

**Die Simulation der antimikrobiellen Wirkung
ausgewählter Lantibiotika mittels kombinierter
Biosensortechniken**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katrin Christ

aus

Halle/Saale

Bonn im Mai 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerd Bendas
2. Prof. Dr. Hans-Georg Sahl

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn elektronisch publiziert (http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online). Erscheinungsjahr 2007.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
2 Theoretischer Teil	10
2.1 Die Synthese bakterieller Zellwand und therapeutische Angriffspunkte	10
2.2 Lantibiotika.....	14
2.2.1 Lantibiotika als antimikrobielle Peptide	14
2.2.2 Biosynthese der Lantibiotika	15
2.2.3 Einteilung der Lantibiotika	18
2.3 Typ A-Lantibiotika	20
2.3.1 Nisin	20
2.3.1.1 Die Struktur des Nisins	20
2.3.1.2 Wirkspektren und –mechanismen des Nisins.....	21
2.3.1.3 Kommerzieller Einsatz des Nisins.....	24
2.3.2 Gallidermin	27
2.3.3 Beispiele weiterer Typ A-Lantibiotika	28
2.4 Typ B-Lantibiotika	29
2.4.1 Mersacidin	29
2.4.1.1 Die Struktur des Mersacidins.....	29
2.4.1.2 Wirkspektren und -mechanismen des Mersacidins.....	30
2.4.2 Actagardine	31
2.4.3 Cinnamycin und Duramycin	32
2.5 Zwei-Peptid-Lantibiotika	32
2.5.1 Lacticin 3147	32
2.5.1.1 Die Struktur des Lacticin 3147	32
2.5.1.2 Wirkspektren und –mechanismen des Lacticin 3147	34
2.5.1.3 Kommerzieller Einsatz des Lacticin 3147	35
2.5.2 Andere Zwei-Peptid-Lantibiotika.....	35
2.6 Bisherige Untersuchungstechniken zur Charakterisierung der Lantibiotikawirkung	36
2.7 Biosensoren.....	37
2.8 Quarzmikrowaage	39
2.8.1 Theoretische Grundlagen.....	39
2.8.2 Vor- und Nachteile der QCM	44

2.8.3	Anwendung der QCM	45
2.9	Zyklische Voltammetrie	46
2.9.1	Theoretische Grundlagen.....	46
2.9.2	Anwendung der CV	49
2.10	Zielstellung der Arbeit	50
3	Materialien und Methoden	51
3.1	Verwendete Chemikalien	51
3.2	Quarzkristalle und deren Reinigung	52
3.3	Beschichtung der Quarzkristalle	52
3.3.1	Selfassembling.....	52
3.3.2	Langmuir-Blodgett-Technik.....	53
3.4	Quarzmikrowaage	55
3.5	Zyklische Voltammetrie	57
3.6	Bildgebende Verfahren	59
3.6.1	FRAP.....	59
3.6.2	AFM	60
3.7	Lantibiotika, andere Peptide und Lipid II	60
3.8	Statistik.....	61
4	Ergebnisse und Diskussion	62
4.1	Die Untersuchung des Lantibiotikums Nisin.....	62
4.1.1	Die Bestimmung der kinetischen Bindungsparameter	62
4.1.2	Die Bestimmung von absoluten Frequenz- und Dämpfungsänderungen	66
4.1.3	Bildgebungsverfahren zur Charakterisierung der Nisinwirkung	71
4.1.4	CV-Untersuchungen zur Beobachtung nisininduzierter Porenbildung.....	73
4.2	Mersacidin	78
4.2.1	Die Bestimmung von absoluten Frequenzänderungen und Bindungskonstanten.....	78
4.2.2	Die CV-Analyse zur Beobachtung möglicher Permeabilitätsänderungen.....	81
4.3	Gallidermin	83
4.3.1	Das Verhalten von Gallidermin an DOPC-Membranen	83
4.3.2	Der Einfluss verkürzter Modellmembranen auf die Wirkung von Gallidermin	88
4.3.3	Der Einfluss verzweigt-kettiger Phospholipide auf die Wirkung von Gallidermin	91
4.4	Lacticin 3147	102
5	Zusammenfassung.....	108

Literaturverzeichnis	111
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	123
Danksagung	126
Erklärung.....	127
Lebenslauf	128
Publikationsliste	129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
AFM	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
AMP	antimikrobielles Peptid
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AviCys	S-Aminovinyl-D-cystein
AviMeCys	S-Aminovinyl-D-methylcystein
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CV	Zyklische Voltammetrie (cyclic voltammetry)
Dha	Didehydroalanin
Dhb	Didehydrobutyrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
DPoPC	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
et al.	und andere (et alii)
FBP	Folat-Bindungsprotein
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
GC	Gaschromatografie
Gl.	Gleichung
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GRAS	generally recognized as safe
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Lan	Lanthionin
Ltn	Lacticin
LSM	Laser-Rastermikroskop (laser scanning microscope)
mDAP	meso-Dipimelinsäure
MeLan	Methylanthionin
MHK	minimale Hemmkonzentration

MRSA	methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MW	Molekulargewicht
NBD-PE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PL3	1- <i>O</i> -Hexadecyl-2-[12-Methyl]-Palmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
PL5	1- <i>O</i> -Hexadecyl-2-[α -Hexyl]-Palmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Pyrophosphat
PRP	penicillinresistente Pneumokokken
QCM	Quarzmikrowaage (quartz crystal microbalance)
RNA	Ribonukleinsäure
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (Surface Plasmon Resonance)
Tab.	Tabelle
UDP	Uridindiphosphat
VRE	vancomycinresistente Enterokokken
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel
ZZuIV	Zusatzstoffzulassungsverordnung

Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den Drei-Buchstaben-Abkürzungen nach IUPAC-Regeln. Alle verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem.

1 Einleitung

Nach Angaben aus dem Jahr 2004 ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Mehr als 59.000 Menschen erliegen jährlich den Folgen einer Infektion durch außer Kontrolle geratene Bakterien oder andere Mikroorganismen. Weltweit sind Infektionskrankheiten nach Aussagen der Weltgesundheitsorganisation WHO die häufigste Todesursache. Dass Mikroorganismen, darunter vor allem Bakterien, sich derartig unkontrolliert vermehren können, hat seine Ursachen auch in der steigenden Resistenzentwicklung gegen antimikrobielle Substanzen. Seit Mitte der achtziger Jahre ist in Deutschland eine Zunahme der Resistenz zu verzeichnen. Mittlerweile existieren resistente Bakterienstämme gegen fast alle gängigen Antibiotika. Problematisch ist dabei zum einen das Auftreten multiresistenter Keime, wie methicillinresistente Stämme von *Staphylococcus aureus*. Im Jahr 2004 lag die Resistenzrate von *S. aureus*-Stämmen in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum bei 22,6%. Ein zweites Problem liegt darin, dass die Resistenz gegenüber Reserveantibiotika wie Vancomycin stetig steigt. Da sich die Entwicklung und Ausbreitung bakterieller Resistenzen fortsetzen wird, ist es dringend notwendig, neue Antibiotika zu entwickeln.

Zur Entwicklung neuer Antibiotika gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können bestehende Arzneistoffe weiterentwickelt werden. Darüber hinaus können neue Substanzen entwickelt werden, die an bereits bekannten bakteriellen Zielstrukturen angreifen können. Eine letzte Möglichkeit ist die Suche nach neuen Zielstrukturen und die Entwicklung von daran angreifenden Antibiotika.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Substanzklasse der Lantibiotika. Dabei handelt es sich um antimikrobiell wirkende Substanzen, die in die Synthese der bakteriellen Zellwand als bereits bekannter und oft genutzter Zielstruktur eingreifen. Die antimikrobielle Aktivität umfasst verschiedene Mechanismen. Eine genaue Kenntnis dieser Mechanismen ist die Grundlage für die mögliche Entwicklung neuartiger antimikrobieller Substanzen, die auf dem Wirkprinzip der Lantibiotika beruhen. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkmechanismen von Lantibiotika. Im Wesentlichen kommen dabei zwei Biosensortechniken zum Einsatz. Einzelne Schritte im Wirkprozess der Lantibiotika werden detailliert mit Hilfe der Quarzmikrowaage und der Zyklischen Voltammetrie unter *in vitro*-Bedingungen simuliert. Dabei werden Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern der Lantibiotika sowie die Abhängigkeit der Wirkintensität von den Gegebenheiten des Wirkorts herausgearbeitet. Es wird gezeigt, dass die beiden Biosensortechniken sich hinsichtlich der Untersuchung der Wirkmechanismen der Lantibiotika ideal ergänzen.

2 Theoretischer Teil

2.1 Die Synthese bakterieller Zellwand und therapeutische Angriffspunkte

Die bakterielle Zellwand hat mehrere Funktionen zu erfüllen. Neben der äußeren Formgebung des Mikroorganismus und der Kommunikation mit der Umgebung schützt sich das Bakterium außerdem vor Noxen sowie der osmotischen Druckdifferenz zwischen dem Innenraum und der äußeren Umgebung. Kernelement der bakteriellen Zellwand ist das Peptidoglykan, ein dreidimensionales Netzwerk aus Polysacchariden und quervernetzten Peptidketten. Während das Peptidoglykan grampositiver Bakterien aus bis zu 40 Schichten mit einer Gesamtdicke von 15 - 80 nm besteht, sind es bei gramnegativen Bakterien nur wenige Schichten mit einer Dicke von 2 nm [1]. Bei der Suche nach antibakteriellen Wirkstoffen ist die Zellwand als Angriffspunkt hervorragend geeignet, da sie eine unter den Lebewesen einzigartige Komponente darstellt, die für das Überleben der Bakterien essentiell ist.

Abbildung 1 zeigt den prinzipiellen Ablauf der Synthese des dreidimensionalen Peptidoglykans. Die Synthese umfasst mit dem Zytosol, der bakteriellen Membran und der Zellwand drei Zellkompartimente. Zunächst wird in einem im Zytosol lokalisierten sechsstufigen Prozess N-Acetylmuraminsäure (MurNAc, Abb. 2A) gebildet und mit einer Pentapeptidkette verknüpft. Die Peptidkette hat bei grampositiven Bakterien die Sequenz L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Abb. 2C). Bei gramnegativen Bakterien ist das L-Lysin durch meso-Dipimelinsäure (mDAP, Abb. 2D) ersetzt [2].

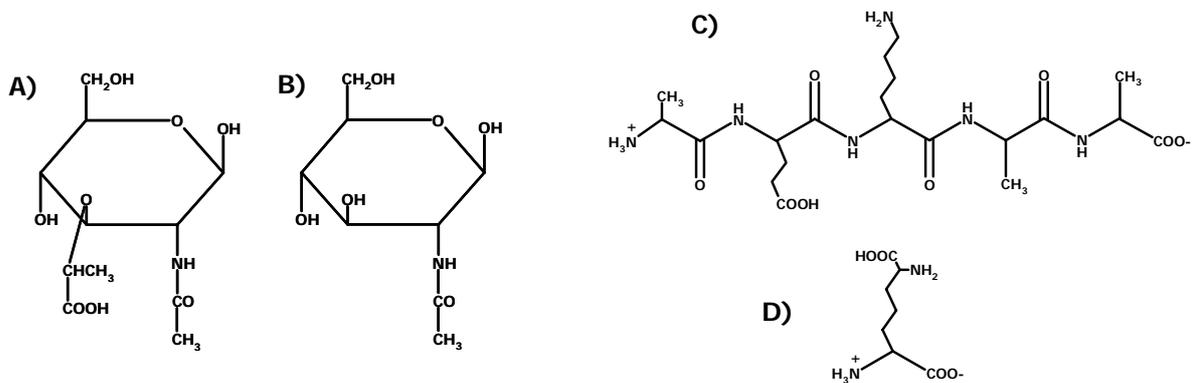


Abbildung 2: Die Strukturen der Bestandteile der bakteriellen Zellwand. A) N-Acetylmuraminsäure. B) N-Acetylglucosamin. C) Pentapeptidkette aus L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala in grampositiven Bakterien. D) In gramnegativen Bakterien ist L-Lys durch mDAP ersetzt.

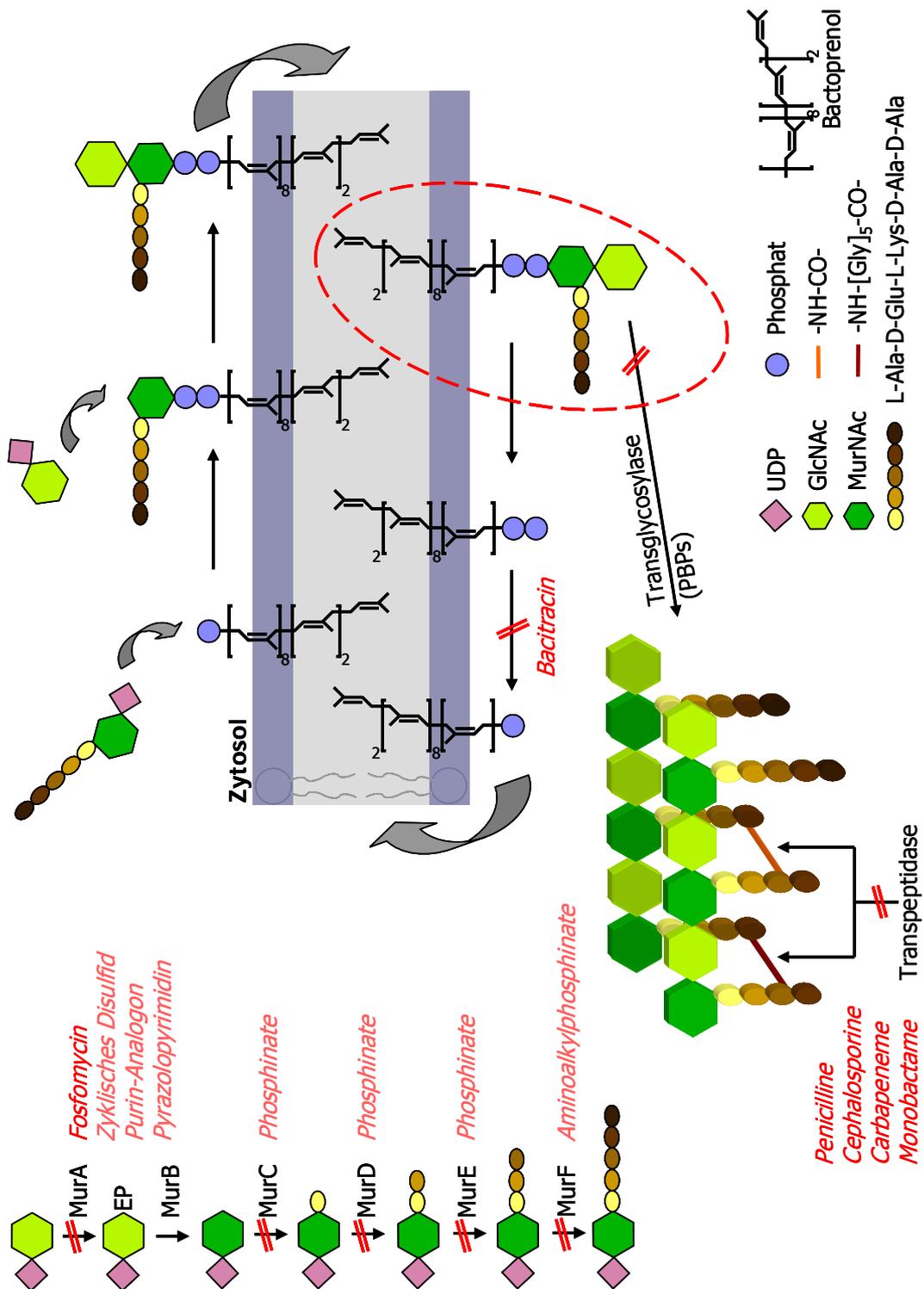


Abbildung 1: Die bakterielle Zellwandsynthese und mögliche Angriffspunkte (ohne Lipid II), modifiziert nach [2, 3]. Ausgangspunkt ist eine im Zytosol ablaufende mehrstufige Synthese des N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptids (MurNAc-Pentapeptid). Dieses wird an der dem Zytosol zugewandten Seite der bakteriellen Membran auf dort verankertes Bactoprenylphosphat übertragen, es entsteht Lipid I. Die Zellwandvorstufe Lipid II (rot umrandet) wird durch Übertragung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) vervollständigt und über einen bisher unbekanntes Mechanismus zur Außenseite der Membran transportiert. Dort kommt es unter Mitwirkung der Transglycosylase zur Polymerisierung der GlcNAc-MurNAc-Pentapeptid-Monomere. Abschließend werden die Peptidketten untereinander direkt oder über eine Pentaglycineinheit verknüpft und das dreidimensionale Netzwerk der bakteriellen Zellwand vervollständigt. In der Abbildung sind mögliche Angriffspunkte einzelner Syntheseschritte und bisher entwickelte Hemmstoffe rot dargestellt. Kommerziell eingesetzte Hemmstoffe sind farblich stärker hervorgehoben.

Das entstandene MurNAc-Pentapeptid wird anschließend zur Membran transportiert, auf dort verankertes Bactoprenylphosphat übertragen und bildet das sogenannte Lipid I. Nach Übertragung eines weiteren Zuckers, in diesem Fall N-Acetylglucosamin (GlcNAc, Abb. 2B), bildet sich Lipid II, das als Transporter von Peptidoglykan-Monomeren einen essentiellen Funktionsträger der Zellwandsynthese repräsentiert.

Über bisher nicht bekannte Mechanismen wird das Lipid II zur Außenseite der Membran transportiert und die GlcNAc-MurNAc-Pentapeptideinheit in einer durch die Transglycosylierungs-Einheit penicillinbindender Proteine (PBP) vermittelten Reaktion auf schon bestehende Peptidoglykanstränge übertragen. Das verbleibende Bactoprenylpyrophosphat wird einfach dephosphoryliert und wieder durch die Membran zur zytosolischen Seite transportiert. Die am MurNAc angeknüpften Peptidketten werden abschließend untereinander und Transpeptidase-katalysiert sowie unter Abspaltung des endständigen D-Alanins entweder durch die direkte Ausbildung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren oder unter Ausbildung einer zusätzlichen Pentaglycinkette verknüpft [3].

In Abbildung 1 sind mögliche Angriffspunkte für antibakterielle Substanzen innerhalb der Zellwandsynthese rot markiert. Es besteht die Möglichkeit, die beteiligten Enzyme direkt zu inaktivieren oder deren Funktion über die Komplexierung der jeweiligen Substrate zu inhibieren. Für fast alle an der MurNAc-Pentapeptid-Synthese beteiligten Enzyme existieren Substanzen, die als Enzymhemmer beschrieben werden, aber nur zum Teil auch antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Bisher hat lediglich Fosfomycin aus *Streptomyces*-Arten als MurA-Hemmer Eingang in die antibiotische Therapie gefunden [2].

Eine der prominentesten Targetstrukturen ist die Transpeptidase, deren verschiedene Inhibitoren in der Antibiotika-Therapie weit verbreitet sind. Penicilline [4], Cephalosporine [5], Carbapeneme und Monobactame [6] hemmen die Verknüpfung der Peptidketten untereinander. Infolgedessen wird die Zellwand instabil und durchlässig für intrazelluläre Substanzen.

Das aus *Bacillus*-Arten gewonnene zyklische Polypeptid Bacitracin hemmt den Rücktransport des membranständigen Bactoprenylphosphates durch Bindung an dessen Pyrophosphatgruppe [7].

Die vielleicht interessanteste Zielstruktur innerhalb der Zellwandsynthese stellt der GlcNAc-MurNAc-Pentapeptidtransporter Lipid II dar (Abb. 3). Grampositive Bakterien besitzen im Durchschnitt nur etwa $2 \cdot 10^5$ Moleküle Lipid II je Zelle [8], was gering erscheint, betrachtet man den Umfang des Peptidoglykans und die Notwendigkeit, die Zellwand permanent zu erneuern. Die Anzahl an Lipid II ist jedoch ausreichend, da es in seiner Funktion als Transporter immer wieder zurückgewonnen und erneut an die Membraninnenseite gebracht wird. Umso effektiver ist es, die Verfügbarkeit des Lipid II, beispielsweise durch

dessen Blockade, zu minimieren. Das Bakterium wäre nicht mehr in der Lage die Zellwand auszubilden und könnte nicht überleben. Außerdem erscheint die Gefahr der Ausbildung von Resistenzen durch Mutation am Lipid II relativ gering, da die Bakterienzelle so ihren eigenen lebensnotwendigen Transporter verändern würde.

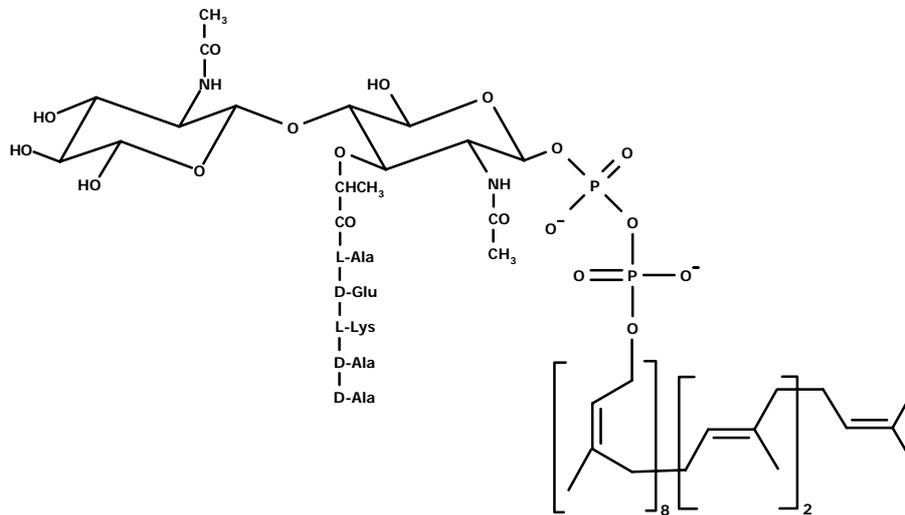


Abbildung 3: Die Struktur des Lipid II. GlcNAc und MurNAc-Pentapeptid sind über Pyrophosphat (PP) an Bactoprenol gebunden und werden in dieser Form durch die Membran transportiert.

Glykopeptide sind kommerziell eingesetzte antimikrobielle Substanzen, die am Lipid II angreifen. Die als Antibiotika der letzten Reserve vor allem gegen multiresistente Stämme eingesetzten Vertreter Vancomycin und Teicoplanin blockieren das Lipid II durch Bindung der beiden endständigen Aminosäuren (D-Ala-D-Ala) des MurNAc-Pentapeptids [9, 10]. Die steigende Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin durch Austausch des N-terminalen D-Ala gegen D-Lac oder D-Ser macht jedoch die Entwicklung neuer Glykopeptidantibiotika notwendig. Vielversprechende Ansätze sind mit den Substanzen Dalbavancin, Telavancin und Oritavancin gegeben, die sich zum Teil in Phase III der klinischen Prüfung befinden [8]. Eine weitere neue Gruppe von Glykopeptiden stellen die aus *Streptomyces*-Arten gewonnenen Manno-peptimycine dar, die wie die bisher vorgestellten Glykopeptide die Transglykosylierung hemmen [11]. Das strukturell mit Lipopeptidantibiotika verwandte Ramoplanin hemmt neben der Polymerisierung des Peptidoglykans auch die Umwandlung von Lipid I zu Lipid II [12]. Andere potenziell Lipid II bindende zyklische Substanzen sind Katanosine aus Cytophagen und Plusbacine aus *Pseudomonas*, die beide möglicherweise über die Bindung an die Pyrophosphatgruppe wirken [8].

Eine weitere Substanzgruppe, die im Zusammenhang mit Lipid II genannt werden muss und im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, sind die Lantibiotika. Für einige Vertreter der Lantibiotika wurde eine antimikrobielle Wirkung durch die Interaktion mit Lipid II nachgewie-

sen. Aufgrund struktureller Gegebenheiten wird für ca. zwei Drittel der Lantibiotika eine solche Interaktion vermutet. Die Gruppe der Lantibiotika soll im Folgenden näher betrachtet werden.

2.2 Lantibiotika

2.2.1 Lantibiotika als antimikrobielle Peptide

Lantibiotika gehören zur umfangreichen Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMP). AMPs sind ein Teil des Immunsystems fast aller Lebewesen und werden oft kurz nach Kontakt mit Pathogenen produziert. Bisher wurden ca. tausend AMPs aus Wirbeltieren, Wirbellosen, Pflanzen, Bakterien und Pilzen isoliert. Beispiele für antimikrobielle Peptide sind Cecropine der Fruchtfliege, Ponericidine der Ameise, Tachyplesine aus Krabben, sowie α - und β -Defensine und Cathelicidine aus Wirbeltieren [13]. Fast allen dieser Substanzen sind ihre Größe (< 10 kDa), positive Nettoladung, Hydrophobie und ihr Wirkmechanismus gemeinsam. Hauptangriffspunkt der meisten AMPs ist die Zellmembran der Zielorganismen. Ab einer bestimmten Konzentration können alle Peptide über unspezifische Wirkmechanismen die Integrität der Membran zerstören [14]. Dabei kommt es zunächst zur Depolarisierung der Membran, gefolgt von einer Permeabilisierung und der irreversiblen Schädigung der Zelle [15]. Allerdings existieren zunehmende Vermutungen, dass die Interaktion mit der Zellmembran nicht der einzige Wirkmechanismus der AMPs ist. Daneben kann es auch zur Hemmung von Zellwand- und Nukleinsäuresynthese sowie von Enzymaktivitäten kommen [16]. Das dafür notwendige Penetrieren der Substanzen in die Zelle stellt dabei aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der AMPs kein Problem dar. Von bakteriellen Organismen ribosomal produzierte antimikrobielle Peptide werden als Bakteriozine bezeichnet. Viele Bakteriozine werden von Milchsäurebakterien produziert. Ihre ursprüngliche Einteilung erfolgte nach Klaenhammer in vier Klassen [17]. **Klasse I** umfasst kleine (< 5 kDa), membranaktive Peptide, die die ungewöhnlichen Aminosäuren Lanthionin (Lan), Methyllanthionin (MeLan), Didehydroalanin (Dha) und Didehydrobutyrin (Dhb) enthalten (= Lantibiotika). In **Klasse II** sind kleine (< 10 kDa), hitzestabile, nicht lanthioninhaltige membranaktive Peptide zusammengefasst, die amphiphile Helices bilden und in drei Untergruppen eingeteilt sind. Peptide, die gegen Listerien aktiv sind, bilden die Klasse IIa (Pediocine [18]), Zweikomponentenpeptide die Klasse IIb (Lactococcin $G_{\alpha/\beta}$, Leucococcin $H_{\alpha/\beta}$, Plantaricin JK und EF [19]) und schwefelaktivierte Peptide die Klasse IIc (Lactococcin C, Plantaricin A [20]). Letztere benötigen reduzierte Cysteinreste für ihre Aktivität. Die **Klasse III** bilden große (> 30 kDa) hitzelabile Proteine (Helveticin J, Enterolysin A [18]) und die **Klasse IV** komplexe Bakteriozine, die zusätzliche Lipid- oder Kohlehydrat-

komponenten aufweisen [21].

Eine aus dem Jahr 2005 stammende Neueinteilung der Bakteriozine fasst die Verbindungen in nur noch zwei Gruppen zusammen [22]. Die jetzt aktuelle Einteilung beinhaltet lanthioninhaltige und nicht lanthioninhaltige Bakteriozine (Klasse I und II). Die frühere Klasse III bildet aufgrund ihrer lytischen Wirkung eine eigene Klasse, die Bakteriolytine. Da bisher Nachweise für die Existenz von Klasse IV Bakteriozinen fehlen, wurde diese Gruppe ganz gestrichen.

2.2.2 Biosynthese der Lantibiotika

Lanthioninhaltige Antibiotika (kurz: Lantibiotika) wurden danach benannt, dass sie seltene Aminosäuren wie Lanthionin und Methyllanthionin enthalten, die durch posttranslationale Modifikationen gebildet werden. Die an der Biosynthese beteiligten Gene sind in Genclustern organisiert und chromosomal (Subtilin, Mersacidin [23]) oder auf mobilen Elementen wie Transposons (Nisin) oder Plasmiden (Epidermin, Lacticin 3147) lokalisiert [24, 25]. Allgemein werden die Gene mit *lanX* und die Proteine, für die sie codieren, mit *LanX* bezeichnet. Trotz grundsätzlich ähnlichem Aufbau der Gencluster gibt es Unterschiede in der Anordnung der einzelnen Gene. Dass sie sich auch innerhalb natürlicher Varianten unterscheidet, zeigt sich am Beispiel zweier Nisinvarianten [26]:

Gencluster NisinA: nis**A**-nis**B**-nis**T**-nis**C**-nis**I**-nis**P**-nis**R**-nis**K**-nis**F**-nis**E**-nis**G**

Gencluster NisinU: nsu**P**-nsu**R**-nsu**K**-nsu**F**-nsu**E**-nsu**G**-nsu**A**-nsu**B**-nsu**T**-nsu**C**-nsu**I**

Die an Ribosomen lokalisierte Synthese beginnt mit der Freisetzung eines Präpeptids, das durch das Strukturgen *lanA* codiert wird. Das Präpeptid besteht aus einer sogenannten Leadersequenz und einem C-terminalen Teil, der die Vorstufe des eigentlichen Lantibiotikums ausmacht. Die Leader-Sequenz umfasst 23 - 59 Aminosäuren und kann innerhalb der Lantibiotika stark variieren. Zur exakten Funktion dieser Sequenz existieren mehrere Vermutungen. Zum einen wird angenommen, dass das Peptid durch Kopplung an seine Leadersequenz in einer inaktiven Form gehalten wird. Zum anderen ist es denkbar, dass das C-terminale Ende durch die Leadersequenz konformell so präsentiert wird, dass die anschließenden Modifikationen korrekt ausgeführt werden können [27, 28].

Die im C-terminalen Bereich des Präpeptids vorhandenen Aminosäuren Serin, Threonin und Cystein werden im zweiten Schritt der Biosynthese modifiziert [25]. Das Gen *lanB* codiert relativ große (~ 1000 Aminosäuren), überwiegend hydrophobe Peptide mit wenigen hydrophilen Bereichen, von denen man weiß, dass sie membranassoziiert sind. Unklar ist,

ob sie in die Membran integriert oder nur an diese angelagert sind. LanB wirkt als Dehydrase und katalysiert die Dehydrierung von Serin und Threonin zu Didehydroalanin und Didehydrobutyrin. In sterisch günstiger Position liegende Cysteinreste werden anschließend durch LanC in einer nukleophilen Michael-Addition an Dha bzw. Dhb angelagert, die Zyklisierung führt zu den charakteristischen Aminosäuren Lanthionin und Methyllanthionin (Abb. 4) [29].

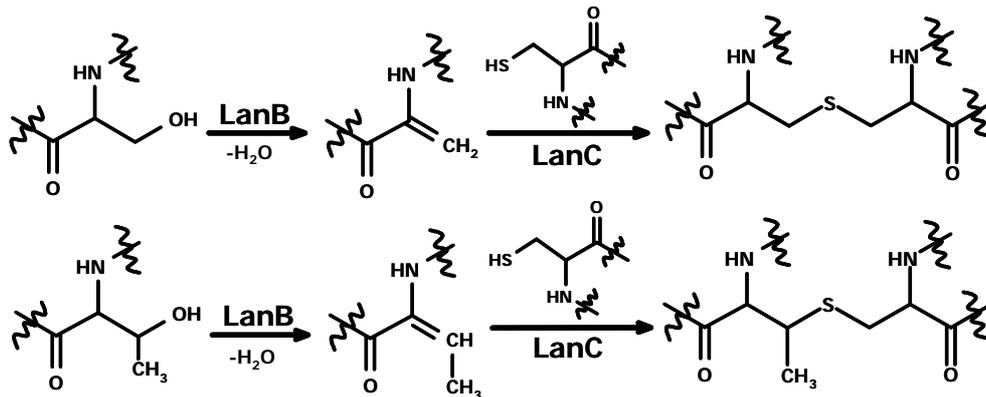


Abbildung 4: Die posttranslationalen Modifikationen des Präpeptids. In einem ersten Schritt werden Serin (obere Reihe) und Threonin (untere Reihe) durch LanB dehydriert. An die entstandene Doppelbindung wird, durch LanC katalysiert, ein in der Nähe befindliches Cystein addiert. Dabei entstehen Lanthionin und Methyllanthionin. Die Funktionen von LanB und LanC können auch in einem Enzym (LanM) vereinigt sein.

LanC ist eine durch lanC codierte Zyklase, die zwischen 398 und 455 Aminosäuren groß ist, konservierte Cystein- und Histidinreste trägt und aus alternierenden hydrophilen und hydrophoben Bereichen besteht. In einigen Lantibiotika findet man die Funktion von LanB und LanC in einem Molekül, LanM, vereinigt. Von lanM codiert, umfasst LanM zwischen 900 und 1000 Aminosäuren und zeigt 20 - 27% Sequenzidentität zu LanC. Es wird angenommen, dass der fast identische C-Terminus des LanM die Aufgaben der Zyklase übernimmt. Ähnlichkeiten des N-Terminus zu LanB existieren jedoch nicht [30]. LanM benötigt zur Entfaltung seiner vollen Aktivität Magnesiumionen und ATP [31]. LanB, LanC und LanM sind nicht die einzigen in die posttranslationalen Modifikationen involvierten Enzyme. Es existieren auch Enzyme wie LanP, die die oxidative Decarboxylierung des C-Terminus von z.B. Mersacidin (MerD 194 Aminosäuren) und Epidermin (EpiD 181 Aminosäuren) katalysieren [32, 33]. Dabei entstehen S-Aminovinyl-D-cystein (AviCys) oder S-Aminovinyl-D-methylcystein (AviMeCys) (Abb. 5).

