

**Aus der Medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Zabel**

und

**aus der Abteilung Molekulare Infektiologie
des Forschungszentrums Borstel**

Leiter der Abteilung: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schaible

**Präklinische Untersuchungen zur Wechselwirkung von
antimikrobiellen Peptiden mit Gram-negativen Bakterien
und deren Pathogenitätsfaktor Endotoxin**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –**

**vorgelegt von
Yani Kaonis
aus Lübeck**

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Zabel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung: 10.9.2013.....

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.9.2013.....

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

„Es ist nicht genug zu wissen-

man muß auch anwenden.

Es ist nicht genug zu wollen-

man muß auch tun.“

(Johann Wolfgang von Goethe 1749 - 1832)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	15
2	Theoretische Grundlagen	27
2.1	Das angeborene Immunsystem (<i>Innate Immunity</i>)	30
2.1.1	Die Membran von eukaryotischen Zellen	31
2.2	Bakterien	33
2.2.1	Die Membran Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien	35
2.3	Fluidität in Membranen-Phasenverhalten von Membranen	37
2.4	Phospholipide	39
2.5	Lipopolysaccharide	40
2.5.1	Lipopolysaccharide als Immunstimulanz	41
2.6	Sepsis	42
2.6.1	Epidemiologie und Ökonomische Aspekte der Sepsis	43
2.6.2	Diagnose und Therapie nach den S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen interdisziplinären Vereinigung Für Intensiv-und Notfallmedizin (DIVI)	49
2.6.3	Gescheiterte Forschungsansätze zur Therapie der Sepsis	51
2.7	Antimikrobielle Peptide (AMP) und Synthetische Anti-LPS Peptide (SALP)	54
2.7.1	Wirkmechanismen membran-aktiver antimikrobieller Peptide	57
3	Material, Methoden und Experimente	61
3.1	Verwendete Lipide	61
3.1.2	Phospholipide	62
3.1.3	Sphingolipide	63
3.1.4	Cholesterol	64
3.2	Verwendete Lipopolysaccharide	65
3.3	Verwendete Puffer	66
3.4	Verwendete Bakterien	67

3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	67
3.4.2	<i>Proteus mirabilis</i>	68
3.4.3	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota	68
3.5	Antimikrobielle Peptide	69
3.5.1	Peptidsynthese	70
3.6	Reagenzien	71
3.6.1	Trägermaterial	72
3.7	Geräteliste zur Vesikelpräparation	73
3.8	Präparation der Bakterien	73
3.9	Präparation der <i>Small Unilamellar Vesicles</i> (SUV)	74
3.10	Präparation von Lipopolysaccharid-Aggregaten	76
3.11	Herstellung antimikrobieller Peptidlösungen	76
3.12	Präparation von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten	76
3.12.1	Präparation der festkörperunterstützten Lipidsysteme mit AMP	78
3.12.2	Präparation von festkörperunterstützten LPS mit AMP	78
3.13	Rasterkraftmikroskopie	78
3.13.1	Cantilever	85
3.13.2	Präparation von festkörperunterstützten Lipidsystemen und LPS in der Temperierzelle	87
3.14	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> , SAXS)	88
3.14.1	Einführung in die Grundlagen von SAXS	88
3.14.2	Der SAXS-Messaufbau am Synchrotron Hamburg	90
3.14.3	Synchrotron-Strahlung	91
3.14.4	SAXS Daten-Reduktion und Analyse	92
3.15	Elektronenmikroskopie (EM) und Gefrierbruchtechnik	95
3.16	FTIR Spektroskopie	96
3.16.1	Prinzipieller Aufbau eines FTIR-Spektrometers	97
3.17	Förster-Resonanz Energie-Transfer Spektroskopie (FRET)	98

3.18	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	100
3.19	<i>Ex vivo</i> Lungenstimulationsversuche	101
3.20	Inhibition der LPS induzierten Zytokinausschüttung von TNF- α via ELISA	101
3.21	Zytotoxizitätsstudien mittels BIONAS-Testsystem und Hämolysetest	102
4	Ergebnisse	104
4.1	Inhibierung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von TNF- α durch die Peptide LPep19-2.5, LPep19-2.5KO, LPep19-4 sowie LPep19-8 im ELISA-Test	106
4.2	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Bindungsstudien	108
4.3	Studien zur Zytotoxizität und Hämolyse	109
4.4	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von Bakterien und deren Interaktion mit antimikrobiellen Peptiden	111
4.4.1	AFM-Messungen von <i>E. coli</i> Bakterien Stamm WBB01	113
4.4.2	AFM-Messungen von <i>E. coli</i> Bakterien Stamm WBB01 mit LPep19-2.5	114
4.4.3	AFM-Messungen von <i>E. coli</i> Bakterien Stamm WBB01 mit LPep19-8.3acyl	115
4.4.4	AFM-Messungen von <i>E. coli</i> Bakterien Stamm WBB01 mit LPep19-4LF	116
4.4.5	AFM-Messungen von <i>E. coli</i> Bakterien Stamm WBB01 mit Polymyxin B (PMB)	118
4.4.6	AFM-Messungen von <i>Salmonella enterica</i> Bakterien Stamm R60	118
4.4.7	AFM-Messungen von <i>Salmonella enterica</i> Bakterien Stamm R60 mit LPep19-2.5	119
4.4.8	AFM-Messungen von <i>Salmonella enterica</i> Bakterien Stamm R60 mit LPep19-8.3acyl	120
4.4.9	AFM-Messungen von <i>Salmonella enterica</i> Bakterien Stamm R60 mit LPep19-4LF	121
4.4.10	AFM-Messungen von <i>Salmonella enterica</i> Bakterien Stamm R60 mit Polymyxin B (PMB)	122

4.4.11 AFM-Messungen von <i>Proteus mirabilis</i> Bakterien	124
4.4.12 AFM-Messungen von <i>Proteus mirabilis</i> Bakterien mit LPep19-2.5	125
4.4.13 AFM-Messungen von <i>Proteus mirabilis</i> Bakterien mit LPep19-8.3acyl	127
4.4.14 AFM-Messungen von <i>Proteus mirabilis</i> Bakterien mit LPep19-4LF	128
4.4.15 AFM-Messungen von <i>Proteus mirabilis</i> Bakterien mit Polymyxin B (PMB)	130
4.5 AFM-Messungen von <i>E. coli</i> Lipopolysaccharid Stamm WBB01 mit LPep19-2.5	131
4.6 Elektronenmikroskopische Studien von <i>Sal. ent. ser. Minn.</i> Lipopolysaccharid mit LPep19-2.5 in Gefrierbruchtechnik	134
4.7 Studien mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> , SAXS) von Lipopolysaccharid R60 und Lipid A R60 mit LPep19-2.5	135
4.8 Studien mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> , SAXS) von bakteriellen Membranlipiden mit LPep19-2.5 und LPep19-4LF	137
4.9 Studien mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> , SAXS) von Lipopolysaccharid R60 mit LPep19-2.5, Ceftriaxon und deren Kombination	140
4.10 Kombinationsversuche mit klassischen Antibiotika	142
4.11 AFM-Messung eines rekonstituierten Lipidmembranmodells einer humanen Zelle mit LPep19-2.5	145
4.12 Studien mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung (<i>Small Angle X-ray Scattering</i> , SAXS) der Lipidmischung eines humanen Lipid-membranmodells mit LPep19-2.5	147
4.13 Phasenübergangsstudien von Membranlipiden und Lipopoly-saccharid mittels Fourier-Transform Infrarotspektroskopie	149
4.14 Interkalationsstudien von antimikrobiellen Peptiden der LPep-Gruppe mit Membranlipiden und Lipopolysaccharid mittels Förster-Resonanz Energie-Transfer Spektroskopie	155

4.15 Etablierung eines <i>ex vivo</i> humane-Lunge-Modells zur Inflammation und Therapie der Inflammation	159
5 Diskussion	162
6 Zusammenfassung	172
7 Ausblick	174
8 Literaturverzeichnis	177
9 Anhänge	192
Danksagung	199
Lebenslauf	202
Publikationsliste	205

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
AMP	Antimikrobielle Peptide
ATR-IR	<i>Attenuated Total Reflection-Infrared Spectroscopy</i>
BZ	Blutzuckerwert
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
Chol	Cholesterol
CMC	<i>Critical Micelle Concentration</i>
Cryo-TEM	Cryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
mCD14	<i>membrane-bound Cluster of Differentiation 14</i>
Da	Dalton
DOPC	1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DOPS	1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin
DMPC	1, 2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DMPS	1, 2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phospho-L-Serin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
F _i O ₂	Fraktion des inhalierten Sauerstoffs
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanz Energietransfer
FT-IR	Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie
hBD	humanes- β -Defensin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethan-sulfonsäure
Hz	Hertz
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
LALF	Limulus Anti-LPS-Faktor
LB	Luria bertani
LBP	LPS-bindendes Protein
LPep19-2.5	Leitpeptid aus der Familie der LPep-Gruppe basierend auf LALF
LPep19-2.5KO	eine Variante des Leitpeptids LPep19-2.5
LPep19-2,2	eine Variante des Leitpeptids LPep19-2.5
LPep19-4	eine Variante des Leitpeptids LPep19-2.5
LPep19-4LF	eine Variante des Leitpeptids LPep19-2.5
LPep19-8	eine Variante des Leitpeptids LPep19-2.5
LPep19-8.3acyl	eine Variante des Leitpeptids LPep19-2.5
LPS	Lipopolysaccharid
LPS R45	LPS von <i>Proteus mirabilis</i> R45
LPS R60	LPS von <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R60
LPS WBB01	LPS von <i>Escherichia coli</i> Stamm WBB01
MAP	<i>Mean Arterial Pressure</i> (Mittlerer arterieller Druck)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>

MD-2	<i>Myeloid Differentiation Protein-2</i>
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MBC	<i>Minimal Bactericidal Concentration</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MM	Molare Masse
MNC	<i>Mononuclear Cells</i>
NW	Normalwert/ Normwert
Pa	Pascal
p _a CO ₂	Arterieller Kohlensäurepartialdruck
p _a O ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PLL	Poly-L-Lysin
PTT	<i>Partial Thromboplastin Time</i> (Partielle Thromboplastinzeit)
R45	<i>Proteus mirabilis</i> Stamm R45
R60	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Stamm R60
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. ent. ser. Minn.</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota
<i>Sal. ent. ser. Minn.</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota
SALP	Synthetische-Anti-LPS-Peptide
SAXS	<i>Small-Angle X-ray Scattering</i> (Kleinwinkel-Röntgenstreuung)
SBP	<i>Systolic Blood Pressure</i> (Systolischer Blutdruck)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
SM	Sphingomyelin
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TFA	Tetrafluoressigsäure
TLR	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
WBB01	<i>Escherichia coli</i> Stamm WBB01

Einheiten und Konstanten

Einheiten		Konstanten und Größen	
Å	Angström [0,1 nm]	c	Konzentration
g	Gramm	m	Masse
h	Stunde	n	Stoffmenge
l/min/m ²	Herzindex	R	Allg. Gaskonstante
keV	Kilo Elektronenvolt	V	Volumen
kPa	KiloPascal [10^3 Pa]	g	Erdbeschleunigung
mg	Milligramm [10^{-3} g]	K	Kelvin
m	Meter	T	Temperatur
µm	Mikrometer [10^{-6} m]	P ₀	Primärintensität
nm	Nanometer [10^{-9} m]	θ	Beugungswinkel
M	Molar	π	Zahl Pi
µM	Mikromolar [10^{-6} Molar]	2 θ	Streuwinkel
mM	Millimolar [10^{-3} Molar]	λ	Wellenlänge
mL	Milliliter	k _d	Dissoziationskonstante
kcal	Kilokalorie	μ	Absorptionskoeffizient
µS/cm	Leitfähigkeit	T _m	Phasenübergangstemperatur
J	Joule	d _{opt}	optimale Schichtdicke
mg/dl	Blutzuckerwert	ΔG	Gibb'sche Energie
ml/kg/24h	Diurese	ΔH	Enthalpieänderung
mmHg	Blutdruck	ΔS	Entropieänderung
s	Sekunde	q	Streuvektor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anforderungen an die Funktion eines antimikrobiellen Peptids im Hinblick auf seine therapeutische Wirkung.	24
Abbildung 2: Vermutete Wirkungsweisen und Wirkorte von antimikrobiellen Peptiden.	29
Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Morphologie von Bakterien.	34
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellhülle Gram-negativer Bakterien.....	35
Abbildung 5: Vergleich der Membranstruktur eines Gram-negativen Bakteriums (linke Bildhälfte) zu der Membranstruktur eines Gram-positiven Bakteriums (rechte Bildhälfte)....	36
Abbildung 6: Prävalenz der Methicillinresistenz bei invasiven Isolaten von <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 2010 (linke Bildhälfte) und 2011 (rechte Bildhälfte) aus EARSS <i>Annual Report European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i> (EARS-Net).	37
Abbildung 7: Platzbedarf von Lipidmolekülen in Abhängigkeit ihres Phasenverhaltens.	38
Abbildung 8: Prinzipielle chemische Struktur eines LPS-Moleküls Gram-negativer Bakterien und Kennzeichnung der Regionen.	41
Abbildung 9: Prinzip des „Self-promoted uptake“	58
Abbildung 10: Ausbildung einer Membranläsion nach dem <i>Barrel-Stave</i> -und dem <i>Toroidal Pore</i> -Modell.	59
Abbildung 11: Das <i>Carpet</i> -Modell.	60
Abbildung 12: Klassifizierung biologisch relevanter Lipide.	62
Abbildung 13: Strukturformeln der verwendeten Phospholipide für das humane (linke Spalte) und bakterielle (rechte Spalte) Membran-Modellsystem.	63
Abbildung 14: Strukturformel des aus Schweinegehirn gewonnenen Sphingomyelins.	64
Abbildung 15: Strukturformel des verwendeten Cholesterols.	65
Abbildung 16: Primärstruktur von Aspidasept mit dem Programm PepDraw generiert.	70
Abbildung 17: Prinzip der Peptidsynthese.	71
Abbildung 18: Entstehung eines <i>lipid bilayer</i> durch Aufspreiten eines Liposomens auf einem Substrat.....	77
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskops.	79
Abbildung 20: Abbildungsverfahren der Rasterkraftmikroskopie.	81
Abbildung 21: Das Bild eines Rasterkraftmikroskops entsteht durch die Abrasterung einer Oberfläche.	82
Abbildung 22: Schematischer Aufbau eines im <i>AC-mode</i> betriebenen Rasterkraft-mikroskops.	83
Abbildung 23: Amplituden- und Phasenverhalten eines <i>cantilevers</i> in Luft.	83

Abbildung 24: Überlagerungseffekte zwischen Spitze und Probe können die AFM-Topographie verfälschen.	85
Abbildung 25: OMCL-RC800PSA <i>cantilever</i>	86
Abbildung 26: Aufbau eines „ <i>Petri Dish Holder and Heater</i> “ für das Rasterkraftmikroskop MFP 3-D (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA).....	87
Abbildung 27: Geometrische Veranschaulichung des Bragg'schen Beugungsgesetzes.....	89
Abbildung 28: SAXS Experimentierstation X33 des EMBL Hamburg.	90
Abbildung 29: Temperierbarer Probenhalter für SAXS-Messungen.	91
Abbildung 30: SAXS an verschiedenen Membransystemen.	92
Abbildung 31: Röntgenbeugungsbild von LPS R60.	93
Abbildung 32: 1D Gitter und 2D hexagonales Gitter.	94
Abbildung 33: Aufbau und Funktionsweise eines FT-IR-Spektrometers.	98
Abbildung 34: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch LPep19-2.5 sowie durch LPep19-2.5KO bei unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen.	106
Abbildung 35: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch LPep19-4 sowie durch LPep19-8 bei unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen.....	107
Abbildung 36: Bindungsstudien von LPS Ra <i>Sal. ent.</i> serovar Minnesota mit LPep19-2.5 via isothermer Titrationskalorimetrie und Darstellung der Enthalpieänderung ΔH über die LPS/Peptidbindung.....	109
Abbildung 37: Bestimmung der Peptid-assoziierten Zytotoxizität.	111
Abbildung 38: Grau-und Farbverlauf für rasterkraftmikroskopische Bilder.	113
Abbildung 39: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> WBB01 Kontrolle.....	114
Abbildung 40: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> WBB01+20 $\mu\text{g/ml}$ LPep19-2.5.	115
Abbildung 41: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> WBB01+20 $\mu\text{g/ml}$ LPep19-8.3acyl.	116
Abbildung 42: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> WBB01+20 $\mu\text{g/ml}$ LPep19-4LF.	117
Abbildung 43: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> WBB01+20 $\mu\text{g/ml}$ LPep19-4LF.	117
Abbildung 44: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>E. coli</i> WBB01+5 $\mu\text{g/ml}$ PMB.....	118
Abbildung 45: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60.....	119
Abbildung 46: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60+20 $\mu\text{g/ml}$ LPep19-2.5.	120

Abbildung 47: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-8.3acyl.	121
Abbildung 48: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-8.3acyl.	121
Abbildung 49: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-4LF.	122
Abbildung 50: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60+5 µg/ml PMB.	123
Abbildung 51: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. R60+5 µg/ml PMB.	124
Abbildung 52: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i>	125
Abbildung 53: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i>	125
Abbildung 54: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +20 µg/ml LPep19-2.5.	126
Abbildung 55: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +20 µg/ml LPep19-2.5.	127
Abbildung 56: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +20 µg/ml LPep19-8.3acyl.	128
Abbildung 57: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +20 µg/ml LPep19-4LF.	129
Abbildung 58: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +20 µg/ml LPep19-4LF.	129
Abbildung 59: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +5 µg/ml PMB.	130
Abbildung 60: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +5 µg/ml PMB.	131
Abbildung 61: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von <i>Proteus mirabilis</i> +5 µg/ml PMB.	131
Abbildung 62: Dynamische rasterkraftmikroskopische Studien von <i>E. coli</i> WBB01 LPS in Wechselwirkung mit dem Leitpeptid LPep19-2.5.	133
Abbildung 63: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota LPS.	135
Abbildung 64: Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 auf die supramolekulare Struktur von LPS-Aggregaten von <i>Sal. ent.</i> ser. Minn. und seines Lipid A-Teils.	137

Abbildung 65: Synchrotronstrahlungsmessungen (SAXS) zur Bestimmung der Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 und des Peptids LPep19-4LF auf die supramolekulare Struktur von Liposomen des bakteriellen Membranmodells aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) in einem molaren Verhältnis von 81:17:2.	139
Abbildung 66: Synchrotronstrahlungsmessungen (SAXS) zur Bestimmung der Wechselwirkung von Ceftriaxon, LPep19-2.5 sowie deren Kombination auf die supramolekulare Struktur von LPS-Aggregaten aus <i>Sal. ent. ser. Minn.</i>	141
Abbildung 67: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch Amoxicillin und die Mischung aus Amoxicillin und LPep19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.	144
Abbildung 68: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch Ceftriaxon und die Mischung aus Ceftriaxon und LPep19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.	145
Abbildung 69: Dynamische rasterkraftmikroskopische Untersuchungen des rekonstituierten humanen Lipidmembranmodells in Wechselwirkung mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®).	147
Abbildung 70: Synchrotronstrahlungsmessung (SAXS) zur Bestimmung der Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 auf die supramolekulare Struktur des humanen Zellmembran-modells aus DOPC:SM:Chol im molaren Verhältnis von 45:45:10.	148
Abbildung 71: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von DMPC durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.	151
Abbildung 72: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von DMPS durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.	152
Abbildung 73: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von <i>Sal. ent. ser. Minn.</i> -LPS durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.....	153
Abbildung 74: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von <i>E. coli</i> -LPS Stamm WBB01 durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.	154
Abbildung 75: Interkalationsstudien mittels Förster-Resonanz Energie Transfer (FRET) von LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-8 auf PC-Liposomen.	156
Abbildung 76: Interkalationsstudien mittels Förster-Resonanz Energie Transfer (FRET) von LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-8 auf PS-Liposomen.	156
Abbildung 77: Interkalationsstudien mittels Förster-Resonanz Energie-Transfer (FRET) von LPep19-2.5 auf LPS-Aggregate von <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota.	158

Abbildung 78: Etablierung des <i>ex vivo</i> Lungenmodells.....	160
Abbildung 79: Ergebnisse des <i>ex vivo</i> Lungenmodells.....	161
Abbildung 80: Hypothese zur LPS-Neutralisation von freien LPS-Aggregaten durch Einwirken des Leitpeptids über Multilamellarisierung.....	165
Abbildung 81: Therapeutische Wirksamkeit von LPep19-2.5 (Aspidasept®) in Kombination mit Antibiotika zur Behandlung einer Endotoxiämie oder Bakteriämie ausgelöst durch intraperitoneale Applikation von lebenden <i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota Bakterien.	170
Abbildung 82: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch Streptomycin und die Mischung aus Streptomycin und LPep19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.....	195
Abbildung 83: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch Tetracyclin und die Mischung aus Tetracyclin und LPep19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.....	196
Abbildung 84: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation <i>in vitro</i> durch Ciprofloxacin und die Mischung aus Ciprofloxacin und LPep19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.....	197

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Parameter zur Definition der SIRS.	44
Tabelle 2: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock der S-2-Leitlinien zur Diagnose und Therapie der DSG e.V. und DIVI.....	50
Tabelle 3: Verwendete Lipopolysaccharide.	66
Tabelle 4: Liste der untersuchten antimikrobiellen Peptide.	70
Tabelle 5: Konzentrationen und Verhältnisse der ternären Lipidmodellsysteme.	75
Tabelle 6: Effekte in Wasser bei einer durchstrahlten Dicke von 1 mm bei einer Wellenlänge von $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ (Photonenenergie 8 keV).....	90
Tabelle 7: Aminosäuresequenzen und Molare Massen der im ELISA-Test untersuchten Peptide.	108
Tabelle 8: Bestimmung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (MIC) der antimikrobiellen Peptide in [$\mu\text{g/ml}$].	112
Tabelle 9: Verwendete Phospholipide (Kapitel 3.1.2).	192
Tabelle 10: Sepsisdefinition nach ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien von 2003	193
Tabelle 11: Spezifikationen (Federkonstanten, Resonanzfrequenzen) und verwendete Modi der verwendeten <i>cantilever</i>	194

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Das Immunsystem des Menschen ist ebenso wie die Immunsysteme der Organismen aus Flora und Fauna durch evolutionäre Anpassungen an das Ökosystem spezialisiert. Menschen, Tiere und Pflanzen haben spezielle Abwehrmechanismen entwickelt, um sich in ihrem jeweiligen Ökosystem gegen Fremdorganismen und deren Toxine zu behaupten. Evolutionäre Prozesse und die dadurch initiierten Anpassungsmechanismen haben ein komplexes System zur Detektion und Abwehr von Mikroorganismen, im Wesentlichen von Bakterien, Viren und Protozoen, hervorgebracht.

Das aus der Evolution hervorgegangene menschliche Immunsystem wird in ein angeborenes Immunsystem, welches bei Geburt dem Menschen eine effektive Grundausstattung zur Infektabwehr von Beginn an zur Verfügung stellt und in ein adaptives Immunsystem, das sich auf die verändernden Einflüsse der Umgebung auf den Organismus einstellt, unterteilt.

Zum angeborenen Immunsystem zählen Zellen des unspezifischen Immunsystems wie basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten und Makrophagen sowie ein humorales System, bestehend aus Zytokinen, Interferonen und dem Komplementsystem. Die zellulären und humoralen Anteile des angeborenen Immunsystems wirken durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene und Prostaglandinen), Sekretion von Zytokinen, Phagozytose von Krankheitserregern, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und durch Aktivierung des Komplementsystems.

Das adaptive Immunsystem ist im Wesentlichen durch T- und B-Lymphozyten sowie durch natürliche Killerzellen gekennzeichnet. Zur Population der T-Zellen gehören T-Helferzellen, die durch Sekretion von Zytokinen alle anderen Zellen des adaptiven Immunsystems regulieren. T-Killerzellen wirken direkt auf ihre Zielzellen, vor allem virusbefallene Zellen, durch direktes Abtöten mittels Perforin. B-Lymphozyten sind in der Lage nach ihrer Aktivierung Antikörper gegen Bakterien, Parasiten und Viren zu bilden und stellen nach erfolgreicher Bekämpfung einer Infektion das Reservoir bzw. die Matrize für die schnelle Produktion von Antikörpern gegen einen bereits bekannten Erreger. Dies wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet.

Die Abwehr von Mikroorganismen bzw. das Eindringen von Erregern in den Körper wird neben den Anteilen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zusätzlich von physikalischen oder chemischen Barrieren im Körper unterstützt. Diese Barrieren schützen insbesondere alle Eintrittspforten in den menschlichen Körper. So sind die Haut, die Bindehäute der Augen, die oberen und unteren Atemwege, der Gastrointestinaltrakt sowie der Urogenitaltrakt als Ein- und Durchtrittspforten gegen alle Mikroorganismen und Keime zu schützen. Die Haut bzw. die Epithelien der benannten Organsysteme bilden die Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Organismus und stellen somit die erste Abwehrlinie des Organismus gegen Fremdorganismen dar. Sie erfüllen diese Barrierefunktion mit Hilfe von Enzymen auf Haut und Schleimhaut oder durch sauren pH auf der Oberfläche von Schleimhäuten.

Zu den wichtigsten Schutzmechanismen zählt unter anderen die Salzsäuresekretion der Belegzellen des Magens. Der pH-Bereich des Magens von unter 2 ermöglicht nur wenigen Erregern ein Überleben und tötet mit der Nahrung aufgenommene Keime weitgehend ab. Zum Schutz des Dünndarms gegen Infektionen durch Erreger wirkt das Darm-assoziierte Immunsystem (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT) entgegen. Dazu zählen die Lymphfollikel der Mukosa und die Peyer-Plaques sowie die Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, die in der *Lamina propria* und zwischen den Epithelzellen diffus verteilt sind.

Die Atemwege werden durch die Auskleidung mit Schleim und dem rachenwärts schlagenden Flimmerepithel vor einer Invasion von Keimen geschützt. Die Erreger werden mit dem Schleim verschluckt und können somit die Lunge nicht erreichen. Dennoch verfügt die Lunge im Alveolarbereich über weitere Schutzmechanismen wie etwa Alveolarmakrophagen und *Surfactant* mit antibakteriell wirkenden Proteinen.

Der Schutz der Vagina vor Infektionen wird durch Abstoßung von glykogenhaltigen Epithelzellen gewährleistet. Zur Vaginalflora gehörende Bakterien wandeln das Glykogen zu Milchsäure um und erniedrigen somit den pH-Wert in der Vagina.

Die Harnröhre als Eintrittspforte wird durch den unter normalen Umständen sauren pH des Urins zum Einen und durch das ungehinderte regelmäßige Abfließen des Urins zum Anderen vor Erregern geschützt.

Diese physiko-chemischen Barrieren können neben Zellen des Immunsystems antimikrobielle Peptide enthalten, wie etwa das humane β -Defensin-1 (hBD-1), welches im Urin nachgewiesen wurde [12] oder die humanen β -Defensine 2 und 3 [59, 60], die in Extrakten

entzündeter Haut von Psoriasispatienten, in Lungenepithelzellen und in Zellen der Mundschleimhaut nachgewiesen wurden (hBD-2). Das hBD-3 konnte darüber hinaus in der Skelettmuskulatur, in der Plazenta, im Ösophagus und in der oralen Schleimhaut gefunden werden [50, 67]. Die humanen β -Defensine-1 und 2 können bei einem entzündlichen Prozess hochreguliert werden, was auf die immunologische Bedeutung dieser antimikrobiellen Peptide hindeutet.

Die Evolution der Mikroorganismen führte zu einer hohen Anpassungsfähigkeit von Erregern. Sie haben Mechanismen und Strategien entwickelt, die dazu dienen, sich den Zellen und Strukturen des Immunsystems des Menschen zu entziehen bzw. Barrieren zu überwinden. Als ein prominentes Beispiel zur Anpassung und zur Überwindung von Barrieren kann *Helicobacter pylori* im Magen des Menschen genannt werden. Dieses Bakterium kann mittels des Enzyms Urease Harnstoff zu NH_3 und CO_2 spalten und dadurch den sehr sauren pH-Wert des Magens, der im Bereich von pH 1 bis 2 liegt, in seiner unmittelbaren Umgebung neutralisieren und schafft sich damit eine Mikroumgebung, in der das Bakterium lebensfähig bleibt. Als eine weitere Strategie zum Überleben von *Helicobacter pylori* zählt die Ansiedelung im nahezu physiologischen pH-Bereich zwischen Schleimschicht und Epitheloberfläche.

Eine weitere Möglichkeit von Bakterien sich vor ihrer Zerstörung zu schützen, liegt in der Anpassung an antibiotische Substanzen und kann durch Mutation und nachfolgender Selektion der Bakterien hervorgerufen werden. Man spricht von Resistenzentwicklung der Bakterien. Erreger können eine „natürliche Resistenz“ als eine natürliche Eigenschaft tragen wie etwa die Nalidixinsäureresistenz von Kokken, Colistin-bzw. Polymyxin-B-Resistenz der Proteus-Keime oder die Nitrofurantoinresistenz der Pseudomonas-Keime. Die „erworbene Resistenz“ von Bakterien, induziert durch die Gabe von Antibiotika, kann bereits durch einen Mutationsvorgang, eine sogenannte „Ein-Schritt-Resistenz“, hervorrufen und damit sehr schnell eine therapeutische Widerstandskraft der Keime erhöhen. Folgen Mutationen über mehrere Schritte oder Generationen von Bakterien spricht man von einer „Mehr-Schritt-Resistenz“, die zu einer stufenweise Zunahme der Resistenz des Erregers im Allgemeinen führt [3]. Die Resistenzen können generationsübergreifend weitergegeben werden.

Es wird deutlich, daß sich Teile des Immunsystems in einem stetigen Wettstreit mit Mikroorganismen um die bessere Strategie, den Gegenpart zu bekämpfen oder zu umgehen, befinden.

Krankheitserreger können über Läsionen der Haut, zum Beispiel bei Hauterkrankungen, Insektenstichen oder Wunden sowie durch chirurgische Eingriffe unter Umgehung der Barriere Haut in den Körper gelangen. Bakterien können auch als Aerosol über die Atemwege, mit der Nahrung in den Gastrointestinaltrakt oder über die Vagina und Harnröhre in den Körper gelangen. Ein schwacher Immunstatus durch hohes Alter, ein schlechter Ernährungszustand, Stress oder eine konsumierende Erkrankung befördert eine Invasion von Erregern über die Eintrittspforten in den Körper.

Infektionen entstehen zumeist aus einer Kombination von Überwindung von Schutzbarrieren und Schutzmechanismen des Körpers und einem reduzierten Immunstatus. Eine Infektion oder Entzündung bzw. Inflammation wird definiert als eine Abwehrreaktion des Organismus oder des Gewebes gegen verschiedenartige schädigende Reize [3]. Die Entzündungsreaktion des Körpers zielt auf eine Beseitigung der schädigenden Noxen und deren Folgeerscheinungen ab.

Entzündungen können zumeist durch mechanische Reize, etwa Druck, Reibung oder Fremdkörper, durch physikalische Faktoren, wie etwa Strahlen und Temperatur oder durch Mikroorganismen, etwa durch Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten und deren Toxine hervorgerufen werden. Die Einteilung von Entzündungen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen [3]:

1. nach dem zeitlichem Ablauf (perakut, subakut, akut, subchronisch, chronisch, rezidivierend)
2. nach Ausbreitung und Lokalisation (lokalisiert, generalisiert, metastasierend)
3. nach der Verlaufsform (exsudativ, granulomatös, proliferativ)

Die klassischen Entzündungszeichen nach Celsus, die bereits in der Antike bekannt waren, bleiben in der modernen Medizin als erste Diagnosekriterien vor dem Einsatz von Blutuntersuchungen und anderen Techniken zur Diagnosestellung für eine Entzündung ein wichtiges Instrument. Die fünf Kriterien bilden die Basis für jeden Kliniker, eine frühzeitige Weichenstellung zur sicheren Diagnosestellung einer Entzündung einzuleiten.

Die klassischen Entzündungszeichen nach Celsus lauten:

1. *Rubor* (Rötung)
2. *Calor* (Überwärmung)
3. *Tumor* (Schwellung)
4. *Dolor* (Schmerz)
5. *Functio laesa* (gestörte Funktion)

Obgleich die Symptome einer Entzündung von Celsus bereits im ersten Jahrhundert nach Christus beschrieben wurden, ist es über die Jahrhunderte hinweg nicht gelungen, die genauen Zusammenhänge zwischen den die Entzündungen auslösenden Faktoren, den Erregern, und einer Infektion und Inflammation zu entschlüsseln. Medizinisches Wissen über die Anatomie und Physiologie des Menschen in Mitteleuropa ist eng verbunden mit Galenos von Pergamon (2. Jahrhundert n. Chr.), Leonardo da Vinci (1452-1519) und Andreas Vesalius (1514-1564), wobei der Letztgenannte als Begründer der modernen Anatomie angesehen wird. Darauf aufbauend und mit der Entwicklung neuer chirurgischer Methoden zur Versorgung von Wunden nach kriegerischen Auseinandersetzungen konnten einige Wissenslücken geschlossen werden. Die Methoden zur Wundversorgung in der Chirurgie konnten immer weiter verfeinert werden, so daß chirurgische Eingriffe immer erfolgreicher vollzogen werden konnten. Dennoch waren die postoperativen Mortalitäten trotz erfolgreicher Intervention aus unerklärlichen Gründen hoch.

Das fehlende Wissen über Krankheitserreger und Bakterien konnte erst durch Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) mit der Entwicklung der Mikroskopie und durch Robert Hook (1665) gewonnen werden. Durch die Entwicklung von mikroskopischen Techniken konnten Krankheitskeime sichtbar gemacht werden.

Es war jedoch der Gynäkologe Ignaz Semmelweis (1818-1865), der die Mortalität von Wöchnerinnen durch das Kindbettfieber im Allgemeinen Krankenhaus Wien in seiner Abteilung auf den Umstand zurückführte, daß Medizinstudenten nach ihren Sektionsstunden in der Pathologie die Wöchnerinnen untersuchten. Er vermutete, daß „die Leichenteilchen, die in das Blutgefäßsystem gelangten“ für die Erkrankung der Wöchnerinnen verantwortlich waren. Somit war erstmals die Verbindung zwischen schädigenden Substanzen, die von außen in den Körper eingetragen werden, und der Entstehung von Kindbettfieber geschaffen. Es gelang ihm, durch die Einführung von hygienischen Maßnahmen die Sterblichkeit der

Wöchnerinnen von 18 % auf 2,5 % zu senken. Dieser Erfolg wurde von Semmelweis erst 1863, 15 Jahre nach seiner Entdeckung, veröffentlicht.

Auf diese Entdeckung aufbauend, konnte der französische Chemiker Louis Pasteur (1822-1895) in seinen Studien zu Fäulnis und Verwesung zeigen, daß diese Prozesse durch kleinste einzellige Lebewesen, die er als Bakterien und Mikroben bezeichnete, verursacht werden. Er stellte die These auf, daß Mikroben die Ursache von Krankheiten sein könnten. Zu den größten Entdeckungen von Pasteur gehört das Wissen um das Abtöten von Bakterien in Flüssigkeiten. Durch seine Entdeckung ist die Sterilisation von Flüssigkeit möglich gemacht worden.

Der englische Chirurg Joseph Lister (1827-1912) konnte die Erkenntnisse von Semmelweis und Pasteur zur Senkung von Todesfällen an der *Glasgow Royal Infirmary* nutzen. Die Todesrate nach Amputationen durch eine Sepsis lag bei 50 %. Die Einführung von Haut- und Gerätedesinfektionen mit Carbolsäure, dem sogenannten antiseptischen Verfahren, durch Lister führte zu einer drastischen Senkung der postoperativen Mortalität durch Sepsis.

Der Zeitgenosse Listers Robert Koch (1843-1910) trug mit der Einführung der Dampfsterilisation 1887 zur Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Sterilisation und Hygiene bei.

Die Entdeckungen von Semmelweis, Pasteur, Lister und Koch trugen zu einer Verbesserung der Hygiene und Sterilisation bei. Die hohen Sterblichkeitsraten einer systemischen Entzündung, der Sepsis, konnten mit diesen Maßnahmen zwar drastisch gesenkt werden, jedoch konnte die Sepsis nicht vollends besiegt werden.

Bis zur Einführung der Definition von Sepsis nach Hugo Schottmüller (1867-1936) im Jahr 1914 wurde die Sepsis nach der klassischen Auffassung als Folge einer Fäulnis betrachtet. Schottmüller schuf mit seiner Sepsisdefinition von 1914 einen Grundstein zum Verständnis der Sepsis als Folge einer bakteriellen Infektion, die noch heute gilt:

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Und weiter: „Eine Therapie hätte sich also nicht gegen die im Blute kreisenden Bakterien, sondern gegen die ... freiwerdenden Bakterien-Toxine zu richten...“.

Diese Definition der Sepsis nennt einen bakteriellen Herd einerseits, andererseits fordert Schottmüller eine effektive Therapie, die nicht nur gegen die Bakterien sondern auch gegen deren Endotoxine gerichtet ist.

Die zufällige Entdeckung des Penicillins durch Alexander Flemming im Jahr 1928 und der breite Einsatz des Penicillins in den frühen 40er Jahren des 20. Jahrhunderts hat die Therapie einer bakteriellen Infektion oder Sepsis grundsätzlich verbessert und damit der Medizin zu einem großem Durchbruch auf diesem Gebiet verholfen.

Die anfängliche Hoffnung mit der Entwicklung von Antibiotika, Infektionserkrankungen und Sepsis endgültig beherrschbar zu machen, wurde relativ schnell enttäuscht. Es kristallisierten sich zwei Punkte heraus, die zunächst nicht geklärt werden konnten und Medizin und Wissenschaft vor neue Herausforderungen stellte:

1. die Anpassung von Keimen an die verwendeten Antibiotika und die damit entstehenden Antibiotikaresistenzen
2. die Identifikation und Isolation der Gram-negativen Sepsis-auslösenden Faktoren, das Lipopolysaccharid (LPS), aus der durch Antibiotikagabe zerstörten Membran von Gram-negativen Bakterien

Die Bekämpfung von Infektionskrankheiten wird durch die Ausbildung von Resistenzmechanismen vieler Bakterienstämme erschwert, so daß heute viele in der Klinik gebräuchliche Antibiotika nicht mehr wirken. Diese weltweite Entwicklung der Ausbildung von multiresistenten Keimen wirkt sich zunehmend dramatischer aus. Gerade auf Intensivstationen ist die Medizin auf wirksame Antibiotika angewiesen, da dort das Immunsystem der Patienten zumeist durch eine schwerwiegende Erkrankung nicht mehr in der Lage ist, Bakterien effektiv zu bekämpfen. Intensivpatienten haben ein höheres Risiko an nosokomialen Infektionen (im Krankenhaus erworbenen Infektionen) zu erkranken, da alle Abwehrmechanismen an den Eintrittspforten durch invasive Methoden, sei es durch eine künstliche Beatmung oder durch arterielle oder venöse Katheter oder Katheter im Urogenitaltrakt, aufgehoben werden.

Die Therapie der Sepsis mit Antibiotika birgt noch immer das Risiko einer nicht mehr beherrschbaren Sepsis durch das Freisetzen des Lipopolysaccharids, das ein Bestandteil der Zellhülle Gram-negativer Bakterien ist, in die Blutbahn. Einmal in die Blutbahn freigesetzt wird eine lokal inflammatorische, d.h., entzündliche Immunantwort ausgelöst, die je nach Schweregrad der Inflammation einen Zytokinsturm entfesseln kann, der eine überschießende

Immunreaktion zur Folge hat. Diese kann ein solches Maß erreichen, daß sich neben hohem Fieber ein massiver Blutdruckabfall (septischer Schock) durch Vasodilatation einstellen kann. Zu den weiteren Komplikationen zählt eine disseminierte intravasale Koagulation (DIC), die das Gerinnungssystem beeinflusst und die Gerinnung beschleunigt. Bei besonders schweren Verläufen kann letztendlich der Tod durch Multiorganversagen, ein schrittweises Abschalten bzw. Versagen der Organe, eintreten.

Das Erkrankungsbild der schweren Sepsis ist noch heute trotz moderner Medizin und maximal invasiver Therapie in den entwickelten Ländern ein lebensbedrohlicher Zustand. Für die Vereinigten Staaten von Amerika ist die Inzidenz der schweren Sepsis von *Angus et al.* mit 300 Fällen pro 100.000 Einwohner beziffert worden [11]. Eine nationale Studie im Jahr 2007 hat für die Sepsis auf deutschen Intensivstationen vergleichbare Zahlen zur Inzidenzrate geliefert. Hier liegen die Zahlen für die schwere Sepsis bei 220 Fällen pro 100.000 Einwohner [44]. Die Letalität von intensivmedizinischen Sepsispatienten beträgt je nach Schweregrad und Fortschreiten der Erkrankung zwischen 20 % und 80 % [11, 160]. Die Sterblichkeit auf deutschen Intensivstationen durch schwere Sepsis und septischen Schock liegt bei etwa 54 % [44]. Die in den letzten Jahren durchgeführten Studien zur Sepsistherapie haben gezeigt, daß die Zeit bis zum Therapiebeginn für die Prognose der Patienten kritisch ist. Neben einer frühzeitigen und sicheren Diagnose der Sepsis durch geeignete Entzündungsparameter, etwa Procalcitonin (PCT) und C-reaktivem Protein (CRP), sind die Behandlung der Kreislaufinsuffizienz [119] und der unverzügliche Beginn der antibiotischen Therapie von immenser Bedeutung. Die vor dem Hintergrund der ansteigenden Resistenzentwicklungen von Erregern gegen Antibiotika resistenzgerechte, adäquate antibiotische Therapie stellt neben der schnellen antibiotischen Intervention eine weitere Herausforderung dar [158].

Das bisher einzige seit 2002 von der *Food and Drug Administration* (FDA) freigegebene Medikament zur Behandlung von Sepsis, das aktivierte Protein C mit dem Handelsnamen Xigris[®], ist im Oktober 2011 vom Markt genommen worden. Studien zeigten, daß der Einsatz von Xigris[®] keine Vorteile gegenüber dem Placeboarm der Studie bietet und die bekannte Nebenwirkung bzw. die Gefahr einer nicht mehr beherrschbaren Blutung in keinem Verhältnis zur Wirksamkeit steht. Zudem war die Anwendung auf eine sehr kleine Untergruppe der von Sepsis betroffenen Patienten zugelassen.

Die rasante Entwicklung der Resistenzbildung von Bakterien gegen Antibiotika fungiert als Triebfeder zur Entwicklung neuer Substanzklassen, die Infektionen und auch Sepsis effektiv bekämpfen können. Seit der Entdeckung von antimikrobiellen Peptiden (AMP) in der Natur

und auch im Menschen als Teil der angeborenen Immunabwehr stehen AMP im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Die Eigenschaften und Wirkungsweisen von AMP stellen somit einen Ausgangspunkt für die Entwicklung einer neuen anti-infektiven Therapie dar [58].

Seit den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts ist die Forschung im Bereich von antimikrobiell wirkenden Peptiden forciert worden. Es konnten bis heute etwa 900 antimikrobielle Peptide von verschiedenen Spezies über Gattungs- und Artengrenzen hinweg identifiziert werden, die in die Datenbank „*Antimicrobial Sequences Database*“ Eingang gefunden haben (<http://www.bbcm.univ.trieste.it> [Tag des Zugriffs: 28.01.2013]). Eine andere Datenbank, die „*Collection of Anti-Microbial Peptides*“ (CAMP) enthält etwa 2900 experimentell validierte Peptide (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/index.php> [Tag des Zugriffs: 28.01.2013]).

Die bislang entdeckten antimikrobiellen Peptide werden in vier Hauptgruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt über ihre Nettoladung basierend auf ihre Aminosäuresequenz und ihre Struktur [27]:

- Anionische Peptide
- Lineare, kationische α -helikale Peptide (<40 Aminosäurereste)
- Kationische Peptide (reich an Aminosäuren wie Prolin, Arginin, Phenylalanin, Glycin, Tryptophan und Histidin)
- Anionische und kationische Peptide (Cysteine und Disulfidbrücken, sowie β -Faltblattstrukturen)

Zu der letztgenannten Gruppe gehören Peptide der humanen Defensine. Sie umfasst etwa 55 α -Defensine und etwa 90 β -Defensine, von denen die Peptide hBD-1, hBD-2 und hBD-3 auf verschiedenen Grenzflächen und Epithelien des Menschen als Teil des angeborenen Immunsystems gefunden wurden.

Die große Herausforderung für die Zukunft ist es, antimikrobielle Substanzen zu finden, die bereits vorhandene bakterielle Resistenzen von klinisch relevanten Keimen überwinden sowie keine neuen Resistenzmechanismen induzieren und nicht zytotoxisch wirken.

Für die Entwicklung einer antimikrobiellen Therapie bei durch Gram-negative Bakterien ausgelöster Sepsis sollten diese Substanzen antiinflammatorisch wirken und keine zytotoxische Wirkung über einen breiten Konzentrationsbereich entfalten. Für eine zielgerichtete Wirkung sollten diese Peptide das die Gram-negative Sepsis-auslösende Agens,

das Lipopolysaccharid (LPS), mit hoher Affinität binden und ohne Nebenwirkungen neutralisieren.

Die antimikrobiellen Peptide der „*Antimicrobial Sequences Database*“ und der „*Collection of Anti-Microbial Peptides*“ bilden somit eine natürliche Quelle für eine neue anti-infektive Wirkstoffgruppe und stellen Leitsubstanzen, die durch Optimierung mittels spezifischer struktureller Veränderung ihrer Aminosäuresequenz auf ihre Zielsubstanzen oder -strukturen maßgeschneidert wirken können.

Die Anforderungen an derartige Peptide sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Das Verständnis der Aktivität sowie der Wirkmechanismus dieser Peptide des Immunsystems sind für eine zielgerichtete sichere Optimierung von eminenter Bedeutung.

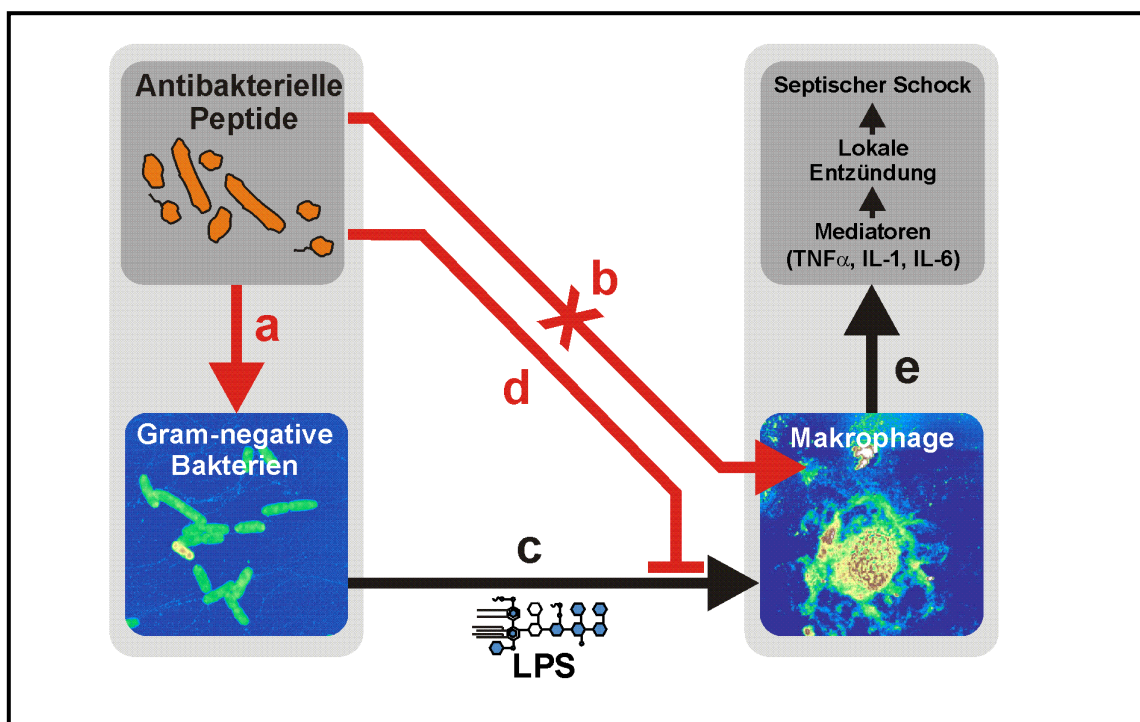


Abbildung 1: Anforderungen an die Funktion eines antimikrobiellen Peptids im Hinblick auf seine therapeutische Wirkung.

Die Peptide können einen antibakteriellen Effekt (a) haben und sollten nicht zytotoxisch sein (b). Zusätzlich sollten sie die Aktivierung von Makrophagen durch freigesetztes LPS (c) unterbinden (d), und damit einen septischen Schock durch eine massive Zytokinausschüttung von LPS-aktivierten Makrophagen verhindern oder vermindern (e).

Ziel dieser Arbeit im Rahmen des BMBF-Projektes 01GU0824 mit dem Titel „Therapie von Infektionskrankheiten mit speziellem Bezug auf die bakterielle Sepsis“ war es, die Wirkungsweise des Leitpeptids LPep19-2.5 bzw. Aspidasept[®], aus einer Reihe von synthetischen anti-LPS Peptiden, mit biophysikalischen Methoden auf das Sepsis-auslösende Agens Lipopolysaccharid und auf Membranmodelle der eukaryotischen Zelle aus 1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC) / Sphingomyelin (SM) und Cholesterol (Chol) im molaren Verhältnis von 45:45:10 sowie auf Gram-negativen Bakterien und ihren Membranmodellen aus Phosphoethanolamin (PE) / Phosphatidylglycerin (PG) / Cardiolipin (CL) im molaren Verhältnis 81:17:2 zu untersuchen.

Die im Vordergrund stehende Fragestellung zielte auf die Interaktionen von LPS aus Gram-negativen Bakterien als Sepsis-auslösendes Agens und dem Leitpeptid LPep19-2.5 ab. Die Erkenntnisse aus der Wirkungsweise des Peptids LPep19-2.5 mit LPS sollten im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz gegen eine durch Gram-negative Bakterien induzierte Sepsis überprüft werden.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit umfassen einen wichtigen Teil der präklinischen Phase zur Entwicklung eines neuen und innovativen Therapieansatzes bei der Behandlung von Sepsis mit einem synthetischen anti-LPS Peptid (SALP).

Die Methoden zur Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehungen von Bakterien, LPS, Membranbestandteilen von humanen Zellen und Bakterien mit dem Leitpeptid umfassten Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM), Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR), Kleinwinkel-Röntgenstreuung (*Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) und Elektronenmikroskopie (EM) in Kombination mit Gefrierbruchtechniken.

Bindungsstudien von LPS mit dem antimikrobiellen Peptid LPep19-2.5 wurden mittels Isothermer Titrations Kalorimetrie (ITC) durchgeführt. Das Einbauverhalten in Lipidvesikel sowie in LPS-Aggregate wurde mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) untersucht.

Die mit biophysikalischen Methoden gewonnen Daten sind mit biologischen Daten zur Klärung der antibakteriellen Wirkung aus Antibakteriellen Assays zur MIC-Wert Bestimmung (*Minimal Inhibitory Concentration*) und Keimzahlbestimmungen (*Colony Forming Units*) korreliert worden. Die Fähigkeit zur Neutralisation von durch LPS induzierte Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in mononukleären Zellen (MNC) ist mit ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-TNF- α -Tests untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist außerdem in Zusammenarbeit mit der Pathologie des Forschungszentrum Borstel ein *ex vivo*-Lungenmodell zur Untersuchung der LPS-neutralisierenden Wirkung von LPep19-2.5 (Aspidasept®) in humanem Lungengewebe etabliert bzw. weiterentwickelt worden. Anhand dieses Modells ist es gelungen, bereits in der präklinischen Phase erste Ergebnisse in menschlichem Gewebe zu analysieren und die durch biophysikalische Methoden, die zumeist auf vereinfachten Modellen basieren, erhobenen Daten auf das komplexe humane System zu übertragen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Bakterielle Infektionen finden in und an Geweben statt. Bakterien interagieren zunächst mit Epithelien und können nachfolgend andere Gewebetypen infiltrieren und zur Inflammation bringen. Der erste Kontakt findet zwischen den Komponenten bakterieller und eukaryotischer Membranen statt.

Bei diesem Kontakt sind seitens der Gram-negativen Bakterien Lipopolysaccharide der äußeren bakteriellen Membran und auf der eukaryotischen Seite Lipide, insbesondere Phospholipide, aber auch Sphingolipide sowie Cholesterol beteiligt.

Die Wechselwirkung dieser Komponenten auf molekularer Ebene führen über eine Aktivierung der Immunzellen durch spezielle Rezeptoren, etwa *Toll-like Receptor 4* (TLR-4) bei LPS, zu einer Immunantwort. Diese kann lokal begrenzt sein, also eine lokale Entzündung auslösen. Sie ist durch die bereits oben angeführten klassischen Entzündungszeichen *calor*, *rubor*, *tumor*, *dolor* und *functio laesa* gekennzeichnet.

Bei einer systemischen Inflammation, wie bei einer Sepsis, ist eine überschießende Reaktion des Immunsystems und deren Immunzellen im Wesentlichen verantwortlich. Die Inflammation bzw. deren Auswirkungen wirken auf den gesamten Organismus.

Die bisherige Therapie der Sepsis basiert auf der Gabe von Antibiotika und die damit einhergehende Eindämmung (bakteriostatische Antibiotika) bzw. Abtötung (bakterizide Antibiotika) von Bakterien sowie die chirurgische Entfernung von betroffenen Geweben. In der Klinik wird von der „Sanierung des bakteriellen Herdes“ gesprochen [114, 115]. Die schnelle und eindeutige Diagnose einer Sepsis ist von eminenter Bedeutung für die sich anschließende Therapie und stellt somit die Weichen für eine kalkulierte Antibiotikatherapie. Der Faktor „Zeit“ spielt dabei für den betroffenen Patienten eine relevante Rolle, da jede Verzögerung des Beginns der antibiotischen Therapie mit einer Verschlechterung der Überlebenschance bei Sepsis einhergeht. Eine in den Vereinigten Staaten von Amerika und Kanada retrospektiv durchgeführte Studie im Jahr 2006, die die Bedeutung eines unverzüglichen Therapiebeginns in Abhängigkeit vom Therapiebeginn mit dem optimalen Antibiotikum untersucht hatte, zeigte auf, daß die Letalität von Intensivpatienten mit septischem Schock im Mittel um 7 % pro Stunde bei verzögertem Therapiebeginn erhöht war.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß ein Therapiebeginn später als 24 bis 48 Stunden in der Regel nicht mehr effektiv ist [80].

Bei Verdacht auf eine Sepsis wird nach Entnehmen einer Blutkultur mit der Gabe eines Breitbandantibiotikums die Therapie der Sepsis initiiert, um die Infektion und die begleitenden Symptome abzumildern sowie die vorliegenden Keime mittels mikrobiologischer Techniken durch Blutkulturen einzugrenzen bzw. genau zu bestimmen. Die Ergebnisse des Antibiotogramms, aus denen Sensibilität oder Resistenz der Keime auf Antibiotika abgelesen werden können, liegen nach etwa 48 Stunden vor. Das Antibiotogramm gibt dem Kliniker Empfehlungen zur weiteren speziellen antibiotischen Therapie. Somit stellt die schnelle und sichere Keimidentifizierung durch mikrobiologische Techniken auf der diagnostischen Seite ein wichtiges Problem dar. Dieses Zeitfenster konnte bislang nicht durch Innovationen in der Mikrobiologie verkürzt werden. Seit Ende der 1990er Jahre konnte mit dem Blutparameter Procalcitonin (PCT) ein neuer Parameter zur Überwachung des Erfolgs der antibiotischen Therapie bei Sepsis etabliert werden. Inwieweit der PCT-Wert auch diagnostisch zur sicheren Erstdiagnose von Sepsis beiträgt, wird gegenwärtig noch in verschiedenen Studien überprüft, obschon PCT in der klinisch-diagnostischen Routine in vielen Krankenhäusern neben C-reaktivem Protein (CRP) und Leukozytenzahl als Entzündungsparameter bestimmt wird [72, 84, 128].

Die Zerstörung Gram-negativer Bakterien durch die Anwendung von Antibiotika kann zu einer Freisetzung von Lipopolysacchariden aus der Bakterienmembran in die freie Blutbahn führen. Das freie, in der Blutbahn zirkulierende LPS, wird als Endotoxin bezeichnet. Je nach Schweregrad der bakteriellen Infektion und dem Ausmaß der beteiligten infizierten Gewebe kann bei antibiotischer Therapie ein Zytokinsturm (pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6) durch das massive Auftreten von LPS verursacht werden und nachfolgend eine Sepsis auslösen. Abhängig von der körperlichen Konstitution der Betroffenen und deren Morbidität kann die Sepsis einen fulminanten und schwer beherrschbaren Verlauf annehmen.

Seit den 1990er Jahren stehen antimikrobielle Peptide (AMP) im Fokus der Wirkstoffforschung zur Behandlung bzw. Bekämpfung von bakteriellen Infektionen und Sepsis. Antimikrobielle Peptide können damit eine neue Substanzklasse bilden, die, abhängig von ihrer chemischen Struktur und natürlichen Herkunft, unterschiedliche Wirkungsweisen entfalten können.

In dieser Arbeit wurde die direkte Wirkung der AMP aus der LPep-Gruppe auf Bakterien im Sinne einer bakteriziden Wirkung durch Destabilisierung der bakteriellen Membran (Abbildung 2, (1)), die Interaktion mit dem Endotoxin LPS aus der Membran Gram-negativer Bakterien durch Bindung des LPS oder durch Verändern seiner supramolekularen Struktur (Abbildung 2, (2)) sowie die Wirkung auf Sphingomyelin und Cholesterol-reiche Lipid-domänen, den sogenannten „*lipid rafts*“, in denen Signalproteine der Infektabwehr lokalisiert sind [134, 136, 142, 145], untersucht (Abbildung 2, (3)). Die Wirkungen der AMP auf diesen Ebenen könnten allein oder in allen drei beschriebenen Ebenen zu einer klinischen Verbesserung bei einer diagnostizierten Sepsis beitragen.

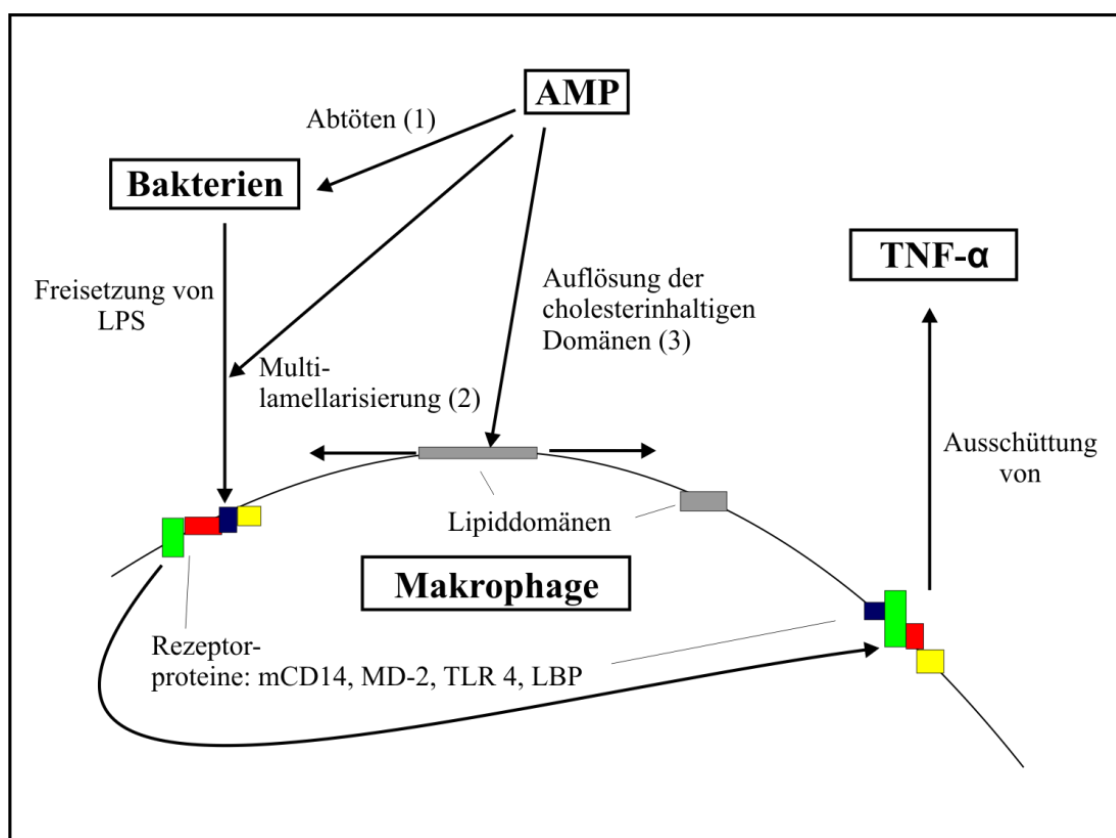


Abbildung 2: Vermutete Wirkungsweisen und Wirkorte von antimikrobiellen Peptiden.

Zur effektiven Bekämpfung eines septischen Syndroms bzw. einer voll ausgeprägten Sepsis erscheint es notwendig, eine wirksame bakterizide Wirkung in Form von klassischen Antibiotika mit einer ebenso effektiven LPS-neutralisierenden Wirkung zu kombinieren.

Die effektivere kombinierte Behandlung von bakterizider und LPS-neutralisierender Wirkung könnte zusätzlich zu einer Reduktion des weit verbreiteten Einsatzes von klassischen Antibiotika führen und somit die Ausbildung von Resistenzen von Bakterien gegen Antibiotika verlangsamen.

2.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM (*INNATE IMMUNITY*)

Das Immunsystem gliedert sich in das angeborene und adaptive Immunsystem (siehe Kapitel 1). Antimikrobielle Peptide, etwa die humanen Defensine, sind ein Teil der angeborenen Immunität. Die in dieser Arbeit untersuchten, synthetisch hergestellten, antimikrobiellen Peptide wirken besonders mit Anteilen der angeborenen Immunität, die den Menschen von Geburt an mit effektiven Schutzmechanismen ausstatten. Im Folgenden sollen die Anteile der angeborenen Immunität genauer auf ihre Funktion und Wirkungsweise hin beschrieben werden.

Das angeborene Immunsystem besteht aus einem zellulären und einem humoralen Anteil. Das zelluläre Element des angeborenen Immunsystems beinhaltet neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Makrophagen sowie Monozyten.

Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten internalisieren Krankheitserreger über Phagozytose. Die in Phagolysosomen aufgenommenen Krankheitserreger werden durch proteolytische, glykolytische und lipolytische Enzyme sowie Nukleasen abgebaut. Bestandteile von Bakterien können, über die Bindung an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) und den Einbau des Komplexes aus Antigen und MHC-Molekül in die Zellmembran der Makrophagen, T-Zellen des adaptiven spezifischen Immunsystems über spezielle T-Zell-Rezeptoren aktivieren. Das angeborene Immunsystem ist hierbei über das Zusammenspiel von Makrophagen und den T-Zellen mit dem adaptiven Immunsystem verknüpft.

Fremdproteine in Geweben werden von dendritischen Zellen phagozytiert und wandern in den nächstgelegenen Lymphknoten mit dem Ziel, die antigenen Proteinfragmente geeigneten T-Zellen zu präsentieren.

Neutrophile Granulozyten sezernieren eine Vielzahl von Enzymen, die Bakterien abtöten und Kollagen abbauen. Zu den Enzymen zählen Lysozym, saure Phosphatasen, saure Proteasen und Kollagenasen. Neutrophile Granulozyten sind über Expression von NADPH-abhängiger Oxidase außerdem in der Lage, stark toxische Sauerstoffradikale zu bilden, die bakterielle Membranen schädigen. Die Sekretion von Kollagenasen erleichtert Immunzellen die Wanderung im Gewebe zum Ort der Infektion. Als Eiter werden Trümmer neutrophiler Granulozyten, Bakterien und des infizierten Gewebes bezeichnet.

Die Werkzeuge der eosinophilen Granulozyten, die toxisch auf Parasiten, insbesondere Würmer, wirken, sind eosinophile, kationische Proteine wie das *major basic protein* sowie das eosinophile Protein X. Sie werden aus intrazellulären Speichergranula sezerniert. Die Leukotriene C4 und D4 werden in besonderem Maße von eosinophilen Granulozyten gebildet.

Basophile Granulozyten sezernieren die gefäßaktiven Substanzen Histamin und Serotonin, die im Wesentlichen eine Gefäßdilatation bewirken und damit das vermehrte Einwandern von Immunzellen zur Folge hat.

Das humorale System der angeborenen Immunität besteht aus Zytokinen, Interferonen und dem Komplementsystem.

Unter den Zytokinen sind Histamine und Eikosanoide, etwa Leukotriene und Prostaglandine, Interleukin 1 (IL-1) sowie Tumor Nekrose Faktor α von großer Bedeutung. Leukotrien B4 und Histamin erhöhen die Gefäßpermeabilität für andere Immunzellen und locken aktiv diese an. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet. IL-1 wird von mononukleären Zellen sezerniert und steigert unter anderem die Expression von Adhäsionsproteinen auf Endothelzellen. Die systemische Wirkung von IL-1 ist die Induktion von Fieber. Das Zytokin TNF- α wird in erster Linie von Makrophagen gebildet und sezerniert. Es nimmt vor allem bei bakteriellen Infektionen eine zentrale Rolle ein, durch die Stimulation von Makrophagen und Monozyten, die Verstärkung der Proliferation von B-Zellen, die Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die Modulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 und die Erzeugung von Fieber. Die Wirkung auf B-Zellen stellt hier eine Verbindung zum adaptiven, spezifischen Immunsystem her. Interferone verzahnen das humorale angeborene Immunsystem mit dem adaptiven System über die Expression von MHC-I-Molekülen und direkt über Interferon γ , welches von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) und T-Zellen produziert wird. Das Komplementsystem ist direkt durch die Interaktion von Antikörpern mit Proteinen der Komplementkaskade mit dem adaptiven Immunsystem verbunden.

