	0,384	0,030
64	0,381	0,424	0,462	0,453	0,430	0,036
80	0,514	0,557	0,533	0,573	0,544	0,026