Weitere mögliche Modifikationen sind Lysinoalanin und Erythro-3-hydroxyaspartamsäure [24]. Nach kompletter Modifikation muss die Leadersequenz abgespaltet und das vollständig generierte Propeptid aus der Zelle transportiert werden. Zur Spaltung dient LanP, ein

Homologes der Serin-Protease aus 266 bis 682 Aminosäuren. Der Transport erfolgt durch LanT, einen ABC-Transporter aus 500 bis 600 Aminosäuren mit vier membranassoziierten Domänen [25]. Zum Schutz des Produzenten vor dessen eigenem Lantibiotikum existieren Gene zur Codierung von Immunitätsprozessen. Die Proteine LanI und LanFEG sind membranassoziiert. Sie minimieren die Lantibiotikakonzentration an der Zelloberfläche durch Abtransport bzw. Aufnahme in die Zelle und anschließenden Abbau.

Eine Besonderheit im Gencluster zeigen die Lantibiotika Nisin, Subtilin und Mersacidin. Sie enthalten zusätzlich LanK und LanR, die an der für diese Lantibiotika typischen Autoregulation der Biosynthese beteiligt sind. Die extrazelluläre Domäne der membrangebundenen Kinase LanK (380 bis 480 Aminosäuren) erkennt das Lantibiotikum als spezifisches Signalmolekül und es kommt zur Autophosphorylierung eines Histidins im C-terminalen Bereich der Kinase. Die Phosphatgruppe wird auf den N-terminalen Bereich der Regulase LanR übertragen. Es kommt zu einer Konformationsänderung im C-Terminus des LanR. Diese wiederum bewirkt entsprechend der Konzentration des Lantibiotikums in der äußeren Umgebung der Zelle eine Aktivierung bzw. Deaktivierung des Transkriptionsprozesses [25].

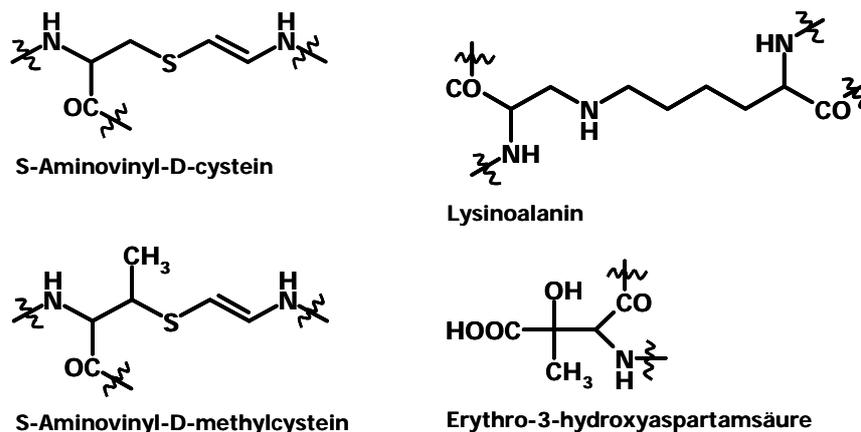


Abbildung 5: Weitere in Lantibiotika vorkommende modifizierte Aminosäuren neben Lan und MeLan.

Wie für Nisin gezeigt, erfolgt die Biosynthese der Lantibiotika in Abhängigkeit von den Wachstumsphasen der Bakterien [34]. Zu Beginn der Wachstumsphase sind nur schwache Nisinkonzentrationen zu messen. Während der exponentiellen Phase steigt die Produktion stark an, um am Ende der lag-Phase/Beginn der stationären Phase ein Maximum zu erreichen. Während der stationären Phase ist ein kompletter Produktionsstillstand zu verzeichnen. Die Einführung von zusätzlichen lanRK, lanI und lanFEG-Gene, nicht aber von zusätzlichen lanA-Gene kann die Produktion der Lantibiotika erhöhen [35].

2.2.3 Einteilung der Lantibiotika

Die am weitesten verbreitete Einteilung in Typ A- und Typ B-Lantibiotika basiert auf einem Vorschlag von Jung [36, 37]. Typ A-Lantibiotika sind stark kationische Peptide mit einer zwei- bis vierfach positiven Nettoladung und einem Molekulargewicht von > 2100 Da. Allen gemeinsam sind eine ähnliche lang gestreckte Gestalt und die Anordnung der intramolekularen Thioether. Die Leadersequenzen sind sehr hydrophil, stark geladen, enthalten kein Cystein und liegen in lipophiler Umgebung meist als α -Helix vor. Ihr Wirkmechanismus beruht im Allgemeinen auf membranmodifizierenden Eigenschaften, verbunden mit einer potenzialabhängigen Porenbildung.

Typ B-Lantibiotika besitzen kompakte, kugelförmige und amphiphile Strukturen, die gar nicht oder nur sehr schwach negativ geladen sind ($MW < 2100$ kDa). Die kompakte Form kommt durch eine typische Kopf-Schwanz-Verknüpfung innerhalb des Moleküls zustande. Hauptproduzenten der Typ B-Lantibiotika sind *Streptomyces*- und *Streptovorticillum*-Stämme. Die meisten Vertreter dieser Gruppe zeigen nur begrenzte antimikrobielle Eigenschaften, vornehmlich gegen *Bacillus*-Arten. Ihre Hauptwirkung beruht auf der Hemmung verschiedener Enzyme wie ACE oder die Phospholipase A2 durch Inhibierung ihrer Substrate [38]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die von Jung klassifizierten Lantibiotika.

Typ A kationisch, langgestreckt, MW > 2100 Da				
Name	Produzentstamm	MW [Da]	AS	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	3330	34	
Subtilin	<i>Bacillus subtilis</i>	3317	32	
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2164	22	
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	2164	22	
Pep5	<i>Staphylococcus lactis</i>	3488	34	
Typ B nicht bzw. schwach negativ geladen, kompakt MW < 2100 Da				
Name	Produzentstamm	MW [Da]	AS	
Cinnamycin	Arten von <i>Streptomyces</i>	2041	19	
Duramycin	Arten von <i>Streptovorticillum</i>	2012	19	
Mersacidin	Arten von <i>Bacillus</i>	1825	20	

Tabelle 1: Die Einteilung der Lantibiotika nach Jung in Typ A- und Typ B-Lantibiotika (nach Jung [36]).

Die Einteilung nach Jung unterliegt einer zunehmenden Limitierung. Schon vor einigen

Jahren war es beispielsweise schwierig, Mersacidin und Actagardine aufgrund ihrer Typ A-Anordnung der intramolekularen Ringe und gleichzeitiger kompakter Form (Typ B) eindeutig zuzuordnen [39]. Dieses Problem löste man durch die Aussage, dass die Leadersequenzen beider Vertreter eindeutig denen der Typ B-Lantibiotika ähneln und sie daher eher zu dieser Gruppe gehören [40]. Allerdings steigt die Zahl neu entdeckter Lantibiotika permanent und damit auch derer, die sich nicht eindeutig Typ A- oder Typ B-Lantibiotika zuordnen lassen. Ein zusätzliches Problem ist die Existenz kombinierter Lantibiotika, die sich aus zwei Komponenten zusammensetzen. In den letzten Jahren gab es mehrere Versuche, die bisher bekannten Lantibiotika neu zu klassifizieren. Eine Möglichkeit ist die Einteilung von Subgruppen innerhalb der Typ A- und Typ B-Lantibiotika, die auf funktionellen Charakteristika und den entsprechenden Primärsequenzen basieren [25, 30]. Die jeweiligen Untergruppen, einige Vertreter und typische Merkmale sind der folgenden Übersicht (Tab. 2) zu entnehmen:

Typ A	
Nisin-Gruppe Nisin A und Z, Subtilin	Unterschiede in der AS-Sequenz, ähnliche Verbrückungsmuster
Epidermin-Gruppe Epidermin, Gallidermin, Mutacine, Staphylococcin	N-Terminus entspricht dem der Nisingruppe, enthält AviCys
Pep5-Gruppe Pep5, Epilancin, Epicidin	Stark geladen, drei Thioetherringe, blockierter N-Terminus
Lacticin 481-Gruppe Lacticin 481, Streptococcin, Variacin, Salivaricin	Identisches Verbrückungsmuster, keine bzw. geringe Ladung bei neutralem pH-Wert, C-terminal 3 ineinander verschlungene Ringe
Zweikomponenten-Peptide Lacticin A1/A2, Cytolysin L I/s, Plantaricin α/β	
Typ B	
Mersacidin-Gruppe Mersacidin, Actagardin	Vier Thioether, davon ein C-terminales Avi-MeCys, überlappende Ringe
Cinnamycin-Gruppe Cinnamycin, Duramycin, Ancovenin, Plantaricin C	Ähnliche Verbrückung und Kopf-Schwanz-Verbindung

Tabelle 2: Die Einteilung der Lantibiotika entsprechend ihrer funktionellen Charakteristika und ihrer Primärsequenzen.

Daneben besteht die Möglichkeit, die Lantibiotika entsprechend ihrer posttranslationalen Modifikationen durch lanB und lanC oder durch lanM in zwei Klassen einzuteilen [25].

Im Folgenden sollen einige Vertreter der Lantibiotika Typ A und B näher charakterisiert werden, beginnend mit dem bekanntesten und am besten untersuchten Vertreter, dem Nisin.

2.3 Typ A-Lantibiotika

2.3.1 Nisin

2.3.1.1 Die Struktur des Nisins

Obwohl schon seit 1928 bekannt, erfolgte die komplette Strukturaufklärung des Nisins erst zu Beginn der 1970iger Jahre [41, 42]. Nisin wird von verschiedenen Stämmen *Lactococcus lactis* auf dem Wege der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Biosynthese produziert. Das Propeptid besteht aus insgesamt 34 Aminosäuren (MW 3330 Da), von denen 13 posttranslational modifiziert sind. Nisin ist in zweierlei Hinsicht als amphiphiles Molekül zu betrachten. Während man am N-Terminus gehäuft hydrophobe Aminosäuren findet, sammeln sich am C-Terminus die geladenen und hydrophilen Aminosäuren. Des Weiteren sind innerhalb der Ringdomänen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Reste vorhanden [43]. Neben dem Wildtyp Nisin A existieren drei bisher bekannte Varianten: Nisin Z, Nisin Q [44] und Nisin U [26]. Die Struktur des Nisin A und Abweichungen seiner natürlichen Varianten sind in Abbildung 6 zu sehen.

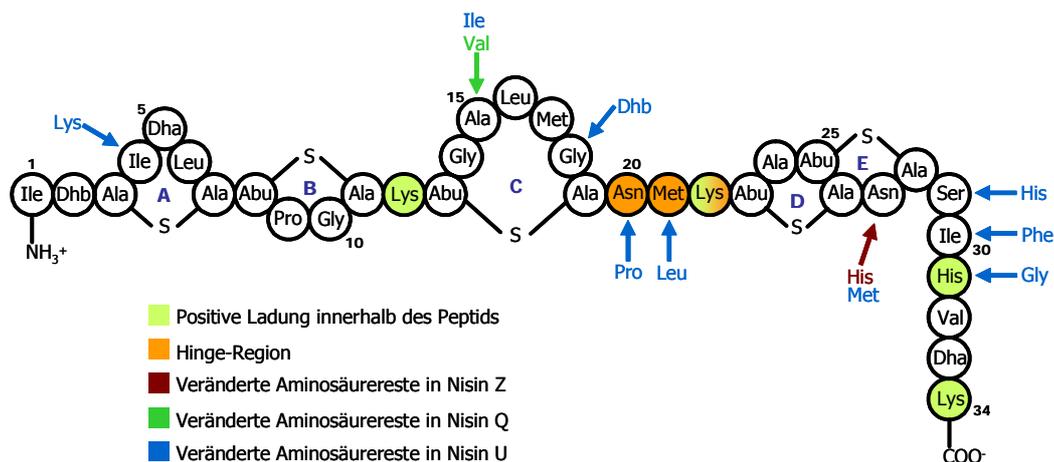


Abbildung 6: Die Strukturen des Nisin A und seiner drei natürlichen Varianten. Dargestellt sind die fünf intramolekularen Ringe, die Ladungsverteilung und die hinge-Region. In der Sequenz des Nisin U sind außer den dargestellten Änderungen die Reste 32 bis 34 nicht vorhanden.

Die Dehydrierung von Serin- und Threoninresten des Präpeptids führt zunächst zur Bildung

von drei Didehydroalaninen und fünf Didehydrobutyrinen. An insgesamt fünf der dehydrierten Reste werden benachbarte Cysteine addiert, sodass am Ende ein pentazyklisches Peptid mit einem Lanthionin und vier Methyllanthioninen entsteht.

Der N-terminale Bereich der Thioether ist D-, der C-terminale Bereich ist L-konfiguriert [36]. Nisin ist ca. 50 Å lang und hat einen Durchmesser von etwa 20 Å [21]. Das Molekül besitzt eine vierfach positive Nettoladung, bedingt durch drei Lysinreste in den Positionen 12, 22 und 34 und einen Histidinrest in Position 31 [45]. Die natürliche Variante Nisin Z enthält eine weitere positive Ladung durch den Austausch von Asp²⁷ (Nisin Wildtyp) gegen His²⁷. Zusätzlich verbleiben die restlichen drei Didehydroaminosäuren im Molekül.

Essentielle Strukturelemente des Nisins sind die Aminosäuren Dha⁵ und Val³², der C-Terminus, eine ausreichend lange bewegliche Region (hinge-Region) sowie der intakte und unveränderte Ring C [46-49]. Nisin besteht aus zwei starren Regionen, die durch die Ringe A bis C und die ineinandergreifenden Ringe D bis E gekennzeichnet sind. Die starren Bereiche sind durch eine flexible hinge-Region verbunden. Durch diese bewegliche Region sind präzise Aussagen zur Konformation des Moleküls erschwert [50]. In wässriger Lösung liegt das Molekül ebenfalls als relativ flexible Struktur vor, bildet aber bei Kontakt mit lipophiler Umgebung im Bereich der Ringe amphiphile Helices mit gegenüberliegenden hydrophoben bzw. geladenen Aminosäuren aus [21].

2.3.1.2 Wirkspektren und –mechanismen des Nisins

Nisin ist gegen ein breites Spektrum grampositiver Bakterien wirksam. Die sensiblen Organismen umfassen Stämme der Gattung *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium* sowie Sporen und vegetative Zellen von *Clostridium*- und *Bacillus*-Stämmen. Nach Schädigung der äußeren Membran wirkt Nisin auch gegen gramnegative Erreger wie *E. coli* und *Salmonella*-Stämme [38, 52]. Ohne diese Vorbehandlung sind gramnegative Bakterien gegenüber Nisin nicht sensitiv, ebenso wie Hefen und Schimmelpilze [52].

Wie bei allen antimikrobiellen Peptiden beruht auch die Wirkung des Nisins auf unspezifischen Interaktionen mit der Zellmembran des Zielorganismus. Über viele Jahre hinweg wurden dazu verschiedene targetunabhängige Modelle entwickelt. Bereits aus den Jahren der Strukturaufklärung stammende Publikationen berichteten von der Membranaktivität des Nisins gegenüber Lysosomen und der daraus folgenden Enzymfreisetzung [41]. Ursprünglich ging man von einer detergenzähnlichen Wirkung des Nisins oder einer Inaktivierung von Enzymen durch Bindung der Didehydroaminosäuren an enzymatische Sulfhydrylgruppen aus [38]. Untersuchungen aus den folgenden Jahrzehnten zeigten, dass

Nisin für die Depolarisation der Membran verantwortlich ist und durch Porenbildung deren Permeabilität erhöht. Als Folge kommt es zur Freisetzung essentieller intramolekularer Substanzen wie Ionen, kleiner Moleküle, ATP, Aminosäuren und Nukleotide sowie dem sofortigen Stopp aller Biosyntheseprozesse [39, 47, 52, 53]. Die Bildung kurzlebiger (ms-Bereich) und kleiner Poren (1 nm Durchmesser) erfolgt in potenzialabhängiger Weise mit einer im Vergleich zur Membraninnenseite positiv geladenen Außenseite [54]. In Abwesenheit anionischer Membranlipide wirkt Nisin als anionenselektiver Transporter, da es diese Substanzen durch seine positiven Ladungen gut binden kann. Durch die Anwesenheit anionischer Membranlipide ist die Fähigkeit als anionenselektiver Transporter vermindert, da das Peptid jetzt eher an die geladenen Phospholipide bindet [55]. Dass anionische Phospholipide über elektrostatische Interaktionen die Wirkung des Nisins verstärken, wurde mehrfach gezeigt. Nisin weist eine hohe Affinität zu negativ geladenen DOPG-Liposomen und eine deutlich geringere und reversible zu ungeladenen DOPC-Vesikeln auf. Lagert sich Nisin an neutrale DOPC-Membranen an, lädt sich die Oberfläche positiv auf und verhindert die Assoziation weiterer Nisinmoleküle [56]. In Mischliposomen (DOPC und DOPG) kommt es ab einem Anteil von 40% DOPG zu einem Anstieg der Aktivität, deren Optimum bei etwa 60% DOPG liegt [45, 57]. Versuche mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden zeigten eine nisininduzierte Umlagerung der Lipide innerhalb der Membran, die auch wieder vom Vorhandensein negativer Phospholipide abhängig ist [58]. Dass der geladene C-Terminus des Nisins für die Interaktion mit DOPG als erster Schritt der Porenbildung verantwortlich ist und der N-Terminus sich in die Membran einlagert, wurde mit tryptophanmodifiziertem Nisin gezeigt. Die Eindringtiefe des Nisins ist vom Anteil der negativen Membranladungen abhängig [59].

Die mögliche Permeabilisierung von Zellmembranen durch Nisin, die die Assoziation und Integration des Peptids umfasst, kann durch verschiedene Modelle beschrieben werden, die auch für andere kationische AMPs gelten [14, 16, 43, 53]. Alle Modelle sind zur Veranschaulichung schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

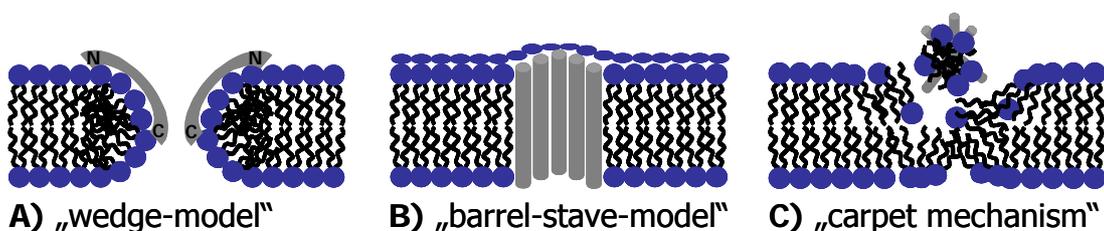


Abbildung 7: Die verschiedenen Mechanismen unspezifischer Membraninteraktionen von Lantibiotika und anderen antimikrobiellen Peptiden [nach 14, 43].

Im „**wedge**“-Modell (= „toroidal“-Modell) aggregieren die an der Membran assoziierten Peptide, lagern sich in die Membran ein, verdrängen die Phospholipide und zwingen sie dabei, sich in Richtung der Peptide zu beugen. Die Peptidmoleküle ragen keilförmig in die Membran und bilden eine mit Wasser gefüllte Pore. Die Peptide sind dabei in permanentem Kontakt mit den Kopfgruppen der Phospholipide (Abb. 7A).

Im „**barrel-stave**“-Modell lagern sich die Peptide als Bündel in die Membran ein und umschließen eine mit Wasser gefüllte Pore. Peptide und Phospholipide sind in diesem Modell senkrecht angeordnet. Der hydrophobe Teil des Peptids hat Kontakt zu den Phospholipiden, der hydrophile Teil stellt den Mantel der Pore dar. Sowohl in diesem als auch im „wedge“-Modell wird die negativ geladene Membranınnenseite als treibende Kraft für die Einlagerung kationischer Peptide angenommen (Abb. 7B).

Ein drittes Modell, der „**carpet mechanism**“, beschreibt das Phänomen, dass kationische Peptide in hohen Konzentrationen mit anionischen Phospholipiden mizellartige Komplexe bilden können und die Struktur der Membran in diesem Bereich erheblich stören (Abb. 7C).

Alle bisher gemachten Aussagen zum Wirkmechanismus des Nisins sind nicht geeignet, die ausgeprägte Diskrepanz zwischen wirksamen Konzentrationen im μM -Bereich *in vitro* und minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) im nM-Bereich *in vivo* zu erklären. Es wird angenommen, dass die deutlich geringere MHK im nM-Bereich durch die Wirkung eines an bzw. in der Membran assoziierten Targetmoleküles verursacht wird. Bereits 1973 wurde gezeigt, dass Nisin in sehr frühe Schritte der Zellwandsynthese eingreift [60, 61]. Erst 1998 allerdings wurden die Modelle für die unspezifische Nisinwirkung dahin ergänzt, dass Nisin neben der Porenbildung auch das an der Membranaußenseite befindliche Lipid II bindet und dadurch die Polymerisierung des Peptidoglykans (Kapitel 2.1) und die komplette bakterielle Zellwandsynthese hemmt [62]. Es wurde nachgewiesen, dass Lipid II im Zielorganismus dessen Sensitivität gegenüber Nisin erhöht und die Nisinringe A und B für die Bindung entscheidend sind [57]. Substanzen mit Mutationen im N-Terminus, inklusive der Ringe A bis C, zeigten eine reduzierte Bindungsfähigkeit an Lipid II und einen Mehrbedarf an Nisin, um Poren bilden zu können. Mutanten mit veränderter hinge-Region zeigten keinerlei Porenbildung. Allerdings bleibt die *in vivo*-Wirksamkeit durch unveränderte Bindung an Lipid II und Hemmung der Zellwandsynthese erhalten [46, 63]. In Gegenwart von Lipid II war auch keine Ionenselektivität der gebildeten Pore mehr zu beobachten [64]. Eine Porenbildung trat auch vollkommen unabhängig vom Vorhandensein oder der Ausrichtung eines Membranpotenzials ein [65]. Die Bindung an Lipid II erfolgt über den N-Terminus des Nisins, der C-terminale Teil ragt in die Membran und bildet die Pore. Nicht nur die Affinität zur Membran ist erhöht, auch Lebensdauer und Durchmesser der Pore nehmen zu

[66]. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass Lipid II nicht nur die Affinität von Nisin erhöht, sondern sogar integrativer Bestandteil der Pore [67] mit einer Stöchiometrie von Lipid II:Nisin von 1:2 und einem Gesamtausmaß von 4:8 ist. Es wird davon ausgegangen, dass zunächst ein 1:1-Komplex gebildet wird, der dann ein weiteres Molekül Nisin je Komplex rekrutiert [68]. Der Nisin-Lipid II-Komplex ist so stabil, dass er die Behandlung mit milden Detergenzien übersteht. Das Bindungsmotiv am Lipid II unterscheidet sich bei Nisin von dem des Vancomycins und umfasst MurNAc, PP und Teile des Isoprenyls. Die Lösungsstruktur des Komplexes zeigt im Bereich der Kontaktstellen eine gut definierte Struktur, während der nicht direkt an der Bindung beteiligte Bereich unstrukturiert vorliegt. Bei der Bindung von Nisin an Lipid II kommt es zum Umklappen des N-Terminus mit Ausnahme der Ringe A und B. Das Peptid bildet eine Art Käfig um die Pyrophosphatgruppe des Lipid II. Innerhalb dieses Käfigs kommt es zur Ausbildung von insgesamt fünf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Pyrophosphat und dem Rückgrat des Nisins [69]. Ebenfalls beteiligt ist das Isoleucin in Position 1 [70]. Dass die Ringe A und B an der Ausbildung des Käfigs beteiligt sind, erklärt die Konservierung ihrer Struktur innerhalb verschiedener Lantibiotika. Eine weitere Konservierung betrifft den hydrophoben Aminosäurerest in Position 6 des Propeptids. Eine Wechselwirkung dieses Rests mit der Isoprenylkette des Lipid II und den Membranlipiden wird vermutet.

Neben dem aus Porenbildung und Hemmung der Zellwandsynthese bestehenden dualen Wirkmechanismus des Nisins zeigt das Peptid noch weitere Wirkungen. So kann Nisin autolytische Prozesse in sensitiven Staphylokokken induzieren. Die kationischen Autolyseenzyme sind durch Bindung an anionische Teichon- und Lipoteichonsäuren inaktiviert. Bei Zugabe von Nisin werden diese Enzyme durch das Lantibiotikum verdrängt und so aktiviert. Diese Wirkung kann besonders im Kontaktbereich sich teilender Tochterzellen beobachtet werden. Die schon angesprochene Hemmung des Sporenwachstums beruht vermutlich auf der Anwesenheit des Dha⁵ im Nisin. An die Doppelbindung der dehydrierten Aminosäuren können reaktive Gruppen essentieller Wachstumsfaktoren der Sporen gebunden werden und die Sporen so inaktivieren [20, 25]. Über bisher nicht bekannte Mechanismen wirkt die Zugabe von Nisin durch Minderung der Spermienmobilität auch kontrazeptiv [71]. Eine letzte, schon in Kapitel 2.2.1 besprochene Wirkung von Nisin umfasst die Eigenschaft als Signalmolekül und die Autoregulation seiner Biosynthese.

2.3.1.3 Kommerzieller Einsatz des Nisins

Nisin wird hauptsächlich als Konservierungsmittel eingesetzt. Grundsätzliche Konservierungstechniken in der Lebensmittelindustrie umfassen die Lagerung bei geringen Tempe-

raturen, bestimmte pH-Werte, Prozeduren wie Pasteurisierung, Sterilisation und aseptische Verpackung sowie den Zusatz von Konservierungsmitteln antimykotischer, organischer und anorganischer Herkunft. Als natürlich vorkommende Substanz ist Nisin das einzige als Konservierungsmittel zugelassene Bakteriozin [19] und wird seit mehreren Jahrzehnten in mittlerweile über 50 Ländern eingesetzt. 1969 erhielt Nisin die WHO-Zulassung als antimikrobieller Zusatzstoff in Lebensmitteln und 1983 die EU-Zulassung mit der Kennzeichnungsnummer E234. In Deutschland regelt die Anlage 5 der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV) die entsprechenden Höchstmengen und Anwendungsgebiete (Tab. 3). 1988 erhielten die Nisin produzierenden Stämme und damit auch das Peptid selber den GRAS-Status (generally recognized as safe) der FDA [72]. Substanzen mit GRAS-Status werden als sicher in der Anwendung in Lebensmitteln angesehen, basierend auf historisch begründeter sicherer Anwendung vor 1958 oder auf publizierten wissenschaftlichen Erkenntnissen nach diesem Zeitraum [22]. Nisin wird den Lebensmitteln entweder als Reinsubstanz oder in Form Nisin produzierender Stämme, die zum Teil genetisch verändert sind [18], zugesetzt. Da *Lactococcus lactis* auch als Starterkultur in Fermentationsprozessen eingesetzt wird, bietet sich Letzteres geradezu an.

Die erste kommerziell erhältliche Nisinzubereitung, Nisaplin[®], wurde 1957 von der englischen Firma Aplin & Barrett eingeführt [52] und wird mittlerweile durch die Firma Danisco A/S (Kopenhagen, DK) vertrieben. Es handelt sich dabei um eine extrem stabile 2,5%ige Nisinzubereitung, die auf eine Million Einheiten je Gramm standardisiert ist. Wirkverluste bei längerer Lagerung (25°C) sind nicht zu beobachten. Die Löslichkeit steigt in saurer Umgebung. Die abnehmende Löslichkeit bei zunehmenden pH-Werten ist in Lebensmitteln nicht problematisch, da die zugelassenen Höchstmengen an Nisin noch ohne weiteres löslich sind. Nisinhaltige Lebensmittel können unter sehr geringen Wirkverlusten auch autoklaviert werden, um die Haltbarkeit der Produkte zusätzlich zu erhöhen. Beachtet werden muss, dass die Aktivität des Peptids durch proteolytische Enzyme in kalten Zubereitungen und durch Lebensmittelzusätze beeinflusst werden kann [73]. Eine weitere von Danisco hergestellte Nisinzubereitung wird unter dem Namen Novasin[™] vertrieben. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl von nisinhaltigen Lebensmitteln mit den entsprechend eingesetzten Höchstmengen des Lantibiotikums.

Lebensmittel	Anmerkung	Eingesetzte Menge Nisin
Milchprodukte Zubereitungen (Käseblöcke, -scheiben, Aufstrich, Saucen, Dips) <i>Schmelz-/Gereifter Käse</i> <i>Grieß- / Tapiokapudding</i> <i>Clotted cream</i>	Oft sind die Zutaten mit Clostridien belastet, die den Wärmeprozess überleben. Die Verhältnisse im Käse (hoher pH-Wert, hoher Feuchtegehalt) fördern zudem das Sporenwachstum.	Bei 6,25 mg/kg erfolgt eine totale Hemmung des Sporenwachstums (Lagerung bei 37°C). Setzt man dagegen nur 2,5 mg/kg ein, erreicht man eine partielle Hemmung des Sporenwachstums. <i>Max. 12,5 mg/kg (Anl. 5 ZZuIV)</i> <i>Max. 3 mg/kg (Anl. 5 ZZuIV)</i> <i>Max. 10 mg/kg (Anl. 5 ZZuIV)</i>
Joghurt	Der Einsatz von Nisin führt zu einer gewünschten Hemmung der Starterkulturen.	Die eingesetzten Mengen Nisin liegen zwischen 0,5 und 1,25 mg/kg.
Eiprodukte (pasteurisierte Flüssigprodukte wie backfertige Pfannkuchenteige o.ä.)	Die angewendete Hitzebehandlung dient der Bekämpfung von Salmonellen, Sporen überleben diesen Prozess jedoch.	Die Zugabe von 2,5-5 mg/L Nisin führt zu einem Anstieg der Haltbarkeit und Hemmung von <i>Bacillus</i> und <i>Listeria</i> .
Dosennahrung (vor allem Gemüse)	Nisin wird zur Kontrolle des thermophilen Verderbs durch Sporen von <i>Bacillus</i> und <i>Clostridium</i> eingesetzt. Eine längere Lagerung, auch bei hohen Temperaturen, wird dadurch möglich.	Gering aziden Produkten werden 2,5 bis 5 mg/kg, stark aziden 1,25 bis 2,5 mg/kg Nisin zugesetzt.
Fleisch-/Wurstwaren	Nisin soll als Alternative zum Einsatz von Nitriten dienen und das Wachstum von <i>Clostridium botulinum</i> verhindern. Dazu sind jedoch ineffektiv hohe Mengen an Nisin nötig, da Nisin durch die Proteine und Lipide im Fleisch inaktiviert werden kann.	Nisin findet trotzdem Anwendung als Zusatz in vakuumverpackten Würstchen und wird dort in einer Konzentration von 1,25 bis 6,25 mg/kg zugegeben.
Salatdressing	Hier soll, ähnlich wie bei Joghurt, das unkontrollierte Wachstum von Milchsäurebakterien eingedämmt werden.	Eingesetzt werden 2,5 bis 5 mg/L Nisin.
Alkoholische Getränke (Bier, Wein)	Problemkeime sind Stämme von <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> und <i>Leuconostoc</i> . Hefen werden durch Nisinzugabe nicht beeinflusst.	Es erfolgt der Zusatz von 0,23 bis 2,5 mg/L Nisin.

Tabelle 3: Der Einsatz von Nisin als Konservierungsmittel in verschiedenen Lebensmitteln [nach 52 und 73]. Die in Deutschland in Anlage 5 der ZZuIV aufgelisteten Begrenzungen sind kursiv gedruckt.

Die Anwendung von Nisin ist für den Menschen ungefährlich. Mangels einer bakterientypischen Zellwand, insbesondere Lipid II, bietet der Mensch keinerlei Angriffspunkte für das Peptid. Zusätzlich wird es durch Darmhydrolasen schnell abgebaut. Eine Resistenzentwicklung ist extrem selten, da Nisin in der Regel nicht am Menschen angewendet wird. Nichtsdestotrotz zeigt Nisin *in vitro*-Aktivität gegen den häufig im Magen anzutreffenden Keim *Helicobacter pylori* [52]. Die Firmen Astra und Merck haben eine kommerzielle Nisinzubereitung zur Behandlung dieses Erregers entwickelt. Die Anwendung von Nisin zur Behandlung vancomycinresistenter Enterokokken (VRE) befindet sich in der Phase präklinischer Studien [13].

Andere kommerziell verwendete Nisinprodukte richten sich gegen die hauptsächlich durch *Streptococcus uberis* ausgelöste bovine Mastitis. Dabei handelt es sich um eine Entzündung der Milchdrüsen von Kühen, die mit Leistungs- und Qualitätseinbußen der Milchproduktion einhergeht und jährlich Kosten in Milliardenhöhe verursacht. Eingesetzt werden die Produkte Consept® (Applied Microbiology Inc. New York, NY, USA) und Wipe-Out® (ImmuCell, Portland, OR, USA) [26, 74].

2.3.2 Gallidermin

Gallidermin wird von *Staphylococcus gallinarum* (isoliert aus dem Hühnerkamm) produziert und kann als natürliche Variante des Epidermins aus *Staphylococcus epidermidis* (isoliert aus humaner Epidermis) betrachtet werden. Die Struktur des Gallidermins wurde 1988 veröffentlicht [75] und ist in Abbildung 8 zu sehen.