2.1.1 DIE MEMBRAN VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Membranen schaffen für alle lebenden Organismen klar von der Umwelt abgetrennte definierte Räume, die ihnen ermöglichen, ihre komplexen Lebensvorgänge in einer hoch geordneten Form und von der Umwelt ungehindert stattfinden zu lassen.

Eukaryotische Zellen verfügen über eine Zellmembran oder auch als Plasmamembran bezeichnete Umhüllung mit einer Dicke von etwa 5 nm. Die Grundstruktur, die allen zellulären Membranen zu Grunde liegt, ist eine Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen. Sie wird durch amphiphile Lipide, speziell Phosphoglyceride und Sphingolipide, ausgebildet, wobei sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Fettsäurereste der amphiphilen Lipide gegeneinander orientieren und die hydrophilen Teile der amphiphilen Lipide sich zu den wässrigen Phasen des Extrazellularraumes und zum Zytosol hin ausrichten. Am Membranaufbau sind unter den Phosphoglyceriden das Phosphatidylcholin, das Phosphatidylethanolamin, das Phosphatidylserin und das Phosphatidylinositol beteiligt. Unter den Sphingolipiden sind Sphingomyelin, Cerebroside, Sulfatide und Ganglioside am Membranaufbau beteiligt. Ferner ist das Cholesterin ein essentieller Membranbestandteil von eukaryotischen Zellmembranen mit Ausnahme der inneren Mitochondrienmembran.

Die Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Membran ist sehr unterschiedlich und vom jeweiligen Zelltyp abhängig. Während Cholesterin in beiden Schichten vorkommt, finden sich Glykolipide nur in der äußeren Membran.

Die Zellmembran fungiert nicht nur als starre Barriere zwischen dem Zellinneren und der Außenwelt, sondern erfüllt eine steuernde bzw. dirigierende Aufgabe für die Passage von Molekülen. Dieser gerichtete Transport von Stoffen in die Zelle bzw. aus der Zelle hinaus wird über Membranproteine ermöglicht. Diese können entweder als integrale oder periphere Membranproteine in der Membran vorkommen. Periphere Membranproteine liegen an nur einer Seite der Membran an. Sie sind mit der Membran über sogenannte Membrananker, etwa Fettsäure- oder Prenylreste, assoziiert. Integrale Membranproteine durchspannen die gesamte Membran, wobei α -helikale Bereiche mit überwiegend hydrophoben Aminosäuren, den sogenannten Transmembrandomänen, mit den hydrophoben Acylketten der Membranlipide assoziiert sind. Der gerichtete Transport von Stoffen, etwa Ionen, niedermolekulare Verbindungen wie Glukose und Aminosäuren und größerer Moleküle wie Proteine, erfolgt über Membranporen, Membrankanäle, Membrantransportproteine oder *carrier* oder Membranvesikel. Für Wassermoleküle, gelöste Gase wie Sauerstoff, Kohlendioxid und Ammoniak sowie kleinere polare Moleküle wie Ethanol und Harnstoff ist die Lipiddoppelschicht bis zu einem gewissen Grad permeabel.

Außer der lebensnotwendigen Funktion des Stoffaustausches zwischen dem Zellinneren und -äußeren nehmen Membranproteine auch andere Funktionen ein:

- Sie fungieren als Rezeptoren für extrazelluläre Signale und wandeln diese in intrazelluläre Signale um (Signaltransduktion).
- Sie sind an Zell-Zell-Kontakten beteiligt, die die Ausbildung von Zellverbänden, Geweben oder Organen ermöglichen.
- Sie sind Teil eines Systems zur Selbstidentifikation gegenüber Immunzellen.

2.2 BAKTERIEN

Der Mikrobiologe und Evolutionsbiologe Carl R. Woese stellte mit Otto Kandler im Jahr 1990 das Domänen-Modell zur Klassifizierung von Organismen basierend auf ihre RNA (Ribonukleinsäure) vor. Danach wird „die Welt des Lebendigen“ in drei Domänen gegliedert [74]:

- i. *Bacteria*
- ii. *Archaea*
- iii. *Eucarya*.

Die einzelnen Domänen werden darüber hinaus in mehrere Reiche unterteilt. Zur Domäne der *Archaea* gehören Lebewesen, die in extremen Umweltbereichen leben. Bislang konnten etwa 250 Arten in dieser Domäne zusammengefasst werden. Sie können in thermophile und hyperthermophile sowie in halophile und methanbildende Mikroorganismen gegliedert werden. Die Domäne der *Eucarya* beschreibt Lebewesen, die einen echten Zellkern aufweisen. Die Reiche der Tiere (*Animales*) und der Pflanzen (*Plantales*) sind Teil dieser Domäne. Zu den Mikroorganismen, die pathogen wirken können, werden neben Pilzen auch Protozoen gezählt sowie im Reich der Tiere Helminthen und Arthropoden [74].

Archaea und *Eucarya* stehen nicht im Fokus dieser Arbeit und werden im Folgenden auch nicht weiter beschrieben. Sie wurden jedoch aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt.

Die Domäne der Bakterien kann weiter in die Reiche der chemosynthetischen Eubakterien und photosynthetischen Zyanobakterien differenziert werden. Humanpathogene Bakterien werden dem Reich der chemosynthetischen Eubakterien zugeschrieben. Klassische Bakterien sind einzellige Mikroorganismen, die im Vergleich zu Eukaryonten über keinen Zellkern verfügen. Sie werden auch als Prokaryonten bezeichnet. Ihre Vermehrung vollzieht sich ungeschlechtlich über einfache Querteilung [74].

Als ein wichtiges Kennzeichen zur Unterscheidung tragen Bakterien ihre stark verknäuelte Doppelstrang-DNA im Zytoplasma, dem sogenannten Nukleoid oder Kernäquivalent, welches nicht von einer Membran umschlossen wird. Sie können auch über andere genetische Strukturen verfügen, den sogenannten Plasmiden. In humanpathogenen Bakterien sind sie die Träger für Virulenz- und Resistenzgene, die den Phänotyp der Bakterien bestimmen.

Ein weiteres wichtiges Kennzeichen von Bakterien ist ihre starre Zellwand, die das bakterielle Zytoplasma von der Umwelt trennt. Sie dient der Aufrechterhaltung der Nähr- und Salzkonzentration, des osmotischen Druckes und des elektrischen Membranpotentials. Mit Hilfe einer Differenzierungsfärbung, etwa durch die Gram-Färbung, kann die bakterielle Zellmembran auch als ein Unterscheidungsmerkmal von verschiedenen Bakterien dienen (siehe Kapitel 2.2.1).

Die Morphologie von Bakterien, die lichtmikroskopisch betrachtet werden kann, lässt eine Einteilung nach der äußeren Erscheinung zu. So lassen sich Kokken von Bazillen und Spirochäten unterscheiden und weiter differenzieren (Abbildung 3).

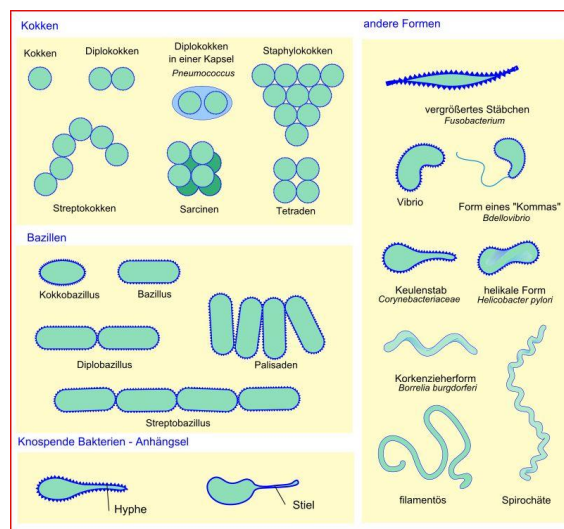


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Morphologie von Bakterien.

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Morphologie_bei_Bakterien.svg [Tag des Zugriffs: 27.11.2012])

In dieser Arbeit konnte die Morphologie von Gram-negativen Bakterien bzw. die Veränderung ihrer äußeren Membran durch den Einsatz antimikrobieller Peptide taktil mittels Rasterkraftmikroskopie erfasst werden. Die als Höhenprofile erhaltenen Bilder konnten zusätzlich als drei-dimensionale Bilder durch eine Software dargestellt werden.

2.2.1 DIE MEMBRAN GRAM-NEGATIVER UND GRAM-POSITIVER BAKTERIEN

Die taxonomische Gruppe der Gram-negativen Bakterien geht auf einen Färbetest des Pharmakologen Hans-Christian Gram zurück. Das zunächst in der dünnen Mureinschicht zwischen der inneren und äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien eingelagerte Kristallviolett kann mit Alkohol ausgewaschen werden. Eine Gegenfärbung mit Karbol-fuchsin führt bei Gram-negativen Bakterien zu einer unter dem Lichtmikroskop sichtbaren roten Färbung. Bei Gram-positiven Bakterien verbleibt der Farbstoff Kristallviolett in der Membran. Sie erscheinen unter dem Lichtmikroskop dunkelblau.

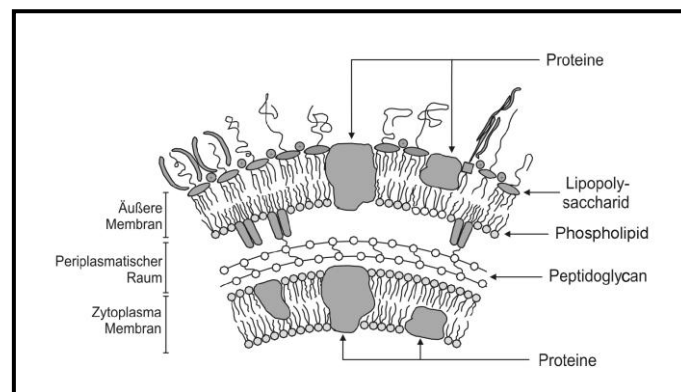


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellhülle Gram-negativer Bakterien.

Der periplasmatische Raum trennt die Zytoplasmamembran von der äußeren Membran; die Mureinschicht (Peptidoglykan) befindet sich im periplasmatischen Raum.

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien (Abbildung 4) besteht aus einer innen liegenden Zytoplasmamembran und einer äußeren Membran sowie dem periplasmatischen Raum, der sich zwischen der äußeren und inneren Membran befindet. Im periplasmatischen Raum bildet ein Geflecht aus verzweigten Peptidoglykanmolekülen eine dünne Mureinschicht (etwa 2 nm) aus. Die innen liegende Zytoplasmamembran besteht aus zwei Monoschichten bzw. aus einem inneren und äußeren Blatt, die aus Glycerophospholipiden aufgebaut ist. Die äußere Membran besteht ebenfalls aus einer Doppelschicht, dem inneren und äußeren Blatt, die sich jedoch in ihrer Zusammensetzung von der inneren Membran unterscheidet. Das innere Blatt der äußeren Membran wird aus einem Glycerophospholipidgemisch gebildet, während das äußere Blatt dieser Membran überwiegend aus Glykolipiden, in der Regel aus Lipopolysacchariden, besteht. Sie stellen die äußerste Struktureinheit der bakteriellen Membran dar und sind damit die erste Barriere für Therapeutika, die ihre Zielstrukturen im Zellinneren der Bakterien haben bzw. ist ein Angriffsziel für Antibiotika oder antimikrobielle Peptide, die die Desintegration dieser Membran zum Ziel haben.

In die äußere Membran sind zahlreiche Proteine eingelagert wie Permeasen, Proteine der Sekretionssysteme und Sensorproteine. Die Gesamtheit aller Membranproteine trägt fast zur Hälfte der Masse der äußeren Membran bei. In der äußeren Schicht befindliche Proteine werden als Omps (*outer membrane proteins*) oder als Momps (*major Omps*) bezeichnet. Die äußere Membran ist über das Murein-Lipoprotein sowie durch das OmpA mit dem Mureinnetz verknüpft. In die äußere Membran eingelagert sind unspezifische Porine, die wassergefüllte Kanäle bilden. Diese sind nach dem *Fluid-Mosaic*-Modell (mit Erweiterung der dynamischen Struktur ein noch heute gültiges Modell) [138, 149] als periphere oder integrale Bestandteile in die Lipidmatrix eingebettet. Hydrophile niedermolekulare Substanzen können durch Porine in den periplasmatischen Raum diffundieren. Auf diesem Weg ist ein Nährstoffaustausch möglich [102]. Niedermolekulare Antibiotika, etwa das Penicillin, können ebenfalls durch diesen Transportweg in die Bakterienzelle gelangen. Größere Moleküle mit einer Größe > 600 Da müssen sich anderer Mechanismen bedienen, etwa durch Transportproteine.

Die bakteriellen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit einem Stamm von *E. coli* und Vertretern von *Salmonella* und deren Lipopolysacchariden vollzogen.

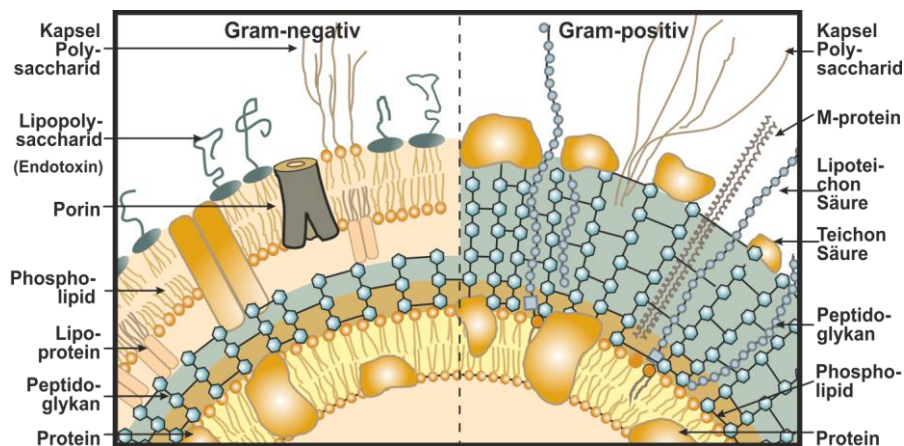


Abbildung 5: Vergleich der Membranstruktur eines Gram-negativen Bakteriums (linke Bildhälfte) zu der Membranstruktur eines Gram-positiven Bakteriums (rechte Bildhälfte).

Gram-positive Bakterien wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sollen aber an dieser Stelle kurz Erwähnung finden.

Der wesentliche Unterschied zu Gram-negativen Bakterien ist die prominente Mureinschicht der Gram-positiven Bakterien. Ihr Mureinnetz kann bis zu 40 Schichten dick sein mit einer Schichtdicke von 15-80 nm und etwa 30 % der Trockenmasse der Zellwand einnehmen. Gram-positive Bakterien verfügen über keine äußere Doppelmembran. Die innere Membran

bzw. Zytoplasmamembran fungiert als Fundament oder Anker für Membran-Lipoteichonsäure, während Zellwand-Teichonsäuren mit dem Murein kovalent verbunden sind. Zahlreiche andere über das Mureingeflecht hinausragende Proteine sind mit einer Zellwandanker-Region kovalent mit dem Peptidanteil des Mureins verknüpft.

Während Forschungen der letzten Jahrzehnte mit Gram-negativen Bakterien den Zusammenhang von LPS sowie dessen Lipid A-Teils und der Stimulans von Immunzellen über TLR-4/MD-2 Rezeptorkomplexe aufgeklärt haben, vermutete die Wissenschaft, daß im Falle von Gram-positiven Bakterien die Lipoteichonsäuren das Immunsystem-aktivierende Agens sind. Neuere Forschungen gehen von Lipoproteinen statt Lipoteichonsäuren als Immunsystem-aktivierendes Agens aus [35].

Unter den klinisch relevanten Gram-positiven Bakterien sind der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) von großer medizinischer Bedeutung. Aus den in Abbildung 6 gezeigten Daten läßt sich die Prävalenz von invasiven MRSA-Isolaten in Europa ablesen und vergleichen. Demnach weist Südeuropa, etwa Portugal, Italien, Griechenland und Zypern sowie in Osteuropa Rumänien, Ungarn und die Slowakei eine erhöhte Resistenz (über 25 %) von MRSA auf.

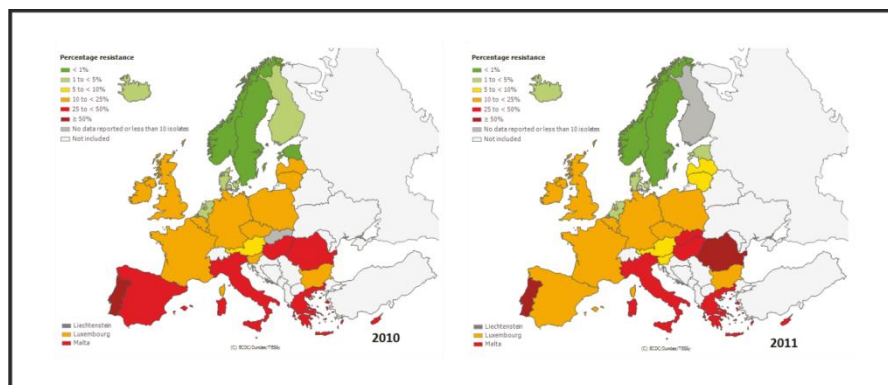


Abbildung 6: Prävalenz der Methicillinresistenz bei invasiven Isolaten von *Staphylococcus aureus* (MRSA) 2010 (linke Bildhälfte) und 2011 (rechte Bildhälfte) aus EARSS Annual Report European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

(<http://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/EARS-Net-summary-antibiotic-resistance.pdf> [Tag des Zugriffs: 11.01.2013])

2.3 FLUIDITÄT IN MEMBRANEN-PHASENVERHALTEN VON MEMBRANEN

Rekonstituierte und natürliche Membranen sind gekennzeichnet durch den Parameter der Fluidität. Die Fluidität wird bestimmt durch den Phasenzustand, den die Kohlenstoffketten

einer Lipiddoppelschicht bzw. einer Lipidmonoschicht bei bestimmten Bedingungen einnehmen. Biologische Membranen können in zwei Zuständen oder Phasen vorliegen.

Die starre und geordnete Phase von Lipidsystemen wird als Gel- oder β -Phase (rigide Phase) (L_β) bezeichnet. Die Phase mit höherer Flexibilität der Lipidmoleküle untereinander wird als α -Phase (L_α) oder flüssigkristalline Phase (fluide Phase) bezeichnet.

Im *Monolayer* entsprechen diese der *Liquid-Condensed* (LC) (Abbildung 7, Bild A) und *Liquid-Expanded* (LE) Phase (Abbildung 7, Bild B). Der Übergang zwischen beiden Phasen wird bestimmt durch die Temperatur, dem lateralen Druck, der Struktur der Kopfgruppe, sowie der Fettsäureverteilung und deren Sättigungsverteilung sowie Sättigungsgrad. Der pH-Wert und die Ionenkonzentration des umgebenden Mediums nehmen ebenso einen Einfluß auf den Übergang hinsichtlich seiner Lage und Schärfe. Lipidmischungen aus verschiedenen Lipiden mit unterschiedlichen Phasenumwandlungstemperaturen führen zu einer Separation der einzelnen Komponenten.

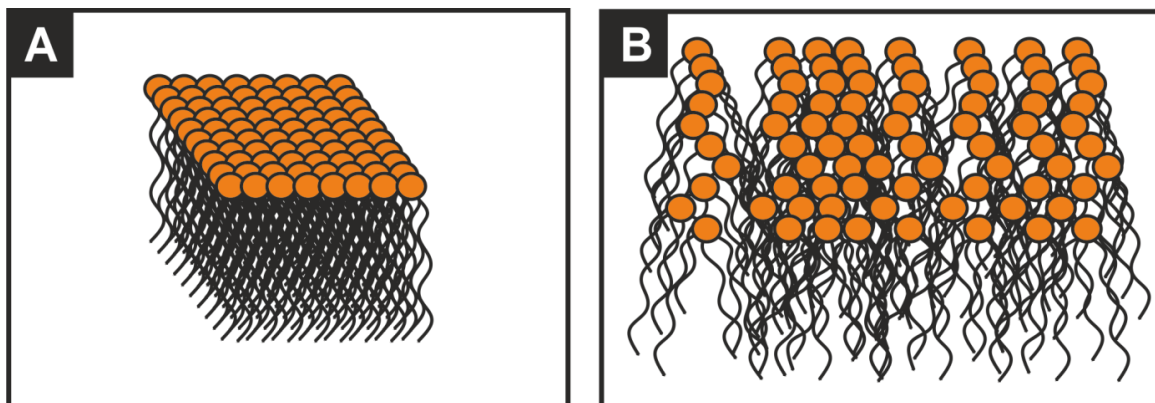


Abbildung 7: Platzbedarf von Lipidmolekülen in Abhängigkeit ihres Phasenverhaltens.

Schematische Darstellung einer rigiden, straffen und hoch geordneten Anordnung der Phospholipidmoleküle in einer Lipidmonoschicht mit geringem Platzbedarf (A) im Vergleich zu einer fluiden und aufgelockerten Lipidmonoschicht mit größerem Platzbedarf (B).

Antimikrobielle Peptide können die Phasenumwandlungstemperatur von LPS-Aggregaten oder Lipidsystemen erheblich durch die Wechselwirkungen von AMP mit den Acylketten von LPS- und Lipidmolekülen beeinflussen. AMP können dadurch eine fluidisierende oder rigidisierende Wirkung auf Membranen entfalten und somit auf ihre Membranstabilität einwirken. Eine fluide Membran ist in sich flexibler als eine rigide, steife Membran. Die Wirkung von AMP auf den Phasenübergang von Lipiden läßt sich durch die Messung der symmetrischen Methylen-Streckschwingung ν_s mittels Infrarotspektroskopie bestimmen.

2.4 PHOSPHOLIPIDE

Biologische Membranen bestehen aus Lipiddoppelschichten. Neben Glycerophospholipiden stellen auch Sphingolipide und Cholesterol wesentliche Bestandteile einer humanen Membran. Cholesterol hat aufgrund seiner chemischen Struktur eine stabilisierende Wirkung auf die Membran.

Glycerophospholipide, auch als Phospholipide oder Membranlipide bezeichnet, sind amphipatisch und verfügen über zwei Fettsäuren, die den hydrophoben Bereich kennzeichnen und die mit dem ersten und zweiten Kohlenstoffatom eines Glycerins verestert sind. Über eine Phosphodiesterbindung sind polare oder geladene Kopfgruppen an das dritte Kohlenstoffatom des Glycerins gekoppelt.

Die unterschiedliche Ladung der Kopfgruppe, die am C3-Kohlenstoff über eine Phosphodiesterbindung kovalent verknüpft ist, beeinflusst die Oberflächeneigenschaften von Membranen.

Der hydrophobe Fettsäureanteil der Glycerophospholipide kann durch unterschiedliche Fettsäuren sehr variabel sein. Für unterschiedliche gesunde Gewebetypen kann die Variabilität der Fettsäuren charakteristisch sein. Sie können einerseits spezifisch für unterschiedliche Organismen und unterschiedliche Gewebe desselben Organismus sein und andererseits können sie spezifisch für unterschiedliche Phospholipide derselben Zelle oder desselben Gewebes sein. Im Allgemeinen tragen Glycerophospholipide am C-1 Atom eine gesättigte C₁₆-oder C₁₈-Fettsäure und am C-2 Atom eine ungesättigte C₁₈-bis C₂₀-Fettsäure [100].

Das Glycerophospholipid PC, das in dieser Arbeit für die Herstellung von Modellsystemen Anwendung findet, kommt in der Zytoplasmamembran von *E. coli* nicht und in der humanen Zellmembran zu einem großen Anteil vor. Den größten Anteil an Glycerophospholipiden in humanen Zellmembranen nimmt das Phosphatidylcholin ein [23]. In humanen Erythrozyten liegt dieser Anteil bei 57 Mol% [157]. Einen sehr geringen Anteil, vorwiegend auf der inneren Membran, nimmt das negativ geladene Phosphatidylserin ein.

In tumorös veränderten Zellen kommt PS in höheren Konzentrationen auf der äußeren Membran vor [23].

Die Phospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) sind neben LPS die Hauptbestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Für PE ergibt

sich eine Nettoladung von 0 e_0 und von -1 e_0 bei PG bei neutralem pH. Der Anteil von PE in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien beträgt 81 Mol% und für PG 17 Mol% [53].

2.5 LIPOPOLYSACCHARIDE

Lipopolysaccharide (LPS) bilden das Hauptmerkmal der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Sie sind die Hauptziele für Antikörper des Immunsystems von Vertebraten und bilden eine wichtige Determinante für den Serotyp von Bakterienstämmen [100].

Die Lipopolysaccharide weisen im Allgemeinen drei Regionen auf, die aus unterschiedlichen Komponenten bestehen (Abbildung 8). Einer als Lipid A bezeichneten Lipidregion folgt eine Kernregion mit einem Oligosaccharid sowie eine O-spezifische Seitenkette, welche die Hauptdeterminante des Serotyps des Bakteriums darstellt und aus einer Vielzahl von sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten und einem Polysaccharidkern besteht.

Bei einer chemischen Betrachtungsweise kann LPS in ein Polysaccharid und in ein Phospholipid unterschieden werden. Wird die endotoxische Aktivität *in vivo* nach Pyrogenität und Letalität unterschieden, so lassen sich eine entbehrliche, O-spezifische Seitenkette und Kernregion, und ein essentieller Teil, Lipid A, beschreiben.

Der essentielle Teil des LPS, das Lipid A, ist durch Acylketten in der Bakterienmembran verankert. Es besteht im Allgemeinen aus vier gesättigten 3-Hydroxy-Fettsäureketten mit einer Kettenlänge von 12 bis 14 Kohlenstoffatomen, die mit bis zu drei weiteren gesättigten Fettsäureketten verestert sein können. Das Lipid A verfügt demnach über vier bis sieben Fettsäureketten. Über eine Ester-und / oder Amidbindung sind die vier Fettsäureketten an das Lipid A Rückgrat, einem Disaccharid, gekoppelt [118, 164].

Die Struktur des Lipid A ist bei verschiedenen Gram-negativen Bakterien sehr ähnlich. Das Lipid A stellt die minimale Struktur dar, die notwendig ist, um das Immunsystem zu aktivieren und eine Entzündungsreaktion auszulösen. Sie stellt das sogenannte „*endotoxische Wirkprinzip*“ dar [118, 130, 164].

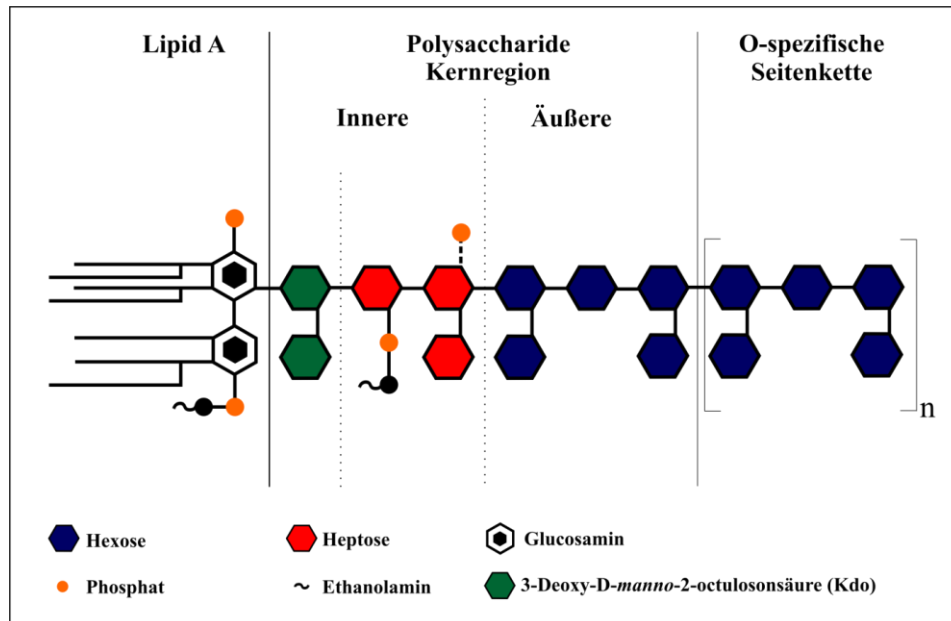


Abbildung 8: Prinzipielle chemische Struktur eines LPS-Moleküls Gram-negativer Bakterien und Kennzeichnung der Regionen.

Das Disaccharid des Lipid A besteht aus zwei N-Acetyl-Glucosaminen, die über eine β (1→6) glykosidische Bindung miteinander verknüpft und an den Positionen 1 und 4' phosphoryliert sind [164].

Die Kernregion des LPS kann in eine äußere und eine innere Region unterschieden werden. Der Hauptanteil des inneren Teils wird überwiegend aus D- oder L-Glycero-D-manno-Heptosen und 3-Deoxy-D-manno-Oct-2-Ulonsäure gebildet. Der äußere Teil besteht hauptsächlich aus Hexosen wie D-Galactose, D-Glucose und N-Acetyl-D-Glucosamin.

Die O-spezifische Kette ist variabel und setzt sich aus bis zu 40 sich wiederholenden Glycosylresten zusammen. Sie ist stammspezifisch und wird auch als O-Antigen bezeichnet [75].

2.5.1 LIPOPOLYSACCHARIDE ALS IMMUNSTIMULANZ

Das aus der zerstörten Membran von Gram-negativen Bakterien (auch durch Zellteilung freigesetztes LPS) in die Blutbahn abgegebene Lipopolysaccharid aktiviert Zellen des Immunsystems, vorwiegend Monozyten und Makrophagen, bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (< 1 ng/ml im Serum) [71].

Makrophagen und Monozyten setzen nach Kontakt mit dem Endotoxin eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Zytokinen und Mediatoren frei (Tumor-Nekrose-Faktor α , Interleukine 1, 6, 8, 10 und 12, Thromboxan, Leukotriene, plättchenaktivierender Faktor, Superoxidanion

und Stickstoffmonoxid), die bei einer niedrigen Konzentration von LPS zu einer sinnvollen Aktivierung des Immunsystems führen. Bei sehr hohen Endotoxinkonzentrationen kommt es zu einer übermäßigen Produktion von Zytokinen und Entzündungsmediatoren, die als „Zytokinsturm“ bezeichnet wird. Die dadurch folgende Schädigung von Organen im septischen Schock und das Versagen von Organen (Multiorganversagen) können über einen lebensbedrohlichen Zustand zum Tod führen.

Der molekulare Mechanismus zur Mediatorinduktion durch LPS konnte vollständig aufgeklärt werden. Komponenten dieser Kaskade stehen deshalb im Fokus von therapeutischen Ansätzen zur Vermeidung eines Zytokinsturms.

LPS interagiert mit einem spezifischen LPS bindenden Serumprotein, dem LBP, welches durch Verhinderung der LPS-Aggregation die Wirkung von LPS um ein Vielfaches von 100 verstärkt. Über das in der äußeren Membran von Makrophagen und Monozyten verankerte bzw. membrangebundene mCD14 (*membrane bound Cluster of Differentiation 14*) und dem benachbarten, für LPS spezifischen, TLR-4 Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, die dem Signalweg des Interleukin-1-Systems ähnelt. Die intrazellulär liegende Adaptordomäne TIR (*Toll/IL-1-Receptor-Domain*) des TLR-4 Rezeptors findet sich mit dem zytosolischen Adaptorprotein MyD88 und der Serinkinase IRAK (*IL-1-Receptor-Associated Kinase*) zu einem Signalproteinkomplex zusammen. Die dadurch aktivierte IRAK dissoziiert und interagiert mit TRAF6 (*TNF-Receptor Associated Factor 6*). Über weitere Phosphorylierungsschritte werden schließlich MAP-Kinasen und NFκB aktiviert, die die Transkription von Entzündungsmediatoren und Zytokinen modulieren.

2.6 SEPSIS

„Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und / oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ Übersetzt nach Bone *et al.* 1989 [21].

Einer Sepsis (griech. Fäulnis) geht immer eine lokale Infektion voran, wobei Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie Pilze die Auslöser dieser Infektion sein können. Die Reaktion des Immunsystems auf die invasiven Erreger oder seiner Bestandteile wird als inflammatorische Antwort bezeichnet und dient als ein wirksamer Schutz des Körpers gegen körperfremde Moleküle und Mikroorganismen. Das aus der Zellhülle von Gram-negativen Bakterien freigesetzte und in die Blutbahn abgegebene Endotoxin Lipopolysaccharid ist ein

potenter Auslöser einer inflammatorischen Antwort des Immunsystems (siehe Kapitel 2.5.1). Nach einer Akkumulierung von Immunzellen am Entzündungsherd treten die typischen klassischen Entzündungszeichen nach Celsus auf: *Tumor* (Schwellung), *Rubor* (Rötung), *Calor* (Überwärmung), *Dolor* (Schmerz) und *Functio laesa* (Eingeschränkte Funktion). Die Freisetzung der gefäßaktiven Substanz Histamin am Ort der Entzündung führt über eine lokale Vasodilatation und Beeinflussung der Gefäßpermeabilität zu einer Invasion von Immunzellen an ihren Wirkort. Die entzündeten Bereiche sind lokal durch die gesteigerte Perfusion des Bereichs mit Blut geschwollen, überwärmt und gerötet.

Sofern die Mechanismen des Immunsystems eine Entzündung nicht mehr lokal begrenzen können, lösen die Erreger oder deren Toxine eine systemische Entzündung des gesamten Körpers aus. Innerhalb von Stunden können dann alle Organe von einer Entzündung betroffen sein, bei der der Körper exzessiv Zytokine (Zytokinsturm) ausschüttet und damit eine überschießende inflammatorische Immunantwort auslöst. Diese Überreaktion kann zu einem Multiorganversagen und letztendlich zum Tod führen.

Die zunehmende Anzahl von invasiven Eingriffen und Therapien in der Klinik sowie das zunehmende Alter der Patienten mit einer schwächer werdenden Immunabwehr führen zu einer Zunahme der Sepsis trotz der Möglichkeiten, die eine moderne Medizin und hohe Hygienestandards bieten. So berichteten *Van Amersfoort et al.* im Jahr 2003 von einer Verdopplung der Sepsisfälle in den USA im Zeitraum zwischen 1979 und 1987 [147].

Ein grundsätzliches Problem in der Sepsistherapie bleibt der Einsatz von Antibiotika, die zwar die Abtötung der Bakterien zum Ziel hat, jedoch im Falle ihrer Wirksamkeit Endotoxine (LPS der Gram-negativen Bakterien), die als Auslöser für ein septisches Syndrom gelten, freisetzt. Die Problematik der Resistenzentwicklungen der Bakterien auf Antibiotika stellt dabei ein eigenes Problemfeld dar.

2.6.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÖKONOMISCHE ASPEKTE DER SEPSIS

Grundlage für alle epidemiologischen Studien zur Sepsis ist die im August 1991 einberufene Konferenz zur Definition von Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis, septischen Schock und Multiorganversagen. Ziel der 1992 publizierte ACCP/SCCM (*American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine*) Konsensus-Konferenz-Kriterien war es, zunächst eine sichere und frühzeitige Diagnose der Sepsis anhand fester Kriterien zu stellen und nachfolgend eine konsequente adäquate Therapie der Sepsis einzuleiten [20, 22].

Nach den Definitionen der ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien ist die Sepsis eine systemische Entzündungsreaktion auf einen infektiösen Stimulus. Sie wird als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) bezeichnet und stellt die erste Stufe einer pro-inflammatorischen Reaktion des Immunsystems auf eine Läsion dar. Eine SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei Kriterien des SIRS erfüllt sind (Tabelle 1) [20].

Kriterien des <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS)	
-	Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
-	Tachykardie mit einer Herzfrequenz > 90/min
-	Tachypnoe von mehr als 20/min bzw. $p_a\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ (< 4,3 kPa)
-	Leukozytose von mehr als 12000 Zellen/ μl oder
-	Leukopenie von weniger als 4000/ μl oder
-	$\geq 10 \%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Tabelle 1: Klinische Parameter zur Definition der SIRS.

(verändert nach Moerer *et al.*, 2009 [96])

Nach Einführung der SIRS-Kriterien wurde eine Sepsis definiert durch das Vorliegen einer Infektion oder den klinischen Verdacht auf eine Infektion in Kombination mit der Erfüllung der SIRS-Kriterien. Die Kurzformel zum Vorliegen einer Sepsis kann in Kürze wie folgt zusammengefasst werden: Sepsis=Infektion+SIRS.

Das Krankheitsbild der schweren Sepsis ist zusätzlich durch Organdysfunktionen gekennzeichnet. Hier lautet die Kurzdefinition zum Vorliegen einer schweren Sepsis: Schwere Sepsis=Infektion+SIRS+Organdysfunktionen [96].

Die schwerste Form der Sepsis ist der septische Schock. Sie beschreibt den Zustand einer schweren Sepsis in Kombination mit einer therapieresistenten Hypotension und Hypoperfusion trotz adäquater Volumenersatztherapie.

Basierend auf die ACCP/SCCM-Kriterien von 1992 wurde eine Vielzahl von klinischen Studien zur Sepsis durchgeführt. Als eine der ersten Studien wurden zwischen 1993 und 1994 in Italien auf 99 Intensivstationen 1101 Patienten in eine prospektive Sepsisstudie eingeschlossen, von denen 2,1 % die Kriterien einer schweren Sepsis erfüllten und 11 % aller auf Intensivstation stationär aufgenommen Patienten darstellten. Die beobachtete Sterblichkeit

ging mit einem Organversagen einher, wobei 36 % der Patienten unter einer Sepsis litten und 81,8 % einen septischen Schock entwickelten. Die Mortalität für Patienten, die bereits eine schwere Sepsis vor der stationären Aufnahme auf der Intensivstation entwickelt haben, lag bei 52,2 % [122].

Eine andere 1995 in den Vereinigten Staaten von Amerika nach den ACCP/SCCM-Kriterien von 1992 durchgeführte prospektive Studie an 3708 Patienten auf drei Intensivstationen und auf drei peripheren Stationen fand heraus, daß unter den Patienten mit einer SIRS 26 % eine Sepsis, 18 % eine schwere Sepsis und 4 % einen septischen Schock entwickelt hatten. Die Sterblichkeit durch eine schwere Sepsis wurde mit 20 % beziffert [110].

Die im selben Jahr durchgeführte prospektive Studie in Frankreich auf 170 Intensivstationen mit Einschluß von 11.828 Patienten in einer Zeitspanne von acht Wochen berichtet von einer bestätigten Sterblichkeitsrate durch schwere Sepsis und septischen Schock von etwa 56 % [31].

Ähnliche Erkenntnisse lieferten später durchgeführte Studien in England, Wales und Nordirland (retrospektiv, 2003) mit 56.673 Patienten. Die Ergebnisse der Studie zeigten, daß 51 Fälle einer schweren Sepsis pro 100.000 Einwohner und Jahr (Inzidenzrate) zu verzeichnen sind. Die Mortalität in der Klinik wurde mit 47,3 % angegeben. Es zeigte sich auch, daß Herz-Kreislauf- und Lungenversagen die häufigsten Organdysfunktionen darstellten [105].

Die großen Unterschiede in den Ergebnissen der Studien und neuere wissenschaftliche Erkenntnisse führten zu einer Ergänzung und Anpassung der ACCP/SCCM-Kriterien von 1992. So wurden die unspezifischen SIRS-Kriterien durch weitere klinische Parameter (etwa Prokalzitonin) und durch den Aspekt der Organdysfunktion sowie gestörter Gewebepfusion erweitert. Sie mündeten in einer Novellierung der ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien, die im Jahr 2003 publiziert wurden. Die Reevaluierung dieser Definitionen ermöglichte, auch klinische Veränderungen des Patientenstatus zu erfassen und einzuschätzen, ab welchem Zeitpunkt ein Patient als „septisch“ angesehen werden kann [82, 83]. Die Parameter der Sepsiskriterien von 2003 können Tabelle 10 im Anhang entnommen werden.

Die Sepsisdefinition nach der ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz von 2003 wurde auf nationaler Ebene im Jahr 2006 mit der Einführung der S-2-Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Sepsis der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv-und Notfallmedizin (DIVI) überarbeitet und ergänzt (siehe Kapitel 2.6.2). Als eine wesentliche Veränderung wurde die Bestimmung des Prokalzitoninwertes zum Ausschluß einer bakteriellen Sepsis bzw. zur Sicherung der Diagnose empfohlen. Bei einer Prokalzitoninkonzentration von $< 0,5$ ng/ml im Serum ist eine schwere Sepsis oder ein septischer Schock als unwahrscheinlich und ab einem Schwellenwert von 2,0 ng/ml als hochwahrscheinlich anzusehen [114, 115].

Der Anteil, der auf der Intensivstation behandelten Patienten, bei denen eine schwere Sepsis diagnostiziert wurde, schwankt, je nach Studie, um einen Wert zwischen 10-15 % [6, 11, 32, 44, 46, 110, 122, 123, 148]. Einige Studien geben viel höhere Inzidenzraten der Sepsis auf Intensivstationen an [61]. Die höchste Inzidenzrate der schweren Sepsis auf Intensivstation in Europa wurde in einer englischen Studie im Jahr 2003 mit einem Wert von über 27,1 % angegeben [105].

Die größten und umfangreichsten Studien zur Epidemiologie der Sepsis wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika durchgeführt. Der Ausgangspunkt für diese umfangreichen Studien zur Sepsis in den USA waren die Berichte der *National Hospital Discharge Survey* des *Center of Disease Control* (CDC). Eine Datensammlung von 1979 bis 1987 für Septikämie, die 1990 publiziert wurde, schätzte, daß etwa 450.000 Patienten pro Jahr in den Vereinigten Staaten von Amerika an Sepsis erkrankten [1]. Die Zahlen für das Jahr 2008 des CDC und des *National Hospital Discharge Survey* zeichnen ein dramatischeres Bild. Sie gehen von etwa geschätzten 727.000 Patienten pro Jahr für die USA mit der Hauptdiagnose Septikämie und Sepsis aus. Bei Einbeziehung der Sepsis oder Septikämie als Sekundär-diagnose, geht das CDC von 1,14 Millionen Patienten pro Jahr aus [55]. Die im Jahr 2001 von *Angus et al.* publizierte Studie zur Epidemiologie der Sepsis in den USA basierte auf Daten des Jahres 1995 und schloß Krankenhausentlassungsdaten von sieben amerikanischen Bundesstaaten ein. Die Gesamtpopulation der untersuchten Patienten lag bei 6,6 Millionen, wobei etwa 193.000 Fälle mit einer schweren Sepsis identifiziert wurden. Die damalige Schätzung von Sepsisfällen für die USA lag bei 751.000 Fällen pro Jahr. Die Inzidenzrate wurde mit 300 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben [11]. Die von *Angus et al.* im Jahr 2001 publizierten Daten decken sich mit den Daten des CDC des Jahres 2008. Diese Daten

müssen im Hinblick auf ihre Aussagekraft kritisch betrachtet werden, da es sich um retrospektive Analysen aus Krankenhausentlassungsdaten handelt.

Neuere Studien, publiziert im Jahr 2003, berichten von geringeren Inzidenzraten für Sepsis in den USA. Hier wurden Inzidenzraten von 240 bzw. 135 Fällen pro 100.000 Einwohner beschrieben [37, 89]. Im Vergleich zu den amerikanischen Studien bewegen sich die Inzidenzraten für europäische Länder im Bereich von 25-118 Fällen pro 100.000 Einwohner, wobei die Inzidenzraten der europäischen Studien auf repräsentative Stichproben mit einem prospektiven Studiendesign basieren. Die Genauigkeit bzw. Verlässlichkeit der Daten der europäischen Studien im Vergleich zu den Daten aus amerikanischen Studien ist höher einzustufen.

Bis zum Jahr 2002 lagen für Deutschland nur grobe Schätzungen zur Epidemiologie und Inzidenz der Sepsis vor [125]. Sie wurden durch die im Jahr 2003 initiierte und 2007 durch das SepNet veröffentlichte Studie abgelöst [44]. In dieser ersten nationalen prospektiven Studie wurde die Ein-Tagesprävalenz von Sepsis in 310 Krankenhäusern und 454 Intensivstationen erfasst. Von den 3877 Patienten hatten 34,8 % eine Infektion. Die Kriterien für eine schwere Sepsis oder septischen Schock erfüllten unter diesen Patienten 30,8 %. Basierend auf den Daten dieser Studie konnte für die Inzidenz der Sepsis die Inzidenzrate von 85-116/100.000 Einwohner und für den septischen Schock von 76-110/100.000 Einwohner kalkuliert werden. Die Mortalität für Sepsis in Deutschland wird seither mit 60.000 Sterbefällen beziffert und stellt damit die dritthäufigste Todesursache hinter der koronaren Herzkrankheit und Myokardinfarkt in Deutschland dar.

Die Letalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks auf deutschen Intensivstationen konnte durch diese Studie mit 40 % bzw. 56 % angegeben werden. Ausländische Studien, auch auf nationaler Ebene beschränkt, gehen von einer Letalität von 16 bis 52 % bei Vorliegen einer schweren Sepsis und 34 bis 82 % bei Vorliegen eines septischen Schocks aus [6-8, 13, 18, 37, 44-46, 51, 61, 73, 78, 88, 109, 140, 148, 150, 163].

Die große Schwankungsbreite und Überschneidung in den Letalitätsraten beider Schweregrade in diesen Studien ist bedingt durch den fließenden Übergang einer schweren Sepsis in einen septischen Schock und die dadurch nicht immer klare Abgrenzung beider Zustände. Weitere Unterschiede neben dem Studiendesign stellen die unterschiedliche Aufnahmepolitik, die Ausrichtung der jeweiligen Intensivstation, der Krankheitsschweregrad bei Aufnahme, das Lebensalter und Geschlecht der Patienten sowie die eigentliche Ursache der Sepsis dar. Die

Studien konnten jedoch belegen, daß die Lunge am häufigsten als primärer Infektionsort (28-68 %) vor Organen des Abdomens (15-47 %) identifiziert werden konnte.

Obgleich die Sepsis, die schwere Sepsis und der septische Schock akute Krankheitszustände beschreiben, beinhalten diese Zustände eine Langzeitkomponente, die den Aspekt der Lebensqualität und des Überlebens betrifft. So berichtet die Studie von *Perl et al.* [106], die bei 100 an schwerer Sepsis erkrankten Patienten nach einem Monat der diagnostizierten Sepsis durchgeführt wurde, von einer Letalität von 32 %. Die Letalität in dieser Studie stieg nach sechs Monaten auf 43 % und nach 30 Monaten auf 60 % an. Eine 1997 veröffentlichte Untersuchung berichtet von einer um vier Jahre verkürzten Lebenserwartung von septischen Patienten im Vergleich zu nicht septischen Patienten [108].

Aus den epidemiologischen Daten und Inzidenzraten lassen sich die ökonomischen Belastungen für die jeweiligen Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften, die sie tragen, berechnen. Die Grundlage zur Berechnung der Kosten, die durch Sepsis und deren Therapie entstehen, bilden die Daten zu den Kosten der Intensivtherapie.

Aus einem im deutschen Ärzteblatt publizierten Bericht im Jahr 2004 geht hervor, daß etwa 13 % (5,5 Mrd. €) der Gesamtausgaben des deutschen Gesundheitssystems auf die Intensivtherapie fallen, wobei ein geringer Anteil der Intensivpatienten, etwa 8 %, fast 50 % der finanziellen Kosten verursacht [99]. Die Studie von *Welton et al.* bestätigt diese Zahlen. In dieser Studie verursachen 10 % der Intensivpatienten etwa 50 % der Gesamtkosten auf der Intensivstation [156].

Die durchschnittlichen Kosten für die Therapie eines an schwerer Sepsis erkrankten Patienten in Deutschland konnten durch eine im Jahr 2002 veröffentlichte, retrospektive Untersuchung von 385 Patienten mit schwerer Sepsis an drei deutschen Universitätskliniken ermittelt werden. Die mittleren Kosten der schweren Sepsis lagen bei 23.297 € (1.318 €/Tag), wobei die Kosten bei Patienten, die die Sepsis nicht überlebt haben, höher waren als bei Patienten, die das septische Syndrom überlebt haben (25.446 vs. 21.984 €) [97].

Die direkten Gesamtkosten einer Therapie der schweren Sepsis auf deutschen Intensivstationen nehmen etwa ein Volumen von 1,77 Mrd. € pro Jahr ein. Zu den direkten Kosten zählen die Medikation, Routinelabor, Mikrobiologie, Einmalartikel, Unterkunft und Personalkosten, wobei der hohe Personalaufwand etwa 40-70 % der anfallenden Gesamtkosten beträgt, bedingt durch die lange Liege- und Therapiedauer.

In die Berechnungen der indirekten Kosten fließt der verursachte Produktivitätsverlust, der durch die schwere Sepsis verursacht wird. Er wird auf 4,5 Mrd. € pro Jahr geschätzt. Somit kann für Deutschland die Höhe der durch Sepsis verursachten Kosten auf über 6,3 Mrd. € pro Jahr geschätzt werden [33, 95].

Untersuchungen in den USA zu den jährlich verursachten Kosten lieferten vergleichbare Zahlen. *Angus et al.* berichten in ihrer Publikation 2001 von mittleren Kosten in der Höhe von 22.100 US-\$ für die Therapie der schweren Sepsis und Tageskosten von 931-1079 US-\$ pro Patient. Für die in dieser Studie errechnete Inzidenzrate liegen die Gesamtkosten in den USA demnach bei 16,7 Mrd. US-\$ [11].

2.6.2 DIAGNOSE UND THERAPIE NACH DEN S2K-LEITLINIEN DER DEUTSCHEN SEPSIS-GESELLSCHAFT E.V. (DSG) UND DER DEUTSCHEN INTERDISZIPLINÄREN VEREINIGUNG FÜR INTENSIV-UND NOTFALLMEDIZIN (DIVI)

Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis sind in der 1. Revision der S2k-Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv-und Notfallmedizin (DIVI) beschrieben [113]. Sie stellt eine Modifikation der Definitionen für Sepsis nach den ACCP/SCCM-Kriterien der Konsensus Konferenz von 1992 und ihrer Reevaluierung von 2003 dar.

An dieser Stelle sollen diese Kriterien und die empfohlenen Therapieansätze nur kurz erwähnt werden.

Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock der S-2-Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Sepsis	
I.	Nachweis der Infektion
Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien	
II.	Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS; mindestens 2 Kriterien)
-Fieber ($\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder-vesikale Messung -Tachykardie; Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ -Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($p_a\text{CO}_2 \leq 4,3\text{ kPa}$ bzw. $\leq 33\text{ mmHg}$) -Leukozytose ($\geq 12000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\mu\text{l}$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild	
III.	Akute Organdysfunktion (mindestens 1 Kriterium)
-Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium -Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100000/\mu\text{l}$. <i>Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muß ausgeschlossen sein.</i> -Arterielle Hypoxämie: $p_a\text{O}_2 \leq 10\text{ kPa}$ ($\leq 75\text{ mmHg}$) unter Raumluft oder $p_a\text{O}_2/F_i\text{O}_2$-Verhältnis von $\leq 33\text{ kPa}$ ($\leq 250\text{ mmHg}$) unter Sauerstoffapplikation. <i>Eine manifeste Herz-oder Lungenerkrankung muß als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.</i> -Renale Dysfunktion: Diurese von $\leq 0,5\text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und / oder Anstieg des Serumkreatinins >2-fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs. -Metabolische Azidose: <i>Base Excess</i> $\leq -5\text{ mmol/l}$ oder Laktatkonzentration $>1,5$-fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs.	
Einteilung der Schweregrade:	
Sepsis: Vorliegen der Kriterien I und II.	
Schwere Sepsis: Vorliegen der Kriterien I, II und III.	
Septischer Schock: Vorliegen der Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90\text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65\text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90\text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 65\text{ mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.	

Tabelle 2: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock der S-2-Leitlinien zur Diagnose und Therapie der DSG e.V. und DIVI.
(verändert nach Moerer et al., 2009 [96, 114])

Die Therapie der Sepsis in der S-2k-Leitlinie der DSG e.V. und DIVI wird in verschiedene Therapieansätze gegliedert. Es werden Empfehlungen zur Kausalen Therapie, Supportiven und Adjunktiver Therapie sowie Empfehlungen zu anderen Supportiven Therapien beschrieben.

In der Kausalen Therapie finden sich Empfehlungen zur Fokussanierung und zur antimikrobiellen Therapie.

Die Supportive Therapie adressiert Maßnahmen zur hämodynamischen Stabilisierung sowie zur initialen hämodynamischen Stabilisierung ebenso wie deren Fortführung während der Therapie. Des Weiteren werden Empfehlungen zur Volumentherapie, Therapie mit Inotropika und Vasopressoren, Nierenersatzverfahren und zu *Airway-Management* und Beatmung ausgesprochen.

Unter den Empfehlungen zur Adjunktiver Therapie werden Behandlungen mit Glukokortikosteroiden, Insulin, rekombinantes humanes aktiviertes Protein C (rhAPC), Antithrombin, Immunglobuline, Selen sowie andere Therapieansätze beschrieben. Die Empfehlungen zum rekombinanten aktivierten Protein C sind seit der Retraction des Medikamentes Xigris[®] vom Markt obsolet geworden.

Detaillierte und vertiefende Einblicke können unter der Referenz [113] eingeholt werden.

2.6.3 GESCHEITERTE FORSCHUNGSANSÄTZE ZUR THERAPIE DER SEPSIS

Medizin und Wissenschaft suchen seit Jahren nach einer adäquaten und effektiven Therapie der Sepsis. Die Kriterien für eine potentielle und effektive anti-Sepsis Therapie sind eine Verringerung der Mortalität bei Sepsis und septischem Schock. Bislang konnten keine wirksamen Therapeutika entwickelt werden, die die Letalität bei Sepsis signifikant reduzieren. Die in jüngster Vergangenheit beschrittenen Wege zur Therapie der Sepsis und gegenwärtigen Bestrebungen nach einer geeigneten Sepsistherapie haben verschiedene Ansatzpunkte, die sich in Gänze als unzureichend erwiesen haben. Sie können in folgende Kategorien eingeteilt werden [129]:

- 1) Eingriff in die Zell-Signalkaskade
- 2) Eingriff in die Koagulations-(Gerinnungs)kaskade
- 3) Anti-Endotoxin Therapien
- 4) Ansätze zur Immunmodulation

5) Einwirkung auf spezifische Mediatoren.

Die Analyse bisher publizierter randomisierter klinischer Phasen (II, III) hat ergeben, daß eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate von septischen Patienten in mindestens einem klinischen Test durch folgende therapeutische Ansätze erreicht wurde: Hochdosis-Kortikosteroide, zwei anti-Endotoxin-Therapien, humane rekombinante IL-1 Rezeptor Antagonisten, intensive Insulin-Therapie, intravenöse Gabe von Immunglobulin sowie die intravenöse Gabe von rekombinantem aktivierten Protein C. Obgleich diese Ansätze vielversprechend waren, konnte nur eine Substanz die Marktreife erlangen und Eingang in die klinische Anwendung finden. Die Therapie mit hochdosierten-Kortikosteroiden, eingesetzt bis 1989, zeigte in Metaanalysen trotz einiger Überlebensverbesserung am Beginn, daß die Letalität von Patienten mit septischem Schock sogar zunahm [153]. Die bis 1997 eingesetzten IL-1 Rezeptor-Antagonisten zeigten nach anfänglichen positiven therapeutischen Daten in weiteren klinischen Studien keine Wirksamkeit. Ähnliche Befunde wurden für den Einsatz von monoklonalen *anti-Tumor-Necrosis-Factor* alpha (TNF- α) Antikörper (Afemilomab, Abbott) berichtet. Hier konnten einige positive Effekte beobachtet werden, allerdings ohne eine signifikante Steigerung der Überlebensrate bei Sepsis. Bei der Gabe von anti-Interferongamma Antikörpern (INNO-202, Innogenetics) bei Affen im Jahr 2003 konnten ebenfalls positive Effekte beobachtet werden, jedoch konnten diese bislang nicht durch Daten aus klinischen Studien verifiziert werden. Die bis heute in der Klinik eingesetzte intensive Insulintherapie hatte bei Vorliegen einer schweren Sepsis keine Erfolge zeigen können und birgt überdies die Gefahr eines iatrogenen hypoglykämischen Schocks.

Therapeutische Ansätze zur Ausschaltung von LPS, als Auslöser einer durch Gram-negative Bakterien induzierten Sepsis, mittels geeigneter anti-LPS-Wirkstoffe könnten effizient sein, da die entzündungsauslösenden bakteriellen Produkte (LPS) unschädlich gemacht werden. Die für diesen Ansatz entwickelten LPS-Antikörper (E5, muriner monoklonaler AK und der monoklonale Antikörper HA-1A, Centoxin) als auch die LPS-Antagonisten wie E5564 (Eritoran, Eisai), deren Wirkung auf die Blockade der LPS-Rezeptoren auf der Immunzellmembran wie etwa das TLR-4/MD2-System zielte, scheiterten in Phase II/III-Studien [10, 143]. Ein Erklärungsansatz für den Misserfolg LPS zu blockieren, könnte die unzureichende kreuzreaktive Wirkung gegen verschiedene LPS-Serotypen sein, da sie im Allgemeinen an Epitope der Zuckerkette von LPS binden, die für verschiedene bakterielle Spezies variabel ist und nicht an den für biologische Reaktionen verantwortlichen Lipid A-Teil des LPS. Die Wirkung von LPS-Antagonisten, die kompetitiv auf den LPS-Rezeptor Komplex TLR-4/MD2 hemmend wirken, kann bei höheren LPS-Konzentrationen durch

Verdrängen des LPS-Antagonisten durch LPS in den Rezeptoren aufgehoben werden. Zudem kann bei diesem Ansatz als auch beim Ansatz der LPS-Antikörper keine therapeutische Wirkung bei Patienten mit durch Gram-positive Bakterien induzierte Sepsis erreicht werden, da hier von anderen Pathogenitätsfaktoren, nämlich von Lipoproteinen, ausgegangen werden muß.

In einem relativ neuen therapeutischen Ansatz wurde als rekombinantes Laktoferrin (humanes antibakterielles Abwehrprotein) Talactoferrin verwendet, das zu einer Erhöhung der Überlebensrate in einer kleinen Phase II Studie führte. Der Hersteller, die Biotech-Firma Agennix, musste die klinischen Studien der Phasen II/III zur Behandlung der schweren Sepsis einstellen, als die Zwischenergebnisse des „*Data Safety Monitoring Boards*“ aufzeigten, daß die 28-Tage-Mortalität in dem Talactoferrin-Arm der Studie höher als im Placebo-Arm war [5].

Das bis vor kurzem einzig zugelassene Medikament gegen die bakterielle Sepsis, das Drotrecogin alpha (aktiviertes Protein C, Xigris[®]), das zu einer Inhibition des prokoagulenten Gerinnungssystems führt und sich gegen die Komplikation einer disseminierten intravasalen Koagulation (DIC) bei einer Sepsis wendet, zeigte in einer früheren Studie eine Überlebenszunahme für Patienten mit schwerer Sepsis (640 versus 581 Überlebende in der Kontrollgruppe, $p=0.05$) [4] und wurde daher als geeignet als anti-Sepsis Wirkstoff eingestuft. Die Indikationsstellung für den Einsatz dieser Substanz war jedoch von Beginn an sehr restriktiv und wurde nur für Patienten im septischen Schock, bei denen mindestens bereits zwei Organe (Multiorganversagen) ausgefallen waren, eingesetzt. Der Einsatz von Drotrecogin alpha barg zudem die Gefahr einer nicht mehr beherrschbaren intrazerebralen Blutung, was sich ebenfalls auf die strenge Indikationsstellung dieser Substanz auswirkte und den zu behandelnden Patientenkreis immens einschränkte. Eine spätere Studie fand allerdings keinen Überlebensvorteil für die Patienten, so daß der Hersteller Eli Lilly das Medikament im Oktober 2011 vom Markt nahm [2, 141].

Andere Therapieverfahren verwenden extrakorporale Filtrationstechniken (etwa Cytosorb[®], *Cytosorbents Corporation*, Monmouth Junction, NJ, USA), bei denen entweder pro-inflammatorische Zytokine wie etwa IL-1 oder IL-6 oder Bakterien und / oder ihre Toxine aus dem Blutkreislauf gefiltert werden. Diese Strategien zielen auf eine Verminderung von Symptomen, die zu einem septischen Schock führen könnten. Allerdings ist hier neben einer Infektionsgefahr, wie sie von jeder Hämofiltration ausgehen kann, auch die körperliche Belastung des durch Sepsis geschwächten Patienten zu berücksichtigen.

Gegenwärtig befinden sich 395 Wirkstoffe und Vakzine in Testphasen (präklinisch oder klinisch), von denen 88 als Antibiotika/antibakterielle Agentien bezeichnet werden können.

Das grundsätzliche Problem der oben beschriebenen Ansätze ist das Herausgreifen und Blockieren oder Verändern eines Signalweges in der komplexen Inflammationskaskade oder das Blockieren eines spezifischen Rezeptors unter Vernachlässigung der Tatsache, daß die Inflammationskaskade komplex und durch eine Vielzahl von Signalwegen gespeist wird.

Eine wirksame Therapie der Sepsis könnte durch die zielgerichtete Wirkung (Neutralisation) auf Pathogenitätsfaktoren, etwa LPS bei durch Gram-negativen Bakterien induzierten Sepsis, erreicht werden.

2.7 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE (AMP) UND SYNTHETISCHE ANTI-LPS PEPTIDE (SALP)

Antimikrobielle Peptide (AMP) stellen einen Teil der angeborenen Immunabwehr dar. Zusammen mit dem adaptiven Immunsystem wird dem menschlichen Organismus ein wirksames System zum Schutz gegen Infektionen bereitgestellt. Die AMP werden über Gene kodiert und sind spezifisch für verschiedene Spezies. Sie sind sehr klein und können aus sechs bis über 50 Aminosäuren bestehen und verfügen im Allgemeinen über eine positive Nettoladung von +2 e_0 bis +9 e_0 . Der Anteil von hydrophoben Komponenten in den AMP liegt bei über 30 % [56, 57, 165].

Die Bezeichnung „Antimikrobielle Peptide“ (AMP) sollte Verwendung finden, sobald eine antimikrobielle Aktivität detektierbar ist oder ein solcher Effekt von den Peptiden ausgeht. Diese Bezeichnung wird oftmals in der Literatur mit einer anderen Bezeichnung verwendet, die auf die anti-infektive Aktivität und die Regulation und Modulation der Immunantwort hindeutet. Die letztgenannten Peptide werden in der Literatur als „*host defence peptides*“ bezeichnet. Obgleich fälschlicherweise als Synonym verwendet, beschreiben die Vertreter dieser Gruppen unterschiedliche Wirkungen, wobei eine antimikrobielle Aktivität von Peptiden auch mit einer auf das Immunsystem wirkenden Regulierung einhergehen kann. Bioaktive Peptide können die Chemokinproduktion und -freisetzung durch Immun- und Epithelzellen verstärken, zu einer Verbesserung der Wundheilung und Angiogenese beitragen oder pro- und anti-apoptotische Effekte auf verschiedenen Immunzelltypen entfalten [47].

Die antimikrobielle Aktivität von AMP kann von der Größe und der Aminosäuresequenz der Peptide abhängen. So konnten antimikrobielle Peptide mit nur sechs Aminosäuren, etwa einem Vertreter der anionischen Peptide, bis hin zu 59 Aminosäuren, etwa im Bac7, ein

Vertreter der kationischen Peptide, beschrieben werden. Die Sequenzen dieser antimikrobiell wirkenden Peptide zeichnen sich durch oftmals basische Aminosäuren wie Lysin oder Arginin aus. Unter den hydrophoben Aminosäuren in diesen Sequenzen kommen überwiegend die Aminosäuren Alanin, Leucin, Phenylalanin oder Tryptophan vor [27].

Die Zusammensetzung der Peptide durch unterschiedlich geladene Aminosäuren haben durch die dadurch resultierende Nettogesamtladung der Peptide einen direkten Einfluß auf ihre antimikrobielle Aktivität und bestimmen im Zusammenspiel mit der Größe und der jeweiligen Aminosäuresequenz der Peptide die Konformation und Struktur der Peptide. Die Konformation und Struktur der Peptide trägt zu gleichen Teilen zur Aktivität bei [27].

Die Eigenschaft der Hydrophobizität von AMP und ihr Grad der Ausprägung ist entscheidend für eine Wirkung auf die Doppellipidmembranen im Sinne eines Einbaus von AMP in Membranen oder einer Passage durch diese Membranen [27].

Antimikrobielle Peptide mit einer ausgeprägten antimikrobiellen Aktivität sind amphipatisch, das heißt, sie verfügen über ein hydrophobes und ein hydrophiles Areal, meist auf gegenüberliegenden Seiten des Peptids [27].

