

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

MASTERARBEIT

**Charakterisierung der membranpermeabilisierenden
Aktivität von antimikrobiellen Peptiden an Bakterien
und rekonstituierten Lipidmembranen**

durchgeführt am

Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Programmbereich Infektionen
Laborgruppe Biophysik

Nadine Gebauer

Matrikelnummer: 2005861

Hamburg
4. Mai 2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Gutschmann (FZ Borstel)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1 Aufbau der bakteriellen Zellhülle	4
2.1.1 Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien.....	5
2.1.2 Phospholipide.....	5
2.1.3 Lipopolysaccharide	6
2.2 Rekonstituierte Membranen.....	7
2.2.1 Lipidmonoschichten.....	9
2.2.2 Planare Membranen	9
2.2.3 Liposomen.....	9
2.2.4 Festkörperunterstützte Membranen.....	10
2.3 Antimikrobielle Peptide	12
2.3.1 Defensine	13
2.3.2 Kathelizidine	14
2.3.3 Arenicin.....	15
2.3.4 Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit Lipidmembranen	16
3. Material und Methoden	19
3.1 Puffersysteme.....	19
3.2 Phospholipide und Lipopolysaccharide	20
3.3 Verwendete antimikrobielle Peptide.....	20
3.4 Verwendete Bakterien.....	21
3.4.1 <i>Escherichia coli</i>	21

3.4.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
3.5 Kultivierung der Bakterien.....	22
3.6 Antimikrobieller Test.....	22
3.7 Fluoreszenzfarbstoff Assays	23
3.7.1 SYTOX Green Assay.....	24
3.7.2 Propidiumiodid Assay.....	24
3.7.3 Fluoresceindiacetat Assay.....	24
3.7.4 Zombie Green Assay.....	25
3.8 Präparation von Phospholipid Liposomen und LPS Aggregaten.....	25
3.9 Fluoreszenzspektroskopie	25
3.9.1 Kaliumiodid-Quenching.....	27
3.10 Impedanzspektroskopie an festkörperunterstützten Membranen.....	28
3.10.1 Theorie	28
3.10.2 Versuchsdurchführung.....	33
4. Ergebnisse	36
4.1 Aktivität antimikrobieller Peptide gegen Gram-negative Bakterien.....	36
4.1.1 Wachstumshemmende Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide	36
4.1.2 Permeabilisierende Aktivität an bakteriellen Membranen.....	38
4.2 Aktivität antimikrobieller Peptide an rekonstituierten Membranen.....	46
4.2.1 Permeabilisierende Aktivität an Liposomen	46
4.2.2 Permeabilisierende Aktivität an festkörperunterstützten Membranen	50
5. Diskussion	55
5.1 Vergleich der Aktivität antimikrobieller Peptide gegen Gram-negative Bakterien.....	55
5.2 Vergleich der Aktivität antimikrobieller Peptide an rekonstituierten Membranen.....	57
5.3 Rekonstituierte Membranen: Geeignetes Modell für bakterielle Membranen?	59
6. Zusammenfassung und Ausblick	61
Literaturverzeichnis	X

Abbildungsverzeichnis	XVI
Tabellenverzeichnis	XVIII
Eidesstattliche Erklärung	XIX
Danksagung	XX
Anhang	XXI
Chemikalien	XXI
Verbrauchsmaterial	XXII
Verwendete Geräte.....	XXIII
Verwendete Software.....	XXV
Zusätzliche Daten.....	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADC	<i>analog-to-digital-converter</i>
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AMP(s)	Antimikrobielle Peptide
AraN	Aminoarabinose
Arenicin-1	Arenicin Isoform 1
BLM(s)	<i>black lipid membranes</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
Da	Dalton
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Em	Emissionsintensität
ESBL	<i>extended spectrum beta-lactamase</i>
FDA	Fluoresceindiacetat
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
Gl.	Gleichung
GlcN	Glucosamin
GOF	<i>Goodness of fit</i>
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
hBD3-1	<i>human beta-defensin-3</i> , linear (ohne Disulfide-Brücken)
Hep	Heptose
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IM	Innere Membran Gram-negativer Bakterien
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , ESBL Stamm
Kap.	Kapitel
Kdo	2-Keto-3-desoxyoctonat
KI	Kaliumiodid
LB	Luria Bertani Broth nach Miller

LL32	C-terminus gekürztes Fragment von LL37
LL37	humanes AMP, aktives Fragment des humanen Kathelizidins
LPS	Lipopolysaccharid
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
NBD	N-7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-yl
OD	optische Dichte
OM	<i>outer membrane</i> ; äußere Membran Gram-negativer Bakterien
Omp	<i>outer membrane protein</i>
P	Phosphat
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
rpm	<i>revolutions per minute</i>
S ₀	Grundniveau
S ₁	angeretes Energieniveau
SAW	<i>surface acoustic wave</i>
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i>
tBLM(s)	<i>tethered Bilayer Lipid Membranes</i>
TFA	Trifluoressigsäure
WBB01	<i>Escherichia coli</i> Stamm WBB01

1. Einleitung und Zielsetzung

In den letzten Jahrzehnten wurde eine zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika beobachtet, die eine Suche und Entwicklung alternativer Wirkstoffe zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen notwendig macht. Eine Alternative könnte der Einsatz von antimikrobiellen Peptiden darstellen. Als Bestandteil der angeborenen Immunantwort mehrzelliger Organismen dienen antimikrobielle Peptide als primärer Abwehrmechanismus gegen Pathogene im Bereich der inneren und äußeren Grenzflächen des Körpers. Der Wirkmechanismus beruht dabei meist auf der Bindung an beziehungsweise dem Einbau in die bakterielle Membran. Durch Beeinflussung der mechanischen oder elektrischen Eigenschaften der Membran kann es zur Permeabilisierung kommen, die zum Tod des Bakteriums führen kann. Um die Grundlagen dieser Vorgänge zu studieren, können vereinfachte Modelle der bakteriellen Membran, die auch als Rekonstitutionssysteme bezeichnet werden, sowie geeignete biophysikalische Methoden herangezogen werden. Das Verständnis des Wirkmechanismus unterschiedlicher antimikrobieller Peptide ermöglicht deren gezielte Modifizierung und Optimierung, um so die Effizienz als potenzielles Therapeutikum zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die membranpermeabilisierende Aktivität der antimikrobiellen Peptide LL32, hBD3-1 und Arenicin-1 an Gram-negativen Bakterien und rekonstituierten Lipidmembranen mittels unterschiedlicher Methoden untersucht. Das tethaPod System von SDx Tethered Membranes ist eine dieser Methoden, deren Etablierung in der Laborgruppe Biophysik des Forschungszentrums Borstel den Schwerpunkt dieser Arbeit bildete. Dieses System ermittelt über Impedanzmessung die Leitfähigkeit von rekonstituierten Phospholipidmembranen, die Auskunft über die Permeabilität der Membranen gibt. Im Fall einer Membranpermeabilisierung durch antimikrobielle Peptide ist ein Anstieg der Leitfähigkeit die Folge. Als Membranmodell werden die sogenannten *tethered Bilayer Lipid Membranes* eingesetzt, die mit einer Fläche von etwa 2,1 mm² deutlich größer sind als Membranmodelle anderer biophysikalischer Methoden (vgl. Montal Mueller Aufbau).

Ein alternatives Membranmodell zu den festkörperunterstützten *tethered Bilayer Lipid Membranes* sind die in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten Phospholipid Liposomen und Lipopolysaccharid Aggregate. Diese wurden in fluoreszenzspektroskopischen Messungen mit Hilfe eines Kaliumiodid-Quenchings untersucht. Liposomen haben den Vorteil, dass sie globulär und frei in Lösung vorkommen und auf diese Weise Zellen recht ähnlich sind.

Doch wie ähnlich sind Wechselwirkungen von antimikrobiellen Peptiden zwischen rekonstituierten Membranen und dem Zielorganismus Bakterium? Um diese Frage beantworten zu können, wurde die membranpermeabilisierende Aktivität der antimikrobiellen Peptide an Gram-negativen Bakterien mittels unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoff Assays untersucht. Dabei

wurden Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen getestet und miteinander verglichen.

Ein antimikrobieller Test sollte Aufschluss darüber bringen, inwieweit die membranpermeabilisierende Aktivität der Peptide für deren antimikrobielle Wirkung verantwortlich ist. Dazu wurde die Auswirkung der antimikrobiellen Peptide auf das Wachstum verschiedener Gram-negativer Bakterienstämme untersucht.

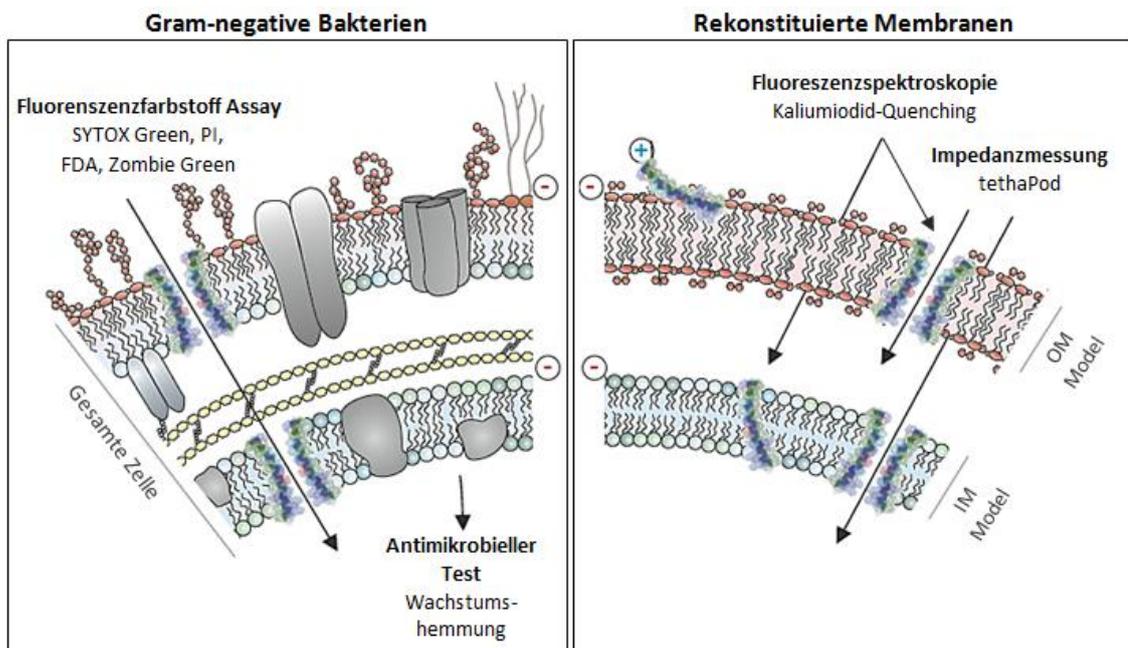


Abbildung 1: Schematische Übersicht der angewandten Methoden. Zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoff Assays an Gram-negativen Bakterien durchgeführt (Kapitel 3.7). Zusätzlich wurde die membranpermeabilisierende Aktivität der antimikrobiellen Peptide an rekonstituierten Membranen, die entweder eine Mimikry der äußeren Membran (engl.: *outer membrane*, OM) oder der inneren Membran (IM) Gram-negativer Bakterien darstellten, überprüft. Dazu wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen mittels Kaliumiodid-Quenching (Kapitel 3.9) und Impedanzmessungen mit dem in dieser Arbeit neu etablierten tethaPod (Kapitel 3.10) herangezogen. Neben Untersuchungen zur Membranpermeabilisierung wurde ein antimikrobieller Test an Gram-negativen Bakterien durchgeführt, um die Wirkung antimikrobieller Peptide auf das Wachstum der Bakterien zu überprüfen (Kapitel 3.6) (modifiziert nach Saathoff, 2013).

Zusätzlich wurden neben der Mimikry bakterieller Membranen auch rekonstituierte Membranen untersucht, die die Membranen humaner Zellen imitieren sollten. Hintergrund dieser Untersuchungen war es zu überprüfen, ob die verwendeten antimikrobiellen Peptide speziell mit bakteriellen Membranen interagieren und dementsprechend für humane Zellen nicht toxisch wirken.

Letztendlich wurden neben der Etablierung des tethaPod Systems und der Testung neuer Fluoreszenzfarbstoffe zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung von Bakterien folgende drei Punkte in dieser Arbeit betrachtet:

- Zusammenhänge zwischen Membranpermeabilisierung und antimikrobieller Wirkung der Peptide an Gram-negativen Bakterien
- Vergleich der membranpermeabilisierenden Aktivität von antimikrobiellen Peptiden an unterschiedlichen Membranmodellen, nachgewiesen mit verschiedenen biophysikalischen Methoden
- Vergleich der Membranpermeabilisierung von antimikrobiellen Peptiden an rekonstituierten Membranen und Bakterien.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Aufbau der bakteriellen Zellhülle

Bakterien bilden zusammen mit Archaeen und Eukaryoten die drei Domänen, die höchste Klassifizierungskategorie der Lebewesen. Diese systematische Einteilung basiert auf der unterschiedlichen Struktur der ribosomalen RNA der Lebewesen und wurde 1990 von Woese, Kandler und Wheelis vorgestellt (Woese, Kandler, and Wheelis 1990).

Da Bakterien und Archaeen im Gegensatz zu Eukaryoten keine komplexen Zellorganellen und keinen Zellkern besitzen, werden sie als Prokaryoten zusammengefasst. Die prokaryotische DNA liegt frei und dicht zusammengelagert in einem Bereich des Zytoplasmas, dem Nucleoid, vor. Bakterien werden ihrerseits in Gram-positiv und Gram-negativ unterteilt. Diese Unterteilung beruht auf dem Aufbau der bakteriellen Zellhülle und geht auf die Gram-Färbung des gleichnamigen dänischen Mediziners und Bakteriologen Hans Christian Gram zurück. Durch Färben der Bakterien mit Kristallviolett und Lugolscher Lösung lagert sich der blaue Farbstoffkomplex in der Peptidoglycanschicht ein. Nach einem Waschriff mit Ethanol werden Gram-negative Bakterien, die nur eine dünne Peptidoglycanschicht besitzen, entfärbt, wohingegen in Gram-positiven Bakterien der Farbstoff-Komplex durch die dicke Peptidoglycanschicht zurückgehalten wird (Popescu and Doyle 1996). Mit dieser Technik können jedoch nicht alle Bakterien klassifiziert werden, sodass oft erst genetische Untersuchungen eine systematische Unterteilung ermöglichen.

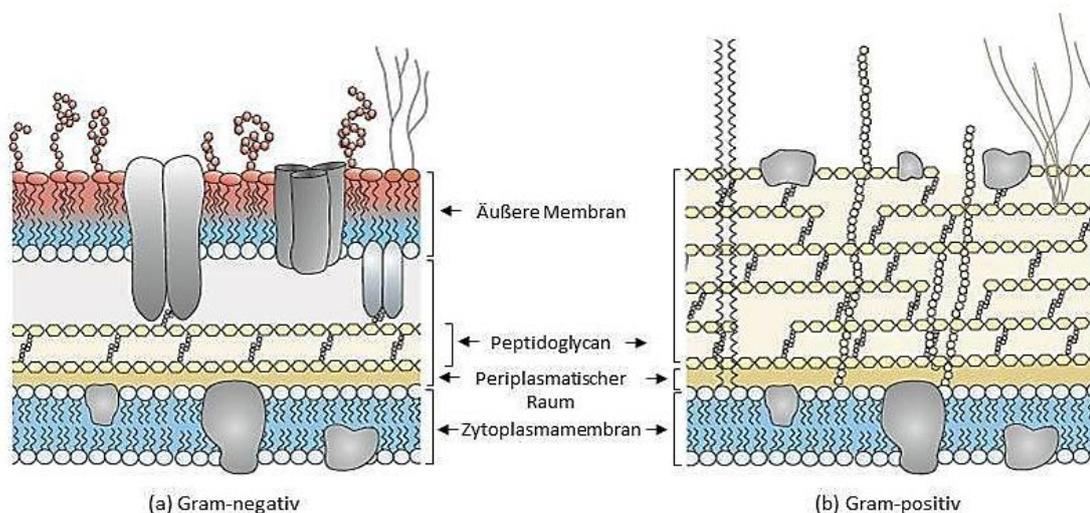


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellhülle Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien (a) besitzt im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien (b) eine äußere Membran. Diese ist durch den periplasmatischen Raum, der eine dünne Peptidoglycanschicht beinhaltet, von der Zytoplasmamembran getrennt. Die Peptidoglycanschicht Gram-positiver Bakterien ist wesentlich dicker als bei Gram-negativen Bakterien und steht im direkten Kontakt mit der Umgebung (modifiziert nach Saathoff, 2013).

Das bakterielle Zytoplasma ist von der Zellhülle umgeben, die als schützende Abgrenzung zur Umwelt dient. Gleichzeitig ist sie für Transportvorgänge und für die Aufrechterhaltung der Nährstoff- und Salzkonzentrationen und des elektrischen Membranpotenzials verantwortlich. Dieses liegt bei Bakterien zwischen -120 mV und -200 mV und unterscheidet sich damit deutlich von dem elektrischen Membranpotenzial eukaryotischer Zellen, das zwischen -60 mV und -80 mV liegt (Goldberg et al. 2013; Martinac, Saimi, and Kung 2008).

Bakterienmembranen weisen einen hohen Anteil an negativ geladenen Lipiden auf. Die daraus resultierende negative Oberflächenladung ist der ausschlaggebende Parameter für die selektive Bindung von kationischen antimikrobiellen Peptiden an der bakteriellen Zellhülle.

2.1.1 Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien setzt sich aus der inneren Zytoplasmamembran, einer dünnen Peptidoglycanschicht und der äußeren Membran zusammen. Letztere kommt bei Gram-positiven Bakterien nicht vor und wird von einer wesentlich dickeren Peptidoglycanschicht kompensiert. Im Gegensatz zur Zytoplasmamembran, die aus einer Doppelschicht von Phosphoglyceriden besteht und damit als symmetrisch bezeichnet wird, ist die äußere Membran Gram-negativer Bakterien asymmetrisch und besteht aus einer inneren Monoschicht aus Phosphoglyceriden und einer äußeren Monoschicht aus überwiegend Lipopolysacchariden (LPS).

Für potenzielle Therapeutika und membranaktive Substanzen stellt die äußere Membran das erste Hindernis dar, um ihre antimikrobielle Wirkung zu entfalten.

Die äußere Membran besitzt genauso wie die Zytoplasmamembran verschiedene Membranproteine sowie Porine, Ionenkanäle und Rezeptorproteine. Proteine der äußeren Membran werden als Omps (*outer membrane proteins*) bezeichnet (Seltmann and Holst 2002). Hydrophile niedermolekulare Substanzen können durch Porine in den periplasmatischen Raum diffundieren, während größere Moleküle (> 600 Da) Transportproteine passieren müssen (Brauser et al. 2012; Nikaido 2003).

2.1.2 Phospholipide

Phospholipide sind phosphorhaltige Lipide, die den Grundbaustein biologischer Membranen bilden. Sie bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und mindestens zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten und verleihen dadurch dem Phospholipid einen amphiphilen Charakter. Dieser ermöglicht die Bildung von Lipid-Doppelschichten, indem sich die hydrophoben Bereiche der Phospholipide in polaren Lösungen wie Wasser spontan zusammenlagern. Dieser Vorgang wird als Selbstorganisation (engl.: *self-assemble*) bezeichnet.

Phospholipide werden in Phosphoglyceride und Sphingophospholipide unterteilt. Die Fettsäureketten von Phosphoglyceriden sind mit den ersten beiden Hydroxygruppen eines Glycerins verestert, während an die dritte Hydroxygruppe eine Phosphorsäurediestergruppe gebunden ist. Bei Sphingophospholipiden besteht das Grundgerüst hingegen aus Sphingosin. Die polaren Kopfgruppen können positiv, negativ aber auch neutral geladen sein. Dementsprechend beeinflusst die Zusammensetzung der Phospholipide einer Membran auch deren Oberflächeneigenschaften.

In Gram-negativen Bakterien ist das Phosphoglycerid Phosphatidylethanolamin (PE) am häufigsten vertreten, gefolgt von Phosphatidylglycerol (PG) in etwa einem Verhältnis von 4:1 (Teixeira et al. 2012).

Neben den Phospholipiden enthalten biologische Membranen auch Sterine (z.B. Cholesterol), die überwiegend in eukaryotischen Zellmembranen vorkommen, und Glykolipide. In Gram-negativen Bakterien kommen Glykolipide überwiegend als LPS in der äußeren Membran vor und werden im nächsten Abschnitt genauer beschrieben (Hammer 2007).

2.1.3 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide kommen nur in der Außenschicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien vor und stellen damit das erste Hindernis für membranaktive Substanzen, die nicht über Porine die Membran passieren können, dar. Neben den Phospholipiden bilden sie die zweite große Gruppe der bakteriellen Membranlipide und setzen sich aus drei miteinander verbundenen Teilbereichen zusammen: Lipid A bildet den hydrophoben Teil des LPS und liegt in der äußeren Membran. Die Kernregion mit einem Oligosaccharid ist an das Lipid A gebunden und schließt mit einer O-spezifischen Seitenkette, einem Oligo-Saccharid mit bis zu 60 Wiederholungseinheiten, ab. Die Länge der O-spezifischen Kette variiert nicht nur zwischen unterschiedlichen Bakterienstämmen, sondern zeigt auch innerhalb eines Bakterienstammes Heterogenität (Raetz and Whitfield 2002). Ferner bestimmt die Länge der Oligosaccharidkette den Typ des LPS: Bakterien mit ausgebildeter O-spezifischer Kette zählen zum Wildtyp und zeigen eine glatte Koloniemorphologie. Das LPS wird dann als glatt (engl.: *smooth*) oder S-LPS bezeichnet. Bakterienstämme, die LPS mit fehlender O-spezifischer Kette (R-LPS oder *Ra* LPS) exprimieren, werden als Raumutanten bezeichnet. Die kürzeste LPS Mutation, die nur aus Lipid A und zwei 2-Keto-3-desoxyoctonat(Kdo)-Sacchariden besteht, wird als *Re* LPS bezeichnet und von sogenannten Tiefraumutanten exprimiert (Raetz 2000).

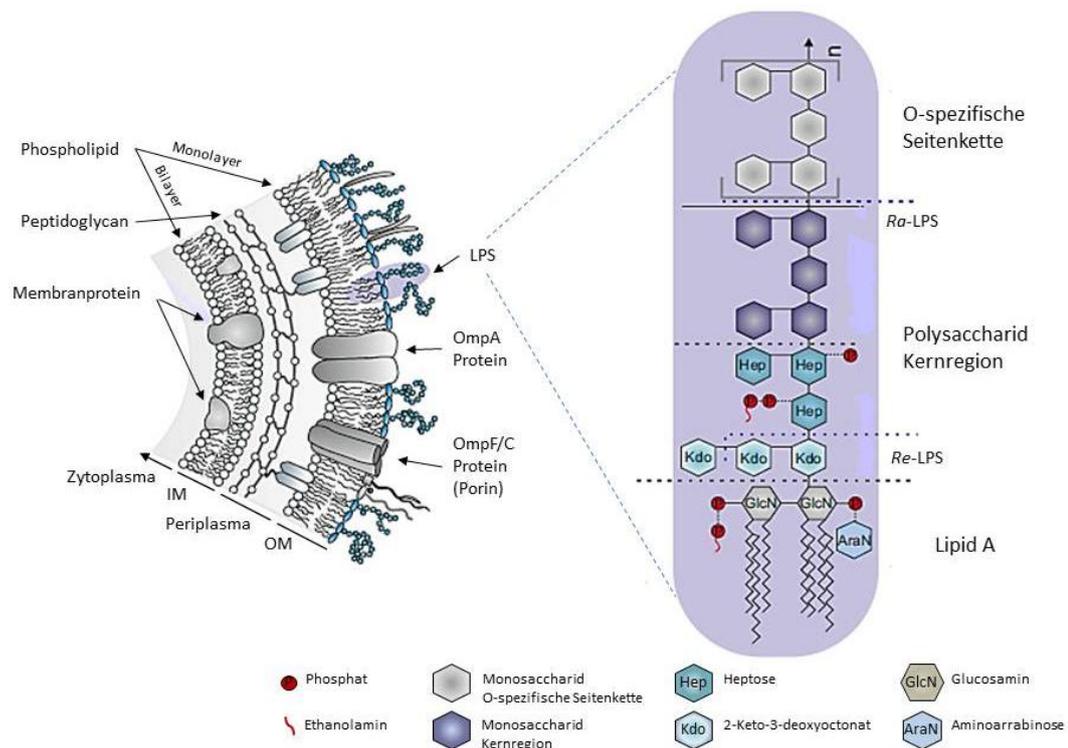


Abbildung 3: Zellhülle Gram-negativer Bakterien und LPS Struktur. Dargestellt sind eine schematische Übersicht der Zellhülle Gram-negativer Bakterien (links) und die exemplarische Lipopolysaccharid(LPS)-struktur von *Salmonella enterica Minnesota* (rechts). Die Zytoplasmamembran oder innere Membran (IM) Gram-negativer Bakterien besteht aus einem Phospholipid-Bilayer, in dem die Membranproteine integriert sind. Die äußere Membran (engl.: *outer membrane*, OM) ist hingegen asymmetrisch und besteht aus einem innenliegenden Monolayer aus Phospholipiden und LPS in der äußeren Schicht. Die Struktur des LPS setzt sich aus Lipid A, einer Kernregion und einer O-spezifischen Seitenkette zusammen. Proteine, die sich in der äußeren Membran befinden, werden als *outer membrane proteins* (Omps) bezeichnet und kommen als Ionenkanäle und Porine vor (modifiziert nach Saathoff, 2013).

Lipid A besteht seinerseits aus einem Glucosamin-Disaccharid an das über eine Esterbindung vier bis sieben Fettsäureketten binden können. Verantwortlich für die Endotoxizität von LPS ist die Lipid A Domäne, die das Immunsystem des Wirtes aktiviert, nachdem LPS beispielsweise durch Tod des Bakteriums freigesetzt wird. Die Folge sind Entzündungsreaktionen bis hin zum septischen Schock (Alexander and Rietschel 2001).

2.2 Rekonstituierte Membranen

Die Reduktion komplexer Systeme auf elementare Strukturen ist in der Wissenschaft ein gängiges Werkzeug, um tiefere Einblicke in die Eigenschaften des Systems zu erhalten. Obgleich das natürliche System weitaus komplexer agiert, lassen sich auf diese Weise Einflüsse einzelner Parameter auf bestimmte Strukturen genauer untersuchen.

Im Falle von Zellmembranen dienen rekonstituierte Membranen als vereinfachtes Modell und können beispielsweise Aufschluss darüber geben, inwiefern die Lipidzusammensetzung oder Umgebungsbedingungen das System beeinflussen.

Um ein Modell zu erschaffen, das dem natürlichen System möglichst nahe kommt, werden meist aufgereinigte oder synthetisierte Lipidzusammensetzungen des zu untersuchenden Organismus verwendet. Die Membransymmetrie des natürlichen Systems kann entweder durch Betrachtung mehrerer einzelner rekonstituierter Membransysteme oder durch den Einsatz asymmetrischer Membransysteme realisiert werden. Neben der Mimikry der natürlichen Membranstruktur werden auch Umgebungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Salzkonzentration der *in vivo* Bedingungen nachgeahmt.

Allgemein werden Modellmembranen in vier wesentliche Gruppen von Rekonstitutionssystemen unterteilt (siehe Abb. 4), deren Existenz, genauso wie bei allen Biomembranen, auf der Selbstorganisation der Lipide in wässrigen Lösungen beruht (siehe Kap. 2.1.2).

Die unterschiedlichen Rekonstitutionssysteme besitzen untereinander Vor- und Nachteile, sodass sich die Wahl eines geeigneten Systems nach der Fragestellung oder der verwendeten Methode richtet. Dementsprechend ist es häufig sinnvoll für eine Fragestellung verschiedene Rekonstitutionssysteme heranzuziehen.

In den nächsten Absätzen sind die vier verschiedenen Systeme rekonstituierter Membranen und deren Einsatzgebiete beschrieben.

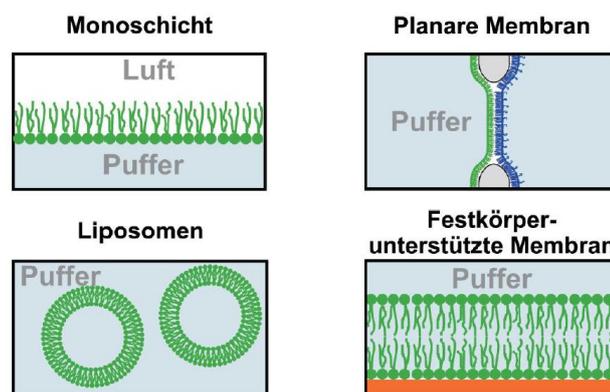


Abbildung 4: Schematische Darstellung der vier rekonstituierten Membransysteme. Lipidmonoschichten (Monolayer) bilden sich an der Luft-Flüssigkeits-Grenze aus, während Liposomen kugelförmige Lipidaggregate sind, die eine wässrige Phase einschließen und frei in Lösung vorkommen. Bei planaren Membranen und festkörperunterstützten Membranen handelt es sich in beiden Fällen um Lipiddoppelschichten (Bilayer). Planare Membranen spannen sich über eine kleine Öffnung zwischen zwei flüssigkeitsgefüllten Kammern, während die festkörperunterstützten Membranen an einem Substrat gebunden sind.