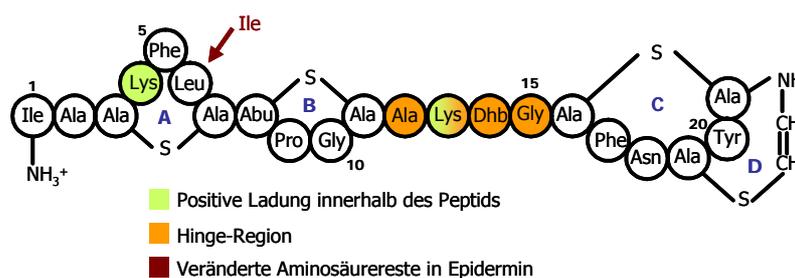


Abbildung 8: Die Strukturen des Gallidermins und seiner natürlichen Variante Epidermin. Dargestellt sind die vier Ringe des Peptids, seine Ladungsverteilung und die hinge-Region.

Es handelt sich um ein Peptid aus 22 Aminosäuren (MW 2164 Da) dessen Leu⁶ im Epidermin gegen Ile⁶ ausgetauscht ist. Die Reste 1 bis 13 bilden den wasserlöslichen, vierfach positiv geladenen N-Terminus, der die Reste 14 bis 22 umfassende C-Terminus ist lipophil und ungeladen.

Wie zu erkennen ist, sind die Ringe A und B zwischen Nisin und dem tetrazyklischen Galli-

dermin nahezu identisch. Die bewegliche Region ist im Gallidermin jedoch länger. Der vierte Ring wird durch S-Aminovinyl-D-cystein gebildet, was eine genaue Strukturanalyse dieser Region erschwert [76]. Die Ringe C und D bilden ein Doppelringssystem. Zusätzlich enthält das Molekül einen Didehydrobutyrin-Rest. Durch einen fehlenden Thioether und einen stark gekürzten C-Terminus ist das Gallidermin insgesamt nur 30 Å lang und hat einen Durchmesser von 8 bis 10 Å. Der N-Terminus mit den ersten beiden Aminosäuren ist sehr beweglich, die Reste 8 bis 11 zeigen eine β -Drehung. Der C-Terminus mit den beiden kleinen und starren Ringen C und D bildet eine Art Käfig. Innerhalb des Käfigs kommt es zur Ausbildung von starken Interaktionen zwischen Avi²² und D-Ala¹⁹. Stabile Wasserstoffbrückenbindungen finden sich zwischen Ala¹¹ und Abu⁸, vorübergehende Kontakte zwischen Leu⁶ und Phe⁵ sowie zwischen Lys¹³ und Gly¹⁰. Die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen ist stark temperaturabhängig [37]. Wie alle Lantibiotika wird Gallidermin ribosomal als in diesem Fall hydrophobes Präpeptid mit insgesamt 52 Aminosäuren synthetisiert [77]. Die Stelle der proteolytischen Spaltung umfasst die Sequenz Pro⁻²Arg⁻¹Ile¹ [78]. Ähnlich wie Nisin wirkt Gallidermin gegen ein breites Spektrum grampositiver Keime. Dazu gehören Stämme von *Staphylococcus* sowie *Streptococcus* und *Lactococcus lactis*. Die hohe Wirksamkeit gegen *Propionibacterium acnes* lässt Gallidermin als attraktiven, in präklinischen Tests befindlichen Kandidaten gegen *Acne vulgaris* erscheinen [74].

Wie durch Nisin, kommt es auch durch Gallidermin zur Bildung unspezifischer Poren in bakteriellen Membranen [38]. Aufgrund des im Vergleich zum Nisin konservierten Bereichs der ersten beiden Ringe interagiert auch Gallidermin mit Lipid II und hemmt die Synthese der bakteriellen Zellwand [79]. Um ähnlich wie Nisin eine spezifische Pore nach der Wechselwirkung mit Lipid II zu bilden, ist das Molekül zu kurz. Eine dennoch bis zu 20fach effektivere Wirkung von Gallidermin gegen *Lactococcus lactis* im Vergleich zu Nisin deutet auf weitere bisher unbekannte Wirkmechanismen hin [79]. Eine mögliche Lipid II-spezifische Porenbildung durch Gallidermin an Phospholipidmembranen mit kürzerkettigen Fettsäuren wurde in ersten Untersuchungen überprüft.

2.3.3 Beispiele weiterer Typ A-Lantibiotika

Das ebenfalls von *Staphylococcus epidermidis* produzierte **Pep5** ist das größte Typ A-Lantibiotikum. Es ist trizyklisch (1 MeLan, 2 Lan) und besitzt neben zwei zusätzlichen Dhb acht positiv geladene Aminosäuren (Abb. 9A). Der N-Terminus ist durch eine 2-Oxobutyrylgruppe blockiert [38].

Der Wirkmechanismus ist ähnlich dem des Nisins und umfasst eine unspezifische potenziell abhängige Porenbildung in bakteriellen Membranen, hat aber keine Affinität zu Lipid II

[15, 24]. Auch kann Pep5 autolytische Enzyme aktivieren [21].

Kurz nach Veröffentlichung der Struktur des Nisins wurde die des **Subtilins** aufgeklärt. Das aus 32 Aminosäuren bestehende, von *Bacillus subtilis* produzierte Peptid weist starke Ähnlichkeiten zum Nisin auf. Die fünf Thioether liegen im Vergleich zum Nisin an identischen Stellen (Abb. 9B) und umfassen ein Lanthionin und vier Methyllanthionine [36]. Obwohl die Sequenz der Aminosäuren eine andere ist, besitzen beide Peptide eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit [53]. Das Subtilin ist relativ instabil.

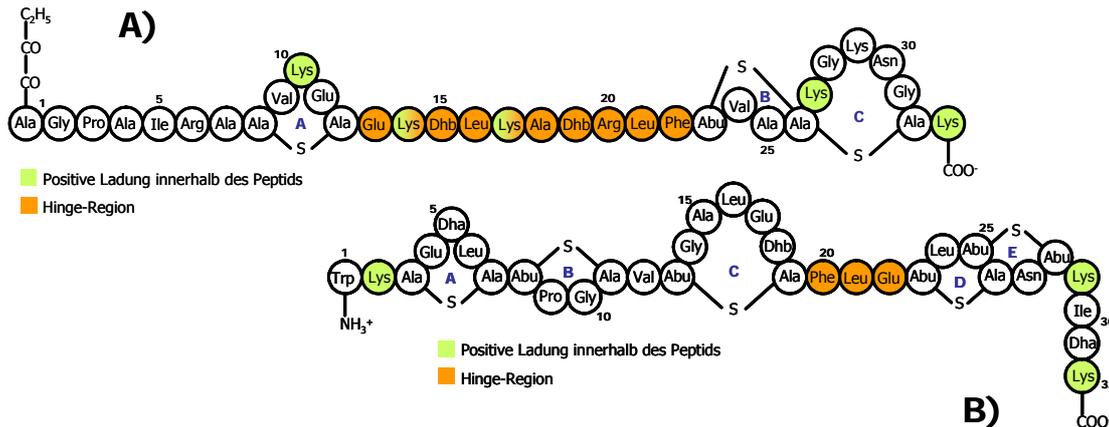


Abbildung 9: Die Strukturen von Pep5 (A) und Subtilin (B). Dargestellt sind die Ringe der Peptide, ihre Ladungsverteilung und die hinge-Regionen.

Das Wirkspektrum umfasst vegetative Zellen und Sporen grampositiver Bakterien. Subtilin zeigt außerdem eine Autoregulation seiner Biosynthese [63]. Die Sättigung des Dha⁵ führt zu einem kompletten Wirkverlust. Die hier beobachtete unspezifische Porenbildung ist im Gegensatz zu Nisin und Pep5 potenzialunabhängig. Die Pore hat einen Durchmesser von 2 nm [38]. In wässriger Lösung zeigt auch Subtilin eine recht große Flexibilität mit starren Bereichen innerhalb der Ringe [30].

2.4 Typ B-Lantibiotika

2.4.1 Mersacidin

2.4.1.1 Die Struktur des Mersacidins

Das relativ kleine Mersacidin (MW 1825 Da) umfasst 20 Aminosäuren, von denen acht posttranslational modifiziert sind (Abb. 10). Neben der Sequenz des Propeptids enthält das Präpeptid eine 48 Aminosäuren lange, 12fach geladene Leadersequenz, die α -helikale Strukturen zeigt und kein Cystein enthält [40]. Drei Methyllanthionine und ein C-terminales 2-Aminovinyl-D-2-methylcystein bilden im Propeptid insgesamt vier Ringe. Mersacidin lässt

sich in drei Domänen einteilen: Die Aminosäuren 1 bis 3 mit der eher ungewöhnlich kurzen Thioetherbrücke zwischen den Positionen 1 und 2, die Aminosäuren 4 bis 12 und die Aminosäuren 13 bis 20 des C-Terminus. Das Molekül ist hydrophob, insgesamt ungeladen und besitzt einen zusätzlichen Dha-Rest. Durch den AviCys-Rest entsteht eine gewisse, wenn auch nicht vollständige, Kopf-Schwanz-Verknüpfung innerhalb des Moleküls, welche es kompakt erscheinen lässt. Die kompakte Struktur schützt das Molekül vor Angriffen durch Proteasen [80]. Die Struktur des Mersacidins in Methanol zeigt ein starres Molekül mit nach außen gerichteten neutralen Seitenketten, was die schlechte Wasserlöslichkeit dieser Verbindung erklärt. Die hydrophobe Oberfläche wird nur von den Seitenketten des Glu¹⁷ und der Glycine sowie der $-NH_3^+$ -Gruppe des Ala¹ durchbrochen. Letztere bildet mit der Seitenkettencarboxylgruppe des Glu¹⁷ unter Zurückklappen des N-Terminus eine Wasserstoffbrücke aus [81].

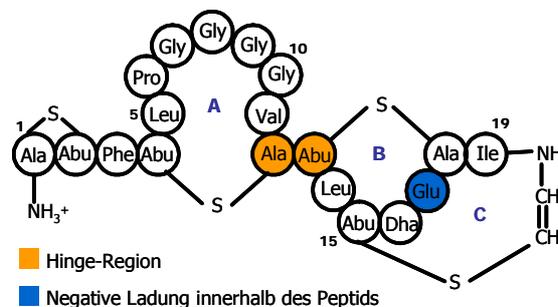


Abbildung 10: Die Struktur des Mersacidins. Dargestellt sind seine Ringe, die Ladungsverteilung und die bewegliche Region.

Auch für das Mersacidin existieren Mutanten zur Charakterisierung essentieller Aminosäuren [23]. Es wurde nachgewiesen, dass Gly¹⁷ für die Wirkung erforderlich ist. Der Austausch des Dha¹⁶ gegen Ile führte zu einem Wirkverlust. Dagegen führt der Austausch eines Aromaten (Phe³) gegen einen Aliphaten (Leu³) an Position drei nur zu einer geringfügig verminderten antimikrobiellen Aktivität.

2.4.1.2 Wirkspektren und -mechanismen des Mersacidins

Von *Bacillus*-Arten produziert, ist Mersacidin wirksam gegen viele grampositive Keime der Arten *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus* sowie gegen *Propionibacterium acnes* [63, 82]. Es zeigt keine Effekte auf ruhende Organismen, eine Wirkung zeigt sich erst während der Wachstumsphase in der nächsten Generation. Die Wirksamkeit ist mit der von Vancomycin vergleichbar und teilweise sogar besser [38]. Erwähnenswert ist vor allem eine signifikante *in vivo*-Aktivität gegen

multiresistente *S. aureus*-Stämme [40, 83] und VRE. Die Wirkung gegen resistente Stämme spiegelt auch die klinische Relevanz dieses Lantibiotikums wider. Der Wirkmechanismus umfasst keine Porenbildung, auch bleiben DNA- und RNA-Synthese unbeeinflusst. Die Behandlung mit Mersacidin führt zu einer deutlichen Abnahme der Zellwanddicke, was auf eine Inhibition der Zellwandbiosynthese hindeutet [82]. Konsequente Untersuchungen zeigten, dass Mersacidin nicht die Lipid II-Synthese, aber die Polymerisierung des Peptidoglykans hemmt. Die Wirkintensitäten von Mersacidin und Vancomycin sind sehr ähnlich. Die daraus resultierende Annahme, dass auch Mersacidin an das Lipid II bindet, wurde bestätigt. Die Wirkung des Mersacidins hängt somit auch stark von der Präsenz des Lipid II ab. Die Zugabe von isoliertem Lipid II antagonisiert die Peptidwirkung [84]. Da Mersacidin auch gegen VRE wirksam ist, muss es aber eine andere Bindungsstelle als Vancomycin am Lipid II besitzen [80]. Die Interaktion mit der Pyrophosphat-Disaccharid-Einheit gilt als wahrscheinlich [63]. Die Wirkung des Mersacidin ist stark vom Vorhandensein von Calciumionen abhängig. Vermutet wird eine Brückenfunktion der zweifach geladenen Ionen zwischen Lipid II und dem Gly¹⁷ [85], wodurch auch erklärt würde, warum Mersacidin trotz fehlender kationischer Nettoladung an Lipid II binden kann.

2.4.2 Actagardine

Aus *Actinoplanes*-Stämmen isoliert, ist dieses Lantibiotikum das einzige, dessen C-terminales MeLan oxidiert ist und eine Sulfoxidgruppe enthält (Abb. 11).

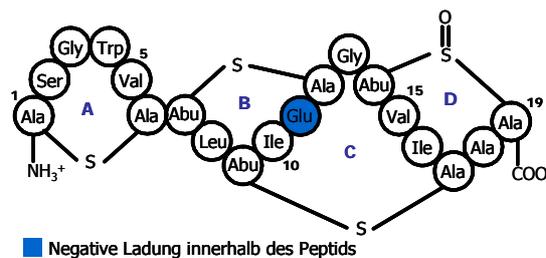


Abbildung 11: Die Struktur des Actagardine. Dargestellt sind die Ringe des Peptids und seine Ladungsverteilung. Bei diesem Molekül ist keine hinge-Region vorhanden.

Es enthält insgesamt vier Ringe, zwei weitere MeLan und ein Lan [38]. Die Ringe sind stärker überlappend, was zu einer kompakten Form des Moleküls führt. Der Ring B des Actagardine und der Ring C des Mersacidins sind identisch und werden als essentielles Bindungsmotiv beider Lantibiotika angesehen [8, 25]. Die Wirkung von Actagardine ist analog der des Mersacidins.

2.4.3 Cinnamycin und Duramycin

Cinnamycin (Abb. 12) und Duramycin sind als ursprüngliche Typ B - Lantibiotika entsprechend der Einteilung nach Jung zu betrachten. Die beiden Peptide weisen fast identische Strukturen auf und werden ausschließlich von *Streptomyces*- und *Streptovercillum*-Arten gebildet [36, 38]. Es handelt sich um kompakte, meist neutrale, amphiphile Polypeptide mit einem Molekulargewicht < 2100 Da. Zusätzlich zu den drei Thioethern besitzen fast alle Moleküle eine Überbrückung durch LysN-Ala [53]. Viele von ihnen enthalten ein Hydroxyaspartat. In lipophilen Lösungsmitteln liegen sich hydrophile und lipophile Aminosäuren gegenüber. Durch die extreme Kopf-Schwanz-Verbindung sind die Peptide sehr rigide. Eine U-förmige Anordnung wird durch den beweglichen Pro⁹-Rest möglich [38].

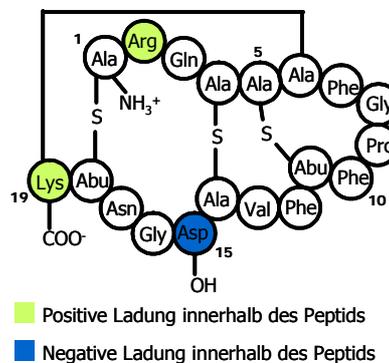


Abbildung 12: Die Struktur des Cinnamycins. Dargestellt sind die Ringe des Peptids und seine Ladungsverteilung. Bei diesem Molekül ist keine hinge-Region vorhanden.

Die Peptide zeigen nur geringe antimikrobielle Aktivitäten. Die Hauptwirkung beruht auf der Hemmung von Enzymen durch Komplexbildung der Substrate [53]. Während Duramycin die Phospholipase A2 durch Bindung an Phosphoethanolamin hemmt, hat Cinnamycin einen zusätzlichen Einfluss auf das Angiotensin-Converting-Enzym und das Herpes-simplex-Virus 1 [36]. Einer potenziellen klinischen Anwendung, insbesondere des Cinnamycins, beispielweise in der Bluthochdruck- und Herpes simplex-Behandlung oder im Entzündungsgeschehen, steht die beobachtete Lyse roter Blutkörperchen entgegen [24].

2.5 Zwei-Peptid-Lantibiotika

2.5.1 Lacticin 3147

2.5.1.1 Die Struktur des Lacticin 3147

Die bisher vorgestellten Lantibiotika entfalten ihre volle Wirksamkeit als Einzelkomponenten. Daneben gibt es innerhalb der Bakteriozine auch einige Verbindungen, in denen zwei Komponenten für die volle Aktivität notwendig sind. Die Wirkung der Einzelpeptide ist da-

bei deutlich schwächer als die der Kombination oder gar nicht vorhanden. Zwei-Komponenten-Bakteriozine finden sich in Lantibiotika und Nicht-Lantibiotika. Bei den Nicht-Lantibiotika zeigen die Komponenten eines Paares untereinander Sequenz- und Strukturhomologien. Das erste bekannte Zwei-Komponenten-Bakteriozin ist Lactococcin G (α und β), das für seine Wirkung gegen Milchsäurebakterien und Clostridien äquimolare Mengen der Einzelpeptide benötigt. Thermophillin 13 (A und B) ist ein Beispiel dafür, dass die Einzelpeptide geringe Eigenwirkungen zeigen können. Die alleinige Wirkung des Thermophillin 13 A wird durch die Anwesenheit der B-Komponente deutlich verstärkt. Ein deutlicher Überschuss der B-Komponente hemmt die Wirksamkeit [19].

Der Lacticin 3147 (Ltn 3147) produzierende *Lactococcus lactis*-Stamm wurde ursprünglich aus irischem Kefir isoliert [86]. Die Einzelpeptide werden mit Lacticin 3147 A1 und A2 bezeichnet und sind in Abbildung 13 dargestellt.

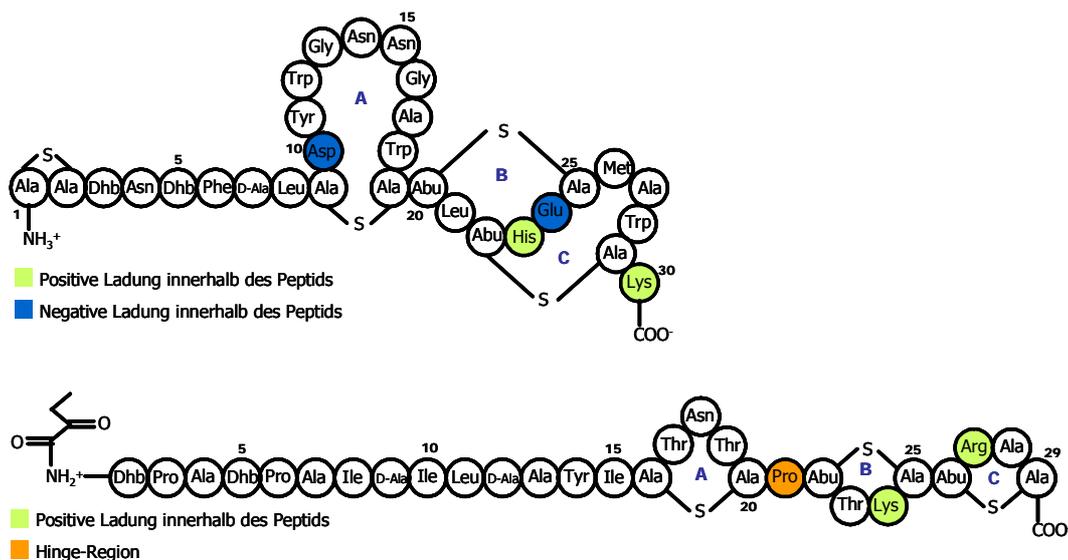


Abbildung 13: Die Struktur des Lacticin 3147. Dargestellt sind die Einzelpeptide Lacticin A1 (oben) und Lacticin A2 (unten) mit ihren Ringen, der Ladungsverteilung und die bewegliche Region des Lacticin A1.

Lacticin A1 (Ltn A1) besteht aus 30 Aminosäuren (MW 3306 Da) mit insgesamt 4 Ringen (zwei Lan, zwei MeLan) und zwei zusätzlichen Dhb. Der Ring A überbrückt, ähnlich wie im Mersacidin nur die ersten beiden Aminosäuren. Auch die anderen drei, am C-Terminus lokalisierten Ringe zeigen starke Ähnlichkeiten zum Mersacidin, weshalb dieses Peptid den Typ B-Lantibiotika zuzuordnen ist. In wässriger Lösung liegt Ltn A1 gut strukturiert und in globulärer Anordnung vor. In Methanol existiert es als eher ungeordnetes und aggregiertes Molekül [87].

Lacticin A2 (Ltn A2) besteht aus 29 Aminosäuren (MW 2847 Da) mit insgesamt drei Ringen

(ein Lan, zwei MeLan) und ebenfalls zwei zusätzlichen Dhb. Am N-Terminus besitzt dieses Peptid eine α -Deaminierung. Die Ringe A, B und C zeigen starke Ähnlichkeiten mit Nisin. Aufgrund dieses Verbrückungsmusters und seiner langgestreckten Form wird es den Typ A-Lantibiotika zugeordnet. Im Vergleich zu Nisin hat Ltn A2 jedoch einen deutlich längeren N- und einen stark verkürzten C-Terminus [87]. Charakteristisch für beide Peptide ist das Vorhandensein von D-Ala, das vermutlich aus L-Ser und dessen Dehydrierung zu Dha mit anschließender Reduktion und Sättigung entstanden ist [88]. Beide Peptide sind hitzestabil und bieten gegenüber Nisin den entscheidenden Vorteil, dass sie auch bei physiologischem pH-Wert die volle Aktivität besitzen [86].

Die Synthese der Präpeptide und die posttranslationalen Modifikationen erfolgen durch zwei LanM-Enzyme, jeweils eines für jedes Einzelpeptid. Baut man in das plasmidcodierte Gencluster zusätzliche lanRK, lanI und lanFEG ein, kann man eine verstärkte Produktion von Lacticin beobachten [35].

2.5.1.2 Wirkspektren und –mechanismen des Lacticin 3147

Lacticin besitzt ein breites Wirkspektrum, u.a. gegen *L. lactis*, Stämme von *Listeria*, *Clostridium* und *Bacillus* [86, 89], aber auch gegen *Propionibacterium* und klinisch relevante Problemstämme wie methycillinresistente *S. aureus* (MRSA), VRE und penicillinresistente Pneumokokken (PRP) [87].

Zunächst wurde beobachtet, dass Ltn 3147 membranaktiv ist und einen Einfluss auf die intrazellulären ATP-, Kalium- und Phosphatkonzentrationen, das Membranpotenzial und den pH-Gradienten hat [86]. Der Kaliumverlust wurde auf die Bildung membrandurchspannender Poren zurückgeführt, die gegenüber Kalium und Phosphat als ionenselektiv anzusehen sind. Die Abnahme des ATP-Spiegels geht dagegen auf intrazelluläre Hydrolyse zurück.

In der kombinierten Anwendung zeigen beide Einzelpeptide MHKs von 7 nM, was die Annahme einer 1:1-Stöchiometrie der Ltn A1/A2-Wirkung fördert. Die volle Wirksamkeit der Kombination erreicht man nur, wenn man mit Ltn A1 vorinkubiert und dann erst Ltn A2 hinzugibt oder beide Peptide zeitgleich induziert. Gibt man dagegen erst Ltn A2 und dann Ltn A1 zum Zielorganismus, ist keine Wirkung zu beobachten. Die Untersuchung der Einzelpeptide zeigt keine Aktivität des Ltn A2. Ltn A1 hingegen liefert MHK_{50} -Werte von 200 nM (MHK_{50} Nisin: 50 nm). Somit wird deutlich, dass Ltn A1 auch als Einzelpeptid wirksam ist, dessen Effektivität durch die Anwesenheit von Ltn A2 verstärkt wird [72].

Die Strukturähnlichkeit des Ltn A1 zu Mersacidin und dessen Wirksamkeit bei alleiniger Anwendung deuten auf eine Bindung an Lipid II und die Hemmung der bakteriellen Zell-

wandsynthese hin. Das Molekül scheint zu kurz zu sein, um die Zellmembran permeabilisieren zu können und braucht dafür Ltn A2. Bestätigt werden diese Vermutungen durch Freisetzungsversuche an Liposomen. Unter der Zugabe der Einzelpeptide kam es auch in hohen Konzentrationen zu keiner Permeabilisierung. Erst die Kombination von Ltn A1 und Ltn A2 führte zu einer 80%igen Freisetzung des eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffes. Die Tatsache, dass die Freisetzung bei Lipid II-freien Liposomen oder solchen mit Bacitroprenolpyrophosphat deutlich geringer ausfiel, zeigt, dass Ltn 3147 wirklich Lipid II targetiert. Untersuchungen mit Hilfe der Tryptophan-Fluoreszenzspektroskopie zeigen, dass Ltn A1 in Anwesenheit von Ltn A2 tiefer in die Membran eindringt. Nach einem Modellvorschlag von Wiedemann *et al.* umfasst die Lacticin 3147-Wirkung einen dreistufigen Mechanismus [90]. Der erste Schritt ist die Anlagerung und Bindung des Ltn A1 an Lipid II über ein dem Mersacidin ähnliches Bindungsmotiv. Diese Bindung stabilisiert oder induziert eine Konformation des Ltn A1-Lipid II-Komplexes, die die nachfolgende Anlagerung des Ltn A2 erlaubt. In einem dritten Schritt nimmt das Ltn A2 nach Bindung eine transmembranäre Anordnung ein, und es kommt zur Porenbildung. Die Poren haben eine Lebenszeit von einigen Millisekunden und einen Durchmesser von 0,6 nm.

2.5.1.3 Kommerzieller Einsatz des Lacticin 3147

Da Ltn 3147 selber aus Starterkulturen der Kefirproduktion isoliert wurde, veränderte man andere Starterkulturen gentechnologisch so, dass sie dieses Lantibiotikum produzieren. Mittlerweile existieren 25 solcher Stämme, die alle den GRAS-Status besitzen und die Qualität von Milchprodukten, ähnlich wie Nisin, kontrollieren sollen. Wie Nisin dämmen sie das Wachstum von Listerien ein, kontrollieren aber auch das Wachstum von Nicht-Starter-LABs, die bei unkontrolliertem Wachstum durch Bildung von Calciumlactatkristallen die Qualität von Käse stark beeinträchtigen können [89]. Ltn 3147 existiert auch als Pulverzubereitung, die für die Säuglingsnahrung eingesetzt werden kann. Durch die Wirksamkeit von Ltn 3147 bei neutralem pH-Wert stellt dieses Peptid eine echte Alternative zu Nisin dar.

Tiermedizinisch wird Ltn 3147 in Kombination mit mechanischen Barrieren aus Paraffin zur Behandlung boviner Mastitis eingesetzt und reduziert die Anzahl pathogener Keime in der Milch. „Teat Seals[®]“ der Firma Cross Vetpharm Group Ltd. (Dublin, Irland) ist eine tiermedizinische lacticinhaltige Zubereitung, die im Handel erhältlich ist [22].

2.5.2 Andere Zwei-Peptid-Lantibiotika

An dieser Stelle soll nur ein grober Überblick über weitere Verbindungen der Zwei-Peptid-

Lantibiotika gegeben werden [19].

Cytolysin besteht aus Cytolysin L' und S' mit 44 bzw. 27 Aminosäuren. Die Präpeptide L und S sind 68 und 63 Aminosäuren lang. Beide Propeptide besitzen eine blockierende Gruppe am N-Terminus. **Staphylococcin C55** aus Stämmen von *S. aureus* besteht aus den Peptiden α und β und ist gegen 120 andere Stämme *S. aureus*, inklusive multiresistenter Stämme wirksam. **Plantaricin W (Plw)** aus *Lactobacillus plantarum* besteht aus den Propeptiden α und β mit 30 (MW 3225 Da) und 22 (MW 3207 Da) Aminosäuren, die im Verhältnis 1:1 wirken. Eine Besonderheit beim Plw α ist das Vorhandensein von einem Serin und zwei Cysteinen, die nicht posttranslational modifiziert wurden. Die Präpeptide weisen Homologien zu Ltn 3147 und Staphylococcin C55 auf. Plw ist gegen viele grampositive Bakterien unabhängig vom Konzentrationsverhältnis der Einzelpeptide wirksam, u.a. gegen Stämme von *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* und *S. aureus*. Die Einzelpeptide zeigen keine Wirksamkeit [91].

2.6 Bisherige Untersuchungstechniken zur Charakterisierung der Lantibiotikawirkung

Sowohl die Wirkspektren, als auch die Wirkmechanismen und Strukturen des Nisins und anderer Lantibiotika wurden bisher mittels verschiedener Techniken untersucht. Die einfachste Variante zur Charakterisierung des Wirkspektrums ist die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber sensitiven Bakterienstämmen [45, 47-49, 59, 83, 92]. Wirkverlust oder -verstärkung modifizierter Lantibiotika können so ermittelt werden. Für Aussagen zur Konformation gelöster Lantibiotika oder der Peptid-Lipid II-Komplexe werden NMR-Messungen als gebräuchliche Methode eingesetzt [37, 69, 81, 87, 93]. Untersuchungen zum Wirkmechanismus wurden überwiegend an Lipidvesikeln durchgeführt, die aus zwei oder mehreren Phospholipidschichten bestehen. Die Lipidvesikel dienen dabei als Modellmembranen. Unabhängig von anderen Organellen der Bakterienzelle kann damit auf Mechanismen an und in der Zellmembran fokussiert werden. Hinsichtlich ihrer Lipidzusammensetzung können die Lipidvesikel variiert werden und erlauben damit Aussagen zu Phospholipid-Einflüssen auf die Wirkmechanismen der Lantibiotika. Um die Wechselwirkung der Peptide mit möglichen spezifischen Targetstrukturen wie Lipid II zu untersuchen, werden diese Strukturen in die Modellmembranen eingebaut. Der Einfluss der Peptide auf die verschiedenen Membranen wird über die Freisetzung von vesikulär eingeschlossenen Verbindungen verfolgt. Typischerweise werden dafür Ionen, radiomarkierte Substanzen und Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Auf diese Weise lassen sich neben Wirkmechanismen und essentiellen Strukturelementen der Wildtyp-Lantibiotika auch diverse genetisch

veränderte Peptide oder Peptidfragmente untersuchen [45, 46, 54, 55, 67, 79, 90]. Neben Freisetzungsversuchen aus Vesikeln zur Aufklärung der Wirkmechanismen bedient man sich aber auch anderer Methoden wie beispielsweise der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC). Grundlage sind auch hier verschiedene Lipidvesikel, zu denen das interessierende Peptid pipettiert wird. Gemessen wird die Intensität der Wechselwirkung zwischen Peptid und Modellmembran über die veränderliche Enthalpie des Systems. Der Wärmegehalt verändert sich dabei proportional zur Intensität der Wechselwirkung. Über die Bestimmung von Bindungsisothermen lassen sich mit dieser Methode auch Gleichgewichtsbindungskonstanten bestimmen [56].

Um die Orientierung der Peptide in den Membranen und die Anordnung der Phospholipide und Targetstrukturen selber näher zu charakterisieren, bedient man sich radio- oder fluoreszenzmarkierter Lipide, Peptide und Targetstrukturen [58, 67, 68]. Durch Beobachtung der markierten Substanzen kann man beispielsweise ihre Positionen in der Membran verfolgen oder den Peptid-Lipid II-Komplex hinsichtlich Aufbau und Porenstöchiometrie charakterisieren. Eine interessante Methode, um Peptide innerhalb der Membranen zu lokalisieren, ist der Austausch von Aminosäuren gegen Tryptophan und die Messung der veränderten Fluoreszenz dieser Mutanten in Gegenwart der Membran [59, 66].

In Studien zur Untersuchung des Lantibiotika-Einflusses auf die Zellwandsynthese wurden markierte Zwischenstufen des Syntheseweges verwendet [61, 82].

Anhand all dieser Methoden lassen sich, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, viele Erkenntnisse über die Struktur und die Wirkungsweise der Lantibiotika gewinnen. Ein Nachteil der Freisetzungsversuche ist, dass nur Endzustände ausgewertet werden können. Welche Veränderungen sich während der Peptidwirkung ergeben, lässt sich nur schwer verfolgen. Untersuchungen zur Gewinnung kinetischer Parameter sind rar, die existierenden Methoden beschränken sich auf die Ermittlung der Gleichgewichtsbindungskonstante. Da sich die Gleichgewichtsbindungskonstante der Peptid-Membran-Interaktion aber aus mehreren Einzelprozessen zusammensetzt, ist die Anwendung zusätzlicher Methoden notwendig. In der vorliegenden Arbeit kommen dafür verschiedene Biosensortechniken zum Einsatz, die im Folgenden näher vorgestellt werden.