Neben einer direkten antimikrobiellen Wirkung auf bakterielle Membranen konnten auch intrazelluläre Wirkungen von AMP in *E. coli* beobachtet werden. Das Peptid Mersacidin inhibiert die Zellwandsynthese, die Peptide PR-39, PR-26, Indolicidin und Microcin 25 wirken auf die zytoplasmatische Membran, die Peptide Buforin II und Tachyplesin binden an bakterielle DNA und die Peptide Pleurocidin, Dermaseptin, PR-39, HNP-1, HNP-2 und Indolicidin inhibieren die bakterielle DNA und RNA sowie die Proteinsynthese. Histatin, Pyrrocoricin, Drosocin und Apidaecin inhibieren die enzymatische Aktivität [27].

Antimikrobielle Peptide sind seit dem Jahr 2000 Gegenstand der innovativen Arzneimittelforschung im Bereich der anti-infektiven Therapie. Eine Vielzahl von internationalen Unternehmungen erforschen vielversprechende Peptide und synthetische Varianten aus der Gruppe der Antimikrobiellen Peptide und der Gruppe der *host defence peptides* aus der Natur. Etwa 40 Präparate werden derzeit in klinischen Phasen getestet [47].

Im Bereich der Sepsisforschung wurden Substanzen wie Laktoferrin, *Bactericidal-permeability-increasing Protein* (BPI), Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LBP), *Limulus*-anti-Lipopolysaccharid-Faktor (LALF), in rekombinanter Form als Endotoxin-neutralisierendes Protein (ENP) bezeichnet, Granulysin und NK-Lysin untersucht.

Weitere Vertreter aus der Gruppe der endogenen antimikrobiellen Peptide (AMP), die in der Bekämpfung von Infektionen und Inflammationen Anwendung finden sollen, stellen die Gruppe der Kathelizidine wie etwa LL32 und LL37 und humane Defensine wie etwa das humane- β -Defensin 1, humane- β -Defensin 2 und humane- β -Defensin 3 und deren Derivate dar.

Die grundsätzlichen Vorteile, die antimikrobielle Peptide gegenüber herkömmlichen Antibiotika bieten, liegen in deren breitem Anwendungsspektrum gegen Bakterien, Viren und Pilze und deren schneller Inaktivierung sowie eine geringe Resistenzentwicklung. Diesen Vorteilen stehen die Nachteile einer systemischen und lokalen Toxizität bei natürlichen, in ihrer Struktur unveränderten Peptiden entgegen. Als ein weiterer Nachteil von AMP als zukünftige Therapeutika steht die reduzierte Aktivität und Stabilität der in der Regel kationischen Peptide in Gegenwart von Kationen wie Magnesium (Mg^{2+}) und Kalzium (Ca^{2+}) in biologischen Umgebungen im Vordergrund.

Aus den bereits oben angeführten Vor- und Nachteilen von AMP setzt die Arzneimittelforschung bei den Peptiden auf synthetisch hergestellte Peptide, die auf in der Natur vorkommenden Strukturen basieren. Sie werden im Wesentlichen im Hinblick auf Stabilität und Bioaktivität in biologischer Umgebung, Effektivität, Toxizität, Pharmakodynamik und -kinetik, Formulierung sowie Herstellungskosten optimiert und getestet [58].

Synthetische Anti-LPS Peptide (SALP) wie Aspidasept[®] (LPep19-2.5) und andere Vertreter dieser Peptidfamilie stellen eine besondere Gruppe unter diesen Peptiden dar. Sie basieren auf die LPS Bindedomäne des zyklischen Limulus-Anti-LPS-Faktors (cLALF) der Pfeilschwanzkrabbe und wurden im Hinblick auf die spezifische Bindung und Neutralisation von LPS weiterentwickelt. Durch Variation der Aminosäuresequenz ist es gelungen, ein Peptid zu entwickeln, das mit hoher Effektivität bei niedriger Peptidkonzentration LPS spezifisch bindet, ohne zytotoxische Effekte im notwendigen therapeutischen Bereich zu induzieren.

Aspidasept[®] (LPep19-2.5) ist somit in der Lage, LPS, welches durch bakterielles Wachstum oder durch den Einsatz klassischer Antibiotika, die zur Zerstörung der bakteriellen Zellwand beitragen, frei wird, spezifisch mit großer Affinität zu binden und strukturell zu verändern. Das in seiner Struktur veränderte LPS wird nicht mehr durch den TLR-4 Rezeptor gebunden und damit erkannt. Die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie etwa IL-1 und IL-6 sowie TNF- α wird dadurch massiv reduziert und in bestimmten Konzentrationsbereichen völlig unterbunden.

Andere Vertreter dieser Peptidfamilie etwa die Peptide LPep19-4LF und LPep19-8.3acyl verfügen über eine überwiegend antibakterielle Komponente im Gegensatz zu Aspidasept® als LPS-Neutralisierer und wurden ebenfalls durch Variation in ihrer Aminosäuresequenz optimiert. Sie wirken direkt auf die bakterielle Membran.

2.7.1 WIRKMECHANISMEN MEMBRAN-AKTIVER ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Membran-aktive antimikrobielle Peptide wirken auf biologische Membranen. Während klassische Antibiotika durch Pore oder direkt durch die Membran in die Bakterienzelle zu ihrem Wirkort gelangen, stellt die äußere Bakterienmembran für diese Peptide ihr Angriffsziel dar. Für Gram-negative Bakterien ist das negativ geladene LPS aus der äußeren bakteriellen Membran damit die wichtigste Zielstruktur. Positiv geladene Peptide, also kationische Peptide, können aufgrund von elektrostatischen Kräften mit der negativ geladenen Außenseite von Gram-negativen Bakterienmembranen interagieren und diese destabilisieren.

Der Wirkungsweise von kationischen Peptiden sowie deren destabilisierende Wirkung auf Membranen liegen bislang folgende Erklärungsmodelle zu Grunde:

- i. *Self-promoted uptake model*
- ii. *Barrel-Stave model (helical-bundle model)*
- iii. *Toroidal Pore model (wormhole)*
- iv. *Carpet model*

Bei dem Erklärungsmodell des *Self-promoted uptake* lagern sich die Peptide zunächst außen an der Membran an (Abbildung 9, Schritt 1) und überwinden diese (Abbildung 9, Schritt 2). Im dritten und vierten Schritt (Abbildung 9) wird die innenliegende Zytoplasmamembran durch Depolarisation zerstört und das Bakterium damit lysiert.

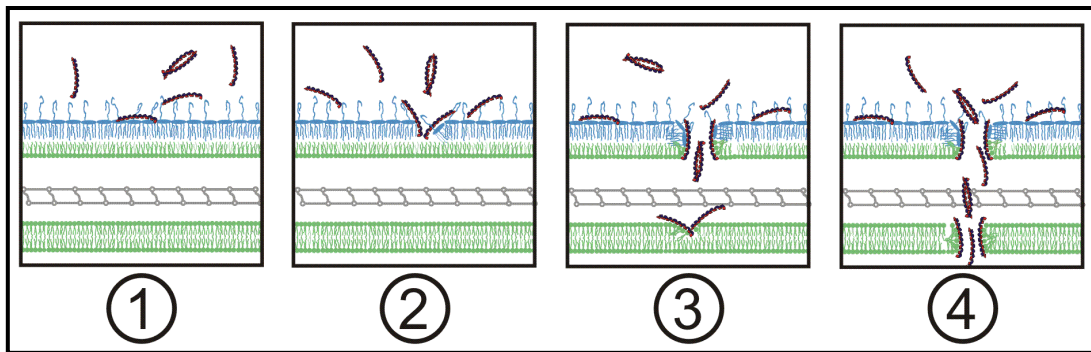


Abbildung 9: Prinzip des „Self-promoted uptake“.

1) Bindung/ Anlagerung der kationischen Peptide an die äußere Schicht der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und 2) Ausbildung/ Formung einer Läsion. 3) Wanderung der Peptide durch die induzierte Läsion zur Zytoplasmamembran. 4) Zerstörung bzw. erneute Läsionsbildung der inneren Zytoplasmamembran durch die Peptide.

Bei den Erklärungsmodellen *Barrel-Stave model*, *Carpet-* und *Toroidal Pore model* steht die Permeabilisierung der Membran mit unterschiedlichen Wirkungsweisen durch die Peptide im Vordergrund [27, 101].

Das *Barrel-Stave*-Modell (Fassdauben-Modell), auch als *Helical-Bundle model* bezeichnet, geht von Wirkstoffmolekülen aus, die sich transmembran in die Membran einbauen. Sie durchspannen die gesamte Membran. Mehrere Moleküle bilden einen Verbund aus und formen durch die Membran eine wassergefüllte Pore aus, durch die das Zellinnere aus der Zelle ausfließen kann (Abbildung 10, linke Bildhälfte). Das Peptid Alamethicin entfaltet seine Wirkung nach dem *Barrel-Stave*-Modell.

Das *Toroidal-Pore*-Modell knüpft an das *Barrel-Stave*-Modell an. Die in geringer Konzentration vorliegenden Peptide dringen in die Membran ein, wobei sie die äußere Monoschicht kontinuierlich umbiegen (Abbildung 10, rechte Bildhälfte). Durch die Interaktion mehrerer Peptide mit der Membran wird eine Läsion in der Membran induziert. Anders als beim *Barrel-Stave*-Modell ist diese Läsion nicht vollständig von den transmembranen Peptiden ausgekleidet, sondern wird auch durch Membranlipide geformt. Die polaren Seiten der Peptide sind dabei mit den polaren Kopfgruppen der Lipide assoziiert (Abbildung 10, rechte Bildhälfte). Mit dem *Toroidal-Pore*-Modell konnten bislang die Wirkungen der antimikrobiellen Peptide wie Magainin 2, Protegrin-1, Melittin, LL37 und MSI-78 erklärt werden [27].

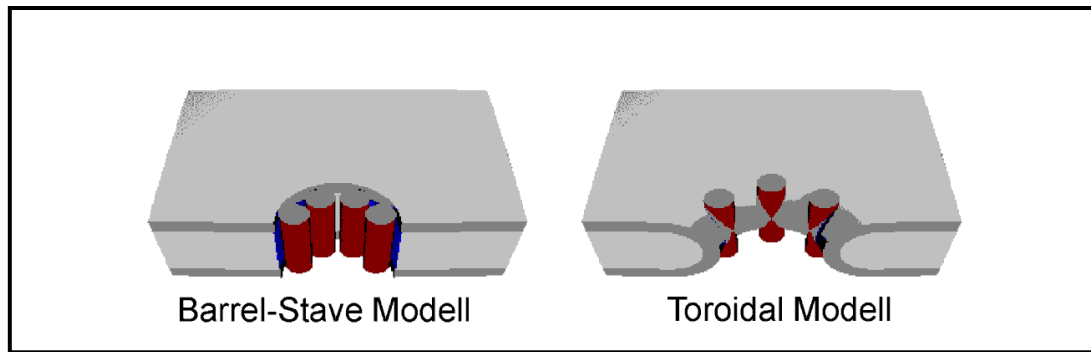


Abbildung 10: Ausbildung einer Membranläsion nach dem *Barrel-Stave*- und dem *Toroidal Pore*-Modell.

Während beim *Barrel-Stave*-Modell die Läsion vollständig von den hydrophilen Bereichen des Peptids ausgekleidet ist (links), wird die nach dem *Toroidal Pore*-Modell gebildete Läsion auch von Lipiden der Membran gebildet (rechts). Die Ausrichtung der Lipide bleibt beim *Barrel-Stave*-Modell im Gegensatz zum *Toroidal Pore*-Modell unverändert (verändert nach Yang *et al.*, 2001 [162]).

Im *Carpet*-Modell (dt. Teppich-Modell) ordnen sich antimikrobielle Peptide zunächst an der Oberfläche der Membran an. Sie werden durch elektrostatische Kräfte, ausgehend von den anionischen Kopfgruppen der Phospholipide, angezogen und stören mit ihrer planaren Ausrichtung die Anordnung und Orientierung der Membranlipide (Abbildung 11, Schritt 1). Diese Anordnung induziert einen mechanischen Stress in der Membran. Sobald eine kritische Konzentration an antimikrobiellen Peptiden erreicht ist, kann die Membran den mechanischen Stress nicht mehr kompensieren und bildet transiente Läsionen, ähnlich dem *Toroidal-pore*-Modell, aus (Abbildung 11, Schritt 2). In diese transienten Läsionen können weitere Peptide vorstoßen, die die Membran, unter Abschnürung von Mizellen aus Teilen der Membran, kollabieren lassen (Abbildung 11, Schritt 3). An die punktuelle Desintegration der Membran durch Ausbildung von Mizellen kann sich der komplette Kollaps der Membran anschließen [162].

Die Desintegration der Membran wird wie im Falle des *Barrel-Stave*-Modells und *Toroidal-Pore*-Modells zunächst durch Ausbildung einer Pore induziert, führt jedoch durch eine nachfolgende Mizellierung der Membran zu ihrer kompletten Auflösung [132].

Die Wirkungen der antimikrobiellen Peptide Dermaseptin S, Cecropin, Melittin, Caerin 1.1 und Ovispirin können durch das *Carpet*-Modell erklärt werden [27].

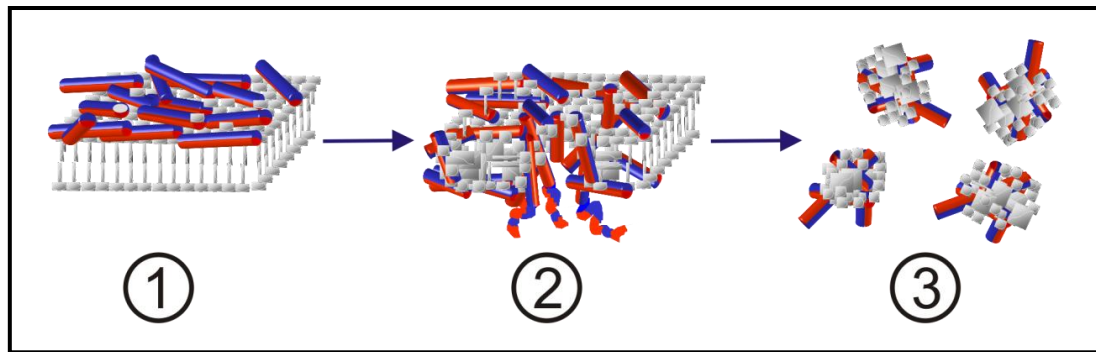


Abbildung 11: Das Carpet-Modell.

1) Bindung/ Anlagerung der Peptide an die Membran 2) Ausbildung von Läsionen durch Herauslösen von Mizellen aus der Membran 3) Vollständiger Kollaps/ Zerstörung der Membran.
(verändert nach *Shai und Oren*, 2001 [133]).

3 MATERIAL, METHODEN UND EXPERIMENTE

3.1 VERWENDETE LIPIDE

Eine wichtige Naturstoffklasse in Säugetierzellen ist neben Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlehydraten die Naturstoffklasse der Lipide. Die allen Lipiden zu Grunde liegende Eigenschaft ist ihre Unlöslichkeit in Wasser, also ihre Hydrophobizität, sowie ihre gute Löslichkeit in organischen Lösemitteln.

Die Vielzahl und Verschiedenheit der Lipide kann nicht nur unter dem Aspekt der chemischen Strukturen betrachtet werden. Lipide erfüllen verschiedene biologische Funktionen im Körper und können auch aufgrund dieser Funktionen in vier große Gruppen unterteilt werden [85]:

1. Lipide mit Funktion als Energiespeicher und Wärmeisolator
2. Lipide mit Funktion als Strukturbildner und Barriere
3. Lipide mit Funktion als Signalmoleküle
4. Lipidvitamine mit speziellen Funktionen

Die in dieser Arbeit untersuchten Lipide gehören der Klasse der Phospholipide und des Cholesterins an. Sie stellen die Hauptkomponenten der Zellmembranen von eukaryotischen Zellen und erfüllen damit die Aufgabe als Strukturbildner. Die Hauptkomponenten Gram-negativer Bakterien sind neben Phospholipiden auch die in der äußeren Bakterienmembran vorkommenden Lipopolysaccharide.

Die Einteilung der Lipide in ihre Klassen mit Beispielen von biologisch relevanten Vertretern dieser Klassen kann Abbildung 12 entnommen werden.

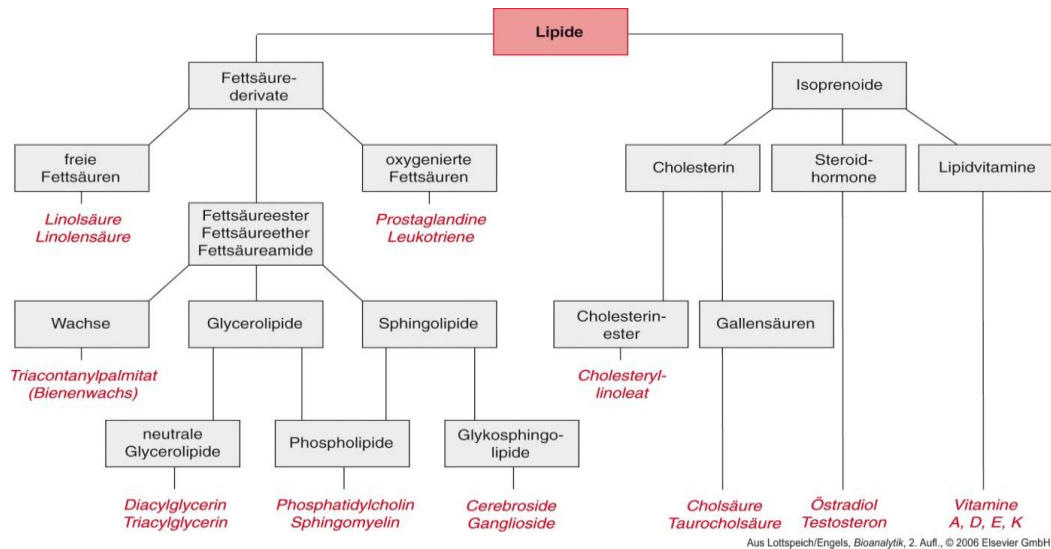


Abbildung 12: Klassifizierung biologisch relevanter Lipide.

Beispiele für spezielle Lipide, die den einzelnen Klassen zugeordnet werden können, sind kursiv gedruckt.

(Bioanalytik, 2. Auflage, 2006, Kapitel 23, Seite 582, Lottspeich/ Engels. Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science und Business Media [85])

3.1.2 PHOSPHOLIPIDE

Als Modell für eine eukaryotische Membran wurde unter anderem das neutral geladene 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC) verwendet. DOPC wurde in einer Mischung mit Sphingomyelin (SM) und Cholesterol (Chol) in einem molaren Verhältnis von Phospholipid : SM : Chol (45:45:10) eingesetzt.

Zur Klärung inwieweit die Kopfgruppe von Phospholipiden und deren Ladung sowie das Phasenverhalten der Acylketten der Phospholipide von AMP beeinflusst werden, fand das durch die Serinkopfgruppe negativ geladene 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serin] (DMPS) sowie das neutral geladene 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) Anwendung in der Infrarotspektroskopie. Die Wahl des Myristoyl- statt des Oleoylrestes liegt in der scharfen Phasenumwandlungstemperatur T_m vom rigiden in den fluiden Zustand des Myristoylrestes begründet. Für DMPC liegt die Phasenübergangstemperatur laut Hersteller Avanti Polar Lipids bei etwa +23 °C und für DMPS kann diese bei +35 °C bestimmt werden.

Das bakterielle Membransystem ist im Wesentlichen durch Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) sowie durch Cardiolipin (CL) gekennzeichnet. Das molare Verhältnis des bakteriellen Membransystems von PE:PG:CL ist mit 81:17:2 determiniert. PE ist somit die dominierende Membrankomponente in diesem System [53].

Bei den verwendeten Phospholipiden (Abbildung 13, linke Spalte) sind die Kopfgruppen sowie die Länge der Fettsäureketten unterscheidbar. Als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal fungiert der Sättigungsgrad der Fettsäureketten. Alle verwendeten synthetischen Phospholipide wurden von der Firma Avanti Polar Lipids, INC. (Alabaster, AL, USA) bezogen. Ihre Reinheit wird mit über 99 % angegeben. Die Summenformeln, molaren Massen und der Sättigungsgrad sowie die Kettenlänge der Fettsäureketten können der Tabelle 9 (Anhang, Seite 192) entnommen werden. Für Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) gibt der Hersteller eine Fettsäureverteilung der vorherrschenden Fettsäuren in Prozent an. Die chemischen Strukturen für PE, PG und CL sind in Abbildung 13, rechte Spalte dargestellt.

Der prinzipielle Aufbau der Phospholipide ist in der Literatur, etwa im Fachbuch Biochemie, 6. Auflage, 2007, Spektrum Akademischer Verlag, Stryer, unter der Referenz [14]

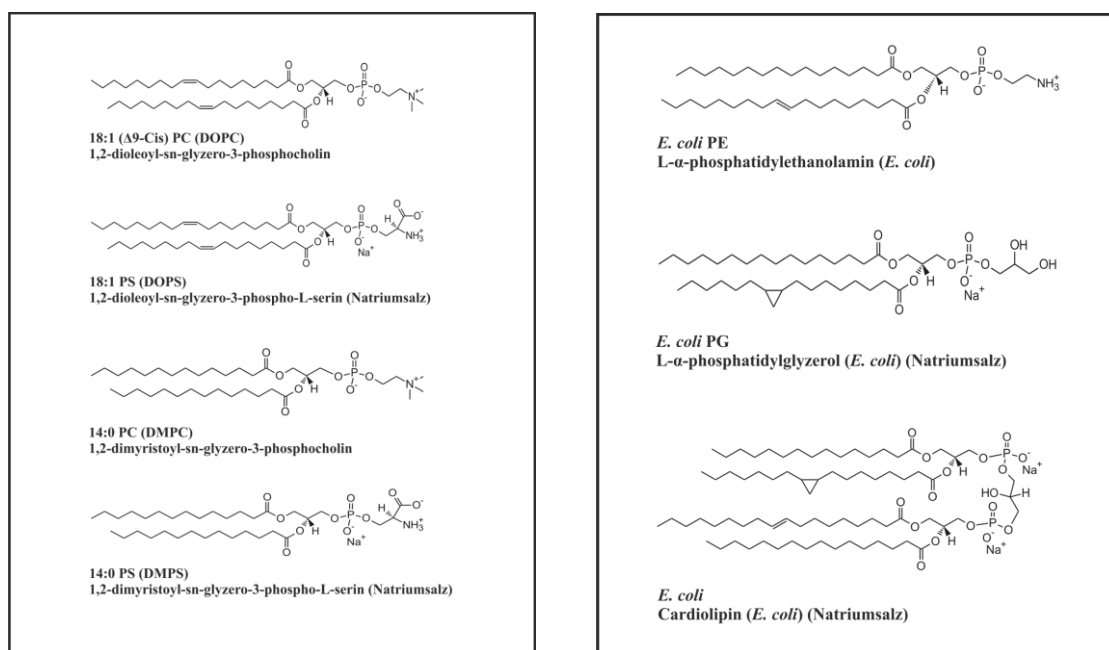


Abbildung 13: Strukturformeln der verwendeten Phospholipide für das humane (linke Spalte) und bakterielle (rechte Spalte) Membran-Modellsystem.

(<http://www.avantilipids.com> [Tag des Zugriffs: 22.01.2013])

beschrieben.

3.1.3 SPHINGOLIPIDE

Sphingolipide stellen eine weitere Hauptkomponente von Membranen dar. Das Sphingomyelin findet sich hauptsächlich in den Myelinscheiden von Nervenzellen und in Erythrozyten. Während frühere Forschungen dem Sphingomyelin eine strukturbildende

Funktion zuschrieb, gehen neuere Erkenntnisse davon aus, daß das Sphingomyelin mit Cholesterol maßgeblich an der Ausbildung von den sogenannten „*lipid rafts*“ beteiligt ist und folglich auch als Teil der Signaltransduktion gesehen werden kann [34, 92].

Sphingolipide basieren auf ein SphingosinGrundgerüst, das mit einer Fettsäurekette und einer weiteren Gruppe, z.B. Phosphochilon, verestert ist. Das Sphingosin ist ein Aminoalkohol und trägt eine ungesättigte C₁₈-Kette. Die Verbindung der Fettsäurekette erfolgt über eine Amidbindung an der Aminofunktion des Sphingosins. Diese Verbindung wird als Ceramid bezeichnet. Das in dieser Arbeit verwendete Sphingomyelin aus dem Schweinegehirn (C₄₁H₈₃N₂O₆P, M = 731,09 g/mol) ist laut Herstellerangaben zu 50 % mit einer gesättigten C₁₈-Fettsäure (Stearinsäure, Octadecansäure), zu 20 % mit einer ungesättigten C₂₄-Fettsäure (24:1, Nervonsäure, Tetracos-15-ensäure) und einigen anderen Fettsäuren verknüpft. Als Kopfgruppe dient eine über die Hydroxylgruppe des Sphingosins verknüpfte Phosphatgruppe, die wiederum mit einem Cholin verbunden ist (Abbildung 14).

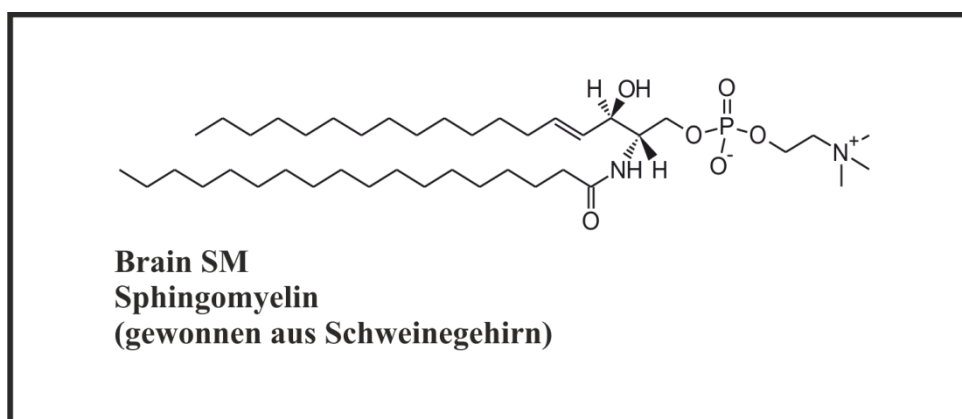


Abbildung 14: Strukturformel des aus Schweinegehirn gewonnenen Sphingomyelins.

(<http://www.avantipolarlipids.com> [Tag des Zugriffs: 22.01.2013])

3.1.4 CHOLESTEROL

Das Steroid Cholesterol (Abbildung 15) stellt nicht nur eine Grundstruktur für Steroidhormone dar, sondern ist auch ein wichtiger Bestandteil von Säugetierzellmembranen. Es liegt in unterschiedlichen Mengen je nach Zelltyp vor. Im Gegensatz zu Eukaryonten tragen Prokaryonten kein Cholesterol in ihren Membranen. In den Membranen von Säugetierzellen ist das Cholesterol parallel zu den Fettsäureketten der Phospholipide orientiert, wobei die polare Hydroxyfunktion des Steroids mit den benachbarten hydrophilen Bereichen der Phospholipide in Wechselwirkung tritt. Es dient der Stabilisierung der Membran. Das in dieser Arbeit verwendete Cholesterol (Cholest-5-en-3 β -ol, C₂₇H₄₆O, M = 386,66 g/mol)

wurde von der Firma Avanti Polar Lipids, INC. (Alabaster, AL, USA) bezogen. Vertiefende Informationen lassen sich den nachstehenden Referenzen entnehmen [14, 151].

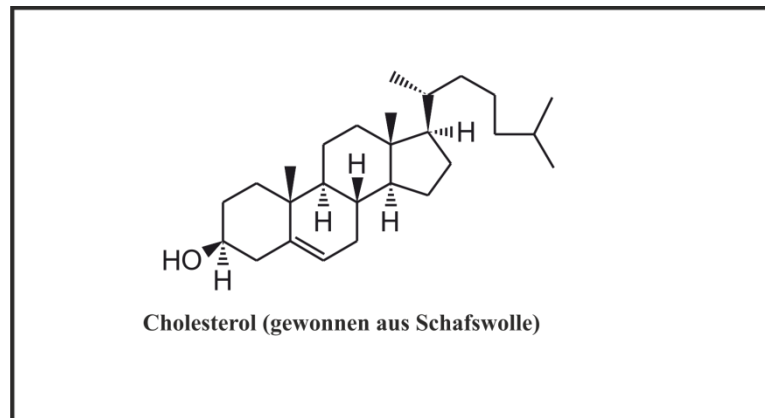


Abbildung 15: Strukturformel des verwendeten Cholesterols.

(<http://avantipolarlipids.com> [Tag des Zugriffs: 22.01.2013])

3.2 VERWENDETE LIPOPOLYSACCHARIDE

In dieser Arbeit sind drei unterschiedliche Lipopolysaccharide untersucht worden. Sie wurden aus dem Bakterienstamm WBB01 von *Escherichia coli* (in Folge *E. coli*), aus der Mutante R60 des Bakterienstammes *Salmonella enterica* serovar Minnesota sowie aus dem PMB-resistenten Bakterienstamm R45 *Proteus mirabilis* gewonnen. Allen untersuchten LPS-Spezies fehlt die O-spezifische Seitenkette. Sie werden als R-Form LPS oder Raumutanten-LPS bezeichnet, wobei sich die Bezeichnung R-Form (R-Form von engl. *rough*) von einer rauhen Bakterienoberfläche ableitet im Gegensatz zu einer LPS-Spezies mit O-spezifischer Seitenkette, die durch eine glatte Bakterienoberfläche gekennzeichnet ist. Sie wird als S-Form LPS (S-Form von engl. *smooth*) bezeichnet. Das R-Form LPS der Kernregion lässt sich aufgrund seiner Zuckerkettenlänge weiter differenzieren, wobei das LPS mit der kürzesten Zuckerkette als Re LPS und das mit vollständiger Zuckerkette als Ra LPS bezeichnet wird.

Zu den sogenannten Tiefraumutanten oder Re LPS, die aus dem toxischen Lipid A-Teil und den beiden 3-Deoxy-D-manno-2-octulonsäuren (Kdo) der inneren Kernregion bestehen, zählen die untersuchten LPS-Spezies R45 von *Proteus mirabilis* sowie das LPS WBB01 von *E. coli* (Abbildung 8).

Das LPS der Raumutante R60 von *Salmonella enterica* serovar Minnesota verfügt über eine vollständige Kernregion und wird als Ra LPS bezeichnet. Diese LPS-Spezies fand als „LPS-Prototyp“ Eingang in alle Untersuchungen zur Interaktion von AMP mit LPS (Abbildung 8).

Die in dieser Arbeit verwendeten LPS wurden mit der Phenol/Chloroform/Petroleumether-Methode aus den jeweiligen Bakterienstämmen und deren Mutanten extrahiert, aufgereinigt, lyophilisiert und in die natürliche oder Triethylamin-Salzform gebracht [49]. Standard Assays der aufgereinigten Lipopolysaccharide zur Bestimmung des Glucosamingehaltes, des totalen und organischen Phosphorgehaltes sowie zur Bestimmung der Fettsäureresteverteilung stimmten mit den erwarteten und bereits bekannten chemischen Eigenschaften für die jeweiligen LPS-Serotypen und deren molekularen Strukturen überein [118].

Die molare Masse, die Nettoladung sowie die interne Bezeichnung der in dieser Arbeit untersuchten Lipopolysaccharide lassen sich Tabelle 3 entnehmen.

LPS	Stamm	MM/ Da	Ladung/ e_0	Interne Bezeichnung
LPS WBB01	<i>Escherichia coli</i> WBB01	2238	-4,0	HL 162
LPS R45	<i>Proteus mirabilis</i> R45	2369	-3,0	HL 97
LPS R60	<i>Salmonella enterica</i> serovar Minnesota R60	4300	-7,0	HL 165

Tabelle 3: Verwendete Lipopolysaccharide.

3.3 VERWENDETE PUFFER

Zur Präparation der Proben und Durchführung von Experimenten wurden Puffer verwendet. Die Zusammensetzung der Puffer ist den Versuchsbedingungen und Anforderungen angepasst worden, die durch die Unterschiedlichkeit der Methoden und deren Messprinzipien bestimmt wurden.

Die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 auf Lipopolysaccharide und Lipidmembranmodelle wurde nach Möglichkeit in einer biologischen Umgebung, die dem System Blut in pH-Wert und Ionenstärke entspricht, getestet.

Zur Untersuchung der Interaktion von festkörperunterstützten Lipidmembranmodellen mit LPep19-2.5 mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) wurde ein Puffer (in Folge als Puffer A bezeichnet) bestehend aus 100 mM NaCl, 50 mM HEPES und 2 mM CaCl_2 mit einem pH-Wert von 7,4 gewählt. Aus vorhergehenden Versuchsreihen zur Darstellung von Lipidmembranmodellen in der Laborgruppe Biophysik und aus der Literatur ist bekannt, daß die

Anwesenheit von zweiwertigen Ionen wie Kalzium (Ca^{2+}) im Puffer zur Stabilisierung der Lipiddomänen nicht nur beiträgt sondern auch notwendig ist [116].

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von LPS-Aggregaten mit den SALP erfolgte mit einem Puffer (in Folge als Puffer B bezeichnet) bestehend aus 100 mM NaCl und 50 mM HEPES mit einem pH-Wert von 7,4. Hier konnte auf den Einsatz von zweiwertigen Ionen verzichtet werden, da diese nicht zur Stabilisierung der LPS-Aggregate notwendig sind. Darüber hinaus sollte eine Interaktion von zweiwertigen Kationen mit den negativ geladenen LPS-Aggregaten vermieden werden.

Die verwendeten Puffer sind mit Milli Q angesetzt worden. Die pH-Wert Einstellung erfolgte mit Natriumhydroxid (NaOH) und Salzsäure (HCl). Die Puffer wurden mit einem Bakterienfilter mit einem Porendurchmesser von 0,22 μm der Firma Merck Millipore, (Billerica, MA, USA) sterilfiltriert und in sterile Glasflaschen (Schott AG, Mainz, Deutschland) gefüllt. Zur Langzeitlagerung wurden die Puffer bei +4 °C gelagert. Für Experimente am AFM wurden Puffer mit Raumtemperatur verwendet.

3.4 VERWENDETE BAKTERIEN

Es wurden drei verschiedene Bakterienstämme verwendet:

Escherichia coli Stamm WBB01 (Re)

Proteus mirabilis Stamm R45 (Re)

Salmonella enterica serovar Minnesota R60 (Ra)

Die Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten antimikrobiellen Peptide auf die oben angeführten Bakterien wurde durch die bildgebende Rasterkraftmikroskopie untersucht.

3.4.1 *ESCHERICHIA COLI*

Das zur Familie der *Enterobacteriaceae* (griech. Darm) gehörende Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*, 1919 entdeckt von Theodor Escherich) kommt im menschlichen und tierischen Darm als Kommensale vor. Bakterielle Infektionen im Menschen werden häufig durch *E. coli* verursacht. Das Bakterium ist im Allgemeinen fakultativ pathogen und wirkt außerhalb seines natürlichen Lebensraumes, des Darms, krankheitsauslösend. Zu den durch *E. coli* verursachten extraintestinalen Infektionen werden Infektionen der Harn- und Gallenwege sowie der Gallenblase sowie Appendizitis, Peritonitis, Wundinfektionen bis hin zu Sepsis

gezählt. Früh-und Neugeborene können durch die Infektion mit *E. coli* eine Meningitis entwickeln. Im Bereich der Forschung, Medizin und Biotechnologie ist das gerade, stäbchenförmige und peritrich begeißelte Bakterium das am weltweit meist studierte Bakterium und dient als Modellorganismus.

3.4.2 *PROTEUS MIRABILIS*

Der verwendete Stamm *Proteus mirabilis* (in Folge *P. mirabilis*) R45 gehört zur Gattung *Proteus* in der Familie *Enterobacteriaceae*. Die Gram-negativen pleomorphen Stäbchenbakterien sind fakultativ anaerob, nicht sporenbildend, peritrich stark begeißelt und sehr beweglich. Die in ihrem Erscheinungsbild sehr wandelbaren (pleomorphen) Bakterien (benannt nach dem griech. Hilfgott Proteus, der vielfältige Erscheinungsformen hat) sind opportunistische Krankheitserreger, die natürlicherweise im Darm von Mensch und Tier [152] und in der Natur ubiquitär vorkommen. Proteusbakterien zählen zu den wichtigsten aeroben Proteinzeretzern und sind an den meisten Fäulnisprozessen beteiligt. Bei immungeschwächten Personen können Harnwegsinfekte, Pneumonien, Wundinfektionen und letztlich Sepsis ausgelöst werden [155]. Die klinische Bedeutung dieses Erregers ist gering, jedoch zeigen einige Stämme gegen β -Lactam-Antibiotika wie z.B. Penicilline oder Cephalosporine Resistenzen.

3.4.3 *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR MINNESOTA

Die Gattung der *Salmonellen* gehört zu den *Enterobacteriaceae*. Klinisch relevant ist die Unterart *S. enterica*, wobei mehr als 2000 Serovare von Spezies bekannt sind. Grundsätzlich lassen sich typhöse *Salmonellen* von enteritischen *Salmonellen* unterscheiden.

Die Serovare *Typhi* und *Paratyphi A, B* und *C* rufen bereits mit kleinen Infektionsdosen (10^2 - 10^3 Bakterien) typhöse Salmonellosen hervor. Der Übertragungsweg erfolgt durch eine direkte Schmierinfektion oder indirekt über Lebensmittel und Trinkwasser. Die Keime gelangen in den Intestinaltrakt und wandern in das lymphatische Gewebe ein, um sich von dort lymphogen und hämatogen auszubreiten. Sie sind Ursache einer systemischen, generalisierten Infektion und eines septischen Krankheitsbildes. Die Behandlung der typhösen Salmonellose ist mit Aminopenicillinen und Fluorochinolonen möglich.

Die nichttyphösen Serovare *Enteritidis* und *Typhimurium* lösen mit relativ großen Infektionsdosen ($> 10^6$ Bakterien) enteritische Salmonellosen aus. Der Infektionsweg ist indirekt über kontaminierte Lebensmittel. Sie rufen eine auf den Gastrointestinaltrakt

beschränkte Infektion hervor, die sich durch akuten Brechdurchfall und Fieber äußert. Bei enteritischen Salmonellosen ist bei gutem Immunstatus zumeist eine symptomatische Therapie ausreichend. Immunkompromittierte Patienten, Kleinkinder sowie Patienten in hohem Lebensalter können dagegen eine Sepsis entwickeln.

3.5 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE

In dieser Arbeit sind primär folgende antimikrobielle Peptide verwendet worden:

- i. Leitpeptid LPep19-2.5, Aspidasept[®]
- ii. LPep19-8.3acyl
- iii. LPep19-4LF
- iv. Polymyxin B (PMB)

Die Aminosäuresequenzen und die molare Masse der antimikrobiellen Peptide LPep19-2.5 und deren fluoreszenzmarkierte Varianten, LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF sowie die um den hydrophoben C-Terminus gekürzten Variante LPep19-2.5gek können der Tabelle 4 entnommen werden.

Das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) besteht aus 20 Aminosäuren. Der kationische Charakter des Peptids basiert auf den positiven Ladungen der basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K). Der C-Terminus des Peptids besteht aus den hydrophoben und unpolaren Aminosäuren Tryptophan (W) und Phenylalanin (F). Die dominierenden strukturellen Eigenschaften von Aspidasept[®] sind somit die positive Nettogesamtladung und ein hydrophober C-Terminus einer definierten Länge. Die Primärstruktur von Aspidasept[®] kann Abbildung 16 entnommen werden.

Bezeichnung des Peptids	Aminosäuresequenz	Molare Masse [Da]
LPep19-2.5/ Aspidasept®	GCKKYRRFRWKF KG KFWFWG	2711
NBD-LPep19-2.5	NBD-GCKKYRRFRWKF KG KFWFWG	2874
Rho-LPep19-2.5	Rho-GCKKYRRFRWKF KG KFWFWG	3124
LPep19-2.5gek	GCKKYRRFRWKF KG K	1988
LPep19-8.3Acyl	SRRYKKFRWKF KG RWFWFGHexanCONH ₂	2779
LPep19-4LF	GCKKYRRFRWKF KG LFLFG	2462

Tabelle 4: Liste der untersuchten antimikrobiellen Peptide.

Die blau hervorgehobenen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) stehen für basische, positiv geladene Aminosäuren.

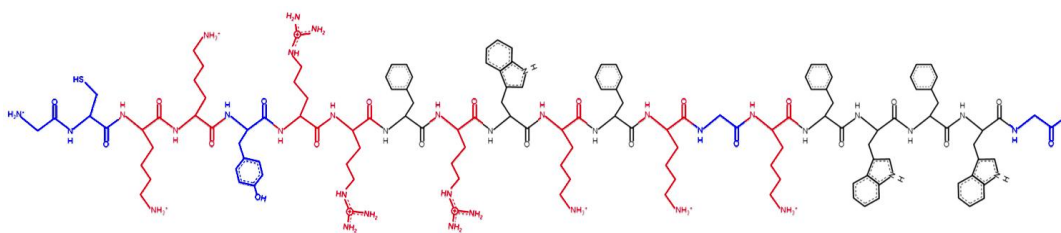


Abbildung 16: Primärstruktur von Aspidasept mit dem Programm PepDraw generiert.

Basische, positiv geladene Aminosäuren sind rot, unpolare, hydrophobe Aminosäuren sind schwarz und polare, ungeladene Aminosäuren sind blau dargestellt. (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html> [Tag des Zugriffs: 08.02.2013])

3.5.1 PEPTIDSYNTHESE

Die in dieser Arbeit untersuchten antimikrobiellen Peptide wurden am Forschungszentrum Borstel synthetisiert. Die Peptide wurden mit einem amidierten C-Terminus mittels der 1963 R. Bruce Merryfield eingeführten Methode der Festphasenpeptidsynthese durch einen automatisierten Peptidsynthetisierer (Model 433A der Firma Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) mit einem polymeren Träger (*Fmoc-Rink amide resin*) gemäß dem 0,1 mmol FastMoc Syntheseprotokoll des Herstellers hergestellt. Die am N-Terminus befindliche Schutzgruppe Fmoc (9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl) wurde entfernt. Die Entfernung der Seitenketten-schutzgruppen des Peptidylharzes und die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte in einem Schritt durch den Zusatz von einer Mischung aus konzentrierter Trifluoressigsäure (90 %), Anisol (5 %), Thioanisol (2 %) und Dithiothreitol (3 %) bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Nach Spaltung wurde die Suspension durch eine Fritte in eiskaltes Diethylether

überführt. Die präzipitierten Peptide wurden durch Zentrifugation getrennt und wiederholt mit kaltem Ether gewaschen. Die finale Aufreinigung der so gewonnenen Peptide erfolgte über eine RP-HPLC mit einer Aqua-C18 Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten unter Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure zur vollständigen Protonierung der Peptide. Die Reinheit der Peptide (bis 98 %) wurde analytisch mit RP-HPLC-UV bei 214 nm oder MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft. Die Peptidsequenzen wurden beim europäischen Patentamt zur Erlangung eines internationalen Patentbesitzes eingereicht (veröffentlicht im Oktober 2009 durch das Europäische Patentamt, 2108 372 A1).

Das Prinzip einer Peptidsynthese ist in Abbildung 17 dargestellt.

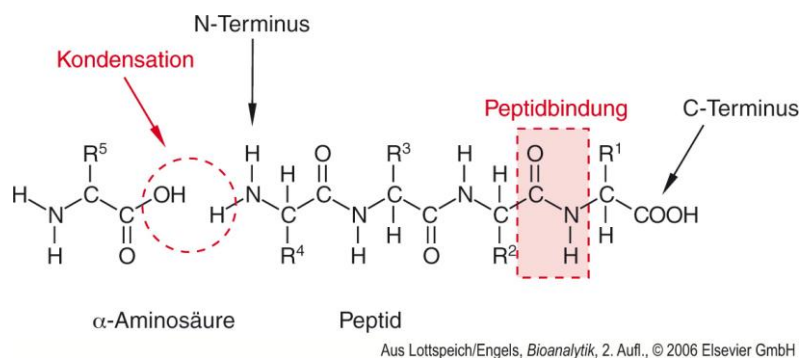


Abbildung 17: Prinzip der Peptidsynthese.

Die Peptidbindung, die die Aminosäuren verknüpft, wird durch eine Kondensationsreaktion erzielt.

(Bioanalytik, 2. Auflage, 2006, Kapitel 21, Seite 517, Lottspeich/ Engels. Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science und Business Media [85])

Das Leitpeptid LPep19-2.5 bzw. Aspidasept® wurde zusätzlich von der Firma Bachem AG, Bubendorf, Schweiz unter GMP-Bedingungen (GMP: *good manufacturing practice*) hergestellt. Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem unter GMP-Bedingungen hergestellten Peptid LPep19-2.5 von der Firma Bachem durchgeführt.

3.6 REAGENZIEN

Natriumchlorid (NaCl) wurde von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Zur pH-Wert-Einstellung wurde Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH), der Firma Merck, Darmstadt eingesetzt.

Kalziumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ist von der Firma Fluka Biochemika bezogen worden. Es diente zur Stabilisierung und Aufspreiten der Lipidvesikel auf einem festen Substrat [116].

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

Chloroform: Das Lösemittel Chloroform (Merck, Darmstadt) wurde zur Lösung aller Lipidmodellsysteme angewendet.

Mischung aus Chloroform und Methanol: Das Verhältnis von Chloroform (CHCl_3) zu Methanol (CH_3OH) entsprach 9:1. Diese Mischung ist zur Lösung aller Lipopolysaccharid-Stammlösungen verwendet worden. Der Hersteller beider Komponenten ist auch hier die Firma Merck, Darmstadt.

Trifluoressigsäure (TFA): TFA (Merck, Darmstadt) wurde als 0,01%-ige Lösung eingesetzt, um antimikrobielle Peptide als Stammlösung länger chemisch stabil zu halten.

3.6.1 TRÄGERMATERIAL

Als Trägermaterial für rekonstituierte festkörperunterstützte Lipidmembranmodelle und Bakterien ist ein Schichtsilikat mit der Zusammensetzung $\text{KAl}_2[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2]$ verwendet worden. Es wird als Mica (dt.: Glimmer) bezeichnet und findet eine breite Anwendung bei rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen als Substrat. Jede Mica-Schicht misst etwa eine Schichtdicke von etwa 1 nm Dicke. Mica zeichnet sich durch eine harte, hydrophile und kaum polarisierbare Oberfläche aus. Die negativ geladene Oberfläche ermöglicht ein Anlagern der hydrophilen Kopfgruppen der Lipide auf dem Träger. Eine Ausbildung einer geschlossenen Lipidmembran wird somit ermöglicht.

Mica kann funktionalisiert bzw. mit speziellen funktionellen Gruppen beschichtet werden, um seine Materialeigenschaften auf die zu untersuchende Spezies einzustellen. Für Experimente mit negativ geladenem LPS kann es von Vorteil sein, das negativ geladene Mica mit Poly-L-Lysin (PLL) zu beschichten. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin führt zu einer Positivierung der Mica-Oberfläche durch die Aminofunktion des Lysins. Das negativ geladene LPS kann sich auf dem positiven PLL aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen besser aufspreiten. Von einer Funktionalisierung von Mica mit PLL konnte abgesehen werden, da Vorversuche zeigten, daß LPS in ausreichendem Maße auf Mica spreitet und haftet und die Beschichtung von Mica mit PLL keinen Vorteil bietet.

Das Trägermaterial Mica vereinigt außerdem zwei Vorteile im Hinblick auf die Einsetzbarkeit. Zum einen läßt sich Mica problemlos in die benötigten Formen schneiden und zum anderen können durch einfaches Aufkleben und Abziehen eines Streifens Tesafilms (Tesa[®], Hamburg, Deutschland) einzelne Schichten von Mica entfernt werden. Die dadurch atomar glatte und saubere Oberfläche eignet sich als Träger von Lipidfilmen und auch von ganzen Bakterien. Das Trägermaterial Mica (*Ruby Red Mica Sheets*) wurde von der Firma *Electron Microscopy Sciences* (Ft. Washington, PA, USA) bezogen.

3.7 GERÄTELISTE ZUR VESIKELPRÄPARATION

Sartorius research R200D (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

MS 2 Minishaker (IKA[®] Labortechnik, Staufen, Deutschland)

Vibrax VXR *basic* (IKA[®] Labortechnik, Staufen, Deutschland)

MS 3 digital (IKA[®] Labortechnik, Staufen, Deutschland)

Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland)

Branson sonifier cell disruptor B15 (Branson, Danbury, CT, USA)

Pipetten: „Reference“, „Research“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Einmalmaterial (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

(Reagiergefäße, Röhrchen, Vorkulturröhrchen, Petrischalen)

Glas Schraubampullen 1 ml (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser ist zunächst aus der Reinstwasseranlage der Firma Reinstwasser System SG und später durch eine Anlage der Firma MilliQ, MilliQ Advantage A10, gewonnen worden. Das sterilfiltrierte Wasser wurde mittels Filter der Firma Millipak[®] Millipore mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm filtriert. Für beide Systeme lag die garantierte Leitfähigkeit bei 0,055 µS/cm.

3.8 PRÄPARATION DER BAKTERIEN

Die in LB Medium (Merck, Darmstadt, Deutschland) gewachsenen und in der Log-Phase befindlichen Bakterien *E. coli* Stamm WBB01, *P. mirabilis* Stamm R45 sowie der Stamm

R60 von *Salmonella enterica* serovar Minnesota (5×10^8 CFU/ml Bakteriensuspension) wurden entweder unbehandelt (Kontrolle) oder mit AMP (LPep19-2.5, LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF), in Konzentrationen zu 10 µg/ml und 20 µg/ml bei +37 °C für 30 Minuten in Puffer (20 mM HEPES, pH 7,4) inkubiert, verwendet. Die Bakteriensuspensionen wurden mittels Pipette auf Objektträger mit fixierten Micaplättchen aufgetragen. Überschüssige Flüssigkeit bzw. Medium wurde mit Hilfe von Filterpapier entfernt. Die Proben sind für 24 Stunden an Luft getrocknet worden. Um etwaige Salz- und Pufferreste zu entfernen, wurden die Proben vor der Messung mit dem Rasterkraftmikroskop mit 1 bis 3 ml MilliQ Reinstwasser gespült und erneut an Luft getrocknet. Die Messungen wurden mit einem MFP-3D Rasterkraftmikroskop (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) an Luft bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Lebendkeimzahlbestimmung (CFU) ist aus den gleichen Bakteriensuspensionen durchgeführt worden. Die in PBS verdünnten Bakteriensuspensionen wurden auf Petrischalen mit LB Agar ausgestrichen, bei +37 °C inkubiert und ausgezählt.

3.9 PRÄPARATION DER *SMALL UNILAMELLAR VESICLES* (SUV)

In wässrigen Lösungen finden sich Phospho- und Sphingolipide oberhalb ihrer kritischen Micellenkonzentration (CMC) zu Aggregaten zusammen, sogenannte Liposomen. Aufgrund des amphiphilen Charakters der Phospholipide bilden sich Vesikel mit einer Lipiddoppelschicht aus, wobei die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide sich zum wässrigen Medium orientieren und die hydrophoben Fettsäureketten der Phospholipide den polaren Wassermolekülen abgewandt sind. Es entsteht eine Doppelschicht der Lipide wie in der Zellmembran, wobei sich die unpolaren und hydrophoben Fettsäureketten der Lipide im Inneren der Doppelschicht befinden. Die so entstandenen Vesikel können Flüssigkeiten einschließen. Es können auch gezielt Substanzen in Vesikel eingeschleust werden. Die Liposomen sind zumeist sphärisch, können jedoch auch in gestreckter Form vorkommen. Die in dieser Arbeit verwendeten Lipidvesikel verfügen über einen Durchmesser von etwa 1 µm und werden in der Literatur als *small unilamellar vesicles* (SUV) bezeichnet.

Die Mischungsverhältnisse der untersuchten ternären Modellsysteme können Tabelle 5 entnommen werden.

Modellsystem	Verhältnis	Molverhältnis	Zusammensetzung der Komponenten [μmol/l]
DOPC/ SM/ Chol	45:45:10	45 mol% : 45 mol% : 10 mol%	225 : 225 : 50
PE/PG/CL	81:17:2	81 mol% : 17 mol% : 2 mol%	405 : 85 :10

Tabelle 5: Konzentrationen und Verhältnisse der ternären Lipidmodellsysteme.

Zur Herstellung von Lipidvesikeln wurden die Substanzen auf einer Analysenwaage (*Sartorius research R200D*, Firma Sartorius, Göttingen, Deutschland) in Schraubampullen aus Glas (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) eingewogen und vollständig in Chloroform gelöst. Ternäre Systeme, also Systeme bestehend aus drei Komponenten, wurden aus den Stammlösungen der Teilkomponenten unter Berücksichtigung der gewünschten molaren Verhältnisse erzeugt. Nach Lösen der Komponenten in Chloroform ist das Lösemittel Chloroform unter einem Stickstoffstrom restlos bis zur Trocknung entfernt worden. Die eingetrockneten Lipidsysteme bzw. Lipide sind in dem jeweiligen Puffer rehydriert worden. Die im Puffer rehydrierten Lipide wurden im Anschluß für etwa eine Minute im kontinuierlichen Modus bei 20 % *Output* sonifiziert (*Branson, Sonifier, Cell disruptor B15*, Firma Branson, Danbury, CT, USA), um eine vollständige Lösung der Lipide zu gewährleisten und um eine einheitliche Vesikelgröße herzustellen. Das Phasengleichgewicht der Lipide wurde durch das dreimalige Durchlaufen eines Temperaturzyklusses erreicht, wobei die Lösungen alternierend für 30 Minuten bei +4 °C kühl gehalten oder auf +60 °C (Blockthermostat BT 100) aufgeheizt wurden. Die Lösungen waren nach einer Inkubationszeit von mindestens 12 Stunden bei +4 °C gebrauchsfertig und wurden ständig bei +4 °C gelagert. Rasterkraftmikroskopische Messungen bis zu sechs Wochen nach Vesikelpräparation zeigten keine Auswirkungen der Lagerdauer auf die Ergebnisse und Qualität der Versuche.

Die eingesetzten Konzentrationen der Lipide in den Lipidvesikeln wurden den angewandten Messmethoden und deren Anforderungen angepasst. So sind rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von festkörperunterstützten Lipiddoppelmembranen (*solid supported bilayer*) mit Lipidlösungen in einer Ausgangskonzentration von 500 μM durchgeführt worden. Dagegen lagen die Konzentrationen mit infrarotspektroskopischen Studien für die gleichen Lipidsysteme oder Lipide im Bereich von 10 mM.

Die Konzentration der chloroformischen Stammlösungen für Lipide wurde zu 1 mM gewählt.

3.10 PRÄPARATION VON LIPOPOLYSACCHARID-AGGREGATEN

Die Herstellung von Lipopolysaccharid-Aggregaten erfolgte analog der Präparation für Lipidsysteme. Die Präparation unterscheidet sich allerdings in der Wahl des Lösemittels zur Herstellung einer Stammlösung. Hier ist eine Mischung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 9:1 gewählt worden, da sich die Polarität des Methanols positiv auf die Löslichkeit von Lipopolysacchariden auswirkt. Nach Abdampfen des Lösemittelgemisches unter einem Stickstoffstrom sind die Lipopolysaccharide in einem kalziumfreien Puffer aufgenommen worden. Die rasterkraftmikroskopischen Messungen von LPS-Aggregaten erfolgten in Puffer B, bestehend aus 100 mM NaCl und 50 mM HEPES mit einem pH-Wert von 7,4 (siehe Kapitel 3.3). Alle weiteren Schritte der Präparation entsprechen der Herstellung der Lipidvesikellösungen. Die Konzentration der Lipopolysaccharidlösungen wurde analog zu den Lipidlösungen den jeweiligen Messmethoden und Techniken angepasst und lag für AFM-Messungen bei 500 μ M. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls bei +4 °C.

3.11 HERSTELLUNG ANTIMIKROBIELLER PEPTIDLÖSUNGEN

Die antimikrobiellen Peptide LPep19-2.5, LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF sowie PMB wurden für eine Langzeitlagerung in 0,01%-iger TFA gelöst bzw. frisch in den jeweiligen Puffern und notwendigen Konzentrationen für die verwendeten Techniken angesetzt und bei +4 °C gelagert.

3.12 PRÄPARATION VON FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN LIPIDDOPPELSCHICHTEN

Rekonstituierte, festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten (*lipid bilayer*) für rasterkraftmikroskopische Messungen entstehen durch das Aufspreiten von Lipidvesikeln auf einem Substrat [66]. Das in dieser Arbeit verwendete Substrat ist Mica (siehe Kapitel 3.6.1). Durch seine hydrophile Oberfläche eignet es sich besonders mit den hydrophilen Kopfgruppen von Lipiden in Wechselwirkung zu treten. Das Aufspreiten von Lipidvesikeln auf einem Substrat sowie die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht kann Abbildung 18 entnommen werden.

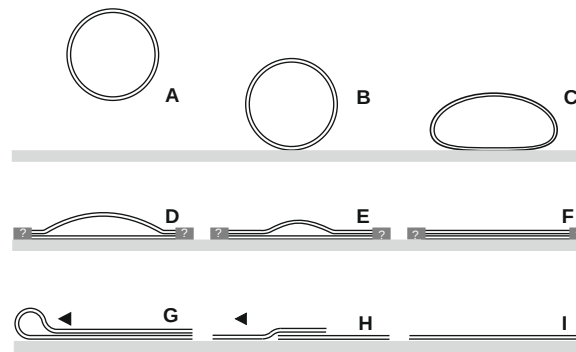


Abbildung 18: Entstehung eines *lipid bilayer* durch Aufspreiten eines Liposomens auf einem Substrat.

(verändert nach Jass *et al.*, 2000 [66])

(A-C): Ein in Puffer gelöstes Liposomen nähert sich dem Substrat, wird vom Substrat adsorbiert und vergrößert seine Kontaktfläche mit der Substratoberfläche unter Abflachen. (D-F): Ausgehend von den Rändern des Liposomens bilden sich flache, übereinanderliegende *lipid bilayer* unter Kollabieren des Liposomens aus. (G-I): Durch rollende oder gleitende Bewegungen löst sich die obere Lipiddoppelschicht und wird von noch unbedeckter Substratoberfläche adsorbiert unter Freilegung einer einzelnen *lipid bilayer* Struktur.

Der Träger einer rekonstituierten Lipidmembran, Mica, ist mittels Komponentenkleber Epoxy (2 TON Epoxy, ITW Devcon, Danvers, MA, USA) auf den Boden des Deckels einer Kunststoffpetrischale fixiert worden. Zur Präparation von Lipiddoppelschichten wurden 100 μl einer 500 μM konzentrierten Lipidvesikellösung auf die zuvor mit Tesafilm[®] gereinigte Micaoberfläche (Fläche 2 cm^2) aufgetragen. Nach einer kurzen Einwirkzeit von etwa 30 Sekunden ist die Probe mit 2900 μl Puffer überschichtet worden. Die Endkonzentration der Lipidlösungen entsprach damit 16,67 μM . Das Probengefäß ist während der Inkubation mit einem weiteren Deckel bedeckt und mit Parafilm gegen Kontaminationen versiegelt worden. Zur Erzeugung einer komplett geschlossenen Membran wurde das ternäre Lipidsystem (DOPC/SM/Chol) in den vorbereiteten Probengefäßen mindestens 16 Stunden unter langsamem und kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Die Proben wurden vor jeder Messung dreimal mit je 1 ml Puffer gespült, um nicht an Mica gebundene Vesikel oder Liposomen weitestgehend zu entfernen und damit eine störende Interaktion mit der *Cantileverspitze* des AFM von noch frei in Lösung befindlichen Liposomen zu vermeiden. Die Vermeidung des Ablösens oder Austrocknens der auf Mica immobilisierten Lipidmembran wurde durch eine Überschichtung mit Puffer während der gesamten Versuchsdauer gewährleistet.

3.12.1 PRÄPARATION DER FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN LIPIDSYSTEME MIT AMP

Für die Präparation rekonstituierter Lipidmembransysteme auf Mica wurden zwei Präparationstechniken angewandt. In der ersten Variante ist eine Lipidvesikellösung auf Mica aufgebracht worden und nach etwa 60 Sekunden eine Lösung aus antimikrobiellen Peptiden in der gewünschten molaren Konzentration hinzugesetzt worden. Die Mischung beider Substanzen ist mit Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, pH7,4) überschichtet und über Nacht (etwa 16 Stunden) inkubiert worden. Überschüssige und nicht an Mica gebundene Lipidreste wurden durch dreimaliges Spülen der Probe mit je 1 ml Puffer weitestgehend entfernt. Die Messung dieser Präparation erfolgt in einem bereits eingestellten Gleichgewicht (statisch).

Im Gegensatz zur statischen Messung wurde bei der dynamischen Messung einem auf Mica immobilisierten Lipidmembransystem eine Lösung von antimikrobiellen Peptiden während einer Messung einmalig zugesetzt und die Kinetik laufend rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die der Lipidprobe zugesetzten antimikrobiellen Peptide diffundieren zu der auf Mica immobilisierten Membran und entfalten dort nachfolgend ihre Wirkung. Empirisch konnte die Diffusionszeit bzw. die Zeit bis zum Beginn der ersten Veränderungen (Wirkungseintritt) etwa mit 60 Minuten beobachtet werden.

3.12.2 PRÄPARATION VON FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN LPS MIT AMP

Die Präparation von LPS-Aggregaten auf Mica und die Zugabe und Messung der Peptide entspricht der Präparation von Lipidvesikeln (Kapitel 3.12.1), wobei hier auf den Zusatz von zweiwertigen Kalziumionen verzichtet werden konnte.

3.13 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE

Die Methode der Rasterkraftmikroskopie (englisch *Atomic Force Microscopy*, AFM) ist 1986 von G. Binnig, C.F. Quate und C. Gerber [17] eingeführt und seither vielfach modifiziert und für biologische Fragestellungen optimiert worden. Diese Methode unterscheidet sich von den bisher bekannten optischen Techniken durch ihr Meßprinzip. Streng genommen stellt die Rasterkraftmikroskopie ein taktils Meßsystem dar, obgleich die Methode als Mikroskopie bezeichnet wird. Das Meßprinzip beruht auf der Wechselwirkung zwischen einer Oberfläche einer Probe und einer feinen Tastspitze, die sich an einem Federbalken, dem *cantilever*, befindet. Die Tastspitze rastert eine Oberfläche ab und erfährt dabei Kräfte, die sich in einer

Ablenkung der Tastspitze äußern. Seit Einführung dieser Technik im Jahr 1986 findet diese Methode immer mehr Einzug in die Erforschung von biologischen Systemen. Die Möglichkeit, Proben mit minimalem präparativen Aufwand bei nahezu physiologischen Bedingungen abzubilden, eröffnet neue Wege in der Untersuchung biologischer Systeme bis in den subzellulären Bereich. So können unter anderem durch geeignete Präparationstechniken rekonstituierte Festkörper-gestützte Lipidsysteme [42, 43, 93], Bakterien und ihre Membranen [39, 40, 124], Zellen (*live cell imaging*) [41, 42] sowie Zellbestandteile [81] untersucht werden. Durch geeignete Funktionalisierung der Tastspitze ist sogar die Manipulation von Zellen und ihren Bestandteilen im Nanometerbereich möglich [98]. Für medizinische Fragestellungen eignet sich die Rasterkraftmikroskopie zur Beobachtung von Wirkungen von Medikamenten auf biologische Systeme im Nanometerbereich [16, 43]. Anders als bei rasterelektronenmikroskopischen Techniken (REM) werden die Proben bei rasterkraftmikroskopischen Techniken (AFM) nicht mit einer leitenden Schicht und unter Hochvakuum gemessen. Als zusätzlicher Vorteil, den diese Methode bietet, können Proben an Luft oder in Flüssigkeit vermessen werden.

In der Rasterkraftmikroskopie können zwei Modi, dynamisch oder statisch, zur Untersuchung von Proben verwendet werden. Das allgemeine Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 19 dargestellt.

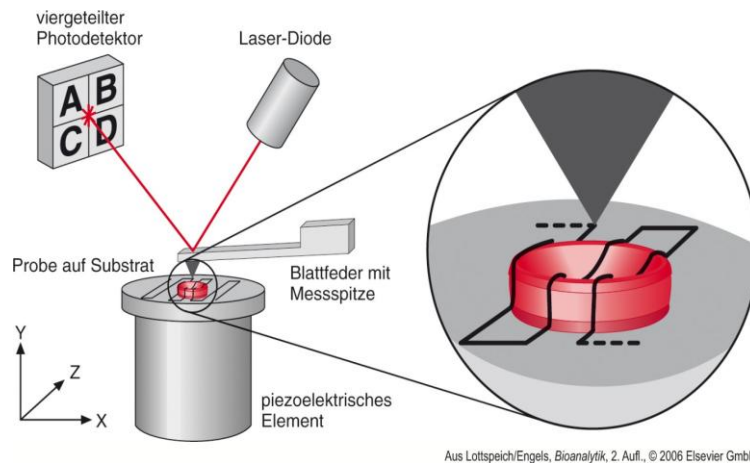


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskops.

Die auf einer Unterlage immobilisierte Probe wird mit einem dreiachsigen piezoelektrischen Element unter der Messspitze bewegt. Während dieser Rasterbewegung wird die Verbiegung der Blattfeder mithilfe eines Laserstrahles und eines Photodetektors gemessen. Die Spannungsdifferenz zwischen den oberen und unteren Segmenten des Photodetektors ($V = (A + B) - (C + D)$) ist dabei ein direktes Maß für die Verbiegung der Feder.

(Bioanalytik, 2. Auflage, 2006, Kapitel 19, Seite 496, Lottspeich/ Engels. Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science und Business Media [85])

Im statischen Modus, oder auch als *contact-mode* oder *DC-mode* bezeichnet, bleibt die Tastspitze des *cantilevers* in direktem Kontakt zur Probenoberfläche. Es treten dabei repulsive Kräfte zwischen den Elektronenhüllen der Atome der Tastspitze des *cantilevers* und der Probenoberfläche auf.