2.2.1 Lipidmonoschichten

Nach Zugabe von Lipiden zu einer wässrigen Lösung bilden diese aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung an der Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche eine Monoschicht aus. Dieses Rekonstitutionssystem kommt vor allem bei der Langmuir-Filmwaage zum Einsatz. Die Messung des lateralen Drucks als Funktion der Oberfläche pro Molekül ermöglicht Aussagen über die Lipideigenschaften oder die Bindung und den Einbau von Peptiden in die Membran (Phillips and Chapman 1968; Chapman and Fluck 1966; Schwarz and Taylor 1995; Wiese, Gutschmann, and Seydel 2003).

2.2.2 Planare Membranen

Bei planaren Membranen handelt es sich um freistehende Membranen aus Lipiddoppelschichten, auch Bilayer genannt, die über eine kleine Öffnung zwischen zwei Kammern hergestellt werden. Jede der zwei Kammern, die mit einer wässrigen Lösung befüllt sind, trägt eine Lipidmonoschicht bei. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen können die elektrische Kapazität der Membran oder Änderungen des Stromflusses, die beispielsweise aus Peptid verursachten Läsionen und Poren in der Membran resultieren, bestimmt werden. Neben den sogenannten *black lipid membranes* (BLMs), die durch direktes Aufbringen von Lipidtropfen auf die Öffnung generiert werden (Mueller et al. 1962), ist die Herstellung von Lipiddoppelschichten nach Montal und Mueller die gängigste. Bei dieser Technik werden zunächst in beiden Kammern Lipidmonoschichten gebildet, die dann durch Anheben der Flüssigkeitsspiegel zu einer Lipiddoppelschicht über der Öffnung führen. Im Gegensatz zu BLMs ist mit dieser Methode auch die Bildung asymmetrischer Membranen möglich (Montal and Mueller 1972).

2.2.3 Liposomen

Eine kugelförmige Anordnung von Lipiden, die eine wässrige Phase in einer Doppelschicht einschließt, nennt man Liposom oder Lipid-Vesikel. Liposomen kommen frei in Lösung vor und sind nicht an Grenz- oder Oberflächen gebunden.

Je nach Größe der Liposomen spricht man von *small*, *large* oder *giant unilamellar vesicles* (SUVs, LUVs oder GUVs). Neben den unilamellaren Vesikeln gibt es auch multilamellare Vesikel, die mehr als eine Doppelschicht aufweisen. Die Art der Präparation richtet sich nach der gewünschten Liposomgröße und der Symmetrie.

Mögliche Einsatzgebiete der Liposomen sind *Förster-Resonanz-Energie-Transfer*(FRET)-Spektroskopie zur Untersuchung von Fusionsprozessen und Peptideinbau oder die Verwendung von Liposomen zur Herstellung von festkörperunterstützten Lipidschichten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Liposomen für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen verwendet (siehe Kap. 2.9), weshalb die entsprechende Präparation in Kapitel 3.8 beschrieben ist.

2.2.4 Festkörperunterstützte Membranen

Rekonstituierte Membranen, bei denen Lipidschichten auf ein Substrat aufgetragen oder konstituiert werden, bezeichnet man als festkörperunterstützte Membranen (engl.: *solid supported membranes*). Zu den üblichen Präparationstechniken gehören die Langmuir-Blodgett-Technik, bei der Lipidmonoschichten oder –doppelschichten von der Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche auf Substrate wie Mica oder Silizium übertragen werden (von Tschärner and McConnell 1981), oder die Spreitung von Liposomen auf speziell hydrophilisierte Festkörperoberflächen (Brian and McConnell 1984).

Festkörperunterstützte Membranen eignen sich beispielsweise für Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie (engl.: *atomic force microscopy*, AFM), Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR), Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) oder akustischer Oberflächenwellen (engl.: *surface acoustic wave*, SAW).

Ein wesentlicher Nachteil von festkörperunterstützten Membranen ist die eingeschränkte Fluidität der Membranlipide und der fehlende Raum zwischen Lipidschicht und Substrat für Membranproteine oder andere Substanzen. Der Einsatz von hydratisiertem Polymermaterial (*polymer cushion*) als Puffermaterial zwischen Substrat und Membran oder die Verwendung von Lipopolymer-Tethern kann zu einer Erhöhung der lateralen Beweglichkeit der Membranlipide führen (Tanaka and Sackmann 2005).

Ein derartiges System stellen die in dieser Arbeit verwendeten *tethered Bilayer Lipid Membranes* (tBLMs) dar, die aus diesem Grund im folgenden Absatz genauer beschrieben sind.

2.2.4.1 Tethered Bilayer Lipid Membranes

Das Prinzip dieser speziellen festkörperunterstützten Membranen beruht darauf, dass ein Lipidbilayer nicht direkt auf einem Substrat, sondern auf sogenannten Tethern konstituiert wird. Die Tether-Moleküle bestehen aus Polyethylenglycol(PEG)-Ketten und sind chemisch über eine Benzylsulfidgruppe an das Substrat, in diesem Fall eine dünne Goldschicht, gebunden.

Neben den Tether-Molekülen sind zusätzlich Spacer-Moleküle, die aus einer kürzeren PEG-Kette bestehen, an das Substrat gebunden. Die Spacer besetzen den Raum zwischen den Tethern

auf dem Substrat und stabilisieren damit nicht nur die längeren Tether-Moleküle, sondern schaffen auch Raum zwischen Substrat und der rekonstituierten Membran, mit der sie nicht in Verbindung stehen. Am Kopfende verleiht eine Hydroxygruppe den Spacern einen hydrophilen Charakter, während die Kopfgruppe der Tether eine hydrophobe Domäne besitzt. Nach Zugabe von Lipiden ordnen sich deren hydrophobe Bereiche an den Kopfgruppen der Tether an. Erst durch Zugabe einer wässrigen Lösung kommt es zum *self-assemble* (siehe Kap. 2.1.2) der Lipide und es entsteht ein Bilayer (siehe Abb. 5).

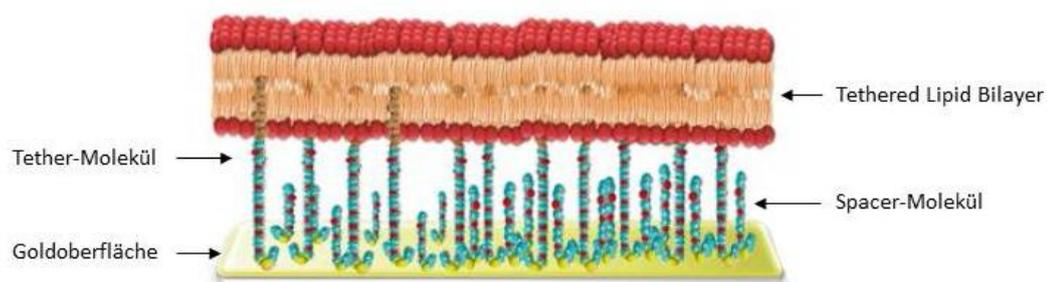


Abbildung 5: Aufbau einer tethered bilayer lipid membrane (tBLM). Die Tether- und Spacer-Moleküle sind über eine Benzyldisulfidgruppe an die Goldoberfläche gebunden. Die hydrophoben Domänen der Tether (braun) ragen in die rekonstituierte Membran, stehen mit den Fettsäureketten der Lipide in Verbindung und stabilisieren die Membran über der Goldoberfläche. Die Spacer-Moleküle halten die Tether-Moleküle auf Abstand und schaffen dadurch zusätzliches Volumen zwischen Goldoberfläche und Membran, in dem sich ebenfalls wässrige Lösung und gegebenenfalls Ionen befinden (modifiziert nach Cranfield, Carne, Martinac, & Cornell, 2015).

Das Verhältnis von Tether- zu Spacer-Molekülen beeinflusst sowohl die Stabilität der rekonstituierten Membran, als auch deren Fluidität. Die Spacer, die aufgrund ihrer geringen Länge und hydrophilen Kopfgruppe nicht mit der Membran interagieren, schaffen in der Membran Bereiche mit mobilen Lipiden. Wird eine Tether Konzentration von 70 % überschritten ist eine Präparation von tBLMs nicht mehr möglich (Krishna et al. 2003). Bei dieser hohen Tether Dichte können nur Substanzen unter 1 kDa aufgenommen werden, da die Bereiche mobiler Lipide nicht größer sind. Im Fall einer Tether Dichte von 10 % sind die Bereiche der mobilen Lipide so groß, dass sich Proteine mit einer molaren Masse bis zu 40 kDa in die Membran integrieren können. Selbst bei einer Tether Dichte von 1 % ist die Membran noch stabil und ermöglicht die Integration von Proteinen mit einer Größe von bis zu 300 kDa (Cranfield et al. 2014).

Wie bereits beschrieben, werden aus mehreren Gründen Benzyldisulfide für die chemische Bindung zwischen den PEG-Ketten und der Goldoberfläche verwendet: Im Vergleich zu Thiolen minimieren Disulfidgruppen das Risiko der Oxidation des Metallsubstrates. Darüber hinaus

verstärkt der Benzolring die Disulfid-Gold Bindung und wirkt gleichzeitig als lateraler Spacer zwischen den Bindungspunkten. Dies schafft weiteres Volumen zwischen Membran und Substrat und erhöht damit die Mobilität von Ionen (Cranfield et al. 2014).

Die Stabilisierung der Membran über die Tether-Metall-Verknüpfung macht die tBLMs wesentlich stabiler als Flüssigkeitsbasierte BLMs, deren Lebensdauer meist nur Minuten bis Stunden beträgt (Cranfield et al. 2015). Selbst mechanischer Stress, der beispielsweise durch Hinüberfließen von Flüssigkeiten entsteht, führt nicht zur Zerstörung der tBLMs (Cranfield et al. 2014). Das System der tBLMs wird im Bereich der Impedanzspektroskopie eingesetzt und liefert Daten zur Kapazität und Leitfähigkeit der Membran (siehe Kap. 3.10).

2.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) gehören zum System der angeborenen Immunantwort und wirken damit als erster Abwehrmechanismus des Organismus gegen Pathogene. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem handelt es sich bei dem Mechanismus der angeborenen Immunantwort um eine unspezifische und unmittelbare Schutzreaktion. Seitdem Steiner et al. 1981 das erste AMP, das aus der Puppe des Schmetterlings *Hyalophora cecropia* isoliert wurde, beschrieben, wurden weitere Hundert AMPs in den verschiedensten Arten von Pflanzen und Tieren gefunden (Teixeira, Feio, and Bastos 2012; Bowdish et al. 2005; Steiner et al. 1981). Ihre Aktivität richtet sich dabei gegen Bakterien, Pilze, Parasiten, Viren oder sogar Krebszellen (Hoskin and Ramamoorthy 2008; Zasloff 2002).

Aufgrund der voranschreitenden Problematik der Antibiotikaresistenz bei Bakterien und der Entwicklung von multiresistenten Keimen, steht die Forschung und Weiterentwicklung von AMPs seit den letzten 25 Jahren im Fokus vieler Arbeitsgruppen. Im Gegensatz zu Antibiotika agieren AMPs nicht nur mit speziellen Rezeptoren, sondern mit der gesamten bakteriellen Membran, führen zur Permeabilisierung und ermöglichen damit das Abtöten der Bakterien (Lohner 2009). Auf diese Weise können Bakterien innerhalb von Minuten zerstört werden (Boman 2003). Zusätzlich konnte den AMPs eine LPS-bindende und –neutralisierende Wirkung, eine Verbesserung der Wundheilung und Stimulation der Produktion und Freisetzung von Chemokinen nachgewiesen werden (Bowdish et al. 2005; Fjell et al. 2012).

Ein weiterer Vorteil der AMPs als potenzielle Therapeutika ist, dass sie aufgrund ihrer geringen Länge von 10 bis 50 Aminosäuren leicht zu synthetisieren sind. Sie besitzen hohe Anteile von Lysin und Arginin, die dem Peptid eine positive Nettoladung verleihen, und rund 50 % hydrophobe Aminosäuren. Kationische und hydrophobe Aminosäuren verteilen sich in separaten Be-

reichen über das AMP und verleihen dem Peptid eine charakteristische amphiphile Struktur (Zaslouff 2002; Bowdish et al. 2005; Glukhov et al. 2005; Lohner 2009).

Die positive Ladung der AMPs ist der ausschlaggebende Faktor, dass die negativ geladene Lipidmembran von Bakterien und nicht die neutrale Membran des Wirtes attackiert wird (Lohner 2009; Teixeira, Feio, and Bastos 2012). Als Bestandteil des angeborenem Immunsystems werden AMPs überwiegend dort produziert, wo die Gefahr eindringender Pathogene am größten ist: dies betrifft die Epithelzellen der Lunge, der Haut und des Verdauungstraktes sowie Neutrophile (Wiesner and Vilcinskas 2010). Die Expression der AMPs erfolgt kontinuierlich oder als Antwort auf eingedrungene Mikroorganismen (Teixeira, Feio, and Bastos 2012). Die bekanntesten Gruppen der humanen AMPs stellen die Defensine und Kathelizidine dar, deren Vertreter im Folgenden genauer beschrieben werden.

2.3.1 Defensine

Defensine zeichnen sich durch sechs Cysteine in ihrer Primärstruktur aus, die zur Ausbildung von drei Disulfidbrücken führen (Lehrer and Ganz 2002; Tomas Ganz 2003; T Ganz and Lehrer 1995). Diese AMPs der Wirbeltiere werden in drei Klassen unterteilt, deren Disulfidbrücken unterschiedlich gepaart sind und sich in der Peptidlänge unterscheiden. Die 29-35 Aminosäuren langen α -Defensine wurden erstmals 1963 in Granulocyten von Kaninchen und Meerschweinchen entdeckt und von Zeya & Spitznagel beschrieben (Lehrer and Ganz 2002; T Ganz and Lehrer 1995; Zeya and Spitznagel 1963). Im Menschen wurden bisher sechs α -Defensine und vier β -Defensine identifiziert (Wiesner and Vilcinskas 2010; Saathoff 2013). Die β -Defensine können bis zu 45 Aminosäuren lang sein und werden von Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute gebildet (Lehrer and Ganz 2002; Wiesner and Vilcinskas 2010). Sowohl α - als auch β -Defensine können die Migration und Reifung von Zellen beeinflussen und die Produktion und Ausschüttung von Cytokinen anregen (Duits et al. 2002; Wiesner and Vilcinskas 2010). Die dritte Klasse bilden die zirkulären θ -Defensine, die auch als Minidefensine bezeichnet werden. Sie kommen allerdings nur in einigen Meerkatzenartigen und Orangutans vor (Lehrer and Ganz 2002; Wiesner and Vilcinskas 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität eines linearen Derviates des humanen β -Defensins 3 (hBD3), das hBD3-1, untersucht. Bei hBD3 handelt es sich um ein 45 Aminosäuren langes Peptid (5154,7 Da), das hauptsächlich in den Zellen der Schleimhäute exprimiert wird (Schibli et al. 2002). Es besitzt die stärksten kationischen Eigenschaften in seiner Klasse und weist damit auch die höchste antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien auf (Harder et al. 2001; Semple et al. 2010). Überdies hinaus besitzt hBD3 eine LPS-neutralisierende Wirkung, sodass Entzündungsreaktionen des Immunsystems gehemmt werden (Semple et al. 2010).

Bei dem Derivat hBD3-1 wurden die sechs Cysteine durch Serine ersetzt, sodass eine Ausbildung der Disulfidbrücken unterbunden wird und ein lineares Peptid entsteht. Aufgrund der fehlenden Disulfidbrücken ist hBD3-1 leichter und kostengünstiger synthetisierbar.

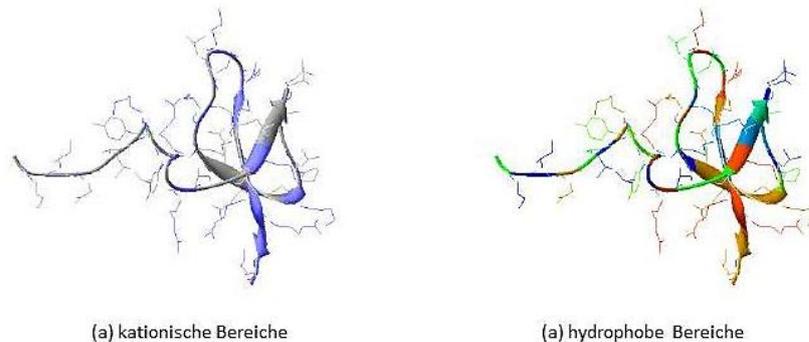


Abbildung 6: Struktur von hBD3. Dreidimensionale Darstellung von hBD3 mit (a) den kationischen Bereichen (blau gefärbt) und (b) den hydrophoben Bereichen (blau und grün gefärbt) (PDB code 1KJ6, aus Saathoff, 2013 (Schibli et al., 2002)).

2.3.2 Kathelizidine

Kathelizidine werden als Prä-Propeptide von Neutrophilen und Epithelien exprimiert und bis zu ihrer Verwendung als Propeptide in Granula gespeichert (Hiemstra 2006; Boman 2003; Bals and Wilson 2003). Das inaktive Kathelizidin besitzt einen konservierten N-Terminus, bestehend aus einer Signalsequenz gefolgt von einer Kathelin-Domäne, und einem antibakteriellen C-Terminus. Durch proteolytische Spaltung zwischen der Kathelin- und AMP-Domäne wird das aktive Kathelizidin freigesetzt (Shinnar, Butler, and Park 2003; Wiesner and Vilcinskas 2010).

Ähnlich wie die Defensine besitzen auch einige Kathelizidine neben ihrer antimikrobiellen Wirkung immunregulierende Faktoren und die Eigenschaft LPS zu binden und zu neutralisieren (Wiesner and Vilcinskas 2010; Bals and Wilson 2003; Nagaoka et al. 2002; Hiemstra 2006).

Im Menschen ist nur ein Kathelizidin, das *human cationic antibacterial protein* mit einer Masse von 18 kDA (hCAP18), bekannt. Das Prä-Propeptid hCAP18 wird durch Protease 3 gespalten und setzt das 37 Aminosäuren lange und aktive Peptid LL37 frei (Sørensen et al. 2001). Dieses α -helikale AMP wird bei Entzündungsreaktionen und Infektionen in Körperflüssigkeiten sekretiert und besitzt ein breites Wirkspektrum gegen Mikroorganismen (Bals and Wilson 2003).

1995 konnten Larrick et al. zeigen, dass das nur 32 Aminosäuren lange Fragment LL32 eine stärkere antimikrobielle Aktivität aufweist als das ursprünglich vorkommende LL37 (Larrick et al. 1995). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit LL32 verwendet.

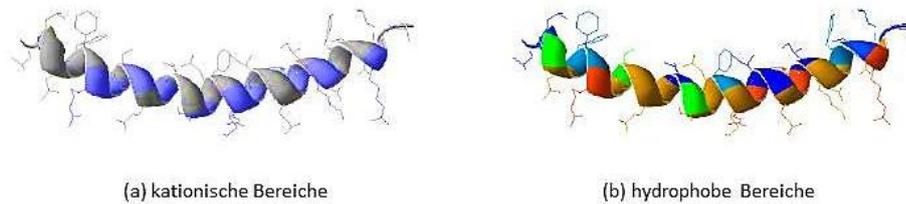


Abbildung 7: Struktur von LL37. Dreidimensionale Darstellung von LL37 mit (a) den kationischen Bereichen (blau gefärbt) und (b) den hydrophoben Bereichen (blau und grün gefärbt) (PDB code 2K6O, aus Saathoff, 2013 (Wang, 2008)).

2.3.3 Arenicin

Im Gegensatz zu den Säugetieren besitzen viele andere Lebewesen kein adaptives Immunsystem, sodass die angeborene Immunantwort den einzigen Schutz gegen eindringende Pathogene darstellt. Dies ist auch bei dem marinen Kiemenringelwurm *Arenicola marina* der Fall. Ovchinnikova et al. isolierten 2004 zwei Isoformen eines AMPs aus *Arenicola marina*, das sie Arenicin nannten. Die Isoformen dieses 21 Aminosäuren langen kationischen Peptids unterscheiden sich nur in einer Aminosäuresubstitution (V10I) und unterscheiden sich nicht in ihrer antimikrobiellen Wirkung (Ovchinnikova et al. 2004).

Im Gegensatz zu der α -helikalen Struktur der Kathelizidine und der β -Faltblatt Struktur der Defensine besitzt Arenicin eine zyklische Haarnadelstruktur, die über eine Disulfidbrückenbindung zwischen Cys3 und Cys20 stabilisiert wird (Andrä et al. 2008). Diese einzigartige Struktur wurde bisher bei keinem weiteren Peptid gefunden (Ovchinnikova et al. 2004).

Arenicin-1 besitzt im Gegenteil zu Arenicin-2 eine globulärere Form und wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht.

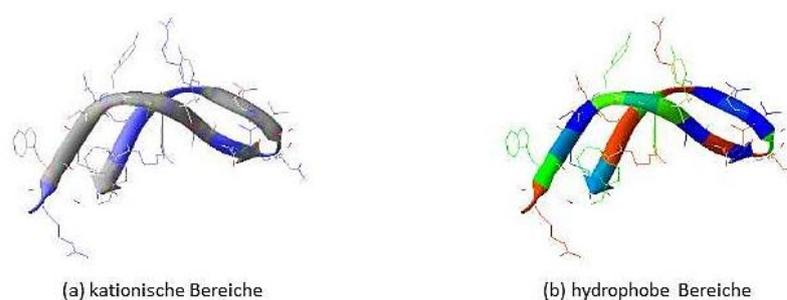


Abbildung 8: Struktur von Arenicin-1. Dreidimensionale Darstellung von Arenicin-1 mit (a) den kationischen Bereichen (blau gefärbt) und (b) den hydrophoben Bereichen (blau und grün gefärbt) (PDB code 2JSB, aus Saathoff, 2013 (Andrä et al. 2008)).

2.3.4 Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit Lipidmembranen

Wechselwirkungen zwischen antimikrobiellen Peptiden und Lipidmembranen entstehen in erster Linie durch starke elektrostatische und hydrophobe Interaktionen, hervorgerufen durch die amphiphilen und kationischen Eigenschaften der Peptide und der negativ geladenen Membran. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen, deren Membran nach außen hin neutral ist, besitzt die bakterielle Membran, insbesondere die LPS-haltige äußere Membran Gram-negativer Bakterien, eine negative Oberflächenladung. Daraus resultiert eine weitaus schwächere Wechselwirkung zwischen eukaryotischen Zellen und AMPs als es bei Bakterien der Fall ist. Die Komposition der äußeren Seite der Zellmembran ist dementsprechend ausschlaggebender Faktor für die Effizienz und gegebenenfalls die Toxizität des Peptids gegenüber Zellen des Wirtes (Lohner 2009; Zasloff 2002).

Die Interaktionen einiger AMPs mit Bakterienmembranen können zu Porenbildung und Läsionen führen. Eine Destabilisierung der Membran und ein Austreten des Zytoplasmas sind die Folge und führen zum Tod des Bakteriums.

Neben der Bildung von Poren und Läsionen wurde in einigen Fällen die Fusion von Membranen und eine Aggregation der Bakterien beobachtet (Daugelavicius, Bakiene, and Bamford 2000; Jung et al. 2009).

Die antibakterielle Wirkung von AMPs muss allerdings nicht nur auf Zerstörung der bakteriellen Membran beruhen, sondern kann auch aus dem Eindringen der Substanz in das Zellinnere resultieren. Dieser Vorgang wird als *self-promoted-uptake* bezeichnet (Hancock 1984). Nachdem die Peptide an die Membran gebunden haben, dort eine Destabilisierung gefolgt von einer Permeabilisierung verursachen, können sie die Membran durch selbst verursachte Läsionen durchqueren. Im Cytosol des Bakteriums angekommen können AMPs zur Blockierung von Nucleinsäuren, sowie zur Störung der Zellwand- oder Peptidsynthese führen (Lohner 2009; Jenssen, Hamill, and Hancock 2006).

Der erste Schritt der Wechselwirkung ist in den meisten Fällen derselbe: das kationische Peptid wird von der negativ geladenen Bakterienmembran angezogen. Die folgenden Schritte hängen von den molekularen Eigenschaften und der Konzentration des Peptids ab. Gängige Modelle der peptidinduzierten Membranpermeabilisierung sind in Abbildung 9 dargestellt. Man unterscheidet das *Barrel-Stack*-, das *Toroidal Pore*- und das *Carpet*-Modell.

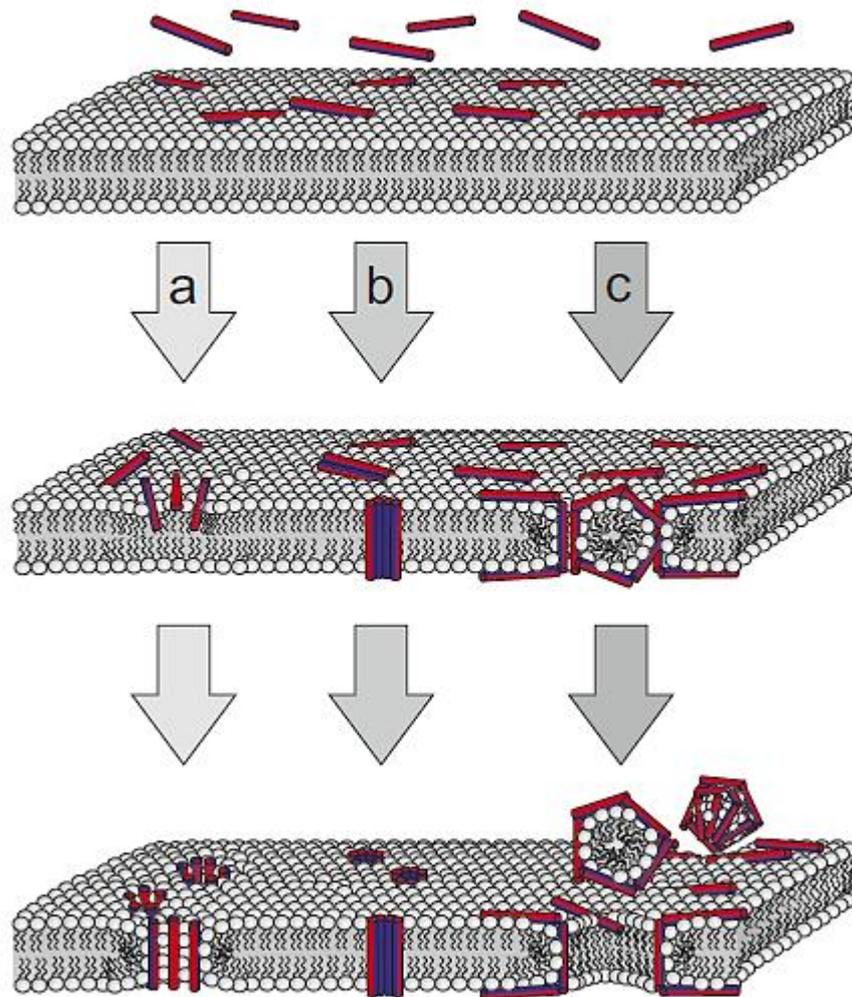


Abbildung 9: Die unterschiedlichen Modelle der Membranpermeabilisierung. Dargestellt sind drei verschiedene Modelle der Permeabilisierung bakterieller Lipidmembranen durch antimikrobielle Peptide. Zu Beginn lagern sich die kationischen Peptide durch elektrostatische Wechselwirkungen an der negativ geladenen Bakterienoberfläche an. Die hydrophilen Bereiche der AMPs sind hier blau dargestellt, während die hydrophoben Bereiche rot gekennzeichnet sind. Im *Toroidal Pore*-Modell (a) interagieren AMPs mit den polaren Kopfgruppen der Lipide. Es kommt zu einer Krümmung der Membran, sodass sich eine Pore bildet. Im Gegensatz dazu bilden die AMPs im *Barrel-Stave*-Modell (b) porenartige Aggregate, die sich in die Membran integrieren. Bei dem *Carpet*-Modell (c) bildet sich ein „Peptid-Teppich“ auf der Membranoberfläche. Bei hohen Peptidkonzentrationen wird die Membran destabilisiert, es kommt zu transienten Läsionen und anschließend zur Bildung von Mizellen und Peptid-Lipid-Aggregaten, die zur Permeabilisierung führen (Saathoff, 2013 nach Jenssen et al., 2006).

Bei dem *Barrel-Stave*-Modell werden die Peptide so eingebaut, dass mehrere Peptide eine Pore ausbilden, die die gesamte Membran durchspannt (siehe Abb. 9b). Die hydrophilen Domänen der Peptide kleiden das Poreninnere aus, während die hydrophoben Bereiche in Verbindung mit den Fettsäureketten der Lipide stehen (Wiesner and Vilcinskas 2010; Teixeira, Feio, and Bastos 2012).