2.7 Biosensoren

Entsprechend der IUPAC-Definition sind Biosensoren in sich geschlossene ganzheitliche Einheiten, die spezifische quantitative oder semiquantitative Informationen unter Verwendung eines biologischen Erkennungssystems, das in direktem Kontakt mit einem elektrochemischen Wandler steht, liefern [94]. Die Vorteile der Biosensoren liegen klar auf der

Hand. Sie sind relativ preisgünstig, arbeiten schnell, und die Proben sind mit wenig Aufwand vorzubereiten. Ihre hohe, durch ihre Substratspezifität gegebene Selektivität und die Möglichkeit der Echtzeitanalyse machen sie zu attraktiven Kandidaten in der klinischen Praxis [95]. Die beiden Kernelemente von Biosensoren sind der Biorezeptor und der Wandler (Transducer). Der Biorezeptor nutzt biologische Mechanismen zur Erkennung des Analyten. Biorezeptoren können in fünf Hauptgruppen unterteilt werden [96]: (1) Antikörper und Antigene, (2) Enzyme, (3) Nukleinsäuren, (4) zelluläre Strukturen und Zellen sowie (5) Biomimetika. Der Begriff Biomimetika umfasst genetisch hergestellte Moleküle, künstliche Membranen und molekulare Abdrücke. Nach Interaktion des Analyten mit dem entsprechenden Biorezeptor wird das entstehende Signal auf den Wandler übertragen, der es in eine messbare Größe umwandelt. Auch hier lassen sich entsprechend des zugrundeliegenden Messsystems Klassifizierungen vornehmen. Am häufigsten findet man elektrochemische und optische Wandler. Elektrochemische Wandler basieren auf Änderungen im Stromfluss (Amperometrie), der Spannung (Potenziometrie) oder der Leitfähigkeit (Konduktometrie). An dieser Stelle soll das vielleicht prominenteste Beispiel das Prinzip der Biosensoren noch einmal verdeutlichen. Der Glukosesensor zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut kombiniert einen enzymatischen Biorezeptor mit einem amperometrischen Wandler (Abb. 14).

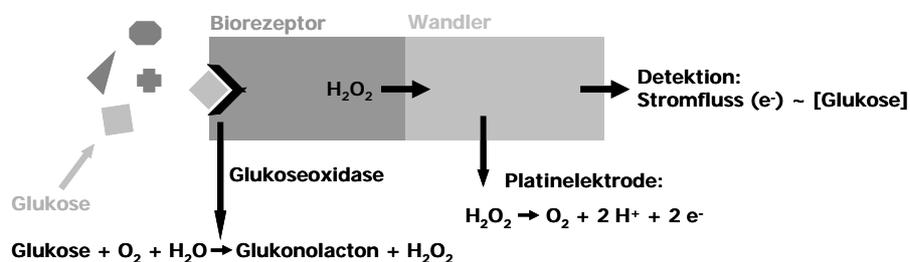


Abbildung 14: Der Aufbau eines Biosensors mit seinen Hauptkomponenten Biorezeptor und Wandler am Beispiel des Glukosesensors.

Die Glukose wird durch die auf einer Elektrode immobilisierte Glukoseoxidase umgesetzt. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode reduziert und der auftretende Stromfluss, der sich proportional zur Glukosekonzentration verhält, durch einen amperometrischen oder potenziometrischen Wandler registriert und aufgezeichnet [97].

Auch das Antibiotikum Penicillin lässt sich potenziometrisch bestimmen. Die auf einer pH-sensitiven Elektrode immobilisierte Penicillase hydrolysiert das Penicillin. Das dabei freigesetzte Proton wird über die Elektrode erfasst [98].

Optische Wandler beruhen auf der Messung von absorbiertem oder emittiertem Licht als Folge der Bioreaktion. Beispielsweise wurden auf der Surface-Plasmon-Resonance (SPR) basierende Biosensoren entwickelt, mit denen HIV-1 Proteasehemmer identifiziert und charakterisiert werden können [99]. Fluoreszenzmarkierte Proteine als Teil des Biorezeptors sind weit verbreitet in der Untersuchung einer Vielzahl von zellulären Prozessen [100]. Neben elektrochemischen und optischen Wandlern existieren auch solche, die Wärmeveränderungen während der Reaktion des Analyten registrieren (kalorimetrische Transducer), sowie massesensitive Wandler (piezoelektrische Transducer), die zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Die in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden Biosensoren nutzen biomimetische Erkennungssysteme. Als Transducer werden ein elektrochemisches und ein massesensitives Prinzip verwendet, die beide im Folgenden näher erläutert werden sollen.

2.8 Quarzmikrowaage

2.8.1 Theoretische Grundlagen

Das Kernstück der Quarzmikrowaage (engl.: quartz crystal microbalance, QCM) sind dünne, scheibenförmige Quarzkristalle mit piezoelektrischen Eigenschaften.

Als Piezoeffekt wird das Auftreten von messbaren Ladungsverschiebungen infolge mechanischer Beanspruchung in Kristallen ohne Symmetriezentrum bezeichnet. Die Verformung von Kristallen durch ein externes elektrisches Feld heißt inverser piezoelektrischer Effekt. Die am häufigsten verwendeten AT-Quarzkristalle zeichnen sich durch eine hohe Temperaturstabilität aus. Sie werden in einem Winkel von $35,10^\circ$ bis $35,15^\circ$ zur optischen Achse aus Quarzkristallen geschnitten (Abb. 15 A). Auf Ober- und Unterseite der Quarze werden Elektroden aufgedampft, an die eine Wechselspannung angelegt wird. Das entstehende externe elektrische Feld führt zu einer Verschiebung der Ionen in jeder Elementarzelle des Kristalls. Die Summe der Ladungsverschiebungen führt zu einer Verformung des gesamten Kristalls, der Quarz schwingt [101-103]. Während der Teilchenbewegung verschieben sich die einzelnen Schichten des Quarzes gegeneinander, ohne dass es zu einer Deformation innerhalb dieser Schichten kommt. Man spricht in diesem Fall von Scherschwingungen oder vom Schwingen im Dickenschermmodus (Abb. 15 B). Die laterale Amplitude des schwingenden Quarzes beträgt 1 bis 2 nm.

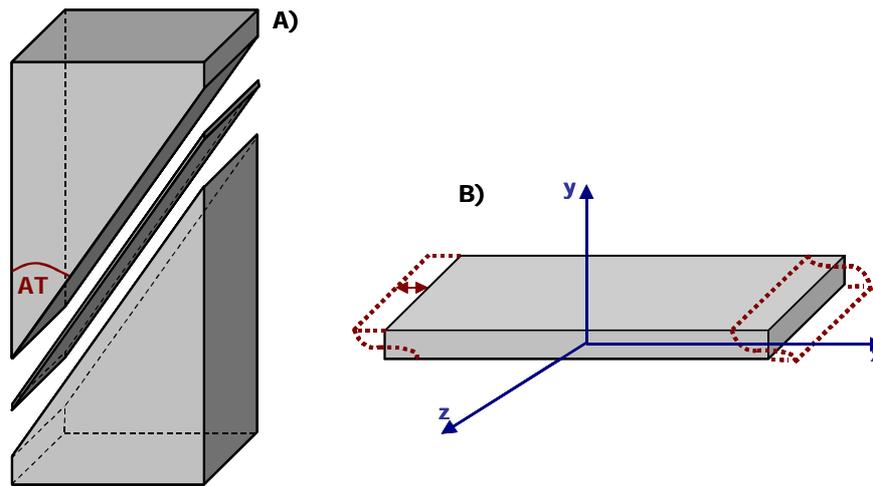


Abbildung 15: Herstellung und Funktionsweise von Quarzkristallen. A) Die besonders temperaturunabhängigen AT-Quarzkristalle werden in einem Winkel von $35,10^\circ$ bis $35,15^\circ$ zur optischen Achse aus dem Kristall geschnitten. B) Die Quarze sind auf Ober- und Unterseite mit Elektroden beschichtet. Durch ein extern angelegtes elektrisches Feld wird der Quarzkristall zum Schwingen angeregt. Die Anregungsrichtung entlang der y-Achse verläuft dabei senkrecht zur Schwingungsrichtung des Quarzes (x-Achse). Bei der entstehenden Scherschwingung kommt es zur Verschiebung der Quarzschichten gegeneinander ohne Verformungen innerhalb der Schichten.

Die Grundfrequenz f des Quarzkristalls entspricht seiner Resonanzfrequenz und hängt von der Dicke des Quarzes d und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Transversalwelle v_{tr} ab (Gl. 1). Letztere ist konstant und keine Eigenschaft der Transversalwelle. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit v_{tr} wird durch die Eigenschaften des Quarzes wie z.B. seiner Dichte und des Schermoduls bestimmt.

$$f = \frac{v_{tr}}{2d} \quad (\text{Gl. 1})$$

$$\frac{\Delta f}{f} = - \frac{\Delta d}{d} = - \frac{\Delta m}{\rho_Q F d} \quad (\text{Gl. 2})$$

Beschichtet man die auf den Quarz aufgedampften Elektroden, beispielsweise mit Modellmembranen, entspricht dies formal einer Zunahme der Quarzdicke Δd . Folglich muss es bei konstanter Ausbreitungsgeschwindigkeit der Transversalwelle zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz kommen. Die Bindung von Substanzen an die Membran erhöht die Quarzdicke zusätzlich und damit auch die Frequenzabnahme. Der Zusammenhang zwischen Masseauflagerung (Dickenzunahme) und Frequenzabnahme bildet die Basis der QCM und wurde bereits 1959 von Sauerbrey formuliert [104]. Die Frequenzänderung Δf ergibt sich danach entsprechend Gleichung 2.

Dabei sind ρ_Q und F die Dichte bzw. Fläche des Quarzkristalls und Δm die Masse einer beliebigen, den Kristall bedeckenden Schicht. Da d , ρ_Q und F konstant sind und sich zur Schichtwägemempfindlichkeit C_f zusammenfassen lassen, vereinfacht sich Gl. 2 zu:

$$\Delta f = - C_f \Delta m \quad (\text{Gl. 3})$$

Der lineare Zusammenhang zwischen f und m wurde ursprünglich an der Luft gemessen. Seine Gültigkeit wurde jedoch auch für Messungen in Flüssigkeiten bewiesen, hier gilt er aber nur für dünne und starre Filme. Bei dickeren Filmen müssen bei der Berechnung der Frequenz auch die Dichte und die Viskosität der Lösung berücksichtigt werden. Mit den am meisten verbreiteten Quarzwaagen lassen sich Massen bis 100 μg bestimmen. Im kleinsten Messbereich liegt die Limitierung bei etwa 1 ng, womit die QCM hundertfach sensitiver als elektronische Waagen ist (Sensitivität elektronischer Waagen $\sim 0,1 \mu\text{g}$). Um die Sensitivität der QCM zu gewährleisten, sollte die aufgelagerte Masse nicht mehr als 2% der Masse des Quarzes ausmachen. Die Sensitivität der QCM ließe sich durch Quarze mit größerer Grundfrequenz erhöhen. Allerdings sind diese aufgrund ihrer Zerbrechlichkeit nur schwer zu handhaben [103].

Neben der reinen Messung der Massebeladung liefern neuere Quarzwaagen noch einen weiteren Parameter, die Dämpfung. Die Dämpfung beschreibt die Energieverluste durch den aufgelagerten Film auf die Frequenz des Quarzes. Mit Hilfe der Dämpfung lassen sich Aussagen zu viskoelastischen Eigenschaften der Filme treffen. Handelt es sich um einen sehr dünnen und starren Film, nimmt dieser die Schwingung des Quarzkristalls gut auf und wird in dieselbe Richtung ausgelenkt. Handelt es sich jedoch um weniger starre Filme, die zusätzlich sehr voluminös sind, wird die Schwingung des Films im Vergleich zu der des Quarzes verzögert sein. Ein solcher Film bewirkt Energieverluste, welche die Frequenz des Quarzes beeinflussen: Er dämpft den Quarz. Als solch dämpfende Filme sind beispielsweise die dichte Anordnung von Vesikeln, multilamellaren Liposomen oder ganzen Zellen anzusehen. Definierte Mono- oder Bilayer gelten dagegen als relativ starre Schichten [105]. Als Ursache für die Dämpfung werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Potenzielle Einflussfaktoren sind poröse Filme, Wasser innerhalb der Filmschicht und das angelagerte Bulkwasser [106]. Da die Oberfläche der Quarzkristalle die Adsorption beeinflusst, spielt auch sie eine Rolle bei der Betrachtung der Dämpfung. Auch kann die Dämpfung in verschiedenen Schichten der aufgelagerten Masse vorkommen. So kann es beispielsweise bei der Bindung von Proteinen an eine auf dem Quarz immobilisierte Schicht zu Dämpfungen innerhalb der Proteinschicht oder an den Grenzflächen Protein/immobilisierte Schicht bzw. Protein/Flüssigkeit kommen.

Die Dämpfung lässt sich mit kommerziell erhältlichen Quarzwaagen über zwei Wege bestimmen. Weit verbreitet ist es, den Wechselstrom abzustellen und die Zeit zu messen, bis die Schwingung des Quarzes zum Erliegen gekommen ist. Bei starren Schichten vergeht dabei sehr viel mehr Zeit im Vergleich zu stark dämpfenden Schichten. Die zweite, auch in dieser Arbeit verwendete Methode, gleicht den durch die Dämpfung verursachten Energieverlust auf die Frequenz durch Spannungserhöhung aus. Die zusätzlich benötigte Energie wird in Hz umgerechnet.

Nachdem bei der ursprünglichen Verwendung der QCM als Biosensor nur die Frequenzänderungen bestimmt wurden, geht man zunehmend dazu über, die simultane Dämpfungsanalyse durchzuführen. Neben den absoluten Masseauflagerungen erhält man so auch Informationen über die Eigenschaften dieser Massen. Abbildung 16 soll an einem beispielhaften Kurvenverlauf die simultane Ermittlung der Frequenz- und Dämpfungsänderung (Δf bzw. ΔD) veranschaulichen.

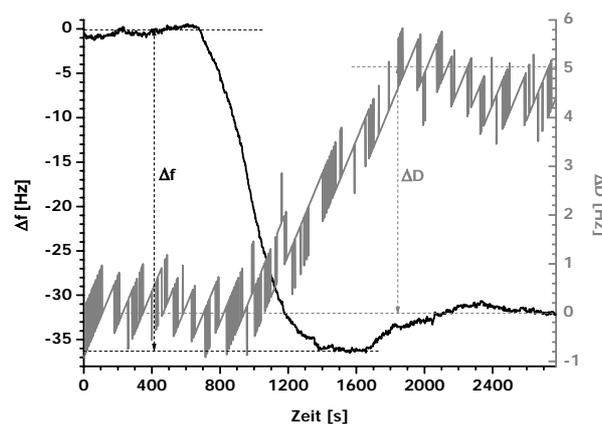


Abbildung 16: Der beispielhafte Verlauf von Frequenz (schwarz) und Dämpfung (grau) eines Quarzkristalls. Auf der Elektrode sind Modellmembranen und Rezeptoren immobilisiert. Die Peptidbindung lässt sich bei Zugabe des Liganden nach rund 800 s in Echtzeit mittels der auftretenden Frequenzab- und Dämpfungszunahme bestimmen.

Zunächst muss der Quarzkristall nach Anlegen der Wechselspannung bis zum Erreichen konstanter Frequenz- und Dämpfungswerte (f - bzw. D -Werte) einschwingen. Bei der Bindung von Analyten an ihre beispielsweise in den Modellmembranen integrierten Rezeptoren kommt es zu einer Frequenzabnahme, deren Größe der aufgelagerten Masse proportional ist. Gleichzeitig lassen sich über die Dämpfungszunahme Aussagen zu den viskoelastischen Eigenschaften der Modellmembran nach erfolgter Peptidbindung treffen. Detailliertere Angaben dazu erhält man aus dem Anstieg des zeitunabhängigen D/f -Graphen. Je höher der Betrag des Anstieges, desto stärker dämpfend ist die aufgelagerte Masse.

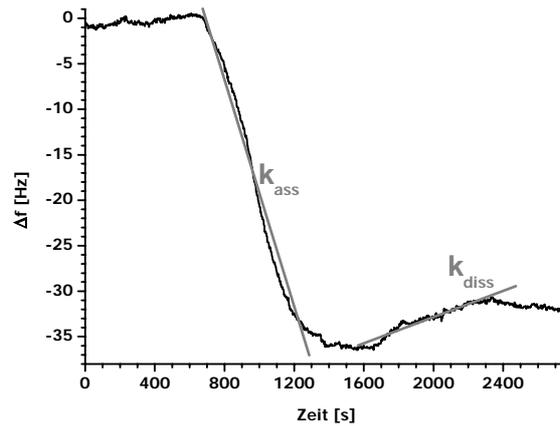


Abbildung 17: Die Bestimmung kinetischer Parameter aus dem Frequenzverlauf. Die Assoziationskonstante k_{ass} kann aus dem abfallenden, die Dissoziationskonstante k_{diss} aus dem ansteigenden Kurvenast berechnet werden. Der Quotient aus k_{diss} und k_{ass} liefert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante k_D .

Betrachtet man nur den Frequenzverlauf (Abb. 17), so fällt auf, dass es nach dem Abfallen der Frequenz zu einem leichten Anstieg kommt, ehe die Frequenz wieder einen konstanten Wert erreicht. Ursache ist die Dissoziation eines Teils der angelagerten Peptide.

Über die abfallenden und ansteigenden Kurvenbereiche lassen sich aus dem f/t -Graphen die kinetischen Parameter Assoziations-, Dissoziations- und Gleichgewichtsdissoziationskonstante (k_{ass} , k_{diss} , k_D) bestimmen.

Zur Berechnung der Bindungskonstanten geht man von folgender Reaktionsgleichung (Gl. 4) aus, nach der eine gelöste Substanz A mit einer immobilisierten Substanz B einen reversiblen Komplex AB bildet:



Die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung ergibt sich entsprechend Gl. 5:

$$\frac{\Delta[AB]}{\Delta t} = k_{\text{ass}} [A][B] - k_{\text{diss}} [AB] \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\frac{\Delta[AB]}{\Delta t} = k' [B] - k_{\text{diss}} [AB] \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Komplexbildung wird dabei durch Assoziations- und Dissoziationsvorgänge bestimmt. Der Prozess der Dissoziation entspricht einer Kinetik erster Ordnung, der der Assoziation formal gesehen einer Kinetik zweiter Ordnung. Da Kinetikbestimmungen mit der QCM aber unter Flussbedingungen durchgeführt werden, ist die Konzentration der gelösten Substanz

A konstant – es werden immer gleiche Mengen über die immobilisierte Schicht gespült. In Gleichung 5 können k_{ass} und $[A]$ damit zu einer neuen Konstanten k_{ass}' zusammengefasst werden (Gl. 6). Der Prozess der Assoziation folgt einer Kinetik pseudo-erster Ordnung [101, 107, 108]. Durch den linearen Zusammenhang zwischen der Masse des Analyten (bzw. dessen Konzentration) und der Frequenzänderung ergeben sich, abgeleitet aus Gleichung 5, folgende Beziehungen, wobei Gleichung 8 nur den Prozess der Dissoziation beschreibt:

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = k_{ass} [A] (f_{max} - f) - k_{diss} f \quad (\text{Gl. 7})$$

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = -k_{diss} f \quad (\text{Gl. 8})$$

Dabei entspricht f der Frequenzabnahme durch die Bildung des Komplexes AB , A der konstanten Konzentration des Analyten und f_{max} der Frequenzänderung bei maximaler Belegung der immobilisierten Substanz. Die Differenz aus f_{max} und f entspricht der Konzentration an unbesetzter immobilisierter Substanz. Für die meisten der mit Quarzmikrowaagen bestimmten Kinetiken wird nun $\Delta f/dt$ gegen f aufgetragen, wobei aus dem Anstieg der entstehenden Geraden k_{diss} und dem Schnittpunkt mit der Abszisse k_{ass} ermittelt werden können [101]. Die kinetischen Parameter lassen sich aber auch durch nichtlineare Regression der Frequenzverläufe (Abb. 17) unter Verwendung der Integrale der Gleichungen 7 und 8 bestimmen (Gl. 9 und 10).

$$\Delta f = -\frac{k_{ass} [A] f_{max}}{k_{ass} [A] + k_{diss}} \left(1 - e^{-[k_{ass} [A] + k_{diss}] (t-t_0)} \right) \quad (\text{Gl. 9})$$

$$\Delta f = \Delta f_0 e^{-[k_{diss}] (t-t_0)} \quad (\text{Gl. 10})$$

Aus den Gleichungen 9 und 10 wird ersichtlich, dass zuerst die Dissoziationskonstante bestimmt werden muss. Der Quotient aus k_{diss} und k_{ass} liefert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante k_D .

2.8.2 Vor- und Nachteile der QCM

Klarer Vorteil der Quarzmikrowaage ist die Gewinnung vielfältiger Aussagen über die jeweils untersuchten Prozesse. Neben reinen Massebestimmungen erhält man Aussagen zu den Eigenschaften der gebundenen Masse, sowie bei Bindungsprozessen zusätzlich detail-

lierte kinetische Parameter wie die Assoziations-, Dissoziations- und Gleichgewichtsdissoziationskonstante.

Im Gegensatz zu anderen Methoden müssen die Analyten weder markiert noch aufgereinigt werden [103]. Zu der daraus resultierenden Zeitersparnis kommen außerdem die vergleichsweise kostengünstige Anschaffung der Quarzwaage und die Möglichkeit der mehrfachen Verwendung der Quarzkristalle hinzu. Unter Verwendung der aufgedampften Elektroden kann die QCM mit elektrochemischen Bestimmungsverfahren kombiniert werden.

Als nachteilig ist die geringe Durchsatzrate bei Verwendung der Quarzwaage anzusehen, da jeder Kristall einzeln beschichtet werden muss und die Anzahl der Oszillatoren je Quarzwaage auch beschränkt ist. Trotz aller Vorteile wird sich die QCM daher nicht zur Analysenmethode mit hohem Durchsatz entwickeln.

Diskutiert wird immer wieder die Vergleichbarkeit von QCM und SPR, einem auf optischen Methoden basierenden System zur Massebestimmung. Hinsichtlich Sensitivität und Selektivität sind beide Verfahren ähnlich leistungsfähig. Problematisch bei der SPR kann die Beschichtung werden. Außerdem ist sie in optisch undurchsichtigen Medien nicht durchführbar. Die Bestimmung der gebundenen Masse erfolgt aber etwas genauer als bei der QCM, da der Einfluss flüssiger Umgebungen vernachlässigt werden kann. Im Gegensatz dazu können mit der SPR keine Aussagen zu viskoelastischen Eigenschaften der aufgelagerten Massen getroffen werden. Um die Nachteile beider Methoden auszugleichen, kombinieren einige Arbeitsgruppen die QCM und die SPR.

2.8.3 Anwendung der QCM

Ursprünglich wurde die QCM hauptsächlich zur Charakterisierung von Filmbildungs- und Oxidations- [109, 110] sowie von Polymerisationsprozessen [111] verwendet. Aktuell wird die Quarzwaage überwiegend als Biosensor zur Untersuchung vielfältigster biologischer Vorgänge genutzt. Dabei wird eine Komponente auf dem Quarz immobilisiert und die Bindung einer zweiten Substanz beobachtet. Im Folgenden sollen nur einige wenige Beispiele die Vielfältigkeit der QCM-Untersuchungen demonstrieren. Eine Aufzählung aller bisher durchgeführten Untersuchungen würde an dieser Stelle zu weit führen. So wurde etwa die Adhäsions- und Spreitungsfähigkeit von Präosteoblasten an verschiedenen auf dem Quarz immobilisierten Schichten (Tantal bzw. Chrom) untersucht. Dabei zeigte sich eine verstärkte Adhäsion an Ta-Flächen, wodurch es als mögliches Biomaterial zur Anregung der Knochenneubildung interessant wird [112]. Allerdings zeigt sich hier schon die Notwendigkeit der simultanen Bestimmung der Dämpfung, da diese bei Verwendung ganzer Zellen extrem groß ist [106]. Im Gegenteil zum eben erwähnten Beispiel können verschiedenste

Biomaterialien auch hinsichtlich unerwünschter Einflüsse auf das Blutgerinnungssystem untersucht werden [113]. Eine ganz andere Richtung schlagen Untersuchungen zur Hybridisierung von DNA ein. Unter Verwendung der bekannten und hochaffinen Rezeptor-Ligand-Bindung des Biotin-Avidin-Systems wird auf dem Quarz zunächst Streptavidin immobilisiert, an das man biotinylierte Proben-DNA koppelt. Die Hybridisierung durch Target-DNA kann dann mit der QCM verfolgt werden [114]. Die Detektierung des Folat-Bindungsproteins (FBP) als Marker für verschiedene maligne Erkrankungen mittels QCM wurde ebenfalls untersucht. Die sehr zügige Analyse des FBPs erfolgt dabei über immobilisiertes, an BSA gekoppeltes Folat [115]. Auf ähnliche Weise lassen sich auch Biotinkonzentrationen klinisch einfach bestimmen [116]. Über die Ermittlung kinetischer Parameter mittels QCM werden beispielsweise Peptid-Peptid-Interaktionen [117] oder hydrolytische Reaktionen [118] verfolgt.

2.9 Zyklische Voltammetrie

2.9.1 Theoretische Grundlagen

Die Zyklische Voltammetrie (CV) ist die vielleicht vielfältigste und interessanteste elektroanalytische Technik. An eine stationäre Elektrode, die in eine nicht gerührte Lösung eintaucht, wird eine Spannung angelegt. Diese Spannung wird gegen eine Referenzelektrode, meist eine Silber-/Silberchlorid- oder gesättigte Kalomelektrode, gemessen und kontinuierlich in Form einer Dreiecksspannung verändert (Abb. 18). Komplettiert wird das Dreielektrodensystem durch eine Hilfselektrode (z.B. Platin), über die der Strom abgefangen wird, der sonst durch die Referenzelektrode fließen und ihr Potenzial verändern würde.

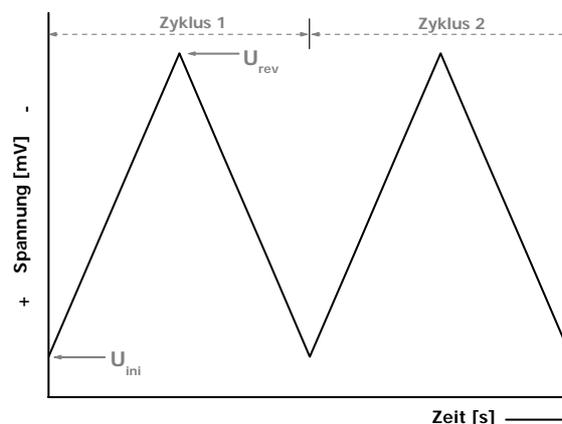


Abbildung 18: Der zeitliche Verlauf der bei der Zyklischen Voltammetrie auftretenden Spannung. Ausgehend von einem Anfangspotenzial U_{ini} wird die Spannung bis zu einem Umkehrpotenzial U_{rev} zunehmend negativ. Nach Erreichen des Umkehrpotenzials wird die Spannung entgegengesetzt gefahren, bis das Anfangspotenzial wieder erreicht und der Spannungszyklus vollendet ist [nach 120].

Die Begrenzungspunkte eines Spannungszyklus sind das Anfangs- und das Endpotenzial, die identische Werte aufweisen. Ausgehend vom Anfangspotenzial wird die Spannung zu steigenden negativen Werten verändert. An einem Umkehrpotenzial wird die Spannung zurück zu steigenden positiven Werten verändert, bis das Endpotenzial (= Anfangspotenzial) erreicht ist. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden. Der zeitliche Verlauf der veränderlichen Spannung ist in Abbildung 18 dargestellt. Der ansteigende Kurventeil entspricht dem Spannungsverlauf der Hinreaktion, der abfallende dem der Rückreaktion. Das Verhältnis aus Spannung und Zeit liefert die Spannungsgeschwindigkeit.

Die Messgröße der CV ist die in Abhängigkeit der angelegten Spannung auftretende Stromstärke, die durch die Umsetzung reduzier- und oxidierbarer Substanzen entsteht. Die zugrundeliegende Bewegungsart der Substanzen ist die Diffusion. Migrationseffekte werden durch Zugabe eines Leitsalzes unterdrückt. Das typische Zyklovoltammogramm ist ein I/U-Diagramm und in Abbildung 19 zu sehen.

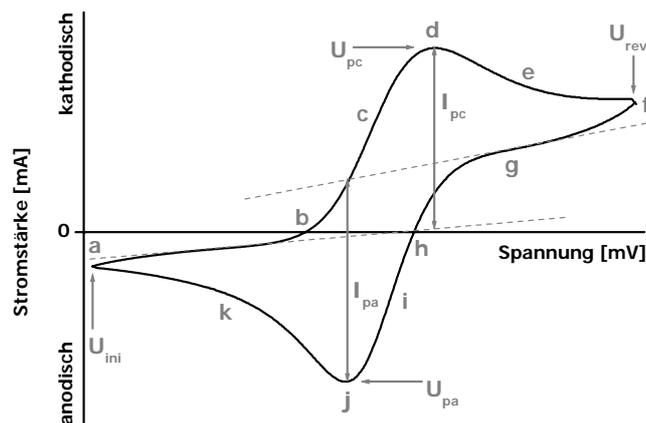


Abbildung 19: Ein typisches Zyklovoltammogramm eines reversiblen Redoxsystems. Dargestellt sind der Verlauf der Stromstärke in Abhängigkeit von der angelegten Spannung und die zur Charakterisierung der Reaktion notwendigen Kenngrößen. [nach 120].

Zunächst sollen der Kurvenverlauf und die Hintergründe der CV am Beispiel des reversiblen Redoxpaares $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ erläutert werden. Das Anfangspotenzial wird von Punkt a) aus konsequent zu negativeren Werten verändert, bis es ausreichend negativ für die kathodische Reduktion von Fe^{3+} ist (Punkt b) und es zum Auftreten eines Faradayschen kathodischen Stromflusses kommt. Bei weiterer Spannungsänderung (Bereich c) kommt es zum verstärkten Umsatz von dreiwertigem Eisen und einem entsprechenden Stromanstieg, bis der Diffusionsgrenzstrom erreicht ist (Punkt d). Das Verhältnis von Fe^{3+} zu Fe^{2+} kann jederzeit über die aktuell angelegte Spannung mit Hilfe der Nernstschen Gleichung berechnet werden. Im Bereich des Diffusionsgrenzstromes ist die Elektrodenumgebung an Fe^{3+} verarmt, da in diesem Bereich die Ionen vollständig reduziert wurden. Jedes aus der Lö-

sung nachdiffundierende Fe^{3+} wird sofort an der Kathode reduziert. Eine Spannungsänderung führt im Gegensatz zum Abschnitt c) nicht zu einem erhöhten Stromfluss. Im Gegenteil, es kommt sogar zu einem Stromabfall (Abschnitt e), dessen Ursache in der zunehmenden Dicke der Diffusionsgrenzschicht (aus Fe^{2+}) und der dadurch erschwerten Nachdiffusion von Fe^{3+} zu suchen ist. Am Umkehrpotenzial (Punkt f) wird die Spannung wieder Richtung Anfangspotenzial und zunehmend positiveren Werten verändert. Dabei befindet man sich zunächst noch im Bereich des Diffusionsgrenzstromes (Abschnitt g) mit den gleichen Erscheinungen wie in Abschnitt e). Ist das erreichte Potenzial ausreichend positiv (Punkt h), kommt es zur anodischen Oxidation des durch die Hinreaktion an der Elektrode aufkonzentrierten Fe^{2+} und einem zunehmenden anodischen Stromfluss (Abschnitt i). Auch bei der Rückreaktion kommt man nach gewisser Zeit in den Bereich des Diffusionsgrenzstromes (Punkt j) und der Abnahme des nunmehr anodischen Stromflusses durch die zunehmende Diffusionsgrenzschicht (Abschnitt k). Nach Erreichen des Anfangspotenzials beginnt der Zyklus von neuem. Der Stromfluss verhält sich während der gesamten Zeit proportional zum Konzentrationsgefälle in der Lösung und lässt sich wie folgt beschreiben (Gl. 11):

$$I = -n F A D \frac{c_{x=\infty} - c_{x=0}}{\delta} \quad (\text{Gl. 11})$$

Dabei sind I die Stromstärke, n die Anzahl der je Ion übertragenen Elektronen, A die Fläche der Elektrode, D der Diffusionskoeffizient, F die Faraday-Konstante, $c_{x=\infty}$ die Konzentration der Ionen in der Lösung, $c_{x=0}$ die Ionenkonzentration an der Elektrode und δ die Diffusionsschichtdicke. In den Abschnitten c) und i) des Zyklovoltammogramms nehmen die Differenz zwischen der Ionenkonzentration an der Elektrode und in Lösung sowie die Diffusionsschichtdicke zu. Die Zunahme von δ ist dabei geringer, es kommt insgesamt zu einem Anstieg der Stromstärke. In den Punkten d) und j) hat der Konzentrationsunterschied sein Maximum erreicht, δ nimmt aber weiter zu, was die Abnahme der Stromstärke erklärt.