Der dynamische Modus wird auch als *non-contact-mode* oder *AC-mode* bezeichnet. Hier wird der *cantilever* über einen Piezokristall in z-Richtung in Schwingung versetzt [90]. Bei Messungen an Luft findet keine Berührung zwischen Tastspitze und Probe statt. Hier tragen Van-der-Waals Kräfte zu schwachen attraktiven Kräften bei, die sich detektieren lassen und damit eine Aussage über die Topographie der Probenoberfläche zulassen. Werden Messungen in flüssigen Medien durchgeführt, stehen repulsive Kräfte im Vordergrund. Ein Regelkreis hält hier die Kräfte, die sich zwischen Tastspitze und Probe ausbilden, konstant. Aus der Kenntnis der Federkonstanten des *cantilevers*, die sich auch für jeden eingesetzten *cantilever* bestimmen läßt, kann die auf den *cantilever* wirkende Kraft, die zur Durchbiegung des Federbalkens führt, bestimmt werden.

Die oben angeführten Abbildungsmodi sind in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

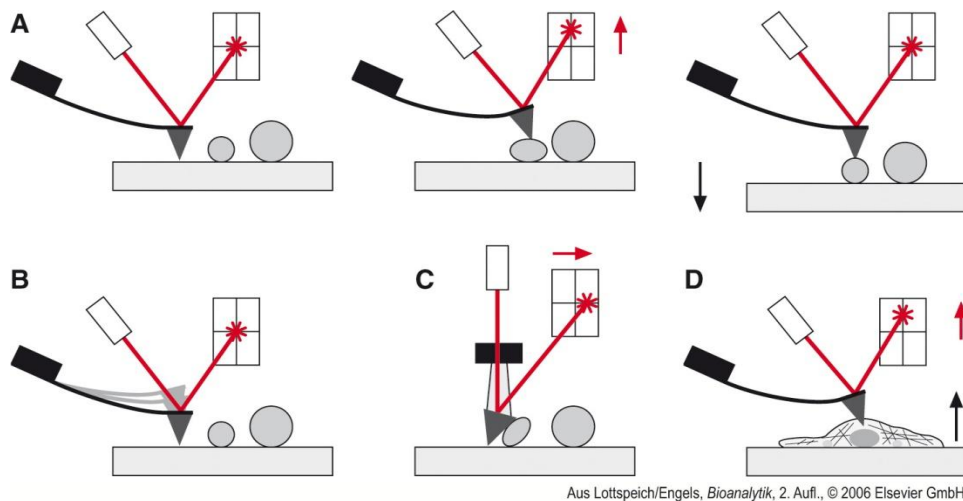


Abbildung 20: Abbildungsverfahren der Rasterkraftmikroskopie.

A Im Kontaktmodus ist die Spitze in ständigem Kontakt mit der biologischen Probe und folgt daher bei Hindernissen der Oberflächenstruktur der Probe, was zu Verbiegungen der Blattfeder führt. Deshalb wird mithilfe einer Regelschleife die Kontaktkraft (Verbiegung der Feder) durch Verändern der Z-Position der Probe konstant gehalten. Aus dem Korrektursignal kann dann auf die Topographie der Probenoberfläche geschlossen werden. **B** In dynamischen Abbildungsverfahren oszilliert die Blattfeder nahe ihrer natürlichen Resonanzfrequenz mit einer Amplitude von wenigen Nanometern. Somit wird das Objekt nur kurzzeitig berührt, wodurch seitliche Wechselwirkungen reduziert werden. Die Regelschleife wird in dynamischen Abbildungsverfahren dazu verwendet, die Amplitude der Oszillation konstant zu halten. **C** Die seitliche Abtastrichtung der AFM-Spitze kann das biologische Objekt verformen. Dies kann durch die präzise Einstellung der Kontaktkraft, der Rastergeschwindigkeit und der Rückkopplungsparameter verhindert werden. **D** Zur Elastizitätsbestimmung wird die Spitze gegen ein weiches Objekt (z.B. Zellen) bewegt. Durch das Verhältnis von gefahrener Distanz und der tatsächlichen Federverbiegung lässt sich die Elastizität der des Objektes berechnen.

(Bioanalytik, 2. Auflage, 2006, Kapitel 19, Seite 497, Lottspeich/ Engels. Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science und Business Media [85])

Die Erfassung des Signals erfolgt über einen Laser, der auf den Federbalken fokussiert ist und von dort auf eine Vier-Segment-Photodiode reflektiert wird. In Ruhelage befindet sich der Laserstrahl auf dem Schnittpunkt der vier Photodioden. Bei einer Durchbiegung des Federbalkens, wird der Laserstrahl auf eine andere Position der Vier-Segment-Photodiode reflektiert. Die Ablenkung wird als *deflection* bezeichnet [9, 87]. Die Auslenkungen des *cantilevers* während einer Abtastung einer Oberfläche können so auf der Vier-Segment-Photodiode detektiert werden. Der relativ große Abstand von Photodiode zu *cantilever* bewirkt, daß sogar kleinste Auslenkungen des Federbalkens zu sehr großen Auslenkungen an der Detektionsseite führen und somit sehr große Auflösungen erzielt werden.

Das Abrastern der Probenoberfläche wird über piezoelektrische Kristalle ermöglicht, die durch das Anlegen eines elektrischen Feldes eine Strukturänderung erfahren. Die Probe wird in x/y-Richtung abgetastet, wobei eine schnelle Abtastung in x-Richtung einer langsamen Abtastung in y-Richtung gegenübersteht (Abbildung 21).

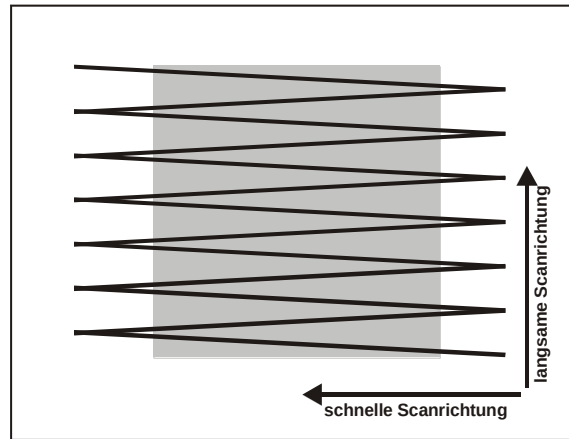


Abbildung 21: Das Bild eines Rasterkraftmikroskops entsteht durch die Abrasterung einer Oberfläche.

Man spricht von einer schnellen und einer langsamen Scanrichtung. An den Umkehrpunkten zwischen zwei Abtastlinien befinden sich die xy-Piezos in einem nichtlinearen Bereich. Für das Endbild wird deshalb nur das Innere des Abtastbereichs verwendet.

Das in dieser Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop (MFP-3D, Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) ist in der Lage, ein Areal bis zu einer Größe von $90\text{ }\mu\text{m} \times 90\text{ }\mu\text{m}$ abzurastern.

Um die Kraft zwischen Probe und Tastspitze während des Abrasterns konstant zu halten, wird vor Beginn der Messung ein Sollwert eingestellt. Für die Messungen im DC-Modus (*contact-mode*) wird die *deflection* als Sollwert herangezogen. Messungen im AC-Modus (*non-contact-mode* oder *tapping-mode*) beziehen sich auf die Amplitude als Sollwert. Während einer Messung wird der aktuelle Meßwert mit dem jeweiligen Sollwert verglichen und bei Abweichungen die Höhe z nachgeregelt. Die schnelle und genaue Regelung dieser Abweichungen wird mittels eines PID (proportionaler, integraler und differentieller) - Verstärkers erzielt (Abbildung 22).

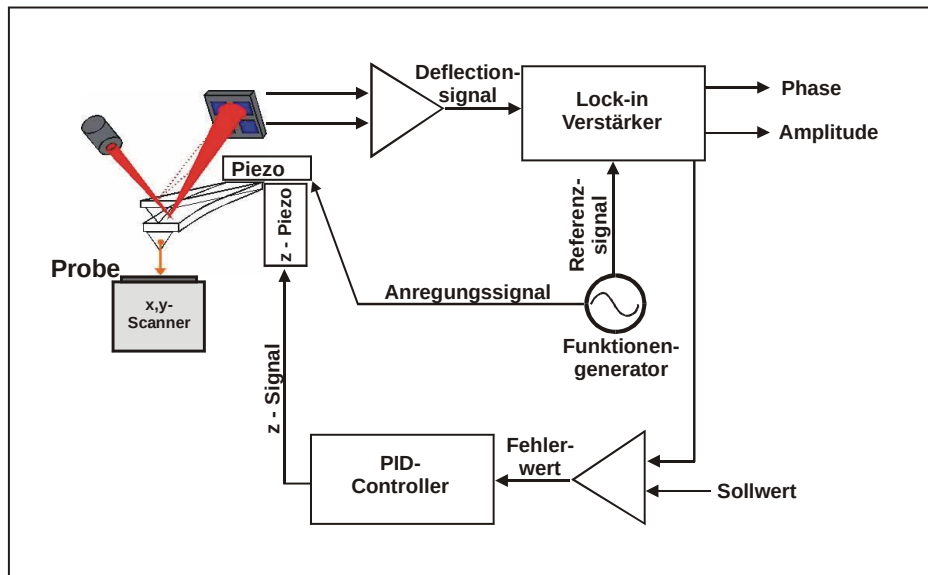


Abbildung 22: Schematischer Aufbau eines im AC-mode betriebenen Rasterkraftmikroskops.

Der reflektierte Laserstrahl wird von einer Photodiode detektiert. Über ein externes Modul, das den AC-Piezo ansteuert, wird die Anregungsfrequenz gewählt. Ein Lock-in Verstärker analysiert Amplitude und Phase der *Cantilevers*chwingung. Um die z-Höhe des *cantilevers* korrekt einzustellen, wird die Amplitude als Rückkopplungssignal für den Abstand zwischen Spitze und Probe genutzt. (Dissertation Arne Böhling Oktober 2007, Kapitel 5, Seite 53)

Aus den z-Daten des Regelkreises und den x/y-Positionen des *cantilevers* wird das Bild über die Software (Igor Pro 6,04 MFP-3D) aufgebaut. Das im AC-Modus befindliche Rasterkraftmikroskop baut zeitgleich mit Hilfe der Software (Igor Pro 6,04 MFP-3D) drei Bilder auf. Es wird ein Höhen-, ein Amplituden und ein Phasenbild ausgegeben. Das Höhenbild zeigt die Topographie einer Probe. Im Phasenbild wird die Phasenlage der *Cantilevers*chwingung im Vergleich zur Phase der Anregungsfrequenz abgebildet.

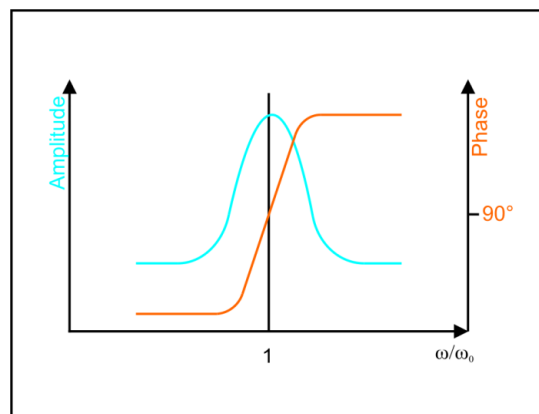


Abbildung 23: Amplituden- und Phasenverhalten eines *cantilevers* in Luft.

Im Resonanzfall erreicht die Amplitude ein Maximum, während die Phase um 90° verschoben ist.

Im Resonanzfall liegt die Phase bei 90° (Abbildung 23). Sobald eine Wechselwirkung von Tastspitze zu Probe durch auftretende Van-der-Waals Kräfte eintritt, nimmt die Phase für die attraktiven Kräfte einen Wert von über 90° ein. Für repulsive Kräfte liegt der Wert unterhalb von 90° . Die Resonanzfrequenzen bei Messungen in Puffer mit *cantilevern* des Typs OMCL800-PSA der Firma Olympus, Tokyo, Japan bewegen sich im Bereich bis zu 10 kHz. Die Messungen an Luft wurden bei Resonanzfrequenzen, je nach eingesetzten *cantilever*, um 200 kHz durchgeführt.

Bei Interaktion der Tastspitze mit der Probenoberfläche verändert sich die Schwingung des *cantilevers* durch die Abgabe kleiner Energiebeträge. Die Anregungsschwingung und die Phase des *cantilevers* werden dadurch aus ihrem Gleichklang gebracht. Für den Fall, daß der *cantilever* auf ein Hindernis trifft, wird die Amplitude des *cantilevers* verändert. Ein Regelkreis regelt die Amplitude durch Bewegen des piezoelektrischen Kristalls in z-Richtung auf den Sollwert zurück. Mit Hilfe des Amplitudenbildes können Konturen genau betrachtet werden. Das auch als „Fehlerbild“ bezeichnete Amplitudenbild im *tapping-mode* (AC-Modus) eignet sich zur Einstellung der optimalen Messparameter für die jeweilige Probe.

In Abbildung 24 sind typische Fehlerquellen, hervorgerufen durch die Geometrie und Abmessungen des *cantilevers* in Wechselwirkung mit strukturellen Details der Probenoberfläche, wiedergegeben.

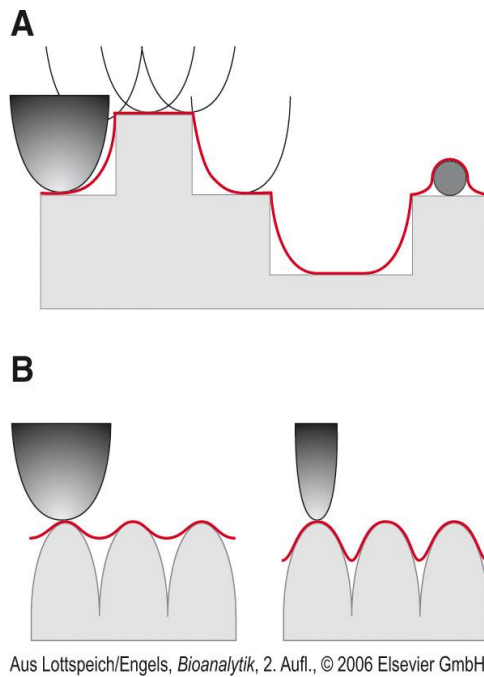


Abbildung 24: Überlagerungseffekte zwischen Spitze und Probe können die AFM-Topographie verfälschen.

A Die Spitze kann aufgrund ihres endlichen Durchmessers sehr scharfen Kanten nicht folgen. Daher stellt die erhaltene Topographie (rote Linie) eine Überlagerung zwischen Spitze und Probe dar. **B** In vielen Fällen kann die Periodizität von Strukturen unabhängig vom Spitzendurchmesser korrekt aufgelöst werden.

(Bioanalytik, 2. Auflage, 2006, Kapitel 19, Seite 498, Lottspeich/ Engels. Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science und Business Media [85])

3.13.1 CANTILEVER

Der *cantilever* (Federbalken) besteht aus dem Träger, dem sogenannten *chip*, und der Spitze, dem sogenannten *tip*. Der *cantilever* stellt die Tastspitze des Rasterkraftmikroskops dar. Die Eigenschaften und die Qualität des *cantilevers* tragen entscheidend zur Durchführung und zum Ergebnis einer Messung bei. *Cantilever* werden aus Silizium oder Siliziumnitrit gefertigt. Die Träger der verwendeten *cantilever* OMCL-RC 800 PSA der Firma Olympus OPTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan bestehen aus Pyrex Glas. Sie verfügen über eine Gold-oder Chrombeschichtung, die eine optimale Reflexion des Laserstrahls gewährleisten (Abbildung 25).

Die Resonanzfrequenzen an Luft betragen für den OMCL-RC 800 PSA 19 kHz für den WLlever (WL für *wide long*) und 18 kHz für den NLlever (NL für *narrow long*). Die Federkonstanten liegen im ersten Fall bei 0,10 N/m und im zweiten Fall bei 0,05 N/m. Sie

eignen sich zur Messung weicher Proben, etwa rekonstituierten Lipidmembranen und LPS-Aggregaten.

Der *tip* hat eine Höhe von 2,9 μm bei einem Radius von $< 20\text{ nm}$ und einem Winkel von $< 70^\circ$.

Härtere Proben, etwa Bakterien, wurden im *non-contact*-Modus mit dem NSG11 B (NT-MDT, Moskau, Russland) mit einer Federkonstanten von 5,5 N/m und einer Resonanzfrequenz von 150 kHz gemessen. Im *contact*-Modus wurde der *cantilever* CSG11 (NT-MDT, Moskau, Russland) für die Messung von Bakterien verwendet. Für den CSG11 A wird die Federkonstante mit 10 N/m und die Resonanzfrequenz mit 0,03 kHz angegeben, während der CSG11 B durch eine Federkonstante von 20 N/m und eine Resonanzfrequenz von 0,1 kHz gekennzeichnet ist. Die *cantilever* CSG 11 und NSG 11 sind zur optimalen Reflexion des Laserstrahls durch den Hersteller mit einer Goldschicht beschichtet worden. Eine Aufstellung zu den Spezifikationen, der in dieser Arbeit verwendeten *cantilever*, kann Tabelle 10 in Kapitel 9 (Anhang) entnommen werden.

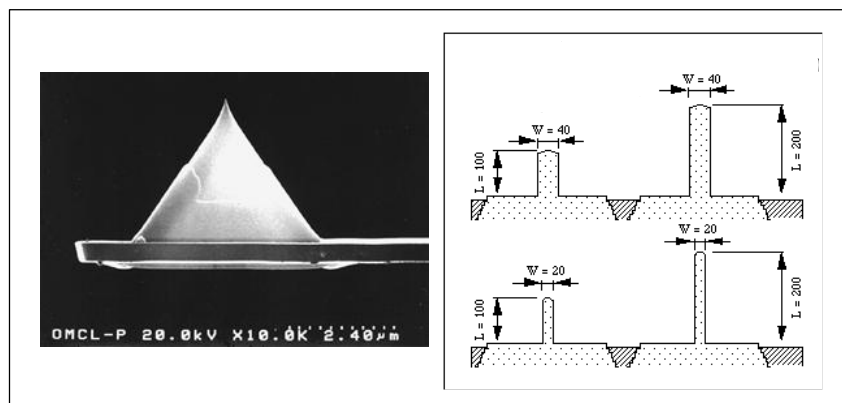


Abbildung 25: OMCL-RC800PSA *cantilever*.

(Firma Olympus OPTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan)

Die vom Hersteller angegebenen Spezifikationen können von *cantilever* zu *cantilever* differieren. Unterschiedliche Chargen können sich in den Eigenschaften und der Qualität unterscheiden. Die Wahl des optimalen *cantilevers* richtet sich in erster Linie nach der zu untersuchenden Probe.

Die *cantilever* sind Verbrauchsmaterial und können mehrfach Anwendung finden. Ein Verschleiß des *tips* geht mit einer massiven Verschlechterung der Auflösung und einer starken Veränderung der Resonanzfrequenz einher.

3.13.2 PRÄPARATION VON FESTKÖRPERUNTERSTÜTZTEN LIPIDSYSTEMEN UND LPS IN DER TEMPERIERZELLE

Das in dieser Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop MFP-3D™ des Herstellers *Asylum Research*, Santa Barbara, CA, USA ist mit einer Temperiereinheit, *Petri Dish Holder and Heater*, ausgestattet. Mit diesem Zubehör ist es möglich, Proben bis zu einer Temperatur von +45 °C aufzuheizen. Es eignet sich besonders zur Untersuchung von Proben unter nahezu nativen Bedingungen. Die Temperiereinheit, *Petri Dish Heater*, ist für Messungen von Raumtemperatur bis +45 °C mit einer Genauigkeit von $\pm 0,05$ °C konzipiert worden. Als Probenträger können Zellkulturschälchen verschiedener Hersteller verwendet werden. Eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Zubehörs kann dem „*Petri Dish Data Sheet 28*“ (<http://www.asylumresearch.com/Products/PetriDishHolderHeater/PetriDishHolderHeaterDS.pdf> [Tag des Zugriff: 09.04.2013]) entnommen werden.

Die Präparation von Lipidsystemen und LPS unter temperierten Bedingungen unterscheidet sich in der Wahl des Probenschälchens. Hier wurden Zellkulturschälchen aus Polystyrol (BD Falcon 351006) verwendet. Die Präparation von Lipidsystemen und LPS erfolgte entsprechend der weiter oben beschriebenen Verfahrensweise (Kapitel 3.12).



Abbildung 26: Aufbau eines „*Petri Dish Holder and Heater*“ für das Rasterkraftmikroskop MFP 3-D (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA).

(<http://www.asylumresearch.com/Products/PetriDishHolderHeater/PetriDishHolderHeaterDS.pdf>)

[Tag des Zugriffs: 09.04.2013])

3.14 KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG (*SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING, SAXS*)

Kleinwinkel-Röntgenstreuung (englisch *Small Angle X-ray Scattering, SAXS*) stellt eine zerstörungsfreie Untersuchungsmethode zur Bestimmung der inneren Nanostruktur verschiedenster Materialien dar. Bei der Methode wird die Probe mit monochromatischem Röntgenlicht beleuchtet und die elastisch gestreuten Röntgenstrahlen mittels eines Röntgenlicht-Detektors festgehalten. Schließlich erlaubt die Auswertung der Röntgenkleinwinkelstreubilder nähere Aussagen über die Nanostruktur der untersuchten Materialien zu treffen. Dies betrifft etwa die Bestimmung von Größe und Form von Makromolekülen (Proteine und Viren), oder dient wie in der vorliegenden Arbeit zur Vermessung der Nanostruktur von molekularen Aggregaten, und zwar von Lipidmembranen. Mit SAXS werden typischerweise strukturelle Details in einem Bereich von 10 bis 1000 Å (1 Å = 0.1 nm) erfasst. Im Weiteren werden die für die Arbeit relevanten Grundlagen zu SAXS erläutert sowie der Messaufbau beschrieben. Erläuterungen zur Daten-Reduktion und Analyse schließen dieses Kapitel ab. Detaillierte Übersichten zu SAXS können folgenden Referenzen entnommen werden [52, 77].

3.14.1 EINFÜHRUNG IN DIE GRUNDLAGEN VON SAXS

Einfallendes monochromatisches Röntgenlicht (elektromagnetische Strahlung) wird an den Hüll-Elektronen der Atome gestreut. Für die Auswertung von SAXS Streubildern steht der elastisch gestreute Anteil (Thomson-Streuung) im Vordergrund. Liegt in der Probe zusätzlich eine periodische Ordnung in einem Gitter vor, kommt es in diskreten Beugungsrichtungen zu konstruktiver Interferenz der gestreuten Partialwellen. Man spricht in diesem Fall auch von Röntgenbeugung (englisch *diffraction*), welcher einen Spezialfall der Röntgenstreuung darstellt. Mit Hilfe des Bragg'schen Gesetzes [24] lassen sich die Beugungsbedingungen beschreiben:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta), \quad (\text{Gleichung 1})$$

wobei n eine ganze Zahl (1, 2, 3...), λ die Wellenlänge des Röntgenlichtes, d der sogenannte d -Wert des Gitters (englisch *d-spacing* oder *lattice spacing*) und θ der Beugungswinkel ist. Konstruktive Interferenz liegt vor, wenn der Wegunterschied zweier Strahlengänge ein Vielfaches von der Wellenlänge entspricht, das heißt, genau in diesem Fall befinden sich auch die gebeugten Strahlen in Phase. In Abbildung 27 ist das Bragg'sche Gesetz geometrisch veranschaulicht.

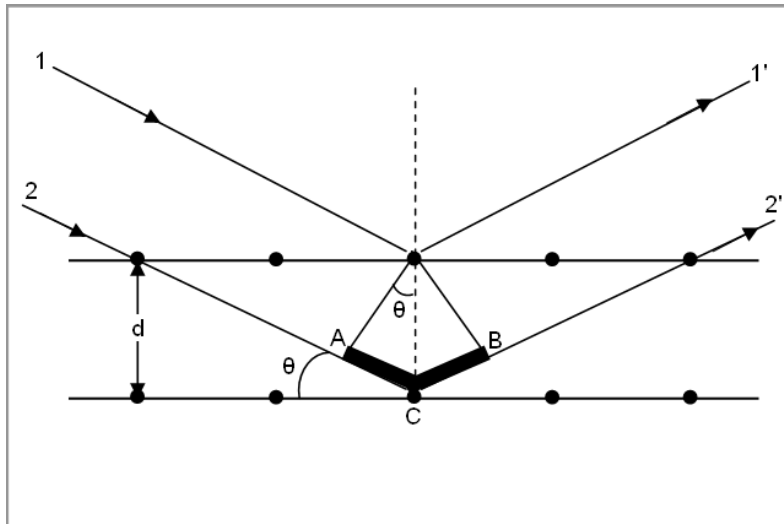


Abbildung 27: Geometrische Veranschaulichung des Bragg'schen Beugungsgesetzes.

Der Gangunterschied von der Strahlführung 2 gegenüber Strahlführung 1 ist mit fetten Linien hervorgehoben (Strecke AC plus Strecke CB). Er lässt sich über den Beugungswinkel und dem d -Wert ausdrücken als $2 \cdot \sin(\theta)$.

Die vorliegenden SAXS Experimente wurden an lipidhaltigen lyotropen Flüssigkristall-Systemen durchgeführt. Um den Anteil der elastischen Streuung an diesen biologischen Proben abzuschätzen, sind zur Veranschaulichung in Tabelle 6 alle auftretenden Effekte in Wasser von 1 mm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ (8 keV) aufgelistet. Der größte Anteil der einfallenden Strahlung wird absorbiert, der zweitgrößte Anteil wechselwirkt überhaupt nicht (36,5 %) und nur ein geringer Prozentsatz wird elastisch gestreut. Bei einer solch geringen Streuwahrscheinlichkeit gilt es daher für SAXS Experimente, die Schichtdicke der Probe d so zu wählen, daß das Verhältnis von elastisch gestreuter Intensität I zu Primärintensität P_0 maximiert wird. Für die optimale Schichtdicke gilt:

$$d_{\text{opt}} = 1/\mu, \quad (\text{Gleichung 2})$$

wobei μ der Absorptionskoeffizient des durchstrahlten Materials ist. Für biologische Proben lässt sich diese optimale Schichtdicke d_{opt} hinreichend gut über den Absorptionskoeffizienten von Wasser abschätzen. Bei einer Photonenergie von 8 keV ist $\mu_{\text{H}_2\text{O}} = 0,95 \text{ mm}^{-1}$, das heißt, man erhält eine optimale Schichtdicke von etwa 1 mm.

Photoeffekt (Absorption)	Elastische Streuung (Thomson)	Inelastische Streuung (Compton)
59 %	3 %	1,5 %

Tabelle 6: Effekte in Wasser bei einer durchstrahlten Dicke von 1 mm bei einer Wellenlänge von $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ (Photonenenergie 8 keV).

3.14.2 DER SAXS-MESSAUFBAU AM SYNCHROTRON HAMBURG

Die in dieser Arbeit beschriebenen SAXS Experimente an Endotoxin-Aggregaten und deren Wechselwirkung mit verschiedenen Peptiden wurden an der Strahlführung X33 des DORIS-Speicherring der Europäischen Molekular Biologischen Labore (EMBL) am HASYLAB am Synchrotron Hamburg durchgeführt [120]. In Abbildung 28 ist die SAXS Experimentierstation schematisch dargestellt.

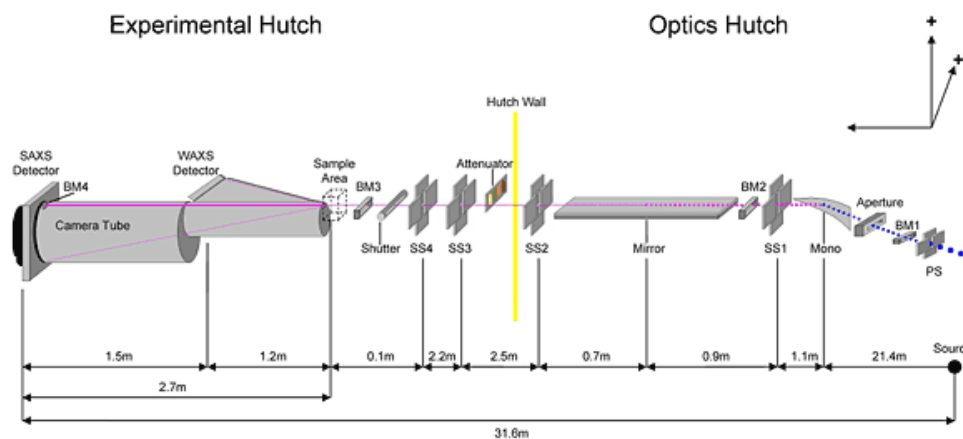


Abbildung 28: SAXS Experimentierstation X33 des EMBL Hamburg.

Das erste optische Element ist der Monochromator (Mono) bei dem eine Wellenlänge von $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ selektiert wird. Der Spiegel (*Mirror*) fokussiert die Röntgenstrahlen auf die Detektorebene. Verschiedene Schlitzsysteme bestimmen die Strahlgröße und dienen zur Reduktion der parasitären Streustrahlung (PS: *Primary Slits*; SS: *Secondary Slits*). Ein „Beam Monitor“ (BM) erfasst die Primärintensität des Röntgenstrahles (Abbildung aus Referenz [120]).

Die Messstation X33 ist im Speziellen für das Vermessen von Makromolekülen in Lösung konzipiert worden, insbesondere sind hier Protein- und Nukleinsäure-Lösungen zu nennen, darüber hinaus ist sie aber auch geeignet, um andere biologische Materialien wie verschiedenste Lipidphasen zu studieren. Hierzu werden die Lipiddispersionen in Quarzkapillaren transferiert (Durchmesser 1-1,5 mm) oder bei viskoserer Gelen wurde ein Probenhalter (Abbildung 29) mit flachen Glimmerfenstern, bestehend aus Mica (Dicke 25

μm), verwendet. Die Proben können mit einer Genauigkeit von $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Bereich von 5 bis $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert werden. Die untersuchten Lipid A und LPS-haltigen Membransysteme wurden typischerweise mit jeweils vier statischen Messungen charakterisiert, wobei zwei Messungen unterhalb des Schmelzpunktes der Lipide (z.B. $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) und zwei oberhalb des Schmelzpunktes (z.B. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $80\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorgenommen wurden. Um eine ausgezeichnete Zählstatistik zu gewährleisten, wurden Belichtungszeiten von jeweils 120 s gewählt, das heißt, jede Probe wurde im Ganzen acht Minuten belichtet. Mögliche Strahlenschäden durch die Röntgenlicht-induzierte Bildung von Wasserradikalen ($\text{OH}^{\cdot}$, H^+) wurden durch regelmäßige Kontrollmessungen ermittelt. In allen Fällen waren das zuerst und das zuletzt erfasste Streubild bei derselben Temperatur praktisch identisch. Alle SAXS Streubilder der vermessenen Lipidproben wurden mit einem 2-dimensionalen Röntgenlicht-Detektor (Pilatus 1M) der Firma DECTRIS (Villigen PSI, Schweiz) aufgenommen [63].

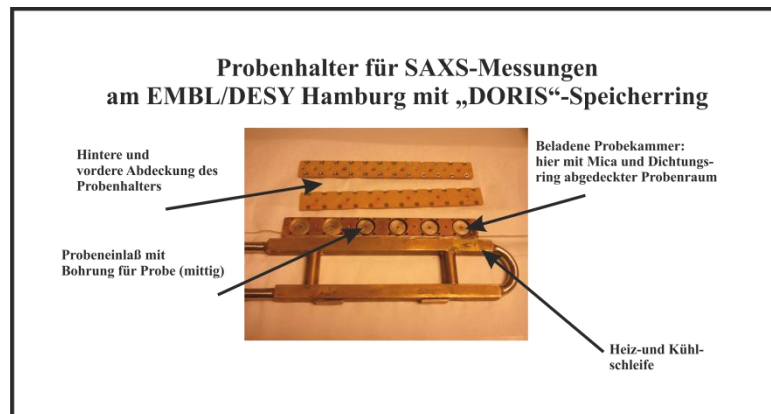


Abbildung 29: Temperierbarer Probenhalter für SAXS-Messungen.

3.14.3 SYNCHROTRON-STRAHLUNG

Synchrotron-Lichtquellen [76] zeichnen sich vor allem durch die hohe Brillanz des erzeugten Lichtes aus (als Brillanz wird die Zahl der Photonen pro Fläche, Raumwinkel und Zeit mit Bezug auf einen schmalen Wellenlängenbereich bezeichnet), das heißt, bei der sehr viel niedrigeren Strahldivergenz im Vergleich zu Laborlichtquellen und der sehr viel höheren Intensität (etwa um einen Faktor von 1000 bis 10000) können Experimente mit sehr viel kürzeren Belichtungszeiten durchgeführt werden und gleichzeitig wird eine höhere strukturelle Auflösung erzielt. Dies bedeutet, daß nicht nur statische Aufnahmen von biologischen Proben möglich sind, sondern ganze Prozesse quasi filmisch festgehalten werden können und dies mit einer zeitlichen Auflösung bis in den Mikrosekundenbereich [161].

3.14.4 SAXS DATEN-REDUKTION UND ANALYSE

Bei der Auswertung von SAXS Daten werden grundsätzlich zwei Arbeitsschritte unterschieden. Zunächst müssen die Rohdaten aufbereitet werden. Zur Daten-Reduktion zählt die Kalibrierung des Streuwinkels und der Abzug der Untergrundstreuung. Da der Streuwinkel 2θ von der Energie abhängt (siehe Bragg-Gesetz (1)) wird in der Literatur meist ein Wellenlängen-normierter Streuvektor mit dem Betrag q (oder s) definiert:

$$q = 2\pi s = 4\pi \sin(\theta) / \lambda, \quad (\text{Gleichung 3})$$

worin 2θ der Streuwinkel (Abbildung 30) und λ die Wellenlänge des verwendeten Röntgenlichts ist.

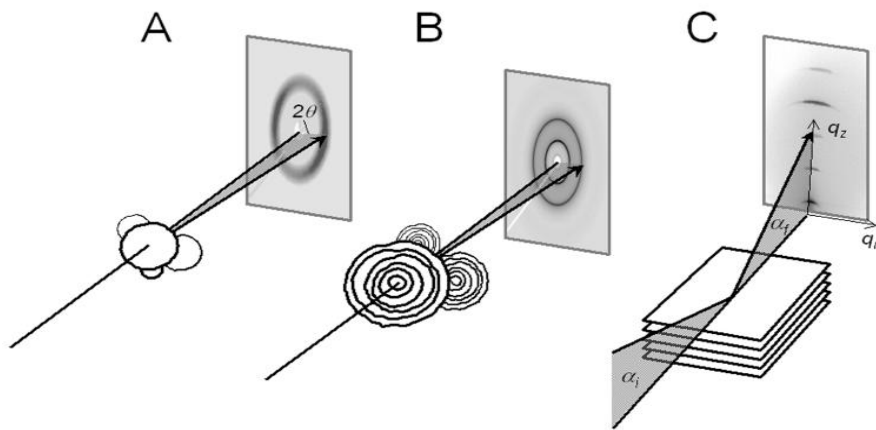


Abbildung 30: SAXS an verschiedenen Membransystemen.

(A) Streuung an unilamellaren Vesikeln, (B) und multilamellaren Vesikeln (Liposomen) und (C) an multilamellaren Lipidfilmen. Während in Transmission vermessene unilamellare Vesikel nur diffus streuen, kommt es bei der Vermessung von Liposomen zur Röntgenbeugung. Die erste und zweite Ordnung sind deutlich als Debye-Scherrer Ringe zu erkennen. Beim streifenden Einfall an einem geordnetem Membran-Stapel sind die Röntgenreflexe eher punktförmig (Abbildung aus Referenz [111]).

Zur Kalibrierung des Streuvektors wurde Silberbehenat-Pulver verwendet. Silberbehenat liegt bei Raumtemperatur in lamellaren Doppelschichten vor und ihr Gitterabstand (d -Wert) ist genau bekannt, das heißt, $d = 58,38 \text{ \AA}$ [64]. Da weiterhin für die kleinen Streuwinkel bei SAXS näherungsweise gilt, dass $\sin(\theta) \sim \theta$ ist, erscheinen die Beugungsreflexe im Röntgendetektor in äquidistanten Abständen. Somit stehen die Reflexpositionen von Silberbehenat am Detektor in einem linearen Zusammenhang mit den Detektorkanälen (Detektorpixeln):

$$s = a \cdot \text{Detectorchannel} + b \quad (\text{Gleichung 4})$$

Je nach Probe zu Detektorabstand werden typischerweise die ersten 4-6 Ordnungen von Silberbehenat vermessen, das heißt, $s(h) = h/d = 1/58,4, 2/58,4, 3/58,4 \text{ \AA}^{-1}$ etc., wobei die Beugungsordnung mit dem Miller-Index h beschrieben wird. Die Kalibrierungskonstanten a und b aus der Gleichung 4 werden mittels linearer Regression gelöst.

Nach der Kalibration des Streuwinkels, sollte der parasitäre Streuanteil, der im Wesentlichen durch die Untergrundstreuung, verursacht vom verwendeten Puffer der LPS-Dispersionen und von den Fenstern des benutzten Probenhalters, bestimmt ist, von den gemessenen Streubildern abgezogen werden. Praktisch bedeutet dies, daß zusätzlich zur Probe noch ein mit Puffer gefüllter Probenhalter sowie der leere Probenhalter vermessen werden. Die genaue Prozedur zum Untergrundabzug ist in der Referenz [77] beschrieben. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Röntgenbeugungsbilder sind durch prominente Bragg-Reflexe gekennzeichnet, die eine genaue Vermessung des Untergrundes nicht notwendig machen. Die Untergrundstreuung wurde mit Polynomen 2. Grades gefittet (Abbildung 31).

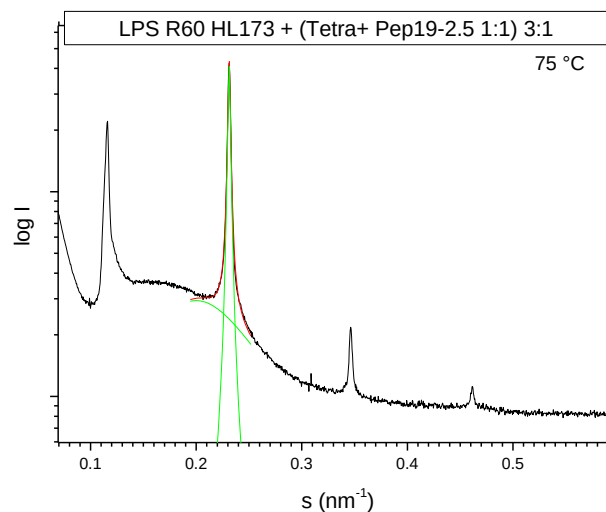


Abbildung 31: Röntgenbeugungsbild von LPS R60.

Anhand der zweiten Ordnung ($h = 2$) ist hier demonstriert, wie die diffuse Untergrundstreuung mit Hilfe eines Polynoms 2. Grades zusätzlich zum eigentlichen Reflex mitgefittet wurde. Der Bragg-Reflex selbst wurde mit einer Lorentz-Verteilung gefittet.

Die Daten Analyse der Röntgenbeugungsbilder erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt werden der Gittertyp und die dazu gehörigen Gitterparameter bestimmt. In dieser Arbeit lag die Mehrzahl der Proben in Form von multilamellaren Vesikeln vor, das heißt, in radialer Richtung liegt eine periodische Abfolge von Doppelschichtmembranen vor. Das dazu

gehörige Gitter ist in diesem Fall 1-dimensional und ist allein durch seinen Gitterabstand d bestimmt (d -Wert). Die auftretenden Reflexpositionen $s(h)$ sind proportional zum Miller-Index h . In der vorliegenden Arbeit wurde in einigen Fällen auch die Bildung von invers hexagonalen Lipidphasen beobachtet. Hierbei handelt es sich um ein Aggregat von Lipid-Nanoröhren auf einem hexagonalen Gitter. In diesem Fall ist $s(h,k)$ proportional zu $\sqrt{h^2 + hk + k^2}$ [111], wobei h und k die Miller-Indizes der 2-dimensionalen hexagonalen Gitters sind.

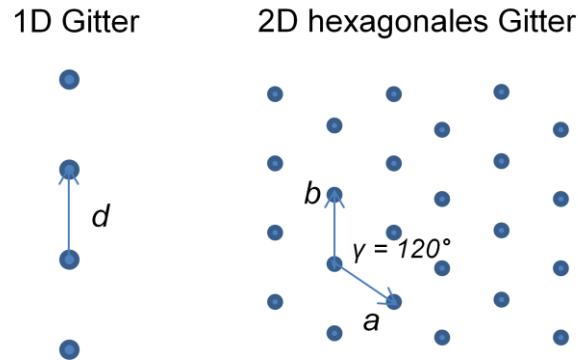


Abbildung 32: 1D Gitter und 2D hexagonales Gitter.

Im hexagonalen Gitter sind die Einheitsvektoren der Einheitszelle gleich groß ($a=b$) und schließen einem Winkel von 120° ein.

Beim Indizieren der lamellaren und hexagonalen Phasen müssen demnach die beobachteten Reflexpositionen eine lineare Abhängigkeit zu h bzw. zu $\sqrt{h^2 + hk + k^2}$ zeigen. Die Miteinbeziehung des Ursprungs bzw. der nullten Ordnung dient der Kontrolle, daß der gefundene lineare Auftrag der Reflexpositionen auf dem Gitter liegt.

Nach Bestimmung der Gitterparameter werden im zweiten Schritt die relativen Elektronendichten mittels einer Fourier Transformation bestimmt. Dazu werden zunächst alle Reflexe mit einer Lorentz-Verteilung gefittet. Die so bestimmten Intensitäten der Bragg-Reflexe (Flächen der Lorentz-Verteilung) werden aus geometrischen Gründen korrigiert, das heißt, $I(h,k)_{\text{kor}} = I(h,k) s(h,k)^2$ (näheres zu dieser sogenannten Lorentz-Korrektur kann Warren [154] entnommen werden). Schließlich ergeben sich die Amplituden $F(h,k)$ aus $\sqrt{I(h,k)_{\text{kor}}}$. Da nahezu alle lyotropen Lipidaggregate zentrosymmetrische Strukturen vorweisen, vereinfacht sich die Fourier-Analyse dahingehend, daß nur Kosinusterme berücksichtigt werden müssen. Folglich reduziert sich das Phasenproblem auf ein Vorzeichenproblem: entweder muß ein mit der Röntgenbeugung bestimmter relativer Elektronendichtekontrast, $\Delta\rho(h,k)$, addiert oder subtrahiert werden. Die Fourier-Reihe in 2D lautet also

$$\Delta\rho(\vec{r}) = \sum_{h,k}^{\text{max}} \alpha(h,k) \cdot F(h,k) \cdot \cos(2\pi\vec{r} \cdot \vec{s}(h,k)), \quad (\text{Gleichung 5})$$

worin $\alpha(h,k)$ die Phasenkonstante ist und nur die Werte +1 oder -1 annehmen kann. Die Phasen für verschiedene LPS-Membransysteme wurden bereits experimentell bestimmt und können übernommen werden [139]. Die Phasenkombination für die Amplituden der invers hexagonalen Phase ist der Referenz [112] zu entnehmen.

3.15 ELEKTRONENMIKROSKOPIE (EM) UND GEFRIERBRUCHTECHNIK

Das bildgebende Verfahren der Elektronenmikroskopie ist bereits seit den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt worden. Es basiert auf der Wechselwirkung von Elektronen, die von einer Elektronenquelle (etwa eine geheizte Kathode aus Wolfram) ausgehend, auf die Atome der Probe treffen. Die Methode der Elektronenmikroskopie bietet im Vergleich zur klassischen Lichtmikroskopie eine hohe Ortsauflösung sowie eine große Schärfentiefe. Der Zugang zu biologischen Proben wird allerdings durch das Anlegen eines Hochvakuums und die aufwendige Probenpräparation (etwa chemische Fixierung, Entwässerung und Einbettung in Kunststoff), die biologisch veränderte bzw. nicht mehr lebende Strukturen erzeugt, beschränkt. Die Beschichtung der Probe mit elektrisch leitfähigem Material führt ebenfalls zu biologisch veränderten bzw. nicht mehr lebenden Strukturen.

Diese Einschränkung für biologische Proben kann durch das Verfahren des Gefrierbruchs kompensiert werden, das insbesondere für die Abbildung von Membranen und Substrukturen von Zellen geeignet ist. Mit dem Verfahren des Gefrierbruchs können unfixierte sowie nicht eingebettete Gewebe dargestellt werden. Die bei dieser Methode verwendete Bedampfungstechnik der Bruchfläche in der Probe mit einem Platin-Kohlegemisch oder Wolfram in einem Winkel von 35° bis 45° (Schrägbedampfung) erzeugt eine etwa 2,5 nm dicke Matrizel, die durch eine senkrechte Bedampfung der Probe mit reinem Kohlenstoff (circa 20 nm) verstärkt wird. Die durch Schrägbedampfung erzeugten Proben ermöglichen eine plastischere Darstellung der Proben und ihrer Strukturen.

In dieser Arbeit ist die Gefrierbruchtechnik in Kombination mit dem Verfahren der cryo-Transmissionselektronenmikroskopie zur Anwendung gekommen. Die Proben des Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota und die Mischung aus dem Ra LPS mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) wurden zunächst bei Raumtemperatur bzw. bei +40 °C präpariert. Für die Durchführung der Gefrierbruchtechnik wurden geringe Mengen der Proben zwischen zwei Kupferprofile, wie sie für die Doppel-Replik-Technik üblich sind, positioniert. Mit der sogenannten „plunge-Technik“ sind die mit Proben beladenen Kupferprofile durch eine Mischung aus flüssigem Ethan/Propan (durch flüssigen Stickstoff gekühlt) eingefroren

worden. Das Gefrierbrechen und das Anfertigen der Matrizen erfolgte bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Vakuum mit dem Gefrierbruchinstrument BAF 400T (Fa. BAL-TEC, Liechtenstein; maximale laterale Auflösung etwa 1 nm). Die Bruchfläche der Proben wurde zunächst unter einem Winkel von 35° mit einem Platin-Kohlegemisch bedampft. Der etwa 2 nm dicke Schwermetallabdruck wurde nachfolgend durch eine dazu senkrechte Bedampfung einer etwa 20 nm dicken Kohlenstoffschicht stabilisiert. Reste der Probe aus LPS und dem Gemisch aus LPS und Peptid wurde durch eine Lösung aus Chloroform und Methanol entfernt. Die gereinigten Proben wurden auf einem feinen Geflecht aus Kupfer in das Elektronenmikroskop EM 901 (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) eingebracht und untersucht [91, 117].

3.16 FTIR SPEKTROSKOPIE

Die Methode der Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie eignet sich zur Bestimmung der Phasenübergangstemperatur von Lipiden und Lipopolysacchariden. Die Verschiebung der symmetrischen Streckschwingung ν_s der Methylengruppe (2850 cm^{-1}) der unpolaren Alkylketten zu höheren Wellenzahlen (2851 cm^{-1} bis 2854 cm^{-1}) kennzeichnet den Übergang von der Gelphase (L_{β}) in die flüssig-kristalline Phase (L_{α}) unter Erhöhung der Unordnung der Alkylketten. Das „Schmelzen“ der Fettsäureketten in den Phospholipiden bei höheren Temperaturen führt zu einer Veränderung der Bandenlage der CH_2 -Streckschwingungen. Die Lage der Phasenübergangstemperatur insbesondere von Phospholipiden ist abhängig von der Konformation der Fettsäureketten, der Kettenlänge der Fettsäuren sowie deren Sättigungsgrad sowie von den Kopfgruppen der Lipide [19, 86].

Lipide, die lange und gesättigte Fettsäureketten tragen, etwa Sphingolipide, sind durch eine im Vergleich zu Phospholipiden (kurze, ungesättigte Fettsäuren) höheren Phasenübergangstemperatur gekennzeichnet.

Die Messung des Phasenübergangs erfolgte mit einem FTIR-Spektrometer der Firma Bruker (Bruker, IFS 55, Billerica, MA, USA) mit einem DTGS-Detektor (Kapitel 3.16.1). Die in 20 mM HEPES (pH 7,0 bzw. 7,4) gelösten Lipopolysaccharide und Mischungen aus LPS mit antimikrobiellen Peptide in den molaren Verhältnissen von $[\text{LPS}:\text{AMP}]$ [1:1] und [1:0,5] bzw. $[\text{Lipid}]:[\text{AMP}]$ [1:1] und [1:0,5] wurden in eine Kalziumfluorid-Küvette (CaF_2) mit einem $12,5\text{ }\mu\text{m}$ Teflon Abstandshalter überführt ($10\text{ }\mu\text{l}$). Zur Messung des Phasenverhaltens wurden automatisch Temperaturscans von $+0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Heizrate von $0,6\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ durchgeführt. Alle $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 50 Interferogramme erzeugt, Fourier transformiert und zu Absorptionsspektren konvertiert (*Software: Origin; Bruker*), wobei die Wellenzahl über die

Temperatur aufgetragen wird. Die Phasenübergangstemperatur wird aus den Wendepunkten der Kurven (1. Ableitung) bestimmt.

3.16.1 PRINZIPIELLER AUFBAU EINES FTIR-SPEKTROMETERS

Die wesentlichen Bestandteile eines FTIR-Spektrometers bestehen aus einer Strahlenquelle, einem Michelson-Interferometer mit einem beweglichen und einem festen Planspiegel, einem Strahlenteiler sowie einem Detektor und einer Recheneinheit (Abbildung 33).

Ein aus Siliziumcarbid bestehender Globar, der als Strahlenquelle dient, wird auf 1200-1400 K aufgeheizt. Er ermöglicht die Aufnahme von Spektren in einem Bereich von 400-4000 Wellenzahlen. Im Interferometer teilt ein Strahlenteiler, *beam splitter*, den Lichtstrahl aus der Lichtquelle in einen reflektierten und in einen durchgehenden Teil. Die im Interferometer eingebauten Spiegel, ein fester und ein beweglicher Planspiegel, können aufgrund ihrer unterschiedlichen Lage zueinander nach Reflektion und Überlagerung der Lichtstrahlen zu einer konstruktiven oder destruktiven Interferenz führen. Diese Interferenz ist von der Position des beweglichen Spiegels und der Frequenz abhängig. Die Intensität in Abhängigkeit zur Wegdifferenz des beweglichen Spiegels wird im Detektor aufgenommen. Es entsteht ein Interferogramm, das durch eine Fourier-Transformation ein Infrarotspektrum erzeugt (Abbildung 33).

In der IR-Spektroskopie werden häufig pyroelektrische Detektoren verwendet. Sie bestehen aus ferroelektrischen Kristallen, deren Kristallstruktur durch IR-Strahlung verändert wird. Die durch diese Strukturänderung entstehenden Ladungen auf der Oberfläche können detektiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Spektrometer ist mit einem sogenannten DTGS-Detektor (DTGS = deuteriertes Triglycinsulfat) ausgestattet.

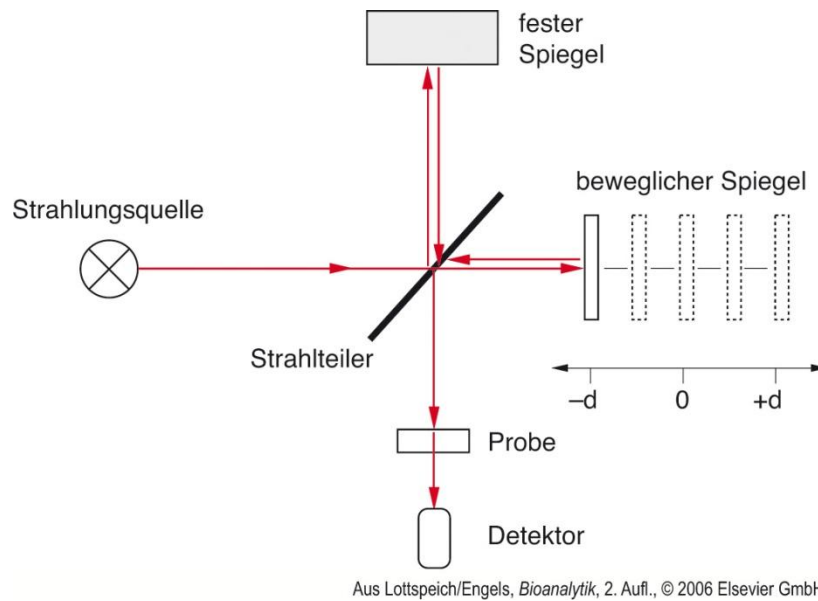


Abbildung 33: Aufbau und Funktionsweise eines FT-IR-Spektrometers.

Polychromatische Infrarotstrahlung aus einer Quelle wird in einem Michelson-Interferometer zunächst durch einen Strahlteiler in einen durchgehenden Anteil (ca. 50 %) und einen reflektierten Anteil (ca. 50 %) zerlegt. Der vom festen Spiegel reflektierte Anteil tritt wieder durch den Strahlteiler und wird dort mit dem vom beweglichen Spiegel reflektierten Teil zusammengeführt. Je nach Wellenlänge und Phasenlage tritt konstruktive und destruktive Interferenz auf, die durch die Position des von $-d$ nach $+d$ bewegten Spiegels moduliert wird. Der zusammengeführte Strahl durchsetzt dann die Probe und trifft auf den Detektor. Aufgezeichnet wird die Intensität am Detektor als Funktion des Ortes des beweglichen Spiegels.

(Bioanalytik, 2. Auflage, 2006, Kapitel 7, Seite 157, Lottspeich/ Engels. Mit freundlicher Genehmigung der Springer Science und Business Media. [85])

3.17 FÖRSTER-RESONANZ ENERGIE-TRANSFER SPEKTROSKOPIE (FRET)

Das Phänomen des Fluoreszenz Resonanz Energie-Transfer ist erstmals 1948 von Theodor Förster beschrieben worden und wird in der Literatur auch als Förster-Resonanz Energie-Transfer bezeichnet. Die Methode basiert auf den strahlungslosen Energieübertrag eines durch Energie angeregten Fluorophors (Donor) durch Dipol-Dipol-Kopplung auf einen zweiten Fluorophor (Akzeptor), der die aufgenommene Energie des Donors als Fluoreszenzlicht emittiert. Dieser Prozeß bzw. seine Effizienz ist im Wesentlichen abhängig von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor und liegt im Bereich unterhalb von 10 nm. Dieser Abstand, der eine Voraussetzung von FRET darstellt, wird auch als Förster-Abstand bezeichnet. Eine weitere Voraussetzung für FRET ist das Überlappen des Emissionsspektrums des Donorfluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors. Fluorophore, die

diese Voraussetzungen erfüllen, werden auch als FRET-Paar bezeichnet [94]. Die Effizienz des Energietransfers E_T nach Förster wird nach folgender Gleichung beschrieben:

$$E_T = \frac{1}{1 + (R_{DA}/R_0)^6} \quad (\text{Gleichung 6})$$

mit:

R_{DA} : Abstand Donor zu Akzeptor; R_0 : Förster-Abstand eines gegebenen Donor-Akzeptor-Paares, bei dem genau in 50 % der Fälle die angeregte Energie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird.

Diese Methode erlaubt es, die räumliche Beziehung von zwei Fluorophoren und ihrem Abstand zueinander mit einer Genauigkeit von unter 1 nm zu bestimmen. Die Fluorophore, die als Donor und Akzeptor fungieren, können an zu untersuchende Moleküle, etwa Lipide oder LPS, gebunden werden.

In dieser Arbeit ist die Methode der FRET-Spektroskopie verwendet worden, um die Fähigkeit von antimikrobiellen Peptiden, in LPS-Aggregate oder in Phospholipidliposomen zu interkalieren, zu untersuchen. Die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) sowie das Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota wurden mit den Fluorophoren NBD-PE (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4yl)-Phosphatidylethanolamin) als Donor und Rh-PE (N-(Lissamin Rhodamin B sulfonyl)-Phosphatidylethanolamin (*Molecular Probes*®) als Akzeptor markiert [126].

Zu den doppelt markierten Phospholipidliposomen oder LPS-Aggregaten (900 µl mit einer molaren Konzentration von 10 µM) wurden 100 µl einer 100 µM Lösung der antimikrobiellen Peptide (LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-2.5KO, LPep19-8, LPep19-4LF sowie LPep19-8.3acyl) gegeben. Die Zugabe der antimikrobiellen Peptide erfolgte 50 Sekunden nach Gleichgewichtseinstellung. Der Fluorophor NBD-PE wurde bei 470 nm angeregt und die Fluoreszenzintensitäten des Donors und Akzeptors wurden bei 531 und 593 nm detektiert. Das Verhältnis von Donorintensität zu Akzeptorintensität I_D/I_A wurde bei jeder Messung für 250 Sekunden gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.

3.18 ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE (ITC)

Die Methode der isothermen Titrationskalorimetrie liefert Daten zu Bindungsenergien zweier Bindungspartner. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode bei einer gegebenen Temperatur (isotherm), etwa +37 °C oder +40 °C, wird die im adiabatischen System produzierte oder dem System entzogene Energie gemessen. Mit dieser Methode ist es möglich, die Bindungskonstante k_a (Assoziationskonstante) zweier Bindungspartner nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung zu bestimmen über:

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad (\text{Gleichung 7) Gibbs – Helmholtz – Gleichung}$$

mit

ΔG : *Gibb'sche Energie*; ΔH : *Enthalpieänderung*; T : *Temperatur*; ΔS : *Entropieänderung*

Die Bindungskonstante k_a wird über

$$\Delta G = -R \times T \times \ln k_a \quad (\text{Gleichung 8) bestimmt,}$$

wobei R als die allgemeine Gaskonstante definiert ist. Die Bindungskonstante k_a ist dabei der reziproke Ausdruck der Dissoziationskonstante k_d mit $k_a = 1/k_d$.

Kalorimetrische Messungen zur Bestimmung der Bindungsenergien von LPS mit antimikrobiellen Peptiden wurden mit dem MSC *isothermal titration calorimeter* der Firma MicroCal Inc., Northampton, MA, USA bei +40 °C durchgeführt. Antimikrobielle Peptide der LPep-Gruppe wurden in molaren Konzentrationen von 1 mM bis 4 mM, gelöst in 20 mM HEPES, pH 7,0, einer LPS-Lösung in der adiabatischen Kammer mit einer molaren Konzentration von 0,05 mM in 20 mM HEPES, pH 7,0 hinzutitriert. Die Änderung der Enthalpie ΔH wurde nach jeder Titration (5 Minuten) des Peptids in die LPS-Lösung vom Kalorimeter erfasst. Die Auswertung (*Software: Origin; MicroCal*) erfolgte über die Integration der Peakfläche der Titrationskurven und gegen deren Auftragung gegen die molaren Konzentrationen von LPS zu antimikrobiellen Peptid. Die Titration der antimikrobiellen Peptide in den verwendeten HEPES-Puffer führte zu vernachlässigbaren endothermen Reaktionen durch Lösungsprozesse, die als Untergrund von den Messungen abgezogen wurden. Die kalorimetrischen Messungen der Peptidvarianten LPep19-2.5KO und LPep19-8 wurde jeweils mindestens dreimal wiederholt. Die Messungen des Leitpeptids wurden bei +37 °C und +40 °C mindestens dreimal durchgeführt.

3.19 EX VIVO LUNGENSTIMULATIONSVERSUCHE

Das bereits in der Literatur beschriebene humane Lungenmodell zur Initiierung einer Inflammation [38, 121] ist durch einen therapeutischen Ansatz mit der Applikation des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) weiterentwickelt worden [62].

Bei Lungenresektionen gewonnenes gesundes (tumorfrees) und vitales Lungengewebe (circa 1 cm³) wurde durch Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota zur Inflammation gebracht. Das den Proben in den molaren Verhältnissen von [LPS:Peptid] [1:10] und [1:100] zugesetzte Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) wurde für vier Stunden bei +37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das von im Lungengewebe residenten Makrophagen in das Medium RPMI 1640 abgegebene pro-inflammatorische Zytokin TNF- α wurde mittels ELISA-Test bestimmt.

Die Genehmigung zur Versuchsdurchführung mit menschlichem Gewebe (hier Lungengewebe) durch die Ethikkommission kann dem Anhang (Kapitel 9) entnommen werden.

3.20 INHIBITION DER LPS INDUZIERTEN ZYTOKINAUSSCHÜTTUNG VON TNF- α VIA ELISA

Mononukleären Zellen (MNC) und Makrophagen können via LPS stimuliert werden und induzieren somit eine Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α , das über einen ELISA-Test (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) im ELISA-Reader Tecan *infinite* M200Pro der Firma Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz bei 450 nm photometrisch bestimmt wird.

Durch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation werden mononukleäre Zellen aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Spendern gewonnen und nach einem festgelegten Protokoll aufgearbeitet [69]. Die Zellen werden nach der Aufarbeitung im Zellkulturmedium RPMI 1640 resuspendiert und durch geeignete Verdünnung auf eine Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt.

Zur Durchführung der Stimulationsversuche von MNC durch LPS werden je 200 μ l einer MNC-Kultur (1 x 10⁶ Zellen) in die Kavitäten einer 96-well Mikrotiterplatte überführt. Jeweils 20 μ l des Ra Lipopolysaccharid (*Salmonella enterica* serovar Minnesota) und Mischungen aus LPS mit antimikrobiellen Peptiden in vorgegebenen molaren Verhältnissen werden nach einer Inkubation von 30 Minuten bei +37 °C den Zellkulturen zugegeben. Die

Zellkulturen werden für vier Stunden bei +37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Mikrotiterplatten werden nach Inkubation für zehn Minuten bei 400 x g zentrifugiert und die zellfreien Überstände entnommen und bis zur immunologischen Bestimmung des Zytokins TNF- α bei -20 °C gelagert. Die Zytokinbestimmung erfolgt über einen *sandwich* ELISA-Test mit einem monoklonalen Antikörper gegen TNF- α (Klon 6b, Fa. Intex AG, Schweiz). Details zur Detektion und Auswertung sind bereits in Publikationen beschrieben und können unter nachfolgender Referenz eingesehen werden [69].

Die Genehmigung zur Versuchsdurchführung mit menschlichem Gewebe (hier Vollblut) durch die Ethikkommission kann dem Anhang (Kapitel 9) entnommen werden.

3.21 ZYTOTOXIZITÄTSSTUDIEN MITTELS BIONAS-TESTSYSTEM UND HÄMOLYSETEST

Die zytotoxische Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) wurde mit vier verschiedenen Zelllinien auf dem *chip*-basierten System der Firma Bionas GmbH, Rostock, Deutschland bestimmt. Auf einem mit Detektoren für den Sauerstoffverbrauch, für den pH-Wert und zur Impedanzmessung (elektrische Widerstandsmessung im elektrischen Wechselfeld) ausgestatteten *chip* wurden Zellen ausgesät, wobei diese den *chip* und die implementierten Detektoren bedecken. Die Kinetiken der zellphysiologischen Parameter Zellatmung und Azidifikation wurden kontinuierlich aufgenommen. Der Parameter der Impedanz liefert Daten zur Bedeckung des *chips* mit Zellen und ist somit ein indirekter Parameter für die Zytotoxizität.

Für die Zytotoxizitätsmessungen wurden die Zelllinien humane Hepatoma Zellen (HepG2), humane Kolon-Adenokarzinoma Zellen (LS-174T), humane periphere mononukleäre Blutzellen (hPBMC) sowie Jurkat-Zellen (*Cell Line Services*, Piscataway, NJ, USA und ProBioGen, Berlin, Deutschland) auf den *chips* ausgesät. Die Zelldichte betrug für die Zelllinien HepG2 und LS-174T 200.000 Zellen/*chip*, für Jurkat-Zellen 300.000 und für hPBMC zwei Millionen Zellen/*chip*.

Das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) wurde in den Konzentrationen von 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µg/ml auf die Zelllinien gegeben.

Die Zytotoxizitätsmessungen wurden in Auftrag gegeben und durch die Firma Bionas GmbH in Rostock durchgeführt.

Die für die Hämolysetests notwendigen Erythrozyten wurden aus humanen Blutproben mittels Zentrifugation (1500 x g, 10 min) gewonnen und dreimalig mit einem isotonischen Puffer aus 20 mM Phosphat und Natriumchlorid (pH 7,4) gewaschen. Die behandelten Erythrozyten wurden nachfolgend in den gleichen Puffer resuspendiert und eine Konzentration, entsprechend 5 % des normalen Hämatokrits, eingestellt. Aus diesen Erythrozyten-Suspensionen wurden 40 µl in 960 µl Peptidlösungen (unter gleichen Pufferbedingungen) überführt, für 30 Minuten bei +37 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (1500 x g, 10 min). Die Überstände wurden spektrophotometrisch bei 543 nm für Hämoglobin analysiert. Die Ergebnisse der Hämolyse wurden prozentual ausgedrückt, wobei mit Ultraschall behandelte Erythrozyten (Kontrolle) 100 % und Kontrollen ohne den Zusatz von Peptiden 0 % Hämolyse aufweisen [103].

Die Genehmigung zur Versuchsdurchführung mit menschlichem Gewebe (hier Vollblut) durch die Ethikkommission kann dem Anhang (Kapitel 9) entnommen werden.

4 ERGEBNISSE

Den biophysikalischen und physikalischen Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus sowie zu Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen dem Peptid Aspidasept[®], respektive einer Auswahl seiner Varianten, und seiner Zielstruktur Lipopolysaccharid werden biologische Daten vorangestellt, die gleichsam den Beginn und das Ziel dieser Studie markieren.