Im Gegensatz zum *Barrel-Stave*-Modell agieren die Peptide im *Toroidal Pore*-Modell nicht mit den hydrophoben Bereichen der Lipide, sondern mit den polaren Kopfgruppen. Die Folge ist ein Krümmen der Membran entlang einer induzierten Pore. Auf diese Weise werden Läsionen nicht vollständig durch Peptide ausgekleidet, sondern auch von Kopfgruppen der Lipide geformt (siehe Abb. 9a) (Lohner 2009; Teixeira, Feio, and Bastos 2012). Das *Toroidal Pore*-Modell trifft für den Mechanismus der AMPs meist eher zu als das *Barrel-Stave*-Modell (Wiesner and Vilcinskas 2010).

Der Wirkmechanismus der meisten AMPs beruht jedoch auf dem *Carpet*-Modell (Wiesner and Vilcinskas 2010). Die Peptide lagern sich auf der bakteriellen Zelloberfläche an und legen sich wie ein Teppich (engl.: *carpet*) über die Membran (siehe Abb. 9c). Ist eine kritische Konzentration erreicht, kommt es zu transienten Läsionen und zur Bildung von Mizellen oder kleinen Peptid-Lipid-Aggregaten (Bechinger and Lohner 2006; Wiesner and Vilcinskas 2010).

Für das antimikrobielle Peptid Arenicin wurde in der Literatur das *Carpet*-Modell, gefolgt von *Toroidalen Poren* beschrieben. Arenicin lagert sich flach auf der Membran an und bildet dort amphiphile Dimere. Ist eine kritische Konzentration erreicht aggregieren die Dimere zu Tetrameren, die dann in die Membran interkalieren (Ovchinnikova et al. 2008).

Auch für hBD3 wird die Wechselwirkung zwischen Peptid und Membran als *Carpet*-Modell beschrieben, das zu einer Störung der Membranintegrität führt (Matsuzaki 1999).

Bezüglich des aktiven Peptides LL37 des humanen Kathelizidins wurde ebenfalls eine parallele Anordnung von LL37 zur Membranoberfläche, gefolgt von einem *Toroidalen Poren*-Mechanismus beschrieben (Brogden 2005; Wildman, Lee, and Ramamoorthy 2003). In der Arbeit von Sevcsik et al. wird für bestimmte Phospholipidzusammensetzungen ein *Carpet*-Modell angenommen, das keine Poren formt (Sevcsik et al. 2008).

3. Material und Methoden

3.1 Puffersysteme

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Versuche an Bakterien und rekonstituierten Membranen unterschiedliche Puffer verwendet. Für die Bakterienversuche wurde ein Puffer mit physiologischen Salzkonzentrationen und pH-Wert verwendet.

Die Wahl der Puffer, die in der Impedanzmessung und beim Kaliumiodid-Quenching verwendet wurden, beruht auf einem methodenübergreifenden Vergleich zur Membranpermeabilisierung, dessen Ergebnisse veröffentlicht werden sollen. Dementsprechend mussten die Puffer auch in der Nanopore-Methode und an planaren Membranen verwendet werden können.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser ($0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$; Milli-Q Advantage A10, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) angesetzt und sterilfiltriert (Steritop ($0,22 \mu\text{m}$), Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Lagerung erfolgte anschließend bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

NaCl-Puffer: Dieser Natriumchlorid(NaCl)-Puffer wurde in allen Versuchen mit Bakterien eingesetzt und besteht aus 150 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; Merck, Darmstadt, Deutschland). Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (1 N , VWR, Darmstadt, Deutschland) auf $7,4$ eingestellt.

HEPES-Puffer: Der HEPES-Puffer wurde für Messungen mit dem tethaPod (siehe Kap. 3.10) und für das Kaliumiodid-Quenching (siehe Kap. 2.9) eingesetzt. Der Puffer enthält 5 mM HEPES und $0,5 \text{ mM}$ Calciumchlorid (CaCl_2) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und wurde mit Kaliumhydroxid (1 N , Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert von $7,4$ eingestellt. Die Anwesenheit zweiwertiger Ionen wie Calcium (Ca^{2+}) ist für die Nanopore-Methode erforderlich, da sie die Spreitung von Phospholipidvesikeln auf dem Substrat fördern (Richter, Bérat, and Brisson 2006). Auf der anderen Seite beeinflussen zweiwertige Ionen aber auch die Wechselwirkung von AMPs mit Membranstrukturen (Gutsmann et al. 2000).

KCl-Puffer: Um die Leitfähigkeit des HEPES-Puffers zu erhöhen wurden diesem noch 100 mM Kaliumchlorid (KCl) (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Die Erhöhung der Ionenkonzentration des HEPES-Puffers war nötig, um bei der Messung planarer Membranen einen ausreichenden Stromfluss zu gewährleisten. Der pH-Wert des Puffers betrug ebenfalls $7,4$.

3.2 Phospholipide und Lipopolysaccharide

Die in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide und Lipopolysaccharide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für die Herstellung von tBLMs wurden die Phospholipide in 99,9 % Ethanol (Ethanol abs.) (Merck, Darmstadt, Deutschland) angesetzt (siehe Kap. 3.10.2), während die Phospholipide für die Herstellung von Liposomen in Chloroform gelöst wurden (siehe Kap. 3.8).

Das verwendete LPS von *Escherichia coli* (*E. coli*) WBB01 wurde nach der Phenol/Chloroform/Petroether-Methode extrahiert (Galanos, Lüderitz, and Westphal 1969) und liegt aufgereinigt, lyophilisiert und in natürlicher Salzform vor. Das LPS wurde nach der Zugabe von Chloroform und Methanol in einem Verhältnis von 1:1 für 20 min bei 60 °C gelöst.

Alle Lösungen wurden in Glasflaschen mit Chloroform resistenten Schraubdeckeln (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) angesetzt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Verwendete Phospholipide und Lipopolysaccharide mit zugehöriger molarer Masse.

Bezeichnung	Ursprung	Masse [Da]	Interne Bezeichnung
DOPC	Synthetisch, Avanti Polar Lipids	786,15	1405
POPE	Synthetisch, Avanti Polar Lipids	718,01	1117
POPG	Synthetisch, Avanti Polar Lipids	770,99	1305
LPS WBB01	<i>E. coli</i> WBB01, Extraktion	2250,00	HL162
NBD-PE	Molecular Probes	956,25	

3.3 Verwendete antimikrobielle Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten antimikrobiellen Peptide wurden von R. Bartels aus der Laborgruppe Strukturbiochemie am Forschungszentrum Borstel synthetisiert und sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Stocklösungen wurden in Konzentrationen von 10 mg/ml oder 1 mM in 0,01 % Trifluoressigsäure (TFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland) präpariert und gegebenenfalls im entsprechenden Puffer herunterverdünnt.

LL32: Bei LL32 handelt es sich um ein Derivat des antimikrobiell aktiven Fragments LL37 des humanen Kathelizidins. Es besitzt eine α -helikale Struktur mit 32 Aminosäuren.

hBD3-1: Das 45 Aminosäuren lange Derivat des humanen β -Defensin 3 (hBD3) besitzt eine lineare Struktur, die aus dem Austausch von sechs Cysteinen gegen die Aminosäure Serin resultiert.

Arenicin-1: Arenicin Isoform 1 (Arenicin-1) stammt ursprünglich aus dem Kiemenringelwurm *Arenicola marina*. Dieses Peptid besitzt eine zyklische Haarnadelstruktur und ist 21 Aminosäuren lang.

Tabelle 2: Verwendete antimikrobielle Peptide mit zugehöriger Aminosäuresequenz und molarer Masse.

Peptid	Aminosäuresequenz	Masse [Da]
LL32	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV	3921,7
hBD3-1	GIINTLQKYYSRVRGGRSAVLSSLPKEEQIGKSSTRGRKSSRRKK	5063,9
Arenicin-1	RWCVYAYVRVRGVLVRRRCW	2758,3

3.4 Verwendete Bakterien

3.4.1 *Escherichia coli*

E. coli aus der Familie der Enterobakterien zählt zu den bekanntesten Vertretern der Gram-negativen Bakterien. Als fakultativ anaerobes Bakterium kann *E. coli* auch unter anaeroben Bedingungen gedeihen. Obwohl das Bakterium als Kommensale im Darm von Menschen und Tieren vorkommt, gibt es auch einige pathogene Stämme, die oft Gastroenteritis oder Harnwegsinfektionen verursachen. Das stäbchenförmige Bakterium ist als Modellorganismus ausgiebig untersucht und dient in vielen molekularbiologischen und biotechnologischen Prozessen als Wirtsorganismus. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm WBB01 gehört zu den Tiefraummutanten und besitzt *Re* LPS in der äußeren Membran.

3.4.2 *Klebsiella pneumoniae*

Bei *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) handelt es sich ebenfalls um ein Gram-negatives Stäbchenbakterium, das fakultativ anaerob ist. Es kommt im Magen-Darm-Trakt und in der Mundflora vor und kann unter bestimmten Umständen Nosokomialinfektionen verursachen. Derartige Infektionen treten oft in Krankenhäusern auf und führen zu Lungenentzündungen

(Pneumonie). *K. pneumoniae* kann aber auch Harnwegsinfektionen oder Meningitis hervorrufen und weist häufig eine Antibiotikaresistenz auf. Diese resultiert aus einem veränderten Enzym, der Beta-Laktamase, welche Antibiotika inaktiviert. Stämme, die diese Resistenz besitzen, werden als ESBL (engl.: *extended spectrum beta-lactamase*) Stämme bezeichnet.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm handelt es sich um einen ESBL Wildtypen.

3.5 Kultivierung der Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme liegen in einer internen Stammbank vor, in der die Bakterien auf Cryoperlen (Cryobank, Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) bei -20 °C gelagert werden. Zu Beginn eines Versuchs wurde eine Übernachtskultur angelegt, indem eine Cryoperle des gewünschten Stammes mittels einer sterilen Kanüle (100 Sterican, Ø 0,9 x 70 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland) in 3 ml LB-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt und bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt wurde. Am Folgetag wurde die Kultur 1:50 in neuem LB-Medium verdünnt. Diese Vorkultur wurde dann für weitere 2,5 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert, um die exponentielle Wachstumsphase der Bakterien zu erreichen.

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte der Kultur bestimmt und mit einer Referenzkurve verglichen. Dazu wurde zuerst 1 ml LB-Medium in einer Acryl-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) als Nullwert und anschließend eine 1:2 verdünnte Bakterien suspension gemessen. Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Spektralphotometer (WPA CO8000, Biochrome, Cambridge, UK) bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Anhand der Referenzkurve des jeweiligen Bakterienstammes konnte dann die Zelldichte bestimmt werden. Die Zelldichte wurde je nach Versuch in Puffer oder LB-Medium auf 1×10^8 cfu/ml eingestellt.

3.6 Antimikrobieller Test

Zur Analyse der antimikrobiellen Wirkung der AMPs wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK, engl.: *minimal inhibitory concentration*, MIC) bestimmt. Dies ist die niedrigste Konzentration der AMPs, bei der kein Wachstum der Bakterien zu verzeichnen ist (Hübner, Sciermoch, and Kramer 2007).

Für die Analyse wurde eine serielle Verdünnung der Peptide in Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Corning, New York, USA) angelegt, die ein Volumen von 90 µl pro Well fasste. Die Wahl der eingesetzten Peptidkonzentrationen orientierte sich an den Ergebnissen von A. Saathoff (Saathoff 2013).

Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen enthielten kein Peptid. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 10 µl der Bakteriensuspension (1×10^8 cfu/ml in LB-Medium) zu jedem Well außer der Negativkontrolle, sodass sich ein Endvolumen von 100 µl mit 10 % LB-Medium ergab. Analog zu den anderen Proben wurden auch der Negativkontrolle 10 µl der abgetöteten Bakterien zugegeben. Für die Negativkontrolle wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension für 10 min gekocht und anschließend 3 min im Ultraschallbad behandelt, um so eine vollständige Abtötung der Bakterien zu erzielen.

Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden in einer mit nassen Cellulose-Tüchern ausgelegten Box bei 37 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Nach 24 h wurde eine Dichtemessung mit dem Platten-Reader Tecan Rainbow (Tecan Group, Crailsheim, Deutschland) bei 620 nm durchgeführt. Anhand dieser Werte konnte das prozentuale Wachstum der Bakterien bestimmt werden (siehe Gl. 1). Die Positivkontrolle (Puffer und Bakterien) lieferte den Wert für 100 % Wachstum, während die Negativkontrolle (Puffer und abgetötete Bakterien) als 0 % Wachstum deklariert wurde.

$$\frac{(OD_{\text{Peptide}} - OD_{\text{Negativkontrolle}})}{(OD_{\text{Positivkontrolle}} - OD_{\text{Negativkontrolle}})} \cdot 100 = \text{Bakterienwachstum in \%} \quad (1)$$

3.7 Fluoreszenzfarbstoff Assays

Um eine membranpermeabilisierende Aktivität der verwendeten AMPs an Bakterien zu untersuchen, wurden verschiedene fluoreszenzfähige Substanzen eingesetzt.

Es sollten Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die sich in ihren Bindungs- und Wirkmechanismen unterscheiden, um etwaige Beeinflussungen der Ergebnisse durch Wechselwirkungen der AMPs mit den Farbstoffen zu erkennen.

Analog zum Antimikrobiellen Test (siehe Kap. 3.6) wurden die Fluoreszenzfarbstoff Assays mit serieller Verdünnung der AMPs in Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) in schwarzen FluoroNUNC 96-Well-Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) durchgeführt, sodass ein Volumen von 80 µl vorlag. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl der jeweiligen Farbstofflösung pro Well. Die peptidhaltenden Wells und die Negativkontrolle wurden zuletzt mit 10 µl Bakteriensuspension (1×10^8 cfu/ml in Puffer, siehe Kap. 3.5) versetzt. Um eine maximale Membranpermeabilisierung für die Positivkontrolle zu erreichen, wurde ein Aliquot der Bakterien für 10 min gekocht und anschließend für 3 min sonifiziert.

Mit dem Platten-Reader Tecan Infinite 200P (Tecan Group, Crailsheim, Deutschland) wurde die zeitabhängige Fluoreszenzemission gemessen. Dazu wurde ein einstündiger kinetischer Zyklus

bei 37 °C gefahren, der alle 5 min in zwölf Zyklen die Emission ermittelte. Zwischen den Messungen wurde die Mikrotiterplatte für 180 s bei 149 rpm geschüttelt.

Das Ausmaß der AMP verursachten Membranpermeabilisierung wurde anhand des Vergleichs der Emissionsintensität der peptidbehandelten Bakterien (Em_{Peptide}) mit der maximalen und minimalen Intensität der Positiv- ($Em_{\text{Positivkontrolle}}$) und Negativkontrolle ($Em_{\text{Negativkontrolle}}$) bestimmt (siehe Gl. 2).

$$\frac{(Em_{\text{Peptide}} - Em_{\text{Negativkontrolle}})}{(Em_{\text{Positivkontrolle}} - Em_{\text{Negativkontrolle}})} \cdot 100 = \text{Membranpermeabilisierung in \%} \quad (2)$$

3.7.1 SYTOX Green Assay

SYTOX Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ist ein grün fluoreszierender Nukleinsäure-Farbstoff, der für Bakterien mit intakter Zellmembran impermeabel ist. 10 µl einer 50 µM SYTOX Green Stocklösung wurden in jedes Well der bereits mit AMPs und Puffer vorbereiteten Mikrotiterplatte (siehe Kap. 3.7) gegeben, sodass eine Endkonzentration von 5 µM vorlag. Im Falle von Membranpermeabilisierung gelangt der Farbstoff in die Zelle, bindet dort an DNA und führt nach einer Anregung bei 488 nm zu einem Anstieg der emittierten Fluoreszenz bei 530 nm.

3.7.2 Propidiumiodid Assay

Propidiumiodid (PI) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ist ebenfalls membranimpermeabel und dringt nur durch bereits beschädigte Membranen in die Bakterien ein. PI interkaliert in die DNA und emittiert nach Anregung bei 535 nm rotes Licht mit einer Wellenlänge von 617 nm. Die Endkonzentration pro Well betrug 10 µg/ml (10 µl aus 100 µg/ml Stock).

3.7.3 Fluoresceindiacetat Assay

Bei Fluoresceindiacetat (FDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) handelt es sich um ein unpolares, membrangängiges Esterase-Substrat, das nicht fluoresziert. Durch enzymatische Hydrolyse werden zwei Acetat-Reste abgespalten und es entsteht Fluorescein. Dieser fluoreszierende Farbstoff ist membranimpermeabel und emittiert nach Anregung bei 495 nm grünes Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm. Im Gegensatz zu SYTOX Green und PI färbt FDA stoffwechselaktive Bakterien mit intakter Zellmembran. Nach Zugabe von 10 µl einer 100 µg/ml Stocklösung lag eine Endkonzentration von 10 µg/ml FDA pro Well vor.

3.7.4 Zombie Green Assay

Zombie Green (BioLegend, San Diego, CA, USA) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der an die primären Aminogruppen von Proteinen bindet. Er ist membranimpermeabel, sodass bei Zellen mit intakten Membranen nur die Oberflächenproteine markiert werden. Bei Zellen mit defekten Membranen gelangt Zombie Green ins Zytoplasma, bindet dort an weitere Proteine und erhöht damit die Fluoreszenzintensität. Es wurden verschiedene Verdünnung des Zombie Greens getestet.

3.8 Präparation von Phospholipid Liposomen und LPS Aggregaten

Liposomen wurden in der vorliegenden Arbeit als Modellmembranen in fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen verwendet. Die Phospholipide 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (POPE) wurden in Stocklösungen mit Konzentrationen von 10 mM in Chloroform angelegt und gegebenenfalls im gewünschten Verhältnis zueinander gemischt. Das N-7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-yl(NBD)-markierte Phosphatidylethanolamine (PE) wurde ebenfalls in Chloroform in einer Konzentration von 2 mM gelöst, während LPS 3,2 mM in Chloroform und Methanol (1:1) präpariert wurde. Die gewünschten Lipide wurden in einem neuen 1,5 ml Glasfläschen mit Schraubdeckel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in einem Verhältnis von 100:1 mit NBD-PE gemischt. Das Chloroform wurde unter Stickstoffzufuhr vollständig abgedampft und die getrockneten Lipide in Puffer aufgenommen, sodass eine Endkonzentration von 1 mM vorlag. Um Liposomen und Aggregate mit einheitlicher Größe herzustellen, wurde die Lipidlösung für 2 min im kontinuierlichen Modus bei 30 % Output sonifiziert (HTU SONI-130, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland). Die Lipidlösung durchlief anschließend einen Temperaturzyklus, um ein Phasengleichgewicht der Lipide zu gewährleisten: es erfolgte eine Lagerung für 30 min bei 4 °C, gefolgt von 30 min im Heizblock bei 60 °C (BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland) und einer Wiederholung der beiden Schritte. Die Liposomen- bzw. Aggregatlösung wurde dann über Nacht bei 4 °C gelagert.

3.9 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz bezeichnet die Emission von Licht ausgehend von einer Substanz, die meist kurz zuvor mit energiereicherem Licht angeregt wurde. Derartige Substanzen werden als Fluorophore bezeichnet. Durch die Absorption von Photonen werden Elektronen des Fluorophors vom

energetisch günstigen Grundzustand S_0 auf ein höheres Energieniveau S_1 gehoben. Innerhalb dieses Niveaus fallen die Elektronen von einem energetisch höheren Schwingungsgrad durch strahlungslose Relaxation auf einen angeregten Grundzustand zurück. Beim Übergang vom angeregten Energieniveau S_1 zum Grundniveau S_0 wird die Energiedifferenz in Form eines Photons emittiert. Es entsteht Fluoreszenz. Innerhalb des Grundniveaus gelangen Elektronen, die noch einen höheren Schwingungszustand aufweisen, abermals strahlungsfrei in den Grundzustand zurück. Aufgrund des Energieverlusts während der zwei inneren Umwandlungen weist das emittierte Licht eine geringere Energie und damit eine größere Wellenlänge auf als das absorbierte Licht. Diese Verschiebung der Wellenlänge wird als *Stokes-Shift* bezeichnet (Lakowicz 2006).

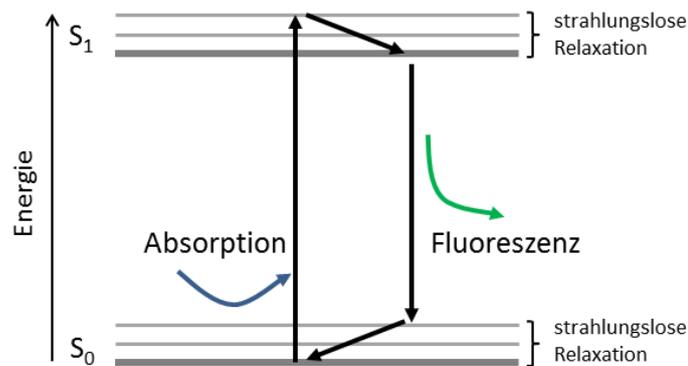


Abbildung 10: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der Fluoreszenz. Ein Elektron wird durch Absorption von speziellem Licht vom Grundniveau S_0 auf das angeregte Energieniveau S_1 angehoben. Innerhalb diesen Niveaus kommt es zur strahlungslosen Relaxation und das Elektron fällt von einem höheren auf einen niedrigeren Schwingungsgrad. Fällt das Elektron vom Energieniveau wieder in auf das Grundniveau, wird Energie in Form eines Photons frei (Fluoreszenz). Auch hier fällt das Elektron wieder von einem höheren Schwingungsgrad auf das unangeregte Grundniveau zurück.

Die Fluoreszenzspektroskopie macht sich die Eigenschaften der Fluorophore und derer Fluoreszenz zu Nutze, um Informationen über die zu untersuchenden Systeme zu gewinnen. Sie zählt zu den dominanten Methoden im Bereich der Biochemie und Biophysik und liefert qualitative und quantitative Analysen von Substanzen oder dient zur Detektion entsprechend markierter Funktionen auf Oberflächen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie für die Analyse der permeabilisierenden Aktivität von AMPs an Liposomen mittels Fluoreszenzlöschung (engl.: *quenching*) mit Kaliumiodid eingesetzt und ist im Folgenden näher beschrieben.

3.9.1 Kaliumiodid-Quenching

Prozesse, die zu einer Abnahme der Fluoreszenz einer Probe führen, werden als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Quenching resultiert aus einer strahlungsfreien Energieübertragung durch bestimmte Moleküle, den sogenannten Quenchern. Für eine Fluoreszenzlöschung müssen sich die Quenching-Partner in sehr engem Kontakt befinden. Diese Eigenschaft wird in der hier beschriebenen Methode ausgenutzt, um die Permeabilisierung von Liposomen durch AMPs nachzuweisen.

Als Quencher wurden Iodid-Ionen in Form von Kaliumiodid (KI) eingesetzt. NBD-markierte Liposomen wurden wie in Kapitel 3.8 beschrieben hergestellt und 1:100 im entsprechenden Puffer verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 10 μM vorlag. In Acryl-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurde ein Volumen von 1751 μl der Liposomenlösung vorgelegt und bei einer Anregung von 470 nm im Fluoreszenzspektrometer Fluorolog 3 (HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching, Deutschland) vermessen. Nach 100 s erfolgte eine Zugabe einer 7 M KI-Lösung im entsprechenden Puffer, sodass eine Endkonzentration von 800 mM vorlag. Durch additive Zugabe der AMPs in Endkonzentrationen von 1 μM , 3 μM und 10 μM nach jeweils 100 s wurde ein Endvolumen von 2 ml erreicht.

Im Falle einer Membranpermeabilisierung können Iodid-Ionen auch in das Innere der Liposomen diffundieren, um dort liegende NBD-Moleküle ebenfalls zu quenchern (siehe Abb. 11). Die Folge wäre ein weiterer Abfall der Fluoreszenz, die bei einer Wellenlänge von 531 nm gemessen wurde.

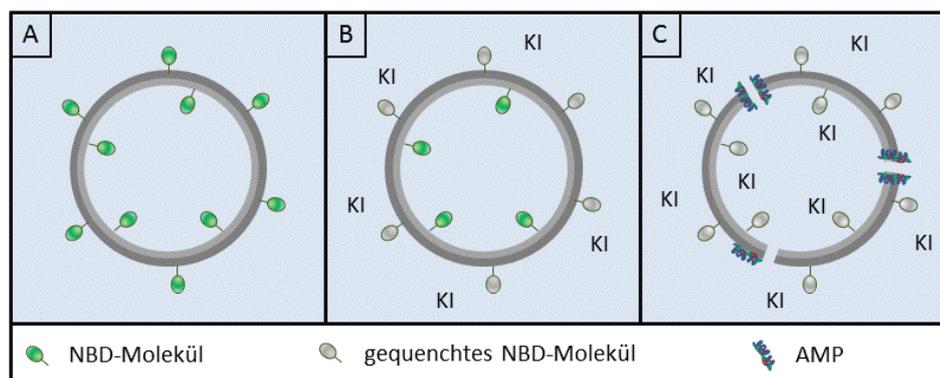


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Kaliumiodid-Quenchings an Liposomen. (A) Zu Beginn liegen die NBD-markierten Liposomen in Puffer vor. Nach der Zugabe von KI (B) werden die NBD-Moleküle der äußeren Lipidschicht gequenchert, während die im Inneren liegenden NBD-Moleküle weiterhin fluoreszieren. (C) Erst durch die Permeabilisierung der Lipidmembran, etwa durch AMP verursachte Poren oder Läsionen, gelangt das KI auch ins Innere der Liposomen, quenchert die dort befindlichen NBD-Moleküle und verursacht einen weiteren Abfall der Fluoreszenzintensität.

3.10 Impedanzspektroskopie an festkörperunterstützten Membranen

In der Impedanzspektroskopie wird der frequenzabhängige Wechselstromwiderstand (Impedanz) einer Probe gemessen, um die Beweglichkeit von Ladungsträgern zu untersuchen. Dadurch können beispielsweise die Leitfähigkeit und die Kapazität von Proben bestimmt werden.

Das zu untersuchende Elektroden-Proben-System wird durch eine elektrische Wechselspannung aus ihrem Gleichgewichtszustand gebracht. Die Antwort des Systems erfolgt dann in Form eines zur anregenden Spannung phasenverschobenen elektrischen Stromes.

Die Frequenzbereich-Methode findet am häufigsten Verwendung in der Impedanzspektroskopie. Bei dieser Methode erfolgt die Anregung des Systems mit einer Wechselspannung definierter Amplitude und schrittweise variierender Messfrequenz. Zu jeder einzelnen Messfrequenz wird die Amplitude des resultierenden Stromsignals und des dazugehörigen Phasenverschiebungswinkels gegenüber der anregenden Spannung gemessen. Aus dieser frequenzabhängigen Systemantwort werden anschließend alle für die Auswertung relevanten Größen berechnet.

Voraussetzung für diese Messung ist jedoch, dass bekannt ist wie sich Strom und Spannung in der elektronischen Schaltung bei Wechselstrom verhalten.

Die in dieser Arbeit neu etablierte Methode des tethaPods (Modell SDx-R1) (SDx Tethered Membranes Pty Ltd, Sydney, Australien) in der Forschungsgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel verwendet die Frequenzbereich-Methode und ist im Folgenden näher beschrieben.

3.10.1 Theorie

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System besteht aus den tethaPlates (Modell SDx-T10) und dem tethaPod (Modell SDx-R1) der Firma SDx Tethered Membranes Pty Ltd aus Sydney, Australien.

Eine tethaPlate besitzt sechs Probenkammern, in denen sich jeweils ein Paar Goldelektroden befindet. Die untere Goldelektrode ist mit Tethern (Benzylidisulphid-tetraethyleneglycol-monophytan) und Spacern (Benzylidisulphid-tetraethyleneglycol) in einem Verhältnis von 1:10 beschichtet und wird auch als T10 Elektrode bezeichnet (siehe Abb. 12) (Cranfield et al. 2015). T10 Elektroden ermöglichen die Konstitution von Modellmembranen, die sogenannten tBLMs (siehe Kap. 2.2.4.1).

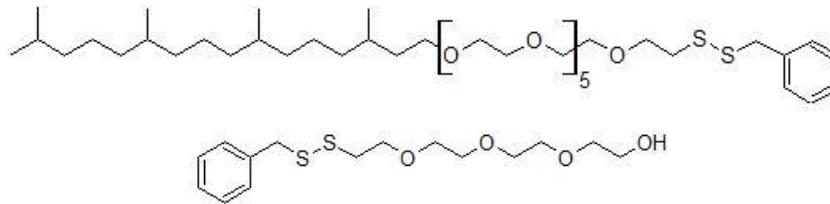


Abbildung 12: Chemische Strukturformel der Tether und Spacer der T10 Elektrode. Die T10 Elektrode ist mit Tethern (oben) und Spacern (unten) in einem Verhältnis von 1:10 beschichtet. Die Tether bestehen aus Benzyldisulphid-tetraethyleneglycol-monophytan, dessen Phytangruppe hydrophob ist. Die Spacer besitzen hingegen eine hydrophile Hydroxygruppe. Sowohl Tether als auch Spacer sind über eine Benzyldisulfidgruppe an die Gold-elektrode gebunden.