Die stattfindenden Reaktionen lassen sich über die ebenfalls in Abbildung 19 dargestellten typischen Kenngrößen eines Zyklovoltammogramms charakterisieren. Dazu gehören das Ausmaß des anodischen und kathodischen Spitzenstroms (I_{pa} bzw. I_{pc}) und die entsprechenden Spitzenpotenziale U_{pa} und U_{pc} . So entspricht bei reversiblen Reaktionen der Mittelwert der Spitzenpotenziale dem Standardpotenzial des Redoxpaares. Bei Raumtemperatur entspricht der Quotient aus 0,059 V und der Anzahl der übertragenen Elektronen bei reversiblen Reaktionen der Differenz der Spitzenpotenziale. Ein verzögerter Elektronentransfer oder irreversible Reaktionen lassen sich über eine größere Differenz zwischen den

Spitzenströmen erkennen. Der Quotient aus den beiden Spitzenströmen sollte bei reversiblen und entsprechend schnellen Reaktionen bei 1 liegen. Die Spitzenströme I_p hängen entsprechend der Randles-Ševčík-Gleichung (Gl. 12) neben den schon erwähnten Faktoren vor allem auch von der Spannungsgeschwindigkeit v ab:

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} c_{x=\infty} v^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Gl. 12})$$

Irreversible Reaktionen zeichnen sich auch durch das Fehlen eines Peaks der Rückreaktion aus, was die Auswertung über die Peakabstände und -größen unmöglich macht. Neben der an der Elektrode stattfindenden elektrochemischen Reaktion muss man auch mögliche vor- oder nachgelagerte chemische Reaktionen beachten, die das Aussehen des Zykelvoltammogramms beeinflussen. Die Elektrodenreaktion kann beispielsweise auch dadurch irreversibel werden, dass das Produkt chemisch umgesetzt wird und somit für die CV-Bestimmung nicht mehr zur Verfügung steht. Andererseits können vorgelagerte chemische Reaktionen erst die elektrochemisch aktive Substanz bilden. Diese eventuell auch langsame chemische Reaktion wird zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und beeinflusst so den Abstand der Peakpotenziale zueinander [119-121].

2.9.2 Anwendung der CV

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten für CV-Untersuchungen. Man kann das direkte Verhalten redoxaktiver Substanzen an Elektroden untersuchen, elektrochemisch inaktive Verbindungen mit redoxaktiven Gruppen markieren oder das veränderte Verhalten zusätzlicher redoxaktiver Substanzen durch die eigentlich zu untersuchenden Verbindungen bestimmen. Zu Letzterem gehört beispielsweise die Analyse des Elektronentransfers durch immobilisierte Schichten auf der Elektrode.

Ähnlich wie für die QCM gibt es auch für die zyklische Voltammetrie unzählige Anwendungsmöglichkeiten, von denen einige Aktuelle erwähnt werden sollen. Man kann beispielsweise den Einbau elektrochemisch aktiver Substanzen in immobilisierte Schichten auf der Elektrode untersuchen. Die Substanz gelangt bei gutem Einbau näher an die Elektrodenoberfläche, was sich in einem Anstieg der Stromstärke äußert [122]. Analyten können auch von Beginn an immobilisiert werden. Neue Einblicke in die Funktion von Hämoglobin (Hb), vor allem unter Einwirkung von oxidativem Stress, wurden nach Immobilisierung des Hb in einer Gelschicht, die sich auf der Elektrode befindet, gewonnen [123]. Hochinteressant ist auch das Feld der DNA-Untersuchungen. Man nutzt dabei die Oxidationsfähigkeit von Guanin und Adenin [124]. Damit kann ein Sensor entwickelt werden, der oxidative DNA-Schäden erkennt [125] oder die Interaktion von Substanzen, z.B. des antikanzerogen-

nen Emodins, mit DNA untersucht. Je stärker die Interaktion, desto geringer fällt die Oxidation der DNA aus [126]. Vorteilhaft gegenüber anderen Techniken wie HPLC, GC oder Radioimmunoassays sind dabei der geringere Geräteaufwand und ein verminderter Zeitaufwand. Auch zur Quantifizierung von elektrochemisch aktiven Arzneistoffen wie Norethisteron in pharmazeutischen Formulierungen wird die CV eingesetzt [127].

2.10 Zielstellung der Arbeit

In Kapitel 2.6 wurden bereits bisher eingesetzte Techniken zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Lantibiotika beschrieben. Obwohl diese Techniken umfangreiche Aussagen zu Lantibiotika liefern, gibt es Prozesse im Wirkungsgeschehen der Peptide, die damit nicht erfasst werden können. In der vorliegenden Arbeit sollen an dieser Stelle die Biosensortechniken der Quarzmikrowaage und der Zyklischen Voltammetrie eingreifen.

Die Wirkung von Lantibiotika auf bakterielle Membranen soll an Modellmembranen simuliert werden. Die Gestaltung der Modellmembranen erfolgt dabei so, dass sie die Abhängigkeit der Wirkintensität von Lipid II erkennen lässt.

Mittels der Quarzmikrowaage werden verschiedene Fragestellungen beantwortet. Neben der Bestimmung absolut gebundener Peptidmengen in Abhängigkeit der jeweils gegebenen Modellmembran soll über die Dämpfungsanalyse untersucht werden, wie die Zugabe ausgewählter Lantibiotika die viskoelastischen Eigenschaften der Membran verändert.

Ein besonderes Augenmerk unter der Verwendung der Quarzmikrowaage liegt auf der Bestimmung kinetischer Bindungsparameter. In der Literatur existieren nur wenige Werte für Bindungskonstanten der Lantibiotika, die sich darüber hinaus auf Gleichgewichtsbindungskonstanten beschränken. Der komplexe Prozess der Bindung der Peptide an die Modellmembran setzt sich aber aus den Einzelprozessen der Assoziation und der Dissoziation zusammen. In der vorliegenden Arbeit sollen diese Einzelprozesse erstmalig mit Hilfe der Quarzwaage isoliert und detailliert betrachtet werden.

Um Permeabilitätsänderungen in den Membranen detektieren zu können, wird die Zyklische Voltammetrie angewendet. Je nach Beschaffenheit der Modellmembranen kann auch hier der Einfluss des Lipid II herausgearbeitet werden. Zusätzliche bildgebende Verfahren sollen die QCM- und CV-Ergebnisse untermauern.

Die Kombination der beiden Biosensortechniken QCM und CV erlaubt weitere und detaillierte Einblicke in den Wirkmechanismus von Lantibiotika. Des Weiteren soll gezeigt werden, dass die Verwendung von Modellmembranen trotz der recht einfachen Handhabung vielfältige Variationsmöglichkeiten erlaubt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien

Ammoniak	Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland
Chloroform	Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland
Essigsäure 99,8%	KMF, Lohmar, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Gallidermin	AK Sahl, Universität Bonn, Deutschland
Hexadecanthiol	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland
Insulin, B-Kette, oxidiert	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumchlorid	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat-III	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland
Lacticin 3147 A1	AK Sahl, Universität Bonn, Deutschland
Lacticin 3147 A2	AK Sahl, Universität Bonn, Deutschland
Lipid II	AK Sahl, Universität Bonn, Deutschland
Mersacidin	Hoechst, Frankfurt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methyliertes Nisin	AK Sahl, Universität Bonn, Deutschland
Monochlorodimethyloktadecylsilan	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland
Natriumsulfat-Decahydrat	Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland
Nisin	AK Sahl, Universität Bonn, Deutschland
1- <i>O</i> -Hexadecyl-2-[α -Hexyl]-Palmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin	Dr. Rattay, Universität Halle, Deutschland
1- <i>O</i> -Hexadecyl-2-[12-Methyl]-Palmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin	Dr. Rattay, Universität Halle, Deutschland
2-Propanol 99,99%	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland
Schwefelsäure 95-97%	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	FLUKA, Neu-Ulm, Deutschland

3.2 Quarzkristalle und deren Reinigung

Zum Einsatz kamen AT-geschnittene planare Quarzkristalle. Charakteristisch für diese Kristallplättchen sind ihre Temperaturstabilität und ein Schermodul von $2,947 \cdot 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ ($\sim 2,5 \cdot 10^{10} \text{ N m}^{-2}$). Die Resonanzfrequenz variiert je nach Dicke des Quarzes. Für die QCM-Versuche wurden mit Gold beschichtete Quarzkristalle der Firma ifak e.V. (Barleben, Deutschland) mit einer Resonanzfrequenz von 10 MHz und einem Durchmesser von 14 mm verwendet. Die aktive Sensorfläche beträgt $0,28 \text{ cm}^2$, die Dichte $2,65 \text{ g cm}^{-3}$. Die ebenfalls mit Gold beschichteten AT-geschnittenen Quarzkristalle für die CV-Experimente (CH Instruments Inc., Austin, Texas, USA) haben eine Resonanzfrequenz von 8 MHz, einen Durchmesser von 13,7 mm und eine Dichte von $2,65 \text{ g cm}^{-3}$. Der Durchmesser der Gold-elektrode beträgt 5 mm. Abbildung 20 zeigt die beiden Arten von verwendeten Quarzkristallen.

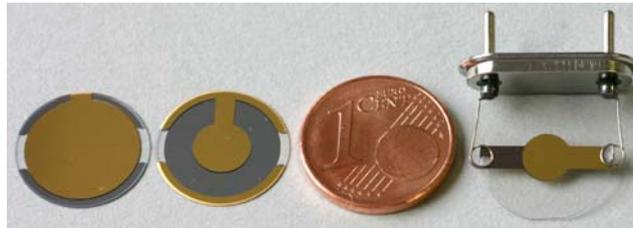


Abbildung 20: Die Darstellung der verwendeten Quarzkristalle. Zum Einsatz kamen mit Gold beschichtete Quarzkristalle mit unterschiedlichen Resonanzfrequenzen. Die links dargestellten 10 MHz Kristalle wurden für QCM-Experimente verwendet, die rechts gezeigten 8 MHz Kristalle mit Halterung für die CV-Versuche.

Beide Quarze wurden mit einer Mischung aus einem Teil 30%igem Wasserstoffperoxid und drei Teilen konzentrierter Schwefelsäure gereinigt (Piranhalösung). Die dabei entstehende Peroxomonoschwefelsäure wirkt als starkes Oxidationsmittel. Alle QCM-Quarze wurden je Seite dreimal komplett mit Piranhalösung bedeckt und nach drei Minuten mit aqua dem. abgespült. Abschließend wurden die Quarze mit Ethanol gespült und im Luftstrom getrocknet. Die CV-Quarze wurden unter Kühlung komplett in Peroxomonoschwefelsäure getaucht und nach 10 Sekunden mit aqua dem. gespült. Dieser Vorgang wurde insgesamt sechsmal durchgeführt, am Ende wurde auch hier mit Ethanol gespült und im Luftstrom getrocknet.

3.3 Beschichtung der Quarzkristalle

3.3.1 Selfassembling

Die gereinigten Quarzkristalle wurden bei Raumtemperatur über Nacht in eine 10 mM Hexadecanethiollösung in Chloroform gelegt. In der Alkanthiollösung kommt es zur Selbstor-

ganisation („self-assembly“) der Thiole auf der Goldschicht. Dabei werden nach einer initialen Thioladsorption auf der Goldoberfläche Goldthiolate ausgebildet. Das Ergebnis sind hochgradig geordnete und stabile Filme auf dem Quarzkristall. In der vorliegenden Arbeit wurde Hexadecanthiol verwendet, da es sich in früheren Experimenten aus einer Reihe kürzer- und längerer Alkanthiole als am besten geeignet erwies, dichte und hoch geordnete Monoschichten auszubilden [128].

3.3.2 Langmuir-Blodgett-Technik

Die Modellmembranen wurden mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik komplettiert. Dafür wurde ein Langmuir-Trog (Abb. 21; Riegler-Kirstein, Potsdam, Deutschland) mit aqua dem. gefüllt und auf die Luft-Wasser-Grenzfläche die entsprechenden in Chloroform gelösten Phospholipide aufgetragen. Eine Wartezeit von 20 bis 30 Minuten erlaubte die gleichmäßige Verteilung der Phospholipide auf der Wasseroberfläche.

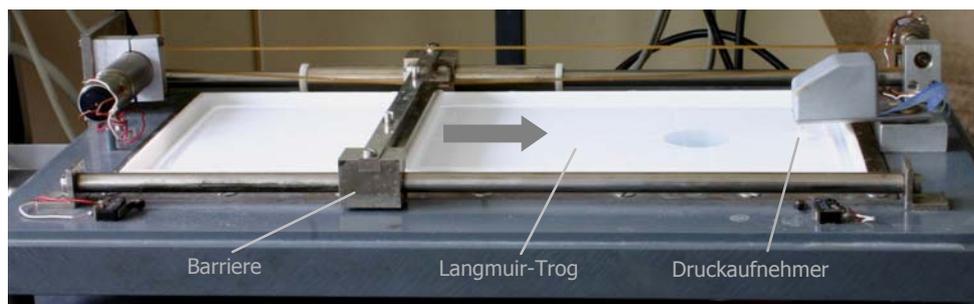


Abbildung 21: Die Darstellung der Langmuir-Blodgett-Filmwaage. Die auf der Luft-Wasser-Grenzfläche aufgetragenen Phospholipide werden mittels einer Barriere unmittelbar vor dem Übertragen verdichtet, was über einen Druckaufnehmer verfolgt werden kann.

Zunächst wurden die Lipide mittels einer Barriere bei einer gleichbleibenden Geschwindigkeit von ca. $800 \mu\text{m s}^{-1}$ komprimiert, der entsprechende Druckverlauf aufgezeichnet und der jeweils spezifische Kollapsdruck der Filmschicht ermittelt. Abbildung 22 zeigt beispielhaft einen solchen Druckverlauf.

Die zunehmende Verdichtung der Phospholipide führt zu einem steigenden Druck des Filmes auf das als Druckaufnehmer dienende Filterpapier. Komprimiert man den Film über die dichtest mögliche Packung hinaus, bricht dieser. Der Anstieg des Druckes stoppt schlagartig oder fällt rapide ab.

Um die Filme auf den Quarzkristall übertragen zu können, sollte der Film möglichst dicht sein, gleichzeitig soll das Zusammenbrechen während des Übertragens ausgeschlossen werden. Zur Übertragung wurde daher an der Steuereinheit der Filmwaage ein Druck von 5 mN m^{-1} unterhalb des Kollapsdruckes eingestellt. Die Lipide wurden automatisch mit

einer kontinuierlich abnehmenden Geschwindigkeit bis zu diesem Druck verdichtet. Damit wurde das vorzeitige Zusammenbrechen des Filmes verhindert.

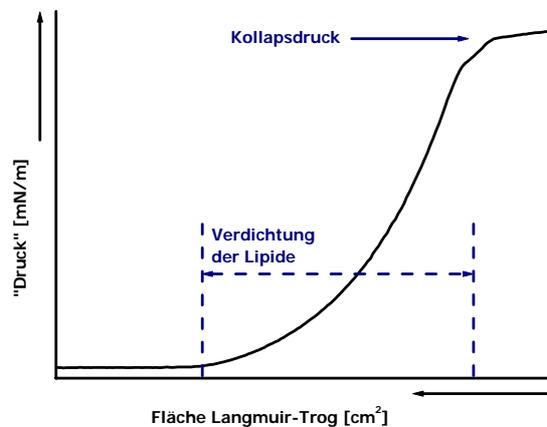


Abbildung 22: Der Druckverlauf der Kompression von Phospholipiden auf einer Langmuir-Blodgett-Filmwaage. Die Einheit des Druckes ist in mN m^{-1} angegeben, da es sich formal nicht um eine Änderung des Druckes, sondern der Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche handelt.

War der gewünschte Druck erreicht, wurde der mit Hexadekanthiol beschichtete Quarzkristall mittels eines Filmlifts mit einer Geschwindigkeit von $190 \mu\text{m s}^{-1}$ senkrecht zur Luft-Wasser-Grenzfläche durch die Phospholipidschicht gefahren. Dabei lagerten sich die Lipide über hydrophobe Wechselwirkungen entsprechend Abbildung 23 auf die Monoschicht des Quarzes und komplettierten die Modellmembran.

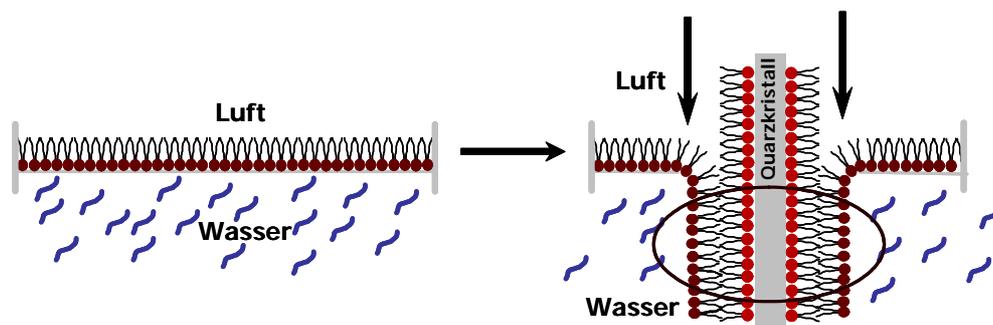


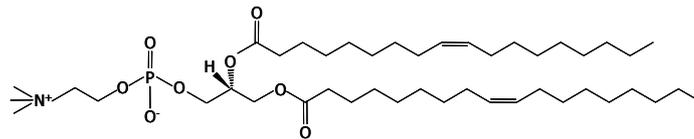
Abbildung 23: Die Komplettierung der Modellmembran. Nach Verdichtung der Phospholipide wird der Quarzkristall senkrecht zur Luft-Wasser-Grenzfläche durch die Filmschicht gefahren. Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten wird die Modellmembran auf dem Quarzkristall komplettiert (schwarze Umrandung).

Die durch die Auflagerung verursachte Abnahme des Lipiddruckes wurde durch entsprechende Nachregulierung ausgeglichen.

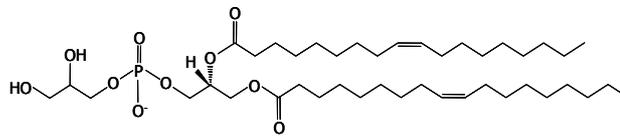
Um die Auflagerung weiterer Multischichten zu verhindern, wurden die restlichen Phospholipide zunächst abgesaugt, bevor der Quarz aus dem Langmuir-Trog genommen und in

wässriger Umgebung in die entsprechenden Messzellen eingebaut wurde.

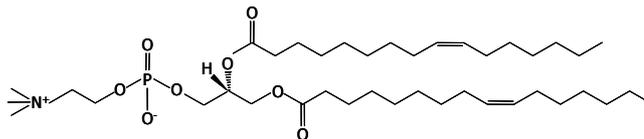
Mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik konnten beliebige Modellmembranen übertragen werden. Dabei kamen verschiedene Phospholipide und Substanzen zum Einsatz, auf deren Konzentrationsverhältnis an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil verwiesen wird. Abbildung 24 zeigt die Strukturen aller verwendeten Phospholipide, die Struktur des bakteriellen Lipid II wurde bereits in Kapitel 2.1 vorgestellt.



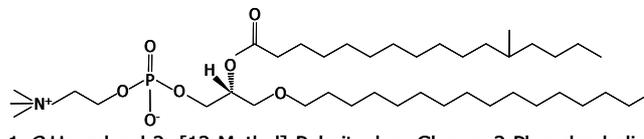
1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC)



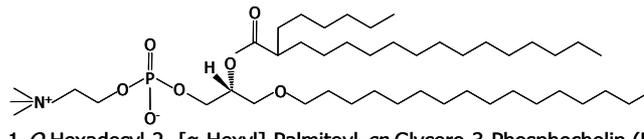
1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] (DOPG)



1,2-Dipalmitoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DPOPC)



1-*O*-Hexadecyl-2-[12-Methyl]-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (PL3)



1-*O*-Hexadecyl-2-[α -Hexyl]-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (PL5)

Abbildung 24: Die Strukturen der mit der Langmuir-Blodgett-Technik übertragenen und in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide.

DOPC, DOPG und DPOPC lagen als in Chloroform gelöste Stammzubereitung mit einer Konzentration von $10 \mu\text{mol mL}^{-1}$ vor. PL3 wurde als $1,84 \text{ mM}$ Lösung, PL5 als $1,24 \text{ mM}$ Lösung verwendet, beide ebenfalls in Chloroform gelöst. Lipid II wurde, in Chloroform gelöst, als Stammlösung mit einer Konzentration von $6,85 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ eingesetzt.

3.4 Quarzmikrowaage

Verwendet wurde das QCM-System LiquiLab 21 der Firma ifak e.V., Barleben, Deutschland. Dabei handelt es sich um ein temperaturstabilisiertes Messsystem, das die Verwen-

dung von bis zu vier Messzellen gleichzeitig erlaubt.

Die Quarzkristalle wurden in die aus PMMA (Kammerboden) bzw. Polycarbonat (Kammerdeckel) bestehenden und in Abbildung 25 dargestellten Messzellen eingebaut.

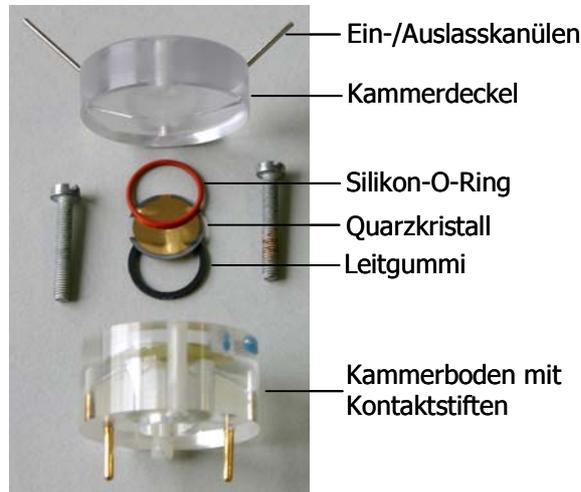


Abbildung 25: Die Darstellung der für die QCM-Messungen verwendeten Messzelle. Das Zellvolumen beträgt 100 μL , unter Einbeziehung der Ein- und Auslasskanülen 200 μL .

Der Durchmesser der Messzelle beträgt 30 mm, die Höhe (ohne Kontaktstifte) 25 mm. Der elektrische Kontakt zwischen Quarz und Zelle bzw. Oszillator erfolgt über ein Leitgummi. Abgedichtet wird die Zelle über einen Silikon-O-Ring. Das Zellvolumen beträgt 100 μL , unter Einbeziehung der Ein- und Auslasskanüle 200 μL . Über aus Edelstahl gefertigte Ein- und Auslasskanülen können Versuche unter Flussbedingungen simuliert werden.

Die Messzelle mit Quarzkristall wird, wie in Abbildung 26 dargestellt, in die Quarzmikrowaage eingebaut. Über den Oszillator wird eine Wechselspannung an den Quarzkristall gelegt, mit deren Hilfe dieser zum Schwingen angeregt wird. Die Messzelle ist über Schläuche (ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 1,02 mm, bestehend aus Silikon bzw. Tygon[®], in das Flusssystem integriert. Die Flüssigkeiten werden mittels einer 12-Walzenpumpe (ISMATEC) transportiert. Diese ist so eingestellt, dass eine Flussrate von 270 $\mu\text{L min}^{-1}$ erreicht wird, was einem Schergrad von etwa 5 s^{-1} entspricht. Die Peptide werden über einen Dreiwegehahn in das Flusssystem injiziert, der Druckausgleich während der Substanzzugabe erfolgt mittels eines Überlaufes. Das komplette System befand sich während der Messungen unter konstanten Temperaturbedingungen, die durch eine Wasserkühlung und eine entsprechende Heizung gewährleistet wurden.



Abbildung 26: Das QCM-Messsystem LiquiLab 21. Gemessen wird bei konstanter Temperatur, die zu untersuchende Substanz wird von außen in das über Schläuche verbundene System gegeben.

Die Messungen wurden alle mit aqua dem. durchgeführt, das einen pH-Wert von 5,4 aufwies. Nach Einschwingen der Quarzkristalle und Erreichen einer Schwingungskonstanz wurden die entsprechenden Peptidmengen injiziert und die Änderung von Frequenz (f) und Dämpfung (D) in Echtzeit verfolgt. Bei Versuchen zur Bestimmung der absoluten Änderungen von f und D war das System als Rundlauf geschaltet, das Peptid passierte die Sensoroberfläche also mehrmals. Die Messung wurde nach Erreichen einer konstanten Frequenz gestoppt. Für die Bestimmung kinetischer Parameter wurden die Messzellen als Durchflusszellen geschaltet. Damit war sichergestellt, dass die Konzentration der eingespülten Peptidlösung konstant ist. Außerdem konnte nach erfolgter Assoziation mit aqua dem. gespült werden, ohne die Flussbedingungen zu verändern. Der Spülvorgang wurde bis zum Erreichen einer Frequenzkonstanz nach beendetem Dissoziationsprozess fortgesetzt, danach wurde der Versuchslauf gestoppt.

3.5 Zyklische Voltammetrie

Zur Bestimmung von Permeabilitätsänderungen an den Modellmembranen wurde eine elektrochemische Quarzwaage CHI-430 der Firma CH Instruments Inc. (Austin, TX, USA) verwendet. Neben einer Vielzahl elektrochemischer Bestimmungsmethoden erlaubt dieses Gerät auch die Verwendung als Quarzmikrowaage. Nachteilig ist dabei aber vor allem, dass die laut Aussagen des Herstellers mögliche simultane Anwendung von CV und QCM schwierig ist. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass die Frequenz des Quarzkristalls stark von der für die CV notwendigen veränderlichen Spannung abhängig ist und somit eine sensitive Erfassung von Masseänderungen verhindert [129]. Da dieses Gerät außer-

dem keine Dämpfungsanalyse aufweist, wurde es in der vorliegenden Arbeit ausschließlich zur Durchführung der Zyklischen Voltammetrie verwendet.

Die Präparation der CV-Quarzkristalle erfolgte wie in den Kapiteln 3.2 und 3.3 beschrieben. In wässriger Umgebung wurden die Quarze in die CV-Messzelle eingebaut, die aus Teflon gefertigt und in Abbildung 27 schematisch dargestellt ist.

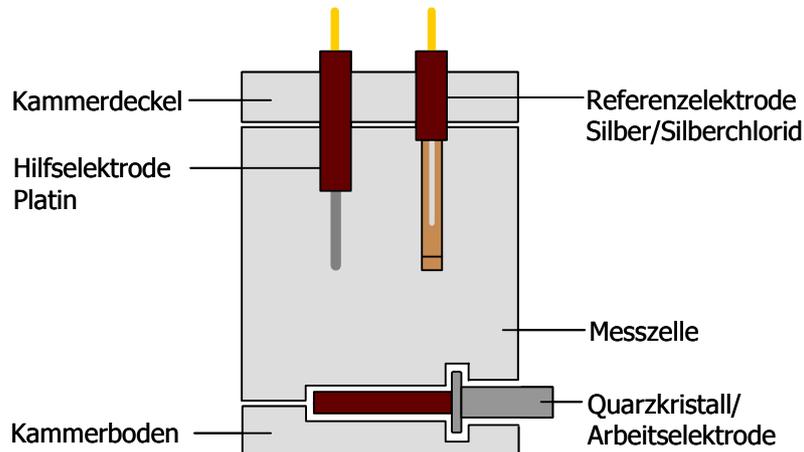


Abbildung 27: Die schematische Darstellung der für die CV-Messungen verwendeten Messzelle, inklusive Dreielektrodenanordnung. Das Kammervolumen beträgt 3 mL. Die Peptide werden über hier nicht dargestellte kleine Bohrungen im Kammerdeckel appliziert.

Die Messzelle besteht aus drei Teflonstücken, die einen Durchmesser von 35 mm und eine Höhe von insgesamt 37 mm haben. Der Kammerdeckel dient als Halterung für die Referenz- und die Hilfselektrode und hat außerdem zwei weitere Aussparungen von je 2 mm Durchmesser, über die die entsprechenden Peptide mittels einer Mikroliterspritze zugegeben wurden. Der beschichtete Quarzkristall dient neben seiner Funktion als Trägermaterial gleichzeitig als Referenzelektrode. Komplettiert wird das Dreielektrodensystem durch einen die Hilfselektrode darstellenden Platindraht und eine Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid). Letztere ist mit 3 M Kaliumchloridlösung gefüllt.

Nach Einbau der Quarze in die Messzelle wird das Wasser gegen eine 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung ausgetauscht. Das dreifach positiv geladene Eisen dient zusammen mit dem während des Versuches entstehenden zweiwertigen Eisen als redoxaktives Ionenpaar. Gelöst wurde das $K_3[Fe(CN)_6]$ in 0,1 M Natriumsulfatlösung, welches als Leitsalz unerwünschte Migrationseffekte verhindern sollte. Nach Verbindung der Messzelle mit den entsprechenden Elektroden und Kontaktierungen wurde die CV-Messung gestartet. Der abzufahrende Spannungsbereich wurde zwischen - 0,05 und 0,6 V festgelegt. Die Spannungsgeschwindigkeit wurde auf 10 mV s^{-1} festgesetzt. Insgesamt wurde der Spannungsbereich für jede Messung siebzimal abgefahren (70 scans), was 35 vollständigen Zyklen entspricht. Durch

die gewählte Geschwindigkeit war die Dauer eines kompletten Zyklus auf 130 Sekunden festgelegt. Nach etwa 15 Zyklen wurde das entsprechende Peptid über den Kammerdeckel direkt in das Innere der Messzelle injiziert. Nach Beendigung der Messung wurden die jeweiligen Zyklovoltamogramme ausgewertet.

3.6 Bildgebende Verfahren

3.6.1 FRAP

Für die FRAP-Versuche (fluorescence recovery after photobleaching) erfolgte die Membranbildung nicht auf Quarzkristallen, sondern auf dünnen Glasplättchen mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 0,2 mm. Zur Reinigung wurden die Glasplättchen in einer Lösung aus Wasserstoffperoxid und konzentrierter Schwefelsäure (1:3) für 15 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden sie zehnmal mit aqua dem. gespült. Eine zweite Inkubation im Ultraschallbad erfolgte für 15 Minuten in einer Lösung aus Wasserstoffperoxid/Ammoniak/Wasser (1:1:5), gefolgt von fünfzehnmalem Spülen mit aqua dem. und abschließender Trocknung bei 70°C.

Zur Beschichtung mit einer ersten Monoschicht wurden die Glasplättchen für 10 Minuten bei 70°C in einer Lösung aus Monochlorodimethyloktadecylsilan inkubiert, anschließend mit Chloroform und aqua dem. gespült und im Luftstrom getrocknet. Auf die erhaltene hydrophobe Monoschicht wurde eine zweite Schicht aus Phospholipiden analog den Quarzkristallen mittels der Langmuir-Blodgett-Technik aufgebracht. Bei den FRAP-Versuchen kamen DOPC bzw. DOPG zum Einsatz, jeweils mit und ohne 0,1 mol% Lipid II. Zusätzlich enthielten alle Filme den Fluoreszenzmarker NBD-PE (in Chloroform gelöst), der in einer Menge von 1 mol%, bezogen auf DOPC bzw. DOPG in den Film eingebaut wurde.

Alle Fluoreszenzbilder wurden von mir im Arbeitskreis von PD Dr. Ulrich Rothe in Halle/S. mit dem konfokalen LSM (laser scanning microscope) Leica DM IRE2 aufgenommen (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Als Objektiv wurde ein 63 × 1,4 Öl-Immersionsobjektiv bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm verwendet. Für die FRAP-Versuche wurden die Glasplättchen zunächst auf Objektträgern befestigt, diese eingespannt und ein geeigneter Ausschnitt des jeweiligen Filmes ausgewählt. Innerhalb des ausgewählten Feldes mit einer Größe von 81 × 70 µm² wurde die Fluoreszenz des NBD-PE auf einer Fläche von 53 × 49 µm² durch Bestrahlen dieses Bereichs mit einer starken Laserintensität für etwa 5 Sekunden gelöscht. Das Einströmen von Fluoreszenzpartikeln in das gebleichte Feld wurde zeitlich aufgelöst dokumentiert. Dabei erfolgten Fluoreszenzmessung und Bildaufnahme über 5 Minuten (1 Bild alle 30 Sekunden) bzw. über 25 Minuten (1 Bild alle 5 Minuten).

3.6.2 AFM

Die AFM-Aufnahmen (atomic force microscopy) wurden im Arbeitskreis von Prof. Udo Bakowsky (Phillips-Universität Marburg) angefertigt. Die Filme wurden, wie für die FRAP-Versuche beschrieben, auf Glasplättchen immobilisiert (ohne den Fluoreszenzmarker NBD-PE) und zeitnah vermessen. Genauere Angaben zum Prozedere der AFM-Aufnahmen finden sich unter [130].

3.7 Lantibiotika, andere Peptide und Lipid II

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lantibiotika und die Zellwandvorstufe Lipid II wurden mir dankenswerterweise in isolierter Form vom Arbeitskreis um Prof. Sahl zur Verfügung gestellt.

Um dem Leser dennoch die Möglichkeit zu geben, Einblicke in die Isolierung der Substanzen zu bekommen, wird auf die dazu existierende Literatur verwiesen (Tab. 4).

Lipid II wurde in einer Mischung aus Methanol und Chloroform (1:1) gelöst, so dass eine Stammlösung von 6,85 pmol/μL entstand. Die Stammlösungen der Peptide wiesen alle Konzentrationen von 300 μM auf und waren in 0,05%iger Essigsäure (Nisin, methyliertes Nisin, Gallidermin), 30%igem 2-Propanol (Mersacidin, Lacticin A1 und A2) oder Methanol (Mersacidin) gelöst. Die Lagerung aller Stammlösungen erfolgte bei -20°C.

Peptid	Stamm	Isolierung/Referenz
Nisin	<i>L. lactis</i> NIZO22186 [48]	Bonelli <i>et al.</i> [79]
Methyliertes Nisin	<i>L. lactis</i> NIZO22186	Dottavio-Martin & Ravel [131] Bonev <i>et al.</i> [70]
Mersacidin	<i>Bacillus</i> HIL Y-85,54728 [85]	Hoechst AG/Chatterjee <i>et al.</i> [132]
Gallidermin	<i>S. gallinarum</i> Tü 3928 [76]	Bonelli <i>et al.</i> [79]
Lacticin A1 und A2	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 [35]	Martin <i>et al.</i> [87] Wiedemann <i>et al.</i> [90]
Lipid II	Membranpräparationen aus <i>M. luteus</i> DSM 1790 [80]	Schneider <i>et al.</i> [133]

Tabelle 4: Eine Übersicht über die verwendeten Lantibiotika und Lipid II, ihre Produzentenstämme und die entsprechenden Referenzen mit Details zur Isolierung.