Die Entdeckung und Optimierung einer Peptidstruktur, die in der Lage ist, Lipopolysaccharid aus den Membranen Gram-negativer Bakterien zu binden und zu neutralisieren, ohne schädlich auf humane Zellen zu wirken, ist somit die Prämisse für die Entwicklung eines Medikamentes bei einer durch Gram-negative Bakterien induzierten Sepsis und wird zunächst durch biologische Daten untersucht. Zu den biologischen Untersuchungsmethoden zählen Zytokinassays mit ELISA-Techniken (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ebenso wie Tests zur Hämolyse und Zytotoxizität mittels verschiedener Techniken und Bindungsstudien durch Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).

Die molekularen Wirkmechanismen sind überwiegend mit dem Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota als Raumutante und seinem Lipid A-Teil studiert worden. Die Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen sind mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*), Gefrierbruchtechniken kombiniert mit Elektronenmikroskopie (EM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM, *Atomic Force Microscopy*) durchgeführt worden. Untersuchungen mittels Infrarotspektroskopie (IR) und Förster-Resonanz-Emissions-Transfer (FRET) lieferten Daten zur Wirkungen auf Membranen im Sinne einer Fluidisierung oder Rigidisierung sowie zur Neigung der antimikrobiellen Peptide, sich in Membranen oder in LPS-Aggregate einzubauen. Ebenso wurden die Wirkungen einer kleinen Auswahl von antimikrobiellen Peptiden der LPep-Gruppe und Aspidasept[®] als Leitpeptid auf ganze Bakterien mit Rasterkraftmikroskopie untersucht.

Rekonstituierte Lipidmembranmodelle sollen die Wirkung der antimikrobiellen Peptide sowie Aspidasept[®] auf Membranlipide von humanen Zellen oder Bakterien aufzeigen. Diese Untersuchungen sind mit Rasterkraftmikroskopie als bildgebendes Verfahren durchgeführt worden.

Im Zuge dieser Arbeit konnten die *in vitro* Daten, die mit biologischen und biophysikalischen Methoden erhoben wurden und in simplifizierten Systemen untersucht wurden, auf das komplexe humane System in ein *ex vivo* Lungenmodell übertragen werden, das zunächst in Zusammenarbeit mit der klinischen und experimentellen Pathologie etabliert wurde. Mit der Etablierung des *ex vivo* Lungenmodells ist es bereits in der präklinischen Phase gelungen, die Wirkung des Leitpeptids Aspidasept® im menschlichen Gewebe zu zeigen.

Klinisch relevante Aspekte zur Applikation von Aspidasept® in einem septischen Geschehen wurden durch die Kombination mit klassischen, in der Klinik weit verbreiteten Antibiotika untersucht, um ein etwaiges synergistisches, antagonistisches oder additives Verhalten von Aspidasept® mit klassischen Antibiotika zu bestimmen.

Die hier vorgestellten Daten sind Bestandteil der präklinischen Phase des Peptids LPep19-2.5 (Aspidasept®). Im Verlauf der präklinischen Untersuchungen wurden einige Peptidvarianten aus der LPep-Gruppe in vergleichenden Studien eingesetzt, um die Wirkungsweise und Effektivität von Aspidasept® aufzuklären.

4.1 INHIBIERUNG DER LPS-INDUZIERTEN ZYTOKINAUSSCHÜTTUNG VON TNF- α DURCH DIE PEPTIDE LPep19-2.5, LPep19-2.5KO, LPep19-4 SOWIE LPep19-8 IM ELISA-TEST

Humane mononukleäre Zellen (engl. *human mononuclear cells*, MNCs) sekretieren bei Kontakt mit LPS das proinflammatorische Zytokin TNF- α . Das Zytokin kann via ELISA-Test detektiert und quantifiziert werden. Das Ausmaß an Inhibition der Zytokinausschüttung durch die antimikrobiellen Peptide zeigt ihre Effektivität an, LPS effektiv zu neutralisieren. In Abbildung 34 ist die Inhibition der durch LPS-induzierten Inflammation durch die Peptide LPep19-2.5 und der Peptidvariante LPep19-2.5KO bei unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen gezeigt. LPS R60 wurde in Konzentrationen zu 100, 10 und 1 ng/ml auf MNCs gegeben, die konzentrationsabhängig das Zytokin TNF- α ausschütten, wobei die niedrigste Konzentration von 1 ng/ml LPS den niedrigsten TNF- α Wert zeigt. Das Peptid LPep19-2.5 zeichnet sich durch die effektivste Inhibition von TNF- α aus. Ein dreifacher bzw. ein zehnfacher Überschuß an LPep19-2.5 führt zu drastischen Inhibitionen der Zytokinausschüttung und damit zur LPS-Neutralisation. Das zum Vergleich eingesetzte Peptid LPep19-2.5KO, das die identischen Aminosäuren in einer zufälligen (engl. *scrambled*) Aminosäuresequenz trägt, zeigt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zytokinausschüttung bei jedoch sehr hohen Konzentrationen mit einem bis zu 100-fachen Überschuß an Peptid.

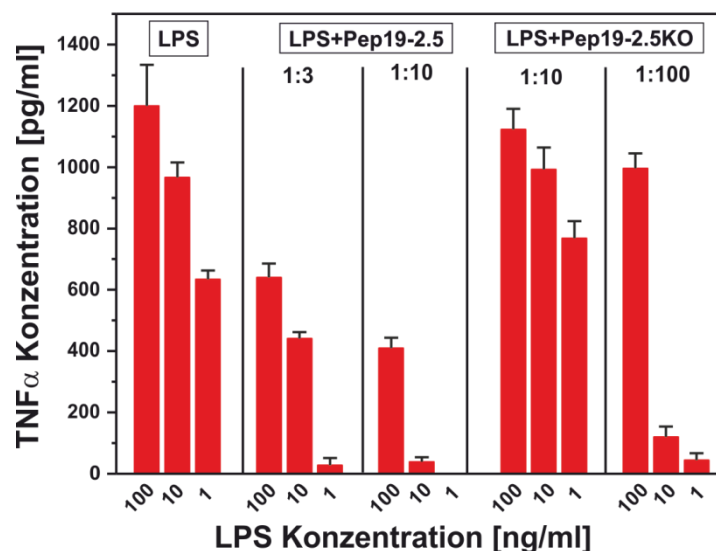


Abbildung 34: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch LPep19-2.5 sowie durch LPep19-2.5KO bei unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen.

Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen [70].

In einem anderen ELISA-Test sind die Peptidvarianten LPep19-4 und LPep19-8 auf ihre Fähigkeit, das Zytokin TNF- α zu inhibieren, getestet worden (Abbildung 35). Beide Varianten wirken inhibierend, wobei die Variante LPep19-8 deutlich weniger effektiv im Sinne einer Zytokininhibition als die Variante LPep19-4 ist. Erst bei einem 100-fachen Überschuß an LPep19-8 kann eine mäßige Zytokininhibition, also LPS-Neutralisation, beobachtet werden.

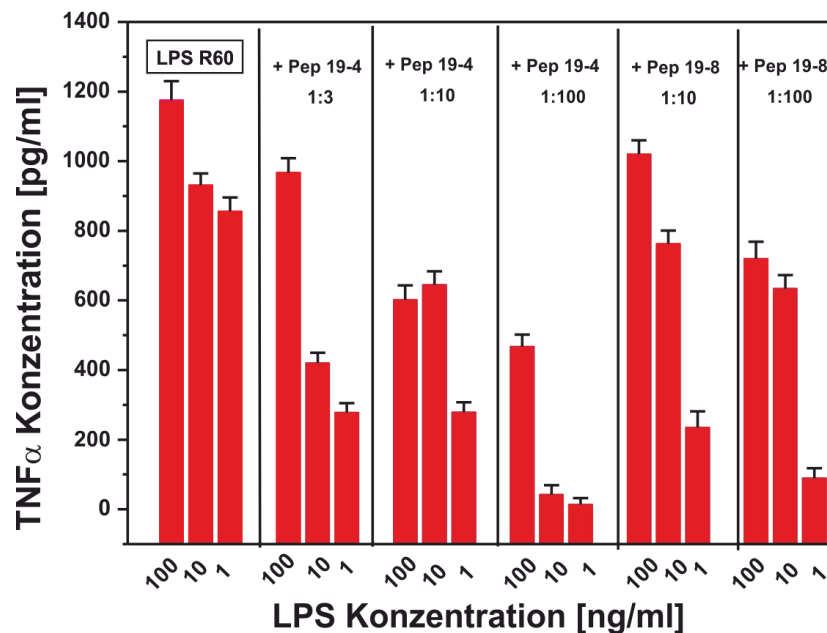


Abbildung 35: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch LPep19-4 sowie durch LPep19-8 bei unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen.

Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen [70].

In Tabelle 7 können die Aminosäuresequenzen und die jeweiligen molaren Massen der antimikrobiellen Peptide LPep19-2.5, LPep19-2.5KO, LPep19-4 und LPep19-8 abgelesen werden. Alle Varianten tragen acht positive Ladungen, wobei sich diese im Falle der Peptide LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-4 auf fünf Lysine und drei Arginine verteilen. Die positiven Ladungen der Variante LPep19-8 basieren auf jeweils vier Lysine und Arginine.

Aus den Ergebnissen zur Bestimmung der TNF- α Ausschüttung (Abbildung 34 und 35) können unterschiedliche Effektivitäten zur LPS-Neutralisation abgeleitet werden, die in direktem Zusammenhang mit der Aminosäuresequenz der untersuchten antimikrobiellen Peptide stehen. Insbesondere sind die Aminosäure Cystein (C) an der zweiten Stelle des N-Terminus sowie die Reihenfolge von Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) am C-Terminus des Peptids für die Inhibition bzw. Reduktion der TNF- α Ausschüttung von entscheidender Bedeutung.

Es kann festgestellt werden, daß das Leitpeptid LPep19-2.5 in wiederholten, unabhängigen Experimenten mit mononukleären Zellen effektiv, schon bei geringem molaren Überschuß, zur Reduktion der Zytokinausschüttung von TNF- α führt.

Name	Aminosäuresequenz	Molare Masse [g/mol]
LPep19-2.5	GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG	2711
LPep19-2.5KO	KFGKWRFKGYRFCWKFRGWK	2711
LPep19-4	GKKYRRFRWKFKGKFWFWG	2750
LPep19-8	GRRYKKFRWKFKGGRFWFWG	2636

Tabelle 7: Aminosäuresequenzen und Molare Massen der im ELISA-Test untersuchten Peptide.

4.2 ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE (ITC)-BINDUNGSSTUDIEN

Eine empfindliche Methode zur Bestimmung der Bindungsenergien stellt die isotherme Titrationskalorimetrie dar. Einer in einer adiabatischen Kammer befindlichen definierten Menge an LPS wurden gleiche Mengen an Peptid wiederholt hinzutitriert und die Bindungsenergien detektiert. Aus dem Versuchsaufbau lassen sich exotherme von endothermen Prozessen unterscheiden sowie die Änderung der Enthalpie ΔH ablesen. Die bereits in Kapitel 4.1 angeführten Peptide LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-8 wurden mittels ITC untersucht. Alle drei Peptide weisen in diesen Untersuchungen negative Werte auf, die auf eine starke exotherme Bindung der Peptide an das LPS durch Coulomb Kräfte hindeuten. Die Peptide LPep19-2.5KO und LPep19-8 zeigen dabei eine Sättigung der Peptid/ LPS-Bindung in einem hohen molaren Bereich von über 1,1 (molares Verhältnis) (Daten hier nicht gezeigt), während das Peptid LPep19-2.5 in eine sigmoidale Sättigung im Bereich von 0,3 (molares Verhältnis) übergeht (Abbildung 36, untere Hälfte). Das molare Verhältnis zur Bindung von Peptid zu LPS bedeutet, daß drei Peptidmoleküle (entsprechend 24 positive Ladungen) ausreichen, um zehn LPS-Moleküle (entsprechend 40 negative Ladungen) zu neutralisieren, wobei der amphiphile Charakter des Peptids dazu beiträgt, in eine Sättigung überzugehen, bevor ein Ladungsausgleich erreicht wird. Die Bindungskonstante für den Komplex LPS/ LPep19-2.5 aus dem sigmoidalen Verlauf von fünf unabhängigen Experimenten (Abbildung 36, untere Hälfte) ergibt sich zu $k = (2,8 \pm 3,0) \times 10^8 / \text{Mol}$.

Ein Molekül des Peptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) bindet mit hoher Affinität drei LPS-Moleküle.

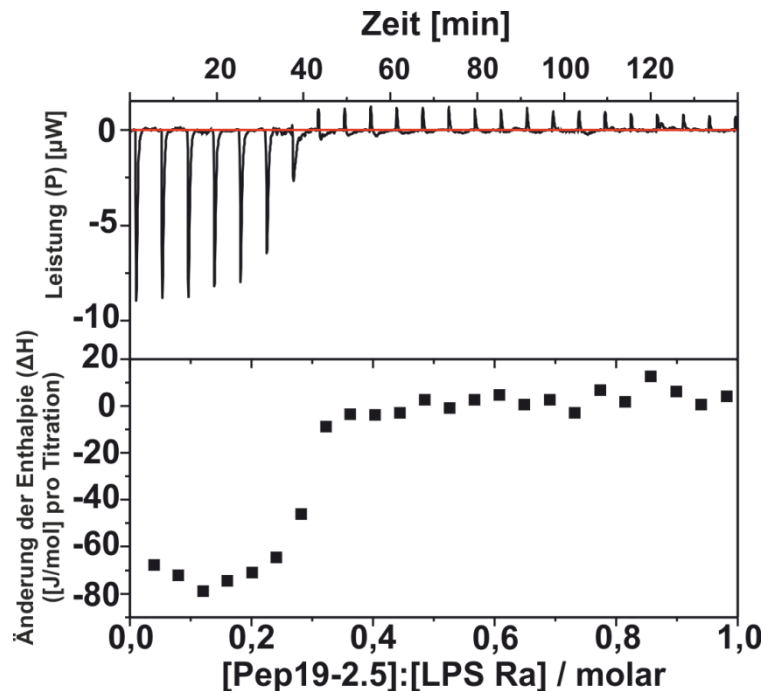


Abbildung 36: Bindungsstudien von LPS Ra *Sal. ent. serovar Minnesota* mit LPep19-2.5 via isothermer Titrationskalorimetrie und Darstellung der Enthalpieänderung ΔH über die LPS/Peptidbindung.

Titration im Abstand von 5 Minuten von jeweils 5 μl einer 1 mM LPep19-2.5 Lösung in eine 0,05 mM LPS-Dispersion bei +40 °C. Nach unten gerichtete Peaks entsprechen einer exothermen Reaktion, während nach oben gerichtete Peaks einer endothermen Reaktion entsprechen [54].

4.3 STUDIEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT UND HÄMOLYSE

Zur Untersuchung von unerwünschten Nebenwirkungen, etwa zytotoxische Effekte, wurden in verschiedenen humanen Zelllinien physiologische Parameter auf ihre Kinetiken hin, etwa die Zellatmung (über den Sauerstoffverbrauch im Medium), die Azidifikation (über den pH-Wert im Medium) und die Impedanz (über den elektrischen Widerstand), auf einem Chip-basierten System (Fa. Bionas GmbH, Rostock) durch die Firma Bionas GmbH in Rostock studiert. Das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) wurde in den Konzentrationen zu 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ in einem konstanten Fluß über auf dem Chip immobilisierten Zellen geführt und die oben genannten Parameter im Beobachtungszeitraum von 32 Stunden aufgenommen.

In Abbildung 37, linke Bildhälfte ist die standardisierte Respirationsrate in Prozent für Jurkat-Zellen in Wechselwirkung mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) dargestellt. Es

lassen sich bis zu Peptidkonzentrationen von 10 µg/ml keine schädigende Effekte detektieren. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) ist die standardisierte Respirationsrate auf 50 % abgesunken und die Zellen sind nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes irreversibel geschädigt (Abbildung 37, linke Bildhälfte). Diese Beobachtung konnte ebenfalls in drei anderen humanen Zelllinien beobachtet werden, etwa humanen Hepatoma Zellen (HepG2), humanen Kolon-Adenokarzinoma Zellen (LS-174T) und humanen peripheren mononukleären Blutzellen (hPBMC).

Die Ergebnisse des konventionellen MTT-Tests (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) mit den Zelllinien HeLa und HaCaT führen zu ähnlichen Ergebnissen und stützen somit die Befunde aus den mit dem Bionas-System gewonnen Daten (Daten hier nicht gezeigt).

Der mit Erythrozyten durchgeführte Test zur Bestimmung der Hämolyse, also Zerstörung der Erythrozyten, mit einer Auswahl aus Peptiden der LPep-Gruppe, etwa LPep19-8, LPep19-2,2, LPep19-2.5KO sowie dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) und Melittin ist in Abbildung 37, rechte Bildhälfte dargestellt.

Der Hämolyse-Test basiert auf dem spektrophotometrischen Nachweis von Hämoglobin im Überstand der Probenkammer. Durch Sonifikation von Erythrozyten zerstörte Erythrozyten geben ihr Hämoglobin vollständig an den Überstand ab. Die so herbeigeführte vollständige Hämolyse wird mit 100 % (100 % Abgabe von Hämoglobin in den Überstand) angegeben. Proben von Erythrozyten ohne Peptid werden mit 0 % (0 % Abgabe von Hämoglobin in den Überstand) angegeben.

Die Peptide LPep19-8, LPep19-2.5KO und das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) zeigen einen hämolytischen Effekt von etwa 8-10 % bei einer Konzentration von 10 µM, entsprechend etwa 25 µg/ml. Das zum Vergleich hinzugezogene synthetische Melittin aus Bienengift wirkt bei gleicher Konzentration zu 100 % hämolytisch.

Die für das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) bestimmte hämolytische Aktivität für die ausgewählten Konzentrationen ist mit einer therapeutischen Verwendung vereinbar und setzt gleichzeitig für alle nachfolgenden Studien und Untersuchungen in biologischen Systemen die einzusetzende Peptidkonzentration auf einen Bereich zwischen 10 und 20 µg/ml fest.

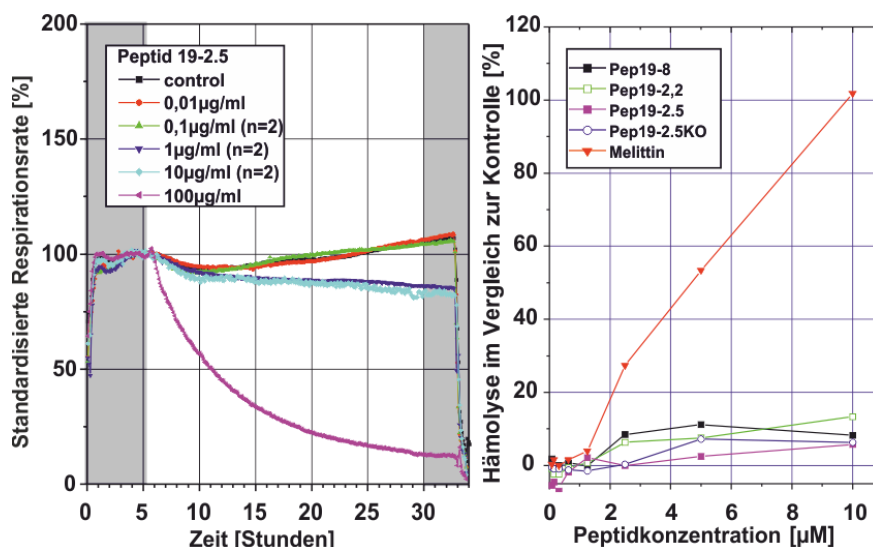


Abbildung 37: Bestimmung der Peptid-assoziierten Zytotoxizität.

Standardisierte Respirationsrate von Jurkat-Zellen gemessen in dem Chip-basierten Bionas-System mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 über einen Beobachtungszeitraum von über 32 Stunden. Die ersten und letzten fünf Stunden (grau hinterlegt) markieren die lag- und Regenerationsphase der Zellen (linke Bildhälfte). Hämolyse von Erythrozyten mit einer Auswahl von Peptiden der LPep-Gruppe im Vergleich zu synthetischem Melittin (rechte Bildhälfte) [54].

4.4 RASTERKRAFTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON BAKTERIEN UND DEREN INTERAKTION MIT ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN

Die Wechselwirkung der antimikrobiellen Peptide LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF sowie LPep19-2.5 (Aspidasept®) und PMB auf Gram-negative Bakterien wie *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar Minnesota sowie *Proteus mirabilis* wurden rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die antimikrobiellen Peptide wurden den Bakteriensuspensionen in zwei Konzentrationen, 10 µg/ml und 20 µg/ml zugegeben, wobei in dieser Arbeit nur die Ergebnisse für die Peptidkonzentration von 20 µg/ml vorgestellt werden. Die antimikrobiellen Peptide wurden für 30 Minuten bei +37 °C mit den Bakteriensuspensionen inkubiert, anschließend auf dem Substrat Mica immobilisiert und der Messung zugeführt.

Den rasterkraftmikroskopischen Experimenten mit Bakterien und antimikrobiellen Peptiden liegen biologische Daten zur Bestimmung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (MIC; *minimal inhibitory concentration*) vor, die aus mindestens drei unabhängigen Versuchen bestimmt wurden. Sie können Tabelle 8 entnommen werden.

	<i>Sal. ent. ser. Minn.</i>	<i>E. coli</i>
	Stamm R60	Stamm WBB01
	[µg/ml]	[µg/ml]
LPep19-2.5	128	32
LPep19-8.3acyl	16	8
LPep19-4LF	16	8
PMB	4	0,5

Tabelle 8: Bestimmung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (MIC) der antimikrobiellen Peptide in [µg/ml].

Die Genauigkeit der MIC-Wert-Bestimmung differiert um jeweils eine Verdünnungsstufe zu höherer bzw. niedriger Konzentration.

Das Leitpeptid LPep19-2.5 zeichnet sich durch eine im Vergleich zu den Peptiden LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF und PMB hohe minimale inhibitorische Konzentration aus und verfügt somit nicht über eine starke antibakterielle Wirkung. Die minimale inhibitorische Konzentration konnte für den Bakterienstamm *P. mirabilis* bei den vorliegenden Wachstumsbedingungen nicht bestimmt werden.

Die Zusammenstellungen der Ergebnisse aus der Rasterkraftmikroskopie stellen repräsentative Aufnahmen von Bakterien einer Probe dar, wobei jede Probe an mindestens drei verschiedenen Stellen untersucht wurde und die Versuche mindestens zweimal durchgeführt wurden.

Im Fokus der Untersuchung stand die mögliche Veränderung der bakteriellen Zellwand im Sinne einer destabilisierten bzw. zerstörten Membran und der bakteriellen Morphologie als Ganzes. Ebenso wurde das Aggregationsverhalten der Bakterien beobachtet.

Die hier gezeigten zweidimensionalen bakteriellen Aufsichtsaufnahmen sind in Grauwerten dargestellt. Drei-dimensionale Bilder wurden überwiegend im Farbcode „Terrain“ dargestellt, wobei tief gelegene Strukturen im blauen Farbbereich und erhabene bzw. hohe Strukturen über einen gelblich-braunen Farbbereich kodiert sind. Beispielhaft werden in Abbildung 38 die Höhenskalierung im Grau-oder Farbverlauf „Terrain“ dargestellt und aus Gründen der Übersichtlichkeit im Folgenden darauf verzichtet.

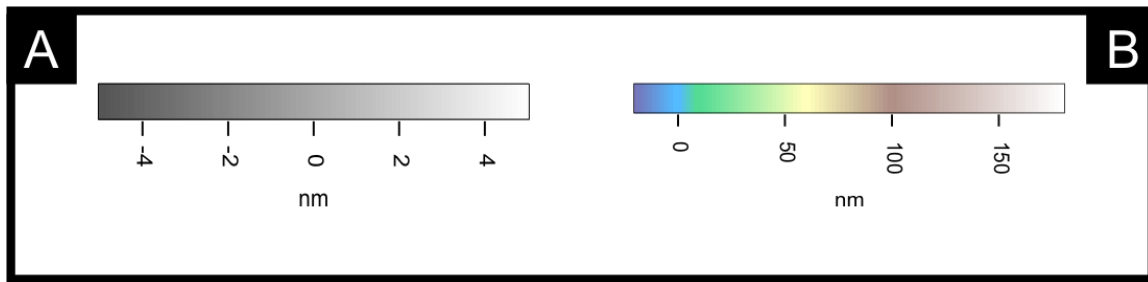


Abbildung 38: Grau- und Farbverlauf für rasterkraftmikroskopische Bilder.

Die Tiefen eines zwei-dimensionalen Bildes werden im Grauverlauf (A) dunkel und die Höhen hell dargestellt. Drei-dimensionale Bilder sind über den Farbverlauf „Terrain“ (B) kodiert. Tiefe Areale liegen im blauen Farbbereich, während die hohen und höchsten Bildteile über einen braunen Farbverlauf kodiert sind und im Maximum eine weiße Färbung aufweisen.

Die optimale Bildeinstellung für die Aufnahme von rasterkraftmikroskopischen Bildern wurde für jede Probe und jedes neue Bild stetig adjustiert. Eine gute Bildauflösung konnte mit der Wahl der geeigneten Scan-Geschwindigkeit, *scan rate*, erreicht werden, wobei sich Scan-Geschwindigkeiten von 0,5 Hz und 1,0 Hz als optimal erwiesen haben.

4.4.1 AFM-MESSUNGEN VON *E. COLI* BAKTERIEN STAMM WBB01

Die in rasterkraftmikroskopischen Studien von *E. coli* WBB01 untersuchten unbehandelten Bakterien (Abbildung 39) stellen sich als vereinzelt vorliegende bis zu 5 μm längliche Stäbchenbakterien mit einer überwiegend glatten Oberfläche dar. Die Höhe der unbehandelten Bakterien liegt bei 180-250 nm (Abbildung 39, Bild A und B). In der Kontrolle vorhandene flache Bakterien mit einer Höhe von etwa 70 nm werden als nicht intakt bezeichnet und sind durch eine leicht gekörnte Oberfläche gekennzeichnet (Abbildung 39, Bild C). Vereinzelt können elongierte Bakterien mit einer Länge bis zu 10 nm beobachtet werden. Die in der Kontrolle elongierten Bakterien sind auf Wachstumsprozesse und Kulturbedingungen zurückzuführen und werden hier nicht weiter erörtert.

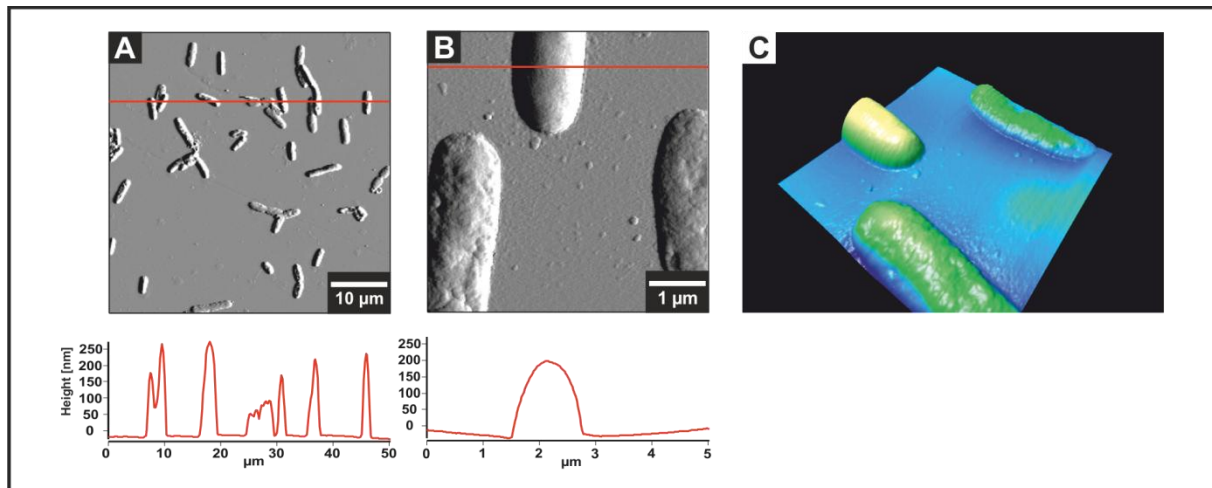


Abbildung 39: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* WBB01 Kontrolle.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild B (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.2 AFM-MESSUNGEN VON *E. COLI* BAKTERIEN STAMM WBB01 MIT LPEP19-2.5

Die für 30 Minuten bei +37 °C mit LPep19-2.5 (Aspidasept®) in einer Konzentration von 20 µg/ml inkubierten *E. coli* WBB01 Bakterien erscheinen in ihrer Form konserviert (Abbildung 40). Die Höhen und Längen von scheinbar nicht angegriffenen Bakterien stimmen mit denen der Kontrolle überein. Scheinbar angegriffene Bakterien zeigen anders als die Kontrollen größtenteils raue, gekörnte Oberflächen und bis zu 5 % der Bakterien zeichnen sich durch furchenähnliche Vertiefungen entlang ihrer Längsachse aus. Die Vertiefungen können Tiefen von 30-40 nm erreichen (Abbildung 40, Bild B). Bakterien mit rauen, gekörnten Oberflächen, die in bis zu 5 % der Fälle auch Vertiefungen aufweisen, erreichen maximale Höhen von 70-80 nm bzw. Höhen von 120-140 nm und sind damit etwa 150 bzw. 120 nm niedriger als Bakterien in der Kontrolle. Es sind keine Poren oder Risse auf der Bakterienmembran oder Zelllysate neben den Bakterien detektierbar. Die mit Aspidasept® behandelten Bakterien aggregieren stärker als in der Kontrolle, bleiben jedoch in den Aggregationen als einzelne Bakterien differenzierbar (Abbildung 40, Bild A). Die Lebendkeimzahlbestimmung der Bakterien, die mit 20 mg/ml LPep19-2.5 in drei unabhängigen Versuchen behandelt wurden, ergibt eine 37,3 % ± 17,0 %-ige Abtötung der Bakterien und für die dargestellte Probe von 33 % ± 20,8 %. Die oben beschriebenen flachen Bakterien mit einer geringeren Höhe als die Bakterien der Kontrolle könnten zu der Gruppe von abgetöteten Bakterien der Probe gehören.

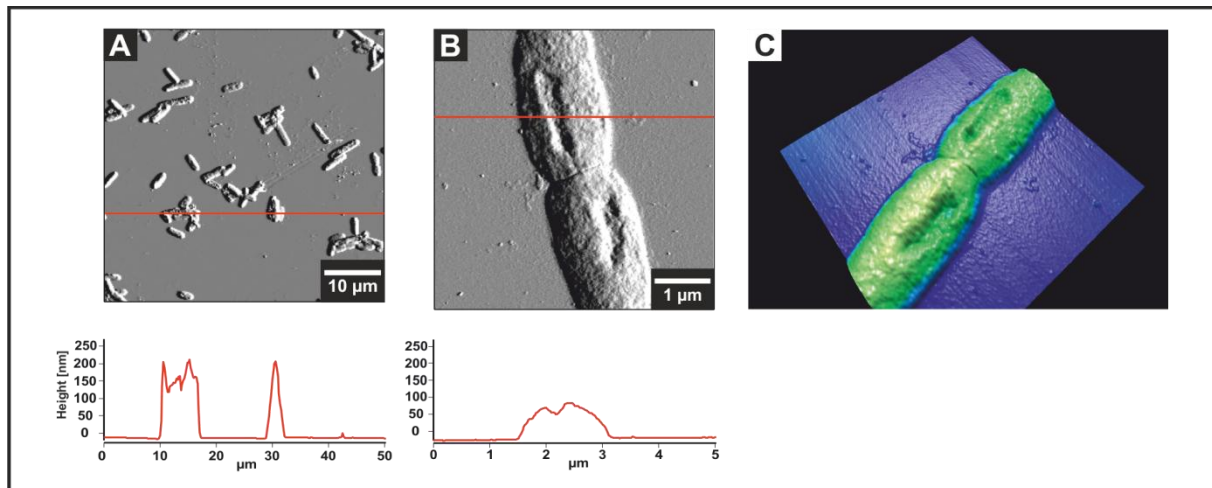


Abbildung 40: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* WBB01+20 µg/ml LPep19-2.5.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild B (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.3 AFM-MESSUNGEN VON *E. COLI* BAKTERIEN STAMM WBB01 MIT LPEP19-8.3ACYL

Bei 30-minütiger Inkubation von *E. coli* WBB01 Bakterien bei +37°C mit dem Peptid LPep19-8.3acyl kann eine verstärkte Aggregation der Bakterien im Vergleich zur Kontrolle und zu mit LPep19-2.5 behandelten *E. coli* WBB01 Bakterien beobachtet werden. Die in ihrer Form unveränderten Bakterien verfügen zwar über eine glatte Oberfläche, scheinen jedoch im Vergleich zur Kontrolle aufgetrieben und teilweise voluminöser mit Höhen um 320 nm (Abbildung 41, Bild A). Scheinbar angegriffene Bakterien erreichen Höhen von etwa 100-120 nm. Neben teilweise stark aufgerauten Oberflächen lassen sich in etwa 10 % der Fälle 10-30 nm tiefe Einbuchtungen entlang ihrer Längsachse erkennen (Abbildung 41, Bild B und C). In direkter Nähe befindliche flache unregelmäßige Strukturen, die von Bakterien niedriger Höhe ausgehen, könnten Zelllysate darstellen und somit diese als lysierte Bakterien kennzeichnen. Die Lebendkeimzahlbestimmung für die dargestellte Probe ergibt einen Wert von $50 \% \pm 20,3 \%$ für abgetötete Bakterien in der Probe, die nicht mit der Höhe der untersuchten Bakterien dieser Probe in Verbindung zu bringen ist. Für drei unabhängige Experimente wird die Abtötung der Bakterien mit 20 mg/ml LPep19-8.3acyl auf $72 \% \pm 16,6 \%$ beziffert.

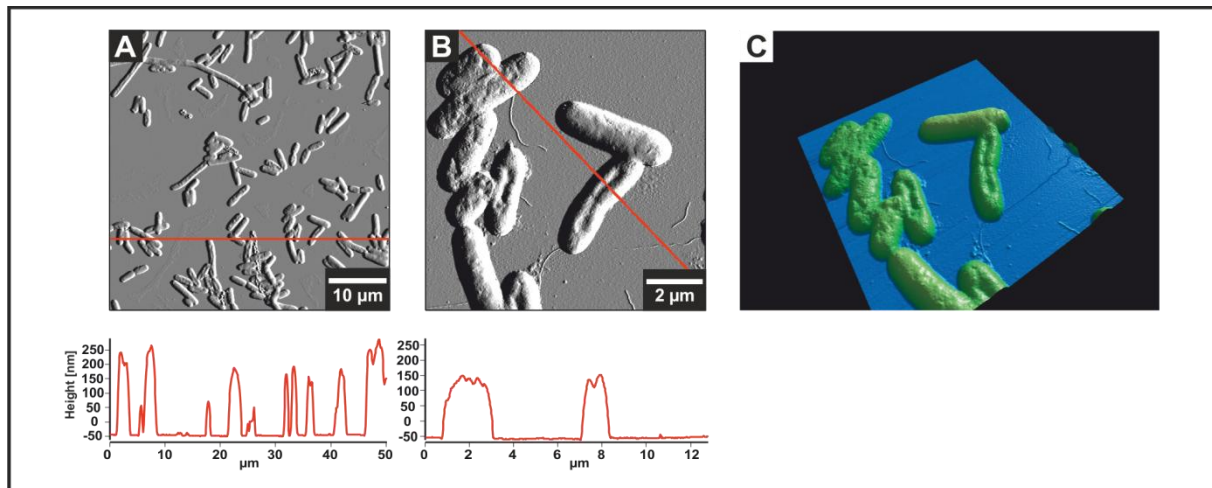


Abbildung 41: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* WBB01+20 µg/ml LPep19-8.3acyl.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild B (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.4 AFM-MESSUNGEN VON *E. COLI* BAKTERIEN STAMM WBB01 MIT LPEP19-4LF

Die Untersuchung von mit dem Peptid LPep19-4LF inkubierten *E. coli* WBB01 Bakterien zeigt die stärkste Aggregation von Bakterien durch die Vertreter der antimikrobiellen Peptide der LPep-Varianten. Die Aggregate türmen sich zu großen Komplexen mit einer Höhe von etwa 500 nm auf (Abbildung 42, Bild A). Einzelne Bakterien in diesen Aggregaten sind nicht immer klar voneinander unterscheidbar. Die Oberfläche von scheinbar angegriffenen Bakterien zeichnet sich durch einen scholligen Belag-ähnlichen Überzug aus, der entweder flach oder erhaben erscheint (Abbildung 42, Bild B und C). Die schollenartigen Strukturen bedecken die Oberflächen von Bakterien mit einer Höhe von etwa 120-170 nm, wobei die schollenartige Zeichnung selbst etwa eine Höhe von 10 nm erreicht. Die erhabenen, teilweise ziegelartigen Strukturen gehen von lysierten Bakterien mit einer Höhe von etwa 30 nm aus, wobei die erhabenen Strukturen Höhen im Bereich von 60-100 nm aufweisen. Die Bakterien scheinen als Ganzes in ihrer Oberfläche verändert. Die Umgebung von Bakterien ist durch flächige und gekörnte Strukturen gekennzeichnet, die auf Zellreste oder Zelllysate hindeutet (Abbildung 42, Bild B und C). Die Bestimmung der prozentualen Abtötung der Bakterien in der untersuchten Probe durch die Wirkung des Peptids LPep19-4LF ergibt einen Wert von 40 % $\pm$ 38,9 %. Für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente zur Lebendkeimzahlbestimmung kann eine 67,5 % $\pm$ 27,5 %-ige Abtötung berechnet werden.

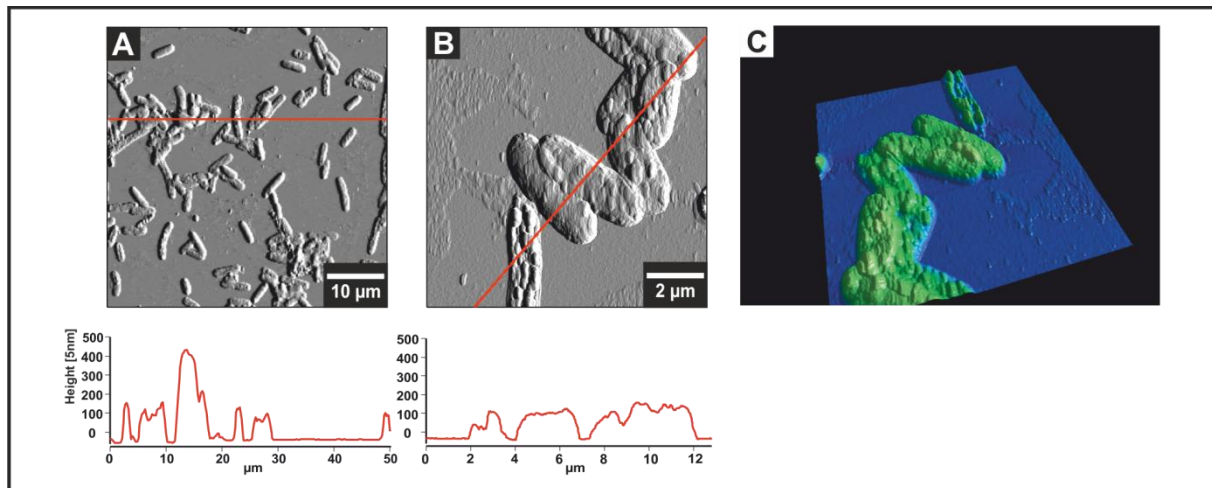


Abbildung 42: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* WBB01+20 µg/ml LPep19-4LF.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,5 Hz; *contact mode*; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 0,5 Hz; *contact mode*; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild B (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

Die flache, schollenartige Struktur sowie die erhabene, ziegelartige Struktur auf der Bakterienoberfläche kann der Abbildung 43 in Bild A und B entnommen werden.

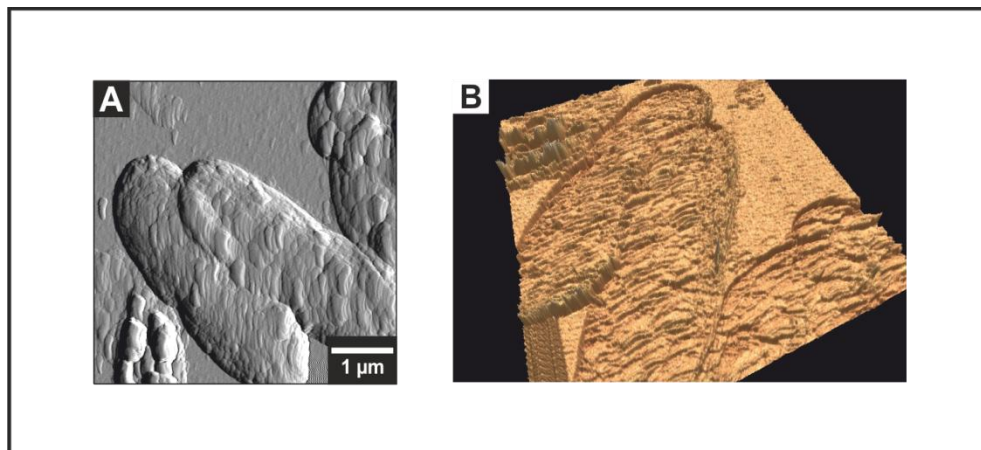


Abbildung 43: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* WBB01+20 µg/ml LPep19-4LF.

Bild A: 5 x 5 µm; scan rate 0,5 Hz; *contact mode*; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Kupfer; *Deflection Retrace*).

4.4.5 AFM-MESSUNGEN VON *E. COLI* BAKTERIEN STAMM WBB01 MIT POLYMYXIN B (PMB)

Die mit Polymyxin B behandelten Bakterien von *E. coli* WBB01 erscheinen in der Masse angegriffen. Die Bestimmung der Abtötung der Bakterien in dieser Probe kann mit $96 \% \pm 2,8 \%$ angegeben werden und für zwei unabhängige Experimente mit $98 \% \pm 2,0 \%$. Sie neigen zu einer mäßigen Aggregation und bleiben in dieser voneinander als einzelne Bakterien abgrenzbar (Abbildung 44, Bild A). Die Oberflächen der mit PMB in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ inkubierten Bakterien sind überwiegend durch unregelmäßig geformte Einsenkungen gekennzeichnet und sehr rau (Abbildung 44, Bild B und C). Vollständig lysierte Bakterien erreichen eine Höhe von etwa 30 nm, aus der bakterielle Zellreste herausragen können. Sie können eine Höhe von 80-120 nm erreichen. Angegriffene Bakterien erreichen Höhen im Bereich von 120 bis 150 nm.

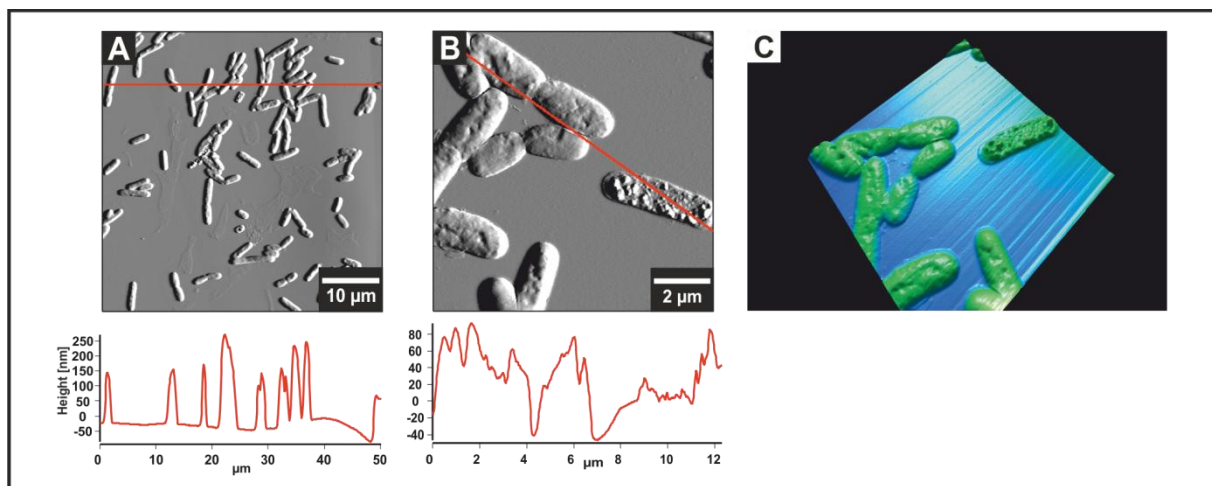


Abbildung 44: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* WBB01+5 µg/ml PMB.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild B (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.6 AFM-MESSUNGEN VON *SALMONELLA ENTERICA* BAKTERIEN STAMM R60

Die Untersuchung von unbehandelten *Salmonella enterica* Bakterien zeigt Bakterien, die durch glatte Oberflächen gekennzeichnet sind (Abbildung 45, Bild B). Es können keine gekörnten oder veränderten Membranen detektiert werden. Die Bakterien liegen zumeist einzeln vor, können jedoch auch sehr dicht zueinander liegen (Abbildung 45, Bild A und C). Die detektierten Höhen der Bakterien aus der Kontrolle liegen im Bereich von 200-230 nm.

Ein kleiner Anteil der Bakterien ($< 10\%$) erreicht Höhen von etwa 140 nm. Die in Abbildung 45, Bild B dargestellten Flagellen der Bakterien können mit einer Höhe von 10-13 nm erfasst werden.

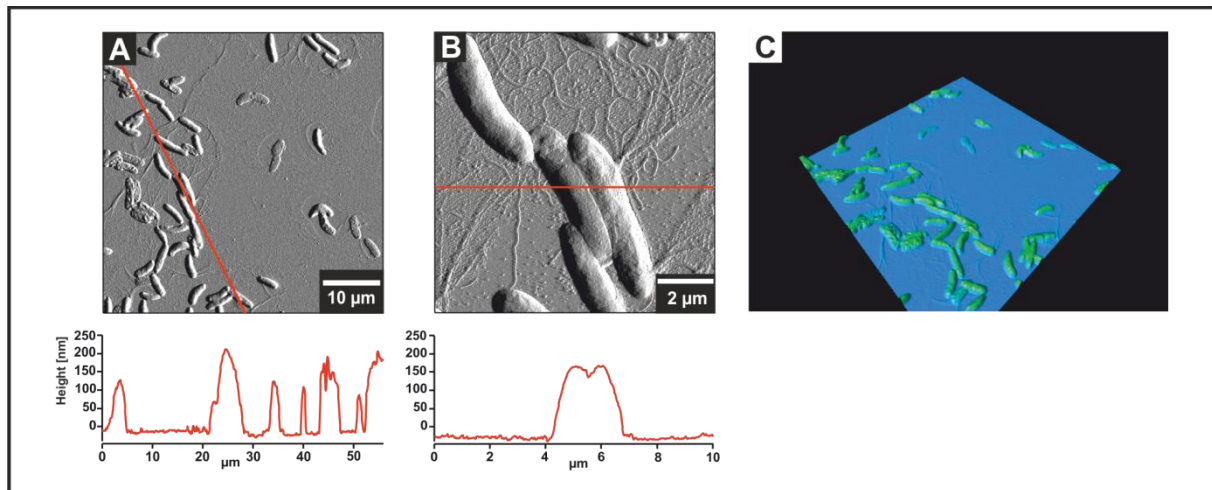


Abbildung 45: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60*.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,25 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.7 AFM-MESSUNGEN VON *SALMONELLA ENTERICA* BAKTERIEN STAMM R60 MIT LPEP19-2.5

Die mit dem Leitpeptid LPEP19-2.5 inkubierten *Salmonella enterica* Bakterien weisen ein im Vergleich zur Kontrolle sehr starkes Aggregationsverhalten auf, wobei in Aggregaten befindliche Bakterien sich nur schwer voneinander differenzieren lassen (Abbildung 46, Bild A und C). In den Aggregationen können sowohl scheinbar intakte, mit glatter Membran versehene Bakterien als auch vermutlich lysierte Bakterien, die durch eine stark gekörnte Oberfläche gekennzeichnet sind und eine Gesamthöhe von etwa 30 nm aufweisen, beobachtet werden (Abbildung 46, Bild B). Die aufeinanderliegenden Bakterien ragen in den Aggregaten bis zu 290 nm in die Höhe (Abbildung 46, Bild A und C). Für diese Probe kann der Wert zur Abtötung der Bakterien mit $30\% \pm 5,7\%$ und für drei unabhängige Experimente mit $31,7\% \pm 4,6\%$ bestimmt werden.

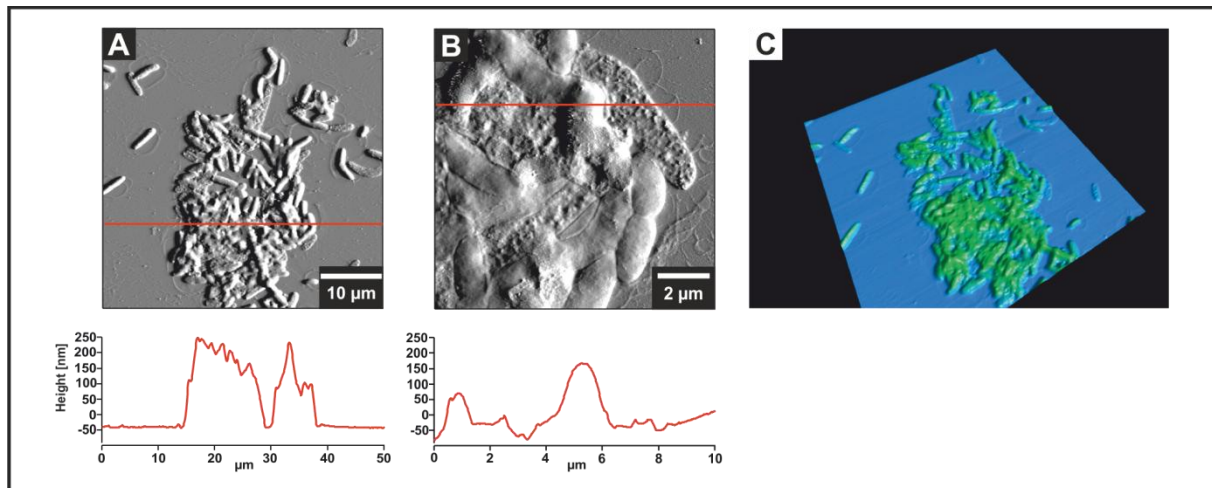


Abbildung 46: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-2.5.*

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.8 AFM-MESSUNGEN VON *SALMONELLA ENTERICA* BAKTERIEN STAMM R60 MIT LPEP19-8.3ACYL

Die Behandlung von *Salmonella enterica* Bakterien mit dem antibakteriellen Peptid LPep19-8.3acyl zeigt überwiegend (etwa zu 60 %) veränderte Bakterienmembranen im Sinne einer ausgeprägten groben Körnung auf der bakteriellen Oberfläche mit vereinzelt auftretenden Vertiefungen entlang der Längsachse der Bakterien (circa 10 %) (Abbildung 47, Bild B). Die vermutlich lysierten Bakterien erreichen dabei Höhen von 70-90 nm, sofern diese nicht übereinanderliegen (Abbildung 47, Bild B). Im Falle einer Aggregation von Bakterien können diese eine Höhe von 190 nm erreichen.

Die zumeist länglichen Vertiefungen entlang der Längsachse der Bakterien können eine Tiefe von 50-80 nm aufweisen (Abbildung 48, Bild A und B).

Der für diese Probe bestimmte Wert zur Abtötung der Bakterien wurde mit $79 \% \pm 22,1 \%$ und für drei unabhängige Experimente mit $60,3 \% \pm 18,0 \%$ bestimmt. Diese Werte können mit den veränderten Membranen in Übereinstimmung gebracht werden und lassen vermuten, daß die auffällige grobe Körnung auf der bakteriellen Membran ein Kennzeichen von abgetöteten Bakterien ist.

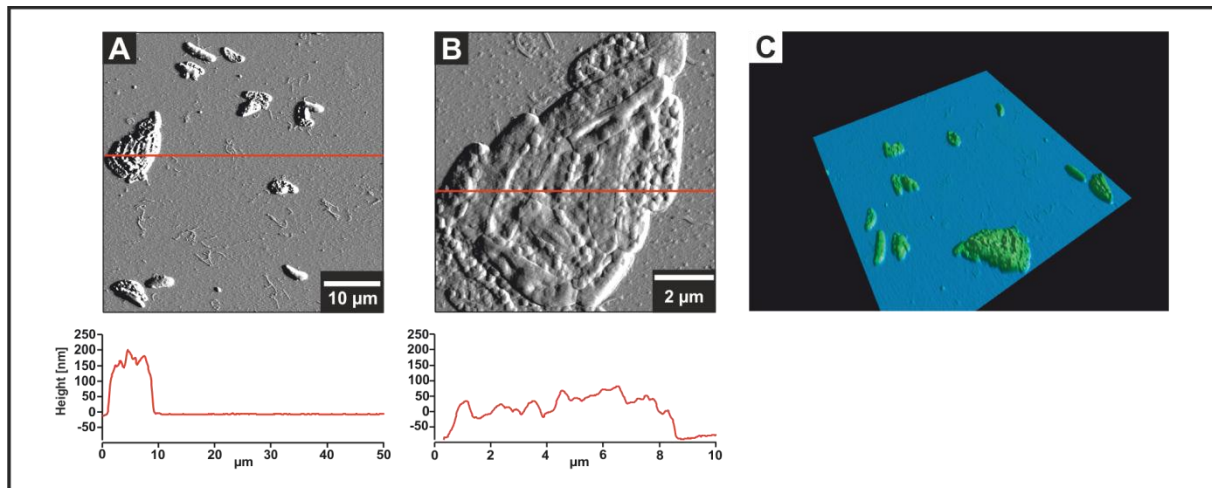


Abbildung 47: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-8.3acyl.*

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

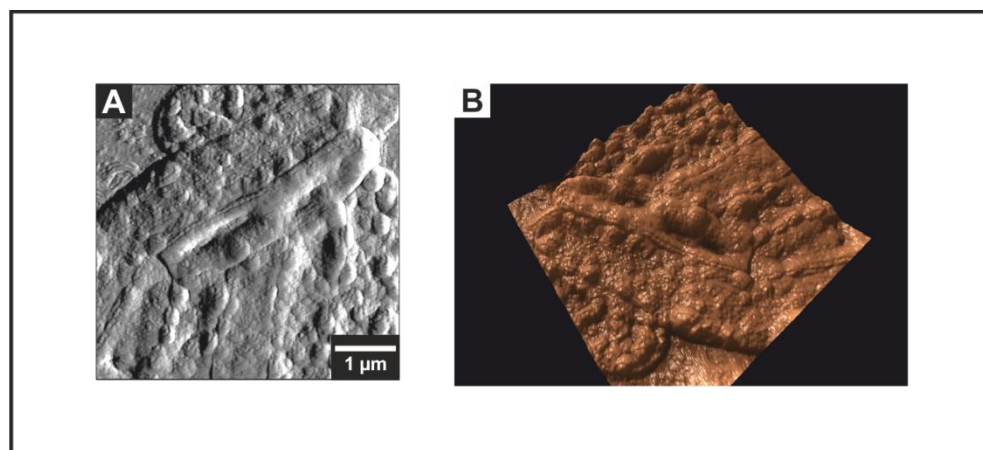


Abbildung 48: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-8.3acyl.*

Bild A: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Kupfer; Height Retrace).

4.4.9 AFM-MESSUNGEN VON *SALMONELLA ENTERICA* BAKTERIEN STAMM R60 MIT LPEP19-4LF

Die mit LPep19-4LF behandelten *Salmonella enterica* Bakterien zeigen ein verstärktes Aggregationsverhalten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 49, Bild A und C), die eine Höhe von 190 nm nicht übersteigen. Es können in etwa 30 % der Fälle angegriffene, scheinbar lysierte Bakterien abgebildet werden, die durch eine körnige Zeichnung ihrer

Bakterienoberfläche und einer Gesamthöhe von circa 30-40 nm charakterisiert sind (Abbildung 49, Bild B). Neben den scheinbar lysierten Bakterien lassen sich intakte Bakterien, die bezüglich ihrer Größe, Höhe und glatten Oberflächenstruktur mit der Kontrolle vergleichbar sind, abbilden (Abbildung 49, Bild B). Der Wert der Lebendkeimzahlbestimmung für diese Probe kann mit $52 \% \pm 18,4 \%$ und für zwei unabhängige Experimente mit $39 \% \pm 13,0 \%$ angegeben werden. Diese Werte lassen sich mit der Beobachtung von körnigen und sehr flachen Bakterien (circa 30 % der Bakterien) in Einklang bringen.

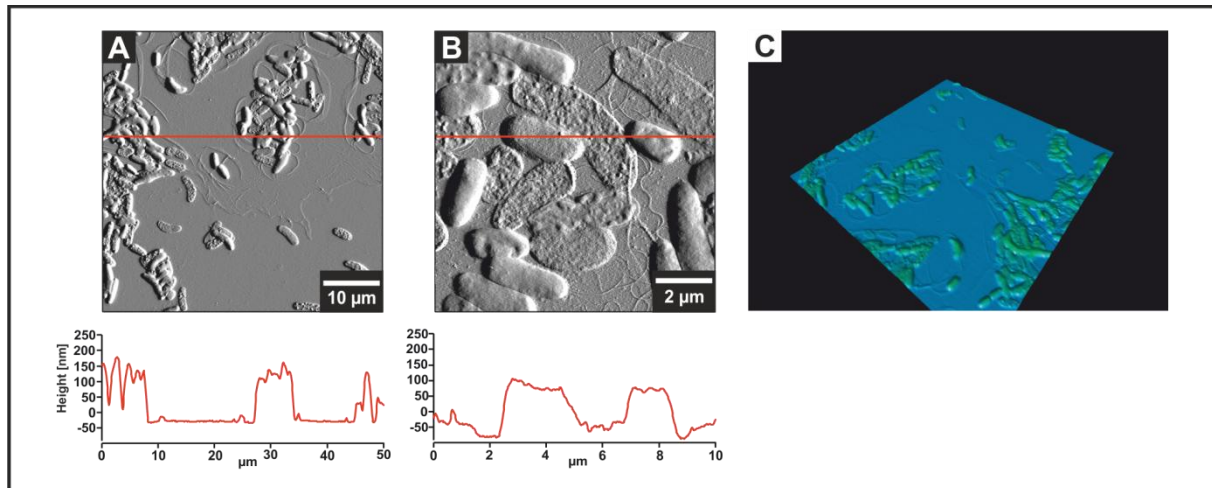


Abbildung 49: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60+20 µg/ml LPep19-4LF*.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.10 AFM-MESSUNGEN VON *SALMONELLA ENTERICA* BAKTERIEN STAMM R60 MIT POLYMYXIN B (PMB)

Die Inkubation von *Salmonella enterica* Bakterien mit PMB zieht eine mäßig ausgeprägte Aggregationsneigung nach sich. Die Bakterien in diesen Aggregationen liegen eng zusammen und grenzen mit ihren Membranen aneinander (Abbildung 50, Bild A, B und C). Es können jedoch keine Aggregationen von Bakterien beobachtet werden, die mehrere Schichten ausbilden und in die Höhe ragen, wie es mit der Behandlung mit LPep19-2.5 beobachtet werden konnte. Die Oberflächenstruktur der Bakterien ist überwiegend glatt (Abbildung 50, Bild B). Der Oberflächenzeichnung nach scheinbar intakte Bakterien (circa 90 % der Fälle) stimmen bezüglich ihrer Höhe mit der Höhe der Bakterien in der Kontrolle überein. Neben intakten Bakterien können in ihrer Form konservierte Bakterien mit glatter

Oberflächenzeichnung jedoch mit Höhen von nur 70 nm beobachtet werden. Vereinzelt (circa 10 % der Bakterien) sind vermutlich angegriffene und teils lysierte Bakterien erkennbar, die eine stark gekörnte Membran aufweisen und durch Höhen von etwa 30 nm charakterisiert sind (Abbildung 50, Bild B).

Der Wert zur Abtötung der Bakterien in dieser Probe wurde mit $15 \% \pm 27,8 \%$ bestimmt und deckt sich mit der Beobachtung von überwiegend (circa 90 % der Bakterien) scheinbar nicht veränderten Bakterien, die mit Bakterien der Kontrolle vergleichbar sind. Die Lebendkeimzahlbestimmung von drei unabhängigen Experimenten ergibt $37,7 \% \pm 22,7 \%$.

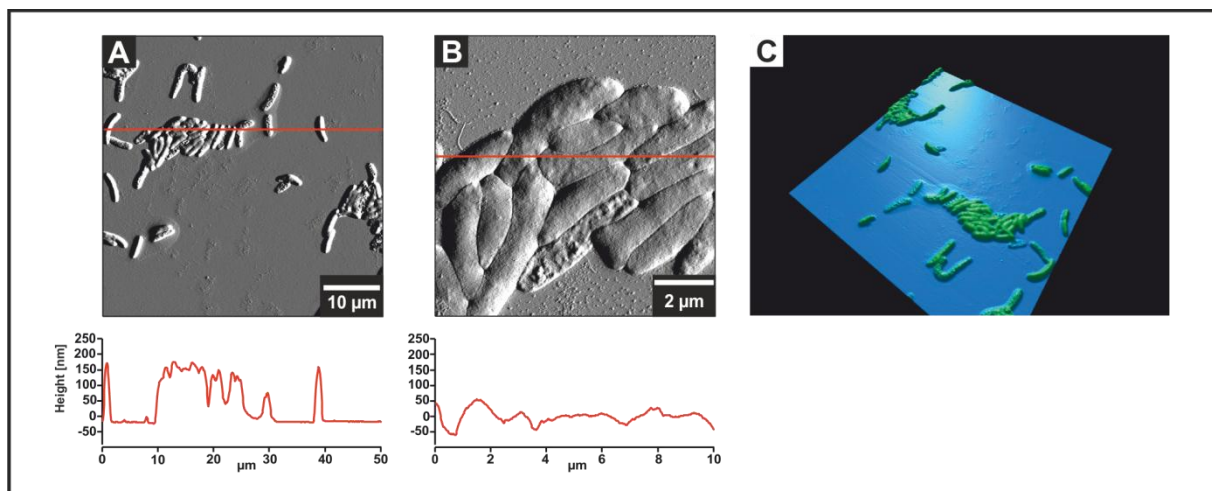


Abbildung 50: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60+5 µg/ml* PMB.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

In Abbildung 51, Bild A und B ist ein durch PMB lysiertes Bakterium dargestellt. Das in der Mitte scheinbar aufgeplatzte Bakterium zeigt Höhen im Bereich seines Korpus von etwa 100-115 nm. Die Oberfläche des Bakteriums erscheint glatt. An der Bruchstelle können Zelllysate bzw. Bruchstücke oder Zelltrümmer dargestellt werden, die auf dem Träger Mica eine Höhe von etwa 20 nm erreichen. Die Läsion in der Mitte des Bakteriums erreicht eine Höhe von etwa 70 nm und liegt damit circa 45 nm tiefer als die bakterielle Oberfläche.

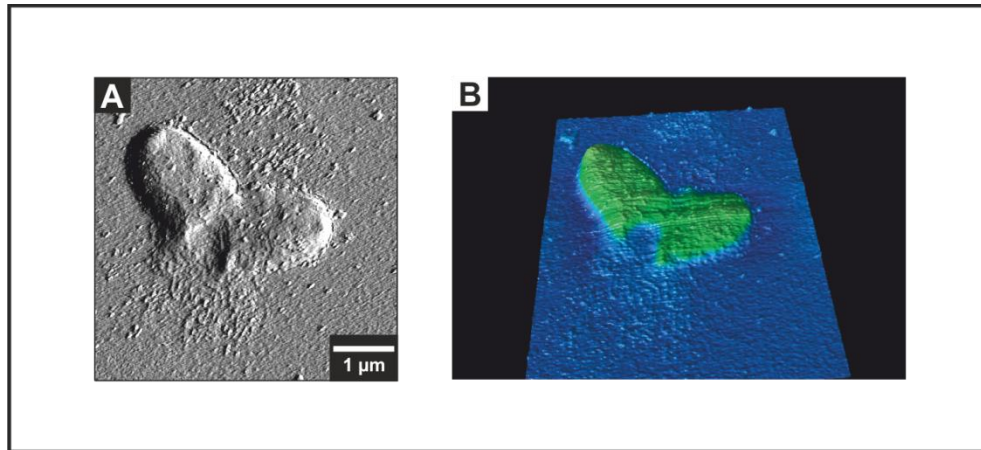


Abbildung 51: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Sal. ent. ser. Minn. R60*+5 µg/ml PMB.

Bild A: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain; Height Retrace).

4.4.11 AFM-MESSUNGEN VON *PROTEUS MIRABILIS* BAKTERIEN

Unbehandelte *P. mirabilis* Bakterien sind durch eine starke Aggregationsneigung gekennzeichnet (Abbildung 52, Bild A und C). Einzelne Bakterien lassen sich jedoch in diesen Aggregationen voneinander abgrenzen. Die Oberfläche der Bakterien erscheint sehr glatt, ebenso ihre Randzeichnung (Abbildung 52, Bild B sowie Abbildung 53, Bild A und B). Die Höhen von einzelnen Bakterien liegt zwischen 130-150 nm, im Falle von aggregierten Bakterien können Höhen von etwa 200-220 nm beobachtet werden (Abbildung 52, Bild B sowie Abbildung 53, Bild A und B).