Der Abstand zwischen der Membran und der unteren Elektrode, auch Tethering-Elektrode genannt, beträgt 2 bis 2,5 nm. Dieses Volumen bietet ein Reservoir für Ionen, die während der Messung die Membran passieren können (Cranfield, Bettler, and Cornell 2014). Insgesamt beträgt der Abstand zwischen der Tethering-Elektrode und der Counter-Elektrode rund 100 μm . Die Tethering-Elektrode besitzt eine Fläche von 2,1 mm^2 , die für die Bildung der Membran zur Verfügung steht (Cranfield, Bettler, and Cornell 2014; Cranfield et al. 2014).

Die so aufgespannte Membran kann in einem elektrischen Feld durch ein Ersatzschaltbild dargestellt werden (siehe Abb. 13B). Sowohl die beiden Goldelektroden als auch die Membran selbst können als Kondensator angenommen werden: Die Ladungsverteilung in der Goldelektrode stellt eine Platte des Kondensators dar, während die andere Platte durch Ionen in der wässrigen Lösung repräsentiert wird. Durch das Anlegen einer Spannung V liegen zu Beginn circa 90 % der Spannung über der tBLM (C_m) und 10 % über der Tethering- (C_{th}) und Counter-Elektrode (C_c) an. Nach einiger Zeit sind C_{th} und C_c aufgrund der unspezifischen Leitfähigkeit der Membran geladen und die Spannung über C_m geht gegen null. In diesem Moment ist die Spannung über C_{th} und C_c nahezu V (Cranfield, Bettler, and Cornell 2014; Cranfield et al. 2014). Die Leitfähigkeit der Membran wird als G_m bezeichnet und bildet zusammen mit der Kapazität der Membran im Ersatzschaltbild ein RC-Glied.

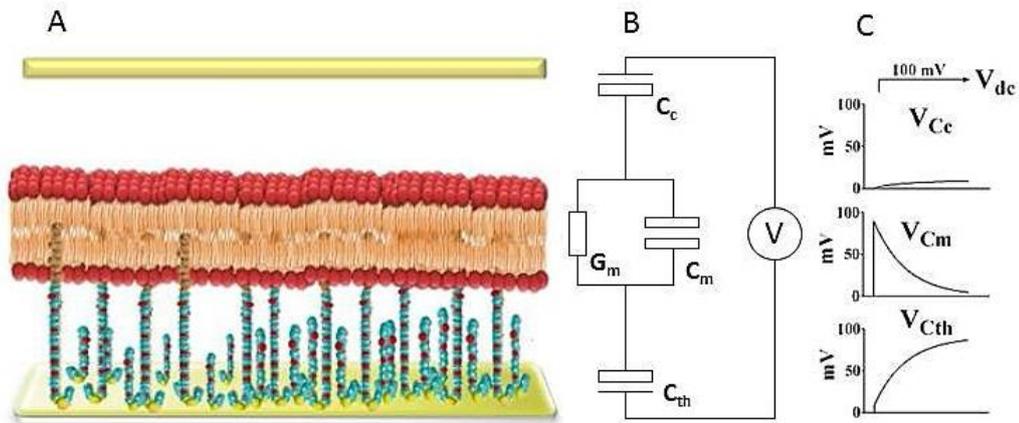


Abbildung 13: Darstellung einer tBLM mit Ersatzschaltbild. (A) Schematische Darstellung des Aufbaus einer tBLM. Das dazugehörige Ersatzschaltbild (B) besteht aus einer Reihenschaltung von zwei Kondensatoren und einem RC-Glied. Die Counter- und Tether-Elektrode stellen die Kondensatoren C_c und C_{th} dar. Die Goldoberfläche der Elektroden, auf der sich die Ladung verteilt, bildet dabei eine der Kondensatorplatten und wird als Linie dargestellt. Die andere Platte besteht aus Ionen der wässrigen Phase, die sich an der Goldelektrode sammeln, und wird als Rechteck dargestellt. Die Kapazität der Membran C_m wird ebenfalls durch zwei Rechtecke dargestellt, um die entgegengesetzte Verteilung der Ionen zu repräsentieren. Die Leitfähigkeit der Membran G_m wird durch einen Widerstand dargestellt. Wird dieses System mit einer konstanten Spannung von $V_{dc} = 100$ mV beaufschlagt (C), strebt die Spannung über der Membran von ca. 90 % der Spannung zu Beginn nach einer kurzen Zeit gegen null (modifiziert nach Cranfield, Bettler, et al. 2014).

Die aktuelle Spannung über der Membran kann quantitativ als zeitliche Funktion von der Kapazität der in Reihe geschalteten Kondensatoren C_{th} und C_c , auch als C_s bezeichnet (siehe Gl. 3), und des Stroms in der Zeit t , der durch G_m fließt, beschrieben werden. Aus dem Integral des Stromes lässt sich die akkumulierte Ladung für diesen Zeitbereich bestimmen und daraus der Spannungsanstieg aus dem Quotienten der Ladung Q zur Kapazität C_s berechnen (Cranfield et al. 2014).

$$C_s = \frac{C_c C_{th}}{C_c + C_{th}} \quad (3)$$

Das System des tethaPods arbeitet bei einer Wechselspannung von 20 mV über Frequenzen zwischen 1000 und 0,125 Hz. Die in Echtzeit ermittelten Impedanzwerte werden an ein idealisiertes Äquivalentschaltbild der tBLM angepasst. Dazu wird ein Referenzelement in Reihe zu dem Membran-Elektroden-System geschaltet (siehe Abb. 14). Das Referenzelement ist ein RC-Glied mit bekannten Größen, die so gewählt sind, dass sie der Größenordnung der erwarteten Werte der tBLM entsprechen (Cranfield et al. 2014).

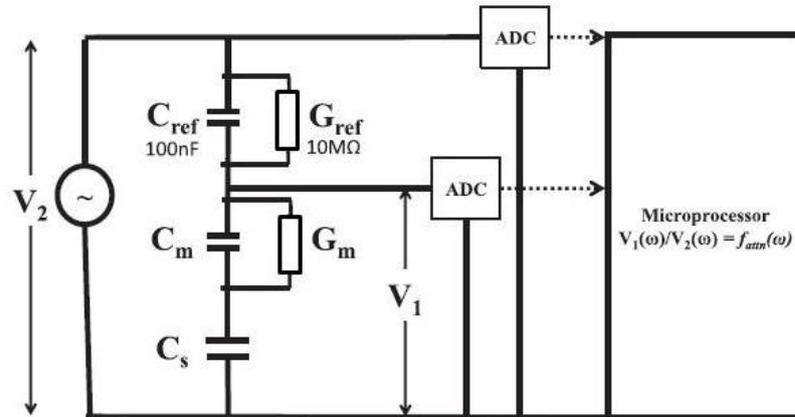


Abbildung 14: Ersatzschaltbild zur Bestimmung der Werte der Impedanzspektroskopie. Das Membran-Elektroden-System wird durch C_s , C_m und G_m repräsentiert und ist mit einem RC-Glied als Referenz in Reihe geschaltet. C_{ref} und G_{ref} besitzen bekannte konstante Größen. Die Spannung V_2 wird über das gesamte Netzwerk gemessen, während V_1 die Spannung über der unbekanntem Impedanz des Membran-Elektroden-Systems liefert. Die Messwerte werden über einen A/D-Wandler (engl.: *analog-to-digital-converter*, ADC) an den Mikroprozessor weitergeleitet (Cranfield et al. 2014).

Aus dem Verhältnis der Spannung über dem Membran-Elektroden-System V_1 und der Spannung über dem gesamten Netzwerk V_2 lässt sich ein frequenzabhängiger Dämpfungsfaktor $f_{attn}(\omega)$ bestimmen (siehe Gl. 4) (Cranfield et al. 2014).

$$f_{attn}(\omega) = \frac{V_1}{V_2} = \frac{I \cdot Z_1}{I \cdot Z_2} = \frac{\left(\frac{(a_l d_l + b_l e_l)^2 + (d_l b_l - a_l e_l)^2}{(e_l^2 + d_l^2)} \right)^{0,5}}{\left(\frac{(a_t d_t + b_t e_t)^2 + (d_t b_t - a_t e_t)^2}{(e_t^2 + d_t^2)} \right)^{0,5}} \quad (4)$$

Nach dem ohmschen Gesetz ergibt sich die Spannung des Membran-Elektroden-Systems V_1 aus dem Produkt der Impedanz Z_1 und des Stroms I , der durch das Netzwerk fließt. Äquivalent dazu liefert die Impedanz des gesamten Netzwerkes Z_2 multipliziert mit dem Strom I die Spannung über dem Gesamtnetzwerk V_2 . Die Konstanten der Gleichung 4 beziehen sich auf die Impedanz des Gesamtnetzwerkes (t , für *total*) und des Membran-Elektroden-Systems (l , für *load*), während ω die Frequenz in rad/s angibt. Für das Gesamtnetzwerk gilt:

$$a_t = 1 - \frac{\omega^2(C_m C_s + C_{ref} C_m + C_{ref} C_s)}{G_m G_{ref}}, \quad (5)$$

$$b_t = \omega \left(\frac{C_s}{G_{ref}} + \frac{C_s}{G_m} + \frac{C_{ref}}{G_{ref}} + \frac{C_m}{G_m} \right), \quad (6)$$

$$d_t = \omega^2 C_s \left(\frac{C_{ref}}{G_{ref}} + \frac{C_m}{G_m} \right), \quad (7)$$

und

$$e_t = \omega C_s - \left(\frac{\omega^3 C_{ref} C_m C_{th}}{G_{ref} G_m} \right). \quad (8)$$

Für das Membran-Elektroden-System (*load*-Netzwerk) gilt:

$$a_l = 1, \quad (9)$$

$$b_l = \omega \left(\frac{C_s}{G_m} + \frac{C_m}{G_m} \right), \quad (10)$$

$$d_l = -\frac{\omega^2 C_s C_m}{G_m}, \quad (11)$$

und

$$e_l = \omega C_s. \quad (12)$$

Mit Hilfe eines Mikroprozessors (ADuC70/24, Analog Instruments, Norwood, MA, USA) wird die Modellgleichung an den experimentell ermittelten Dämpfungsfaktor $f_{attn}(\omega)$ angepasst, so dass die Abweichung zwischen beiden Werten minimal wird. Die mathematische Anpassung liefert die Parameter C_m , G_m und C_s (Cranfield et al. 2014). Die Übereinstimmung zwischen experimentellen und Modellwerten wird mit Hilfe der Anpassungsgüte (engl.: *goodness of fit*, GOF) beurteilt (siehe Gl. 13). Liegt der GOF unter 0,1 weist dies auf eine gute Anpassung der Werte an das Referenzmodell und eine homogene Membran hin (Cranfield et al. 2015; Cranfield et al. 2014).

$$GOF = \sum_{\omega=2\pi 0,1}^{\omega=2\pi 1000} ((f_{attn}(\omega)_{experimentell} - f_{attn}(\omega)_{Modell})^2)^{0,5} \quad (13)$$

Nach diesem Prinzip ermöglicht der tethaPod eine Echtzeit-Messung von Membranen, indem er als ratiometrisches Impedanzspektrometer mit einer Abtastfrequenz agiert (Cranfield et al. 2014), das Leitfähigkeit und Kapazität der Membran bestimmt. Die ermittelte Leitfähigkeit, die proportional zum Ionenfluss durch die Membran ist, gibt Auskunft über die Permeabilität der Membran, während die Kapazität antiproportional zur Membrandicke ist (Cranfield et al. 2015). Das tethaPod-System besitzt den Vorteil, dass die Leitfähigkeit über eine relativ große Fläche integriert wird und so neue Möglichkeiten für die Untersuchung der permeabilisierenden Aktivität antimikrobieller Peptide bietet.

3.10.2 Versuchsdurchführung

Bevor die tethaPlate (SDx Tethered Membranes Pty Ltd, Sydney, Australien) verwendet werden kann, muss diese aus einem mit Tethern und Spacern beschichteten Slide und einem Kunststoffaufsatz (engl.: *Cartridge*) zusammengesetzt werden. Die Messungen wurden mit T10 Slides durchgeführt, bei denen die Goldelektrode mit Tethern und Spacern in einem Verhältnis von 1:10 beschichtet ist. Die Slides werden in Ethanol bei 4 °C gelagert und müssen vor der Verwendung auf die gewünschte Versuchstemperatur gebracht werden. Die Impedanzmessungen wurden bei 37 °C unter einer Inkubationshaube (Unihood RSC-550, LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland) durchgeführt.

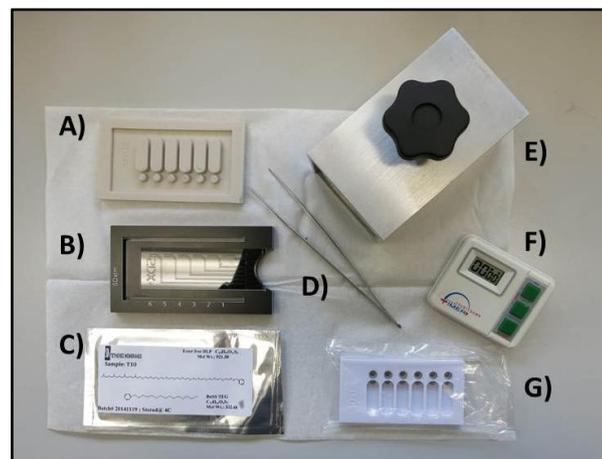


Abbildung 15: Übersicht des benötigten Materials für den Zusammenbau einer tethaPlate. (A) Silikon-Spreader, (B) Assembly Jig, (C) verpackter T10 Slide, (D) Pinzette zum Entnehmen des Slides, (E) Klemme und Aluminiumplatte, (F) Timer und (G) Cartridge.

Bevor der Slide in die *Assembly Jig* gelegt wurde (siehe Abb. 16A), wurde dieser hochkant aufgestellt und für 1 min getrocknet. Durch Entfernen der Schutzfolie auf der Unterseite der Kunststoff-*Cartridge* konnte diese mit Hilfe der *Assembly Jig* auf den Slide aufgebracht werden (siehe Abb. 16B). Dabei war darauf zu achten, dass beide Komponenten richtig in der *Assembly Jig* montiert wurden (Beachtung der Beschriftung). Anschließend wurde ein Silikon-*Spreader* in die Aussparungen der *Cartridge* gedrückt (siehe Abb. 16C), von einer Aluminiumplatte bedeckt und das gesamte Konstrukt für 1 min in einer Klemme eingespannt, um die *Cartridge* gleichmäßig auf dem Slide zu befestigen (siehe Abb. 16D). Nach der Entfernung des Silikon-*Spreader*s (siehe Abb. 16E) konnte die fertige tethaPlate verwendet werden (siehe Abb. 16F).

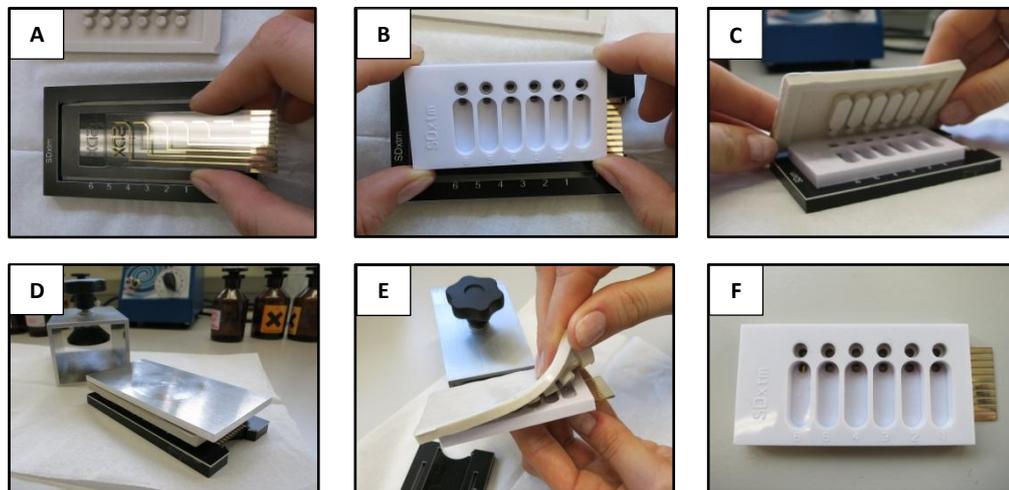


Abbildung 16: Ablauf des Zusammenbaus einer tethaPlate. (A) Der getrocknete Slide wird in die *Assembly Jig* gesetzt, (B) die *Cartridge* aufgesetzt und anschließend (C) der Silikon-*Spreader* in die Aussparungen der *Cartridge* gedrückt. (D) Für eine feste Verbindung zwischen *Cartridge* und Slide wird das gesamte Konstrukt in einer Klemme gepresst. (E) Nach Entfernen des Silikon-*Spreader*s (F) ist die tethaPlate einsatzbereit.

Für die Herstellung von tBLMs wurden in jede Kammer 8 μl einer 3 mM Lipidlösung gegeben. Die Lipide wurden einzeln in 99,9 % Ethanol (Ethanol abs., Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Konzentration von 3 mM angesetzt und gegebenenfalls im gewünschten Verhältnis in neuen Glasfläschen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemischt. Nach 2 min Inkubation wurden 93,4 μl Puffer in die runden Zugabekammern gegeben. Es folgten drei Waschschrte mit 100 μl Puffer. Anschließend wurde die tethaPlate in den tethaPod Reader (SDx Tethered Membranes Pty Ltd, Sydney, Australien) geschoben und die Messung gestartet. Die Membranen wurden vor der Zugabe der AMPs für 20 min gemessen, um ein stabiles Grundsignal zu erhalten. Um die Verdunstung des Puffers innerhalb der Inkubationshaube zu reduzieren, wurde die tethaPlate mit zwei Objektträgern bedeckt.

Die verwendeten AMPs lagen in einer 1 mM Stocklösung in 0,01 % TFA vor und wurden in neuen Mikroreaktionsgefäßen auf Konzentrationen von 150 μM , 45 μM und 15 μM verdünnt. Es erfolgten drei additive Zugaben von 6,7 μl der Peptidverdünnungen in aufsteigender Konzentration in Abständen von 15 min. Auf diese Weise betrug die Endkonzentration pro Messkammer nach der ersten Peptidzugabe 1 μM , nach der zweiten ca. 3 μM und nach der dritten ca. 10 μM .

Es wurden Membranen aus DOPC und POPE:POPG (4:1, M:M) verwendet und in zwei Puffersystemen untersucht: 0,5 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4 sowie 100 mM KCl 0,5 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

4. Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der in dieser Arbeit angewandten Methoden dargestellt und im Einzelnen diskutiert.

4.1 Aktivität antimikrobieller Peptide gegen Gram-negative Bakterien

Der Einsatz von AMPs als Therapeutika wird seit geraumer Zeit von vielen Arbeitsgruppen untersucht. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass AMPs eine Permeabilisierung der Bakterienmembran verursachen und damit zum Tod des Bakteriums führen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, sowohl die Membranpermeabilisierung als auch die Wachstumsinhibierung von Bakterien mit geeigneten Methoden zu untersuchen. Zum Einsatz kamen drei strukturell sehr unterschiedliche Peptide: LL32 als α -helikales Peptid, das lineare Derivat des humanen β -Defensins 3 hBD3-1 und das nicht humane Arenicin-1, das eine β -Haarnadelstruktur aufweist. Die Aktivität und Auswirkung dieser AMPs wurde gegen die Gram-negativen und klinisch relevanten Bakterienstämme *E. coli* und *K. pneumoniae* untersucht.

4.1.1 Wachstumshemmende Eigenschaften der antimikrobiellen Peptide

Die bedeutendste Wirkung der AMPs beruht auf ihrer Wirkung, das Wachstum von Bakterien zu hemmen und diese sogar abzutöten. Um diese Eigenschaften auch für die in dieser Arbeit verwendeten AMPs an *E. coli* und *K. pneumoniae* zu testen, wurde ein antimikrobieller Test durchgeführt (siehe Kap. 3.6). Das Wachstum der Bakterien wurde in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der AMPs untersucht und daraus der MIC-Wert ermittelt. Der MIC-Wert entspricht der geringsten AMP Konzentration, bei der kein signifikantes Wachstum der Bakterien mehr zu erkennen ist. In der Arbeit von A. Saathoff wurden bereits die MIC-Werte für LL32, hBD3-1 und Arenicin-1 für *E. coli* und *K. pneumoniae* beschrieben und dienten als Orientierung für die eingesetzten AMP Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit (Saathoff 2013). Allerdings beziehen sich die Angaben aus A. Saathoffs Arbeit auf 1×10^5 cfu/ml, während in dieser Arbeit MIC-Werte für 1×10^7 cfu/ml ermittelt wurden. Die erhöhte Bakteriendichte wurde gewählt, da diese in den Fluoreszenzfarbstoff Assays nötig ist, um ein ausreichend starkes Signal zu erlangen. Auf diese Weise können die Ergebnisse beider Methoden besser miteinander verglichen werden.

Die Ergebnisse setzen sich aus dem arithmetischen Mittel aus fünf unabhängigen Versuchen, die jeweils als Triplikat durchgeführt wurden, zusammen. Dabei zeigte sich zwischen den ein-

zelen Versuchen eine große Diversität der Ergebnisse. Die MIC-Werte wurden unter Einbezug der Standardabweichung bestimmt und sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: MIC-Werte für AMPs an *E. coli* und *K. pneumoniae*. Die Bakterien (1×10^7 cfu/ml) wurden in einem 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer bei pH 7,4 mit 10 % LB-Bouillon und unterschiedlichen AMP Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h wurden die MIC-Werte für LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 bestimmt.

Bakterienstamm	MIC [$\mu\text{g/ml}$]		
	LL32	Arenicin-1	hBD3-1
<i>E. coli</i>	32	8	256
<i>K. pneumoniae</i>	128	32	> 2048

Die ermittelten MIC-Werte zeigen, dass *E. coli* sensitiver auf AMPs reagierte als *K. pneumoniae*, da hier geringere AMP Konzentrationen erforderlich waren, um das Wachstum der Bakterien zu hemmen. Möglicherweise spielt die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien eine Rolle, die bei *E. coli* deutlich geringer ist als bei *K. pneumoniae*. Im Falle von Antibiotika wirken sich diese oft auf schnell wachsende Bakterienstämme stärker aus als auf langsamer wachsende, da sie den Metabolismus der Bakterien stören. Für AMPs wurde in diesen Versuchen Gegenteiliges beobachtet.

Der Vergleich der AMPs zeigt, dass von Arenicin-1 die geringsten Konzentrationen benötigt wurden, um das Wachstum beider Bakterienstämme zu hemmen. Bei *K. pneumoniae* konnte keine der eingesetzten hBD3-1 Konzentrationen das Bakterienwachstum hemmen. Im Falle von *E. coli* wurde der MIC-Wert bei einer Konzentration von 256 $\mu\text{g/ml}$ hBD3-1 bestimmt. Konzentrationen, die unter dem MIC-Wert von hBD3-1 lagen ($< 256 \mu\text{g/ml}$), führten zu einem stärkeren Wachstum der behandelten *E. coli* Bakterien im Vergleich zur Positivkontrolle (unbehandelte Bakterien). Es scheint, als würde hBD3-1 das Wachstum der *E. coli* Kulturen fördern, bis eine kritische Konzentration (MIC-Wert) erreicht wird, bei der die Bakterien im Wachstum gehemmt werden. Derartige Phänomene werden als Reaktion der Bakterien auf kritische Umgebungsbedingungen beschrieben, um so die Kultur zu erhalten, bis wieder günstigere Bedingungen vorliegen. Bei *K. pneumoniae* wurde dieses Phänomen nicht beobachtet.

Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten MIC-Werte von LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 für *E. coli* und *K. pneumoniae* mit den Ergebnissen aus A. Saathoffs Arbeit, so zeigt sich, dass die hundertfach höhere Bakteriendichte auch höhere MIC-Werte fordert (Saathoff 2013).

Im Schnitt waren die MIC-Werte für 1×10^7 cfu/ml um das Zwei- bis Vierfache höher als bei 1×10^5 cfu/ml. Lediglich bei *K. pneumoniae* blieb der MIC-Wert für LL32 unverändert bei 128 µg/ml. Eine Ausnahme bildet hBD3-1, da hier für 1×10^7 cfu/ml deutlich höhere Konzentrationen nötig waren als bei 1×10^5 cfu/ml.

4.1.2 Permeabilisierende Aktivität an bakteriellen Membranen

Um eine Peptid induzierte Membranpermeabilisierung an vitalen Bakterien zu untersuchen, wurden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt und miteinander verglichen. Die Fluoreszenzfarbstoff Assays wurden an Bakterien der Stämme *E. coli* und *K. pneumoniae* mit einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 durchgeführt (siehe Kap. 3.7). Unmittelbar nach der Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe und Bakterien erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität alle 5 min bei 37 °C über einem Zeitraum von 1 h. Das aufgenommene Zeitspektrum sollte zusätzliche Informationen über die Geschwindigkeit der Permeabilisierung liefern. Die eingesetzten Konzentrationen der AMPs LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 orientierten sich ebenfalls an der Arbeit von A. Saathoff (Saathoff 2013).

Bei den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen SYTOX Green und PI handelt es sich um membranpermeable Substanzen, die nach der Bindung an Nukleinsäuren der DNA fluoreszieren. SYTOX Green wurde in der Forschungsgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel bereits zur Überprüfung der membranpermeabilisierenden Aktivität von AMPs eingesetzt (Andrä et al. 2008; Saathoff 2013) und lieferte auch in dieser Arbeit aussagekräftige Ergebnisse. In Abbildung 17 ist die konzentrationsabhängige Membranpermeabilisierung von *K. pneumoniae* durch die AMPs LL32 (a), Arenicin-1 (b) und hBD3-1 (c) dargestellt. Der Grad der Permeabilisierung bezieht sich auf die Positivkontrolle, in der eine 100 %ige Zerstörung der Membran durch Aufkochen der Bakterien erreicht werden sollte, und auf die Negativkontrolle, die unbehandelte Bakterien enthielt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der unterschiedlichen Proben gemessen und verglichen (siehe Gl. 2). LL32 erreichte bei *K. pneumoniae* nach 15 min Inkubationszeit die maximale Permeabilisierung von ca. 90 %. Für Arenicin-1 ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten, jedoch wurde nur eine Membranzerstörung von ca. 70 % erreicht. Deutlich schlechtere Ergebnisse lieferte hBD3-1: die maximale Permeabilisierung wurde erst nach 1 h Inkubation erreicht und lag bei ca. 45 %. Die Ergebnisse zeigen, dass die kinetische Aktivität von hBD3-1 bei *K. pneumoniae* deutlich langsamer und schwächer ist im Vergleich zu LL32 und Arenicin-1.

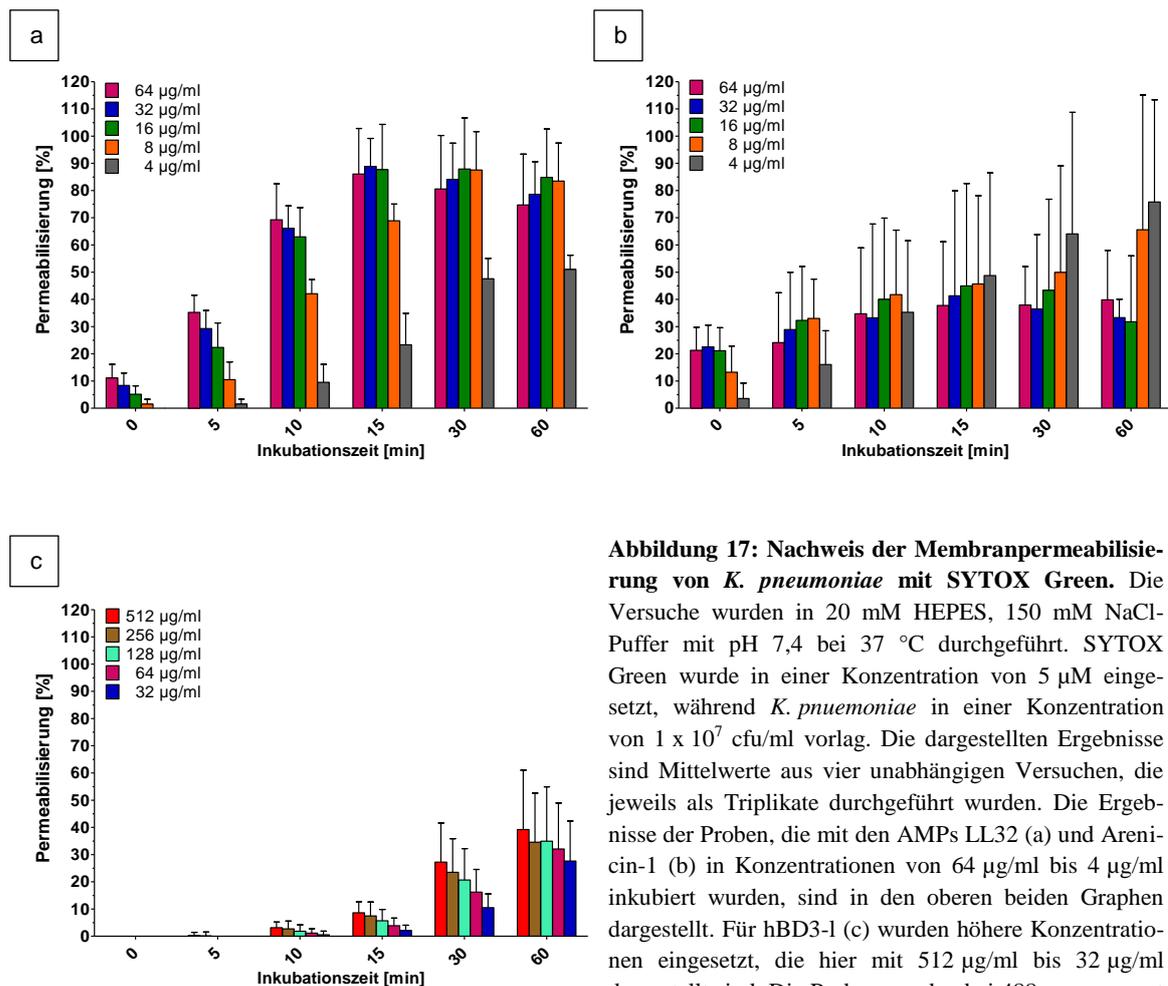


Abbildung 17: Nachweis der Membranpermeabilisierung von *K. pneumoniae* mit SYTOX Green. Die Versuche wurden in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. SYTOX Green wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt, während *K. pneumoniae* in einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml vorlag. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Proben, die mit den AMPs LL32 (a) und Arenicin-1 (b) in Konzentrationen von 64 µg/ml bis 4 µg/ml inkubiert wurden, sind in den oberen beiden Graphen dargestellt. Für hBD3-1 (c) wurden höhere Konzentrationen eingesetzt, die hier mit 512 µg/ml bis 32 µg/ml dargestellt sind. Die Proben wurden bei 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm gemessen.