Die Reinheit des Lipid II lag bei 98%, die von Nisin und methyliertem Nisin bei 99%. Die einwandfreie Reinheit von Mersacidin, Gallidermin und Lacticin 3147 wurde mittels Mas-

senspektroskopie überprüft.

Nach Erreichen einer konstanten Frequenz (QCM) bzw. nach etwa 15 kompletten Zyklen (CV) wurden die verschiedenen Mengen der Stammlösungen so in die Messkammer injiziert, dass Peptidkonzentrationen von 15 nM und 1,5 µM, bezogen auf das jeweilige Kammer Volumen, erreicht wurden. Für die Bestimmung kinetischer Parameter wurden 10 µL der Stammlösung auf 3 ml verdünnt. Damit wurden konstante Peptidkonzentrationen von 10^{-6} mol L⁻¹ in das Durchflusssystem injiziert.

Als Vergleichssubstanz wurde die kommerziell erhältliche B-Kette des Insulin (oxidiert) verwendet. Das Peptid wurde unter Ultraschallbehandlung in 0,05%iger Essigsäure gelöst, die Konzentration der Stammlösung betrug ebenfalls 300 µM, die Lagerung erfolgte auch hier bei -20°C. Die Reinheit des Insulin lag bei $\geq 80\%$. Die Applikation des Peptides mit den entsprechenden Verdünnungen erfolgte ebenso wie für die Lantibiotika beschrieben.

3.8 Statistik

Alle Versuche wurden mehrfach wiederholt. Es wurde sichergestellt, dass der Stichprobenumfang $n \geq 3$ beträgt. Die in dieser Arbeit dargestellten Werte sind die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem ungepaarten Student'schen t-Test berechnet. Die Signifikanzebenen sind in den jeweiligen Darstellungen angegeben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die Untersuchung des Lantibiotikums Nisin

4.1.1 Die Bestimmung der kinetischen Bindungsparameter

Wie bereits ausführlich dargestellt, wurden bisher verschiedene Methoden angewendet, um den Wirkmechanismus des Nisins aufzuklären. Der Fokus lag dabei auf Endergebnissen der Untersuchungen, weniger auf den dabei ablaufenden Einzelprozessen. Die Kombination der Biosensortechniken QCM und CV erlaubt es, diese Lücke zu schließen und auch die Einzelprozesse der Bindung und der Porenbildung getrennt voneinander zu betrachten. Für das Bindungsverhalten von Nisin konnte bereits eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante ermittelt werden [46]. Welchen Einfluss die einzelnen Prozesse der Assoziation und Dissoziation auf die Gesamtbindungsfähigkeit haben, wurde dabei nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb mit Hilfe der QCM erstmalig k_{ass} und k_{diss} bestimmt, um das komplexe Bindungsverhalten des Nisins detailliert beschreiben zu können.

Alle Untersuchungen wurden an Modellmembranen durchgeführt, die über die „selfassembling“- und die Langmuir-Blodgett-Technik auf dem Quarzkristall immobilisiert wurden. Die Phospholipide für die Modellmembranen wurden in Anlehnung an experimentelle Arbeiten anderer Gruppen ausgewählt [46, 62, 70]. Auf die Hexadecanethiol-Einzelschicht wurde das ungeladene Phospholipid DOPC oder das negativ geladene DOPG übertragen. Anhand dieser beiden Phospholipide sollte die Auswirkung geladener Membranen auf die Bindung untersucht werden. Um die Bedeutung des Lipid II für den Bindungsschritt untersuchen zu können, enthielten die Modellmembranen 0,1 mol% der bakteriellen Zielstruktur. Der Einbau von Lipid II in DOPC und DOPG wurde durch die fluiden Phospholipide toleriert. Die beim Komprimieren der Phospholipid/Lipid II-Mischung aufgenommene Druckkurve ließ keine Clusterbildung und keine Phasentrennung erkennen.

Um nisinspezifische Bindungsschritte und –mechanismen zu erkennen, wurden zwei Vergleichspeptide eingesetzt. Durch reduktive Methylierung der Aminogruppen des Lysins sowie des N-Terminus erhält man das methylierte Nisin (NisinM). Dieses Peptid besitzt acht zusätzliche Methylgruppen, ist wie das nicht methylierte Nisin vierfach positiv geladen, zeigte aber in früheren Untersuchungen eine reduzierte Bindung an Membranen und keine Porenbildung [70].

Des Weiteren wurde die oxidierte B-Kette des Insulins als Vergleichspeptid verwendet. Dieses Peptid besteht aus 30 Aminosäuren und hat ein ähnliches Molekulargewicht wie Nisin (3496 Da). Es besitzt eine zweifach positive Nettoladung, hat aber im Gegensatz zu Nisin keine intramolekularen Ringe (Abb. 28). Eine spezifische Interaktion mit Lipid II, wie sie beim Nisin vorliegt, kann ausgeschlossen werden. Der Einfluss der positiven Nettola-

dung kann somit isoliert betrachtet werden.

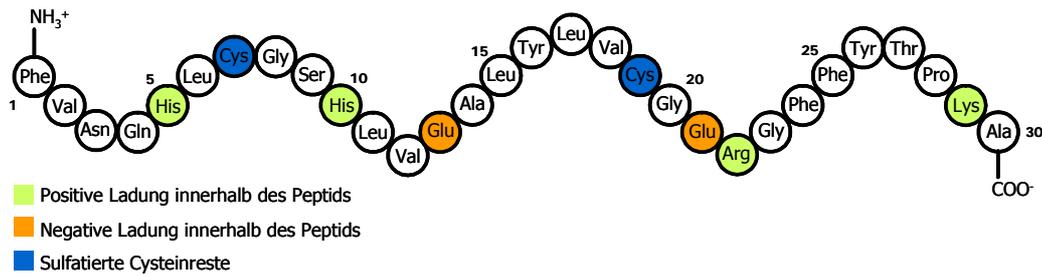


Abbildung 28: Die Struktur der oxidierten B-Kette des Insulins. Dargestellt sind die Ladungsverteilungen innerhalb des Peptids und die sulfatierten Cysteinreste.

Alle drei Peptide wurden nach Erreichen einer konstanten Frequenz in das Flusssystem injiziert. Aus den entsprechenden Frequenzänderungen konnten die kinetischen Bindungsparameter wie beschrieben berechnet werden. Tabelle 5 zeigt die Dissoziations-, Assoziations- und Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung von Nisin, methyliertem Nisin und Insulin (oxidierte B-Kette) an neutrale bzw. negativ geladene Modellmembranen ohne und mit 0,1 mol% Lipid II.

		$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{diss}} [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{D}} [\text{M}]$
NISIN	DOPC	751,96 $\pm 105,84$	$7,70 \cdot 10^{-4}$ $\pm 4,16 \cdot 10^{-5}$	$1,03 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,16 \cdot 10^{-7}$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	4676,58 $\pm 307,47^{\dagger}$	$1,77 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,95 \cdot 10^{-4}^{\dagger}$	$2,68 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,74 \cdot 10^{-7}^{\dagger}$
	DOPG	652,80 $\pm 119,94$	$2,00 \cdot 10^{-4}$ $\pm 7,50 \cdot 10^{-5}$	$3,13 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,34 \cdot 10^{-7}^{\diamond}$
	DOPG/ 0,1 mol% Lipid II	643,83 $\pm 255,64$	$1,58 \cdot 10^{-4}$ $\pm 9,43 \cdot 10^{-5}^{\diamond}$	$2,11 \cdot 10^{-7}$ $\pm 9,93 \cdot 10^{-8}$
NISINM	DOPC	2257,94 $\pm 1001,81^{\#}$	$2,44 \cdot 10^{-3}$ $\pm 5,26 \cdot 10^{-4}^{\#}$	$1,42 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4,26 \cdot 10^{-7}$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	2430,05 $\pm 271,85^{\#}$	$1,58 \cdot 10^{-3}$ $\pm 6,43 \cdot 10^{-4}$	$7,17 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,96 \cdot 10^{-7}^{\# \dagger}$
	DOPG	1137,45 $\pm 582,95^{\#}$	$3,26 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,53 \cdot 10^{-3}$	$1,76 \cdot 10^{-6}$ $\pm 5,14 \cdot 10^{-7}^{\#}$
	DOPG/ 0,1 mol% Lipid II	1708,10 $\pm 706,82^{\#}$	$1,43 \cdot 10^{-4}$ $\pm 9,02 \cdot 10^{-5}^{\diamond \dagger}$	$1,38 \cdot 10^{-7}$ $\pm 7,29 \cdot 10^{-8}^{\diamond \dagger}$

INSULIN	DOPC	535,92 ± 246,57	$6,33 \cdot 10^{-4}$ ± $2,99 \cdot 10^{-4}$	$1,62 \cdot 10^{-6}$ ± $1,50 \cdot 10^{-6}$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	2431,21 ± 1350,04 [#]	$1,81 \cdot 10^{-3}$ ± $2,84 \cdot 10^{-4}$ [†]	$1,34 \cdot 10^{-6}$ ± $5,98 \cdot 10^{-7}$ [#]
	DOPG	1440,67 ± 329,60 ^{#◊}	$1,99 \cdot 10^{-3}$ ± $1,11 \cdot 10^{-3}$ [#]	$2,59 \cdot 10^{-6}$ ± $1,76 \cdot 10^{-6}$
	DOPG/ 0,1 mol% Lipid II	2118,65 ± 264,32 ^{#†}	$1,27 \cdot 10^{-3}$ ± $6,01 \cdot 10^{-4}$ [#]	$6,19 \cdot 10^{-7}$ ± $2,98 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 5: Die kinetischen Bindungsparameter von Nisin, NisinM und Insulin (B-Kette, oxidiert) an Modellmembranen aus DOPC bzw. DOPG ohne und mit 0,1 mol% Lipid II. Nisin zeigt eine Lipid II-abhängige Kinetik an neutralen Membranen. Der Einfluss von Lipid II ist an DOPG-Membranen durch die negative Ladung überdeckt. Methyliertes Nisin zeigt unabhängig von der Ladung der Membran eine verlangsamte Dissoziation in Gegenwart von Lipid II. Wie erwartet, hat die Gegenwart von Lipid II keinen Einfluss auf die Bindungskinetik des Insulins. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für NisinM und Insulin im Vergleich zu Nisin mit [#], für DOPG im Vergleich zu DOPC mit [◊] und für Lipid II-haltige im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit [†] markiert.

Betrachtet man zunächst nur das Nisin, so fällt für DOPC-Membranen eine starke Lipid II-Abhängigkeit der Bindungsintensität auf. Die Bindung ist in Gegenwart von Lipid II etwa vierfach stärker als ohne Lipid II. Ursache dafür ist eine sechsfach stärkere Assoziation an Lipid II-haltigen Membranen. Eine zweifach schnellere Dissoziation an diesen Filmen im Vergleich zu reinen DOPC-Membranen beeinflusst die Gesamtbindungsfähigkeit geringfügig und lässt sich durch eine Aufkonzentration des Nisins an der Membran aufgrund der stärkeren Assoziation erklären. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante von $2,68 \cdot 10^{-7}$ M für Nisin an Lipid II-haltigen DOPC-Membranen stimmt sehr gut mit einer von Wiedemann *et al.* veröffentlichten k_D überein ($2 \cdot 10^{-7}$ M) [46]. Mikromolare Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wie die des Nisins liegen im mittleren Bereich bekannter Bindungskonstanten [134]. Der k_D -Wert der stärksten bekannten Protein-Ligand-Bindung zwischen Avidin und Biotin liegt zum Vergleich bei 10^{-15} M [135].

Die Bindungskonstanten k_D von Nisin an negativ geladenen Filmen ohne und mit Lipid II liegen im Bereich der Bindung des Peptids an DOPC/Lipid II ($3,13 \cdot 10^{-7}$ M und $2,11 \cdot 10^{-7}$ M). Allerdings ist die Assoziation an diesen Filmen nicht annähernd so stark ausgeprägt, sondern liegt im Bereich reiner DOPC-Filme. Die Ursache der starken Bindung ist die im Vergleich zu reinen DOPC-Membranen um ein Vierfaches verlangsamte Dissoziation. Es ist anzunehmen, dass das Nisin durch die ladungsinduzierten Interaktionen sehr viel stärker an der Membranoberfläche gebunden ist. Die negative Ladung der DOPG-

Membran überdeckt auch eine Lipid II-abhängige verstärkte Bindung, wie sie an neutralen DOPC-Membranen zu beobachten ist.

Die Affinität des methylierten Nisins zu reinen DOPC-Filmen liegt mit einer k_D von $1,42 \cdot 10^{-6}$ M im gleichen Größenbereich wie die des nicht methylierten Peptids. Eine stärkere Assoziation wird durch eine schnellere Dissoziation nivelliert. Auch bei NisinM lässt sich an neutralen Membranen eine Lipid II-Abhängigkeit der Bindung erkennen. Im Vergleich zu reinen DOPC-Filmen ist die Bindung an Lipid II-haltige Membranen auf das Doppelte erhöht, bedingt durch eine leicht stärkere Assoziation und eine etwas langsamere Dissoziation. Verglichen mit Nisin ist k_{ass} aber nur halb so groß und die Gesamtbindung der methylierten Variante schwächer.

Die Bindung von NisinM an reine DOPG-Membranen ist zehnfach schwächer als die von Nisin. Einer um den Faktor 2 größeren Assoziation steht eine zehnfach schnellere Dissoziation gegenüber. Es ist vorstellbar, dass die zusätzlichen Methylgruppen, die sich überwiegend an positiv geladenen Lysinresten befinden, die Ladung des Lantibiotikums maskieren und dementsprechend die ladungsinduzierte Wechselwirkung zwischen Modellmembran und Peptid verringern. Interessanterweise lässt sich für NisinM, im Gegensatz zu Nisin, eine Lipid II-Abhängigkeit an negativ geladenen Membranen erkennen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante k_D liegt im Bereich des Nisins ($1,38 \cdot 10^{-7}$ M vs. $2,11 \cdot 10^{-7}$ M) und ist damit auch zehnfach höher als für NisinM an Lipid II-freien Membranen. Der verringerten ladungsinduzierten Interaktion ist hier die spezifische Peptid-Lipid II-Interaktion überlagert.

Insulin als Peptid mit fehlendem Lipid II-Bindungsmotiv zeigt lediglich an reinen DOPC-Filmen mit Nisin vergleichbare k_{ass} -, k_{diss} - und k_D -Werte. Hier kann von einer ähnlichen unspezifischen Anlagerung beider Peptide an die Membran ausgegangen werden. Für alle anderen Membranen ist die Bindungsfähigkeit von Insulin bis zum Zehnfachen schlechter. Für DOPC/Lipid II liegt die Ursache in einer fehlenden spezifischen Bindung an Lipid II und damit einer geringeren Assoziationskonstante. Interessanterweise ist die Assoziation an negativ geladenen Filmen stärker ausgeprägt als für Nisin. Möglicherweise ist durch die fehlenden intramolekularen Brücken der konformelle Zwang für das Insulin geringer, was vermehrte Ladungsinteraktionen ermöglicht. Trotz größerer Anzahl ladungsinduzierter Interaktionen ist deren Intensität geringer, die Peptide können deutlich schneller von der Membran dissoziieren, was in einer insgesamt schlechteren Bindung resultiert.

Die Bestimmung der kinetischen Bindungskonstanten hat gezeigt, dass die Quarzwaage eine sehr gut geeignete Technik ist, um Bindungsprozesse zu verfolgen. Zusätzlich zu der Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten konnten erstmalig auch die Asso-

ziation und Dissoziation als Einzelprozesse des Bindungsschritts betrachtet werden. Es wurde deutlich, dass beide Prozesse die Bindungskinetik unterschiedlich stark beeinflussen. Ergänzend zu bisherigen Erkenntnissen zum Wirkmechanismus des Nisins konnte detailliert gezeigt werden, welchen Einfluss die Membran auf die einzelnen Bindungsschritte hat.

4.1.2 Die Bestimmung von absoluten Frequenz- und Dämpfungsänderungen

Die bessere Bindung eines Peptids an Membranen ist durch eine verstärkte Assoziation und / oder durch eine verlangsamte Dissoziation bedingt. In beiden Fällen sollte sich eine größere Menge gebundener Peptide ergeben. Entsprechend der Sauerbrey-Gleichung ist eine verstärkte Masseanlagerung durch eine erhöhte Frequenzabnahme zu erkennen. Die günstigeren Bindungskonstanten von Nisin an Membranen mit negativen Ladungen oder mit Lipid II deuten darauf hin, dass sich das Peptid in diesen Fällen in größeren Mengen an der Membran befindet. Entsprechend sollten größere Frequenzabnahmen zu beobachten sein. Abbildung 29 zeigt die Frequenzänderungen der QCM-Messungen nach Peptidzugabe. In Analogie zu Untersuchungen anderer Gruppen wurden Peptidmengen gewählt, die den wirksamen Konzentrationen an Modellmembranen ohne und mit Lipid II entsprechen.

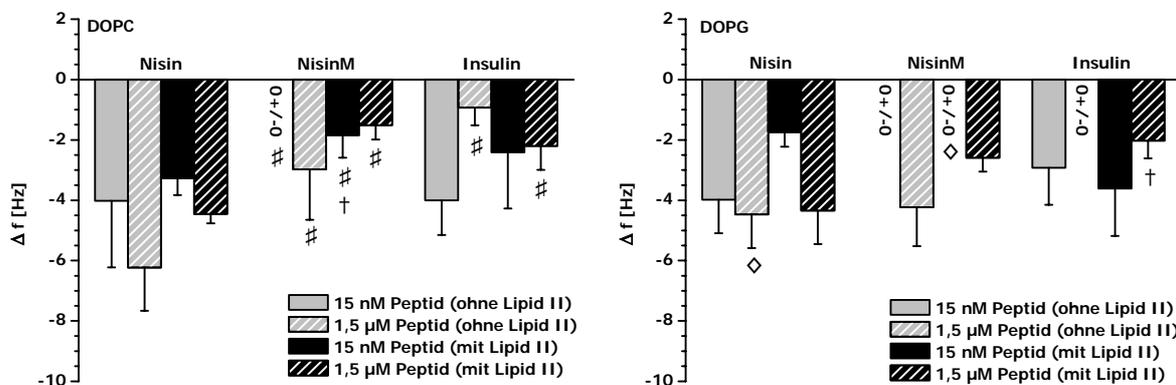


Abbildung 29: Die absoluten Frequenzänderungen der mit verschiedenen Modellmembranen beschichteten Quarzkristalle nach Zugabe von Nisin, NisinM oder Insulin. Trotz Abhängigkeit der Bindungskonstanten von der Gegenwart negativ geladener Phospholipide oder der Anwesenheit von Lipid II korreliert dies nicht mit den absolut gebundenen Peptidmengen. Alle Frequenzänderungen befinden sich unabhängig von der Modellmembran oder der Peptidkonzentration im selben Größenbereich. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für NisinM und Insulin im Vergleich zu Nisin mit #, für DOPG im Vergleich zu DOPC mit ◇ und für Lipid II-haltige im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit + markiert.

Entgegen den Erwartungen lässt sich bei keinem der Peptide eine Abhängigkeit der absolut gebundenen Menge von der Ladung der Membran oder der Anwesenheit von Lipid II

erkennen. Die Frequenzänderungen liegen für Nisin alle im selben Größenbereich. Aufgrund der vorhandenen Unterschiede in den Bindungskonstanten kann man annehmen, dass die absolut gebundenen Peptidmengen nicht mit den Bindungskonstanten zu korrelieren sind. Mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung ist es möglich, die absolut an die Modellmembran gebundenen Peptidmoleküle zu bestimmen. Unter Berücksichtigung der sensitiven Fläche und der Resonanzfrequenz des Quarzkristalls entspricht in diesem Fall eine Frequenzänderung um ein Hertz einer Masseänderung von 1,24 ng. Damit ergeben sich für das Nisin aus den Frequenzänderungen in Abbildung 29 Masseänderungen an DOPC-Membranen von 4,05 ng bis 7,73 ng bzw. 1,22 pmol bis 2,32 pmol. Über die Konzentrationsangaben kann man auch das Verhältnis von Nisin zu Lipid II auf der Sensoroberfläche bestimmen. Legt man den mittleren Kopfgruppenbedarf von Phospholipiden mit 40 \AA^2 zugrunde, ist die aktive Sensorfläche ($0,28 \text{ cm}^2$) mit rund $7 \cdot 10^{13}$ Phospholipidmolekülen belegt. Die Zahl des darin enthaltenen 0,1 mol% Lipid II liegt bei $7 \cdot 10^{10}$ Molekülen, was einer Konzentration von 0,12 pmol entspricht. Das Verhältnis von Nisin zu Lipid II liegt damit im nM-Bereich bei 10:1 und im μM -Bereich bei 20:1. Literaturangaben gehen von einem Nisin/Lipid II-Verhältnis von 2:1 aus [68]. Das in der vorliegenden Arbeit berechnete Verhältnis stimmt damit nicht überein. Einem Molekül Lipid II entsprechen deutlich mehr Nisinmoleküle. Damit befinden sich in diesem Fall mehr Nisinmoleküle an der Membranoberfläche, als für eine potenzielle Porenbildung notwendig sind. Aktuelle Veröffentlichungen von Hasper *et al.* berichten von einem weiteren Wirkmechanismus des Nisins [136]. Das Peptid bindet nicht nur an die Lipid II-Moleküle, die zur Porenbildung notwendig sind. Es rekrutiert zusätzliche Lipid II-Moleküle aus der Membran, insbesondere im Bereich sich teilender Zellen. Sowohl in unilamellaren Vesikeln, als auch in bakteriellen Membranen lassen sich nach der Zugabe von Nisin und Lantibiotika mit ähnlichem Bindungsmotiv deutliche punktförmige Ansammlungen von Lipid II erkennen. Andere Bereiche der Membranen verarmen an Lipid II. Durch das fehlende bzw. durch die Lantibiotika gebundene Lipid II kann die Zellwandbiosynthese nicht mehr korrekt ausgeführt werden und es kommt zum Absterben der Bakterien. Untersuchungen mit markiertem Nisin haben gezeigt, dass die beobachteten Ansammlungen auch größere Mengen Nisin enthalten. Eine durch die Rekrutierung von Lipid II bedingte Ansammlung einer Vielzahl von Nisinmolekülen würde auch das in der vorliegenden Arbeit berechnete Verhältnis des Peptids zu Lipid II erklären. Im Gegensatz zu bakteriellen Membranen enthalten die Modellmembranen nur eine begrenzte Menge an Lipid II, das sich punktförmig in der Membran ansammeln kann. Eine deutlich größere Menge an Nisin in diesen Ansammlungen führt zu einem größeren Mengenverhältnis von Nisin und Lipid II. Die vermehrte Anzahl an Nisinmolekülen beeinflusst aber nicht die Wirkung des Lantibiotikums, wie die mit den Literaturdaten [46]

übereinstimmenden Bindungskonstanten zeigen.

Die Frequenzänderung nach Zugabe von methyliertem Nisin zeigt für DOPC-Membranen etwas kleinere Werte als nach Nisinzugabe. Damit wird die in den Kinetikversuchen gezeigte geringere Bindungsfähigkeit des NisinM bestätigt. Analoge Aussagen lassen sich für DOPG-Filme treffen, die Frequenzabnahme ist größtenteils geringer als bei Nisin. Die nM-Konzentrationen reichen in diesem Fall nicht aus, um deutliche Frequenzabnahmen hervorzurufen. Wie für das Nisin, lässt sich auch bei der Bestimmung der absolut gebundenen Mengen NisinM keine Abhängigkeit von der Anwesenheit des Lipid II erkennen.

Die Frequenzabnahmen nach Zugabe von Insulin fallen geringer aus als nach Zugabe von Nisin. Auch hier werden die im Vergleich zu Nisin größeren k_D -Werte und damit die reduzierte Bindungsfähigkeit bestätigt. Die in den kinetischen Untersuchungen gezeigte stärkere Bindungsfähigkeit des Insulins an negativ geladene Membranen ließ sich mit dieser Methode nicht bestätigen. Wie erwartet, zeigte sich auch kein Unterschied zwischen Filmen mit und ohne Lipid II. Schwer erklärbar ist die geringere Masseauflagerung nach Zugabe der μM -Insulinkonzentrationen zu den reinen Filmen. Vorstellbar wären Interaktionen und gegenseitige Behinderungen zwischen den einzelnen Molekülen aufgrund der langgestreckten Gestalt des Peptids, die eine Anhaftung an die Membranen erschweren.

Zur Charakterisierung der Peptidbindung an Modellmembranen wurden neben den Frequenz- auch die Dämpfungsänderungen bestimmt. Um eine bessere Auswertung zu ermöglichen, wurden die Dämpfungs- gegen die Frequenzwerte aufgetragen und der Anstieg der entsprechenden Geraden bestimmt. Tabelle 6 zeigt die Beträge der Anstiege aus den D/f-Graphen. Neben den Werten nach Peptidanlagerung sind auch die D/f-Anstiege der reinen Filme aufgeführt.

Betrachtet man zunächst nur die reinen Filme, so fällt auf, dass die Beträge der Anstiege für DOPC- und DOPG-Membranen größer sind als in Anwesenheit von Lipid II. Die Zielstruktur der Lantibiotika scheint die Dämpfung des Filmes zu verringern und eine rigidisierende Wirkung auf Membranen zu haben. Ein ähnlicher Effekt auf Membranen ist für Cholesterol bekannt. Vergleichende Messungen an DOPC- und DOPG-Filmen mit 0,1 mol% Cholesterol anstelle von Lipid II zeigten ebenfalls einen verringerten Betrag des D/f-Anstiegs ($0,300 \pm 0,149$ für DOPC/Cholesterol bzw. $0,270 \pm 0,149$ für DOPG/Cholesterol). Die Zugabe der Peptide verändert die Anstiege in Richtung einer stärkeren bzw. schwächeren Dämpfung der Quarzschwingung. Die Anlagerung von methyliertem Nisin und Insulin an DOPC zeigt eine konzentrationsabhängige stärkere Dämpfung als der Film ohne Peptidzugabe. Die bis zu 1,5fach stärkeren Anstiegswerte kennzeichnen eine lose Auflagerung der Peptide auf die Membranen.

	DOPC	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	DOPG	DOPG/ 0,1 mol% Lipid II
KEIN PEPTID	0,518 ± 0,064	0,456 ± 0,079	0,574 ± 0,117	0,465 ± 0,212
15 nM NISIN	0,732 ± 0,213	0,783 ± 0,167	1,033 ± 0,367	1,635 ± 0,240 [◇]
1,5 µM NISIN	0,594 ± 0,214	1,494 ± 0,360 [†]	2,902 ± 1,501	1,043 ± 0,295
15 nM NISINM	0,528 ± 0,045	0,146 ± 0,066 ^{#†}	0,302 ± 0,029 ^{#◇}	0,640 ± 0,342 [#]
1,5 µM NISINM	1,606 ± 0,389 [#]	0,301 ± 0,149 ^{#†}	0,331 ± 0,193 [#]	0,855 ± 0,387 [◇]
15 nM INSULIN	0,673 ± 0,300	0,660 ± 0,240	0,355 ± 0,155 [#]	0,592 ± 0,388 [#]
1,5 µM INSULIN	0,751 ± 0,077	0,986 ± 0,626	0,613 ± 0,144	0,630 ± 0,280

Tabelle 6: Die Anstiege der Dämpfungs-Frequenz-Graphen nach Anlagerung von Nisin, NisinM und Insulin (B-Kette, oxidiert) an Modellmembranen aus DOPC bzw. DOPG ohne und mit 0,1 mol% Lipid II. Generell verringert die Zugabe von Lipid II die dämpfende Wirkung der Membranen und stabilisiert sie damit. NisinM und Insulin wirken auf DOPG-Membranen ähnlich stabilisierend. Gibt man Nisin zu reinen DOPG-Membranen, so ist eine starke Zunahme der Viskosität zu erkennen, die eine zusätzliche Auflagerung von Peptidmolekülen impliziert. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für NisinM und Insulin im Vergleich zu Nisin mit [#], für DOPG im Vergleich zu DOPC mit [◇] und für Lipid II-haltige im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit [†] markiert.

Im Gegensatz dazu sind beide Peptide relativ dicht an der Membranoberfläche von reinen DOPG-Filmen. Diese Filme dämpfen den Quarz weniger stark, wie es anhand der D/f-Anstiege zu erkennen ist. Eine durch Ladungsinteraktionen induzierte Stabilisierung der negativ geladenen Filme kann angenommen werden. Enthält die DOPG-Membran Lipid II, so wird der Quarz nach Peptidzugabe stärker gedämpft. Es ist wahrscheinlich, dass die Peptide durch die Targetsubstanz daran gehindert werden, dicht an die Quarz- und damit auch Membranoberfläche zu gelangen. Eine Stabilisierung der DOPG/Lipid II-Membranen in gleichem Ausmaß wie reine DOPG-Membranen ist damit nicht mehr gegeben.

Nach Zugabe von NisinM zu Lipid II-haltigen DOPC-Membranen zeigt sich eine im Vergleich zum reinen DOPC geringere Dämpfung. Ursachen hierfür können eine geringere Menge angelagerten Peptids oder bei größeren Peptidmengen eine stärkere Interaktion mit der Membran sein. Als wahrscheinlicher gilt die zweite Möglichkeit. NisinM besitzt das Lipid II-Bindungsmotiv, gelangt daher durch die Lipid II-Peptid-Interaktion näher an die Sensoroberfläche und kann eventuell die Membran zusätzlich stabilisieren.

Die mit DOPC/Lipid II-Filmen beschichteten Quarze werden nach Zugabe von Insulin stärker gedämpft als nach Zugabe von NisinM. Hier wird deutlich, dass Insulin das Lipid II-

Bindungsmotiv nicht aufweist, daher nicht mit diesem interagiert oder den Film stabilisiert und nur lose auf der Oberfläche des Films liegt.

Die D/f-Anstiege zeigen für Nisin ein stark abweichendes Verhalten im Vergleich zu den beiden anderen Peptiden. Auffällig ist zunächst, dass für alle Filme eine stärker dämpfende Wirkung nach Peptidzugabe zu verzeichnen war. Damit ist auch eine zunehmende Viskosität der Filme anzunehmen. Im Gegensatz zu NisinM zeigt sich bei Nisin keine Abnahme der D/f-Anstiege, wenn die neutrale Membran Lipid II enthält. Da die Bindung von Nisin an DOPC/Lipid II stärker ist als für NisinM, ist es wahrscheinlich, dass mehr Moleküle die Membran erreichen. Die Berechnung der absolut gebundenen Nisinmengen hat auch gezeigt, dass mehr Nisin gebunden wird, als eigentlich für die Porenbildung notwendig ist. Zusätzlich gebundene Peptide, die nicht in die Permeabilisierung der Membran eingebunden sind, lagern sich an der Oberfläche der Membran ab. Die damit verbundene Erhöhung der Membrandicke führt zu einer Zunahme der Dämpfung.

Während bei NisinM und Insulin der D/f-Anstieg bei Zugabe zu DOPG-Filmen geringer als bei Zugabe zu DOPC-Filmen war, ist es im Fall des Nisins genau umgekehrt. Für 1,5 μM Nisin ist der D/f-Anstieg an DOPG fast fünfmal so hoch wie an DOPC. Aufgrund der sehr starken Bindung von Nisin an DOPG sind in diesem Fall mehr Moleküle an der Membranoberfläche lokalisiert. Diese Tatsache an sich bewirkt schon eine stärkere Dämpfung. Zum anderen impliziert der große Anstieg eine stark viskose Oberflächenstruktur, wie sie üblicherweise durch größere molekulare Assoziate verursacht wird. Frühere Untersuchungen zeigten, dass positiv geladene Peptide nach Kontakt mit negativ geladenen Membranen Phospholipide herauslösen und molekulare Assoziate bilden können. Dieser bereits in Kapitel 2.3.1.2 als „carpet mechanism“ beschriebene Vorgang wurde beispielsweise auch für das AMP Pardaxin beobachtet [137]. Es kann angenommen werden, dass die Ursache der starken D/f-Anstiege der Dämpfung nach Zugabe von Nisin zu Lipid II-freien DOPG-Membranen in der Ausbildung solcher Assoziate liegt. Zur Bestätigung dieser Vermutung sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Der „carpet mechanism“ ist in Gegenwart von Lipid II nicht von Bedeutung, da das Herauslösen von Molekülen durch die stabilisierende Wirkung des Lipid II nicht möglich ist. Erkennbar ist dies an einem deutlich geringeren D/f-Anstieg nach Nisinzugabe an DOPG/Lipid II-Filmen.

Die Bestimmung der absoluten Frequenz- und Dämpfungsänderungen zeigt, dass sich die absolut gebundenen Peptidmengen nicht mit den Bindungskonstanten korrelieren lassen. Die Frequenzabnahmen liegen unabhängig von der Membran alle im selben Bereich. Dagegen zeigen die dargestellten Ergebnisse der Dämpfungsanalyse, dass dieser Aspekt

der Quarzwaage wertvolle Aussagen über die Eigenschaften der Modellmembranen liefert, die in dieser Art bisher nicht getroffen werden konnten. Veränderungen der viskoelastischen Eigenschaften der Modellmembranen nach der Peptidzugabe können gut erkannt werden und sind auf die Interaktion zwischen den Peptiden und der Membran zurückzuführen. Ähnlich wie bei der Bindungsanalyse ist die Abhängigkeit der Interaktion von der Zusammensetzung der Membran zu erkennen.