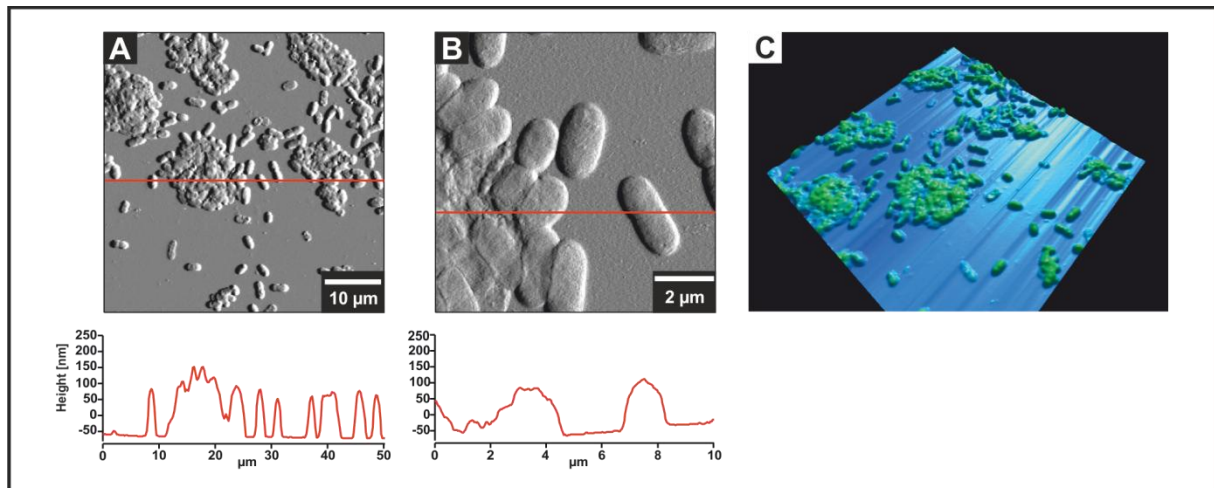


Abbildung 52: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis*.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

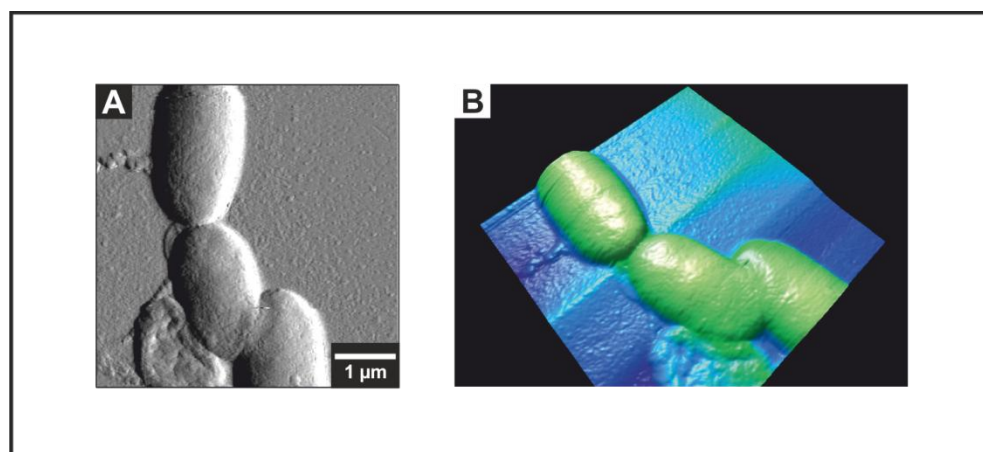


Abbildung 53: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis*.

Bild A: 5 x 5 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain; Height Retrace).

4.4.12 AFM-MESSUNGEN VON *PROTEUS MIRABILIS* BAKTERIEN MIT LPEP19-2.5

Die mit LPEP19-2.5 (20 µg/ml) behandelten Bakterien bilden sehr große und sehr hohe Aggregationen mit Höhen im Bereich von 0,9 µm bis 1,7 µm, in denen einzelne Bakterien nicht mehr unterscheidbar sind. Die Aggregationen sind scheinbar mit einer Art Schicht bedeckt (Abbildung 54, Bilder A-C sowie Abbildung 55, Bild A und C). In kleineren Aggregationen, bestehend aus nur wenigen Bakterien, können Höhen von 140-180 nm beobachtet werden (Abbildung 55, Bild B). Ihre Oberfläche unterscheidet sich von den

Oberflächen der Kontrolle durch knotenähnliche Auftreibungen und einer Art Bedeckung der gesamten Oberfläche (Abbildung 54, Bild B sowie Abbildung 55, Bild B). Im Vergleich zur Kontrolle ist die Randzeichnung der Bakterien in allen Fällen nicht mehr scharf und klar ausgebildet (Abbildung 54, Bild A und B sowie Abbildung 55, Bild A und C).

Der Wert zur Abtötung der Bakterien liegt bei 100 %. Dieser Wert kann hier durch die ausgeprägte Aggregationsneigung der Bakterien nur schwer mit morphologischen Veränderungen der bakteriellen Oberfläche oder der bakteriellen Form als Ganzes in Einklang gebracht werden.

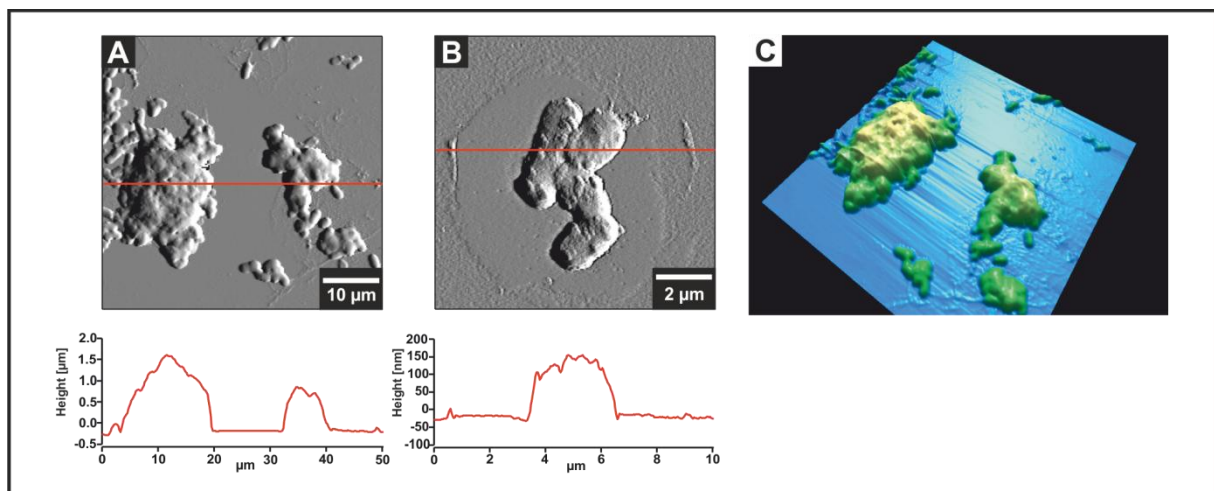


Abbildung 54: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis* + 20 µg/ml LPep19-2.5.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

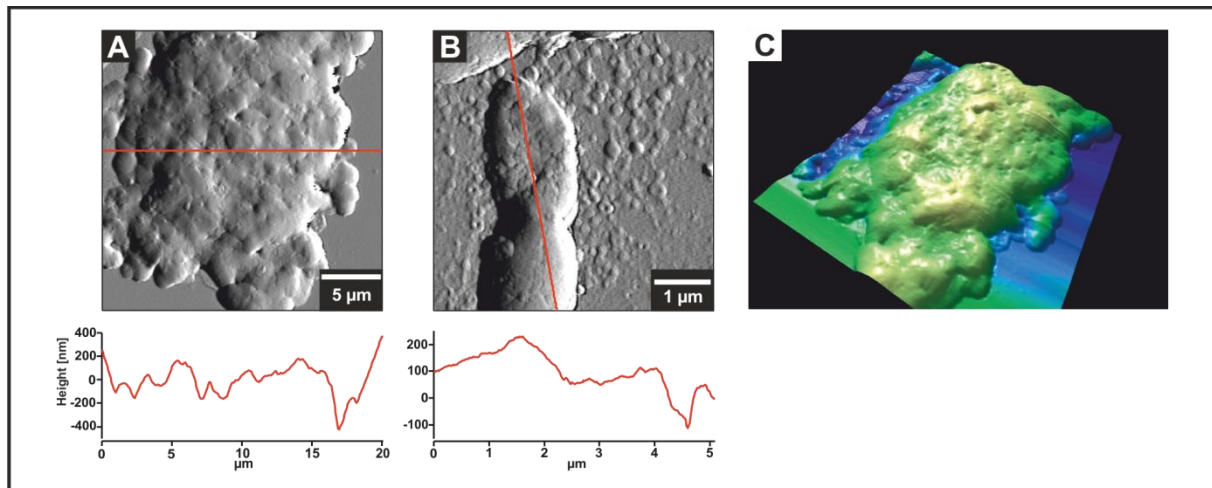


Abbildung 55: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis*+20 µg/ml LPep19-2.5.

Bild A: 20 x 20 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.13 AFM-MESSUNGEN VON *PROTEUS MIRABILIS* BAKTERIEN MIT LPep19-8.3ACYL

Die Behandlung von *P. mirabilis* mit LPep19-8.3acyl führt zu großflächigen Aggregationen, in denen, wie im Fall von LPep19-2.5 (Aspidasept®), keine einzelnen Bakterien sichtbar sind. Die Aggregationen scheinen großflächig mit einer Art Schicht bedeckt zu sein. An den Randbereichen der Aggregationen können Teile von in der Aggregation eingeschlossen Bakterien abgebildet werden. Die Aggregationen erreichen Höhen von etwa 500 nm (Abbildung 56, Bild A und C). Bakterien in kleineren Aggregationen erscheinen flach mit Höhen im Bereich von 30-70 nm. Erhabene Strukturen lassen sich besonders an Randbereichen der Bakterien darstellen, die eine Höhe von etwa 30 nm erreichen (Abbildung 56, Bild B).

Der Wert zur Abtötung der Bakterien durch LPep19-8.3acyl liegt bei 95 %.

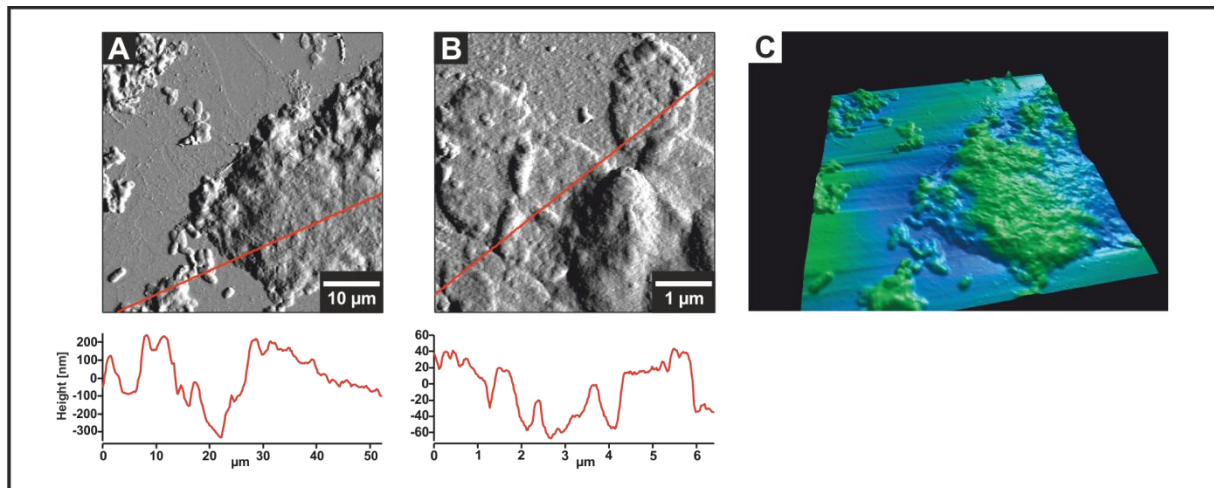


Abbildung 56: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis* + 20 µg/ml LPep19-8.3acyl.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

4.4.14 AFM-MESSUNGEN VON *PROTEUS MIRABILIS* BAKTERIEN MIT LPEP19-4LF

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von *P. mirabilis* Bakterien mit dem antimikrobiellen Peptid LPep19-4LF zeigt wie im Fall von LPep19-2.5 und LPep19-8.3acyl eine starke Aggregation von *P. mirabilis*. Die Aggregate erreichen im Falle flächiger Aggregationen Höhen im Bereich von etwa 300 nm, können jedoch auch zu höheren Aggregationen mit einer Höhe von bis zu etwa 500-800 nm in Erscheinung treten (Abbildung 57, Bild A sowie Abbildung 58, Bild A). In diesen Aggregationen lassen sich im Gegensatz zu den Aggregationen, die auf die Wirkung von LPep19-2.5 und LPep19-8.3acyl zurückzuführen sind, einzelne Bakterien differenzieren. Die Oberfläche der Bakterien scheint gleichmäßig mit einem glatten Überzug bedeckt, der die Bakterien vollständig bis in die Randbereiche umhüllt (Abbildung 57, Bild B).

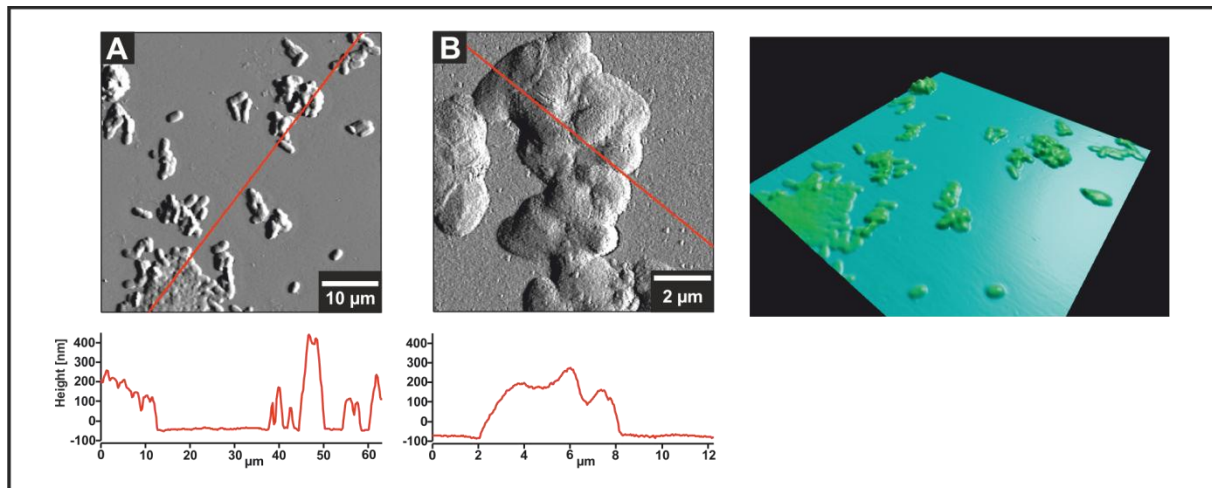


Abbildung 57: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis*+20 µg/ml LPep19-4LF.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 10 x 10 µm; scan rate 0,5 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

Besonders an Randbereichen von Aggregationen können mehrere Lagen von übereinander liegenden Bakterien abgebildet werden (Abbildung 58, Bild A), die sofern sie nicht oder nur teilweise von anderen Bakterien überdeckt sind, Höhen von etwa 130 nm erreichen.

Das Peptid LPep19-4LF führt bei einer Konzentration von 20 µg/ml zu einer 96 %-igen Abtötung von *P. mirabilis*.

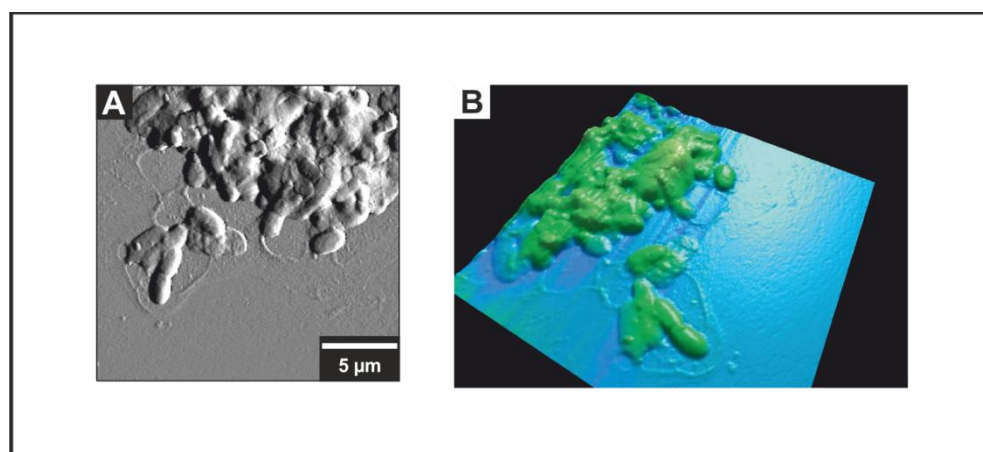


Abbildung 58: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis*+20 µg/ml LPep19-4LF.

Bild A: 20 x 20 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain; Height Retrace).

4.4.15 AFM-MESSUNGEN VON *PROTEUS MIRABILIS* BAKTERIEN MIT POLYMYXIN B (PMB)

Die mit 5 µg/ml PMB behandelten *P. mirabilis* Bakterien zeigen Aggregationen auf, die sich von den Aggregationen durch Vertreter der LPep-Gruppe unterscheiden. So treten die Aggregationen nicht großflächig in Erscheinung und einzelne Bakterien sind in den Aggregationen voneinander differenzierbar (Abbildung 59, Bild A und B). Bakterien mit glatter Oberfläche, vergleichbar mit Bakterien der Kontrolle, erreichen Höhen von etwa 150 nm (Abbildung 59, Bild B). In etwa 30 % der Fälle können Bakterien mit veränderter und rauer Membran dargestellt werden, die Höhen im Bereich von 30-70 nm aufweisen (Abbildung 60, Bild B).

Anders als bei den antimikrobiellen Peptiden LPep19-2.5, LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF ist keine Bedeckung von Bakterien mit einer Art Schicht detektierbar. Bakterien mit glatter Oberfläche entsprechen in ihrer Morphologie im Wesentlichen unbehandelten Bakterien.

Das Polymyxin B führt bei einer Konzentration von 5 µg/ml zu einer 36 %-igen Abtötung der Bakterien. Dieser Wert ist mit den zu etwa 30 % der Fälle zu beobachtenden flachen und mit einer unregelmäßigen, sehr rauen Oberfläche versehenen *P. mirabilis* Bakterien in Übereinstimmung zu bringen.

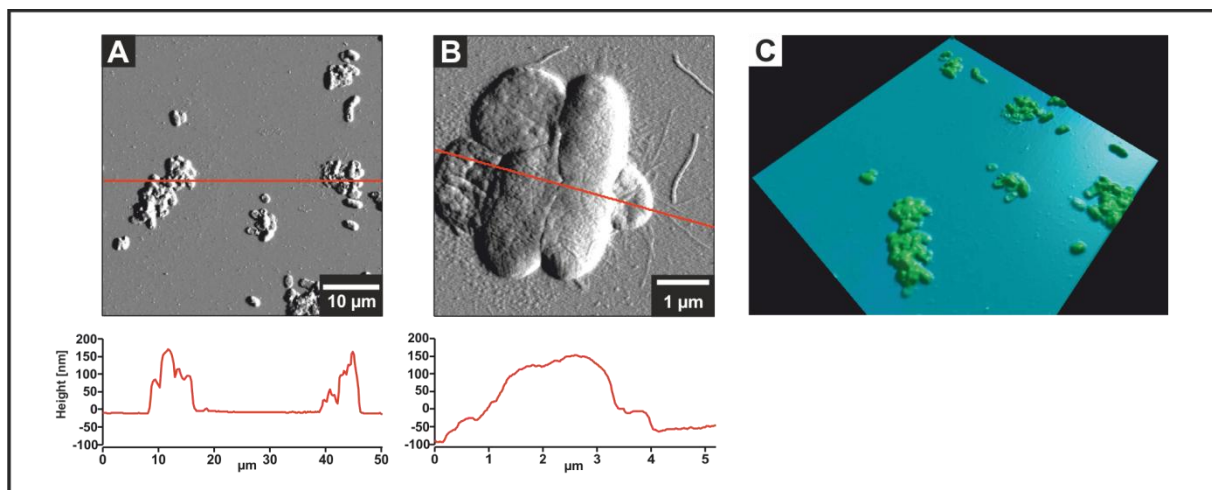


Abbildung 59: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis* + 5 µg/ml PMB.

Bild A: 50 x 50 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild C: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain).

Rote Linien stellen Höhenprofile dar.

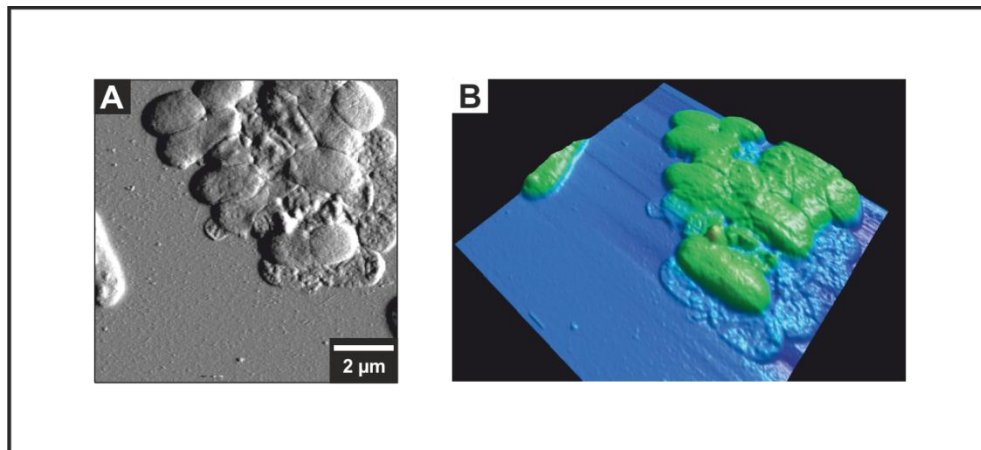


Abbildung 60: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis* + 5 µg/ml PMB.

Bild A: 10 x 10 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain; Z-Sensor Retrace).

In Abbildung 61, Bild A und B sind Bakterien mit einer glatten Oberflächenzeichnung und Bakterien mit einer sehr rauen und körnigen Oberfläche dargestellt. Man beachte den Höhenunterschied von etwa 190 nm Höhe bei glatter Membranzeichnung zu circa 60 nm Höhe bei stark veränderter Membran.

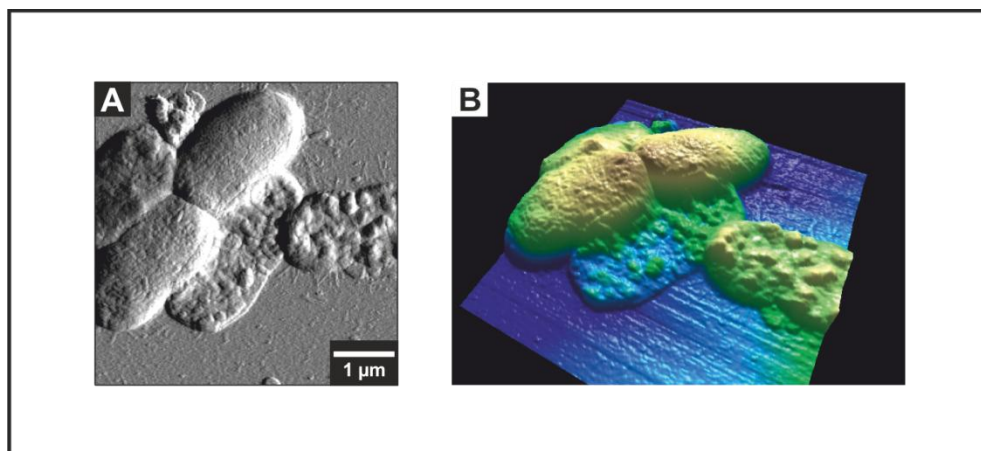


Abbildung 61: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von *Proteus mirabilis* + 5 µg/ml PMB.

Bild A: 5 x 5 µm; scan rate 1,0 Hz; contact mode; Messung an Luft; cantilever CSG 11;

Bild B: Drei-dimensionale Darstellung von Bild A (Farbcode Terrain; Z-Sensor Retrace).

4.5 AFM-MESSUNGEN VON *E. COLI* LIPOPOLYSACCHARID STAMM WBB01 MIT LPEP19-2.5

In einer Versuchsreihe mit Rasterkraftmikroskopie ist die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) auf das Re Lipopolysaccharid von *E. coli* Stamm WBB01 untersucht worden. Die LPS-Lösung wurde auf dem Träger Mica immobilisiert und mit Puffer,

bestehend aus 100 mM NaCl, 50 mM HEPES mit einem pH-Wert von 7,4, überschichtet. Die LPS-Aggregate binden an den Träger Mica, spreiten sich über diesen auf und bilden eine Doppelschicht aus Lipopolysacchariden aus (siehe Kapitel 3.12). Die LPS-Probe wurde vor der Messung mit mindestens 3 ml Puffer gespült, um störende und nicht an Mica geheftete LPS-Aggregate aus der Lösung zu entfernen. Die über Nacht inkubierten und auf Mica immobilisierten LPS-Proben wurden zunächst ohne Peptid bei Raumtemperatur von +20 °C im Puffer untersucht. Nach Charakterisierung der LPS-Probe wurde das im gleichen Puffer gelöste Peptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) in die LPS-Probe bei laufender Messung gegeben. Das Peptid verteilt sich per Diffusion in der Probe und tritt nach etwa 60 Minuten mit der auf Mica immobilisierten LPS-Doppelschicht in Wechselwirkung. Die Wirkung des Peptids ist sukzessive durch die stetige Abtastung bzw. Abrasterung der Probe durch den *cantilever* beobachtet worden. Nach einer Beobachtungszeit von 150 Minuten bei Raumtemperatur ist die Probe auf +40 °C aufgeheizt und für weitere 150 Minuten abgerastert worden.

In Abbildung 62 ist die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 auf immobilisiertes *E. coli* WBB01 LPS in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur dargestellt. In Bild A der Abbildung 62 ist die LPS-Probe bei +20 °C charakterisiert. Punktförmige (grau dargestellte Areale) Strukturen, die zu größeren LPS-Flecken konfluieren, erreichen Höhen im Bereich von 6-8 nm (rote Höhenlinie in Bild A und Höhenprofil mittig). Im drei-dimensionalen Bild D erscheint ein ungleichmäßig bedeckter Träger mit LPS, der durch gleiche Höhen gekennzeichnet ist, wobei das mehrfache mechanische Abrastern der Probe die Erscheinung der Probe weder in seiner Form noch in seiner Höhe verändert.

Nach Applikation des im gleichen Puffer gelösten Leitpeptids LPep19-2.5 bei +20 °C kann nach stetigem Abtasten derselben Stelle eine Zunahme von hohen Strukturen (weiße Strukturen) detektiert werden. Bei einer Beobachtungszeit von 150 Minuten (Bild B) können multiple ortsständige (nicht verschiebliche) hohe Strukturen erfasst werden, deren Höhen im Bereich von 16-18 nm liegen und vereinzelt 20 nm erreichen (rote Höhenlinie in Bild B und Höhenprofil mittig). Aus der drei-dimensionalen Darstellung in Bild E können diese Erhöhungen als vereinzelt, aus der immobilisierten LPS-Schicht herausragende, Strukturen abgelesen werden.

Die folgende Temperierung der Probe auf +40 °C für weitere 150 Minuten zeigt eine Zunahme der Veränderung der auf Mica immobilisierten LPS-Struktur durch eine Zunahme an Zahl und Ausdehnung hoher Areale, die aus der LPS-Schicht hinausragen und Höhen von etwa 40 nm, im Einzelfall über 150 nm, erreichen können (Bild C, Höhenlinie in Bild C und

Höhenprofil). In der drei-dimensionalen Darstellung sind diese nadelähnlichen Strukturen klar von der auf Mica immobilisierten LPS-Schicht abgrenzbar.

Die Untersuchung der gleichen Stelle über einen Beobachtungszeitraum von 300 Minuten zeigt eine starke Veränderung der immobilisierten LPS-Schicht durch die Einwirkung des Leitpeptids im Sinne einer Zunahme an hohen Strukturen, die durch eine Erhöhung der Temperatur auf +40 °C verstärkt wird.

Versuche ohne Temperierung auf +40 °C der LPS-Probe mit dem Leitpeptid führen zu gleichen Ergebnissen, benötigen jedoch eine längere Inkubationszeit des Leitpeptids auf der immobilisierten LPS-Schicht (Daten hier nicht gezeigt).

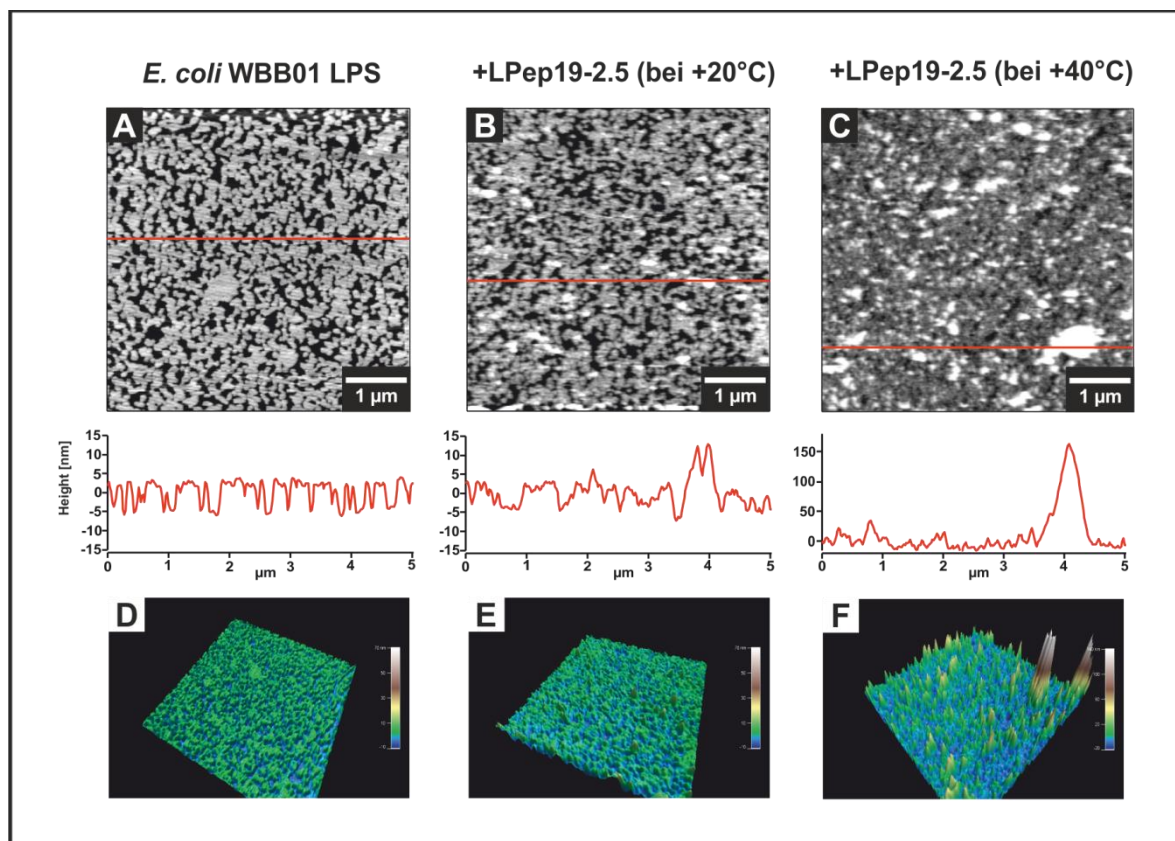


Abbildung 62: Dynamische rasterkraftmikroskopische Studien von *E. coli* WBB01 LPS in Wechselwirkung mit dem Leitpeptid LPep19-2.5.

Obere Reihe: Bild A: *E. coli* WBB01 LPS, Aufnahme bei 20 °C. Bild B: Aufnahme nach 150 min der Applikation von 22,7 µM LPep19-2.5 bei 20 °C; Bild C: Aufnahme 150 min nach Bild B und 300 min nach Bild A bei 40 °C für 150 min.

Mittlere Reihe: Höhenprofile in Nanometer zu den Bildern A-C.

Untere Reihe: Drei-dimensionale Darstellung der Bilder A-C (Farbcode Terrain, *Height Retrace*).

Bilder A-C: Bildgröße: 5 x 5 µm; Scan rate 0,5 Hz; *non-contact mode*; Messung in Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,4).

4.6 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE STUDIEN VON *SAL. ENT. SER. MINN.* LIPOPOLYSACCHARID MIT LPEP19-2.5 IN GEFRIERBRUCHTECHNIK

Die Wechselwirkung des Lipopolysaccharids R60 von *Salmonella enterica* serovar Minnesota mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) wurde in Kooperation mit Dr. Walter Richter aus dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsklinik Jena mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Kombination mit Gefrierbruchtechniken untersucht. Der Einsatz der Gefrierbruchtechnik ermöglicht eine etwas plastischere Sichtweise von Strukturen im Vergleich zu Aufsichtsaufnahmen.

Das bildgebende Verfahren der Elektronenmikroskopie zeigt für das Lipopolysaccharid längliche, bandartige Strukturen, deren Ausdehnung Längen von mehreren Hundert Nanometern erreichen und eine Dicke von etwa 14 bis 20 nm aufweisen (Abbildung 63, linke Bildhälfte, Einschub). Die Lipopolysaccharid-Aggregate können sowohl als quer (durch Stern markierte Anordnung) als auch tangential (durch Dreieck markierte Anordnung) angeschnittene Strukturen abgebildet werden.

In Anwesenheit des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) wird diese Ordnung vollständig aufgehoben und in eine dicht gepackte multilamellare Struktur überführt. Die terrassenartigen Stufen formen einen Stapel aus mehreren Dutzend LPS-Aggregaten (Abbildung 63, rechte Bildhälfte), die mit den Ergebnissen der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) im Sinne einer Multilamellarisierung korrespondieren.

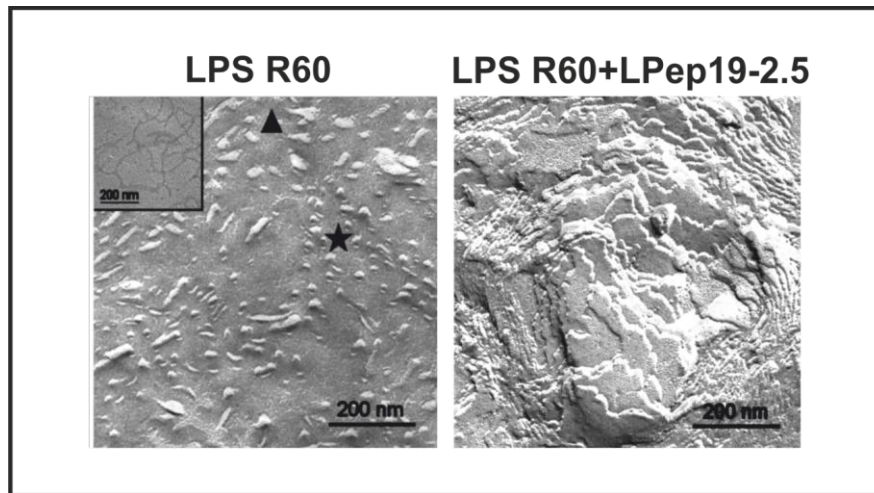


Abbildung 63: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Salmonella enterica* serovar Minnesota LPS.

Linke Bildhälfte: *Sal. ent.* ser. Minn. LPS alleine

Rechte Bildhälfte: *Sal. ent.* ser. Minn. LPS inkubiert mit dem Leitpeptid Aspidasept®.

Stern: quer angeschnittene LPS-Aggregate; Dreieck: tangential angeschnittene LPS-Aggregate.

Aufnahme durch Dr. Walter Richter des Elektronenmikroskopischen Zentrums der Universitätsklinik Jena [70].

4.7 STUDIEN MIT KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG (SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING, SAXS) VON LIPOPOLYSACCHARID R60 UND LIPID A R60 MIT LPep19-2.5

Das Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota (R60) und sein korrespondierender Lipid-A Teil wurden mittels Synchrotronstrahlung am DESY/HASYLAB (Deutsches Elektronen-Synchrotron/Hamburger Synchrotronstrahlungs Labor) des EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) DORIS-Speicherring *beamline* X33 untersucht mit dem Ziel, Aussagen über die supramolekulare Struktur zu treffen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß der biologisch aktive Teil von LPS-Aggregaten und Lipid A-Aggregaten eine in der drei-dimensionalen Darstellung kubische Form einnimmt [25, 26, 131]. Die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) auf die supramolekulare Struktur der LPS-Aggregate bzw. der Aggregate seines Lipid-A Teils wurde mit Synchrotronstrahlung bei Temperaturen von +20 °C, +40 °C, +60 °C und +80 °C untersucht. Die Temperaturen von +60 °C und +80 °C sind zwar mit physiologischen Verhältnissen unvereinbar, jedoch können supramolekulare Zustände höherer Ordnung der untersuchten Proben erst bei höheren Temperaturen erfasst werden.

Für LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota mit LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) in einem molaren Verhältnis von 3:1 können zwei starke Signale/Reflektionen bei 8,85 nm (8,70 nm) und 4,55 nm (4,48 nm), die bei +60 °C prominenter und schärfer werden, (Abbildung 64, linke Bildhälfte mittig und unten) abgelesen werden. Diese Reflektionen werden als 1. und 2. Ordnung bezeichnet und stellen den aus der Literatur bekannten Abstand zwischen zwei LPS-Aggregaten, speziell die Elektronendichte zwischen den Phosphatgruppen des LPS am Lipid-A-Teil, dar [131]. Die Reflexe bei 3,00 nm und 1,80 nm, die bei Messungen von +60 °C auftreten (Abbildung 64, linke Bildhälfte unten), sind nicht prominent, können jedoch Signale der 3. und 4. Ordnung darstellen.

Vergleichsmessungen mit den Peptiden LPep19-2.5KO und LPep19-8 mit LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota zeigen eine eher konservierte supramolekulare Struktur von LPS, die ihren kubischen Charakter durch die Wirkung der Peptide nicht verliert (Daten hier nicht gezeigt [70]).

Die Untersuchung des Lipid-A Teils des LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota zeigt ein komplexes Spektrum von Signalen/Reflektionen bei 8,18 nm, 5,29 nm sowie bei 4,06 nm und 3,28 nm, wobei die ersten drei Reflektionen den Verhältnissen $a_Q/\sqrt{2}$, $a_Q/\sqrt{5}$ und $a_Q/\sqrt{8}$ folgen und eine kubische Periodizität von $a_Q=11,6 \pm 0,2$ nm einnehmen (Abbildung 64, rechte Bildhälfte oben). In Anwesenheit des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) in einem molaren Verhältnis von Lipid A zu Peptid von 7:1 wird die komplexe kubische Struktur aufgehoben und in eine lamellare Struktur überführt, die sich in einem scharfen und starken Signal bei 5,07 nm zeigt. Dieses scharfe Signal entspricht einem Lipid A-Teil mit multilamellarer Struktur [25].

Das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) wirkt auf den Lipid A-Teil des LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota und auf das LPS als Ganzes im Sinne einer Konvertierung des biologisch aktiven kubischen Teils in eine multilamellare zylindrische Struktur, die, ohne der Diskussion vorgreifen zu wollen, biologisch inaktiv ist.

Die Daten aus den Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen unterstützen die Ergebnisse aus den elektronenmikroskopischen und rasterkraftmikroskopischen Studien zur Wechselwirkung von LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) mit LPS.

Die unabhängig voneinander erhobenen Datensätze mittels Rasterkraftmikroskopie, Elektronenmikroskopie und Kleinwinkel-Röntgenstreuung lassen den Schluß zu, daß der Effekt des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) auf LPS-Aggregate im Sinne einer

Veränderung der LPS-Struktur wirkt. Die LPS-Aggregate bilden multilamellare Strukturen bzw. Stapel aus, von denen keine oder eine nur sehr geringe biologische Aktivität ausgeht.

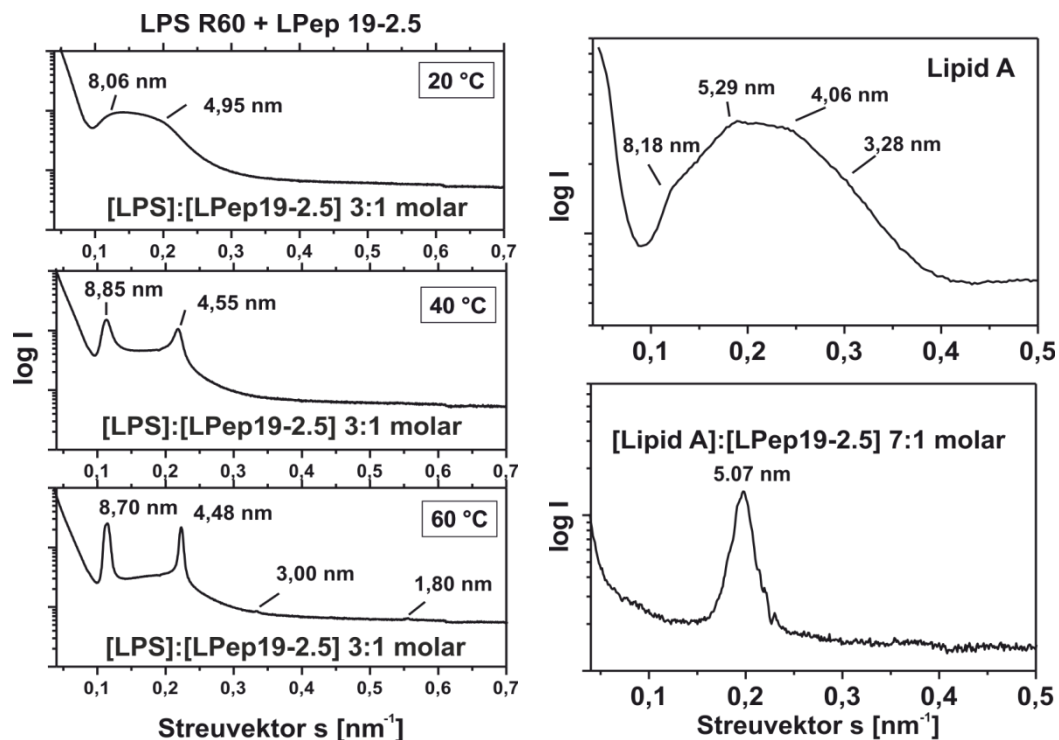


Abbildung 64: Wirkung des Leitpeptids LPeP19-2.5 auf die supramolekulare Struktur von LPS-Aggregaten von *Sal. ent. ser. Minn.* und seines Lipid A-Teils.

Linke Bildhälfte: Synchrotronstrahlungsmessung (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*) von Ra LPS mit dem Leitpeptid LPeP19-2.5 in einem molaren Verhältnis von 3:1 bei drei Temperaturen (+20 °C oben, +40 °C mittig, +60 °C unten) [70].

Rechte Bildhälfte: Synchrotronstrahlungsmessung (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*) von Lipid A des *Sal. ent. ser. Minn.* LPS (oben) mit dem Leitpeptid LPeP19-2.5 in einem molaren Verhältnis von 7:1 (unten) [54].

Der Logarithmus der Streuungsintensität ist gegen den Streuvektor „s“ aufgetragen, wobei $s=1/d$ entspricht, mit „d“ als Gitterabstand der Reflektionen mit gleicher Elektronendichte.

4.8 STUDIEN MIT KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG (*SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING*, SAXS) VON BAKTERIELLEN MEMBRANLIPIDEN MIT LPEP19-2.5 UND LPEP19-4LF

Das bakterielle Lipidmembranmodell, aus den Komponenten Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) in einem molaren Verhältnis von 81:17:2

bestehend, wurde mittels Synchrotronstrahlung am DESY/HASYLAB des EMBL am DORIS-Speicherring *beamline* X33 untersucht.

Die Charakterisierung des bakteriellen Lipidsystems zeigt eine Veränderung seiner supramolekularen Struktur von einer multilamellaren Ordnung bei +20 °C (Abbildung 65, Bild A), die bis zur vierten Ordnung messbar ist, in eine invertiert hexagonale Struktur (Abbildung 65, Bild B), auch als H_{II} -Struktur bezeichnet, die sich durch ein charakteristisches Reflektionsmuster auszeichnet. Die Reflexionen bei 5,13 nm, 2,58 nm, 1,72 nm sowie 1,29 nm entsprechen einer multilamellaren Ordnung, während der Reflex bei 7,27 nm einer hexagonalen Struktur entspricht (Abbildung 65, Bild A). Diese geordnete lamellare Struktur wird ab einer Temperatur von +40 °C in eine hexagonal invertierte Struktur umgewandelt, die sich bei +60 °C manifestiert und schließlich bei +80 °C ihre volle Ausprägung erreicht. Von den Reflexen in Abbildung 65, Bild B können die Hauptperiodizitäten von 5,78 nm, 3,32 nm ($a_Q/\sqrt{3}$), 2,88 nm ($a_Q/\sqrt{4}$), 2,18 nm ($a_Q/\sqrt{7}$), 1,93 nm ($a_Q/\sqrt{9}$) und 1,76 nm ($a_Q/\sqrt{12}$) abgelesen werden. Sie stehen für eine charakteristische hexagonal invertierte Struktur.

In Anwesenheit der antimikrobiellen Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) (Abbildung 65, Bild C) und LPep19-4LF (Abbildung 65, Bild D) ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer hexagonal invertierten Struktur durch den Einfluß der Temperatur vollständig aufgehoben. Für das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) kann bei +20 °C eine *bilayer*-Struktur (unilamellar) gezeigt werden mit einem Signal bei 6,25 nm (Abbildung 65, Bild C), das seine Struktur im Wesentlichen konserviert mit einem Signal bei 5,00 nm (+80 °C). Die Wanderung des prominenten Signals von 6,25 nm auf 5,00 nm ist auf die Verringerung des Abstandes der Elektronendichten der Kopfgruppen der Lipide durch das „Schmelzen“ der dazwischenliegenden Acylketten zurückzuführen.

Das antimikrobielle Peptid LPep19-4LF wirkt auf das bakterielle Lipidgemisch in gleicher Weise. Die supramolekulare Struktur entspricht einer *bilayer*-Struktur, die vermutlich noch einen geringen Anteil einer hexagonal invertierten Struktur enthält, die durch das Signal bei 3,25 nm indiziert ist (Abbildung 65, Bild D).

Insgesamt wird die supramolekulare Struktur der bakteriellen Membran durch die untersuchten antimikrobiellen Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) und LPep19-4LF von einer multilamellaren, hexagonalen in eine elementare *bilayer*-Struktur umgewandelt.

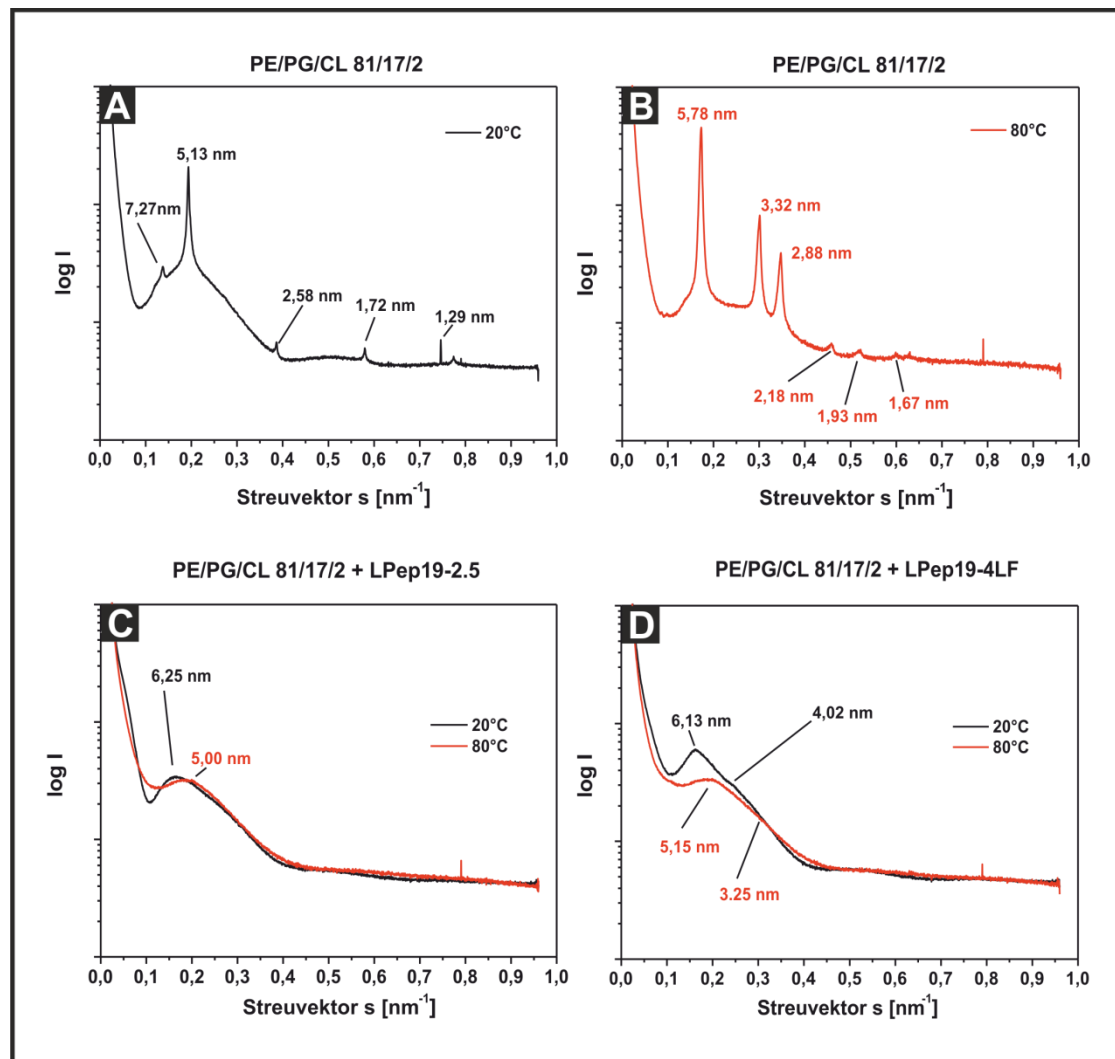


Abbildung 65: Synchrotronstrahlungsmessungen (SAXS) zur Bestimmung der Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 und des Peptids LPep19-4LF auf die supramolekulare Struktur von Liposomen des bakteriellen Membranmodells aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) in einem molaren Verhältnis von 81:17:2.

Bild A: Bakteriellies Membranmodell bei +20 °C mit einer lamellaren Struktur.

Bild B: Bakteriellies Membranmodell bei +80 °C mit einer hexagonal invertierten Struktur.

Bild C: Bakteriellies Membranmodell in Wechselwirkung mit LPep19-2.5 bei +20 °C und +80 °C mit einer *bilayer*-Struktur.

Bild D: Bakteriellies Membranmodell in Wechselwirkung mit LPep19-4LF bei +20 °C und +80 °C mit einer *bilayer*-Struktur.

Der Logarithmus der Streuungsintensität ist gegen den Streuvektor „ s “ aufgetragen, wobei $s=1/d$ entspricht, mit „ d “ als Gitterabstand der Reflektionen mit gleicher Elektronendichte.

4.9 STUDIEN MIT KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG (SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING, SAXS) VON LIPOPOLYSACCHARID R60 MIT LPep19-2.5, CEFTRIAXON UND DEREN KOMBINATION

Im Folgenden ist die Wechselwirkung des Antibiotikums Ceftriaxon mit LPep19-2.5 (Aspidasept®) auf seine Wirkung auf die supramolekulare Struktur von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS untersucht worden. Die bereits in Kapitel 4.7 beschriebene multilamellarisierende Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) auf LPS und Lipid A von *Sal. ent. ser. Minn.* sollte durch die Kombination des in der Klinik bei Sepsis verwendeten Antibiotikums Ceftriaxon weder herabgesetzt noch aufgehoben werden.

In Abbildung 66 sind die durch Synchrotronstrahlung am DESY/HASYLAB am EMBL DORIS-Speicherring *beamline* X33 gemessenen Reflektionsmuster von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS (Bild A), LPS *Sal. ent. ser. Minn.* mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Bild B), LPS *Sal. ent. ser. Minn.* mit dem Antibiotikum Ceftriaxon in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Bild C) sowie von LPS *Sal. ent. ser. Minn.* mit einer Kombination von LPep19-2.5 mit Ceftriaxon in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Bild D) dargestellt.

Das sich als *bilayer*-System darstellende Reflektionsmuster von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS mit nur einem starken Signal bei 7,14 nm (Abbildung 66, Bild A) wird durch die Wirkung von LPep19-2.5 in ein multilamellares System überführt (Abbildung 66, Bild B). Bei +20 °C können hierbei Signale der beiden ersten Ordnungen (9,43 nm und 4,72 nm) dargestellt werden. Messungen bei +80 °C ermöglichen die Erfassung der Signale der dritten (2,94 nm) und vierten Ordnung (2,20 nm) (Abbildung 66, Bild B), wobei die Signale der ersten und zweiten Ordnung schärfer werden und damit mehr multilamellare Strukturen auf dem dreidimensionalen Gitter liegen.

Das Antibiotikum Ceftriaxon entfaltet alleine auf das *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS keine wesentliche Wirkung (Abbildung 66, Bild C). Das *bilayer*-System der LPS-Aggregate wirkt konserviert und zeigt einen Hauptreflex bei 9,17 nm bei +20 °C (Abbildung 66, Bild C).

Die Kombination des Antibiotikums Ceftriaxon mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) in Wechselwirkung mit einem dreifachen molaren Überschuß an LPS führt zu einer multilamellaren Struktur, die bis in die fünfte Ordnung (+80 °C) darstellbar ist (Abbildung 66, Bild D), wobei die Signale der ersten und zweiten Ordnung sehr scharf sind und damit eine hohe Anzahl an multilamellaren Strukturen auf dem drei-dimensionalen Gitter

anzeigen. Die Reflexe, gemessen bei +80 °C, liegen bei 8,93 nm (1/1) für die erste Ordnung, 4,46 nm (1/2) für die zweite Ordnung, 2,97 nm (1/3) für die dritte Ordnung, 2,23 nm (1/4) für die vierte Ordnung und 1,78 nm (1/5) für die fünfte Ordnung (Abbildung 66, Bild D).

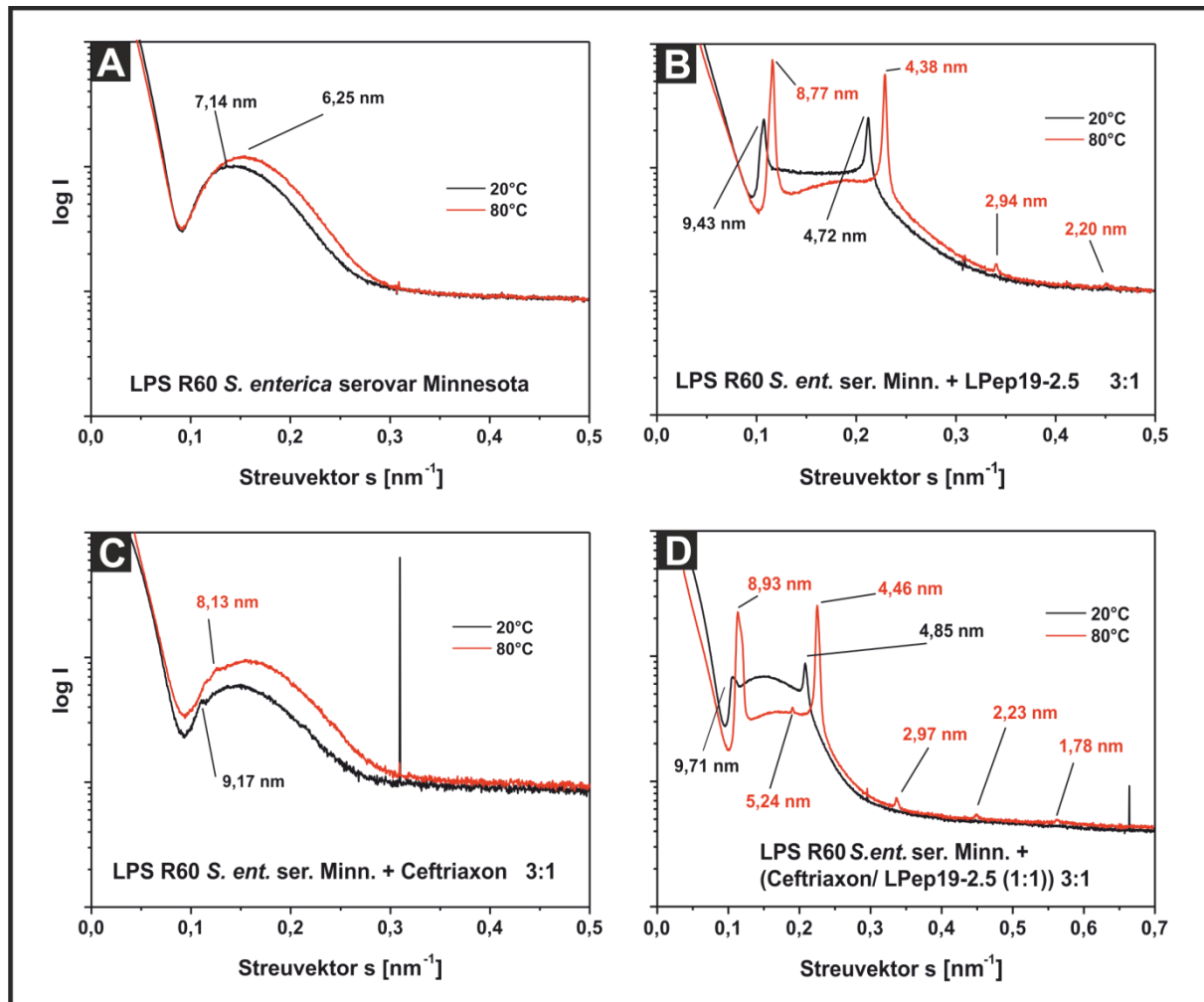


Abbildung 66: Synchrotronstrahlungsmessungen (SAXS) zur Bestimmung der Wechselwirkung von Ceftriaxon, LPep19-2.5 sowie deren Kombination auf die supramolekulare Struktur von LPS-Aggregaten aus *Sal. ent. ser. Minn.*.

Bild A: Reflektionsmuster von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS als *bilayer*-System.

Bild B: Reflektionsmuster von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS mit LPep19-2.5 in einem molaren Verhältnis von 3:1 als ein multilamellares System.

Bild C: Reflektionsmuster von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS mit Ceftriaxon in einem molaren Verhältnis von 3:1 als ein *bilayer*-System.

Bild D: Reflektionsmuster von *Sal. ent. ser. Minn.*-LPS mit einer Kombination von LPep19-2.5 und Ceftriaxon (1:1) in einem molaren Verhältnis von 3:1 als ein multilamellares System.

Der Logarithmus der Streuungsintensität ist gegen den Streuvektor „s“ aufgetragen, wobei $s=1/d$ entspricht, mit „d“ als Gitterabstand der Reflexionen mit gleicher Elektronendichte.

Aus den Reflektionsmustern läßt sich klar ableiten, daß das Antibiotikum Ceftriaxon keine Wirkung auf die supramolekulare Struktur von LPS entfaltet und die LPS-eigene *bilayer*-Struktur konserviert. Darüber hinaus kann festgestellt werden, daß die Kombination aus dem Antibiotikum Ceftriaxon und dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) die multilamellarisierende Wirkung des Leitpeptids beibehält, das heißt, daß das Ceftriaxon nicht die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) behindert.

4.10 KOMBINATIONSVERSUCHE MIT KLASSISCHEN ANTIBIOTIKA

Im Hinblick auf einen zukünftigen therapeutischen Einsatz auf parenteralem Weg von LPep19-2.5 (Aspidasept®) bei septischen Geschehen ist eine Untersuchung mit in der Klinik eingesetzten Medikamenten notwendig. Zu den wichtigsten Medikamenten zählen Antibiotika, die eine bakterielle Infektion eindämmen oder bekämpfen und die in ihrer Wirksamkeit nicht negativ durch eine andere Therapie, etwa mit Aspidasept®, beeinflusst werden dürfen. Ebenso ist eine Herabsetzung der Wirkung von Aspidasept® durch Antibiotika nicht wünschenswert und zu vermeiden. Eine antagonistische Wirkung ist weder von Seiten der Antibiotika noch von Seiten des Leitpeptids zu erwarten, da beide Substanzgruppen unterschiedliche Zielstrukturen in den Bakterien adressieren.

Vertreter der gegenwärtig in der Klinik verwendeten Antibiotika wurden mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 kombiniert. Die Bestimmung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in Anwesenheit von verschiedenen Antibiotika mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 hat zum Ziel einen synergistischen, antagonistischen oder additiven Effekt der Antibiotika auf das Leitpeptid aufzuklären. In ELISA-Studien zur Bestimmung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α kann eine etwaige Herabsetzung des LPS-neutralisierenden Effektes des Leitpeptids LPep19-2.5 abgelesen werden.

Für diese Versuchsreihe wurde Amoxicillin® aus der Gruppe der Ampicilline und Aminobenzylpenicilline, Ceftriaxon aus der Gruppe der Cephalosporine der III. Generation Gruppe 3a (unzureichende Pseudomonaswirksamkeit), Streptomycin aus der Gruppe der Aminoglykoside, Ciprofloxacin aus der Gruppe der Fluorochinolone der II. Generation sowie Tetracyclin in Kombination mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) untersucht.

Die Antibiotika sind entweder allein mit der gleichen Konzentration an LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota oder in einem äquimolaren Verhältnis von [Antibiotikum]:[LPep19-2.5] 1:1 in Kombination in verschiedenen molaren Verhältnissen mit

LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota auf mononukleäre Zellen gegeben worden. Die Fähigkeit, die Zytokinausschüttung von TNF- α zu inhibieren, wurde mittels ELISA-Test spektrophotometrisch ausgewertet.

Das unter anderem bei Salmonellenenteritis, Sinusitis und Bronchitis eingesetzte Amoxicillin[®] ist allein in Anwesenheit von LPS nicht in der Lage, die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α zu inhibieren (Abbildung 67, violette Balken). Ein zehnfacher molekularer Überschuß des Antibiotikums führt zu einer geringen Inhibition der Zytokinausschüttung (Abbildung 67, violette Balken). Die äquimolare Kombination des Amoxicillins[®] mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) bei verschiedenen molaren Verhältnissen zu LPS wirkt sehr stark inhibierend auf die Zytokinausschüttung von TNF- α (Abbildung 67, gelbe Balken). Ein dreifacher molarer Überschuß der Kombination aus Antibiotikum und LPep19-2.5 setzt die Zytokinproduktion derart herab, daß sie nahezu nicht mehr detektierbare Mengen an TNF- α induziert. Dies gilt auch für den zehnfachen molaren Überschuß der Kombination aus Antibiotikum und LPep19-2.5.

Das Antibiotikum Amoxicillin[®] setzt die LPS-neutralisierende Wirkung des Leitpeptids nicht herab, wirkt also nicht antagonistisch zu Aspidasept[®].

Gleiches kann für die äquimolare Kombination aus Ceftriaxon und dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) beobachtet werden (Abbildung 68). Während das unter anderem bei Sepsis, Urosepsis, nosokomialen Pneumonien und Meningitis eingesetzte Ceftriaxon allein nicht in der Lage ist, bei einem molaren Verhältnis von 1:1 und 1:3, die Zytokinausschüttung von TNF- α zu inhibieren, kann eine leichte Zytokininhibition bei einem zehnfachen molaren Überschuß beobachtet werden (Abbildung 68, violette Balken). Die äquimolare Kombination von Ceftriaxon mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 hingegen zeigt bei einem molaren Verhältnis von [Kombination]:[LPS] 1:1 eine sehr starke Inhibition der Zytokinausschüttung von TNF- α (Abbildung 68, gelbe Balken). Ein dreifacher oder gar zehnfacher molarer Überschuß der Kombination zu LPS führt zu einer sehr starken, fast nicht mehr detektierbaren Inhibition der TNF- α -Ausschüttung in humanen mononukleären Zellen.

Das Antibiotikum Ceftriaxon setzt die LPS-neutralisierende Wirkung des Leitpeptids nicht herab, wirkt also nicht antagonistisch zu Aspidasept[®].

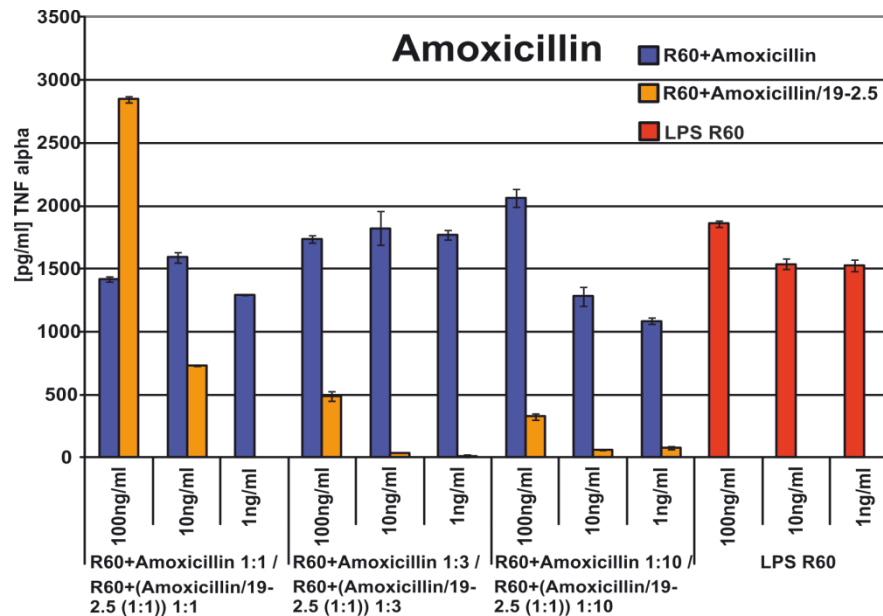


Abbildung 67: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch Amoxicillin und die Mischung aus Amoxicillin und LPeP19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.