Dieses Ergebnis trifft für *E. coli* nicht zu. Hier erreichte hBD3-1 bereits nach 10 min die maximale Permeabilisierung. Arenicin-1 lag zwar mit einer maximalen Permeabilisierung bei 64 µg/ml von ca. 30 % höher als hBD3-1 mit ca. 15 %, erreichte diese jedoch erst nach 60 min. Ab einer Konzentration von 256 µg/ml zeigte hBD3-1 einen starken Anstieg der Fluoreszenzaktivität bei *E. coli*. Dies lässt vermuten, dass ab 256 µg/ml hBD3-1 eine kritische Konzentration erreicht wurde, die in der Zellmembran von *E. coli* Poren und Läsionen verursacht, die groß genug sind, um SYTOX Green den Eintritt in die Bakterien zu ermöglichen beziehungsweise das hinaus Diffundieren der DNA zu erlauben.

Der Vergleich der Ergebnisse des SYTOX Green Assays für *K. pneumoniae* (siehe Abb. 17b) und *E. coli* (siehe Abb. 18b) zeigt, dass Arenicin-1 eine schwächere Aktivität gegenüber *E. coli* aufwies. Auch für LL32 war bei *K. pneumoniae* bei gleichen Peptidkonzentrationen eine höhere Membranpermeabilisierung zu verzeichnen. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Aktivität

der AMPs auf unterschiedliche Stämme Gram-negativer Bakterien auch unterschiedlich auswirken kann. Ähnliche Ergebnisse beschrieb auch A. Saathoff, die neben *K. pneumoniae* auch *Salmonella enterica* Minnesota R95 und R60 untersuchte (Saathoff 2013).

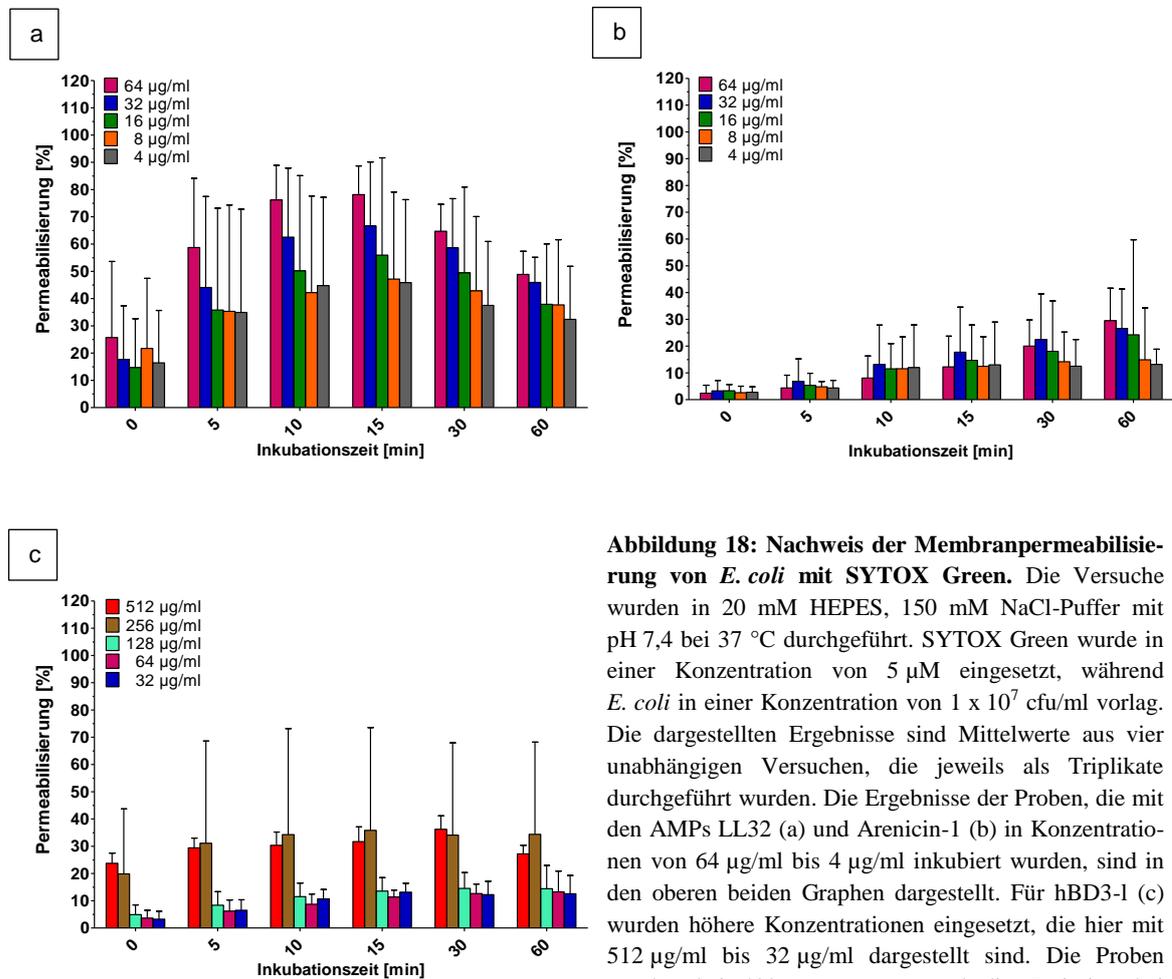


Abbildung 18: Nachweis der Membranpermeabilisierung von *E. coli* mit SYTOX Green. Die Versuche wurden in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. SYTOX Green wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt, während *E. coli* in einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml vorlag. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Proben, die mit den AMPs LL32 (a) und Arenicin-1 (b) in Konzentrationen von 64 µg/ml bis 4 µg/ml inkubiert wurden, sind in den oberen beiden Graphen dargestellt. Für hBD3-1 (c) wurden höhere Konzentrationen eingesetzt, die hier mit 512 µg/ml bis 32 µg/ml dargestellt sind. Die Proben wurden bei 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm gemessen.

Um die mit dem SYTOX Green Assay gewonnenen Erkenntnisse zu verifizieren, wurde ein PI Assay durchgeführt, das auf dem gleichen Wirkmechanismus wie SYTOX Green basiert. Das PI Assay lieferte für LL32 und Arenicin-1 für beide Bakterienstämme Ergebnisse, die mit denen des SYTOX Green Assays vergleichbar sind (siehe Abb. 19). Die Durchschnittswerte aus vier Versuchen, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden, unterschieden sich von denen des SYTOX Green Assays um maximal 20 % und sind damit tolerierbar. Es zeigte sich jedoch, dass die Fluoreszenzintensität bei Bakterien, die mit hBD3-1 inkubiert wurden, im PI Assay deutlich geringer ausfiel als im SYTOX Green Assay (siehe Abb. 20).

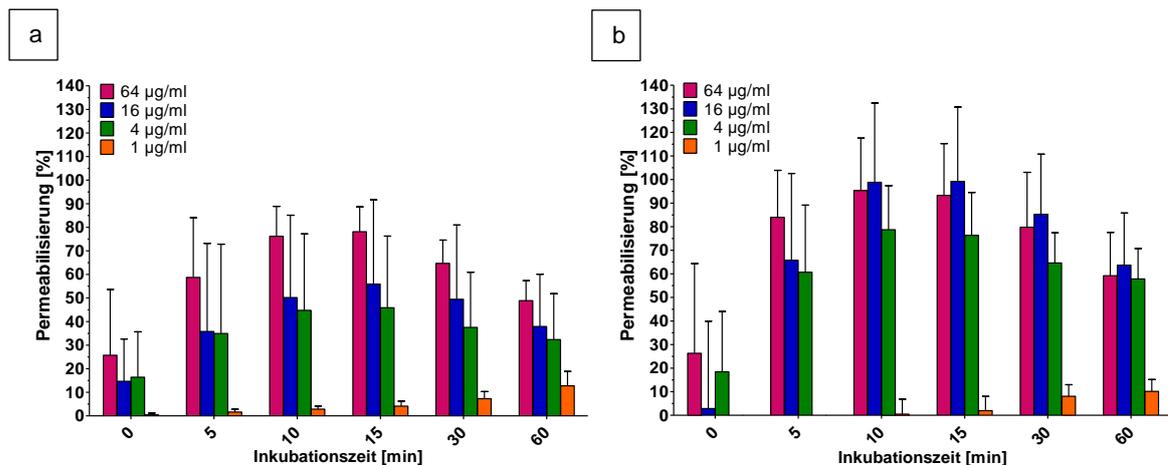


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Ergebnisse des SYTOX Green und des PI Assays an *E. coli* inkubiert mit LL32. Dargestellt sind die Ergebnisse des SYTOX Green (a) und des PI Assays (b) von *E. coli* inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von LL32. Die Versuche wurden in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. SYTOX Green lag in einer Konzentration von 5 µM vor, während PI in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt wurde. Die Bakteriendichte betrug 1×10^7 cfu/ml. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Die Proben des SYTOX Green Assays wurden bei 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm gemessen, während die Emission der Proben des PI Assays bei 617 nm nach einer Anregung mit 535 nm gemessen wurde.

Obwohl PI (668 Da) nur ein geringfügig höheres Molekulargewicht als SYTOX Green (600 Da) besitzt (Mortimer, Mason, and Gant 2000), besteht die Möglichkeit, dass die von hBD3-1 verursachten Poren und Läsionen zu klein sind, um den Eintritt von PI in die Zelle zu ermöglichen. Das Ausschleusen von Ethidiumbromid, dessen molekulare Struktur PI sehr ähnlich ist, mittels bakterieller Membranproteine wurde bereits beschrieben und könnte auch für PI zutreffen (Mortimer, Mason, and Gant 2000). Gerade im Falle von hBD3-1, dessen permeabilisierende Aktivität auf die verwendeten Bakterienstämme am geringsten ausfiel, könnte sich der Efflux der wenigen eingedrungenen PI Moleküle stark auf die Fluoreszenzintensität auswirken.

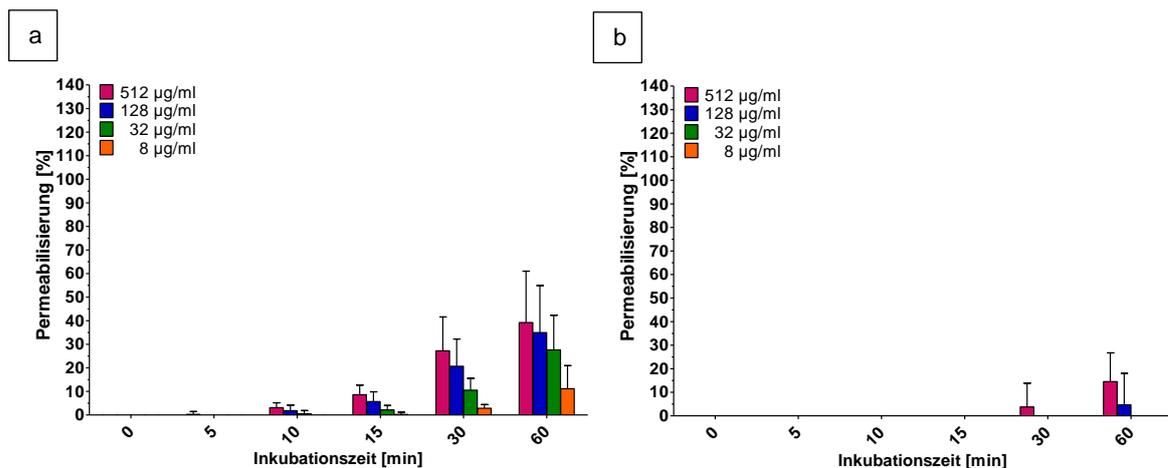


Abbildung 20: Gegenüberstellung der Ergebnisse des SYTOX Green und des PI Assays an *K. pneumoniae* inkubiert mit hBD3-1. Dargestellt sind die Ergebnisse des SYTOX Green (a) und des PI Assays (b) von *K. pneumoniae* inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von hBD3-1. Die Versuche wurden in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. SYTOX Green lag in einer Konzentration von 5 µM vor, während PI in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt wurde. Die Bakteriendichte betrug 1×10^7 cfu/ml. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Die Proben des SYTOX Green Assays wurden bei 488 nm angeregt und die Emission bei 530 nm gemessen, während die Emission der Proben des PI Assays bei 617 nm nach einer Anregung mit 535 nm gemessen wurde.

Sowohl im PI Assay als auch im SYTOX Green Assay wurde bei einigen hohen AMP Konzentrationen ein Abfall der Fluoreszenzaktivität im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen beobachtet (Daten hier nicht gezeigt). Bereits A. Saathoff beschrieb dieses Phänomen (Saathoff 2013). Neben der Möglichkeit einer Akkumulation der Peptide bei zu hohen Konzentrationen und einer damit verbundenen geringeren permeabilisierenden Aktivität, könnte die Beeinflussung des Assays durch AMPs selbst eine Ursache sein. Um zu überprüfen, ob der Einsatz von AMPs das Fluoreszenzsignal beeinflusst, wurde ein SYTOX Green Assay durchgeführt, in dem unterschiedliche Konzentrationen von LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 an abgetöteten Bakterien getestet wurden. Im Idealfall hätten diese Proben eine Permeabilisierung von etwa 100 % erreichen müssen, da sie der Positivkontrolle mit Zugabe von AMPs entsprachen. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass mit zunehmender AMP Konzentration das Fluoreszenzsignal von SYTOX Green abnahm (siehe Abb. 21). Für Arenicin-1 war der Effekt am stärksten und lieferte bei 512 µg/ml nur noch ca. 12 % der Fluoreszenzintensität bezogen auf die Positivkontrolle (gekochte Bakterien ohne Peptidzugabe). Bei der gleichen Konzentration fiel das Fluoreszenzsignal bei LL32 und hBD3-1 auf ca. 17 % und 48 %. Die Fähigkeit von AMPs mit DNA zu interagieren wurde bereits in der Literatur beschrieben (Jenssen, Hamill, and Hancock 2006; Hsu 2005; Park, Kim, and Kim 1998) und damit ist es denkbar, dass die AMPs mit SYTOX Green um die Bindung an die DNA konkurrieren.

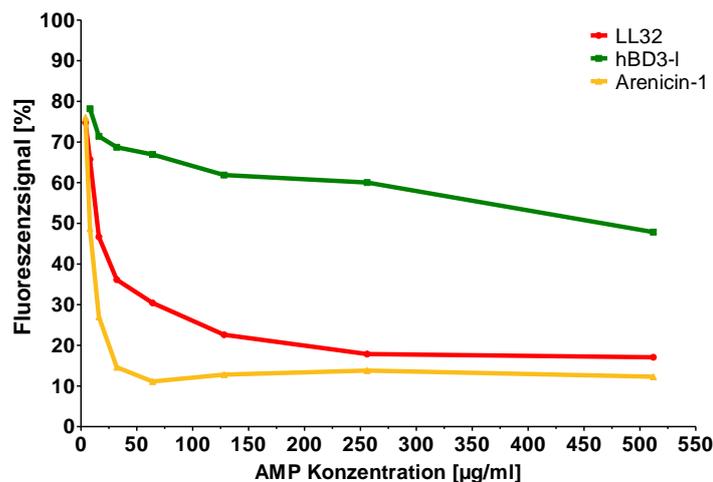


Abbildung 21: SYTOX Green Assay an abgetöteten *K. pneumoniae* Bakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse eines SYTOX Green Assays, in dem Bakterien verwendet wurden, die zuvor für 10 min gekocht und anschließend für 3 min sonifiziert wurden. Die Bakterienkonzentration betrug 1×10^7 cfu/ml in einem 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4. Die Bakterien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der AMPs LL32 (rote Linie), hBD3-1 (grüne Linie) und Arenicin-1 (gelbe Linie) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Das prozentuale Fluoreszenzsignal bezieht sich auf die Positivkontrolle, die abgetötete Bakterien ohne AMPs enthielt, und auf die Negativkontrolle, die vitale Bakterien ohne AMPs enthielt. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils als Duplikat durchgeführt wurden.

Um dieser Problematik aus dem Weg zu gehen, sollten Farbstoffe eingesetzt werden, deren Fluoreszenz nicht auf der Bindung an DNA beruht.

FDA ist eine dieser verwendeten Substanzen. Durch Esterasen wird das membrangängige FDA in Fluorescein hydrolysiert, akkumuliert in der Zelle und fluoresziert nach Anregung mit blauem Licht. Der Theorie zu Folge sollten vitale Bakterien nach der Inkubation mit FDA grün fluoreszieren. Bevor die Aktivität der AMPs in Versuchen getestet wurde, wurden Vorversuche zur Überprüfung der Positiv- und Negativkontrolle und geeigneten FDA Konzentrationen durchgeführt. Es zeigte sich schnell, dass die Methode des FDA Assays zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung an *K. pneumoniae* und *E. coli* nicht geeignet ist. Das Fluoreszenzsignal der Positivkontrolle, die aus vitalen Bakterien in Puffer mit FDA bestand (siehe Abb. 22, grüne Linie), zeigte den gleichen Intensitätsverlauf wie FDA alleine in Puffer (siehe Abb. 22, blaue Linie). Das stärkste Signal erzielten gekochte Bakterien in Puffer mit FDA, die eigentlich als Negativkontrolle fungieren sollten (siehe Abb. 22, orange Linie). Das Erhitzen der Negativkontrolle auf 100 °C scheint die Bakterien lysiert und damit das Zytosol samt Proteinen freigesetzt zu haben. Allerdings kam es anscheinend zu keiner vollständigen Denaturierung der Enzyme, sodass in der Negativkontrolle freie und aktive Esterasen vorhanden waren, die FDA zu Fluorescein hydrolysieren konnten. Die Folge war ein Anstieg des Fluoreszenzsignals mit der Zeit.

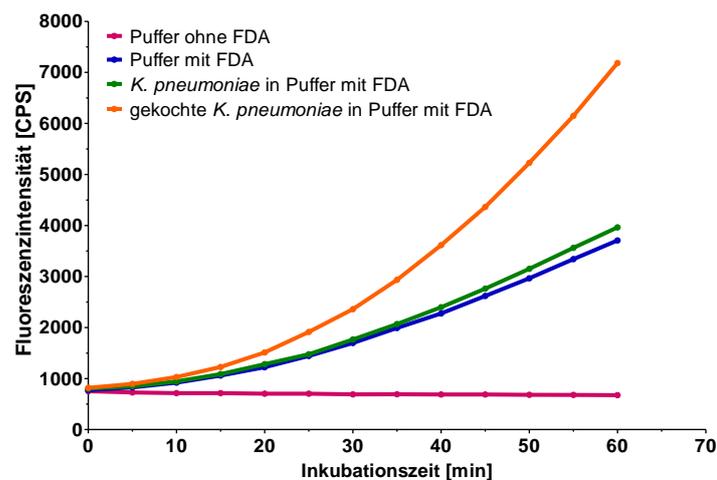


Abbildung 22: Ergebnisse der FDA Vorversuche mit *K. pneumoniae*. Der Versuch wurde in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. FDA wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, während *K. pneumoniae* in einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml vorlag. Die Emission der Proben wurde nach einer Anregung von 495 nm bei 525 nm über einen Zeitraum von 60 min gemessen.

Die Anwendung von FDA zur Anfärbung stoffwechselaktiver Bakterien zeigte in der Vergangenheit oft Probleme: Gram-positive Bakterien wiesen oft deutlich stärkere Fluoreszenzsignale auf als Gram-negative Bakterien. Zum einen wird angenommen, dass die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien die Aufnahme von FDA erschwert, zum anderen wird weniger Fluorescein gebildet und in der Zelle akkumuliert (Brunius 1980; Chrzanowski et al. 1984; Netuschil and Schmalz 1981).

Eine spontane Degradation von FDA zu Fluorescein in leicht alkalischen Lösungen und Kultivierungsmedien wurde bereits in anderen Arbeiten beobachtet und konnte auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden (Brunius 1980). Das Fluoreszenzsignal der Kontrollmessung von FDA in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 stieg mit der Zeit deutlich an (siehe Abb. 22, blaue Linie). Da der Verlauf der Kontrollmessung nahezu identisch ist mit dem der Positivkontrolle, kann davon ausgegangen werden, dass FDA innerhalb der Bakterien nicht zu Fluorescein umgewandelt wurde. Der FDA Assay ist damit nicht für die Detektion der permeabilisierenden Aktivität von AMPs geeignet.

Als weitere Alternative wurde versucht einen Zombie Green Assay zu etablieren. Zombie Green ist zellimpermeabel und bindet an primäre Aminogruppen von Proteinen. Durch AMP verursachte Poren und Läsionen würden dem Farbstoff den Eintritt in die Zelle ermöglichen, dort an weitere Proteine binden, und damit das Fluoreszenzsignal erhöhen. Laut Hersteller gibt es noch keine Erfahrungen über die Wirkung von Zombie Farbstoffen an Bakterien. Dementsprechend

wurde erst mit Vorversuchen begonnen, die Auskunft über die Eignung und optimale Konzentrationen von Zombie Green liefern sollten.

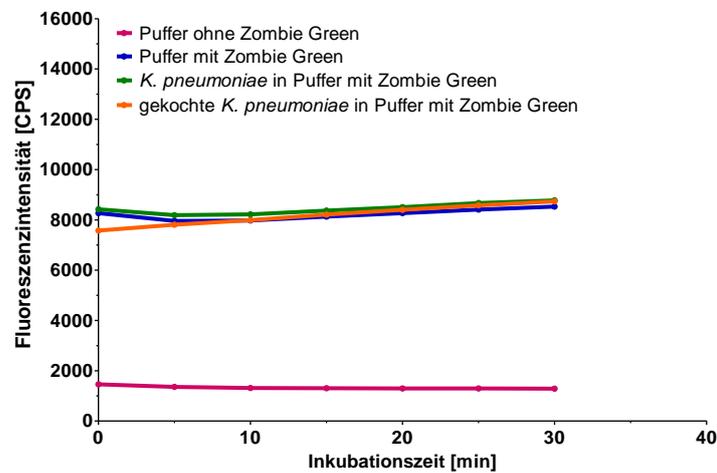


Abbildung 23: Ergebnisse der Zombie Green Vorversuche mit *K. pneumoniae*. Der Versuch wurde in 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer mit pH 7,4 bei 37 °C durchgeführt. Zombie Green wurde in einer 1:1600 Verdünnung eingesetzt, während *K. pneumoniae* in einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml vorlag. Die Emission der Proben wurde nach einer Anregung von 486 nm bei 516 nm über einen Zeitraum von 30 min gemessen.

Die Ergebnisse zeigten, dass Zombie Green bereits ohne Bindung an Aminogruppen fluoresziert, da alle Proben, egal ob sie vitale, gekochte oder keine Bakterien enthielten, die gleiche Fluoreszenzintensität aufwiesen (siehe Abb. 23). Der erforderliche Zentrifugationsschritt mit Pufferwechsel machte eine kontinuierliche Messung zur Detektion der AMP induzierten Membranpermeabilisierung unmöglich. Außerdem konnte bisher nach dem Zentrifugationsschritt bei $1258 \times g$ für 10 min kein verwertbares Ergebnis erzielt werden, da abermals alle Proben im selben Bereich der Fluoreszenzintensität lagen. Grund hierfür war womöglich eine nicht hinreichende Abtrennung der Bakterien während der Zentrifugation, sodass diese während des Pufferwechsels verloren gingen.

4.2 Aktivität antimikrobieller Peptide an rekonstituierten Membranen

4.2.1 Permeabilisierende Aktivität an Liposomen

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wurden Liposomen aus verschiedenen Lipidzusammensetzungen als Membranmodelle eingesetzt, um die permeabilisierende Aktivität von AMPs an diesen zu überprüfen. Grundlage dieses Versuches war, dass die Zugabe von 800 mM KI zum Puffer zu einem Quenching der NBD-markierten Lipide der äußeren Membranschicht führt. Bei einer permeabilisierenden Wirkung der zugegebenen AMPs könnten Iodid-Ionen durch die entstandenen Poren und Läsionen ins Innere der Liposomen vordringen, um die dort liegenden NBD-Moleküle ebenfalls zu quenchchen. Die Folge wäre ein weiterer Abfall des Fluoreszenzsignals. Es wurden Liposomen aus POPE:POPG (4:1, M:M), DOPC und Aggregate aus *E. coli* WBB01 LPS, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, hergestellt und die Auswirkung der AMPs, deren Zugabe additiv in den Konzentrationen von 1 μM , 3 μM und 10 μM erfolgte, miteinander verglichen. Alle Messungen wurden in HEPES- und KCl-Puffer (siehe Kap. 3.1) bei 37 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

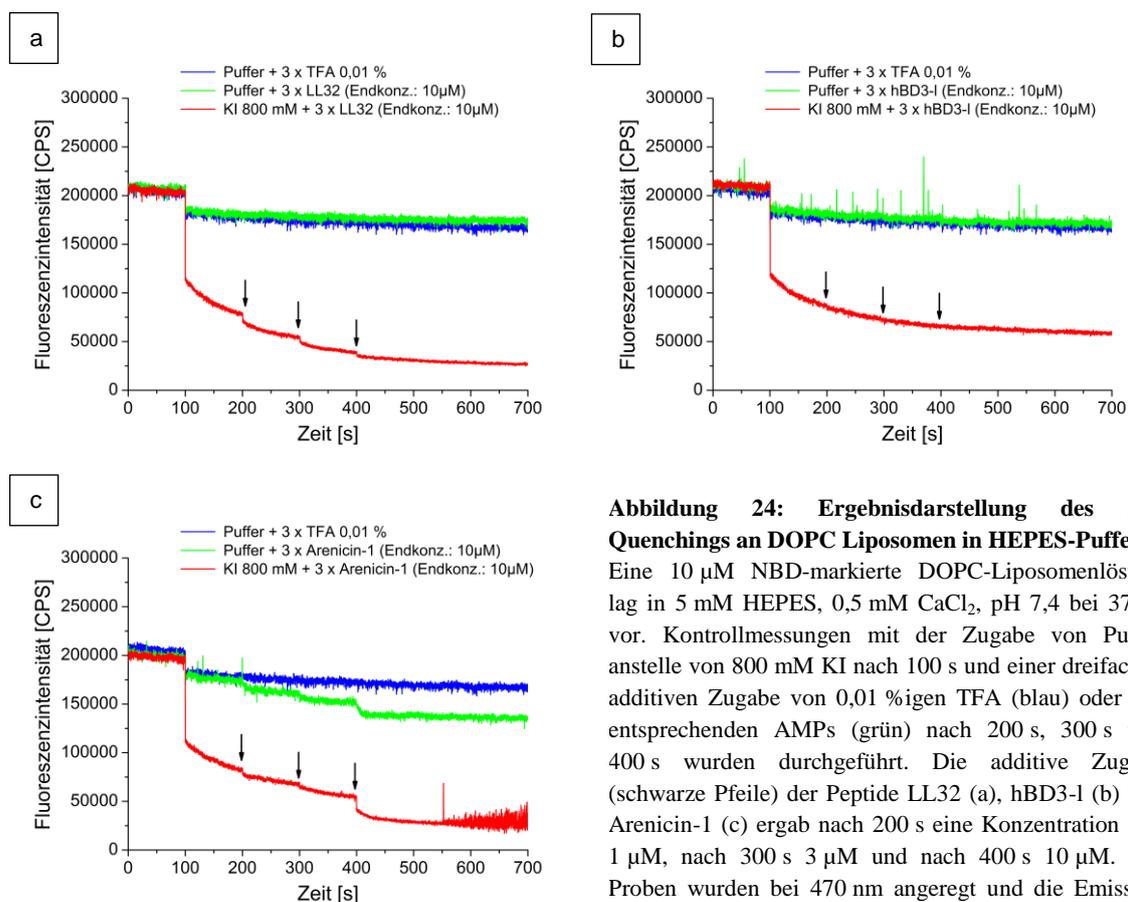


Abbildung 24: Ergebnisdarstellung des KI-Quenchings an DOPC Liposomen in HEPES-Puffer.