4.1.3 Bildgebungsverfahren zur Charakterisierung der Nisinwirkung

Um zu untersuchen, inwieweit die anhand der Dämpfungsanalyse postulierte Ausbildung molekularer Assoziate an der Modellmembran untermauert werden kann, wurden AFM-Aufnahmen angefertigt. Die Filme wurden dafür auf Glasplättchen immobilisiert. Zu einigen Filmen wurde Nisin zugegeben, um mögliche Veränderungen der Filmstruktur durch das Peptid zu erkennen. Die Filme wurden zeitnah zur Immobilisierung bzw. zur Nisinbehandlung vermessen. Abbildung 30 zeigt beispielhaft einige AFM-Aufnahmen verschiedener Modellmembranen.

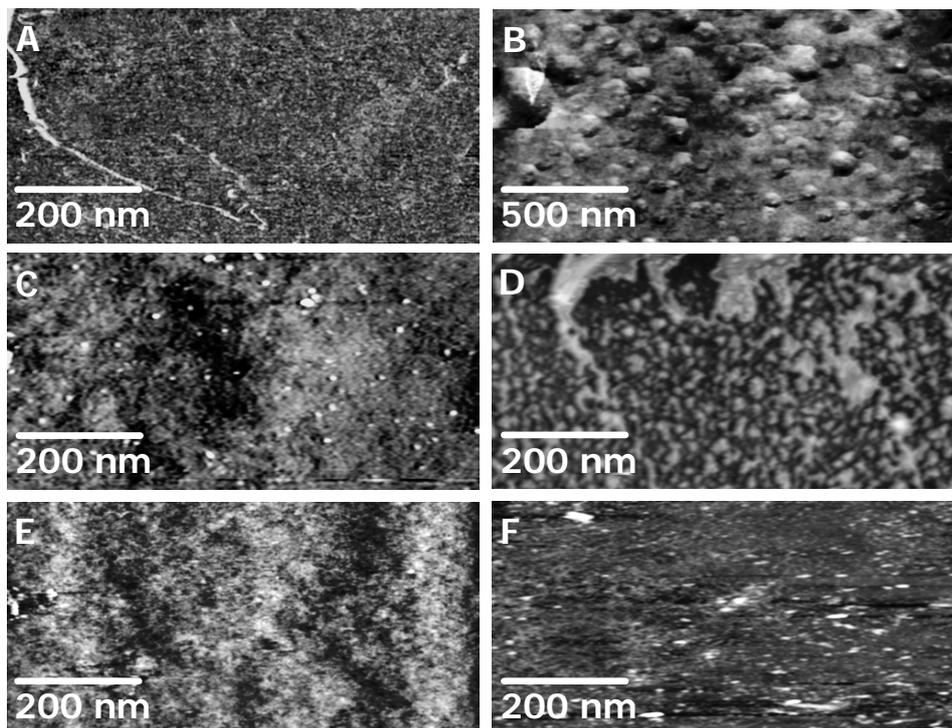


Abbildung 30: AFM-Aufnahmen verschiedener Modellmembranen vor und nach Zugabe von Nisin. A) Reines DOPG. B) DOPG nach Zugabe von Nisin; C) DOPG/Lipid II; D) DOPG/Lipid II nach Zugabe von Nisin; E) Reines DOPC; F) DOPC nach Zugabe von Nisin.

Wie in den Abbildungen 30 A und 30 E zu erkennen ist, liegen die reinen Phospholipidfilme

als homogene Schichten vor. Auch in Anwesenheit von 0,1 mol% Lipid II (Abb. 30 C) ist keine Clusterung in den Membranen zu erkennen. Gibt man Nisin zu DOPG-Membranen, so sind deutlich die entstehenden Vesikel zu erkennen (Abb. 30 B). Sie sind gleichmäßig über den Film verteilt und stehen auch noch in Kontakt mit der Filmoberfläche. Dass für die Vesikelbildung die Ladung der DOPG-Membran verantwortlich ist, zeigt Abbildung 30 F. Die Zugabe von Nisin zu DOPC bewirkt keinerlei Vesikelbildung. Auch an DOPG/Lipid II-Membranen sind keine Assoziate zu beobachten (Abb. 30 D). Damit bestätigen die AFM-Aufnahmen die membranstabilisierende Wirkung von Lipid II.

Dem Lipid II kommt so neben der Funktion als Targetstruktur für Nisin und andere Antibiotika sowie als Bestandteil der Pore noch eine dritte Funktion innerhalb der Membran zu. In Monoschichten ragt der hydrophobe Bactoprenolteil des Lipid II über die Schicht hinaus. Da eine Membran aber aus zwei Monoschichten besteht, ist anzunehmen, dass Lipid II den Kontakt zwischen beiden Einzelschichten verstärkt. Eine vertikale Diffusion der Matrixmoleküle könnte so reduziert sein.

Um dies zu untersuchen, wurde die in Kapitel 3.6 beschriebene FRAP-Technik eingesetzt. Baut man in Modellmembranen fluoreszenzmarkierte Phospholipide ein, so kann man die Beweglichkeit der Phospholipide verfolgen. In Abbildung 31 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu sehen, welche die Diffusion von markierten Phospholipiden in ein zuvor gebleichtes Feld zeigen. Die Diffusion wurde über 25 min aufgenommen.

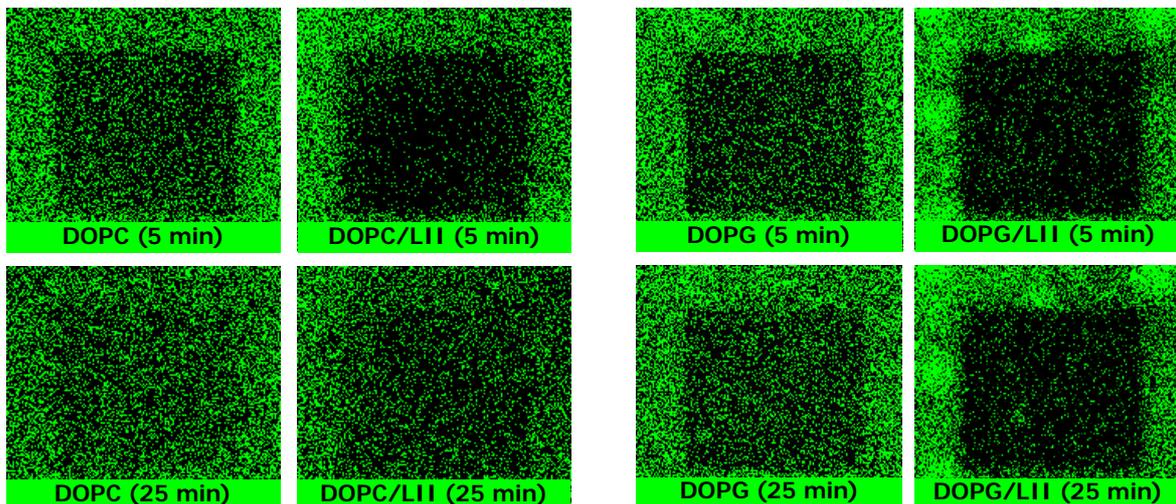


Abbildung 31: Die Diffusion fluoreszenzmarkierter Phospholipide in gebleichte Bereiche von DOPC- und DOPG-Membranen ohne und mit Lipid II. Die Bilder zeigen die Zustände jeweils 5 und 25 min nach dem Bleichen.

Abgebildet sind die repräsentativen Zustände nach 5 und 25 min. Die Zeiten dazwischen und der Ausgangszustand mit fehlender Fluoreszenz im gebleichten Bereich sind nicht

dargestellt.

Trotz leichter Unterschiede zwischen DOPC und DOPG zeigte sich deutlich die erwartete Reduzierung der Lateraldiffusion der Phospholipide in Anwesenheit von Lipid II und damit auch wieder dessen stabilisierende Wirkung. Die Diffusionsfähigkeit der DOPG-Moleküle ist geringer als die der DOPC-Moleküle, was sich in einer insgesamt schwächeren Fluoreszenz innerhalb der gebleichten Fläche äußert.

Die stabilisierende Wirkung des Lipid II auf die Membranen bedeutet aber nicht, dass sich das bakterielle Target oder die Phospholipide in einem statischen Zustand befinden, der eine Porenbildung verhindern würde. Ein dynamischer Kontakt zwischen den hydrophoben Bereichen des Lipid II und den Phospholipiden ist weiterhin gegeben.

Zur Unterstützung dieser Aussagen wurde in einem zweiten FRAP-Versuch die Zunahme der Pixelintensität innerhalb des gebleichten Bereichs alle 30 s in den ersten fünf Minuten bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Zeit aufgetragen und der Anstieg der Geraden bestimmt. Je höher der Anstieg, desto ausgeprägter die Diffusion der Matrixlipide. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 7 aufgelistet.

	reines Phospholipid	Phospholipid/Lipid II
DOPC	$2,62 \cdot 10^{-2} \pm 1,94 \cdot 10^{-2}$	$1,49 \cdot 10^{-2} \pm 7,78 \cdot 10^{-5}$
DOPG	$5,03 \cdot 10^{-3} \pm 3,68 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 7: Weiterführende Untersuchungen zur membranstabilisierenden Wirkung von Lipid II. Dargestellt ist der aus der Fluoreszenz-Zeit-Geraden ermittelte Anstieg. In Gegenwart von Lipid II ist die laterale Diffusion verringert. Der membranstabilisierende Effekt ist an DOPG-Membranen stärker ausgeprägt.

Auch hier zeigt sich die reduzierte laterale Diffusion an DOPC-Membranen in Anwesenheit von Lipid II. Die Diffusion in das gebleichte Feld ist um etwa 45% verringert. Der Einfluss von Lipid II an DOPG-Membranen ist deutlich ausgeprägter. Die Diffusion ist in Anwesenheit von Lipid II um etwa 75% reduziert.

Die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren stellen eine wertvolle Ergänzung zur Quarzmikrowaage dar. Hinweise und Postulate, die sich aus den QCM-Ergebnissen ergeben, können mit Hilfe der FRAP-Technik und der AFM überzeugend bestätigt werden.

4.1.4 CV-Untersuchungen zur Beobachtung nisininduzierter Porenbildung

Die Zyklische Voltammetrie wurde zur Detektion veränderter Membranpermeabilitäten eingesetzt. Das umfasst neben der Porenbildung auch eine veränderte Phospholipidord-

nung innerhalb der Membranen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die in Kapitel 2.9 besprochene übliche Auswertung über I_p und U_p für Elektroden, die mit Modellmembranen beschichtet sind, nicht immer angewendet werden kann [128].

In Abbildung 32 A ist der Verlauf der Stromstärke an blanken Elektroden und solchen mit Mono- und Bischichten dargestellt. Bereits die Ausbildung einer ersten Einzelschicht auf der Elektrode isoliert diese gegenüber dem Elektronentransfer so stark, dass keine Peakströme mehr zu beobachten sind.

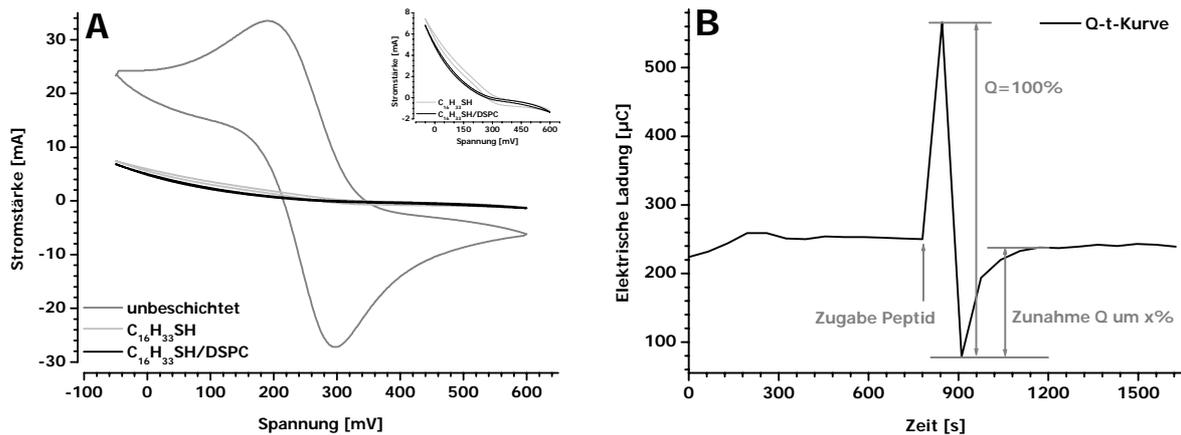


Abbildung 32: Die Auswertung zyklischer Voltammogramme. A) Das Zykelvoltammogramm an einer unbeschichteten Goldelektrode zeigt den typischen Kurvenverlauf. Die Beschichtung der Elektrode führt zu einem deutlich verminderten Stromfluss. B) Da die übliche Auswertung des Zykelvoltammogramms nicht möglich ist, wurde die Fläche zwischen den Kurven jedes kompletten Zyklus berechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

Alternativ zur üblichen Auswertung der Zykelvoltammogramme wurde deshalb die Fläche zwischen zwei Scans integriert. Die Fläche als Maß für die elektrische Ladung wird durch die Spannung und die Stromstärke bestimmt. Der Spannungsbereich von -0,05 und 0,6 V ist für jeden Scan konstant. Veränderungen der berechneten Fläche resultieren daher ausschließlich aus veränderlichen Stromstärken. Die elektrische Ladung wurde gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 32 B). Das Einspritzen der Peptide in die Messzelle bewirkte eine kurzzeitige Permeabilitätsänderung innerhalb der Membranen. Der anschließend durch das Peptid verursachte Anstieg der Stromstärke als Zeichen für eine erhöhte Permeabilität der Membran wurde in Prozent berechnet.

In Abbildung 33 sind die so berechneten veränderlichen Permeabilitäten als Stromanstieg in Prozent für Nisin, NisinM und Insulin nach Zugabe zu DOPC- und DOPG-Membranen ohne und mit Lipid II dargestellt. An nicht geladenen und Lipid II-freien Membranen kommt es nach Zugabe von Nisin nur zu einem geringen Anstieg der Stromstärke. Folglich ist die Permeabilität der Membran nur leicht erhöht. Der Einbau von 0,1 mol% Lipid II er-

hört die Permeabilität um den Faktor 2 (15 nM Nisin) bzw. um den Faktor 5 (1,5 μ M Nisin). Damit zeigt sich deutlich, dass die Erhöhung der Permeabilität von Membranen bzw. die Porenbildung in Membranen durch Nisin von der Anwesenheit von Lipid II abhängt. Die stärker ausgeprägte Stromzunahme in Gegenwart des bakteriellen Targets korreliert mit der beobachteten erhöhten Affinität zu diesen Membranen. Der Anstieg des Faradayschen Stromes bzw. die Porenbildung erfolgt innerhalb von 65 s und ist offenbar über die restliche Messzeit stabil. Die Stabilität des Nisin-Lipid II-Komplexes und damit der Pore wurde auch von anderen Gruppen gezeigt [68].

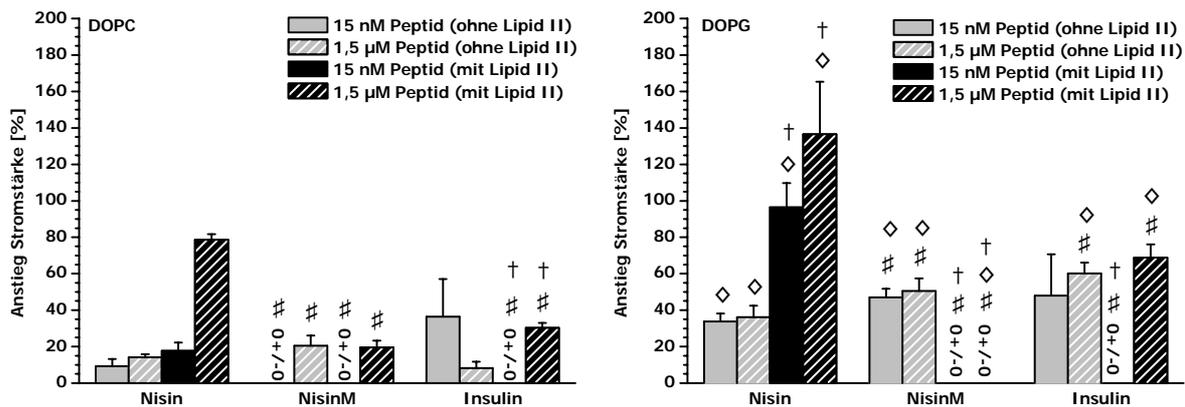


Abbildung 33: CV-Ergebnisse von Nisin, NisinM und Insulin an DOPC- und DOPG-Membranen ohne und mit Lipid II. An reinen DOPC-Membranen zeigt Nisin nur einen geringen unspezifischen Stromanstieg. Die Gegenwart von Lipid II steigert den Stromfluss um den Faktor 2 (15 nM Nisin) bzw. 5 (1,5 μ M Nisin). Eine zuverlässige Zunahme der Stromstärke konnte des Weiteren für die hohen Konzentrationen an methyliertem Nisin beobachtet werden. An DOPG-Membranen sind die Effekte deutlich stärker ausgeprägt. Alle Peptide zeigen auch an Lipid II-freien Membranen ausgeprägte unspezifische Effekte, die auf eine Zunahme der Permeabilität durch veränderte Membranordnung hindeuten. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für NisinM und Insulin im Vergleich zu Nisin mit $\#$, für DOPG im Vergleich zu DOPC mit \diamond und für Lipid II-haltige im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit \dagger markiert.

NisinM zeigt an DOPC-Membranen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung. Die Zugabe von nM-Konzentrationen führt zu keinem Stromanstieg. Nach der Zugabe der einhundertfachen Peptidmenge sieht man an nicht targetierten Membranen einen im Vergleich zu Nisin etwas stärkeren Anstieg der Stromstärke, der mit der höheren Assoziationskonstante des NisinM einhergeht. In Anwesenheit von Lipid II ist die Permeabilisierung ausgeprägter als ohne Lipid II, aber geringer als für das Nisin. Die Methylierung des Nisins führt daher nicht nur zu einer Verringerung der Bindungsaffinität und -intensität, sondern beeinflusst auch die Porenbildung. Auch hier lässt sich wieder deutlich der Zusammenhang zwischen geringer Bindungsaffinität und verminderter Permeabilisierung der Membranen von NisinM im Vergleich zu Nisin erkennen. Inwieweit die für das NisinM dargestellte Zu-

nahme der Stromstärke auf unspezifische Membranschädigungen zurückzuführen ist oder es entgegen bisheriger Annahmen doch zu einer Porenbildung kommt, kann an dieser Stelle nur vermutet werden.

Insulin zeigt aufgrund seiner fehlenden Lipid II-Bindungsmotive in nM-Konzentrationen keine Zunahme der Stromstärke an Lipid II-haltigen Membranen. Der nach Zugabe der einhundertfachen Konzentration beobachtete Stromanstieg kann auf unspezifische Wechselwirkungen mit der Membran zurückgeführt werden. Die im Vergleich zu Nisin und NisinM leicht verminderte Affinität von Insulin zu DOPC-Membranen spiegelt sich im μM -Bereich in einer schwächeren Zunahme der Stromstärke wider. Die Stromzunahme nach Zugabe der geringeren Insulin-Konzentration lässt sich auch aufgrund der hohen Standardabweichung weder mit den kinetischen Daten noch mit Nisin oder NisinM in Einklang bringen.

Die an DOPC-Filmen beobachteten Effekte aller drei Peptide, insbesondere die des Nisins, sind an DOPG-Membranen sehr viel stärker ausgeprägt. Nisin zeigt an negativ geladenen Lipid II-freien Filmen eine etwa 2,5fach stärkere Zunahme der Stromstärke und damit auch eine erhöhte Permeabilisierung der Modellmembran. Durch die langsamere Dissoziation an DOPG-Membranen stehen mehr Nisinmoleküle für unspezifische ladungsinduzierte Interaktionen zur Verfügung als an DOPC-Membranen. An dieser Stelle kommt neben mehr Nisinmolekülen noch ein zweiter Punkt zum Tragen. Durch den schon besprochenen „carpet mechanism“ und die Ausbildung molekularer Assoziate ist die Membran stark geschädigt und der Transport der Elektronen durch die Membran erleichtert. Die Bedeutung von Lipid II für die Porenbildung zeigt sich an DOPG-Membranen noch deutlicher. Die Anwesenheit des Targets steigert die Zunahme der Stromstärke auf über 100%.

Das methylierte Nisin zeigt aufgrund seiner positiven Ladungen auch ausgeprägte unspezifische Effekte an Lipid II-freien Membranen, die quantitativ mit Nisin vergleichbar sind. Gibt man NisinM zu Lipid II-haltigen DOPG-Filmen, so ist keine Zunahme der Stromstärke zu verzeichnen, was einer mit Nisin vergleichbaren Bindungsaffinität widerspricht.

Insulin zeigt an Lipid II-haltigen DOPG-Membranen ein ähnliches Verhalten wie an Lipid II-freien. Das Ausmaß der Stromzunahme ist konzentrationsabhängig. Die etwa gleich großen Werte für die $1,5 \mu\text{M}$ -Konzentrationen zeigen, dass die Permeabilisierung auf Lipid II-unabhängigen Mechanismen beruht.

Eine Besonderheit zeigt das Verhalten von Nisin und Insulin an Lipid II-haltigen DOPG-Membranen. Durch Zugabe beider Peptide kommt es zunächst an diesen Schichten zu einer Zunahme der Stromstärke. Wie in Abbildung 34 dargestellt ist, nimmt die Stromstärke im weiteren Verlauf allerdings wieder ab.

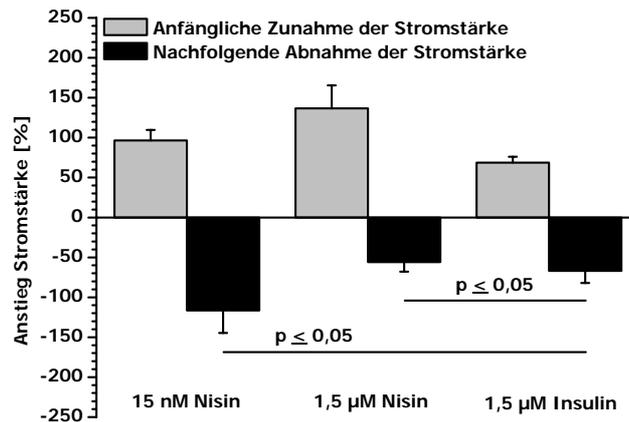


Abbildung 34: An DOPG/Lipid II-Membranen führt die Zugabe von Nisin und Insulin nach einer anfänglichen Zunahme der Stromstärke zu einer Abnahme der Permeabilität. Durch die erhöhte Affinität beider Peptide zu negativ geladenen Membranen sind eine stärkere Anlagerung und die zusätzliche Isolierung der Elektrode möglich.

Die Ursache für die Abnahme der Permeabilität der DOPG/Lipid II-Membranen liegt in der erhöhten Affinität der positiv geladenen Peptide zu negativ geladenen Filmen. Nisin und Insulin lagern sich verstärkt auf die Membran bzw. dissoziieren nur langsam von dieser ab. Unabhängig von der beobachteten Stabilität der Pore wird die Elektrode durch die zusätzliche Peptidschicht stärker isoliert und der Elektronentransport erschwert. Die Folge ist die zu beobachtende Abnahme der Stromstärke. Da Nisin neben der erhöhten Affinität gegenüber negativ geladenen Membranen spezifisch an Lipid II bindet, ist der isolierende Effekt auch schon in nM-Konzentrationen zu beobachten. Die Methylgruppen des NisinM stehen mit ihrem Raumbedarf einer dichten Anlagerung und Isolierung der Elektrode entgegen. Durch die Anwesenheit von Lipid II wird die Ausbildung der Vesikel, wie sie für Nisin an reinen DOPG-Membranen zu beobachten war, verhindert. Die stabilisierende Rolle des Lipid II auf Membranen wird damit erneut untermauert.

Bei den CV-Untersuchungen lag der Fokus auf dem Prozess der Permeabilisierung der Membran. Mit den Ergebnissen konnten bisherige Erkenntnisse zur Porenbildung durch Nisin bestätigt werden. Weiterführende Aussagen, wie z.B. die zusätzliche Isolierung der Elektrode durch die Peptide, konnten gemacht werden.

Die Korrelation der CV-Daten mit den Ergebnissen der QCM-Bindungsanalyse zeigt, dass sich beide Biosensortechniken ideal ergänzen.

4.2 Mersacidin

4.2.1 Die Bestimmung von absoluten Frequenzänderungen und Bindungskonstanten

Mersacidin gehört nicht wie Nisin zur Gruppe der Typ A-Lantibiotika und hat dementsprechend auch ein anderes Lipid II-Bindungsmotiv. Die strukturellen Unterschiede sollten sich in einem anderen Verhalten des Mersacidins an Modellmembranen bemerkbar machen. Aufgrund der aktuellen Datenlage ist ein Lipid II-abhängiges Bindungsverhalten des Peptids zu erwarten. Zunächst wurde die absolut gebundene Menge an Mersacidin mit Hilfe der QCM bestimmt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen des Nisins bestanden die Modellmembranen jetzt nur aus DOPC \pm Lipid II. Der Einfluss der negativen Ladung von DOPG-Membranen soll bei der Analyse der nachfolgenden Peptide vernachlässigt werden. Zunächst wurde die Frequenzänderung durch absolut gebundene Mengen an Mersacidin analysiert. In Anlehnung an die bisher untersuchten Peptide Nisin, NisinM und Insulin mit ihren unterschiedlichen Strukturen werden auch nach der Zugabe von Mersacidin Frequenzänderungen erwartet, die sich im Bereich der anderen drei Peptide befinden. In Abbildung 35 sind die ermittelten Frequenzänderungen nach Zugabe von Mersacidin zu DOPC-Membranen mit und ohne Lipid II dargestellt.

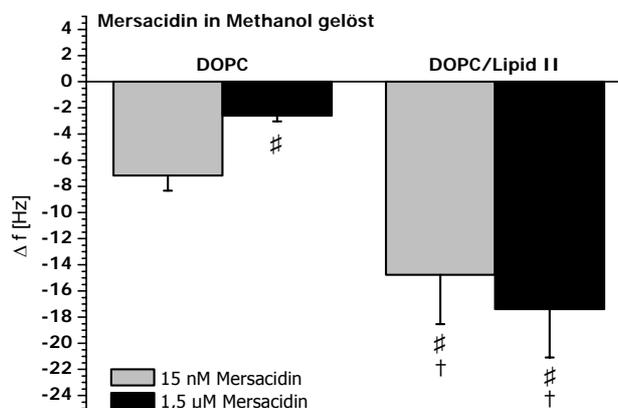


Abbildung 35: Absolute Frequenzänderungen an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II nach Zugabe unterschiedlicher Mengen Mersacidin. Die Werte an reinen DOPC-Filmen befinden sich im Bereich der bisher untersuchten Peptide. Im Gegensatz dazu ist die Abnahme der Frequenz in Gegenwart von Lipid II sehr viel größer. Damit ist entgegen den Erwartungen eine Lipid II-Abhängigkeit erkennbar. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Mersacidin im Vergleich zu Nisin mit # und für DOPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit † markiert.

Wie zu erkennen ist, zeigen sich lediglich für reine DOPC-Membranen Frequenzabnahmen im Bereich des Nisins. An DOPC/Lipid II-Filmen ist die Frequenzabnahme etwa dreimal so groß. Entgegen den Erwartungen und im Gegensatz zu allen anderen Peptiden zeigt sich

hier eine Abhängigkeit der absolut gebundenen Menge an Mersacidin von der Anwesenheit des Lipid II. Die Ursache der zu den bisherigen QCM-Untersuchungen gegensätzlichen Ergebnisse ist in dem verwendeten Lösungsmittel der Mersacidin-Stammlösung zu suchen. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Peptiden, die in verdünnter Essigsäure gelöst vorlagen, wurde Mersacidin zunächst in reinem Methanol gelöst und später mit Wasser verdünnt. Versuche an der QCM, bei denen anstelle des Peptids reines Methanol in das Rundlaufsystem eines mit DOPC/Lipid II beschichteten Quarzkristalls injiziert wurden, zeigten tatsächlich eine Frequenzänderung von $-2,89 \pm 0,37$ Hz. Die Lipid II-abhängige Frequenzabnahme nach Zugabe von Mersacidin ist demnach auch auf den Einfluss des Lösungsmittels zurückzuführen. Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Methanol mit den Phospholipiden interagiert. Das an die Phospholipide gebundene Wasser wird zum Teil durch Alkoholmoleküle ersetzt. Die membranstabilisierende Interaktion zwischen Wasser und Phospholipiden ist damit gestört, und die Membran wird destabilisiert. Methanol ist zusätzlich in der Lage, Phospholipidmoleküle zu lösen. In Folge dessen sinkt der Ordnungsgrad der Phospholipide. Sie benötigen gleichzeitig mehr Fläche je Molekül und der Film wird insgesamt fluider. Es konnte gezeigt werden, dass damit auch eine erhöhte Permeabilität der Phospholipidschichten einhergeht [138-140]. Vereinzelt können so Phospholipidmoleküle aus der Membran herausgelöst werden, was die Ordnung der Filmschicht zusätzlich vermindert. Wie anhand der CV-Ergebnisse noch gezeigt werden wird, beeinflusst Methanol neben den Frequenzänderungen tatsächlich auch die Permeabilität der Membran. Um den stark ausgeprägten Effekt des Methanols zu minimieren, wurde erfolgreich versucht, Mersacidin entgegen der üblichen Vorgehensweise in 30%igem 2-Propanol zu lösen. Die zuvor mit in Methanol gelöstem Mersacidin durchgeführten Versuche wurden wiederholt. Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt, die ohne den Einfluss des Lösungsmittels durch die Wirkung des Mersacidins hervorgerufen wurden. An Stellen, an denen durch Methanol stark abweichende Resultate bereits vorlagen, werden diese ergänzend aufgeführt.

Die neu durchgeführten Versuche zeigten bei der Bestimmung der absolut gebundenen Mengen Mersacidin die in Abbildung 36 dargestellten Frequenzänderungen. Alle Werte der Frequenzabnahme liegen unter denen in Abbildung 35. Die Änderung der Frequenz fällt nach Zugabe von Mersacidin etwas geringer aus als nach der Zugabe von Nisin, befindet sich aber im selben Größenbereich wie NisinM und Insulin. Eindeutige Abhängigkeiten von der Peptidkonzentration oder der Anwesenheit von Lipid II wurden wie bei den bisher untersuchten Peptiden nicht festgestellt. Es wird deutlich, dass die Bestimmung der Frequenzänderungen mit Hilfe der QCM möglicherweise nicht geeignet ist, Unterschiede zwischen den einzelnen Lantibiotika in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Modell-

membran zu detektieren. Eventuell sind die ähnlichen Frequenzen auch gar nicht auf die Limitierung der Technik zurückzuführen. Inwieweit es unter Umständen tatsächlich keine Unterschiede zwischen den absolut gebundenen Mengen gibt, kann an dieser Stelle allerdings nicht geklärt werden.

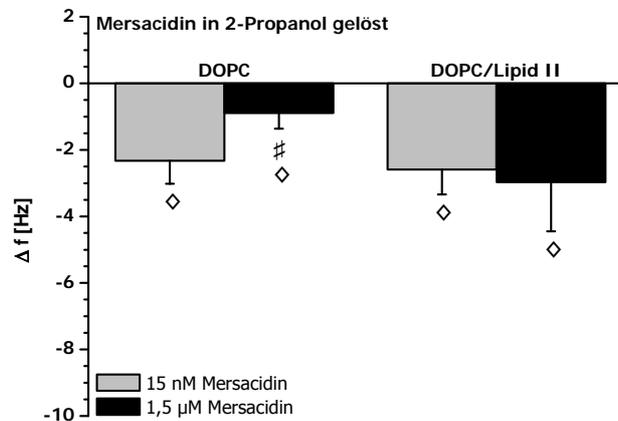


Abbildung 36: Absolute Frequenzänderungen an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II nach Zugabe unterschiedlicher Mengen Mersacidin. Im Vergleich zu Abbildung 35 ist das Peptid in 30%igem 2-Propanol gelöst. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Mersacidin im Vergleich zu Nisin mit # und mit ◊ für die Werte von Mersacidin in 2-Propanol, verglichen mit Mersacidin in Methanol, markiert. Auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ sind keine Unterschiede zwischen Lipid II-haltigen und Lipid II-freien Membranen zu erkennen.

Die Abhängigkeit der Wirkung von den entsprechend immobilisierten Filmen lässt sich allerdings eindeutig anhand der kinetischen Bindungskonstanten erkennen. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die ermittelten Bindungskonstanten von Mersacidin an DOPC ± Lipid II-Filmen. Da sich die Bindungskonstanten von Mersacidin in Methanol nur geringfügig unterscheiden, sind sie nicht mit dargestellt.