Vergleich der Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung von TNF- α durch Amoxicillin in verschiedenen molaren Verhältnissen (violette Balken) und durch die 1:1 Kombination aus Amoxicillin und LPeP19-2.5 (Aspidasept®) in verschiedenen molaren Verhältnissen (gelbe Balken) und LPS-Kontrolle (rote Balken). Untersuchung von drei verschiedenen Konzentrationen zu 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml. Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen.

Die Studien mit Streptomycin, Ciprofloxacin und Tetracyclin in Kombination mit dem Leitpeptid LPeP19-2.5 (Aspidasept®) weisen ähnliche Ergebnisse auf. Die ELISA-TNF- α Zytokinassays der drei genannten Antibiotika können im Anhang (Kapitel 9, ab Seite 197) eingesehen werden.

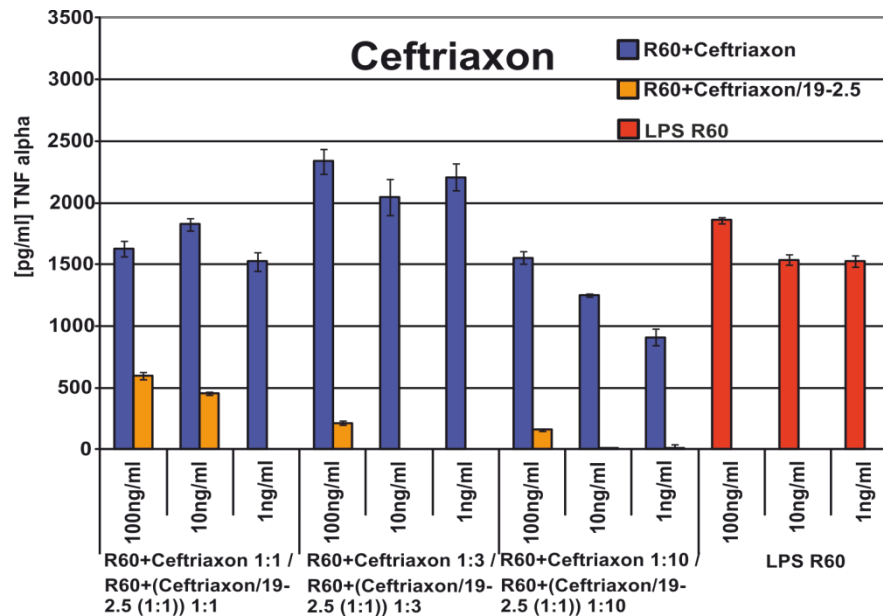


Abbildung 68: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch Ceftriaxon und die Mischung aus Ceftriaxon und LPeP19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.

Vergleich der Inhibition der proinflammatorischen Zytokinausschüttung von TNF- α durch Ceftriaxon in verschiedenen molaren Verhältnissen (violette Balken) und durch die 1:1 Kombination aus Ceftriaxon und LPeP19-2.5 (Aspidasept®) in verschiedenen molaren Verhältnissen (gelbe Balken) und LPS-Kontrolle (rote Balken). Untersuchung von drei verschiedenen Konzentrationen zu 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml. Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen.

4.11 AFM-MESSUNG EINES REKONSTITUIERTEN LIPIDMEMBRANMODELLS EINER HUMANEN ZELLE MIT LPEP19-2.5

Die Hauptkomponenten einer humanen Zellmembran stellen das Phospholipid DOPC, das Sphingolipid Sphingomyelin (SM) und das Steroid Cholesterol (Chol). Für rasterkraft-mikroskopische Untersuchungen sind die oben genannten Komponenten [DOPC:SM:Chol] in einem molaren Verhältnis von [45:45:10] auf dem Träger Mica immobilisiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die experimentelle Ausführung entspricht dem beschriebenen Vorgehen in Kapitel 4.5. Das rekonstituierte Lipidmembranmodell für die humane Zellmembran bildet aufgrund unterschiedlicher Phasenübergänge der Komponenten sogenannte Domänen aus. Domänen sind Bereiche, in denen überwiegend nur eine Komponente vorliegt, etwa das DOPC. Aus der Literatur ist bekannt, daß sich in Domänen, bestehend aus Sphingomyelin und Cholesterol, Rezeptoren zur LPS-Erkennung befinden (TLR-4 und MD-2) und damit eine Funktion bei inflammatorischen Prozessen auf der

Zellmembran erfüllen [144, 146], wobei die Aktivierung von TLR-4 durch S-Form LPS unter Beteiligung der Proteine CD14 und LBP (*LPS Binding Protein*) erfolgt, während R-Form LPS direkt TLR-4 und MD-2 aktiviert [48, 65, 68].

Die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) auf die Domänenstruktur aus DOPC/SM/Chol [45:45:10] ist mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht worden. Dabei ist zunächst die rekonstituierte Lipidmembran in einem Puffer, bestehend aus 100 mM NaCl, 50 mM HEPES und 2 mM CaCl₂, charakterisiert worden, wobei die zweiwertigen Kalziumionen zur Stabilisierung der Lipidmembranen notwendig sind. In einem zweiten Schritt wurde das Leitpeptid in einer molaren Konzentration von 16,7 μ M (45 μ g/ml), gelöst in einer 0,01%-igen Trifluoressigsäurelösung (TFA), auf das rekonstituierte Lipidmembranmodell gegeben. Die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) ist durch das stetige Abrastern des rekonstituierten Lipidmembranmodells beobachtet worden, wobei das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) durch Diffusion die Oberfläche des rekonstituierten Lipidmembransystems erreicht.

Das rekonstituierte Lipidmembransystem aus DOPC/SM/Chol in einem molaren Verhältnis von [45:45:10] bildet Domänen aus, die sich im rasterkraftmikroskopischen Bild als hellgraue (Sphingomyelin-/Cholesterolreiche Domänen, Fläche circa 37 % $\pm$ 5 %) und dunkle (DOPC-Domänen) Areale darstellen. Die Höhendifferenz zwischen den erhabenen Sphingomyelin-/Cholesterolreichen Domänen und den DOPC-Domänen beträgt etwa 0,8 bis 1,2 nm (800-1200 pm), die sich nur in engen Grenzen (etwa 3% $\pm$ 1%) in ihrer Form und Flächenbedeckung durch das mechanische Abrastern verändern (Abbildung 69, Bild A). Nach Applikation des Leitpeptids in den das Lipidsystem bedeckenden Puffers kann eine Auflösung der Domänen beobachtet werden (Abbildung 69, Bild B). Nach etwa 150 Minuten ist das Domänenmuster vollständig verändert und es zeigen sich nur wenige hellgraue erhabene Sphingomyelin-/Cholesterolreiche Domänen. Die Abnahme der Fläche der Sphingomyelin-/Cholesterolreiche Domänen auf eine Fläche von etwa 10 % $\pm$ 5% beträgt über 25 % $\pm$ 5%.

Die Auflösung der Domänen ist im Beobachtungszeitraum von etwa 300 Minuten nicht reversibel. Der Wirkungseintritt des Leitpeptids auf das rekonstituierte Lipidmembransystem bei diesem experimentellen Aufbau kann nach etwa 60 Minuten beobachtet werden und ist auf die Diffusionszeit zurückzuführen. Die mindestens in drei unabhängigen Experimenten beobachtete Auflösung der Domänen bei einer Konzentration des Leitpeptids von 16,7 μ M konnte auch in rekonstituierten Lipidmembransystemen aus DOPC/SM/Chol, die mit dem Leitpeptid über Nacht inkubiert wurden, beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt).

In welchem Ausmaß *in vivo* Domänen auf der humanen Zellmembran verändert werden, kann mit der gewählten Methode nicht geklärt werden. Ebenso ist zu beachten, daß in dieser Versuchsreihe das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) in einer molaren Konzentration von 16,7 µM verwendet und damit jenseits seines zukünftigen therapeutischen Bereiches eingesetzt wurde.

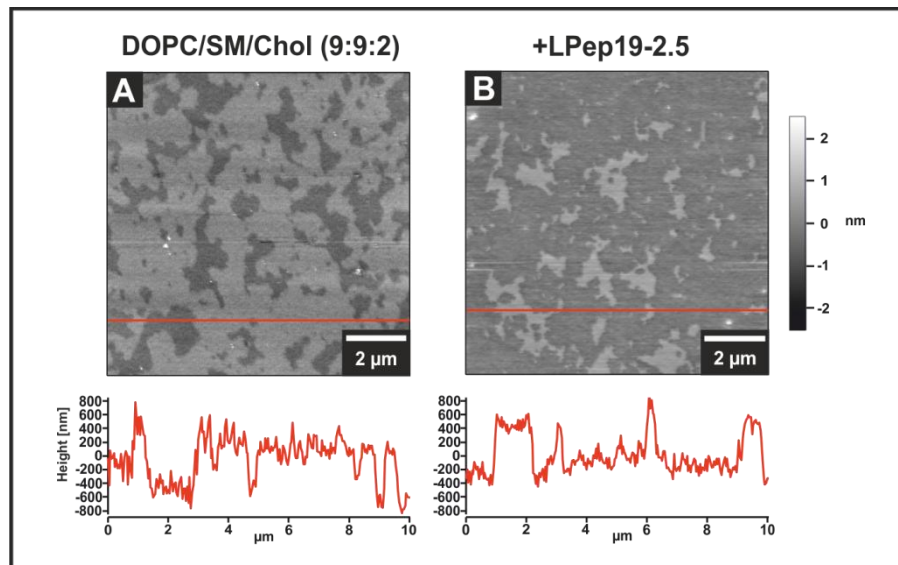


Abbildung 69: Dynamische rasterkraftmikroskopische Untersuchungen des rekonstituierten humanen Lipidmembranmodells in Wechselwirkung mit dem Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®).

Bild A: Charakterisierung des humanen Lipidmembranmodells aus DOPC/SM/Cholesterol in molaren Verhältnis von 45:45:10 bei Raumtemperatur (+20 °C).

Bild B: Veränderung der Domänenstruktur des humanen Lipidmembranmodells nach 150 Minuten durch die Applikation von LPep19-2.5 in einer Konzentration von 16,7 µM (45 µg/ml) unter Auflösung der SM- und Cholesterolreichen Domänen bei Raumtemperatur (+20 °C).

Bilder A und B: Bildgröße 10 x 10 µm; Scan rate 1,0 Hz, *non-contact mode*; Messung in Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, pH 7,4); Messung bei 20 °C.

4.12 STUDIEN MIT KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG (SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING, SAXS) DER LIPIDMISCHUNG EINES HUMANEN LIPID-MEMBRANMODELLS MIT LPEP19-2.5

Das in Kapitel 4.11 untersuchte humane Zellmembranmodell aus DOPC/SM/Chol in einem molaren Verhältnis von [45:45:10] wurde mittels Synchrotronstrahlung am DESY/HASYLAB des EMBL DORIS-Speicherring *beamline* X33 in Ab- und Anwesenheit des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) bei zwei molaren Verhältnissen untersucht.

Das Lipidgemisch aus DOPC/SM/Chol zeigt ein komplexes System von Reflexen, deren Hauptperiodizität bei 5,05 nm mit einer Schulter bei 4,65 nm liegt und einen weiteren Reflex bei 7,46 nm aufweist (Abbildung 70, oben). Die Reflexe bei 5,05 nm und 4,65 nm können verschiedene Periodizitäten aufgrund der Domänenstrukturen dieses Lipidsystems darstellen, während der Reflex bei 7,46 nm auf die drei-dimensionale Phasenseparation des Sphingomyelins in der Lipidmischung hindeutet.

Nach Zugabe des Leitpeptids LPep19-2.5 in zwei verschiedenen molaren Verhältnissen bleibt der Hauptreflex erhalten (5,13 nm, Abbildung 70 mittig und 5,03 nm Abbildung 70 unten). Die Reflexe, die den Domänen zugeordnet werden können, werden in ihrer Lage und Form verändert, korrespondierend zu einer einhergehenden Veränderung der Domänenstruktur durch den Einfluß des Leitpeptids (Kapitel 4.11).

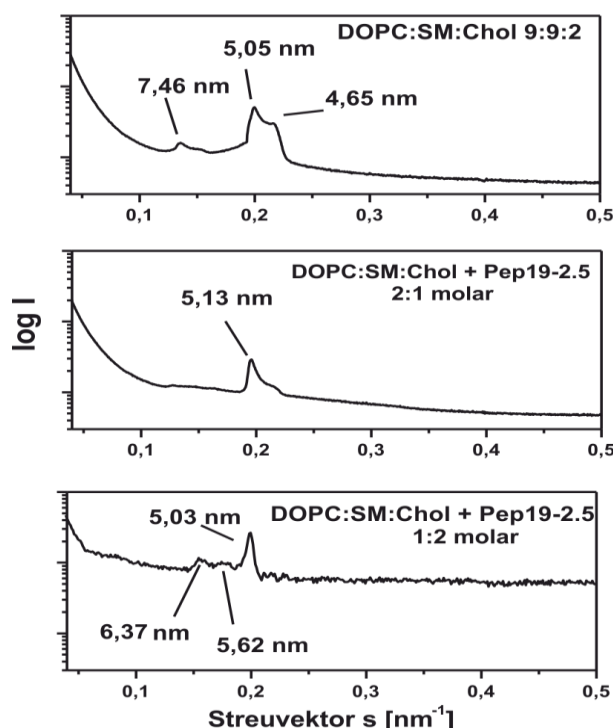


Abbildung 70: Synchrotronstrahlungsmessung (SAXS) zur Bestimmung der Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 auf die supramolekulare Struktur des humanen Zellmembranmodells aus DOPC:SM:Chol im molaren Verhältnis von 45:45:10.

Oben: Reflektionsmuster von DOPC/SM/Chol [45:45:10] bei 40 °C.

Mitte: Reflektionsmuster von DOPC/SM/Chol [45:45:10] und LPep19-2.5 in einem molaren Verhältnis von 2:1 bei 40 °C.

Unten: Reflektionsmuster von DOPC/SM/Chol [45:45:10] und LPep19-2.5 in einem molaren Verhältnis von 1:2 bei 40 °C [70].

Der Logarithmus der Streuungsintensität ist gegen den Streuvingsvektor „s“ aufgetragen, wobei $s=1/d$ entspricht, mit „d“ als Gitterabstand der Reflexionen mit gleicher Elektronendichte.

4.13 PHASENÜBERGANGSSTUDIEN VON MEMBRANLIPIDEN UND LIPOPOLYSACCHARID MITTELS FOURIER-TRANSFORM INFRAROTSPEKTROSKOPIE

Die Methode der Infrarotspektroskopie ermöglicht, Aussagen über Phasenzustände von Lipiden, hier Membranlipiden, und Lipopolysacchariden über einen Temperaturbereich zu treffen. Im Zentrum dieser Messmethode stehen die symmetrischen Streckschwingungen ν_s der Methylengruppen ($-\text{CH}_2-$) der unpolaren Alkylketten, die in Membranlipiden und Lipopolysacchariden vorkommen. Die hier für die Auswertung herangezogenen Werte für die symmetrische Streckschwingung ν_s der CH_2 -Gruppe liegen bei 2850 cm^{-1} Wellenzahlen (Ordinate). Sie werden gegen die Temperatur in Grad Celsius (Abszisse) aufgetragen. Diese Auftragung ermöglicht, einen Phasenübergang einer hoch geordneten Gelphase mit hoher Packungsdichte der Lipide bzw. Lipopolysaccharide und ihrer Alkylketten bei niedrigen Temperaturen zu einer ungeordneten flüssig kristallinen Phase bei hohen Temperaturen zu bestimmen. Der Phasenübergang wird mathematisch als die Steigung der Kurve oder ihrer 1. Ableitung bestimmt, wobei eine rigide (starre) Phase von einer fluiden Phase unterschieden wird.

Eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu höheren bzw. niedrigen Temperaturen oder gar eine Aufhebung des Phasenübergangs läßt Rückschlüsse auf die Membranstruktur im Sinne einer Rigidisierung oder Fluidisierung von Membrankomponenten zu. Ebenso ist eine Erhöhung der Wellenzahlen der symmetrischen Streckschwingungen ν_s der Methylengruppen ($-\text{CH}_2-$) ein Maß für eine Fluidisierung der Alkylketten.

Die Interaktion von Membranlipiden oder LPS mit antimikrobiellen Peptiden gibt Hinweise auf eine Störung der Membranstabilität durch die Einflußnahme der Peptide auf den Phasenübergang bzw. die Lage der Phasenübergangstemperatur T_m . Eine Fluidisierung der Lipide steht dabei für eine Destabilisierung der Membran durch den gesteigerten Platzbedarf der Alkylketten in der Membran mit der Konsequenz einer gesteigerten Spannung in der Membran.

Die Bestimmung des Phasenverhaltens ist für die Phospholipide DMPC und DMPS, für das Sphingolipid Sphingomyelin (SM) und für die Lipopolysaccharide von *Salmonella enterica* serovar Minnesota, *E. coli* und *Proteus mirabilis* mit einem Fourier-Transform-Infrarotspektrometer in einem molaren Verhältnis von 1:0,5 und 1:1 bestimmt worden. In dieser Versuchsreihe ist der Einfluß der antimikrobiellen Peptide (AMP) LPep19-2.5, LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF sowie PMB auf das Phasenverhalten der oben angeführten

Membrankomponenten untersucht und im Folgenden vergleichend dargestellt worden. Im Falle des LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota ist die Peptidvariante LPep19-2.5gek in die Studie miteinbezogen worden, die durch das Fehlen der hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) und der terminalen Aminosäure Glycin (G) am C-Terminus (FWFWG) gekennzeichnet ist.

Die Messung des Phasenverhaltens und die Bestimmung der Phasenübergangstemperatur erfolgte in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Für das Phospholipid DMPC, das durch einen sehr scharfen Phasenübergang bei circa +25 °C gekennzeichnet ist, zeigt sich bei der Betrachtung der Kurven von [DMPC:AMP] 1:1 eine Fluidisierung des Phospholipids durch die Erhöhung der Wellenzahlen überwiegend in der Gelphase und ein Abweichen vom sehr scharfen Phasenübergang (Abflachen der Kurve) mit einer Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu niedrigeren Temperaturen (Abbildung 71, Bilder A-D). Die Wirkung der Peptide LPep19-2.5 und 19-4LF (Abbildung 71, Bilder A und C) haben dabei eine vergleichbare Ausprägung. Das Peptid LPep19-8.3acyl verschiebt hingegen die Phasenübergangstemperatur stärker zu niedrigeren Temperaturen und zu höheren Wellenzahlen (Abbildung 71, Bild B).

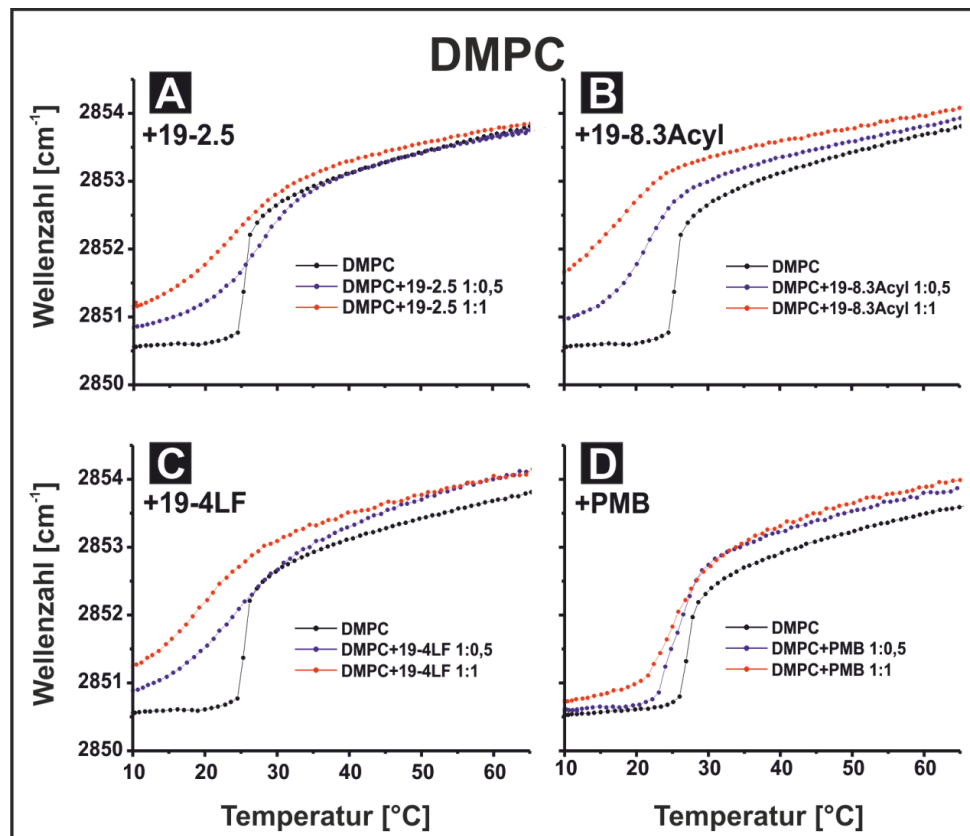


Abbildung 71: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von DMPC durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.

Darstellung von Absorptionsspektren für das Phospholipid DMPC und den antimikrobiellen Peptiden LPeP19-2.5 (Aspidasept®), LPeP19-8.3acyl, LPeP19-4LF und PMB in den molaren Verhältnissen von 1:1 und 1:0,5 gemessen durch die symmetrischen CH₂-Streckschwingungen der Acylketten.

Im Falle des Phospholipids DMPS wird der scharfe Phasenübergang von circa +42 °C durch alle antimikrobiellen Peptide zu niedrigen Temperaturen und höheren Wellenzahlen verschoben. Bei einem molaren Verhältnis von 1:1 führt das Leitpeptid LPeP19-2.5 zu einer Aufhebung des Phasenübergangs und damit zu einer starken Fluidisierung des Phospholipids (Abbildung 72, Bild A). Polymyxin B (PMB) führt zu einer dramatischen Verschiebung der Phasenübergangstemperatur unterhalb von etwa +20 °C bei einem molaren Verhältnis von 1:1 (Abbildung 72, Bild D). Die antimikrobiellen Peptide LPeP19-8.3acyl und LPeP19-4LF wirken ebenso fluidisierend auf das Phospholipid DMPS (Abbildung 72, Bild B und C) durch Erhöhung der Wellenzahl und Herabsenkung der Phasenübergangstemperatur, wobei im Falle des Peptids LPeP19-4LF bei einem molaren Verhältnis von 1:1 zwei Phasenübergänge bei etwa +22 °C und +38 °C sichtbar werden (Abbildung 72, Bild C).

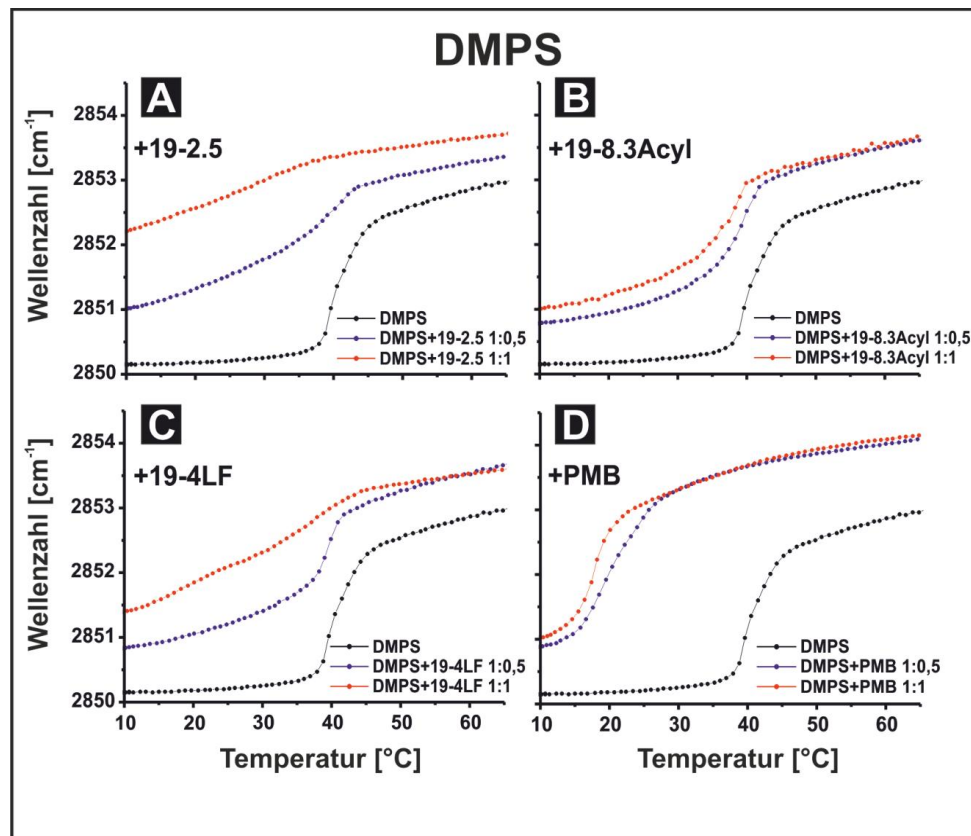


Abbildung 72: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von DMPS durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.

Darstellung von Absorptionsspektren für das Phospholipid DMPS und den antimikrobiellen Peptiden LPeP19-2.5 (Aspidasept®), LPeP19-8.3acyl, LPeP19-4LF und PMB in den molaren Verhältnissen von 1:1 und 1:0,5 gemessen durch die symmetrischen CH₂-Streckschwingungen der Acylketten.

Bei der Untersuchung des Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota ($T_m \approx +35^\circ\text{C}$) mit dem Leitpeptid LPeP19-2.5 (Aspidasept®) in einem molaren Verhältnis [LPS:AMP] von 1:1 kann eine Aufhebung der Phasenübergangstemperatur und somit eine starke Fluidisierung der LPS-Aggregate durch das Leitpeptid festgestellt werden (Abbildung 73, Bild A). Polymyxin B (PMB) entfaltet bei einem molaren Verhältnis von 1:1 eine stark fluidisierende Wirkung auf LPS, ohne den Phasenübergang völlig aufzuheben, sondern vielmehr die Phasenübergangstemperatur des Ra LPS auf etwa $+15^\circ\text{C}$ abzusinken (Abbildung 73, Bild D). Die antimikrobiellen Peptide LPeP19-8.3acyl und LPeP19-4LF wirken bei einem molaren Verhältnis von 1:1 auf die Phasenübergangstemperatur durch eine Erhöhung der Wellenzahlen und Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu niedrigeren Temperaturen, wobei der Effekt im Falle des Peptids LPeP19-8.3acyl prominenter in Erscheinung tritt (Abbildung 73, Bild B und E).

Das um den hydrophoben C-Terminus gekürzte Peptid LPep19-2.5gek zeigt eine im Vergleich zu LPep19-2.5 (Aspidasept[®]), LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF und PMB leichte Fluidisierung des untersuchten Ra LPS (Abbildung 73, Bild C) bei einem molaren Verhältnis von 1:1. Die Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur um circa 2 °C und die Erhöhung der Wellenzahlen erscheinen im Vergleich moderat und lassen vermuten, daß der hydrophobe C-Terminus für eine Fluidisierung von Ra LPS notwendig ist. Diese Annahme wird unterstützt durch das Ergebnis der Wirkung des Peptids LPep19-8.3acyl, das über eine hydrophobe Acylkette verfügt und eine vergleichbare, wenn auch niedrigere, fluidisierende Wirkung auf das untersuchte Ra LPS aufzeigt.

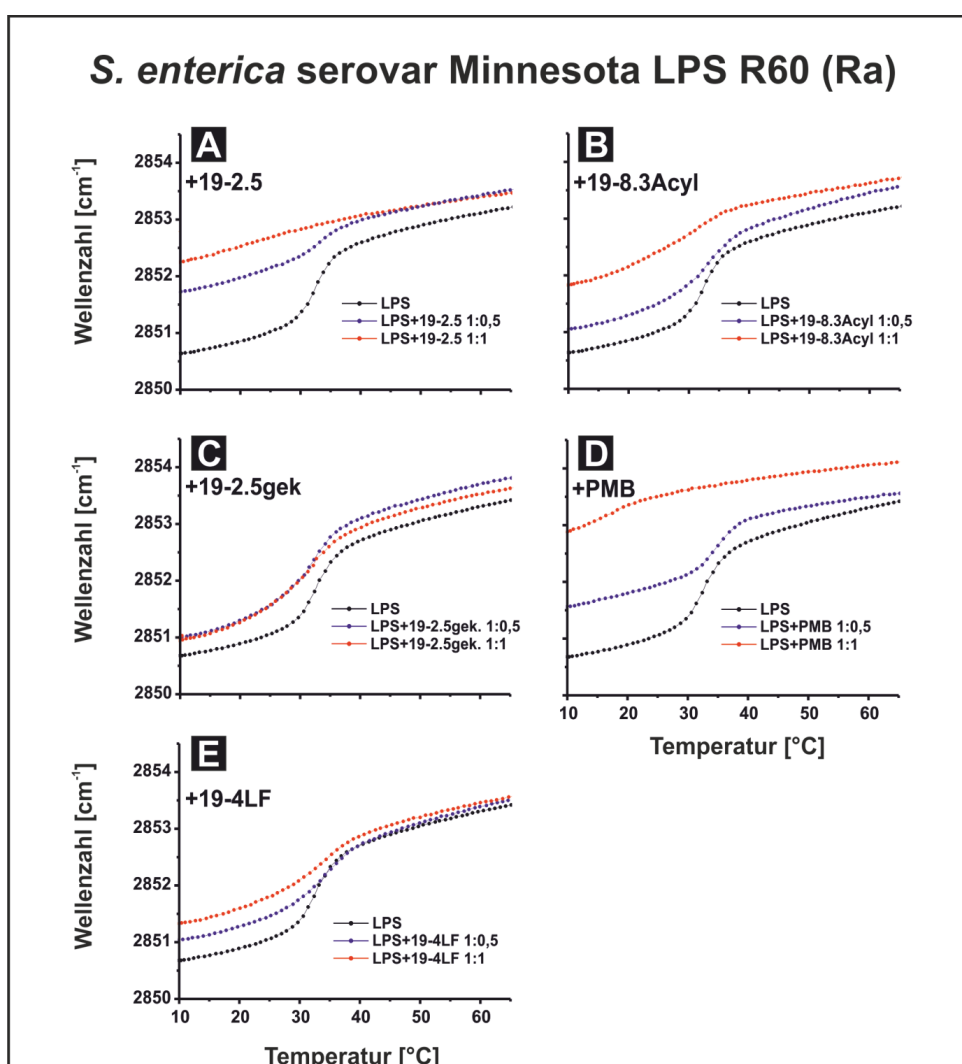


Abbildung 73: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von *Sal. ent. ser. Minn.* LPS durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.

Darstellung von Absorptionsspektren für das Ra LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota und den antimikrobiellen Peptiden LPep19-2.5 (Aspidasept[®]), LPep19-8.3acyl, LPep19-2.5gek, PMB und LPep19-4LF in den molaren Verhältnissen von 1:1 und 1:0,5 gemessen durch die symmetrischen CH₂-Streckschwingungen der Acylketten.

Die Phasenübergangstemperatur des Re LPS von *E. coli* Stamm WBB01 ($T_m \approx +42\text{ °C}$) wird durch die Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF zu niedrigeren Temperaturen bei einem molaren Verhältnis von 1:1 verschoben, ohne den Phasenübergang aufzuheben. Die Werte der Wellenzahlen für die symmetrische Streckschwingung der Alkylketten wandern dabei besonders in der Gelphase zu höheren Werten (Abbildung 74, Bild A-C). Polymyxin B (PMB) entfaltet bei einem molaren Verhältnis von 1:1 eine sehr starke fluidisierende Wirkung auf das untersuchte Re LPS im Sinne einer sehr starken Verschiebung der Wellenzahlen zu höheren Werten bei einer kompletten Aufhebung der Phasenübergangstemperatur (Abbildung 74, Bild D).

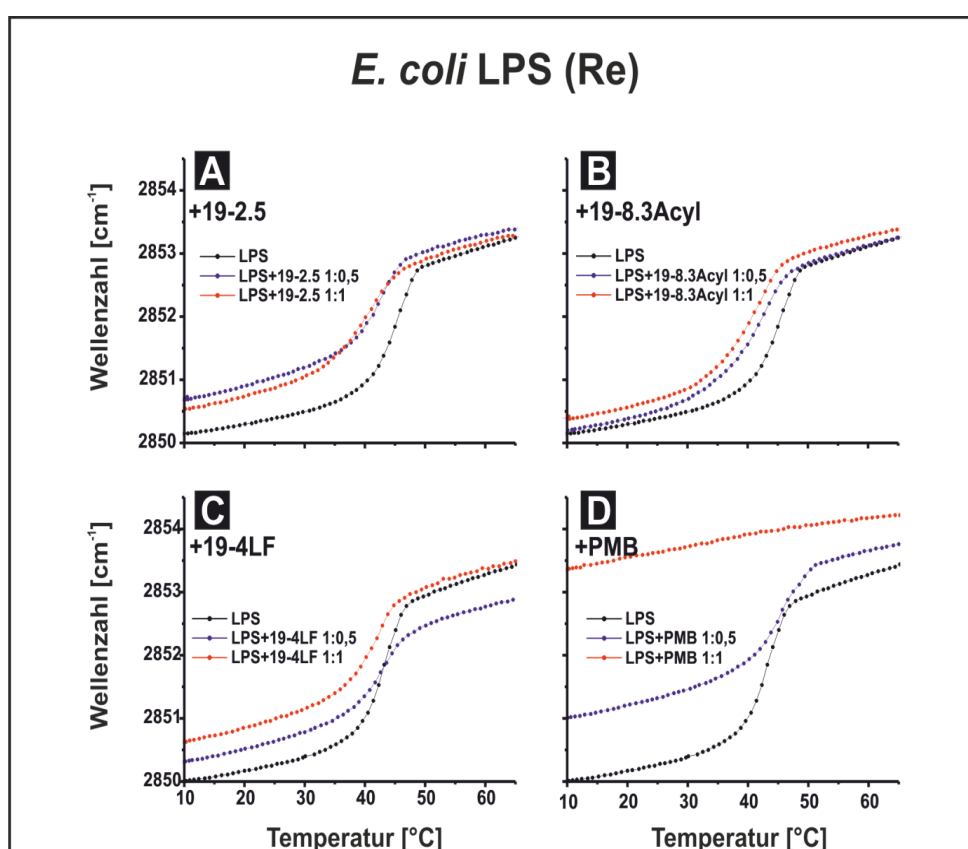


Abbildung 74: Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens von *E. coli*-LPS Stamm WBB01 durch Fourier Transform-Infrarotspektroskopie.

Darstellung von Absorptionsspektren für das Re LPS von *E. coli* Stamm WBB01 und den antimikrobiellen Peptiden LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF und PMB in den molaren Verhältnissen von 1:1 und 1:0,5 gemessen durch die symmetrischen CH_2 -Streckschwingungen der Acylketten.

Infrarotspektroskopische Messungen zur Bestimmung des Phasenverhaltens des LPS von *Proteus mirabilis* mit den Peptiden LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF und PMB zeigen für die Vertreter der LPep-Gruppe eine leichte Fluidisierung im Bereich des

flüssig kristallinen Zustandes oberhalb der Phasenübergangstemperatur von circa +36 °C durch eine leichte Erhöhung der Wellenzahlen für die symmetrische Streckschwingung der Methylengruppe ohne weitere Einwirkung auf das Phasenverhalten. Die Wirkung des PMB auf das LPS von *Proteus mirabilis* ist vergleichbar mit der Wirkung von PMB auf das LPS von *E. coli* WBB01. Hier kann ebenfalls eine vollständige Aufhebung des Phasenübergangs bei einem molaren Verhältnis von 1:1 beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt).

Die Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF haben keinerlei Wirkung auf das Phasenverhalten des Sphingolipids Sphingomyelin. Weder wird die Phasenübergangstemperatur verschoben, noch ist eine signifikante Veränderung der Werte für die Wellenzahlen der symmetrischen Streckschwingung erkennbar (Daten hier nicht gezeigt). Polymyxin B hingegen führt zu einer leichten Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu höheren Temperaturen (etwa 1-2 °C) (Daten hier nicht gezeigt).

4.14 INTERKALATIONSSTUDIEN VON ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN DER LPEP-GRUPPE MIT MEMBRANLIPIDEN UND LIPOPOLYSACCHARID MITTELS FÖRSTER-RESONANZ ENERGIE-TRANSFER SPEKTROSKOPIE

Die Fähigkeit der antimikrobiellen Peptide der LPep-Gruppe wie etwa der Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-2.5KO sowie LPep19-8 in Phospholipidmembranen und LPS-Aggregate zu interkalieren, wurde mittels Förster-Resonanz Energie-Transfer-Studien (FRET) untersucht. Die Interkalationsstudien erfolgten an Liposomen, bestehend aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS) sowie für LPS an LPS-Aggregaten von *Salmonella enterica* serovar Minnesota als einem Vertreter der Ra Lipopolysaccharide. Das Interkalationsverhalten auf das Phospholipidgemisch bestehend aus DOPC, Sphingomyelin und Cholesterol in einem molaren Verhältnis von 45:45:10, das ein Modell der humanen Zellmembran darstellt, wurde ebenfalls mit den oben angeführten Peptiden untersucht.

Die Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept®), LPep19-2.5KO und LPep19-8 zeigen eine nahezu gleich ausgeprägte Fähigkeit, sich in PC-Liposomen einzubauen, wobei die Amplitude des Peptids LPep19-2.5KO stärker ist als die Amplituden für die Peptide LPep19-2.5 und LPep19-8 (Abbildung 75).

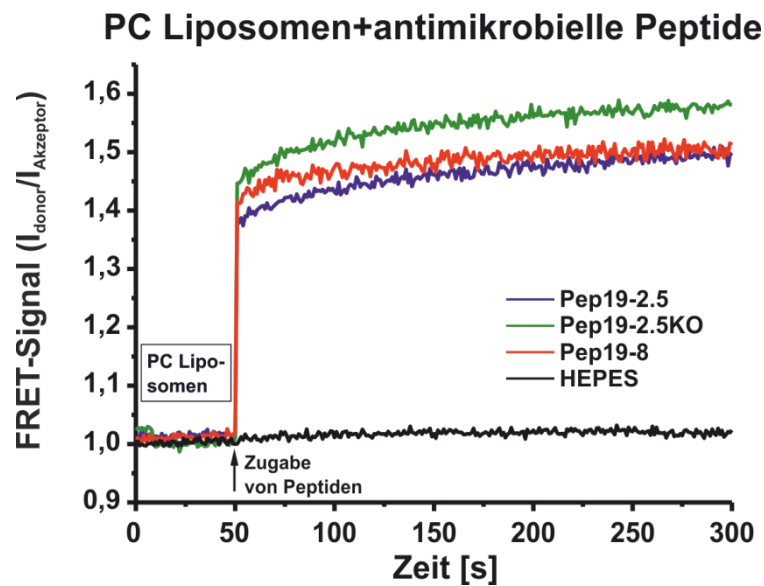


Abbildung 75: Interkalationsstudien mittels Förster-Resonanz Energie Transfer (FRET) von LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-8 auf PC-Liposomen.

Verhältnis PC-Liposomen zu Peptiden 1:1 oder 10 μM [70].

Für das System aus PS-Liposomen zeichnet sich ein ähnliches Bild, wobei die Amplituden des detektierten FRET-Signals stärker sind als bei PC-Liposomen (Abbildung 76).

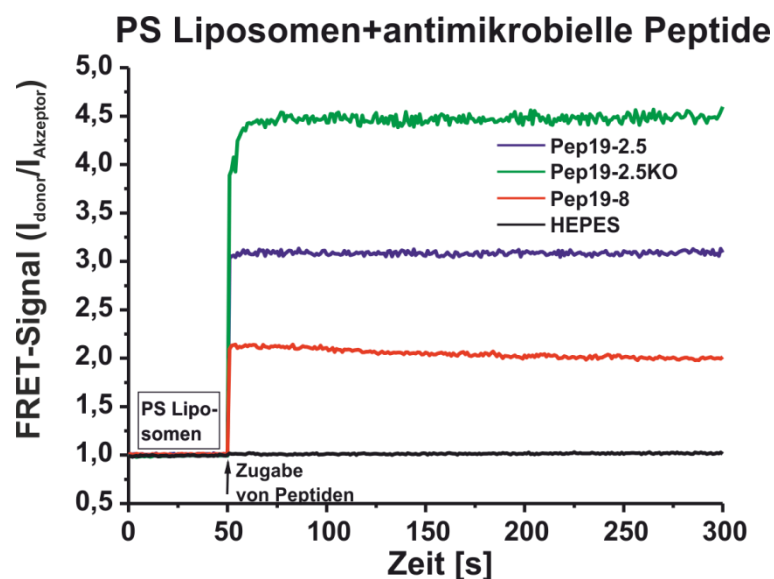


Abbildung 76: Interkalationsstudien mittels Förster-Resonanz Energie Transfer (FRET) von LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-8 auf PS-Liposomen.

Verhältnis PS-Liposomen zu Peptiden 1:1 oder 10 μM [70].

Die verwendeten Peptide zeigen für das Modell einer humanen Zelle bestehend aus DOPC, Sphingomyelin und Cholesterol ebenso ein Interkalationsvermögen, vergleichbar wie bei PC-Liposomen (Daten hier nicht gezeigt).

Die Interkalationsstudien zu den LPS-Aggregaten aus *Salmonella enterica* serovar Minnesota zeigen, daß die eingesetzten Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept[®]), LPep19-2.5KO und LPep19-8 eine nahezu gleiche Amplitude aufweisen und sich in die LPS-Aggregate einbauen (Daten hier nicht gezeigt [70]).

Es läßt sich eine Wechselwirkung der Peptide mit den Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS) sowie mit LPS-Aggregaten der Ra-Variante von *Salmonella enterica* serovar Minnesota ableiten, die für die negativ geladenen Systeme aus PS und LPS mit den Peptiden stärker scheint als bei dem neutral geladenem Phosphatidylcholin (PC).

In einem zweiten Schritt sind diese Studien auf verschiedene LPS-Varianten, etwa auf die Ra und Re Variante von *Salmonella enterica* serovar Minnesota, sowie auf LPS von *E. coli* WBB01 und *Proteus mirabilis* ausgedehnt worden. Das Phospholipidgemisch aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) in einem molaren Verhältnis von 81:17:2 wurde ebenfalls in diese Studien eingeschlossen. Für die Untersuchungen an diesen Systemen wurden die antimikrobiellen Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) und LPep19-4LF verwendet. Das Phospholipidgemisch aus PE/PG/CL wurde zusätzlich mit dem Peptid LPep19-8.3acyl untersucht.

Die Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) und LPep19-4LF interkalieren in alle untersuchte Lipopolysaccharide, wobei die Amplituden des LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) unabhängig vom untersuchten Lipopolysaccharid gleich stark waren. Der Einbau des Peptids LPep19-4LF in alle untersuchten LPS-Aggregate erfolgt mit einer niedrigeren Amplitude als bei LPep19-2.5 (Aspidasept[®]), wobei auch hier die Signalstärke unabhängig vom untersuchten Lipopolysaccharid nahezu gleich stark war (Daten hier nicht gezeigt).

In Abbildung 77 ist der Einbau des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) in LPS-Aggregate aus *Salmonella enterica* serovar Minnesota mit drei verschiedenen Konzentrationen des Peptids gezeigt. Bei allen verwendeten Peptidkonzentrationen kann ein Einbau des Peptids in die LPS-Aggregate beobachtet werden.

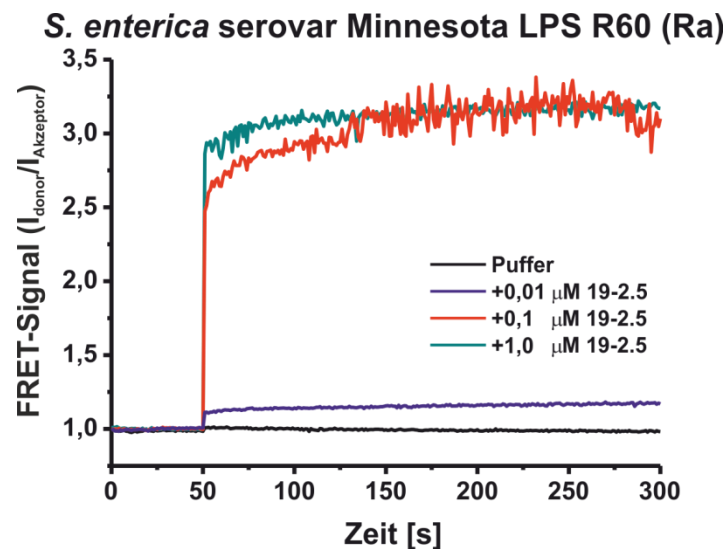


Abbildung 77: Interkalationsstudien mittels Förster-Resonanz Energie-Transfer (FRET) von LPep19-2.5 auf LPS-Aggregate von *Salmonella enterica* serovar Minnesota.

Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,4

Die Untersuchung des bakteriellen Lipidgemisches aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin in einem molaren Verhältnis von 81:17:2 mit den Peptiden LPep19-2.5 (Aspidasept[®]), LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF zeigt eine Interkalation aller Peptide in das bakterielle Lipidgemisch mit der höchsten Amplitude im Falle des LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) und der niedrigsten Amplitude im Falle des Peptids LPep19-4LF (Daten hier nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Interkalationsstudien für die untersuchten Systeme zeigen für alle oben angeführten Peptide eine starke Wechselwirkung mit PC und PS Liposomen (LPep19-2.5, LPep19-2.5KO und LPep19-8) sowie für die LPS-Aggregate aus *Salmonella enterica* serovar Minnesota. Eine ebenso starke Wechselwirkung kann für alle Varianten der LPS-Aggregate mit den Peptiden LPep19-2.5 (Aspidasept[®]) und LPep19-4LF festgestellt werden.

4.15 ETABLIERUNG EINES *EX VIVO* HUMANE-LUNGE-MODELLS ZUR INFLAMMATION UND THERAPIE DER INFLAMMATION

Die in dieser Arbeit durch biologische und biophysikalische Methoden gewonnen *in vitro* Daten, die Teil der präklinischen Phase von Aspidasept® sind, wurden in der Forschungsgruppe Biophysik in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe Klinische und Experimentelle Pathologie am Forschungszentrum Borstel auf ein humanes System übertragen.

In der Literatur ist bereits ein Inflammationsmodell der humanen Lunge mit *Chlamydia pneumoniae* beschrieben worden [38, 121]. Dieses Inflammationsmodell ist im Rahmen der Etablierung in der Forschungsgruppe Biophysik um den möglichen therapeutischen Einsatz des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) erweitert worden.

Gesundes und noch vitales Lungengewebe, das bei Lungenresektionen (Klinikum Großhansdorf) gewonnen wurde, ist durch die Zugabe von *Salmonella enterica* serovar Minnesota-LPS zur Inflammation gebracht worden. Ziel dieser Versuchsreihe war es, die im Lungengewebe befindlichen Immunzellen bzw. Makrophagen, durch LPS zu stimulieren, um die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α zu befördern und somit eine von außen zugeführte Entzündung des vitalen humanen Gewebes *ex vivo* zu simulieren. Die dadurch induzierte Inflammation des Gewebes sollte durch den therapeutischen Einsatz des Leitpeptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) verhindert oder abgemildert werden.

Zur Etablierung dieser Versuchsreihe in der Forschungsgruppe Biophysik des Forschungszentrum Borstel war es notwendig, die optimale LPS-Konzentration für ein ausreichend starkes Signal (TNF- α) zu finden, welches unter anderem durch Diffusionsprozesse (LPS und LPep19-2.5) aus der Zellkultur in das Gewebe und durch die Eindringtiefe des LPS und des Leitpeptids in das Gewebe bestimmt wird. Das von den Immunzellen produzierte pro-inflammatorische Zytokin TNF- α wurde an die Umgebung, also auch in den Zellkulturpuffer RPMI 1640, abgegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei +37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator wurden die Überstände entnommen, und bis zur Zytokinbestimmung mittels ELISA bei -20 °C eingefroren. Das Lungengewebe wurde mittels HOPE-Fixierlösung (Fa. DCS Innovative Diagnostics, Hamburg Deutschland), einer Alternative zu Formalinfixierungen von Geweben, über Nacht bei +4 °C inkubiert und für weitere histologische Untersuchungen histologisch durch die Laborgruppe Klinische und Experimentelle Pathologie am Forschungszentrum Borstel aufgearbeitet.

Der Initialversuch zur *ex vivo* Stimulation der humanen Lunge wurde mit einer hohen LPS-Konzentration und großen molaren Überschüssen an LPS durchgeführt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß eine *ex vivo* Stimulation der Lunge unter den gegebenen Versuchsbedingungen möglich ist und die Immunzellen in der Lunge auf eine Stimulation von LPS mit einer erwarteten Zytokinausschüttung reagieren (Abbildung 78, Balken 2.1 - 2.3).

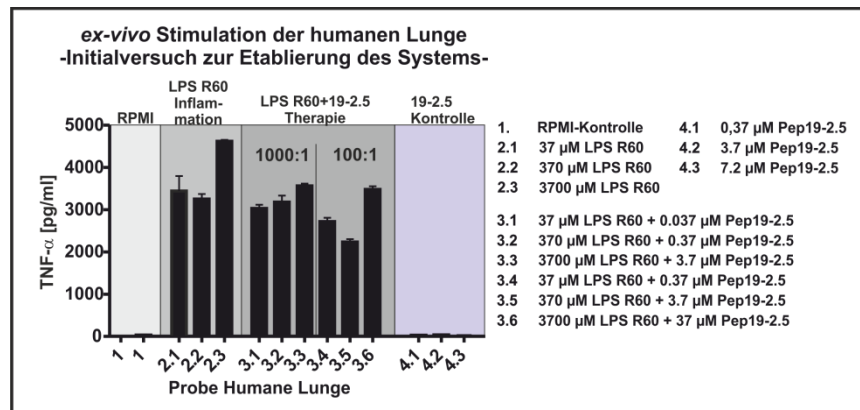


Abbildung 78: Etablierung des *ex vivo* Lungenmodells.

Zytokinbestimmung von pro-inflammatorischem TNF- α via ELISA im Initialversuch *ex vivo* Lungenmodell zur Inflammation der humanen Lunge mit LPS und Therapie mit LPep19-2.5 (Aspidasept®).

Nach Anpassung und Optimierung der *ex vivo* Stimulation der humanen Lunge wurden für den therapeutischen Ansatz zwei molare Verhältnisse von [LPS:AMP] [1:10] und [1:100] zu je drei Konzentrationsstufen gewählt. Parallel dazu sind Pufferkontrollen (RPMI 1640) und LPep19-2.5 (Aspidasept®)-Kontrollen angesetzt worden (Abbildung 79).

Die Zusammenführung von fünf unabhängigen Versuchen zeigt eine Reduktion der TNF- α Antwort bei einem zehnfachen und stärker bei 100-fachem Überschuß an LPep19-2.5 (Aspidasept®) (Abbildung 79, Balken 3.1 - 3.6).

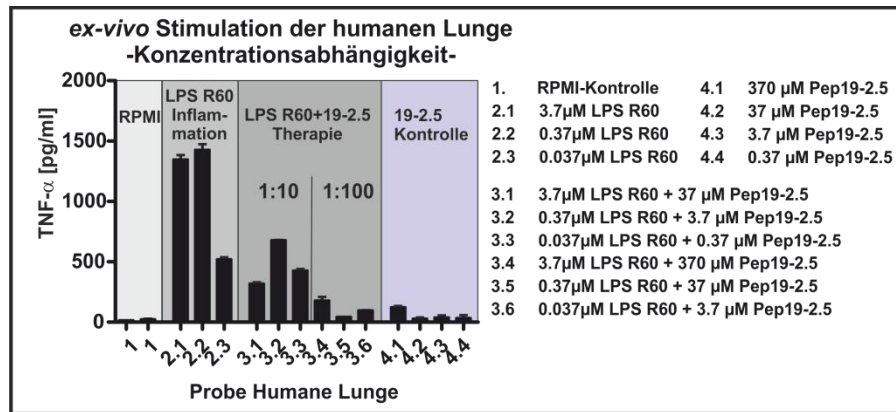


Abbildung 79: Ergebnisse des ex vivo Lungenmodells.

Zusammenführung von fünf unabhängigen ex vivo Stimulationen mit LPS der humanen Lunge nach Etablierung des Experimentes und Therapie mit LPep19-2.5 (Aspidasept®).

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) mit seiner Zielsubstanz Lipopolysaccharid, dem endotoxischen Bestandteil Gram-negativer Bakterien, im Hinblick auf seinen therapeutischen Einsatz bei durch Gram-negative Bakterien induzierte Sepsis zu untersuchen.

Als eine Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz einer Substanz als potentielles Medikament gilt die niedrige bzw. nicht existierende Zytotoxizität, die von der Substanz ausgeht. Das im Fokus dieser Arbeit stehende Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) wurde durch ein *chip*-basiertes System der Firma Bionas und durch einen Hämolysetest auf zytotoxische bzw. hämolytische Effekte getestet (Kapitel 4.3). Die Ergebnisse zeigen, daß zytotoxische und hämolytische Effekte ab einer Konzentration von etwa 20 µg/ml des Leitpeptids zunehmen. Vor dem Hintergrund, daß nicht-Überlebende Sepsispatienten eine mittlere Konzentration von 0,7 ng/ml im Blut aufweisen [104], kann von einem großen therapeutischen Potential des Leitpeptids ausgegangen werden.

Die effektive Neutralisierung von LPS, bestimmt durch die *in vitro* Senkung oder Inhibierung der Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in ELISA-Tests, stellt das zentrale Ziel zur Verhinderung eines pro-inflammatorischen Zytokinsturms und einer nachfolgenden Sepsis dar. Das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) ist bereits bei molaren Verhältnissen von [LPS]:[Aspidasept®] von 3:1 in der Lage, die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in mononukleären Zellen drastisch zu senken (Kapitel 4.1). Vergleichende Untersuchungen anderer Peptidvarianten der LPep-Gruppe unterstreichen die Effektivität der LPS-Neutralisation des Leitpeptids.

Andere Versuchsreihen mit den pro-inflammatorischen Interleukinen IL-1 und IL-6 und dem Chemokin IL-8 sowie Prostaglandin PGE2 zeigen eine ähnliche Hemmung der Zytokinproduktion durch das Leitpeptid.

Der molekulare Mechanismus, der zur LPS-Neutralisation führt, kann durch zwei Erklärungsmodelle beschrieben werden, der sich auf unterschiedliche zelluläre und molekulare Ebenen auswirkt.

Einerseits könnte die Neutralisierung des Endotoxins LPS auf der Ebene des LPS-Rezeptorenkomplexes aus TLR-4 und MD2 stattfinden und durch die Veränderung oder Blockierung des TLR-4 Rezeptors eine Signalerkennung von LPS und eine Signaltransduktion in der Immunzelle unterbinden mit der Folge einer Inhibierung oder Absenkung der pro-inflammatorischen Zytokine, etwa TNF- α .

Ebenso könnte auf molekularer Ebene eine nachhaltige strukturelle Veränderung des Sepsis-auslösenden Agens „LPS“ durch den Einsatz des Leitpeptids Aspidasept® dazu führen, daß das strukturell und morphologisch veränderte LPS, nicht mehr durch seinen Rezeptorkomplex (TLR-4/MD2) auf der Oberfläche von Immunzellen erkannt wird und somit ebenfalls zur Senkung oder Inhibierung der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung beiträgt.

Aus den Messungen zur Aufklärung von Struktur und Wirkungsbeziehungen mit Rasterkraftmikroskopie (AFM), Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) und Elektronenmikroskopie (EM) in Kombination mit Gefrierbruchtechniken konnte der molekulare Wirkmechanismus abgeleitet werden. Die Ergebnisse dieser Messungen favorisieren bzw. erhärten die Theorie einer strukturellen Veränderung des LPS von einer aktiven kubischen Form in eine nicht aktive zylindrische Form.

Die durch Rasterkraftmikroskopie beobachtete Zunahme der Höhe von untersuchten *E. coli* WBB01-Aggregaten von 6-8 nm auf 16-18 nm bei Raumtemperatur bzw. auf über 150 nm bei 40 °C (Kapitel 4.5) stimmt mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie in Kombination mit Gefrierbruchtechnik (Kapitel 4.6) überein. Es kann eine strukturelle Veränderung des LPS, unabhängig von seiner Zuckerkettenlänge, beobachtet werden. Das Leitpeptid induziert große und hohe LPS-Aggregate (AFM), die sich in multiplen Lamellen eng aneinander anordnen (EM) und Stapel aus mehreren Dutzend LPS-Schichten ausbilden. Diese Beobachtung wird durch die Höhenzunahme der LPS-Aggregate auf über 150 nm in der Rasterkraftmikroskopie gestützt, wobei hier bis zu zwanzig LPS-Schichten miteinander verbunden sein können. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Lipid A und LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) zeigen eine Veränderung der supramolekularen Struktur von LPS bzw. Lipid A durch Aspidasept® an (Kapitel 4.7), wobei die aktive kubische Form des LPS in eine inaktive zylindrische Form überführt wird. Die Beobachtung von Reflexen bis in die 4. Ordnung (LPS) bzw. die Zunahme der Peakschärfe (Lipid A) bestätigen die Anordnung von LPS (Lipid A) zu einer multilamellaren Schicht mit einer Hauptperiodizität von 8 nm.

Die sich gegenseitig stützenden Ergebnisse aus den oben angeführten Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß das Leitpeptid LPep19-2.5 eine LPS-neutralisierende Wirkung durch eine Multilamellarisierung von LPS entfaltet und die aktive Struktur von LPS in eine inaktive Form überführt, die nicht mehr durch den TLR-4/MD2-Rezeptorkomplex erkannt wird.

Als eine Voraussetzung für die Veränderung der supramolekularen Struktur von LPS durch das Leitpeptid ist der kationische Charakter von Aspidasept[®] basierend auf seiner Primärstruktur zu nennen. Die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin sowie der hydrophobe C-Terminus (Phenylalanine und Tryptophane) interagieren mit dem negativ geladenen LPS. Die effektive Bindung des kationischen Leitpeptids an das negativ geladene Endotoxin konnte durch die Methode der isothermen Titrationskalorimetrie gezeigt werden, wobei drei LPS-Moleküle durch ein Molekül des Leitpeptids gebunden werden (Kapitel 4.2). Ausgehend von Coulomb-Kräften erfolgt eine Bindung des Leitpeptids an die negativ geladenen Phosphate des Lipid A-Teils von Lipopolysacchariden, wobei die Bindung des Leitpeptids an den Lipid A-Teil auf den möglichen universellen Einsatz bei verschiedenen Gram-negativen Bakterien hinweist.

Versuchsreihen mit einer um den hydrophoben C-Terminus gekürzten Variante des Leitpeptids zeigten, daß die LPS-neutralisierende Wirkung nicht ausschließlich auf den kationischen Charakter des Peptids zurückzuführen ist, sondern daß der hydrophobe C-Terminus für die LPS-Neutralisierung ebenfalls notwendig ist [127]. Dieses Ergebnis führt zur Aufstellung einer Hypothese zur LPS-neutralisierenden Wirkung des Leitpeptids mit freiem LPS in zwei Schritten über eine Multilamellarisierung des LPS. Im ersten Schritt bindet das Leitpeptid aufgrund von Coulomb-Kräften an den Lipid A-Teil des LPS. Im zweiten Schritt faltet sich der hydrophobe C-Terminus in den hydrophoben Teil der Lipopolysaccharide und erzeugt eine Art Verbindung mit benachbarten LPS-Aggregaten, mit der Folge einer Multilamellarisierung von LPS-Aggregaten zu großen Stapeln aus LPS-Schichten (Abbildung 80).

LPS-Neutralisation durch LPep19-2.5

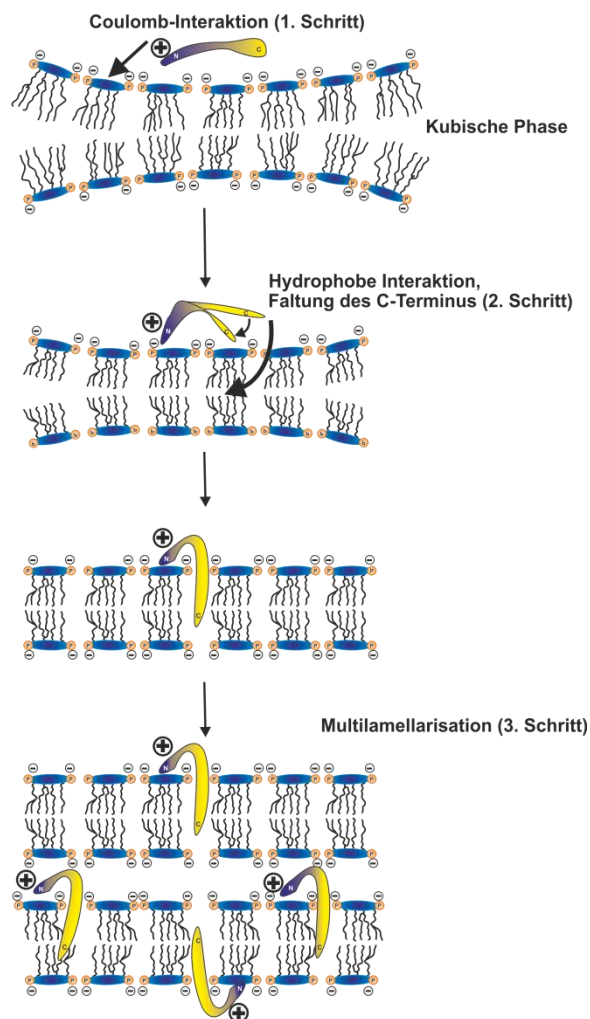


Abbildung 80: Hypothese zur LPS-Neutralisation von freien LPS-Aggregaten durch Einwirken des Leitpeptids über Multilamellarisierung

Versuchsreihen mit anderen Peptidvarianten des Leitpeptids LPep19-2.5, die sich in den Aminosäuresequenzen und der daraus folgenden Peptidlänge und Nettoladung unterscheiden, haben gezeigt, daß nicht nur die hohe negative Nettoladung des Peptids und sein hydrophober C-Terminus, sondern auch die Gesamtlänge des Peptids zur Wirksamkeit des Peptids im Hinblick auf seine LPS-neutralisierende Wirkung beiträgt [127].

Die LPS-neutralisierende Wirkung von Aspidasept® geht mit der Eigenschaft einher, sich in Phospholipide und LPS-Aggregate einzubauen, wie aus den Interkalationsstudien mit FRET abzulesen ist (Kapitel 4.14). Der Einbau in Liposomen aus negativ geladenen Phospholipiden und LPS-Aggregaten wird durch das kationische Leitpeptid bevorzugt [70].

Ebenso ist die Wirkung auf den Phasenübergang von Lipiden (insbesondere Phospholipide) und Lipopolysaccharide im Sinne einer Aufhebung der Phasengrenze mit der LPS-

neutralisierenden Wirkung zu korrelieren. Die Ergebnisse der Phasenübergangsstudien für das Leitpeptid mittels FT-IR (Kapitel 4.13) zeigen eine stark fluidisierende Wirkung auf Membranlipide wie PC oder PS [70], sowie bei LPS als Re LPS (*E. coli* WBB01) und Ra LPS (*Salmonella enterica* serovar Minnesota). Die Fluidisierung der Membrankomponenten ist auf den erhöhten Platzbedarf der Acylketten in Phospholipiden und LPS zurückzuführen mit der Folge, Membranen zu destabilisieren.

Die Wirkung des Leitpeptids LPep19-2.5 und seiner Varianten LPep19-8.3acyl, LPep19-4LF sowie von PMB auf ganze Bakterien wie *E. coli* WBB01, *Salmonella enterica* serovar Minnesota sowie *P. mirabilis*, in denen das Endotoxin LPS in der äußeren Bakterienmembran verankert ist, wurde rasterkraftmikroskopisch untersucht (Kapitel 4.4). Im Vorfeld wurde die minimale inhibitorische Konzentration der Peptide auf die zu untersuchenden Bakterien bestimmt, wobei das Leitpeptid im Vergleich zu den untersuchten Peptiden durch sehr hohe MIC-Werte gekennzeichnet ist. Die Ergebnisse aus der MIC-Wert Bestimmung bestätigen eine in erster Linie LPS-neutralisierende Wirkung für das Leitpeptid. Ein antibakterieller Effekt des Leitpeptids trifft hierbei für höhere Konzentrationen zu.

Das Leitpeptid entfaltet zwar eine antibakterielle Wirkung, die bei *E. coli* WBB01 zu einer Abtötung von Bakterien von etwa 37 % und bei *Salmonella enterica* serovar Minnesota von 30 % führt, seine Hauptwirkung auf die Bakterien scheint jedoch die Zunahme des Aggregationsverhaltens von Bakterien zu sein. Die Wirkung des Leitpeptids auf *Salmonella enterica* serovar Minnesota ist im Vergleich zur Wirkung auf *E. coli* WBB01 stärker ausgeprägt, durch ein sehr starkes Aggregationsverhalten.