Eine 10 μM NBD-markierte DOPC-Liposomenlösung lag in 5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4 bei 37 $^{\circ}\text{C}$ vor. Kontrollmessungen mit der Zugabe von Puffer anstelle von 800 mM KI nach 100 s und einer dreifachen additiven Zugabe von 0,01 %igen TFA (blau) oder des entsprechenden AMPs (grün) nach 200 s, 300 s und 400 s wurden durchgeführt. Die additive Zugabe (schwarze Pfeile) der Peptide LL32 (a), hBD3-1 (b) und Arenicin-1 (c) ergab nach 200 s eine Konzentration von 1 μM , nach 300 s 3 μM und nach 400 s 10 μM . Die Proben wurden bei 470 nm angeregt und die Emission bei 531 nm gemessen.

Im Gegensatz zu POPE:POPG Liposomen (siehe Abb. 25) führte die additive Zugabe von LL32 und Arenicin-1 bei DOPC Liposomen zu einem stufenförmigen Abfall des Fluoreszenzsignals, der auf die Permeabilisierung der Liposommembranen und dem damit verbunden Quenching der innen liegenden NBP-Moleküle hinweist. Im Fall von Arenicin-1 könnte der beobachtete Abfall des Fluoreszenzsignals jedoch auch ein Resultat der Peptidzugabe selbst sein, die bereits ohne KI einen deutlichen Quenching-Effekt aufweist (siehe Abb. 24c, grüne Linie). Dieses Phänomen wurde in allen Messungen unabhängig von Lipidzusammensetzung und Puffer beobachtet. Ein aggregatartiger Einbau von Arenicin-1, der die NBD-markierten Phospholipide dichter zusammenrücken lässt und damit eine selbstinduzierte Fluoreszenzauslöschung (engl.: *self-quenching*) herbeiführt, könnte eine mögliche Erklärung liefern. Aber auch andere Faktoren wie Veränderungen der physikalischen und elektrostatischen Eigenschaften der Membran können einen Einfluss auf *self-quenching* Effekte von NBD-PE haben (Brown, Brennan, and Krull 1994). Es wäre denkbar, dass ein Anlagern von Arenicin-1 auf der Membran nach dem *Carpet*-Modell (siehe Kap. 2.3.4) Auswirkung auf die physikalische und elektrostatische Struktur der Membran hat, die zum Abfall der Fluoreszenzintensität führt.

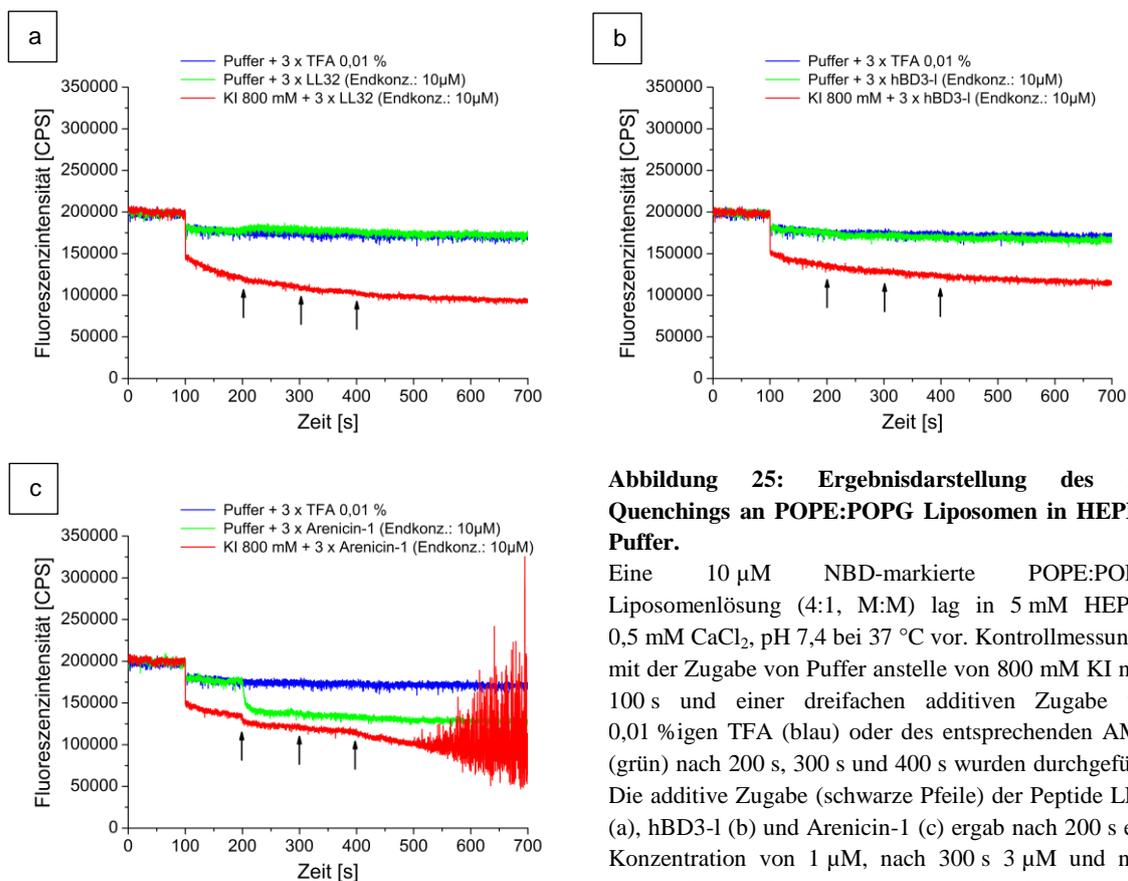


Abbildung 25: Ergebnisdarstellung des KI-Quenchings an POPE:POPG Liposomen in HEPES-Puffer.

Eine 10 µM NBD-markierte POPE:POPG-Liposomenlösung (4:1, M:M) lag in 5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,4 bei 37 °C vor. Kontrollmessungen mit der Zugabe von Puffer anstelle von 800 mM KI nach 100 s und einer dreifachen additiven Zugabe von 0,01 %igen TFA (blau) oder des entsprechenden AMPs (grün) nach 200 s, 300 s und 400 s wurden durchgeführt. Die additive Zugabe (schwarze Pfeile) der Peptide LL32 (a), hBD3-l (b) und Arenicin-1 (c) ergab nach 200 s eine Konzentration von 1 µM, nach 300 s 3 µM und nach 400 s 10 µM. Die Proben wurden bei 470 nm angeregt und die Emission bei 531 nm gemessen.

Im Vergleich zu Arenicin-1 und LL32 hat die Zugabe hBD3-1 weder bei DOPC noch bei POPE:POPG Liposomen einen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal. Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Arbeit von A. Saathoff für hBD3-1, in der mittels FRET-Messung keine Interkalation des Peptides in POPE:POPG Liposomen nachgewiesen werden konnte (Saathoff 2013). Die Interkalation von LL32 und Arenicin-1 wurde allerdings bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Saathoff 2013; Andrä et al. 2008) und wurde auch für die hier vorgestellten Versuche an POPE:POPG Liposomen erwartet. In vorausgegangen Versuchen mit PE:PG (1:1, M:M) Liposomen und einem anderen Puffersystem (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 6,5) konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit von KI und nach Zugabe von LL32 beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass das in dieser Arbeit vorgestellte System zur Mimikry der inneren Membran Gram-negativer Bakterien in dieser Konstellation (Puffer, Lipidzusammensetzung) nicht optimal ist.

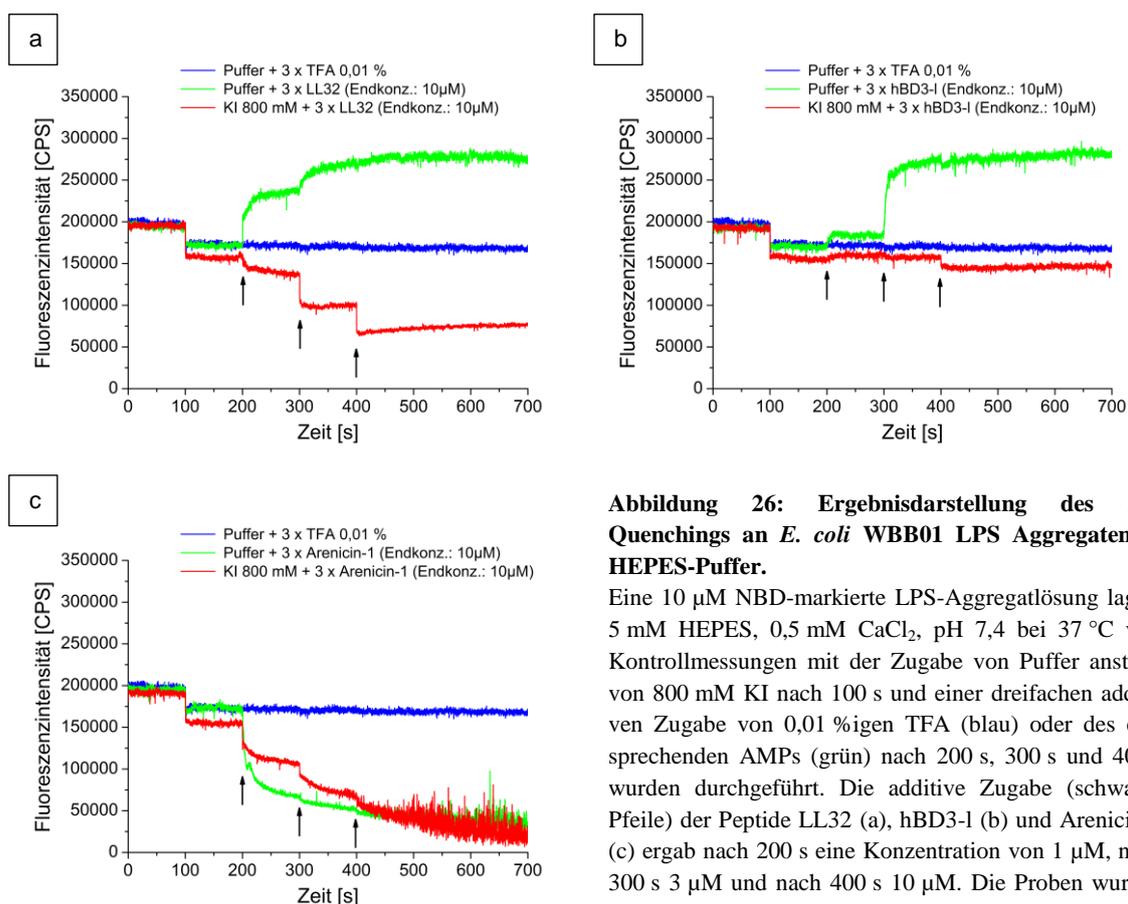


Abbildung 26: Ergebnisdarstellung des KI-Quenchings an *E. coli* WBB01 LPS Aggregaten in HEPES-Puffer.

Eine 10 µM NBD-markierte LPS-Aggregatlösung lag in 5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,4 bei 37 °C vor. Kontrollmessungen mit der Zugabe von Puffer anstelle von 800 mM KI nach 100 s und einer dreifachen additiven Zugabe von 0,01 %igen TFA (blau) oder des entsprechenden AMPs (grün) nach 200 s, 300 s und 400 s wurden durchgeführt. Die additive Zugabe (schwarze Pfeile) der Peptide LL32 (a), hBD3-1 (b) und Arenicin-1 (c) ergab nach 200 s eine Konzentration von 1 µM, nach 300 s 3 µM und nach 400 s 10 µM. Die Proben wurden bei 470 nm angeregt und die Emission bei 531 nm gemessen.

LPS Aggregate dienen als Modell der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, deren Ergebnisse des KI-Quenchings sich deutlich von denen der DOPC und POPE:POPG Liposomen unterscheiden (siehe Abb. 26). Zum einen wird bei LL32 und hBD3-1 nach der Zugabe der Peptide in Puffer ohne KI (grüner Verlauf) ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet. Dieser Anstieg könnte ein Indiz für die Interkalation der Peptide in die LPS Aggregate sein, die ein Auseinanderrücken der NBD-markierten Phospholipide und damit eine Verringerung des *self-quenching* Effekts zur Folge hat.

Zum anderen ist der Quenching-Effekt des KIs auf die LPS Aggregate selbst verschwindend gering. Grund hierfür könnten hexagonal invertierte Strukturen des LPS sein, die die NBD-Moleküle von den Iodid-Ionen abschirmen (Brandenburg, Koch, and Seydel 1990). Die additive Zugabe von LL32 zeigt bei den LPS Aggregaten den stufenartigen Verlauf (siehe Abb. 26a, rote Linie), der ursprünglich auch für die POPE:POPG analog zu PE:PG Liposomen erwartet wurde. Im Vergleich zu DOPC Liposomen ist der Intensitätsabfall nach der Peptidzugabe wesentlich stärker und deutet auf eine stärkere Permeabilisierung der LPS Aggregate durch LL32 hin. Genauso führt Arenicin-1 zu deutlich stärkeren Abfällen des Fluoreszenzsignals, sowohl ohne den Quencher KI als auch als alleinige Zugabe. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Andrä et al., die zeigten, dass Arenicin-1 in *E. coli* WBB01 LPS Aggregaten stärker interkaliert als in PC oder PG Liposomen (Andrä et al. 2008). Wie bereits für andere Lipidzusammensetzungen beschrieben, zeigt hBD3-1 auch bei LPS Aggregaten keinerlei membranpermeabilisierende Aktivität.

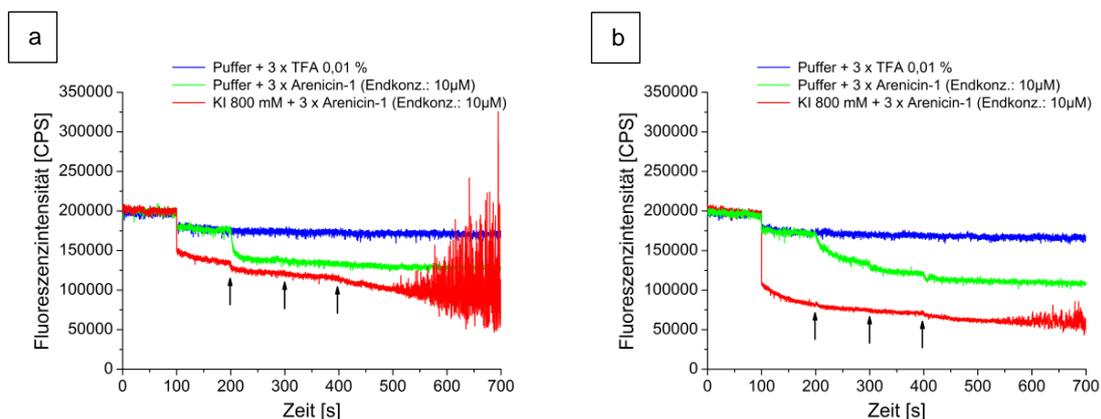


Abbildung 27: Vergleich des KI-Quenchings an POPE:POPG Liposomen in HEPES- und KCl-Puffer. Eine 10 µM NBD-markierte POPE:POPG-Liposomenlösung (4:1, M:M) lag in (a) 5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl₂ Puffer und in (b) 5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl₂, 100 mM KCl Puffer jeweils mit pH 7,4 bei 37 °C vor. Eine additive Zugabe (schwarze Pfeile) des AMPs Arenicin-1 ergab nach 200 s eine Konzentration von 1 µM, nach 300 s 3 µM und nach 400 s 10 µM. Kontrollmessungen mit der Zugabe von Puffer anstelle von 800 mM KI nach 100 s und einer dreifachen additiven Zugabe von 0,01 %igen TFA (blau) oder von Arenicin-1 (grün) wurden durchgeführt. Die Proben wurden bei 470 nm angeregt und die Emission bei 531 nm gemessen.

Der Vergleich zwischen den beiden verwendeten Puffern liefert keinen gravierenden Unterschied in den Ergebnissen. Lediglich der Abfall der Fluoreszenzintensität ist nach der Zugabe von 800 mM KI im KCl-Puffer größer (siehe Abb. 27).

4.2.2 Permeabilisierende Aktivität an festkörperunterstützten Membranen

In der vorliegenden Arbeit wurden tBLMs (siehe Kap. 2.2.4.1) im Rahmen des tethaPod Systems hergestellt (siehe Kap. 3.10) und die Auswirkung verschiedener AMPs auf die Leitfähigkeit und Kapazität dieser rekonstituierten Membranen untersucht.

Membranen aus DOPC dienten als Modell eukaryotischer Zellen, während POPE:POPG (4:1, M:M) Membranen der inneren Membran Gram-negativer Bakterien imitieren sollten. Die Membranen lagen in HEPES- oder KCl-Puffer bei 37 °C vor. Leider konnten keine tBLMs aus LPS hergestellt werden, da es nicht gelang LPS in Ethanol oder Methanol abs. zu lösen. Auch unterschiedliche Verhältnisse der beiden Lösungsmittel zueinander in Kombination mit bis zu 10 % Chloroform, Erhitzen auf 100 °C und Ultraschallbehandlung führten nicht zum Erfolg. Erst Konzentrationen über 40 % Chloroform ermöglichten einen vollständigen Lösungsvorgang des LPS. Lipidlösungen mit solch hohen Anteilen an Chloroform sind für das tethaPod System nicht geeignet, da sie sowohl den Klebstoff zwischen Slide und Kunststoff *Cartridge* lösen als auch eine Degradation der Tether- und Spacer-Schicht und des Polycarbonats verursachen können (SDx Tethered Membranes Pty Ltd 2012).

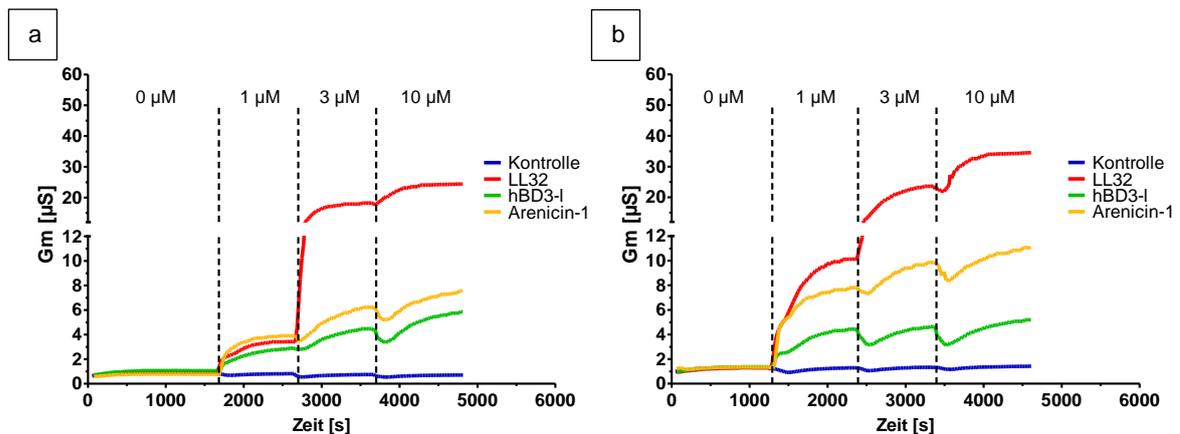


Abbildung 28: Leitfähigkeit von DOPC Membranen in HEPES-Puffer. Dargestellt ist die Leitfähigkeit von tBLMs aus DOPC in Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) aus zwei identischen, aber unabhängigen Versuchen (a und b). Nach ca. 20 min erfolgte die erste Zugabe von LL32 (rot), hBD3-1 (grün) und Arenicin-1 (gelb), sodass eine Endkonzentration von 1 μM vorlag. Zwei weitere Zugaben nach je 15 min lieferten Endkonzentrationen von 3 μM und 10 μM . Die Peptide lagen in 0,01 % TFA vor, weshalb in der Kontrolle (blau) 0,01 % TFA in den entsprechenden Volumina hinzugegeben wurden.

Die in diesen Versuchen eingesetzten AMPs LL32, hBD3-1 und Arenicin-1 hatten auf beide Modellmembranen und in beiden Puffersystemen Einfluss auf die Leitfähigkeit der rekonstituierten Membranen. Dabei näherte sich die Leitfähigkeit der Membran nach der Zugabe der Peptide einem Plateau an, dem ein mehr und minder starker Anstieg oder sogar ein Abfall der Leitfähigkeit voraus ging. Für LL32 zeigte sich, dass die additive Zugabe von 1 μM , 3 μM und 10 μM Peptidkonzentration in beiden Membransystemen einen stufenförmigen Anstieg der Leitfähigkeit zur Folge hatte (vergleiche Abb. 28a und 29a). Im Gegensatz dazu zeigten hBD3-1 und Arenicin-1 oft direkt nach der Peptidzugabe einen vorläufigen Abfall der Leitfähigkeit. Sowohl bei DOPC als auch bei POPE:POPG Membranen hatte LL32 den stärksten Einfluss auf die Leitfähigkeit der Membranen, gefolgt von Arenicin-1 und hBD3-1 mit der schwächsten Auswirkung.

Wiederholungsmessungen zeigten, dass die Auswirkungen der zugegeben AMPs nicht immer einen gleich starken Effekt erzielten (siehe Abb. 28). Derartige Abweichungen, wie sie in Abbildung 28 für LL32 (rot) bei 1 μM zu sehen sind, lassen darauf schließen, dass ein signifikanter Effekt des AMPs erst bei Konzentrationen zwischen 1 μM und 3 μM erzielt wird. Die Zugabe von LL32 beeinflusste die Leitfähigkeit von DOPC Membranen ähnlich stark wie die von POPE:POPG Membranen, verursacht von Läsionen oder Poren in den Membranen. Die Peptide Arenicin-1 und hBD3-1 zeigten gegenüber POPE:POPG Membranen ebenfalls keine erhöhte Aktivität im Vergleich zu DOPC Membranen.

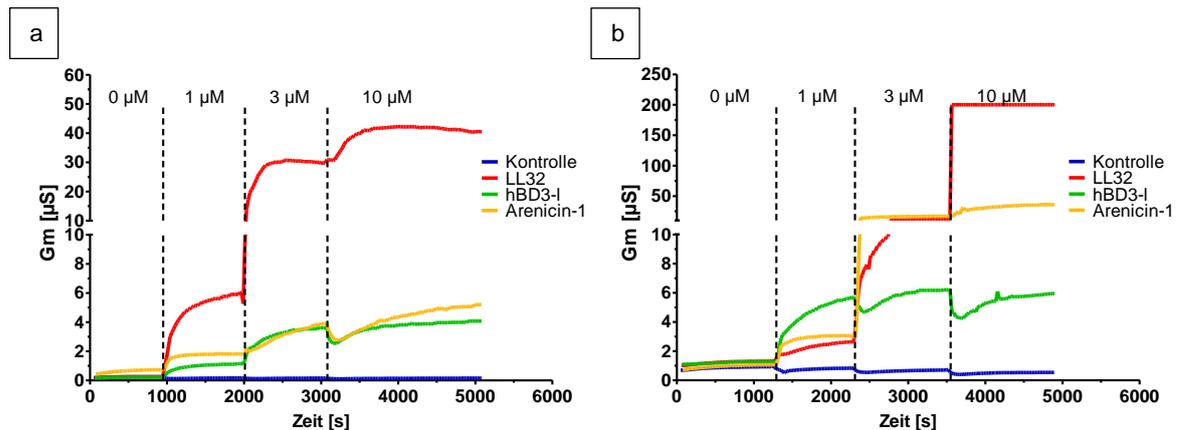


Abbildung 29: Leitfähigkeit von POPE:POPG Membranen in HEPES- und KCl-Puffer. Dargestellt ist die Leitfähigkeit von tBLMs aus POPE:POPG (4:1, M:M) in (a) HEPES-Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) und (b) in KCl-Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , 100 mM KCl, pH 7,4). Nach ca. 20 min erfolgte die erste Zugabe von LL32 (rot), hBD3-1 (grün) und Arenicin-1 (gelb), sodass eine Endkonzentration von 1 μM vorlag. Zwei weitere Zugaben nach je 15 min lieferten Endkonzentrationen von 3 μM und 10 μM . Die Peptide lagen in 0,01 % TFA vor, weshalb in der Kontrolle (blau) 0,01 % TFA in den entsprechenden Volumina hinzugegeben wurden.

Der Vergleich von POPE:POPG Membranen in zwei Puffern mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen ist in Abbildung 29 dargestellt. Die von den AMPs induzierte Leitfähigkeitszunahme der Membranen war im KCl-Puffer höher als im HEPES-Puffer. Eine Konzentration von 10 μM LL32 führt in HEPES-Puffer zu einer Leitfähigkeit von ca. 40 μS , während es im Puffersystem mit 100 mM KCl zum Zusammenbruch der Membran kam. Die Zerstörung der Membran wird in den Ergebnissen als Erreichen einer Leitfähigkeit von 200 μS dargestellt (siehe Abb. 29b, rote Linie), da das tethaPod System keine Leitfähigkeitswerte über 200 μS bestimmen kann und die Membran in derartigen Fällen als zerstört annimmt. Das System selbst gibt dann für den Wert der Leitfähigkeit „Infinity“ (Unendlichkeit) an.

Nach der Zugabe von 3 μM Arenicin-1 ist der Anstieg der Leitfähigkeit im KCl-Puffer nicht nur höher im Vergleich zum HEPES-Puffer, sondern zeigt einen starken, sprunghaften Anstieg. Im Vergleich zu Messungen in KCl-Puffer wiesen Arenicin-1 und hBD3-1 in HEPES-Puffer eine ähnliche membranpermeabilisierende Aktivität auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität von Arenicin-1 weniger salzabhängig ist, als es bei hBD3-1 und LL32 der Fall ist, und deckt sich damit mit Ergebnissen anderer Arbeiten (Saathoff 2013; Andrä et al. 2008).

Die deutlich höhere Leitfähigkeit der Membranen nach Zugabe der AMPs ist aber auch auf die unterschiedliche Ionenkonzentration der Puffer zurückzuführen. Der verwendete KCl-Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , 100 mM KCl, pH 7,4) wies im Vergleich zum HEPES-Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) bei 37 °C eine um den Faktor 41,8 höhere Leitfähigkeit auf. Eine Maßnahme, um eine vergleichende Aussage der permeabilisierenden Aktivität der AMPs bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen zu treffen, war die gemessene Leitfähigkeit

auf die Leitfähigkeit des Puffers zu beziehen. Es zeigte sich, dass die von den AMPs verursachte Leitfähigkeitszunahme in HEPES-Puffer um den Faktor 10 höher war als in KCl-Puffer (siehe Abb. 30). Mögliche Ursachen können zum einen eine vermehrte Porenbildung der AMPs bei niedrigeren Salzkonzentrationen sein, die einen stärkeren Anstieg der Leitfähigkeit mit sich bringt. Zum anderen könnte die höhere Ionenkonzentration im KCl-Puffer dazu führen, dass sich die Ionen am Durchtritt der Membran durch AMP induzierte Poren gegenseitig behindern und damit einen geringeren Stromfluss über die Membran generieren.

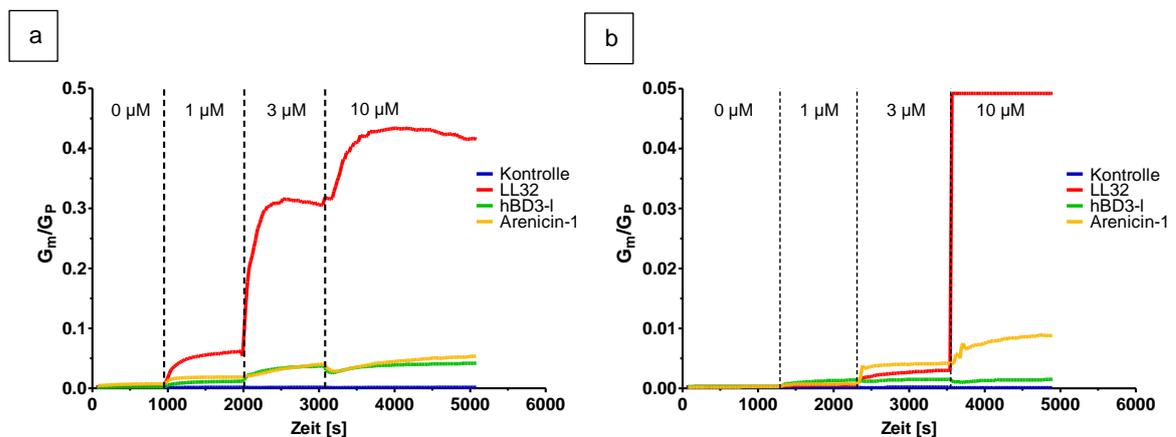


Abbildung 30: Leitfähigkeit von POPE:POPG bezogen auf die Leitfähigkeit des Puffers. Dargestellt ist die Leitfähigkeit von tBLMs aus POPE:POPG (4:1, M:M) in (a) HEPES-Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) und (b) in KCl-Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , 100 mM KCl, pH 7,4). Die Leitfähigkeit der Membran wurde durch die Leitfähigkeit des Puffers dividiert, um so eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Nach ca. 20 min erfolgte die erste Zugabe von LL32 (rot), hBD3-1 (grün) und Arenicin-1 (gelb), sodass eine Endkonzentration von 1 µM vorlag. Zwei weitere Zugaben nach je 15 min lieferten Endkonzentrationen von 3 µM und 10 µM. Die Peptide lagen in 0,01 % TFA vor, weshalb in der Kontrolle (blau) 0,01 % TFA in den entsprechenden Volumina hinzugegeben wurden.