Die zum Vergleich untersuchten Peptide LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF entfalten eine sehr starke antibakterielle Wirkung in der untersuchten Konzentration auf *E. coli* WBB01 und *Salmonella enterica* serovar Minnesota. Das Peptid LPep19-8.3acyl tötet zu circa 72 % *E. coli* WBB01 Bakterien und zu etwa 60 % *Salmonella enterica* serovar Minnesota Bakterien. Das Peptid LPep19-4LF zeigt vergleichbare Werte zur Abtötung von Bakterien. Beide Peptidvarianten induzieren eine sehr starke Aggregation von Bakterien, die die Aggregationsneigung von durch LPep19-2.5 hervorgerufene Aggregation übertrifft. Beide Peptidvarianten führen zu sehr stark veränderten bakteriellen Membranen im Sinne einer starken Körnung oder Aufrauhung der Membran. Polymyxin B führt hingegen zu einer leichten Aggregation von *E. coli* WBB01 und *Salmonella enterica* serovar Minnesota.

Die Wirkung der Peptide auf *P. mirabilis* stellt einen Sonderfall dar. Neben einem sehr stark ausgeprägten Aggregationsverhalten der Bakterien durch den Einfluß der Peptide kann eine Bedeckung der Bakterienaggregation durch eine Art Schicht beobachtet werden, wobei nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die Bedeckung der Bakterien auf die antimikrobiellen Peptide oder auf einen Schutzmechanismus von *P. mirabilis* zurückzuführen ist.

Der Effekt der verstärkten Aggregation von Bakterien durch die Peptide konnte durch die Forschergruppe um Dr. Dirk Kuhlmeier am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) in Leipzig in eine Anwendung zur beschleunigten Detektion von Sepsis-auslösenden Bakterien transferiert werden. Hierbei wurde die spezifische Bindung der Peptide an LPS genutzt, um quasi als Fänger für Bakterien aus Blutproben zu fungieren. Die an magnetischen Nanopartikeln gekoppelten Peptide LPep19-2.5 und LPep19-8.3acyl können durch ihre starke Haftung an der Bakterienzellwand und die Aggregation der Bakterien, Pathogene gezielt isolieren und für eine schnelle Detektionsmethode verfügbar machen [79].

Das Lipidmembranmodell einer bakteriellen Phospholipidmembran aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) in einem Verhältnis von [81:17:2] wurde mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) untersucht und charakterisiert (Kapitel 4.8). Die zunächst bei 20 °C detektierte, lamellare supramolekulare Struktur wurde ab einer Temperatur von 40-60 °C in eine invertiert hexagonale Struktur überführt. Die Peptide LPep19-2.5 (Aspidasept®) und LPep19-4LF verhindern die Transformation in eine invertiert hexagonale Struktur bei höheren Temperaturen zu Gunsten einer *bilayer*-Struktur und stabilisieren diese.

Zusätzlich zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung des Leitpeptids wurde (Kapitel 4.3) in dieser Arbeit die Wechselwirkungen des Leitpeptids mit Modellen der humanen Zellmembran aus [DOPC:SM:Chol] [45:45:10] untersucht (Kapitel 4.11 und 4.12). Aus der Literatur ist bekannt, daß Modelle der humanen Zellmembran Domänen ausbilden [28-30, 36, 135, 137]. Die auch als „*lipid rafts*“ bezeichneten Domänen [135] fungieren als positive oder negative Regulatoren für immunologische Funktionen [142]. So wurden durch die Behandlung mit LPS Ligand-spezifische Rezeptoranhäufungen in den Lipiddomänen von Monozytenmembranen, etwa TLR-4, CD16a und CD81 beobachtet [107]. Die *in vivo* LPS-Aktivierung in SIRS-bzw. Sepsispatienten verstärkt eine Anhäufung von Immunrezeptoren in den *lipid rafts* [144, 159]. Das Leitpeptid LPep19-2.5 (Aspidasept®) zeigt in rasterkraftmikroskopischen Messungen (Kapitel 4.11) bei Konzentrationen von etwa 45 µg/ml eine Domänenauflösende Wirkung, ohne die Membran zu destabilisieren. Ausgehend von den

Erkenntnissen, daß in den *lipid rafts* Rezeptoren zur LPS-Erkennung lokalisiert sind, kann ein Einfluß auf die Signalerkennung bzw. Signaltransduktion auf der Immunzellmembran durch die Delokalisierung der LPS-Rezeptoren vermutet werden im Sinne einer Herabsetzung oder Inhibierung der durch LPS-aktivierten Signalkaskade. Die in dieser Arbeit gezeigte Wirkung ist jedoch bei einer Konzentration von 45 µg/ml des Leitpeptids beobachtet worden und liegt demnach jenseits des zukünftigen therapeutischen Bereichs. In welchem Ausmaß eine Wechselwirkung mit *lipid rafts* von Immunzellen durch das Leitpeptid induziert wird, konnte durch diese Arbeit nicht beantwortet werden.

Die Untersuchung des humanen Zellmembranmodells mit dem Leitpeptid mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) (Kapitel 4.12) stützt die Beobachtung einer Strukturveränderung, die durch die Umorganisation der Domänen bedingt ist.

Ähnliche rasterkraftmikroskopische Studien zur Interaktion des Makrolid-Antibiotikums Azithromycin mit festkörpergestützten Lipiden wie [DPPE:DOPC] und [DPPC:DOPC] in einem molaren Verhältnis von [1:1] zeigen eine Domänen-auflösende Wirkung des Antibiotikums auf die Domänen aus DPPE und DPPC innerhalb von 60 Minuten [15, 16]. Die Konzentration des Makrolids Azithromycin lag in diesen Studien bei 785 µg/ml. Die gleiche Konzentration von Azithromycin entfaltete keine Domänen-auflösende Wirkung auf die Lipidsysteme [SM:DOPC] [1:1] und [SM:Chol:DOPC] [1:1:1] [15, 16]. Die Domänen-auflösende Wirkung auf DPPE und DPPC des kationischen Azithromycin wird auf die Interkalation des Antibiotikums in die untersuchten Lipidsysteme und die Senkung der Phasenübergangstemperatur durch das Antibiotikum zurückgeführt. Die Interkalation in die Lipidmembranen würde die Bindungen zwischen den polaren Kopfgruppen der Phospholipide derart stören, daß eine Fluidisierung der Membran und damit Auflösung der Domänen die Folge ist. Im Gegensatz dazu gehen die Autoren für die SM-haltigen Lipidsysteme [SM:DOPC] und [SM:Chol:DOPC] von einer durch SM ausgelösten intermolekularen Stabilisierung der Lipiddomänen aus, die durch Azithromycin nicht gestört wird.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Domänen-auflösende Wirkung für das ternäre Lipidsystem [DOPC:SM:Chol] [45:45:10] durch das Leitpeptid Aspidasept[®] kann durch die Ergebnisse aus den Interkalationsstudien (FRET) und die Wirkung auf die Phasenübergangstemperatur (FT-IR) erklärt werden, wobei das Leitpeptid keinen Einfluß auf die Phasenübergangstemperatur von SM zeigte.

Der mögliche therapeutische Einsatz von Aspidasept® als LPS-Neutralisierer bei durch Gram-negative Bakterien induzierten Sepsis ist in der Kombination mit klassischen Antibiotika auf mögliche Wechselwirkungen untersucht worden. Die Kombination aus Aspidasept® und Ceftriaxon im molaren Verhältnis von 1:1 zeigt in Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen (SAXS) (Kapitel 4.9) eine Transformation der supramolekularen Struktur von LPS in eine multilamellare inaktive zylindrische Struktur, wie sie bereits durch Aspidasept® allein beobachtet werden konnte. Das Antibiotikum Ceftriaxon hingegen verändert nicht die supramolekulare Struktur von LPS.

Folglich zeigen die Ergebnisse aus den Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen keine Verminderung der LPS-neutralisierenden Wirkung von Aspidasept® durch Ceftriaxon.

Die Ergebnisse der SAXS-Messungen korrelieren mit Untersuchungen zu Kombinationsversuchen von Antibiotika mit Aspidasept® in ELISA-Studien (Kapitel 4.10). Während das Antibiotikum (Amoxicillin® bzw. Ceftriaxon) allein nicht die durch LPS-induzierte Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α senkt, kann in der Kombination mit Aspidasept® in unterschiedlichen molaren Verhältnissen eine Reduktion der TNF- α Sekretion beobachtet werden.

Die Kombination der antibakteriellen Wirkung des Antibiotikums, etwa Ceftriaxon, mit der LPS-neutralisierenden Wirkung von Aspidasept® zeigt keinen antagonistischen Effekt des Antibiotikums auf Aspidasept®. Es kann vielmehr ein additiver Effekt beider Komponenten angenommen werden, der darauf beruht, daß beide Komponenten verschiedene Zielstrukturen adressieren und sich somit gegenseitig in ihrer Wirkung ergänzen.

Die hier vorgestellten und diskutierten Ergebnisse zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Aspidasept® wurden durch biologische *in vitro* und *in vivo* Versuchsreihen bestätigt und können der Referenz [62] entnommen werden.

Die therapeutische Wirksamkeit des Peptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) wurde in Maus-Modellen zur Bakteriämie und Endotoxiämie bestätigt. Aspidasept® erhöht in diesen Modellen in Kombination mit den Antibiotika Ceftriaxon und Tetracyclin signifikant das Überleben von Mäusen, die mit einer hohen Bakterienlast behandelt wurden, während Kontrolltiere, die einer Infektion ohne eine Therapie ausgesetzt wurden, nach 24 Stunden nicht überlebt haben (Abbildung 81).

Die Wirkung von Kombinationen aus Aspidasept® mit klassischen Antibiotika wurde in TNF- α -ELISA-Tests durch die Bestimmung des TNF- α Serumsiegels untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien bestätigen die in dieser Arbeit gezeigten Kombinationsversuche aus Antibiotika und LPep19-2.5 (Kapitel 4.10) und unterstreichen damit den vermuteten additiven Effekt der Kombination aus Antibiotikum und LPep19-2.5 (Aspidasept®) (Abbildung 81) [62].

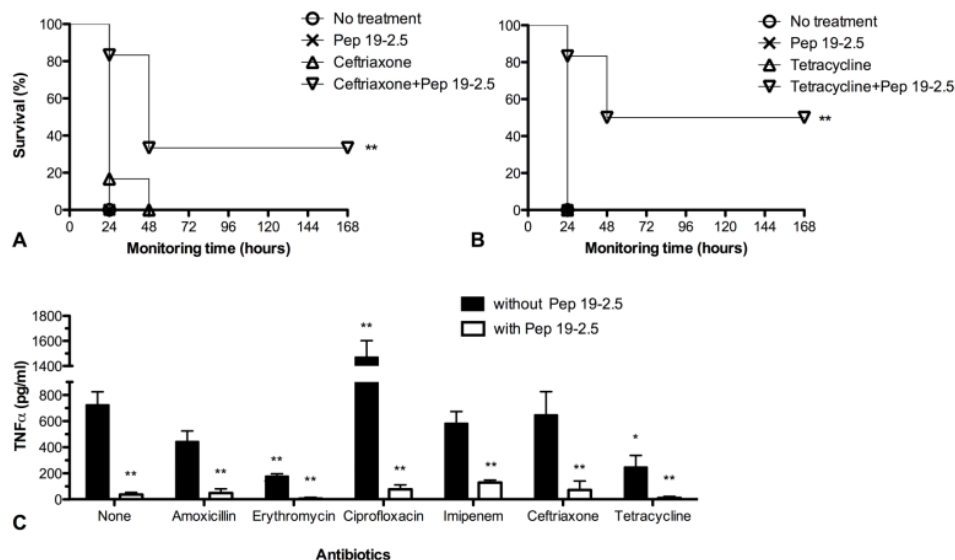


Abbildung 81: Therapeutische Wirksamkeit von LPep19-2.5 (Aspidasept®) in Kombination mit Antibiotika zur Behandlung einer Endotoxiämie oder Bakteriämie ausgelöst durch intraperitoneale Applikation von lebenden *Salmonella enterica* serovar Minnesota Bakterien. Bakterien (10^7 CFU/Maus) wurden zusammen mit Galaktosamin (18 mg/Maus) in Mäuse appliziert. Die so behandelten Mäuse ($n=6$) erhielten sofort durch intraperitoneale Injektion 200 μ g Antibiotikum/Maus (für Erythromycin 400 μ g/Maus) allein oder in Kombination mit 400 μ g (Aspidasept®)/Maus. **A** und **B**: Beobachtung der Überlebensrate in 24 Stunden Intervallen nach Applikation von Ceftriaxon (A) oder Tetracyclin (B) allein oder in Kombination mit LPep19-2.5. **C**: Bestimmung des TNF- α Serumsiegels 90 Minuten nach Inokulation mit Bakterien. Statistische Unterschiede in der Sterblichkeitsrate wurden mittels Scheffes *post hoc* Methode sowie mit Kaplan-Meier Überlebenstest analysiert. Die TNF- α Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney U Test durch den Vergleich der Ergebnisse jeder untersuchten Gruppe mit den mittleren Werten der unbehandelten Gruppe. (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$) [62]. (in Kooperation mit Guillermo Martinez de Tejada *et al.*)

Letztlich konnten die Ergebnisse zur Struktur-Wirkungsbeziehung auf das komplexe humane System der Lunge übertragen werden (Kapitel 4.15). In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Lena Heinbockel und der Klinischen und Experimentellen Pathologie des Forschungszentrum

Borstel wurde noch vitales und gesundes Lungengewebe aus Lungenresektionen mittels LPS zur Inflammation gebracht. Die Inflammation des Gewebes wurde durch die Bestimmung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α analysiert, wobei die Behandlung des Gewebes mit LPep19-2.5 die Sekretion von TNF- α deutlich reduziert und somit eine Inflammation eindämmt.

Die Etablierung der *ex vivo* Lungenstimulation durch LPS ist durch Frau Dr. Lena Heinbockel mit der Stimulation der Lunge durch hitzegetötete MRSA-Bakterien (Methicillin Resistente *Staphylococcus Aureus*) weiter entwickelt worden, wobei auch im Fall des klinisch relevanten Gram-positiven Bakteriums MRSA eine therapeutische Wirkung nachgewiesen werden konnte [62].

6 ZUSAMMENFASSUNG

Primäres Ziel dieser Arbeit im Rahmen des BMBF-Projektes 01GU0824 mit dem Titel „Therapie von Infektionskrankheiten mit speziellem Bezug auf die bakterielle Sepsis“ war es, die Wirkungsweise des Leitpeptids LPep19-2.5 bzw. Aspidasept[®], aus einer Reihe von synthetischen anti-LPS Peptiden, mit biophysikalischen Methoden auf das Sepsis-auslösende Agens Lipopolysaccharid zu untersuchen. Die Entschlüsselung des molekularen Wirkmechanismus und die Überprüfung der biophysikalischen Ergebnisse in biologischen Systemen mit dem Ziel einer therapeutischen Anwendung bei durch Gram-negative Bakterien induzierten Sepsis standen im Vordergrund der Untersuchungen in dieser Arbeit.

Die sekundären Ziele beinhalteten die Untersuchung von Kombinationen aus klassischen Antibiotika mit dem Leitpeptid im Hinblick eines synergistischen, antagonistischen oder additiven Effekts sowie die Wirkung des Leitpeptids auf Modellmembranen von humanen Zellen und auf Bakterien.

Die Studien zur Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden mit Rasterkraft- sowie Elektronenmikroskopie, Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen, Infrarotspektroskopie, isothermer Titrationskalorimetrie sowie mit Förster-Resonanz Energie-Transfer Spektroskopie durchgeführt und mit biologischen Daten aus Zytokinassays untermauert. Schließlich wurden die Ergebnisse aus den biophysikalischen und biologischen Methoden auf ein humanes *ex vivo* Lungenmodell übertragen.

Die Ergebnisse aus rasterkraft- sowie elektronenmikroskopischen Versuchen als auch die Ergebnisse aus Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimenten des Leitpeptids LPep19-2.5 mit seiner Zielstruktur Lipopolysaccharid weisen auf eine Änderung der supramolekularen Struktur von freiem Lipopolysaccharid von einer aktiven kubischen in eine inaktive zylindrische Form als molekularen Wirkmechanismus hin, die eine Multilamellarisierung von freiem Lipopolysaccharid bewirkt. Der molekulare Wirkmechanismus wird durch die Bindung des kationischen Peptids an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Lipid A-Teils aufgrund von Coulomb Kräften sowie durch die Wechselwirkung des hydrophoben C-Terminus des Peptids mit den hydrophoben Arealen (Acylketten) der Lipopolysaccharide getrieben.

Eine Destabilisierung von Phospholipidmembranen durch den Einbau von LPep19-2.5 in Phosphatidylcholin- und Phosphatidylserin Liposomen konnte durch Förster-Resonanz Energie-Transfer Spektroskopie gezeigt werden und wurde durch die Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur bzw. die Auflösung der Phasengrenze als Folge der Interaktion mit LPep19-2.5 mittels Infrarotspektroskopie bestätigt. Diese destabilisierende Wirkung durch Einbau und Wirkung auf das Phasenverhalten konnte auch für Lipopolysaccharid-Aggregate von *E. coli* WBB01 und *Salmonella enterica* serovar Minnesota gezeigt werden.

Die aus der Multilamellarisation von Lipopolysacchariden resultierende Lipopolysaccharid-neutralisierende Wirkung konnte durch die Bestimmung von pro-inflammatorischen Zytokinen belegt und in ein therapeutisches Versuchsmodell der humanen Lunge übertragen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Lipopolysaccharid-neutralisierende Wirkung des Peptids LPep19-2.5 (Aspidasept®) effektiv die Zytokinausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine durch eine direkte irreversible Veränderung der Zielstruktur senkt oder inhibiert und mit der antibakteriellen Wirkung klassischer Antibiotika kombinierbar ist.

Diese Arbeit konnte das hohe therapeutische Potential für die Behandlung einer durch Gram-negative Bakterien induzierten Sepsis aufzeigen und stellt mit seinen Ergebnissen und Rückschlüssen einen grundlegenden Beitrag der präklinischen Phase eines Anti-Sepsis Therapeutikums dar.

7 AUSBLICK

Die Ergebnisse aus den präklinischen Untersuchungen von Aspidasept® (LPep19-2.5), die primär den molekularen Wirkmechanismus von Aspidasept® mit seinem Reaktionspartner Endotoxin, Lipopolysaccharid, zu entschlüsseln suchten, stellen die Basis für den Eintritt in klinische Phasen. Nach der ersten Beratung beim Bundesministerium für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Jahr 2011 sind noch offene Fragen für die Beendigung der präklinischen Phase aufgeworfen worden. Bis zum Ende des Jahres 2012 konnten diese Fragen beantwortet werden. Gegenwärtig steht noch eine tiertoxikologische Studie an nicht-Nagetieren (geplant: Mini-Schwein) nach den Richtlinien der ICH M3 (*international commission of harmonization*) aus. Mit Durchführung und Abschluß dieser Studie kann die präklinische Phase als abgeschlossen angesehen werden und wird durch eine abschließende Beratung bei der BfArM bewertet.

Das Einsatzgebiet für den Wirkstoff bzw. das Produkt Aspidasept® ist die durch Gram-negative Bakterien ausgelöste Sepsis. Die angestrebte und in den klinischen Phasen zu prüfende Applikation ist der intravenöse Weg (i.v.) als Dauerinfusion über mehrere Tage (3-5 Tage) neben der i.v. Gabe von klassischen Antibiotika (etwa Ceftriaxon).

Der Eintritt in die sich anschließenden klinischen Phasen I bis III ist ab Mitte 2013 zu erwarten, sofern eine solide Finanzierung für die zukünftigen Phasen gefunden wird. Die klinischen Phasen I und II sind bereits weitestgehend geplant in Bezug auf Studiendesign und „power“ sowie in Bezug auf beteiligte Studienzentren oder Universitätskliniken.

Die angedachte klinische Phase I (humane Pharmakologie) soll drei Studien umfassen und an gesunden Probanden durchgeführt werden. Die sogenannten „first in men“-Studien (FIM) haben die Prüfung bzw. den Nachweis der Wirksamkeit und Verträglichkeit sowie die pharmakologische Sicherheit des Medikamentes zum Ziel. Das Erkennen von eventuell auftretenden Nebenwirkungen ist ein ebenso wichtiges Ziel. Die klinische Phase I-Studien sind als randomisierte, doppel-blind-und Placebo-kontrollierte-Studien ausgelegt. Zwei Studien der klinischen Phase I testen unterschiedliche Dosen bzw. Konzentrationen des Medikamentes. Die dritte Studie aus der klinischen Phase I testet die Wirksamkeit von Aspidasept® bei gleichzeitiger LPS-Gabe. Diese Studien zielen auf den klinischen Nachweis der Wirksamkeit des untersuchten Medikamentes (*clinical proof of concept; cPOC*).

Die Rahmenbedingungen der sich anschließenden klinischen Phase II sind ebenfalls bereits festgelegt. Sie wird als multizentrische, randomisierte, doppelt verblindete und Placebo-kontrollierte Studie an Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt.

Die Untersuchungen in der klinischen Phase I werden etwa 12 Monate in Anspruch nehmen und für die klinische Phase II ist mit einer Dauer von etwa 18 Monaten zu rechnen. Nach den vorliegenden Planungen könnte das *cPOC* nach 36 Monaten erreichbar sein und eine klinische Verwertung durch ein pharmazeutisches Unternehmen in Betracht gezogen werden.

Die Anwendbarkeit von Aspidasept® ist nicht nur auf die intravenöse Applikation beschränkt. Zukünftig könnten auch inhalative Wege oder topische Anwendungen interessant werden. Der inhalative Weg könnte als supportive Therapie bei intubierten und beatmeten Patienten zur Prophylaxe und Therapie einer Pneumonie denkbar sein. Die lokale bzw. topische Anwendung ließe sich bei Patienten mit Brandwunden einsetzen, um eine Primärheilung zu unterstützen.

Für diese Anwendungen sind die Etablierung neuer *in vitro*- und *in vivo*- Modelle notwendig, die auch einer neuen Formulierung von Aspidasept® in Tropfen-oder Salbenform bzw. als Inhalationsflüssigkeit bedürfen.

Die primär antibakteriell wirkenden Peptide LPep19-8.3acyl und LPep19-4LF, die als Vergleich zu Aspidasept® in einigen Untersuchungen Eingang gefunden haben, verfügen über ein therapeutisches Potenzial im Hinblick auf die Verwendung als antibakterielle Beschichtung von medizinischen Implantaten und Verbandmaterialien. Die Wirkungsweise dieser Peptide auf molekularer Ebene sollte vertiefend mit biophysikalischen und biologischen Methoden untersucht werden. Vorstellbar wäre ein bildgebendes Verfahren, etwa Rasterkraftmikroskopie, zur Abbildung von Bakterien in der Wechselwirkung mit biologisch aktiven, fluoreszenzmarkierten Peptiden unter nahezu physiologischen Bedingungen in einer fluiden und temperierten Umgebung. Somit wäre eine direkte Wirkung der Peptide auf Bakterien unter physiologischen Bedingungen *in situ* darstellbar.

Die antibakterielle Wirksamkeit kann auf andere klinisch relevante Keime ausgedehnt werden, wobei Keime, die bereits gegen Antibiotika Resistenzen entwickelt haben, von besonderem klinischem Interesse sind.

Ferner ist eine Kombination eines antibakteriellen Peptids, etwa LPep19-4LF, mit einem klassischen Antibiotikum und Aspidasept® als Dreierkombination denkbar. Diese Kombi-

nation würde die antibakteriellen Wirkungen des Antibiotikums mit der des LPep19-4LF verbinden und darüber hinaus über eine LPS-neutralisierende Komponente (Aspidasept®) verfügen.

Wissenschaftlich interessant ist die Klärung eines synergistischen oder additiven Effekts der untersuchten Peptide mit bereits bekannten Antibiotika im Sinne einer Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit der Antibiotika vor dem Hintergrund der weltweit wachsenden Resistenzen von Bakterien gegen Antibiotika.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. (1990) From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. JAMA 263:937-938
2. (2011) IN BRIEF Xigris Withdrawn. Medical Letter on Drugs and Therapeutics 53:104-104
3. (2011) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2012. [Buch plus Online ; inklusive Online Zugang für 1 Jahr]. De Gruyter Berlin
4. (2012) Deutsches Ärzteblatt
5. (2013) Deutsches Ärzteblatt
6. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H et al. (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med 28:108-121
7. Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S et al. (2005) Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. Am J Respir Crit Care Med 171:461-468
8. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV et al. (2003) Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. Am J Respir Crit Care Med 168:77-84
9. Alexander S, Hellemanns L, Marti O et al. (1989) An atomic-resolution atomic force microscope implemented using an optical lever. J. Appl. Phys. 65:164-167
10. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA et al. (2000) E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. JAMA 283:1723-1730
11. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J et al. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 29:1303-1310

12. Bensch KW, Raida M, Magert HJ et al. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368:331-335
13. Beovic B, Hladnik Z, Pozenel P et al. (2008) Epidemiology of severe sepsis in Slovenian intensive care units for adults. *J Chemother* 20:134-136
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L et al. (2007) *Biochemie*. Elsevier, Spektrum Akad. Verl. München
15. Berquand A, Fa N, Dufrene YF et al. (2005) Interaction of the macrolide antibiotic azithromycin with lipid bilayers: effect on membrane organization, fluidity, and permeability. *Pharm Res* 22:465-475
16. Berquand A, Mingeot-Leclercq MP, Dufrene YF (2004) Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1664:198-205
17. Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56:930-933
18. Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V et al. (2008) Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 12:R158
19. Blume A (1996) Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies (vol 1, pg 64, 1996). *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1:431-431
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-1655
21. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP et al. (1989) Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 17:389-393
22. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL (1992) The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481-1483

23. Boon JM, Smith BD (2002) Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Med Res Rev* 22:251-281
24. Bragg WL, Bragg WH (1914) Die Beugung kurzer elektromagnetischer Wellen durch einen Kristall. Barth Leipzig
25. Brandenburg K, Koch MH, Seydel U (1990) Phase diagram of lipid A from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* rough mutant lipopolysaccharide. *J Struct Biol* 105:11-21
26. Brandenburg K, Wiese A (2004) Endotoxins: Relationships between structure, function, and activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4:1127-1146
27. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238-250
28. Brown DA, London E (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 164:103-114
29. Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544
30. Brown RE (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science* 111:1-9
31. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J et al. (1995) Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 274:968-974
32. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P et al. (2004) EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 30:580-588
33. Brunkhorst FM (2006) [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41:43-44
34. Christie WW, Han X (2010) Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis. Oily Press Bridgwater

35. de Tejada GM, Sanchez-Gomez S, Razquin-Olazarán I et al. (2012) Bacterial Cell Wall Compounds as Promising Targets of Antimicrobial Agents I. Antimicrobial Peptides and Lipopolyamines. *Current Drug Targets* 13:1121-1130
36. Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN et al. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal* 80:1417-1428
37. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J et al. (2007) Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 35:1244-1250
38. Droemann D, Rupp J, Goldmann T et al. (2007) Disparate innate immune responses to persistent and acute *Chlamydia pneumoniae* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175:791-797
39. Dufrene YF (2004) Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat Rev Microbiol* 2:451-460
40. Dufrene YF (2006) Nanoscale exploration of microbial surfaces using the atomic force microscope. *Future Microbiol* 1:387-396
41. Dufrene YF (2008) Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nat Rev Microbiol* 6:674-680
42. El Kirat K, Burton I, Dupres V et al. (2005) Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *J Microsc* 218:199-207
43. El Kirat K, Morandat S, Dufrene YF (2010) Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1798:750-765
44. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG et al. (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33:606-618
45. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND et al. (2007) Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med* 35:1284-1289
46. Finfer S, Bellomo R, Lipman J et al. (2004) Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 30:589-596

47. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE et al. (2012) Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov* 11:37-51
48. Freudenberg MA, Tchaptchet S, Keck S et al. (2008) Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 213:193-203
49. Galanos C, Luderitz O, Westphal O (1969) A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 9:245-249
50. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S et al. (2001) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 306:257-264
51. Gasparovic V, Gornik I, Ivanovic D (2006) Sepsis syndrome in Croatian intensive care units: piloting a national comparative clinical database. *Croat Med J* 47:404-409
52. Glatter O, Kratky O (1982) Small angle X-ray scattering. *Acad. Pr. London* [u.a.]
53. Goldfine H (1984) Bacterial membranes and lipid packing theory. *J Lipid Res* 25:1501-1507
54. Gutschmann T, Razquin-Olazarán I, Kowalski I et al. (2010) New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3817-3824
55. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ et al. (2011) Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*:1-8
56. Hancock RE (1998) The therapeutic potential of cationic peptides. *Expert Opin Investig Drugs* 7:167-174
57. Hancock RE, Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16:82-88
58. Hancock RE, Sahl HG (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24:1551-1557

59. Harder J, Bartels J, Christophers E et al. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861
60. Harder J, Bartels J, Christophers E et al. (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-5713
61. Harrison DA, Welch CA, Eddleston JM (2006) The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit Care* 10:R42
62. Heinbockel L, Sanchez-Gomez S, Martinez de Tejada G et al. (2013) Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors. *Antimicrob Agents Chemother* 57:1480-1487
63. Henrich B, Bergamaschi A, Broennimann C et al. (2009) PILATUS: A single photon counting pixel detector for X-ray applications. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 607:247-249
64. Huang TC, Toraya H, Blanton TN et al. (1993) X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *Journal of Applied Crystallography* 26:180-184
65. Huber M, Kalis C, Keck S et al. (2006) R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol* 36:701-711
66. Jass J, Tjarnhage T, Puu G (2000) From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J* 79:3153-3163
67. Jia HP, Schutte BC, Schudy A et al. (2001) Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* 263:211-218
68. Jiang Z, Georgel P, Du X et al. (2005) CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 6:565-570

69. Jurgens G, Muller M, Koch MHJ et al. (2001) Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A - Physicochemical characterization and biological activity. *European Journal of Biochemistry* 268:4233-4242
70. Kaconis Y, Kowalski I, Howe J et al. (2011) Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides. *Biophys J* 100:2652-2661
71. Karima R, Matsumoto S, Higashi H et al. (1999) The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 5:123-132
72. Karlsson S, Heikkinen M, Pettila V et al. (2010) Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit Care* 14:R205
73. Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E et al. (2007) Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med* 33:435-443
74. Kayser FH, Voll M (2005) *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Stuttgart [u.a.]
75. Kleinig H, Sitte P, Maier U et al. (1999) *Zellbiologie*. Fischer Stuttgart [u.a.]
76. Koch E-E (1983) *Handbook on synchrotron radiation*. North-Holland Amsterdam [u.a.]
77. Koch MH, Vachette P, Svergun DI (2003) Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* 36:147-227
78. Kubler A, Durek G, Zamirowska A et al. (2004) Severe sepsis in Poland--results of internet surveillance of 1043 cases. *Med Sci Monit* 10:CR635-641
79. Kuhlmeier D, N. S, Lorentzen M et al. (21.03.2011) Neuer, beschleunigter Sepsistest basiert auf Magnetsensorik. *Laborpraxis*
80. Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34:1589-1596

81. Labernadie A, Thibault C, Vieu C et al. (2010) Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:21016-21021
82. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29:530-538
83. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31:1250-1256
84. Lichtenstern C, Brenner T, Bardenheuer HJ et al. (2012) Predictors of survival in sepsis: what is the best inflammatory marker to measure? *Curr Opin Infect Dis* 25:328-336
85. Lottspeich F, Engels JW (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Akad. Verl. München
86. Mantsch HH, McElhaney RN (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 57:213-226
87. Marti O, Colchero J, Mlynek J (1990) Combined scanning force and friction microscopy of mica. *Nanotechnology* 1:141-144
88. Martin CM, Priestap F, Fisher H et al. (2009) A prospective, observational registry of patients with severe sepsis: the Canadian Sepsis Treatment and Response Registry. *Crit Care Med* 37:81-88
89. Martin GS, Mannino DM, Eaton S et al. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-1554
90. Martin Y, Williams CC, Wickramasinghe HK (1987) Atomic force microscope force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J. Appl. Phys.* 61:4723-4729
91. Meyer HW, Richter W (2001) Freeze-fracture studies on lipids and membranes. *Micron* 32:615-644
92. Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA (2010) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett* 584:1887-1894

93. Mingeot-Leclercq MP, Deleu M, Brasseur R et al. (2008) Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat Protoc* 3:1654-1659
94. Miyawaki A (2011) Development of Probes for Cellular Functions Using Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 80 80:357-373
95. Moerer O, Burchardi H (2006) [The cost of sepsis]. *Anaesthesist* 55 Suppl 1:36-42
96. Moerer O, Quintel M (2009) [Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects]. *Internist (Berl)* 50:788, 790-784, 796-788
97. Moerer O, Schmid A, Hofmann M et al. (2002) Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 28:1440-1446
98. Muller DJ, Dufrene YF (2008) Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat Nanotechnol* 3:261-269
99. Neilson AR, Moerer O, Burchardi H et al. (2004) A new concept for DRG-based reimbursement of services in German intensive care units: results of a pilot study. *Intensive Care Med* 30:1220-1223
100. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL et al. (2011) *Lehninger Biochemie*. Mit 131 Tabellen. Springer Berlin [u.a.]
101. Neville F, Cahuzac M, Konovalov O et al. (2006) Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptide LL-37: insight into mechanism of action. *Biophys J* 90:1275-1287
102. Nikaido H (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593-656
103. Ohtani Y, Irie T, Uekama K et al. (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186:17-22
104. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL et al. (1999) Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *Journal of Infectious Diseases* 180:1584-1589

105. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR et al. (2003) Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 31:2332-2338
106. Perl TM, Dvorak L, Hwang T et al. (1995) Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA* 274:338-345
107. Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E et al. (2001) Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 31:3153-3164
108. Quartin AA, Schein RM, Kett DH et al. (1997) Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* 277:1058-1063
109. Rangel-Frausto MS (1999) The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 13:299-312, vii
110. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M et al. (1995) The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 273:117-123
111. Rappolt M (2006) Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. In: Liu AL (ed) The Biologically Relevant Lipid Mesophases As "Seen" by X-Rays, in: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes ; vol. 5, pp. 253-283., vol. 5 Elsevier textbooks [s.l.], pp Online Ressource (4853 KB, 4336 S.)*
112. Rappolt M, Hodzic A, Sartori B et al. (2008) Conformational and hydrational properties during the L(beta)- to L(alpha)- and L(alpha)- to H(II)-phase transition in phosphatidylethanolamine. *Chem Phys Lipids* 154:46-55
113. Reinhart K (2010) Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. 1. Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Thieme Stuttgart [u.a.]

114. Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H et al. (2006) [Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]. *Anaesthesist* 55 Suppl 1:43-56
115. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG et al. (2006) [Diagnosis and therapy of sepsis]. *Clin Res Cardiol* 95:429-454
116. Richter RP, Brisson AR (2005) Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys J* 88:3422-3433
117. Richter W, Vogel V, Howe J et al. (2011) Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immun* 17:427-438
118. Rietschel ET, Brade H, Holst O et al. (1996) Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:39-81
119. Rivers E, Nguyen B, Havstad S et al. (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345:1368-1377
120. Roessle MW, Klaering R, Ristau U et al. (2007) Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *Journal of Applied Crystallography* 40:S190-S194
121. Rupp J, Droemann D, Goldmann T et al. (2004) Alveolar epithelial cells type II are major target cells for *C. pneumoniae* in chronic but not in acute respiratory infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:197-203
122. Salvo I, de Cian W, Musicco M et al. (1995) The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 21 Suppl 2:S244-249
123. Sands KE, Bates DW, Lanken PN et al. (1997) Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 278:234-240
124. Scheuring S, Dufrene YF (2010) Atomic force microscopy: probing the spatial organization, interactions and elasticity of microbial cell envelopes at molecular resolution. *Mol Microbiol* 75:1327-1336

125. Schmid A, Burchardi H, Clouth J et al. (2002) Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ* 3:77-82
126. Schromm AB, Brandenburg K, Rietschel ET et al. (1996) Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *Febs Letters* 399:267-271
127. Schuerholz T, Brandenburg K, Marx G (2012) Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Crit Care* 16:207
128. Schuetz P, Albrich W, Mueller B (2011) Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Med* 9:107
129. Seam N, Suffredini AF (2007) Mechanisms of sepsis and insights from clinical trials. *Drug Discov Today Dis Mech* 4:83-93
130. Seydel U, Hawkins L, Schromm AB et al. (2003) The generalized endotoxic principle. *Eur J Immunol* 33:1586-1592
131. Seydel U, Koch MH, Brandenburg K (1993) Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. *J Struct Biol* 110:232-243
132. Shai Y (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236-248
133. Shai Y, Oren Z (2001) From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22:1629-1641
134. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
135. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572
136. Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3
137. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1:31-39

138. Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731
139. Snyder S, Kim D, McIntosh TJ (1999) Lipopolysaccharide bilayer structure: Effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature. *Biochemistry* 38:10758-10767
140. Sundararajan V, Macisaac CM, Presneill JJ et al. (2005) Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit Care Med* 33:71-80
141. Suter PM (2011) Xigris is withdrawn from the market a-10-year odyssey. *Minerva Anesthesiologica* 77:1128-1129
142. Szoor A, Szollosi J, Vereb G (2010) Rafts and the battleships of defense: the multifaceted microdomains for positive and negative signals in immune cells. *Immunol Lett* 130:2-12
143. Tidswell M, Tillis W, Larosa SP et al. (2010) Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 38:72-83
144. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT et al. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 115:2603-2611
145. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT et al. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of Cell Science* 115:2603-2611
146. Triantafilou M, Morath S, Mackie A et al. (2004) Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* 117:4007-4014
147. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003) Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16:379-414
148. van Gestel A, Bakker J, Veraart CP et al. (2004) Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care* 8:R153-162

149. Vereb G, Szollosi J, Matko J et al. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8053-8058
150. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL et al. (2006) Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 34:344-353
151. Voet D, Voet JG, Pratt CW et al. (2002) *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH Weinheim
152. Walker KE, Moghaddame-Jafari S, Lockatell CV et al. (1999) ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* 32:825-836
153. Walmrath D, Grimminger F, Seeger W (2001) [Severe sepsis--new therapeutic options]. *Internist (Berl)* 42:1619-1620, 1623-1630
154. Warren BE (1969) X-ray diffraction. Addison-Wesley Reading/Mass. [u.a.]
155. Warren JW, Tenney JH, Hoopes JM et al. (1982) A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. *J Infect Dis* 146:719-723
156. Welton JM, Meyer AA, Mandelkehr L et al. (2002) Outcomes of and resource consumption by high-cost patients in the intensive care unit. *Am J Crit Care* 11:467-473
157. Willumeit R, Kumpugdee M, Funari SS et al. (2005) Structural rearrangement of model membranes by the peptide antibiotic NK-2. *Biochim Biophys Acta* 1669:125-134
158. Witte W, Kresken M, Bräulke C et al. (1997) Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. *Clin Microbiol Infect* 3:414-422
159. Wolf Z, Orso E, Werner T et al. (2007) Monocyte cholesterol homeostasis correlates with the presence of detergent resistant membrane microdomains. *Cytometry A* 71:486-494

160. Woodward B, Cartwright M (2009) Safety of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis: data from adult clinical trials and observational studies. *J Crit Care* 24:595-602
161. Yaghmur A, Rappolt M (2012) Structural characterization of lipidic systems under nonequilibrium conditions. *Eur Biophys J* 41:831-840
162. Yang L, Harroun TA, Weiss TM et al. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81:1475-1485
163. Zahorec R, Firment J, Strakova J et al. (2005) Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic. *Infection* 33:122-128
164. Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET (1994) Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 50:211-276
165. Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395

9 ANHÄNGE

Name nach IUPAC	Abkürzung	Summen- formel	Molare Masse [g/mol]	Kohlenstoff- Kettenlänge/Doppel- bindungen
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- Phosphocholin	DOPC	$C_{44}H_{84}NO_8P$	786,150	18:1 (cis)
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- [Phospho-L-Serin] (Natriumsalz)	DOPS	$C_{42}H_{77}NO_{10}PNa$	810,040	18:1 (cis)
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero- 3-Phosphocholin	DMPC	$C_{36}H_{72}NO_8P$	677,940	14:0
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero- 3-[Phospho-L-Serin] (Natriumsalz)	DMPS	$C_{34}H_{65}NO_{10}PNa$	701,850	14:0
L- α - phosphatidylethanolamin (<i>E. coli</i>)	PE	$C_{39}H_{76}NO_8P$	719,302	16:0 (33,3%) 17:0 (17,7%) 18:1 (34,1%)
L- α -phosphatidylglycerol (<i>E. coli</i>) (Natriumsalz)	PG	$C_{39}H_{74}NaO_{10}P$	761,073	16:0 (43,6%) Cyclo 17:0 (26,8%) Trans 18:1 (9,7%)
Cardiolipin (<i>E. coli</i>) (Natriumsalz)	CL	$C_{76}H_{142}Na_2O_{17}P_2$	1429,954	16:0 (33,3%) 16:1 (10,2%) Cyclo 17:0 (27,0%) Trans 18:1 (14,4%)

Tabelle 9: Verwendete Phospholipide (Kapitel 3.1.2).

Sepsisdefinition nach ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien in der Novellierung von 2003 [83]	
I. Nachweis einer Infektion <u>oder</u> Verdacht auf eine Infektion <u>und</u> einige der folgenden Kriterien:	
Allgemeine Parameter -Fieber (> 38,3 °C) oder Hypothermie (< 36 °C) -Tachykardie (>90/min) oder >2-fache SD des NW*) -Tachypnoe (> 30/min) -Eingeschränkter neurologischer Status (> 20 ml/kg/24h) -Hyperglykämie (BZ > 120 mg/dl oder 7,7 mmol/l)	Inflammatorische Parameter -Leukozytose (>12000/µl) oder Leukopenie (<4000/µl) oder Normwerte mit > 10 % unreifen Formen -C-reaktives Protein (> 2-fache SD über NW) -Prokalzitonin (> 2-fache SD über NW)
Hämodynamische Parameter -Hypotonie (SBP < 90 mmHg, MAP < 70 mmHg, Abfall SBP > 40 mmHg oder Abfall < 2-fach SD unter NW) -Gemischtvenöse Sauerstoffsättigung > 70 % -Herzindex (CI) > 3,5 l/min/m²	
Organdysfunktion -Arterielle Hypoxämie ($p_aO_2/F_iO_2 < 300$) -Akute Oligurie (< 0,5 ml/kg/h oder 45mmol/l für ≥ 2 Stunden) -Gerinnungsstörung (INR > 1,5 oder PTT > 60 s) -Hyperbilirubinämie (Bilirubin > 4 mg/dl oder > 70 mmol/l) -Ileus (Fehlen von Darmgeräuschen) -Kreatininanstieg um ≥ 0,5 mg/dl -Thrombozytopenie (< 100000/µl)	
Gestörte Gewebeperfusion -Erhöhtes Laktat (> 1 mmol/l) -Reduzierte kapilläre Füllung oder Marmorierung	

Tabelle 10: Sepsisdefinition nach ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien von 2003

(verändert nach *Moerer et al.*, 2009 [83, 96]); * Über- bzw. Unterschreitung um die 2-fache Standardabweichung vom Normwert; SIRS-Kriterien sind fett hervorgehoben. (Kapitel 2.6.1)

<i>cantilever</i>	Hersteller	Federkonstante $k / \text{N} \cdot \text{m}^{-1}$	Resonanzfrequenz an Luft $f_{\text{res}} / \text{kHz}$	Umgebung und Verwendete Modi
NSG11 <i>cantilever B</i>	NT-MDT, Moskau, Russland	5,5	150	Luft AC
OMCL-RC 800 PSA <i>WLlever</i>	Olympus OPTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan	0,10	19	Puffer AC
OMCL-RC 800 PSA <i>NLlever</i>	Olympus OPTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan	0,05	18	Puffer AC
CSG11 <i>cantilever A</i>	NT-MDT, Moskau, Russland	10	0,03	Luft DC
CSG11 <i>cantilever B</i>	NT-MDT, Moskau, Russland	20	0,1	Luft DC

Tabelle 11: Spezifikationen (Federkonstanten, Resonanzfrequenzen) und verwendete Modi der verwendeten *cantilever*.

(Kapitel 3.13.1)

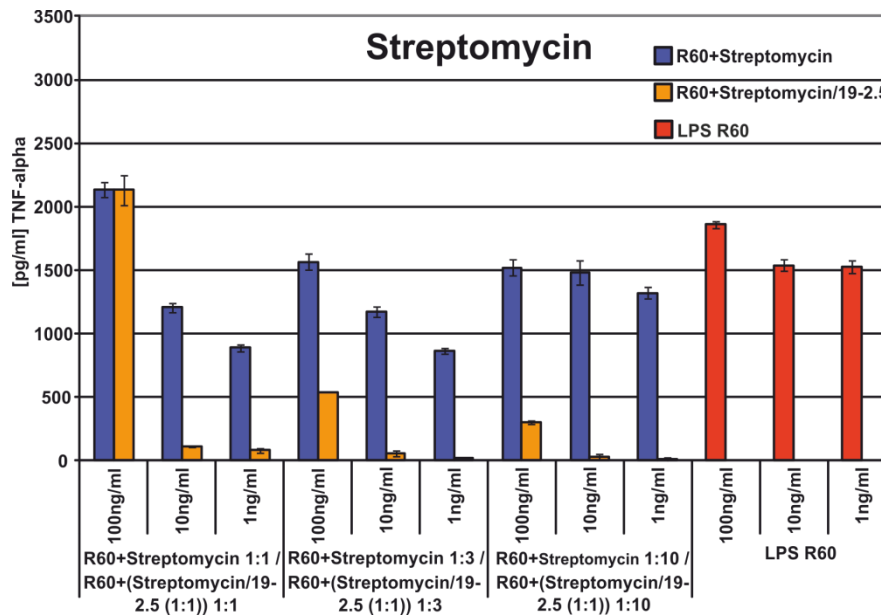


Abbildung 82: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch Streptomycin und die Mischung aus Streptomycin und LPeP19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.

Vergleich der Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung von TNF- α durch Streptomycin in verschiedenen molaren Verhältnissen (violette Balken) und durch die 1:1 Kombination aus Streptomycin und LPeP19-2.5 (Aspidasept®) in verschiedenen molaren Verhältnissen (gelbe Balken) und LPS-Kontrolle (rote Balken). Untersuchung von drei verschiedenen Konzentrationen zu 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml. Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen. (Kapitel 4.10)

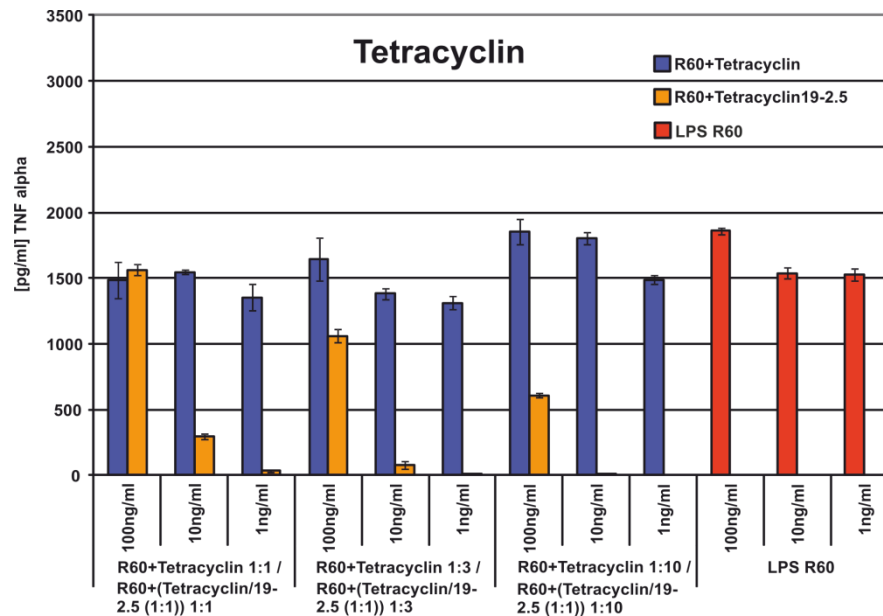


Abbildung 83: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch Tetracyclin und die Mischung aus Tetracyclin und LPep19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.

Vergleich der Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung von TNF- α durch Tetracyclin in verschiedenen molaren Verhältnissen (violette Balken) und durch die 1:1 Kombination aus Tetracyclin und LPep19-2.5 (Aspidasept®) in verschiedenen molaren Verhältnissen (gelbe Balken) und LPS-Kontrolle (rote Balken). Untersuchung von drei verschiedenen Konzentrationen zu 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml. Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen. (Kapitel 4.10)

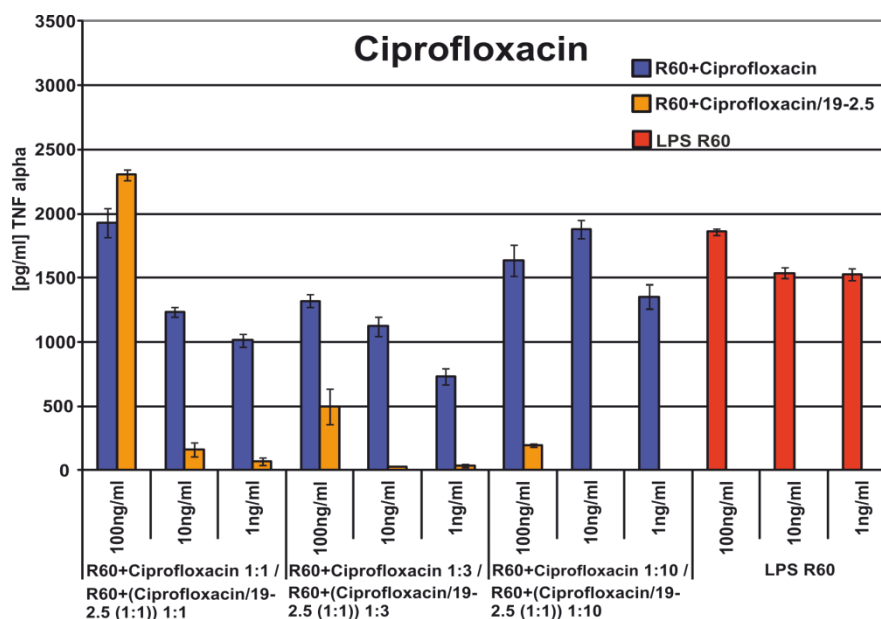


Abbildung 84: Inhibition der LPS-induzierten Inflammation *in vitro* durch Ciprofloxacin und die Mischung aus Ciprofloxacin und LPeP19-2.5 im Verhältnis von 1:1 bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen.

Vergleich der Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung von TNF- α durch Ciprofloxacin in verschiedenen molaren Verhältnissen (violette Balken) und durch die 1:1 Kombination aus Ciprofloxacin und LPeP19-2.5 (Aspidasept®) in verschiedenen molaren Verhältnissen (gelbe Balken) und LPS-Kontrolle (rote Balken). Untersuchung von drei verschiedenen Konzentrationen zu 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml. Dargestellt ist die durch LPS R60 induzierte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α durch humane mononukleäre Zellen. (Kapitel 4.10)

Ethikanträge

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente mit Blut und Blutbestandteilen wurden durch die Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck unter dem Aktenzeichen 09-183 genehmigt.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente mit humanem Lungengewebe wurden durch die Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck unter dem Aktenzeichen 03-158 genehmigt.

Die diese Dissertation begleitenden und im Kapitel Diskussion gezeigten Daten aus Tierexperimenten wurden an der Universität Navarra in Spanien unter Genehmigung des Tierversuchs-Komitees der Universität Navarra in Spanien mit den Aktenzeichen 069-09, E6-11 und E28-11 erhoben.

Markenanmeldung

Das Peptid LPep19-2.5 wurde mit dem Markennamen „Aspidasept“ unter dem Aktenzeichen EU-Marke 11 177 102 vom Harmonisierungsamt für den Binnenmarkt in das Register eingetragen und ist als Marke geschützt.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Forschungsgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, die für ein hervorragendes, freundliches und immer interessantes Arbeitsklima mit Spaß an der Arbeit und hilfreichen Diskussionen gesorgt haben.

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Gutschmann, als Leiter der Forschungsgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, der mir die Möglichkeit eröffnet hat, meine Dissertation in der Forschungsgruppe Biophysik anzufertigen.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Peter Zabel für die Übernahme der Doktorvaterschaft und für das Begleiten meiner Dissertation bedanken.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt meinem direkten Betreuer Herrn Prof. Dr. Klaus Brandenburg, der mir die interessante Fragestellung und Aufgabe übertragen hat, an der Entwicklung eines potentiellen Medikamentes gegen Sepsis mitwirken zu dürfen. Sein Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten, seine immerwährende Motivation und sein Interesse an meinen Forschungen haben diese Arbeit ermöglicht und vorangetrieben. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Brandenburg danken für die ungebrochene Unterstützung und Ermutigung bei der Beschreitung immer neuer Wege und bei der Etablierung neuer Systeme und Ideen. Darüber hinaus danke ich ihm für das stets offene und herzliche Wesen und die freundschaftliche Atmosphäre und vielfältigen fachlichen und allgemeinen Diskussionen, die diese Arbeit begleitet haben.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä für die stetige gute Laune, für Motivation und freundschaftliche Hilfe in allen Angelegenheiten, die über das kollegiale Maß hinausgingen. Ebenso danke ich ihm für die wertvollen Hinweise und Anmerkungen zu wissenschaftlichen Fragestellungen und Problemen.

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Roessle und Herrn PD Dr. Michael Rappolt möchte ich mich für die Einweisung und Unterstützung bei SAXS-Experimenten bedanken, die ich am EMBL und DESY in Hamburg erfahren habe.

Den Mitgliedern des BMBF-Konsortiums „Therapie von Infektionskrankheiten mit besonderem Bezug auf die bakterielle Sepsis“, dem OA Herrn PD Dr. Tobias Schürholz vom Universitätsklinikum der RWTH Aachen und Herrn Prof. Dr. Mathias Hornef von der

Medizinischen Hochschule Hannover sowie deren Mitarbeiterinnen, danke ich für die intensive und fruchtbare Mitarbeit und Offenheit für alle Ideen und Anregungen, die das Forschungsprojekt vorangebracht haben.

Für die begleitenden Forschungen in Tiermodellen zur Endotoxiämie und Bakteriämie, die das Forschungsprojekt nicht nur ergänzt sondern stets vorangetrieben haben, bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Guillermo Martinez de Tejada und seinen Mitarbeitern von der Universität von Navarra in Spanien.

Für die Unterstützung und den Einblick in die Elektronenmikroskopie möchte ich einen großen Dank an Herrn Dr. Walter Richter und den Mitarbeitern des Elektronenmikroskopischen Zentrums an der Universitätsklinik Jena richten.

Für die Etablierung des *ex vivo* Lungenmodells in der Forschungsgruppe Biophysik danke ich den Pathologen Herrn Dr. Holger Schultz, Herrn Dr. Florian Stellmacher und Herrn PD Dr. Torsten Goldmann sowie Frau Dr. Lena Heinbockel und Herrn M. Sc. Sebastian Marwitz.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen der Forschungsgruppe Biophysik Frau Sabrina Groth, Frau Nina Hahlbrock, Frau Christine Hamann und Frau Kerstin Stephan sowie Frau Sabine Dabelstein für die technische Unterstützung bedanken, die ich im Besonderen bei der Umsetzung von IR-, FRET- und EM-Experimenten sowie bei biologischen Assays und bei der Etablierung des *ex vivo* Lungenmodells erfahren konnte und für den allseits herzlichen und verständnisvollen Umgang während meiner Promotionszeit.

Bei Herrn PD Dr. Buko Lindner möchte ich mich für seine motivierenden Diskussionen und hilfreichen kritischen Anmerkungen bei wissenschaftlichen Präsentationen bedanken.

Herrn Dipl. Ing. Rainer Bartels und Herrn Volker Grote danke ich für die Synthese von antimikrobiellen Peptiden. Ebenso ein Dank an die Firma Bachem für die Bereitstellung des Leitpeptids LPep19-2.5 unter GMP-Bedingungen.

Einen herzlichen Dank möchte ich an Frau Dr. Bettina Brand für die wertvollen Hinweise bei der Wahrnehmung von repräsentativen Aufgaben für das Forschungszentrum Borstel richten. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Susanne Pätzold für die Leitung und Organisation des Doktorandenkollegs „*Borstel Biomedical Research School*“ sowie für ihre immerwährende motivierende Art.

Bei Frau M. Sc. Kai Karin Geschuhn und bei Frau Christiane Engler möchte ich mich sehr herzlich für die Bereitstellung und Beschaffung von Literatur und Publikationen bedanken.

Den ehemaligen Auszubildenden als Biologielaboranten Frau Denise Nitter, Herrn Patrick Albracht, Frau Geraldine Wiese und Frau Ricarda Wurtzel danke ich nicht nur für ihre wertvolle Mitarbeit, sondern auch für die Möglichkeit durch sie und mit ihnen Erfahrungen im Bereich Anleitung und Ausbildung sammeln zu dürfen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Mitstreitern und Kollegen für ihre offene, freundliche und verständnisvolle Art danken, die mir auch in schwierigen Zeiten geholfen haben, meinen Rücken gestärkt haben und mich immer wieder aufgefangen haben. Für viele entspannende Abende jenseits aller Forschung bedanke ich mich besonders herzlich bei meinen Kollegen Herrn Dipl.-Phys. Christian Nehls, Herrn Dr. Daniel Kähler, Herrn M. Sc. Sebastian Marwitz, Herrn Dipl.-Biol. Julius Brandenburg, Herrn Dr. Göran Hübner, Herrn Dr. Kolja Schaale, Frau M. Sc. Carlotta Ober-Blöbaum und bei Frau Birte Hanisch.

Für die stete Aufmunterung und das Interesse sowie für die herzliche Aufnahme und das Vertrauen in allen Lebenslagen bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Lisa Brandenburg und Frau Walburga Brandenburg.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kolleginnen Frau Dr. Lena Heinbockel, Frau M. Sc. Annika Kopp sowie bei Frau M. Sc. Nicole Zehethofer, mit denen ich nicht nur das Vergnügen hatte, eine Bürogemeinschaft zu bilden, sondern immer Rückhalt in jeglicher Hinsicht gefunden habe. Für die gute Laune, Hilfsbereitschaft, Freundschaft und Empathie sowie für ihr Vertrauen ein herzlicher Dank. Danke Euch für die wunderbare gemeinsame Zeit!

Mein letzter und zugleich innigster Dank geht an meine Familie, meine Mutter, meinen Bruder und meinen Vater, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung diesen Weg ermöglicht haben, mich immer ermutigt haben und mir Kraft gegeben haben.

Allen Genannten gilt mein tief empfundener Dank, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. EUCHARISTO!

LEBENS LAUF

Name: Kaconis
Vorname: Yani
Staatsangehörigkeit: deutsch
geboren: 05.06.1976
Geburtsort: Hansestadt Lübeck



Promotion:

05/2009 - 09/2013: Anfertigung der Doktorarbeit am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Biophysik im Rahmen des BMBF-Projekts „Therapie von Infektionskrankheiten mit speziellem Bezug auf die bakterielle Sepsis“

Titel: Präklinische Untersuchungen zur Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit Gram-negativen Bakterien und deren Pathogenitätsfaktor Endotoxin

Zweite Hochschulausbildung:

05/2008 - 05/2009: Anfertigung der Diplomarbeit am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Biophysik

Thema: Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen zur Interaktion zwischen Lipidmembranen und antimikrobiellen Peptiden

09/2002 - 05/2009: Studium des Chemieingenieurwesens mit der Fachrichtung Biotechnologie an der Fachhochschule Lübeck mit dem Erwerb des Diploms (Dipl. Ing. (FH))

Berufsausbildung:

04/1999 - 03/2002: Ausbildung zum staatlich examinierten Krankenpfleger
am Uniklinikum Lübeck

Erste Hochschulausbildung:

10/1996 - 09/1998: Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Zivildienst:

11/1995 - 10/1996: Leistung des Zivildienstes im Städtischen Krankenhaus Priwall in
Travemünde auf der Station Innere 1

Schulausbildung:

07/1986 - 06/1995: Carl - Jacob - Burckhardt - Gymnasium zu Lübeck mit dem
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
(Abitur, Notendurchschnitt von 2,6)

Praktika:

12/2007 - 03/2008: Zweiter Teil des Praxissemesters am Institut für Physiologie an der
Medizinischen Universität zu Lübeck

07/2007 - 10/2007: Erster Teil des Praxissemesters in der Firma Porphyrin Systems GbR in
Lübeck im Bereich Forschung und Entwicklung sowie Produktion und
Qualitätssicherung

08/2003 - 09/2003: Zweiter Teil des Grundpraktikums im chemisch toxikologischen Labor
des Institutes für Rechtsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein Campus Lübeck

07/2002 - 09/2002: Erster Teil des Grundpraktikums im Qualitätssicherungslabor für
Filtersysteme der Firma Dräger Safety AG & Co. KGaA sowie
Tätigkeiten im angeschlossenen Ausbildungslabor

Zusatzqualifikation: Fachkraft für Arbeitssicherheit

Anleitung und Ausbildung von Auszubildenden am Forschungszentrum
Borstel in der Forschungsgruppe Biophysik

Werksstudent am Uniklinikum-Schleswig-Holstein Campus Lübeck:

09/2002 - 10/2008: Extrawachentätigkeit am Uniklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck (UKSH-Campus Lübeck) für die internistischen
Intensivstationen 12a1/12a sowie für die Intensivstation 23V plastische
Chirurgie Schwerbrandverletzteneinheit im Besonderen und für
periphere Stationen im Allgemeinen

PUBLIKATIONSLISTE

Originalpublikationen

1. Kowalski I, Kaconis Y, Andra J, Razquin-Olazarán I, Gutschmann T, Martínez de Tejada G, Brandenburg K: **Physicochemical and biological characterization of anti-endotoxin peptides and their influence on lipid properties.** *Protein and peptide letters* 2010, **17**(11):1328-1333.
2. Gutschmann T, Razquin-Olazarán I, Kowalski I, Kaconis Y, Howe J, Bartels R, Hornef M, Schuerholz T, Rossle M, Sanchez-Gomez S *et al*: **New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(9):3817-3824.
3. Kaconis Y, Kowalski I, Howe J, Brauser A, Richter W, Razquin-Olazarán I, Inigo-Pestana M, Garidel P, Rossle M, Martínez de Tejada G *et al*: **Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides.** *Biophysical journal* 2011, **100**(11):2652-2661.
4. de Tejada GM, Sanchez-Gomez S, Razquin-Olazarán I, Kowalski I, Kaconis Y, Heinbockel L, Andra J, Schuerholz T, Hornef M, Dupont A *et al*: **Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines.** *Curr Drug Targets* 2012.
5. Schuerholz T, Domming S, Hornef M, Dupont A, Kowalski I, Kaconis Y, Heinbockel L, Andra J, Garidel P, Gutschmann T *et al*: **Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents II. Immunological and clinical aspects.** *Curr Drug Targets* 2012.
6. Heinbockel L, Sanchez-Gomez S, Martínez de Tejada G, Brandenburg J, Kaconis Y, Hornef M, Dupont A, Marwitz S, Goldmann T, Ernst M, Gutschmann T, Schuerholz T und Brandenburg K: **Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors.** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**(3):1480-1487.

Tagungsbeiträge (Auswahl)

1. **Workshop on Scanning Probe Microscopies and Organic Materials XVII**, Bremen, Deutschland, 15. bis 17.06.2009
Poster: *Interaction of the Antimicrobial Peptide Human Beta Defensin-3 and its Derivatives with Bacteria and Reconstituted Membrane Systems of Lipids and Bacterial Lipopolysaccharides*
2. **3rd North German Biophysicists**, Borstel, Deutschland, 22.01.2010
Vortrag: *Atomic Force Microscopical Investigations on the Interaction of Lipidmembranes with Antimicrobial Peptides*
3. **7th International Conference on Innate Immunity**, Rhodos, Griechenland, 04. bis 09.07.2010
Poster: *Interaction Between Bacterial Membranes, Lipopolysaccharides and Antimicrobial Peptides Leading to new Therapeutic Treatment of Sepsis*
4. **Annual Meeting of the German Biophysical Society**, Bochum, Deutschland, 03. bis 06.10.2010
Poster: *Antimicrobial Peptides Based on LALF-Protein as new Promising Agents Against Septic Syndrome, Septic Shock and Septicaemia*
5. **39. Arbeitstagung Flüssigkristalle German Liquid Crystal Conference 2011**, Hamburg, Deutschland, 30.03. bis 01.04.2011
Vortrag: *Neutralization of Endotoxins by Antimicrobial Peptides*
6. **5th International Congress of the German Sepsis Society**, Weimar, Deutschland, 07. bis 10.09.2011
Poster: *Conformational and Morphological Investigations of Antimicrobial and Endotoxin-Neutralizing Peptides*
7. **64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V.**, Hamburg, Deutschland, 30.09. bis 03.10.2012
Poster: *Antimicrobial Peptides as a new Promising Therapeutic Treatment against Bacterial Infections*
8. **12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) Meeting**, Tokio, Japan, 23. bis 26.10.2012
Poster: *Antimicrobial Peptides as Neutralizers of Endotoxins and Promising Therapeutic Treatment against Gram-negative Induced Sepsis*

Auszeichnungen

Posterpreis

7th International Conference on Innate Immunity, Rhodos, Griechenland, 04. bis 09.07.2010

Poster: *Interaction Between Bacterial Membranes, Lipopolysaccharides and Antimicrobial Peptides Leading to new Therapeutic Treatment of Sepsis*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und ausschließlich die angegebenen Quellen verwendet wurden.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, im April 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Yani Kaonis', on a light-colored rectangular background.

Yani Kaonis