Membranen, die in KCl-Puffer vorlagen, wiesen im Durchschnitt eine vierfach höhere Grundleitfähigkeit zu Membranen in HEPES-Puffer mit geringer Ionenkonzentration auf. Die Leitfähigkeit der unbehandelten POPE:POPG Membranen in HEPES-Puffer lag im Schnitt bei 0,3 µS, die von DOPC Membranen bei 1 µS. Neben der Leitfähigkeit ermittelt der tethaPod auch die Kapazität der Membranen, die Auskunft über die Dicke der Membran gibt. Die Kapazität von DOPC Membranen lag im Schnitt bei 23 µF (siehe Abb. 31b), während die Kapazität von POPE:POPG Membranen im Schnitt bei 15 µF lag (siehe Abb. 31a). Damit sind diese dünner als DOPC Membranen. Die unterschiedliche Ionenkonzentration der verwendeten Puffer hatte keinen Einfluss auf die Membrankapazität. Die Kapazität aller Membranen blieb auch nach der additiven Zugabe von AMPs konstant (siehe Abb. 31), außer es kam zum Zusammenbruch der Membran. In diesem Fall nahm die Kapazität schlagartig den Wert Null an (Daten hier nicht

gezeigt). Etwaige Anlagerungen von AMPs, die eine Erhöhung oder Verringerung der Dicke der Membran und damit eine Änderung in der Kapazität zur Folge hätten, konnten in diesen Versuchen nicht beobachtet werden. Es ist denkbar, dass derartige Anlagerungen oder *Carpet*-Mechanismen bei AMP Konzentrationen unter $1 \mu\text{M}$ zu sehen sind.

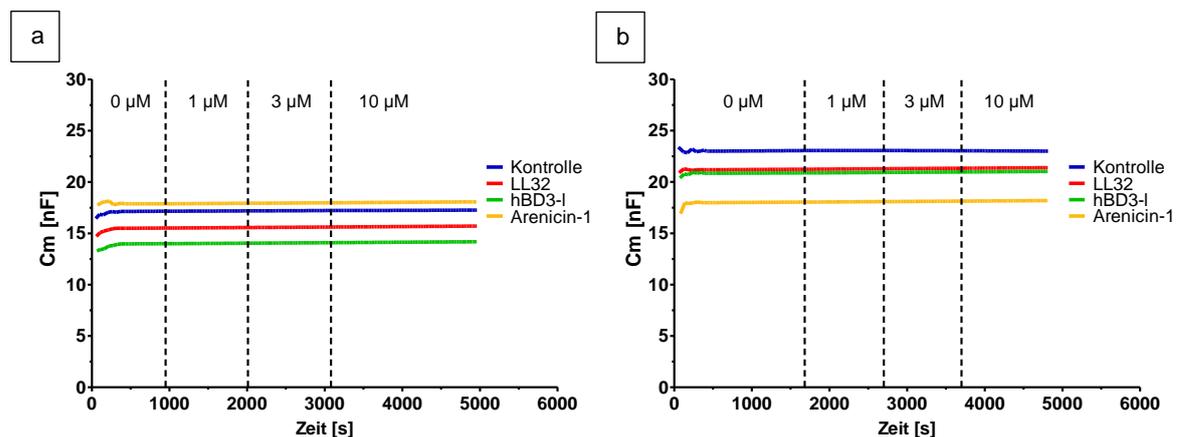


Abbildung 31: Kapazität von POPE:POPG und DOPC Membranen in HEPES-Puffer. Dargestellt ist die Kapazität von tBLMs aus (a) POPE:POPG (4:1, M:M) und (b) DOPC in Puffer (5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl_2 , pH 7,4). Nach ca. 20 min erfolgte die erste Zugabe von LL32 (rot), hBD3-1 (grün) und Arenicin-1 (gelb), sodass eine Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ vorlag. Zwei weitere Zugaben nach je 15 min lieferten Endkonzentrationen von $3 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$. Die Peptide lagen in 0,01 % TFA vor, weshalb in der Kontrolle (blau) 0,01 % TFA in den entsprechenden Volumina hinzugegeben wurden.

Die Methode des tehtaPod Systems, die mit dieser Arbeit in der Forschungsgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel etabliert wurde, lieferte nicht nur Ergebnisse zur permeabilisierenden Aktivität von AMPs, sondern auch Aussagen über die Membranbeschaffenheit. Die Messungen ergaben, dass DOPC Membranen dicker sind als POPE:POPG Membranen und eine höhere Leitfähigkeit aufweisen. Überdies hinaus konnte kein signifikanter Unterschied in den Wechselwirkungen der AMPs LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 mit DOPC oder POPE:POPG Membranen festgestellt werden. LL32 wies in beiden Membransystemen und in beiden Puffern die stärkste permeabilisierende Aktivität auf, gefolgt von Arenicin-1 und hBD3-1. Tendenziell zeigte Arenicin-1 eine stärkere Auswirkung auf die Leitfähigkeit der Membran als hBD3-1.

5. Diskussion

5.1 Vergleich der Aktivität antimikrobieller Peptide gegen Gram-negative Bakterien

Zur Überprüfung der Auswirkungen von AMPs auf Gram-negative Bakterien wurden zwei unterschiedliche Methoden in dieser Arbeit angewandt und sollen in diesem Kapitel miteinander verglichen werden. Meist wird die permeabilisierende Aktivität der AMPs mit ihrer antimikrobiellen Wirkung in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der strukturell unterschiedlichen AMPs LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 auf die Gram-negativen Bakterienstämme *E. coli* und *K. pneumoniae* in einem antimikrobiellen Test und in Fluoreszenzfarbstoff Assays zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung untersucht.

Die Ergebnisse des antimikrobiellen Tests zeigten, dass Arenicin-1 das Wachstum beider Bakterienstämme am stärksten hemmt, dicht gefolgt von LL32. Dagegen zeigte hBD3-1 kaum eine Verringerung des Bakterienwachstums, obwohl die eingesetzten Konzentrationen höher waren. Bei *E. coli* konnte ein verstärktes Wachstum nach der Zugabe von hBD3-1 bei Konzentrationen unterhalb von 256 µg/ml nachgewiesen werden. Dennoch ergab das SYTOX Green Assay für hBD3-1 bei diesen Konzentrationen eine geringe Permeabilisierung von ca. 15 %. Allgemein konnte für hBD3-1 eine geringere permeabilisierende Aktivität mittels des SYTOX Green und des PI Assays nachgewiesen werden als es bei Arenicin-1 und LL32 der Fall war. Im Gegensatz zum antimikrobiellen Test, in dem Arenicin-1 die stärkste Inhibierung des Wachstums zeigte, wurde in den Fluoreszenzfarbstoff Assays für LL32 die stärkste Membranpermeabilisierung nachgewiesen. Möglicherweise könnte der starke Quenching-Effekt von Arenicin-1, der bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben wurde, die Fluoreszenzintensität verringert und damit die Ergebnisse der Fluoreszenzfarbstoff Assays mit SYTOX Green und PI verfälscht haben.

Zusammenfassend zeigt der direkte Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass durchaus eine Korrelation zwischen Membranpermeabilisierung und bakteriellem Wachstum zu erkennen ist. Beispielsweise ging das Wachstum von *E. coli* bei 32 µg/ml LL32 auf bis zu 15 % zurück, während die Permeabilisierung der bakteriellen Membran von ca. 40 % auf 50 % stieg (siehe Abb. 32a). Auch bei den anderen beiden AMPs Arenicin-1 und hBD3-1 wurde bei Konzentrationen, bei denen eine geringe Erhöhung der Permeabilisierung nachgewiesen wurde, gleichzeitig ein Anstieg der Wachstumsinhibierung festgestellt (siehe Abb. 32).

Für *K. pneumoniae* ergaben sich ähnliche Ergebnisse bezüglich des Vergleichs der Membranpermeabilisierung und der Wachstumshemmung (siehe Anhang, Abb. 35).

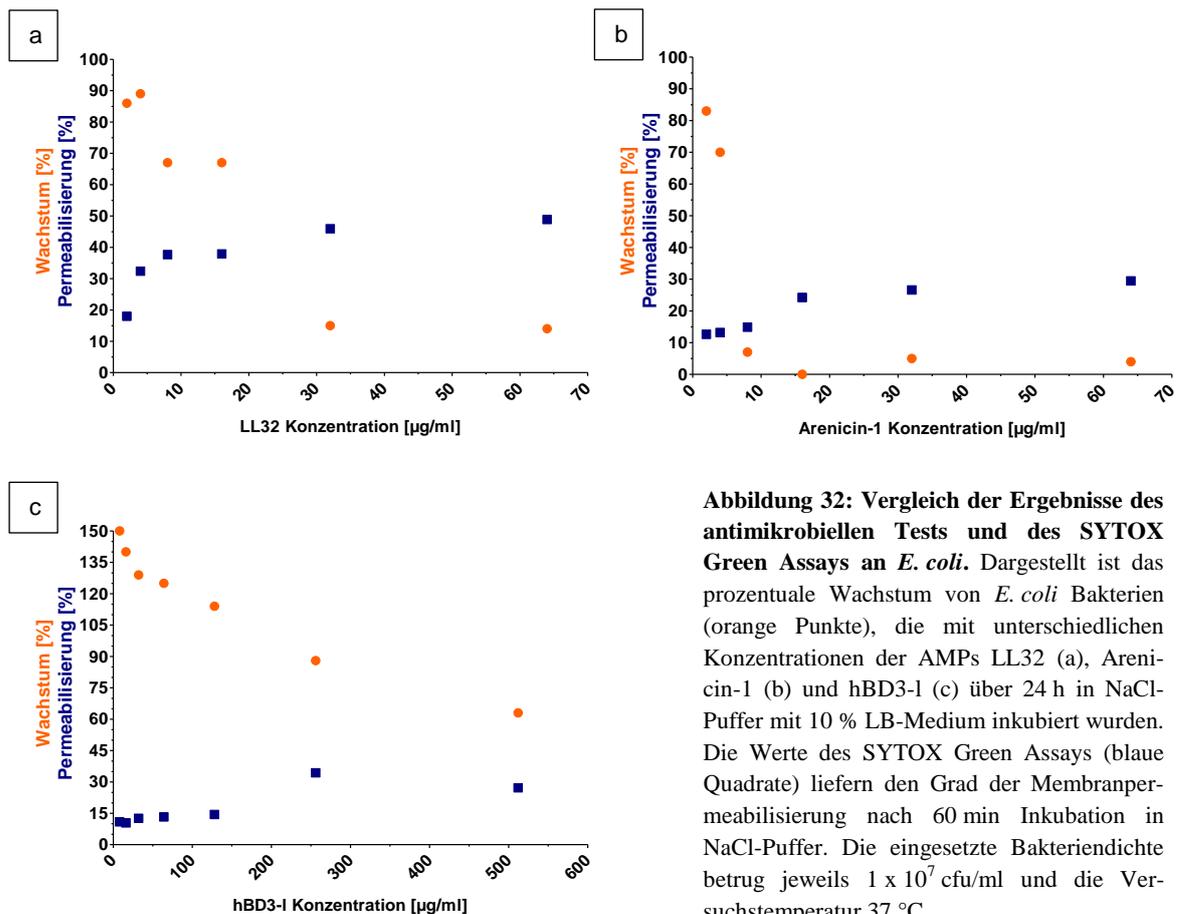


Abbildung 32: Vergleich der Ergebnisse des antimikrobiellen Tests und des SYTOX Green Assays an *E. coli*. Dargestellt ist das prozentuale Wachstum von *E. coli* Bakterien (orange Punkte), die mit unterschiedlichen Konzentrationen der AMPs LL32 (a), Arenicin-1 (b) und hBD3-1 (c) über 24 h in NaCl-Puffer mit 10 % LB-Medium inkubiert wurden. Die Werte des SYTOX Green Assays (blaue Quadrate) liefern den Grad der Membranpermeabilisierung nach 60 min Inkubation in NaCl-Puffer. Die eingesetzte Bakteriendichte betrug jeweils 1×10^7 cfu/ml und die Versuchstemperatur 37°C .

Es konnte in dieser Arbeit sowohl die permeabilisierende Aktivität als auch eine antimikrobielle Wirkung der AMPs LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 an den Bakterienstämmen *E. coli* und *K. pneumoniae* nachgewiesen werden. Für die Überprüfung der AMP induzierten Membranpermeabilisierung wäre es wünschenswert weitere Alternativen zu finden, die von den AMPs nicht beeinflusst werden. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz von 5-Cyano-2,3-ditolyt-tetrazoliumchlorid (CTC), das von stoffwechselaktiven Zellen zu fluoreszierendem Formazan reduziert wird. Ein anderer Ansatz könnte die Verwendung eines 0,1 mM Phosphatpuffers mit 0,5 mM EDTA sein, um den in dieser Arbeit beschriebenen FDA Assay auch für Gram-negative Bakterien zu ermöglichen (Dojindo Molecular Technologies 2014).

Die nachgewiesene antimikrobielle Wirkung kann lediglich als bakteriostatisch, nicht aber als bakterizid deklariert werden, da zum einen keine vollständige Wachstumshemmung nachgewiesen werden konnte und zum anderen die Abtötung der Bakterien nicht explizit überprüft wurde. Hier wäre ein Ausplattieren der AMP behandelten Bakterien auf Agar-Platten eine geeignete Methode, um eine Aussage über die Bakterizidie der AMPs treffen zu können.

5.2 Vergleich der Aktivität antimikrobieller Peptide an rekonstituierten Membranen

Neben der Analyse der AMP Aktivität an Gram-negativen Bakterien wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche biophysikalische Methoden eingesetzt, um die Wechselwirkung der AMPs mit rekonstituierten Modellmembranen zu untersuchen. Beide Methoden, das KI-Quenching und die Impedanzmessung mittels des tethaPod Systems, sollten in erster Linie Informationen über die membranpermeabilisierenden Eigenschaften der AMPs liefern. Das KI-Quenching wurde an NBD-markierten Liposomen durchgeführt (siehe Kap. 3.8 und 3.9), während bei der Impedanzmessung festkörperunterstützte Membranen in Form von tBLMs zum Einsatz kamen (siehe Kap. 2.2.4.1 und 3.10). Lipidzusammensetzungen wie POPE:POPG (4:1, M:M), *E. coli* WBB01 LPS und DOPC sollten die innere und äußere Membran Gram-negativer Bakterien sowie die Zellmembran von Eukaryoten nachahmen. Die Versuche wurden in einem Puffer aus 5 mM HEPES, 0,5 mM CaCl₂ oder mit zusätzlich 100 mM KCl bei pH 7,4 und 37 °C durchgeführt. Die Wahl dieser beiden Puffer ist darauf zurückzuführen, dass die vorliegende Arbeit Bestandteil eines methodenübergreifenden Vergleichs zur Membranpermeabilisierung durch AMPs bildet. Die verwendeten Puffer mussten dementsprechend auch für andere Methoden geeignet sein (Nanopore-Methode und planare Membranen).

Unter diesen Versuchsbedingungen erzielte das KI-Quenching nicht die erwarteten Ergebnisse: LL32 hatte keine Auswirkungen auf POPE:POPG Liposomen, zeigte dafür aber bei DOPC Liposomen und LPS Aggregaten Anzeichen einer Membranpermeabilisierung. Die Komposition aus zwitterionischem POPE und POPG, das eine negative Nettoladung aufweist, sollte den Liposomen eine negativ geladene Membranoberfläche verleihen. Damit hätten die Wechselwirkungen zwischen den kationischen AMPs und den negativ geladenen POPE:POPG Liposomen stärker ausfallen sollen als zwischen AMPs und zwitterionischen und damit neutral geladenen DOPC Liposomen.

In den Messungen der Impedanzspektroskopie mittels des tethaPods verursachten zwar alle drei AMPs einen Anstieg der Leitfähigkeit bei POPE:POPG und DOPC Membranen, wiesen aber keinen deutlichen Unterschied in ihrer Wirkung auf beide Membransysteme auf. LL32 erwies sich in tethaPod Messungen beider Membransysteme als am stärksten permeabilisierendes AMP, da es den größten Anstieg der Membranleitfähigkeit verursachte. Die membranpermeabilisierende Eigenschaft von hBD3-1 war zwar im Vergleich zu LL32 und Arenicin-1 am geringsten, aber im Gegensatz zu Untersuchungen an POPE:POPG und DOPC Liposomen mittels KI-Quenching vorhanden.

Die Auswertung für Arenicin-1 gestaltete sich im KI-Quenching schwierig, da das Peptid selbst einen Abfall des Fluoreszenzsignals bewirkte. Dementsprechend konnte nicht beurteilt werden,

ob der Abfall der Fluoreszenzintensität nach der Zugabe von Arenicin-1 aus einer Permeabilisierung des Liposoms oder aus der Anwesenheit von Arenicin-1 resultierte. In der Impedanzmessung hingegen konnte für Arenicin-1 eine membranpermeabilisierende Aktivität nachgewiesen werden, da sich der Stromfluss durch die Membranen nach der Zugabe von Arenicin-1 erhöhte.

Auch bei NBD-markierten LPS Aggregaten zeigte Arenicin-1 den selbst verursachten Fluoreszenzabfall, während für LL32 und hBD3-1 nach der Zugabe ein Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen wurde (siehe Abb. 26). Es ist möglich, dass dieser Anstieg auf eine Interkalation von LL32 und hBD3-1 in die Membran zurückzuführen ist, durch die die NBD-Moleküle weiter auseinander rücken und der *self-quenching* Effekt verringert wird. Zusätzlich wurde nach der Zugabe von LL32 beim KI gequenchten Fluoreszenzsignal ein Abfall beobachtet, der eine Permeabilisierung der Membran vermuten lässt. Das KI gequenchte Fluoreszenzsignal von Arenicin-1 fiel trotz des eigens verursachten Quenchings nicht stärker aus als das nach der Zugabe von LL32, sodass LL32 die stärkste permeabilisierende Aktivität der AMPs auf LPS Aggregate auszuüben scheint. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen an tBLMs bestehend aus POPE:POPG und DOPG. Eine Überprüfung von tBLMs aus LPS konnte in dieser Arbeit leider nicht umgesetzt werden, da es nicht gelang *E. coli* WBB01 LPS in Ethanol oder Methanol abzulösen.

Aus diesem Grund sind die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden des KI-Quenchings und der Impedanzmessung mittels tethaPod kaum miteinander vergleichbar. Es wäre interessant die Versuche mit anderen Lipidzusammensetzungen beispielsweise PE:PG und anderen Puffersystemen zu wiederholen, um etwaige Probleme des KI-Quenchings aufzudecken und gegebenenfalls zu eliminieren.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse des KI-Quenchings und der tethaPod Messungen darauf schließen, dass die Wechselwirkung von LL32 mit Lipidmembranen durchaus größer ist als die von Arenicin-1 und hBD3-1. Obwohl sich die in dieser Arbeit untersuchten Membranen aus POPE:POPG und DOPC in ihrer Nettoladung unterscheiden, scheint es keinen gravierenden Unterschied zwischen der Aktivität der AMPs an diesen Membranmodellen zu geben.

5.3 Rekonstituierte Membranen: Geeignetes Modell für bakterielle Membranen?

Für die Anwendung vieler biophysikalischer Methoden werden rekonstituierte Membranen als Modell eines Zielorganismus eingesetzt, um so tiefere Einblicke in den Membranaufbau, Funktionalität oder Wechselwirkungen mit Substanzen zu gewinnen. Aber inwieweit eignen sich diese Membranmodelle um Aussagen über das Zielsystem zu treffen?

In der vorliegenden Arbeit wurde die membranpermeabilisierende Aktivität der AMPs LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 sowohl an Gram-negativen Bakterien als auch an rekonstituierten Membranen untersucht. Es wurden verschiedene Methoden eingesetzt, um die Permeabilisierung der Membranen zu beobachten und nachzuweisen. Im Fokus der Untersuchungen stand der Vergleich der Ergebnisse aus Bakterienversuchen und Versuchen mit rekonstituierten Membranen, die die innere und äußere Membran Gram-negativer Bakterien imitieren sollten. Dazu wurde POPE:POPG in einem Verhältnis von 4:1 (M:M) als Mimikry der inneren Membran eingesetzt, während für die äußere Membran *E. coli* WBB01 LPS als Baustein diente.

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Bakterien und AMPs wurden ein antimikrobieller Test und verschiedene Fluoreszenzfarbstoff Assays durchgeführt. Als biophysikalische Methoden wurde die Fluoreszenzspektroskopie mit einem KI-Quenching an Liposomen und Impedanzmessung mit dem neu etablierten tethaPod System an tBLMs herangezogen, um eine Membranpermeabilisierung durch die AMPs zu untersuchen. Die Bakterienversuche wurden in physiologischen NaCl-Puffer durchgeführt, während die rekonstituierten Membranen in HEPES-Puffer und KCl-Puffer vorlagen. Der Grund für die abweichenden Puffersysteme war, dass die in dieser Arbeit produzierten Daten der tethaPod Messungen und des KI-Quenchings für eine wissenschaftliche Ausarbeitung des Vergleichs unterschiedlicher Methoden zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung dienten.

Dennoch zeigte sich eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Bakterienversuche und den Untersuchungen der rekonstituierten Membransysteme. Das Kathelizidin Derivat LL32 wies sowohl im SYTOX Green und im PI Assay an *E. coli* und *K. pneumoniae* als auch bei der Impedanzmessung des tethaPods an POPE:POPG Membranen und in den Ergebnissen des KI-Quenchings an LPS Aggregaten die stärkste membranpermeabilisierende Aktivität der drei eingesetzten AMPs auf. Das Schlusslicht bildete hBD3-1, das im KI-Quenching anscheinend weder in POPE:POPG Liposomen noch an LPS Aggregaten zu einer Permeabilisierung führte. Ähnliche Beobachtungen hatte bereits A. Saathoff beschrieben (Saathoff 2013). Im Fall von Arenicin-1 konnte eine Beeinflussung von Fluoreszenzsignalen in den Fluoreszenzfarbstoff Assays an Bakterien und im KI-Quenching nachgewiesen werden. Dies bedeutet möglicherweise, dass

Arenicin-1 selbst als Quencher fungiert und nicht nur mit den Farbstoffen um die Bindung an der DNA konkurriert oder durch einen komplexartigen Einbau in die Liposommembran zum *self-quenching* der NBD-Moleküle führt.

Die Verwendung von rekonstituierten Membranen in biophysikalischen Methoden als Modell bakterieller Membranen ist durchaus geeignet, um generelle Aussagen zu treffen oder spezielle Mechanismen zu untersuchen. Es ist offensichtlich, dass die Auswirkungen von Substanzen auf rekonstituierte Membranen immer Abweichungen zum Originalsystem aufweisen werden, da die Modellmembranen in Geometrie, Beschaffenheit oder Funktionalität divergieren. Bereits bei unterschiedlichen Stämmen Gram-negativer Bakterien ergeben sich Unterschiede in der Auswirkung von AMPs. Das in dieser Arbeit vorgestellte und in der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel etablierte System des tethaPods zur Impedanzmessung an tBLMs lieferte zuverlässige Ergebnisse über den Grad der durch AMPs verursachten Membranpermeabilisierung, der mit den Ergebnissen der Bakterienversuche korrelierte. Die Betrachtung eines Membransystems mit verschiedenen biophysikalischen Methoden liefert differenziertere Informationen und erlaubt eine Überprüfung der Ergebnisse untereinander.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die membranpermeabilisierende Aktivität der AMPs LL32, Arenicin-1 und hBD3-1 an den Bakterienstämmen *E. coli* und *K. pneumoniae* sowie an rekonstituierten Membranen nachgewiesen und miteinander verglichen werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Etablierung des tethaPod Systems in der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, das den Nachweis der Permeabilisierung von tBLMs durch Impedanzmessung ermöglicht. Die Messungen an den relativ großen Oberflächen der tBLMs von ca. 2 mm² ergaben, dass LL32 die rekonstituierten Membranen nicht nur sehr schnell, sondern auch am stärksten permeabilisiert. Ähnliche Ergebnisse wurden in Versuchen an Bakterien nachgewiesen. Der Einsatz der Nukleinsäure-Farbstoffe SYTOX Green und PI lieferte vergleichbare Ergebnisse, die jedoch nachweislich von Wechselwirkungen der AMPs mit der Methode beeinflusst wurden. An dieser Stelle wäre es wünschenswert andere Fluoreszenzfarbstoff Assays zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung einzusetzen, die nicht von der Zugabe der AMPs beeinflusst werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden eines FDA und Zombie Green Assays eigneten sich nicht zur Überprüfung der Membranpermeabilisierung der verwendeten Bakterienstämme.

Interessanterweise besaß Arenicin-1 zwar eine geringere permeabilisierende Aktivität an Bakterien und rekonstituierten Membranen als LL32, zeigte im antimikrobiellen Test allerdings eine stärkere Wachstumshemmung. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass nicht nur die Membranpermeabilisierung durch AMPs antimikrobielle Effekte hervorruft, sondern auch weitere Wechselwirkungen der AMPs mit Nukleinsäuren oder der Peptidsynthese die Vitalität der Bakterien beeinflussen (Lohner 2009; Jenssen, Hamill, and Hancock 2006).

Die fluoreszenzspektroskopische Methode des KI-Quenchings erzielte unter den in dieser Arbeit vorgestellten Bedingungen nicht die erwarteten Ergebnisse, die bereits in Vorversuchen beobachtet wurden. Ausschlaggebend könnte die Verwendung des Puffersystems für die rekonstituierten Membranen sein, der sich von dem physiologischen Puffer für die Bakterienversuche deutlich unterschied. Dementsprechend wäre es ratsam die hier vorgestellten Versuche in einem einheitlichen Puffer zu wiederholen, um so eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Bakterien und rekonstituierten Membranen zu gewährleisten. Des Weiteren wäre es durchaus interessant weitere Lipidzusammensetzungen, die den Membranen der Zielorganismen näher kommen, zu testen. Gerade als Modellmembran für menschliche Zellen wäre es sinnvoll Membranen zu untersuchen, die auch Sphingomyelin und Cholesterol enthalten, um so einen besseren Eindruck über die Wechselwirkungen von AMPs zwischen menschlichen und bakteriellen Membranen zu gewinnen. In den Versuchen dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Auswirkung von LL32, hBD3-1 und Arenicin-1 an Membranen aus DOPC oder POPE:POPG

nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit Beobachtungen anderer Arbeiten, in denen die Wechselwirkungen von AMPs auf PC haltige Membranen deutlich geringer ausfielen als auf Membranen, die PG enthielten, und sollten wiederholt werden (Andrä et al. 2008; Gutschmann et al. 2000; Böhling 2007).

Literaturverzeichnis

- Alexander, C, and E T Rietschel. 2001. "Bacterial Lipopolysaccharides and Innate Immunity." *Journal of Endotoxin Research* 7 (3): 167–202. doi:10.1177/09680519010070030101.
- Andrä, Jörg, Igor Jakovkin, Joachim Grötzinger, Oliver Hecht, Anna D Krasnosdembskaya, Torsten Goldmann, Thomas Gutsmann, and Matthias Leippe. 2008. "Structure and Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Arenicin." *The Biochemical Journal* 410 (1): 113–22.
- Bals, R., and J. M. Wilson. 2003. "Cathelicidins - A Family of Multifunctional Antimicrobial Peptides." *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Bechinger, Burkhard, and Karl Lohner. 2006. "Detergent-like Actions of Linear Amphipathic Cationic Antimicrobial Peptides." *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (9): 1529–39. doi:10.1016/j.bbamem.2006.07.001.
- Böhling, Arne. 2007. "Biophysikalische Untersuchungen an Bakteriellen Modellmembranen Bezüglich Ihrer Lateralen Organisation Und Der Interaktion Mit Humanen B-Defensinen." Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Boman, H. G. 2003. "Antibacterial Peptides: Basic Facts and Emerging Concepts." *Journal of Internal Medicine* 254 (3): 197–215. doi:10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
- Bowdish, Dawn M E, Donald J Davidson, Robert E W Hancock, and U K Eh. 2005. "A Re-Evaluation of the Role of Host Defence Peptides in Mammalian Immunity." *Current Protein and Peptide Science*, 35–51.
- Brandenburg, K., M.H.J. Koch, and U. Seydel. 1990. "Phase Diagram of Lipid A from Salmonella Minnesota and Escherichia Coli Rough Mutant Lipopolysaccharide." *Journal of Structural Biology* 105 (1-3): 11–21. doi:10.1016/1047-8477(90)90093-R.
- Brauser, A., I. Schroeder, T. Gutsmann, C. Cosentino, A. Moroni, U.-P. Hansen, and M. Winterhalter. 2012. "Modulation of Enrofloxacin Binding in OmpF by Mg²⁺ as Revealed by the Analysis of Fast Flickering Single-Porin Current." *The Journal of General Physiology* 140 (1): 69–82. doi:10.1085/jgp.201210776.
- Brian, A A, and H M McConnell. 1984. "Allogeneic Stimulation of Cytotoxic T Cells by Supported Planar Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (19): 6159–63.
- Brogden, Kim a. 2005. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" *Nature Reviews. Microbiology* 3 (3): 238–50. doi:10.1038/nrmicro1098.
- Brown, R. Stephen, John D. Brennan, and Ulrich J. Krull. 1994. "Self-Quenching of Nitrobenzoxadiazole Labeled Phospholipids in Lipid Membranes." *The Journal of Chemical Physics* 100 (8): 6019. doi:10.1063/1.467112.
- Brunius, Gustaf. 1980. "Technical Aspects of the Use of 3', 6'-Diacetyl Fluorescein for Vital Fluorescent Staining of Bacteria." *Current Microbiology* 4: 321–23.

- Chapman, D., and D. J. Fluck. 1966. "Physical Studies of Phospholipids. 3. Electron Microscope Studies of Some Pure Fully Saturated 2,3-Diacyl-DL-Phosphatidyl-Ethanolamines and Phosphatidyl-Cholines." *Journal of Cell Biology* 30 (1): 1–11.
- Chrzanowski, Thomas H., Rhonda D. Crotty, James G. Hubbard, and Robert P. Welch. 1984. "Applicability of the Fluorescein Diacetate Method of Detecting Active Bacteria in Freshwater." *Microbial Ecology* 10 (2): 179–85. doi:10.1007/BF02011424.
- Cranfield, Charles, Taren Bettler, and Bruce Cornell. 2014. "Nanoscale Ion Sequestration To Determine the Polarity Selectivity of Ion Conductance in Carriers and Channels." *Langmuir* 31(1): 292–98. doi:10.1021/la504057z.
- Cranfield, Charles, Sonia Carne, Boris Martinac, and Bruce Cornell. 2015. "The Assembly and Use of Tethered Bilayer Lipid Membranes (tBLMs)." In *Methods in Membrane Lipids*, edited by Dylan M. Owen, 1232nd ed., 45–53. New York: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-1752-5_4.
- Cranfield, Charles, Bruce A Cornell, Stephan L Grage, Paul Duckworth, Sonia Carne, Anne S Ulrich, and Boris Martinac. 2014. "Transient Potential Gradients and Impedance Measures of Tethered Bilayer Lipid Membranes: Pore-Forming Peptide Insertion and the Effect of Electroporation." *Biophysical Journal* 106 (1). Biophysical Society: 182–89. doi:10.1016/j.bpj.2013.11.1121.
- Daugelavicius, Rimantas, Elena Bakiene, and Dennis H Bamford. 2000. "Stages of Polymyxin B Interaction with the Escherichia Coli Cell Envelope." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (11): 2969–78.
- Dojindo Molecular Technologies. 2014. Produktbeschreibung für: *-Bacstain- CFDA Solution*.
- Duits, Louise A, B E P Ravensbergen, Mirjam Rademaker, and Pieter S Hiemstra. 2002. "Expression of B -Defensin 1 and 2 mRNA by Human Monocytes , Macrophages and Dendritic Cells." *Immunology* 106 (4): 517–25. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01430.x.
- Fjell, Christopher D., Jan A. Hiss, Robert E. W. Hancock, and Gisbert Schneider. 2012. "Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function." *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Galanos, C., O. Lüderitz, and O. Westphal. 1969. "A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides." *European Journal of Biochemistry* 9 (2): 245–49. doi:10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
- Ganz, T, and R I Lehrer. 1995. "Defensins." *Pharmacology & Therapeutics* 66 (2): 191–205. doi:10.1016/0163-7258(94)00076-F.
- Ganz, Tomas. 2003. "Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity." *Nature Reviews Immunology* 3 (9): 710–20. doi:10.1038/nri1180.
- Glukhov, Evgenia, Margareta Stark, Lori L Burrows, and Charles M Deber. 2005. "Basis for Selectivity of Cationic Antimicrobial Peptides for Bacterial versus Mammalian Membranes." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 33960–67. doi:10.1074/jbc.M507042200.

- Goldberg, Keren, Hadar Sarig, Fadia Zaknoon, Raquel F Eband, Richard M Eband, and Amram Mor. 2013. "Sensitization of Gram-Negative Bacteria by Targeting the Membrane Potential." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (9): 3818–26. doi:10.1096/fj.13-227942.
- Gutsmann, T, M Fix, J W Larrick, and A Wiese. 2000. "Mechanisms of Action of Rabbit CAP18 on Monolayers and Liposomes Made from Endotoxins or Phospholipids." *The Journal of Membrane Biology* 176 (3): 223–36. doi:10.1007/s00232001092.
- Hammer, Malte. 2007. "Struktur-Wirkungsbeziehungen Zwischen Membranaktiven Peptiden Und Bakteriellen Lipopolysacchariden." Promotionsschrift an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Hancock, R E W. 1984. "Alterations in Outer Membrane Permeability." *Annual Review of Microbiology* 38: 237–64.
- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 2001. "Isolation and Characterization of Human Beta -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5707–13.
- Hiemstra, P S. 2006. "Defensins and Cathelicidins in Inflammatory Lung Disease: Beyond Antimicrobial Activity." *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 2): 276–78. doi:10.1042/BST20060276.
- Hoskin, David W, and Ayyalusamy Ramamoorthy. 2008. "Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides." *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (2): 357–75. doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.008.
- Hsu, C.-H. 2005. "Structural and DNA-Binding Studies on the Bovine Antimicrobial Peptide, Indolicidin: Evidence for Multiple Conformations Involved in Binding to Membranes and DNA." *Nucleic Acids Research* 33 (13): 4053–64. doi:10.1093/nar/gki725.
- Hübner, Nils-Olaf, Katharina Sciermoch, and Axel Kramer. 2007. "Vergleich von Methoden Zur Bestimmung Der Minimalen Hemmkonzentration Und Schlussfolgerungen Zur Weiterentwicklung Der Methoden Comparison of Methods for Susceptibility Testing of Pathogens to Antiinfective Agents and Conclusions Concerning the Further de." *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2 (2): 1–5.
- Jenssen, H., P. Hamill, and R. E. W. Hancock. 2006. "Peptide Antimicrobial Agents." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3): 491–511. doi:10.1128/CMR.00056-05.
- Jung, Sascha, Andrew J Dingley, René Augustin, Friederike Anton-Erxleben, Mareike Stanisak, Christoph Gelhaus, Thomas Gutsmann, et al. 2009. "Hydramacin-1, Structure and Antibacterial Activity of a Protein from the Basal Metazoan Hydra." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (3): 1896–1905. doi:10.1074/jbc.M804713200.
- Koistinen, Max. 2012. "Charaterization of Reconstituted Bacterial Membranes and Their Interaction with Antimicrobial Peptides." Dissertation at the University of Lübeck.
- Krishna, Gowri, Jurgen Schulte, Bruce A. Cornell, Ron J. Pace, and Peter D. Osman. 2003. "Tethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: Selectivity and Conductance." *Langmuir* 19 (6): 2294–2305.

- Lakowicz, Joseph R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Edited by Joseph R. Lakowicz. 3rd ed. Baltimore, MD: Springer US. doi:10.1007/978-0-387-46312-4.
- Larrick, James W, Michimasa Hirata, Robert F Balint, Jaehag Lee, Jian Zhong, and Susan C Wright. 1995. "Human CAP18: A Novel Antimicrobial Lipopolysaccharide-Binding Protein." *Infection and Immunity* 63 (4): 1291–97.
- Lehrer, Robert I., and Tomas Ganz. 2002. "Defensins of Vertebrate Animals." *Current Opinion in Immunology*.
- Lohner, Karl. 2009. "New Strategies for Novel Antibiotics: Peptides Targeting Bacterial Cell Membranes." *General Physiology and Biophysics*.
- Martinac, Boris, Yoshiro Saimi, and Ching Kung. 2008. "Ion Channels in Microbes." *Physiological Reviews* 88 (4): 1449–90. doi:10.1152/physrev.00005.2008.
- Matsuzaki, Katsumi. 1999. "Why and How Are Peptide–lipid Interactions Utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462 (1-2): 1–10. doi:10.1016/S0005-2736(99)00197-2.
- Montal, M, and P Mueller. 1972. "Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (12): 3561–66.
- Mortimer, F. C., D. J. Mason, and V. a. Gant. 2000. "Flow Cytometric Monitoring of Antibiotic-Induced Injury in Escherichia Coli Using Cell-Impermeant Fluorescent Probes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 676–81. doi:10.1128/AAC.44.3.676-681.2000.
- Mueller, P, D O Rudin, H T Tien, and W C Wescott. 1962. "Reconstitution of Cell Membrane Structure in Vitro and Its Transformation into an Excitable System." *Nature* 194: 979–80.
- Nagaoka, I., S. Hirota, F. Niyonsaba, M. Hirata, Y. Adachi, H. Tamura, S. Tanaka, and D. Heumann. 2002. "Augmentation of the Lipopolysaccharide-Neutralizing Activities of Human Cathelicidin CAP18/LL-37-Derived Antimicrobial Peptides by Replacement with Hydrophobic and Cationic Amino Acid Residues." *Clinical and Vaccine Immunology* 9 (5): 972–82. doi:10.1128/CDLI.9.5.972-982.2002.
- Netuschil, L, and G Schmalz. 1981. "Lebendbestimmung Kariogener Bakterien Mittes Fluoresceindiacetat." *Kariesprophylaxe* 3: 75–79.
- Nikaido, H. 2003. "Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 593–656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- Ovchinnikova, Tatiana V, Galina M Aleshina, Sergey V Balandin, Anna D Krasnosdembskaya, Mikhail L Markelov, Elena I Frolova, Yulia F Leonova, Andrey a Tagaev, Eugeny G Krasnodembsky, and Vladimir N Kokryakov. 2004. "Purification and Primary Structure of Two Isoforms of Arenicin, a Novel Antimicrobial Peptide from Marine Polychaeta Arenicola Marina." *FEBS Letters* 577 (1-2): 209–14. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.012.

- Ovchinnikova, Tatiana V, Zakhar O Shenkarev, Sergey V Balandin, Kirill D Nadezhdin, Alexander S Paramonov, Vladimir N Kokryakov, and Alexander S Arseniev. 2008. "Molecular Insight into Mechanism of Antimicrobial Action of the Beta-Hairpin Peptide Arenicin: Specific Oligomerization in Detergent Micelles." *Biopolymers* 89 (5): 455–64. doi:10.1002/bip.20865.
- Park, Chan Bae, Hun Sik Kim, and Sun Chang Kim. 1998. "Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (1): 253–57. doi:10.1006/bbrc.1998.8159.
- Phillips, M C, and D Chapman. 1968. "Monolayer Characteristics of Saturated 1,2,-Diacyl Phosphatidylcholines (lecithins) and Phosphatidylethanolamines at the Air-Water Interface." *Biochimica et Biophysica Acta* 163 (3): 301–13.
- Popescu, A, and R J Doyle. 1996. "The Gram Stain after More than a Century." *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission* 71 (3): 145–51.
- Raetz, Christian R H. 2000. "Bacterial Endotoxins : Extraordinary Lipids That Activate Eucaryotic Signal Transduction O-Antigen." *Journal of Bacteriology* 175 (18): 5745–53.
- Raetz, Christian R H, and Chris Whitfield. 2002. "Lipopolysaccharide Endotoxins." *Annual Review of Biochemistry* 71 (January): 635–700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
- Richter, Ralf P., Rémi Bérat, and Alain R. Brisson. 2006. "A Mechanistic View of the Formation of Supported Lipid Bilayers In V Ited Feature Article Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers : An Integrated View." *Langmuir* 22 (8).
- Saathoff, Annika. 2013. "Biophysical Investigations Into the Interactions Between Antimicrobial Peptides of the Epithelial Defense and Microbial Cell Envelopes." Dissertation at the University of Lübeck.
- Schibli, David J, Howard N Hunter, Vladimir Aseyev, Timothy D Starner, John M Wienczek, Paul B McCray, Brian F Tack, and Hans J Vogel. 2002. "The Solution Structures of the Human Beta-Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against Staphylococcus Aureus." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (10): 8279–89. doi:10.1074/jbc.M108830200.
- Schwarz, G, and S E Taylor. 1995. "Thermodynamic Analysis of the Surface-Activity Exhibited by a Largely Hydrophobic Peptide." *Langmuir* 11 (11): 4341–46 ST – Thermodynamic Analysis of the Surf. <Go to ISI>://A1995TF28200028.
- SDx Tethered Membranes Pty Ltd. 2012. Produktbeschreibung für: *tethaPlate*. Sydney.
- Seltmann, Guntram, and Otto Holst. 2002. *The Bacterial Cell Wall*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Semple, Fiona, Sheila Webb, Hsin-Ni Li, Hetal B Patel, Mauro Perretti, Ian J Jackson, Mohini Gray, Donald J Davidson, and Julia R Dorin. 2010. "Human Beta-Defensin 3 Has Immunosuppressive Activity in Vitro and in Vivo." *European Journal of Immunology* 40 (4): 1073–78. doi:10.1002/eji.200940041.

- Sevcsik, E, G Pabst, W Richter, S Danner, H Amenitsch, and K Lohner. 2008. "Interaction of LL-37 with Model Membrane Systems of Different Complexity: Influence of the Lipid Matrix." *Biophysical Journal* 94 (12): 4688–99. doi:10.1529/biophysj.107.123620.
- Shinnar, Ann Eisenberg, Kathryn L. Butler, and Hyon Ju Park. 2003. "Cathelicidin Family of Antimicrobial Peptides: Proteolytic Processing and Protease Resistance." *Bioorganic Chemistry*.
- Sørensen, Ole E, Per Follin, Anders H Johnsen, Jero Calafat, G Sandra Tjabringa, Pieter S Hiemstra, and Niels Borregaard. 2001. "Human Cathelicidin , hCAP-18 , Is Processed to the Antimicrobial Peptide LL-37 by Extracellular Cleavage with Proteinase 3." *Blood* 97 (12): 3951–59.
- Steiner, H, D Hultmark, A Engström, H Bennich, and H G Boman. 1981. "Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect Immunity." *Nature* 292 (5820): 246–48.
- Tanaka, Motomu, and Erich Sackmann. 2005. "Polymer-Supported Membranes as Models of the Cell Surface." *Nature* 437 (7059): 656–63. doi:10.1038/nature04164.
- Teixeira, Vitor, Maria J Feio, and Margarida Bastos. 2012. "Role of Lipids in the Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes." *Progress in Lipid Research* 51 (2): 149–77. doi:10.1016/j.plipres.2011.12.005.
- Von Tscherner, V, and H M McConnell. 1981. "Physical Properties of Lipid Monolayers on Alkylated Planar Glass Surfaces." *Biophysical Journal* 36 (2): 421–27.
- Wang, Guangshun. 2008. "Structures of Human Host Defense Cathelicidin LL-37 and Its Smallest Antimicrobial Peptide KR-12 in Lipid Micelles." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (47): 32637–43. doi:10.1074/jbc.M805533200.
- Wiese, Andre, Thomas Gutschmann, and Ulrich Seydel. 2003. "Towards Antibacterial Strategies: Studies on the Mechanisms of Interaction between Antibacterial Peptides and Model Membranes." *Journal of Endotoxin Research* 9 (2): 67–84.
- Wiesner, Jochen, and Andreas Vilcinskas. 2010. "Antimicrobial Peptides: The Ancient Arm of the Human Immune System." *Virulence* 1 (5): 440–64. doi:10.4161/viru.1.5.12983.
- Wildman, Katherine A. Henzler, Dong-Kuk Lee, and A. Ramamoorthy. 2003. "Mechanism of Lipid Bilayer Disruption by the Human Antimicrobial Peptide, LL-37." *Biochemistry*, 6545–58.
- Woese, Carl R, Otto Kandler, and Mark L Wheelis. 1990. "Towards a Natural System of Organisms : Proposal for the Domains." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87 (June): 4576–79.
- Zasloff, Michael. 2002. "Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms." *Nature* 415 (January): 389–95.
- Zeya, H I, and J K Spitznagel. 1963. "Antibacterial and Enzymic Basic Proteins from Leukocyte Lysosomes: Separation and Identification." *Science (New York, N.Y.)* 142: 1085–87.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht der angewandten Methoden..	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellhülle Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. ...	4
Abbildung 3: Zellhülle Gram-negativer Bakterien und LPS Struktur..	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der vier rekonstituierten Membransysteme.	8
Abbildung 5: Aufbau einer <i>tethered bilayer lipid membrane</i> (tBLM).	11
Abbildung 6: Struktur von hBD3.	14
Abbildung 7: Struktur von LL37..	15
Abbildung 8: Struktur von Arenicin-1.....	15
Abbildung 9: Die unterschiedlichen Modelle der Membranpermeabilisierung.....	17
Abbildung 10: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der Fluoreszenz..	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Kaliumiodid-Quenchings an Liposomen.	27
Abbildung 12: Chemische Strukturformel der Tether und Spacer der T10 Elektrode.....	29
Abbildung 13: Darstellung einer tBLM mit Ersatzschaltbild.....	30
Abbildung 14: Ersatzschaltbild zur Bestimmung der Werte der Impedanzspektroskopie.....	31
Abbildung 15: Übersicht des benötigten Materials für den Zusammenbau einer tethaPlate.	33
Abbildung 16: Ablauf des Zusammenbaus einer tethaPlate.	34
Abbildung 17: Nachweis der Membranpermeabilisierung von <i>K. pneumoniae</i> mit SYTOX Green.....	39
Abbildung 18: Nachweis der Membranpermeabilisierung von <i>E. coli</i> mit SYTOX Green.....	40
Abbildung 19: Gegenüberstellung der Ergebnisse des SYTOX Green und des PI Assays an <i>E. coli</i> inkubiert mit LL32.	41
Abbildung 20: Gegenüberstellung der Ergebnisse des SYTOX Green und des PI Assays an <i>K. pneumoniae</i> inkubiert mit hBD3-1.....	42
Abbildung 21: SYTOX Green Assay an abgetöteten <i>K. pneumoniae</i> Bakterien.....	43

Abbildung 22: Ergebnisse der FDA Vorversuche mit <i>K. pneumoniae</i>	44
Abbildung 23: Ergebnisse der Zombie Green Vorversuche mit <i>K. pneumoniae</i>	45
Abbildung 24: Ergebnisdarstellung des KI-Quenchings an DOPC Liposomen in HEPES-Puffer.....	46
Abbildung 25: Ergebnisdarstellung des KI-Quenchings an POPE:POPG Liposomen in HEPES-Puffer.	47
Abbildung 26: Ergebnisdarstellung des KI-Quenchings an <i>E. coli</i> WBB01 LPS Aggregaten in HEPES-Puffer.....	48
Abbildung 27: Vergleich des KI-Quenchings an POPE:POPG Liposomen in HEPES- und KCl-Puffer.	49
Abbildung 28: Leitfähigkeit von DOPC Membranen in HEPES-Puffer.	51
Abbildung 29: Leitfähigkeit von POPE:POPG Membranen in HEPES- und KCl-Puffer.....	52
Abbildung 30: Leitfähigkeit von POPE:POPG bezogen auf die Leitfähigkeit des Puffers.	53
Abbildung 31: Kapazität von POPE:POPG und DOPC Membranen in HEPES-Puffer.....	54
Abbildung 32: Vergleich der Ergebnisse des antimikrobiellen Tests und des SYTOX Green Assays an <i>E. coli</i>	56
Abbildung 33: Ergebnisse des antimikrobiellen Tests an <i>E. coli</i> zur Bestimmung der MIC-Werte. ..	XXVI
Abbildung 34: Ergebnisse des antimikrobiellen Tests an <i>K. pneumoniae</i> zur Bestimmung der MIC-Werte.....	XXVI
Abbildung 35: Vergleich der Ergebnisse des antimikrobiellen Tests und des SYTOX Green Assays an <i>K. pneumoniae</i>	XXVII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Phospholipide und Lipopolysaccharide mit zugehöriger molarer Masse.....	20
Tabelle 2: Verwendete antimikrobielle Peptide mit zugehöriger Aminosäuresequenz und molarer Masse.	21
Tabelle 3: MIC-Werte für AMPs an <i>E. coli</i> und <i>K. pneumoniae</i>	37

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere hiermit, dass alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Werken entnommen wurden, als solche gekennzeichnet wurden.

Tangstedt, den 04.05.2015

Nadine Gebauer

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Gutschmann, für die Eröffnung der Möglichkeit meine Masterarbeit in der Forschungsgruppe Biophysik anzufertigen, für die hervorragende Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenfalls möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer und Gutachter an der HAW Hamburg Herrn Prof. Dr. André bedanken, der mich mit gutem Rat bei der Anfertigung meiner Masterarbeit unterstützt hat.

Frau Dr. Annika Saathoff und Kerstin Stephan danke ich für die Einweisung in die Arbeit im S2-Labor und in die verschiedenen Methoden. Bei Sabrina Groth möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung der Fluoreszenzmessungen bedanken.

Für die zahlreichen „Kaffeepausen“, den fachkundigen Rat und die Hilfsbereitschaft bedanke ich mich herzlichst bei Laura Paulowski, Christian Nehls und Niklas Stein. Außerdem danke ich Julia Wernecke für die Unterstützung in technischen Fragen.

Der gesamten Laborgruppe Biophysik und Immunbiophysik möchte ich für die herzliche Aufnahme in die Gemeinschaft und allgegenwärtige Hilfsbereitschaft danken.

Meinen lieben Eltern danke ich, dass sie mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt und mir damit das Studium ermöglicht haben. Mein Dank gilt auch meiner Schwester und meinem Freund Kevin, der während meiner Studienzeit an meiner Seite war.

Anhang

Chemikalien

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller	Produkt-Nr.
CaCl ₂	Calciumchlorid, Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	208290
Ethanol abs.	EMSURE®, Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	100983
FDA	Fluoresceindiacetat, Molecular Probes®	Life Technologies, Darmstadt, Germany	F1303
HCl	Salzsäure, Titrisol®, 1 N	VWR International, Darmstadt, Deutschland	30024.290
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	391340
KCl	Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A3582
KI	Kaliumiodid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A1365
LB-Bouillon	nach Miller	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	71753
NaCl	Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	567440
NaOH	Natronlauge, Titrisol®, 1N	VWR International, Darmstadt, Deutschland	31627.290
PI	Propidiumiodid, Molecular Probes® 1 mg/ml in Wasser	Life Technologies, Darmstadt, Germany	P3566
SYTOX® Green	Molecular Probes® 5 mM in DMSO	Life Technologies, Darmstadt, Germany	S7020
TFA	Trifluoressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	108178
Zombie Green™	100 Tests	BioLegend, San Diego, USA	423111

Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller	Produkt-Nr.
96-Well-Mikrotiterplatte	Costar®, steril, flache Bodenplatte mit Deckel	Corning Inc., New York, USA	3596
96-Well-Mikrotiterplatte	FluoroNUNC™, steril, schwarz, mit Deckel	Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Dänemark	437111
Dispenser-Spitzen	0,5 ml, steril	VWR International, Darmstadt, Deutschland	613-1009
Falcon Röhrchen	50 ml, 114 x 28 mm, steril, PP, roter Schraubdeckel	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	62.547.254
Gewindeflaschen	N8, 1,5 ml, flacher Boden	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	70213
Kanülen	Sterican® 100, Ø 0,90 x 70 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	4665791
Kryoröhrchen	Cryobank	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland	291703
Kultivierungs-Röhre	13 ml, 100 x 16 mm, steril, PP, mit Belüftungsstufen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	62.515.006
Küvetten	Arcyl, 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	67.740
Objektträger	76 x 26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland	03-0038
Pipettenspitzen	20 µl, 200 µl und 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	70.116 70.760 70.762
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 und 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	
Schraubdeckel	N8, PTFE beschichtet, 1,3 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	70245
Serologische Pipetten	Costar® Stripette®, steril, 25 ml, 10 ml und 5 ml	Corning Inc., New York, USA	4489 4488 4487
Sterilfilter	Millipore® Steritop™, Express™ PLUS Membran (0,22 µm), 250 ml, steril	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	SCGPS02RE

tethaPlate™	SDx-T10	SDx Tethered Membranes, Sydney, Australien
-------------	---------	---

Verwendete Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analytikwaage	Research R200D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer	Fluorolog® 3	HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching, Deutschland
Heizblock	BT 100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
Impedanzspektrometer	tethaPod™ SDx-R1	SDx Tethered Membranes Pty Ltd, Sydney, Australien
Inkubationshaube	Unihood™ RSC-550	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
Inkubationshaube	Certomat® H	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Leitfähigkeitsmesser	ExStik®II EC400	Extech® Instruments, Nashua, NH, USA
Mikrotiterplatten-Reader	Tecan Rainbow	Tecan Group, Crailsheim, Deutschland
Mikrotiterplatten-Reader	Tecan Infinite 200P	Tecan Group, Crailsheim, Deutschland
pH-Meter	Lab 860	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Pipette	Research® 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette	Reference® 100 µl, 1000 µl, 2000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette	Research® Multichannel 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipette, Seriendosierung	HandyStep® elektronik	BrandTech® Scientific, Essex, CT, USA
Pipettierhilfe	PIPETBOY_acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Präzisionswaage	Extend ED6235-CW	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Rührplatte	MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schüttler	Certomat® R	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer	WPA CO8000, OD600	Biochrome, Cambridge, UK
Sterilwerkbank	BSB4	Gelaire®, Sydney, Australien
Tischzentrifuge	Microzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator	HTU SONI-130	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Vortex Schüttler	Minishaker MS2 und MS3	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Advantage A10	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Verwendete Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
easyWIN fitting	V 6.1	Tecan Group, Crailsheim, Deutschland
GraphPad Prism®	5.04	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Magellan™	V 7.1	Tecan Group, Crailsheim, Deutschland
tethaPod Software	1.6.6	SDx Tethered Membranes Pty Ltd, Sydney, Australien
FluorEssenz™	3.5	HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching, Deutschland
Origin®	6.0	OriginLab® Corporation, Northampton, MA, USA

Zusätzliche Daten

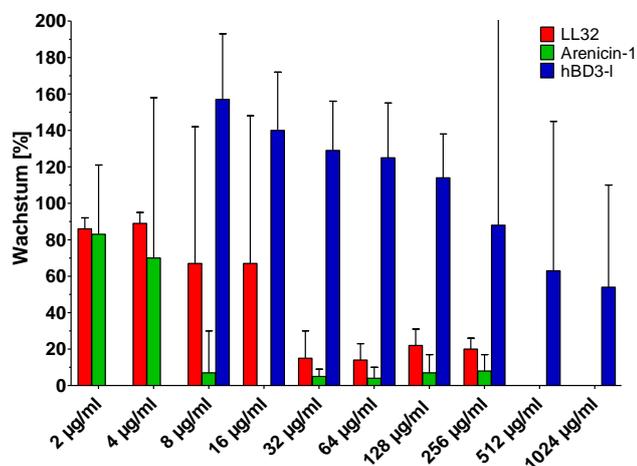


Abbildung 33: Ergebnisse des antimikrobiellen Tests an *E. coli* zur Bestimmung der MIC-Werte. Die Bakterien (1×10^7 cfu/ml) wurden in einem 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer bei pH 7,4 mit 10 % LB-Bouillon und unterschiedlichen AMP Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h wurde das prozentuale Wachstum der Bakterien anhand einer Dichtemessung mit einem Platten Reader bestimmt. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittel aus fünf unabhängigen Versuchen, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

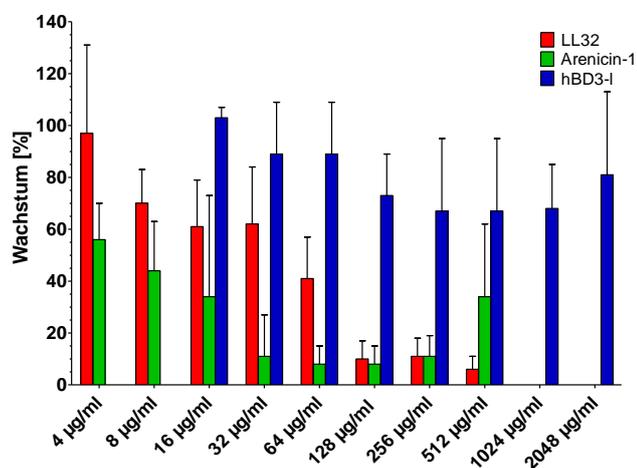


Abbildung 34: Ergebnisse des antimikrobiellen Tests an *K. pneumoniae* zur Bestimmung der MIC-Werte. Die Bakterien (1×10^7 cfu/ml) wurden in einem 20 mM HEPES, 150 mM NaCl-Puffer bei pH 7,4 mit 10 % LB-Bouillon und unterschiedlichen AMP Konzentrationen inkubiert. Nach 24 h wurde das prozentuale Wachstum der Bakterien anhand einer Dichtemessung mit einem Platten Reader bestimmt. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittel aus fünf unabhängigen Versuchen, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