	$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{diss}} [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{D}} [\text{M}]$
DOPC	689,46 ± 251,00	$1,44 \cdot 10^{-3}$ ± $3,96 \cdot 10^{-4}$ #	$2,51 \cdot 10^{-6}$ ± $1,77 \cdot 10^{-6}$
DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	4132,36 ± 1739,92 †	$4,45 \cdot 10^{-3}$ ± $5,94 \cdot 10^{-4}$ # †	$9,88 \cdot 10^{-7}$ ± $4,77 \cdot 10^{-7}$ #

Tabelle 8: Die kinetischen Bindungskonstanten von Mersacidin an DOPC-Membranen. Während die Assoziationskonstanten denen des Nisins entsprechen, verläuft die Dissoziation des Mersacidins deutlich schneller. Daraus resultiert eine insgesamt schlechtere Bindungsfähigkeit. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Mersacidin im Vergleich zu Nisin mit # und für DOPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit † markiert.

Die Assoziationskonstanten von Mersacidin an DOPC-Filmen zeigen die gleichen Werte wie Nisin. Auch hier ist die Assoziation in Anwesenheit von Lipid II um den Faktor sechs stärker als an reinen DOPC-Filmen. Die unabhängig von Lipid II im Vergleich zu Nisin insgesamt schlechtere Bindung liegt an der schnelleren Dissoziation des Mersacidins von der Membran. Während Nisin zusammen mit Lipid II Poren bildet, wurde dies bisher nicht für Mersacidin gezeigt. Wenn es durch Mersacidin nicht zu einer Porenbildung kommt, so wird sich das Peptid vermutlich auch nicht in gleicher Weise wie Nisin in die Membranen einlagern. Der Dissoziationsprozess wird so erleichtert und erklärt die höheren k_{diss} -Werte des Mersacidins. Nisin dagegen ist für die Pore essentiell und wird daher eher in der Membran gehalten. Die Dissoziation ist somit erschwert.

Für das Mersacidin wurden mit Hilfe der QCM erstmalig kinetische Bindungskonstanten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Assoziation durch die Anwesenheit von Lipid II günstig beeinflusst wird. Die bisherigen Erkenntnisse, dass Mersacidin aufgrund seiner äußeren Gestalt keine Poren ausbilden kann, wurden erweitert. Neben der Form des Peptids steht seine schnelle Dissoziation einer möglichen Porenbildung entgegen.

4.2.2 Die CV-Analyse zur Beobachtung möglicher Permeabilitätsänderungen

Um zu überprüfen, inwieweit die schnellere Dissoziation des Mersacidins tatsächlich einer möglichen Porenbildung entgegensteht, wurden auch für dieses Peptid CV-Untersuchungen durchgeführt.

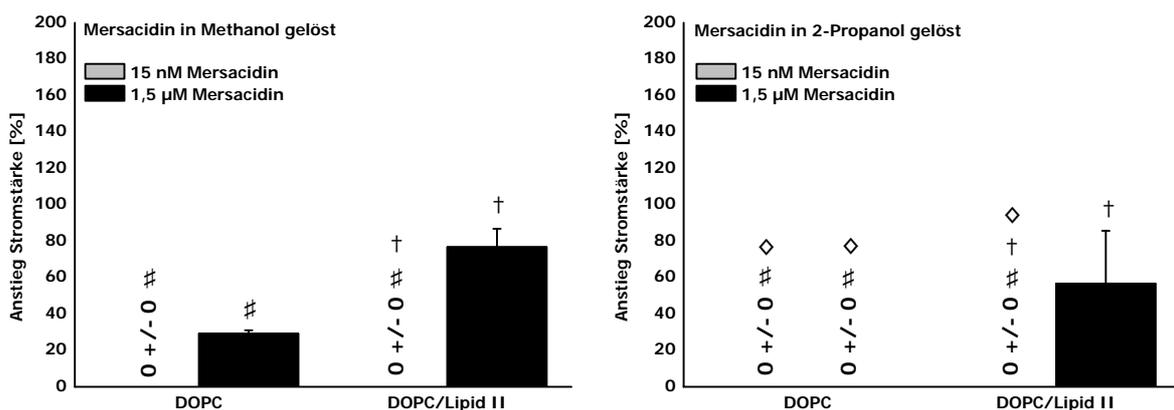


Abbildung 37: Die Änderung der Membranpermeabilität nach Zugabe von Mersacidin in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Mersacidin im Vergleich zu Nisin mit #, für DOPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit † und mit † für die Werte von Mersacidin in 2-Propanol, verglichen mit Mersacidin in Methanol, markiert.

Wie bereits erläutert wurde, beeinflusst Methanol die Permeabilität der Membran. In

Gegenwart dieses Lösungsmittels sollte daher eine verstärkte Zunahme der Stromstärke zu beobachten sein. In Abbildung 37 sind die entsprechenden Ergebnisse von Mersacidin, gelöst in Methanol oder 2-Propanol, dargestellt.

Wie erwartet, führt die Gegenwart von Methanol in hohen Mersacidinkonzentrationen zu einer deutlichen Erhöhung der Membranpermeabilität. Die Effekte, die nur durch das Mersacidin bedingt sind, können so nicht isoliert werden.

Eine deutliche Zunahme der Permeabilität der Membranen und die damit verbundene gestörte Filmordnung zeigt auch die Dämpfungsanalyse. Der D/f-Anstieg ist nach Zugabe von Mersacidin besonders hoch, wenn das Peptid in Methanol gelöst wurde. In Tabelle 9 sind die aus den D/f-Graphen ermittelten Anstiege, wiederum für beide Lösungsmittel, dargestellt.

	Lösungsmittel Methanol		Lösungsmittel 2-Propanol	
	DOPC	DOPC/ Lipid II	DOPC	DOPC/ Lipid II
15 nM MERSACIDIN	0,575 ± 0,205	0,869 ± 0,208	0,355 ± 0,182	0,552 ± 0,109
1,5 µM MERSACIDIN	0,599 ± 0,112	1,327 ± 0,639 #	0,508 ± 0,184	0,522 ± 0,120 #

Tabelle 9: Die Dämpfungsanalyse nach Zugabe von Mersacidin in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die durch Methanol bedingte geringere Ordnung der Membranen spiegelt sich auch in einer stärkeren Dämpfung wider. Die Werte der rechten Tabellenhälfte zeigen die nur durch Mersacidin bedingten Effekte. Die im Vergleich zu Nisin geringere Dämpfung korreliert mit der schnelleren Dissoziation des Mersacidins. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Mersacidin im Vergleich zu Nisin mit # markiert.

Unter Verwendung von 2-Propanol zeigt sich ein anderes Bild. An reinen DOPC-Membranen kann keine Zunahme der Permeabilität festgestellt werden. Ursächlich hierfür ist die schwache Assoziation des Mersacidins in Verbindung mit einer schnellen Dissoziation. Unspezifische Effekte, wie sie für das Nisin beobachtet wurden, sind damit nicht möglich. In Gegenwart von Lipid II zeigt sich allerdings eine Zunahme der Permeabilität, wenn auch mit schwankenden Werten. Für eine echte Porenbildung ist das Peptid aufgrund seiner Länge und seiner kompakten Gestalt eher ungeeignet. Wahrscheinlich ist ein durch die Bindung an Lipid II geförderter unspezifischer Effekt. Möglich ist, dass Mersacidin selber die Ordnung der Phospholipide durch den engen Kontakt mit der Membran stört. Auch eine Konformationsänderung des Lipid II nach Bindung des Lantibiotikums und eine damit verbundene gestörte Ordnung der Filme muss in Betracht gezogen werden.

Die Störung der Filmordnung durch Mersacidin allein hat geringere Auswirkungen auf die Dämpfung der Quarzschwingung. Die D/f -Anstiege nach Peptidzugabe zu Lipid II-haltigen DOPC-Filmen in der rechten Hälfte der Tabelle 9 sind deutlich geringer als zuvor beschrieben. Sie fallen ebenfalls geringer aus als nach der Zugabe von Nisin zu diesen Modellmembranen. Auch hier lässt sich wieder der Zusammenhang zwischen schnellerer Dissoziation und einer damit verbundenen geringeren Gesamtbindung des Mersacidins und den geringeren Effekten an den Membranen im Vergleich zu Nisin zeigen.

Mit der Kombination von QCM und CV konnten keine unspezifischen Effekte beobachtet werden, die sich auf die Wirkung des Mersacidins zurückführen lassen.

Die in Gegenwart von Lipid II aufgetretene Zunahme der Stromstärke lässt sich aufgrund der Struktur des Mersacidins nicht wie bei Nisin mit einer spezifischen Porenbildung erklären.

Nach Zugabe des Peptids wirken die Filme weniger stark dämpfend als nach Nisinzugabe. Auch hier zeigte die Bindungsanalyse, dass dafür die schnelle Dissoziation des Mersacidins verantwortlich ist.

4.3 Gallidermin

4.3.1 Das Verhalten von Gallidermin an DOPC-Membranen

Gallidermin gehört wie Nisin zu den Typ A-Lantibiotika. Die an Bindung des Lipid II beteiligten Ringe A und B sind in beiden Peptiden nahezu identisch. Aufgrund des Bindungsmotivs sollte Gallidermin zumindest im Bereich der Assoziation ein ähnliches Bindungsverhalten zeigen wie Nisin. Im Gegensatz zu Nisin konnte bisher keine Porenbildung durch Gallidermin an DOPC-Membranen beobachtet werden. Bonelli *et al.* gehen davon aus, dass das Peptid zu kurz ist, um als Bestandteil einer möglichen Pore die Membran zu durchspannen [79]. In Anlehnung an die Ergebnisse der Mersacidin-Untersuchungen könnte man aufgrund der fehlenden Porenbildung auch bei Gallidermin eine schnellere Dissoziation erwarten. Bevor diese Vermutungen durch die Bestimmung der Bindungskonstanten überprüft wurden, sollte zunächst auch für das Gallidermin die absolut gebundene Peptidmenge mit Hilfe der QCM bestimmt werden. Die entsprechenden Frequenzänderungen nach Zugabe von Gallidermin zu DOPC-Membranen mit und ohne Lipid II sind in Abbildung 38 dargestellt. Zum besseren Vergleich sind die Daten des Nisins noch einmal mit aufgeführt.

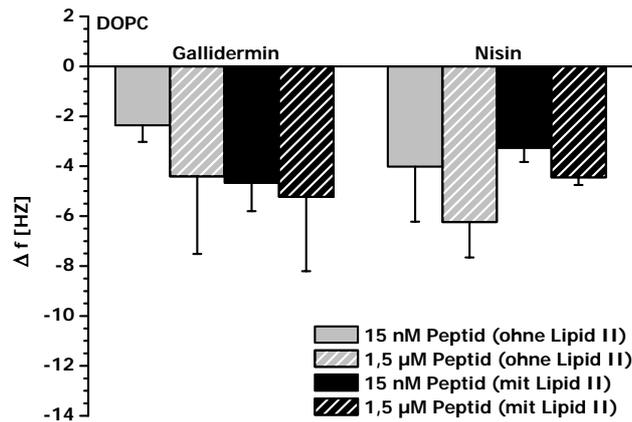


Abbildung 38: Absolute Frequenzänderungen der mit DOPC-Membranen beschichteten Quarzkristalle nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin. Auch nach Zugabe von Gallidermin lassen sich keine Unterschiede in den absolut gebundenen Peptidmengen erkennen. Die Frequenzänderungen lassen sich weder mit den Peptidkonzentrationen noch mit dem Vorhandensein von Lipid II korrelieren. Auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ sind keine Unterschiede zwischen Gallidermin und Nisin zu erkennen.

Die Frequenzänderungen liegen für Gallidermin bei ähnlichen Werten wie für Nisin und den anderen bisher untersuchten Peptiden. Auch an dieser Stelle lässt sich anhand der reinen Frequenzänderungen nicht zwischen den verschiedenen Peptiden, deren Konzentrationen oder der Anwesenheit von Lipid II differenzieren. Bisher verhielten sich alle Peptide bei der Bestimmung der absolut gebundenen Peptidmengen sehr ähnlich. Für die weiteren Untersuchungen des Gallidermins an verschiedenen Modellmembranen wird daher von ähnlichen Frequenzänderungen nach Peptidzugabe ausgegangen. Die Versuche zur Bestimmung der entsprechenden Frequenzänderungen wurden deshalb nicht durchgeführt.

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Erwartungen zum Bindungsverhalten des Gallidermins bestätigen lassen, wurden die Bindungskonstanten bestimmt. Die ermittelten Werte für k_{ass} , k_{diss} und k_{D} sind, wiederum im direkten Vergleich zu Nisin, in Tabelle 10 aufgelistet.

Die Bindungskonstanten des Gallidermins verhalten sich entgegen den Erwartungen. Bereits an reinen DOPC-Membranen ist eine starke Assoziation zu erkennen. Der Wert liegt im Bereich der spezifischen Assoziation von Nisin an DOPC/Lipid II-Membranen und ist um den Faktor 5,5 größer als k_{ass} von Nisin an reinen DOPC-Membranen. Es scheint, als käme das Gallidermin durch den verkürzten C-Terminus dichter an die Oberfläche der Modellmembran heran und könnte so besonders gut mit dieser interagieren. Aus der sehr guten Assoziation resultiert eine insgesamt gute Bindung an reine DOPC-Membranen.

		k_{ass} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_{diss} [s^{-1}]	k_{D} [M]
GALLIDERMIN	DOPC	4134,86 $\pm 276,23$ [#]	$1,40 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,80 \cdot 10^{-4}$ [#]	$5,26 \cdot 10^{-7}$ $\pm 2,78 \cdot 10^{-7}$ [#]
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	1828,42 $\pm 876,17$ ^{# †}	$4,05 \cdot 10^{-4}$ $\pm 1,29 \cdot 10^{-4}$ ^{# †}	$2,69 \cdot 10^{-7}$ $\pm 8,38 \cdot 10^{-8}$
NISIN	DOPC	751,96 $\pm 105,84$	$7,70 \cdot 10^{-4}$ $\pm 4,16 \cdot 10^{-5}$	$1,03 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,16 \cdot 10^{-7}$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	4676,58 $\pm 307,47$ [†]	$1,77 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,95 \cdot 10^{-4}$ [†]	$2,68 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,74 \cdot 10^{-7}$ [†]

Tabelle 10: Die Bindungskonstanten von Gallidermin an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II. Gallidermin zeigt eine starke Assoziation an reinen DOPC-Filmen, die die Gesamtbindung positiv beeinflusst. In Gegenwart von Lipid II nimmt die Assoziation ab. Möglicherweise ist dies durch die geringere Interaktion zwischen dem Bactoprenol des Lipid II und dem verkürzten C-Terminus des Gallidermins bedingt. Die geringere Assoziation ist jedoch so spezifisch, dass die Dissoziation deutlich langsamer verläuft und die Gesamtbindung mit der des Nisins vergleichbar ist. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit [#] und für DOPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit [†] markiert.

Im Vergleich zu Nisin kehrt sich die Tendenz der Bindungskonstanten nach Peptidzugabe zu Lipid II-haltigen Filmen um. Die Assoziation des Gallidermins ist deutlich schwächer als an reinen DOPC-Membranen und auch schwächer als der vergleichbare Nisinwert. Möglicherweise ist die schlechtere Assoziation auf die fehlende Interaktion zwischen dem Bactoprenol des Lipid II und dem stark verkürzten C-Terminus des Gallidermins zurückzuführen. Die Dissoziation des Gallidermins an DOPC/Lipid II-Membranen verläuft langsamer als an reinen DOPC-Filmen bzw. langsamer als für Nisin an DOPC/Lipid II-Membranen. Obwohl die Assoziation insgesamt schwächer ausfällt, scheint sie im Bereich MurNAc/PP des Lipid II doch so stark und spezifisch zu sein, dass die Moleküle nicht so schnell von der Membran dissoziieren können. Trotz schwächerer Assoziation führt die langsame Dissoziation somit zu einer Gesamtbindung des Gallidermins an DOPC/Lipid II-Membranen, die besser ist als an reinen DOPC-Filmen und außerdem dem k_{D} -Wert des Nisins entspricht.

Die gegenüber dem Nisin verminderte Assoziation schlägt sich auch in den Anstiegen der D/f-Geraden nieder, die in Tabelle 11 aufgeführt sind. Die Werte sind in diesem Fall aus den Frequenzverläufen der kinetischen Bestimmungen und der simultan bestimmten Dämpfung ermittelt.

	DOPC	DOPC/0,1 mol% Lipid II
GALLIDERMIN	0,538 ± 0,178	0,515 ± 0,153 [#]
NISIN	0,594 ± 0,214	1,494 ± 0,360 [†]

Tabelle 11: Die Dämpfung des Quarzkristalls nach Zugabe von Gallidermin zu DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II. An reinen DOPC-Filmen kann die im Vergleich zu Nisin geringere Dämpfung als Hinweis auf eine Anlagerung des Gallidermins dicht an der Oberfläche gesehen werden. An Lipid II-haltigen Membranen fällt die Dämpfung deutlich geringer aus als für Nisin. Aufgrund der schwächeren Assoziation scheint eine geringere Anzahl von Molekülen gebunden zu haben. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit [#] und für DOPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit [†] markiert.

Die im Vergleich zu Nisin geringere Dämpfung an reinen DOPC-Membranen scheint die Vermutung zu bestätigen, dass die Galliderminmoleküle aufgrund der geringeren Länge besonders dicht an die Membran gelangen können. Bei einer ähnlich starken Assoziation wie der von Nisin an DOPC/Lipid II-Membranen wäre auch eine ähnlich starke Dämpfung zu erwarten gewesen. Tatsächlich ist die Dämpfung aber deutlich geringer. Möglich sind eine kleinere Anzahl von Molekülen an der Membran und eine andere Anlagerung. Wahrscheinlicher ist aufgrund der deutlich geringeren Assoziation eine kleinere Anzahl von Galliderminmolekülen an der Membran.

In bisherigen Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Gallidermins an DOPC-Membranen konnte keine Porenbildung detektiert werden. Im Gegensatz dazu stehen die Daten der Bindungsanalyse. Eine mit Nisin vergleichbare gute Bindung würde auch eine Permeabilisierung der Membran erwarten lassen. Um zu überprüfen, inwieweit es möglicherweise doch zu einer Permeabilisierung der Modellmembran durch Gallidermin kommt, wurden CV-Versuche in gleicher Weise wie für die bisher vorgestellten Peptide durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

Erwartungsgemäß ist Gallidermin im Gegensatz zu Nisin nicht in der Lage, in Lipid II-haltigen DOPC-Membranen Poren zu bilden oder deren Permeabilität anderweitig zu verändern. Frühere Annahmen, dass Gallidermin für eine Porenbildung zu kurz ist, lassen sich hier bestätigen. Die Literaturangaben für die Dicke von DOPC-Doppelschichten liegen zwischen 37,5 Å und 38,4 Å [141-142]. Die Dicke der hier verwendeten Membranen ist geringer, da eine der beiden Schichten nicht DOPC, sondern das kürzere Hexadecanthiol ist. Von Lewis *et al.* wird die Länge einer Phosphocholin-Kopfgruppe mit ca. 5,5 Å angegeben [143]. Der Abstand der Kohlenstoffatome in Alkanketten beträgt ca. 1,8 Å je Atom [141].

Die Dicke der C₁₆H₃₃SH/DOPC-Membran wäre damit um ca. 9 Å im Vergleich zu reinen DOPC-Doppelschichten reduziert. Die resultierende Dicke zwischen 28,4 Å und 29,3 Å liegt im Bereich der Länge des Gallidermins. Wie aber die CV-Ergebnisse zeigen, ist Gallidermin auch für die verwendete Modellmembran zu kurz. Es muss hier beachtet werden, dass nicht das komplette Peptid die Membran durchspannt. Der Lipid II-bindende N-Terminus befindet sich partiell an der Oberfläche der Membran, und das Molekül kann die Membran nicht durchspannen. Damit lässt sich auch die Vermutung bekräftigen, dass das Gallidermin nicht mit dem Bactoprenol des Lipid II in Wechselwirkung treten kann.

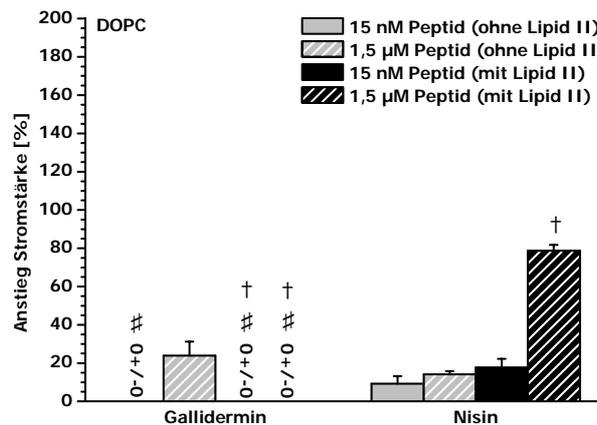


Abbildung 39: Die CV-Ergebnisse von Gallidermin im Vergleich zu Nisin an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II. Erwartungsgemäß ist keine Porenbildung an DOPC/Lipid II-Membranen zu beobachten. Eine ausgeprägte Zunahme der Stromstärke an reinen DOPC-Filmen durch Gallidermin ist auf die starke Assoziation des Peptids zurückzuführen. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit # und für DOPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit † markiert.

Eine Permeabilisierung der reinen DOPC-Membran ist entgegen den Erwartungen für hohe Konzentrationen an Gallidermin zu beobachten. Die durch die kinetischen Daten implizierte dichte Lage der Moleküle an der Membranoberfläche und die starke Assoziation scheinen die Anordnung der Phospholipide zu beeinträchtigen. Eine gestörte Membranordnung führt zu einer erhöhten Permeabilität der Membran und erklärt die Zunahme der Stromstärke durch die Zugabe von Gallidermin. Aufgrund der im Vergleich zu Nisin deutlich stärkeren Assoziation an reinen DOPC-Membranen fällt auch die Permeabilisierung der Membran durch Gallidermin stärker aus.

Mit Hilfe der Quarzwaage konnten auch für das Gallidermin erstmalig Bindungskonstanten bestimmt werden. Die Ergebnisse deuten entgegen bisherigen Annahmen darauf hin, dass Gallidermin die Membran permeabilisieren kann. Durch die CV-Analyse konnte eine unspezifische Permeabilisierung bestätigt werden. Einmal mehr konnte demonstriert werden,

dass sich die beiden Biosensortechniken optimal ergänzen.

4.3.2 Der Einfluss verkürzter Modellmembranen auf die Wirkung von Gallidermin

Wie gezeigt werden konnte, steht der verkürzte C-Terminus des Gallidermins einer Porenbildung in DOPC-Membranen entgegen. Deshalb sollte eine Verringerung der Dicke der Membran eine Permeabilisierung der Membran durch Gallidermin erlauben. Durch die Verwendung von DPOPC anstelle des DOPC als Phospholipid wurde eine Verringerung der Membrandicke angestrebt. DPOPC besitzt Fettsäuren, deren Kettenlänge im Vergleich zu DOPC um zwei C-Atome verkürzt ist. Obwohl in Arbeiten von Bonelli *et al.* an Liposomen aus DPOPC keine Freisetzung von Fluoreszenzfarbstoffen durch Gallidermin beobachtet werden konnte, wurde dieses Phospholipid in der vorliegenden Arbeit bewusst ausgewählt. Die eingesetzten Liposomen wurden aus Stabilitätsgründen unter Verwendung von 50 mol% Cholesterol hergestellt. Cholesterol ist bekannt dafür, dass es mit Phospholipiden in Wechselwirkung tritt und deren Orientierung in Membranen verändert. Außerdem kann es mit Proteinen interagieren, die in der Membran eingelagert sind [144-146]. Für die antimikrobiell wirkenden Peptide Plantaricin A und Gramicidin S sowie das hämolytisch wirkende Melittin wurde gezeigt, dass Cholesterol die Einlagerung in die Membran vermindert. Die teilweise permeabilisierende Wirkung der Peptide auf die Membran ist durch den Einfluss von Cholesterol ebenfalls reduziert [147-149]. Es ist vorstellbar, dass das Cholesterol auch einen Einfluss auf die Phospholipide der Liposomen hat, die bisher für die Galliderminuntersuchungen verwendet wurden. Darüber hinaus kann nicht gesagt werden, inwieweit das Cholesterol auch einen Einfluss auf die Wirkung des Gallidermins hat. Aus diesem Grund sollte es von Vorteil sein, die Wirkung von Gallidermin ohne die Gegenwart von Cholesterol zu untersuchen.

Auf den Quarzkristallen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, waren die immobilisierten Schichten auch ohne Zusatz von Cholesterol stabil. Damit konnte die Wirkung von Gallidermin auf verkürzte Membranen ohne störende Einflüsse betrachtet werden.

Um zu untersuchen, inwieweit Gallidermin in der Lage ist, die verkürzten Membranen zu permeabilisieren, wurden CV-Untersuchungen durchgeführt. Auch an diesen Membranen wurde Nisin als Referenz berücksichtigt. Überraschenderweise zeigten ausnahmslos alle CV-Versuche keine Zunahme der Stromstärke nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin. Betrachtet man nur das Gallidermin, so ist es vorstellbar, dass die gewählte Modellmembran immer noch zu dick ist. Das Peptid ist nicht in der Lage, diese zu durchspannen. Allerdings ist es erstaunlich, dass auch die Zugabe von Nisin keine Veränderung der Perme-

abilität der Membran bewirkt. Weder unspezifische, noch Lipid II-vermittelte Effekte konnten beobachtet werden. Es erscheint unwahrscheinlich, dass Nisin in diesem Fall nicht an Lipid II-haltige Filme binden kann. Sowohl das Bindungsmotiv des Nisins als auch das Lipid II haben sich in ihrer Struktur nicht verändert. Daher erscheint auch eine geänderte Bindungskinetik eher fraglich. Allerdings hat sich bei den bisherigen Untersuchungen immer ein Einfluss der Bindungskinetik auf die CV-Ergebnisse gezeigt. Deshalb wurden an dieser Stelle die Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an DPoPC-Membranen bestimmt. Eine bessere Interpretation der CV-Ergebnisse soll damit möglich werden. In Tabelle 12 sind die Werte für k_{ass} , k_{diss} und k_{D} der beiden Peptide an DPoPC-Membranen zusammengefasst.

		k_{ass} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_{diss} [s^{-1}]	k_{D} [M]
GALLIDERMIN	DPoPC	1421,00 $\pm 700,61$	$1,32 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3,10 \cdot 10^{-4}$	$1,67 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,03 \cdot 10^{-6}$
	DPoPC/ 0,1 mol% Lipid II	771,66 $\pm 49,07$ [#]	$6,67 \cdot 10^{-4}$ $\pm 9,24 \cdot 10^{-5}$ [†]	$9,35 \cdot 10^{-7}$ $\pm 5,94 \cdot 10^{-8}$ [#]
NISIN	DPoPC	1140,56 $\pm 73,36$	$1,67 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,80 \cdot 10^{-4}$	$1,19 \cdot 10^{-6}$ $\pm 6,19 \cdot 10^{-7}$
	DPoPC/ 0,1 mol% Lipid II	3665,49 $\pm 1194,55$ [†]	$1,08 \cdot 10^{-2}$ $\pm 7,40 \cdot 10^{-3}$	$3,47 \cdot 10^{-6}$ $\pm 7,80 \cdot 10^{-7}$ [†]

Tabelle 12: Die kinetischen Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an verkürzten DPoPC-Membranen. Gallidermin zeigt im Vergleich zu DOPC-Membranen an Lipid II-freien und DPoPC/Lipid II-Membranen eine schlechtere Bindungsfähigkeit, die sich auf die verminderte Assoziation zurückführen lässt. Das Verhalten von Nisin ist dagegen durch eine sehr schnelle Dissoziation charakterisiert, die einer möglichen Porenbildung entgegensteht. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit [#] und für DPoPC-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit [†] markiert.

Betrachtet man zunächst das Gallidermin, so fällt auf, dass die Bindungsfähigkeit an DPoPC-Membranen insgesamt schlechter ausfällt als an DOPC-Membranen. Die Hauptursache dafür ist die um den Faktor 3 bzw. 2 reduzierte Assoziation. Vor allem die an reinen DPoPC-Filmen schwächere Assoziation erklärt, dass im Gegensatz zu DOPC-Membranen kein Anstieg der Stromstärke zu verzeichnen ist. Die Dissoziation bleibt durch die unterschiedlichen Lipide relativ unbeeinflusst. Eine ausgeprägte Interaktion zwischen Gallidermin und Lipid II kann auch an DPoPC-Filmen nicht beobachtet werden. Die fehlende Wechselwirkung ist anscheinend für die ausbleibende Permeabilisierung der Membran ver-

antwortlich. Entsprechend kann auch mit CV-Untersuchungen keine Zunahme der Stromstärke bestimmt werden.

Anders verhält es sich beim Nisin. Die Assoziationskonstanten zeigen ähnliche Werte wie an DOPC-Membranen. Eine deutliche Abhängigkeit der Assoziation von der Anwesenheit des Lipid II kann auch hier gezeigt werden. Die Dissoziation verläuft an DPoPC-Filmen allerdings deutlich schneller als an DOPC-Filmen. Ohne Lipid II ist der Dissoziationsprozess doppelt so schnell, in Gegenwart von Lipid II sogar sechsfach schneller. Insgesamt resultiert daraus, verglichen mit reinen DOPC-Filmen, eine geringfügig schlechtere Bindung an reine DPoPC-Membranen und eine ca. 13fach schlechtere Bindung an DPoPC/Lipid II-Filme.

Man kann davon ausgehen, dass Lipid II für Nisin grundsätzlich zugänglich ist. Die schnelle Dissoziation verhindert jedoch eine Wirkung des Peptids. Eine zeitliche Verzögerung zwischen der Bindung an Lipid II und einer potenziellen Porenbildung ist erkennbar. Möglicherweise ist der Bactoprenolrest des Lipid II durch die kürzere Membran gestaucht und liegt nicht mehr in seiner ursprünglichen Konformation vor. Damit ist zwar die Bindung des Nisins an MurNAc/PP ungehindert möglich, die sich anschließende Interaktion mit dem Bactoprenol aber gestört. In Folge dessen kann sich kein korrekter Nisin/Lipid II-Komplex bilden und das Peptid kann auch nicht als Bestandteil der Pore in der Membran verankert werden. Dementsprechend schneller verläuft dann auch die Dissoziation.

Die deutlich schnellere Dissoziation spiegelt sich auch in der Dämpfungsanalyse wider. In Tabelle 13 sind die D/f-Anstiege von Gallidermin und Nisin an DPoPC-Membranen dargestellt. Die Werte der Anstiege aus den D/f-Geraden liegen für DPoPC ohne Peptidzugabe bei $0,383 \pm 0,163$ (reines DPoPC) und $0,325 \pm 0,056$ (DPoPC/Lipid II). Diese Werte liegen deutlich niedriger als die vergleichbaren DOPC-Werte (Tab. 6). Die verkürzten Hexadecanthiol/DPoPC-Membranen befinden sich insgesamt dichter an der Oberfläche des Quarzkristalls und wirken demzufolge auch weniger dämpfend.

	DPoPC	DPoPC/0,1 mol% Lipid II
GALLIDERMIN	$0,364 \pm 0,193$	$0,387 \pm 0,200$
NISIN	$0,326 \pm 0,286$	$0,493 \pm 0,093$

Tabelle 13: Die Dämpfungsanalyse nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin zu verkürzten DPoPC-Membranen. Fast alle Werte liegen im Bereich der DPoPC-Filme ohne Peptidzugabe. Eine Anlagerung von wenigen Molekülen und entsprechend geringer Dämpfung wird unter Berücksichtigung des Dissoziationsverhaltens angenommen. Entsprechend der stärksten Assoziation fällt allerdings die Dämpfung für Nisin an Lipid II-haltigen Membranen etwas stärker aus. Auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ sind keine Unterschiede zwischen Gallidermin und Nisin zu erkennen.

Betrachtet man die D/f-Anstiege nach Peptidzugabe, so sieht man, dass fast alle im Bereich der Anstiege der Membranen ohne Peptidzugabe liegen. Eine deutliche Erhöhung der Dämpfung wurde nach Zugabe von Nisin zu Lipid II-haltigen DPoPC-Membranen festgestellt. Entsprechend der beobachteten stärksten Assoziation in Tabelle 12 ist davon auszugehen, dass sich hier die meisten Moleküle an der Membran angelagert haben. Trotzdem fällt die Dämpfung deutlich geringer aus als die vergleichbare für DOPC. Ursache ist die an DPoPC-Membranen deutlich schnellere Dissoziation, die eine längere Wechselwirkung von mehr Nisinmolekülen verhindert.

Bei allen anderen Dämpfungswerten befinden sich entweder verhältnismäßig wenige Moleküle an der Membranoberfläche, oder die gebundenen Peptidmoleküle nehmen die Schwingung des Quarzes gut auf und wirken nicht dämpfend. Für Ersteres sprechen die kinetischen Bindungskonstanten, vor allem die recht schnelle Dissoziation.

Wie auch von Bonelli *et al.* konnte an den kürzeren DPoPC-Membranen keine Permeabilisierung der Filme durch Gallidermin oder Nisin festgestellt werden. Für beide Peptide konnte gezeigt werden, dass die Ursache dafür in der Bindungskinetik zu suchen ist. Die Gesamtbindungsfähigkeit beider Lantibiotika wird von den Prozessen der Assoziation und Dissoziation unterschiedlich stark beeinflusst. Es ist einmal mehr erkennbar, dass die Trennung der beiden Prozesse für eine umfassende Charakterisierung des Bindungsverhaltens der Lantibiotika essentiell ist.

4.3.3 Der Einfluss verzweigt-kettiger Phospholipide auf die Wirkung von Gallidermin

In der Literatur finden sich zahlreiche Beiträge über die Zusammensetzung bakterieller Zellmembranen. Die Aufmerksamkeit liegt an dieser Stelle besonders auf den Membrankomponenten von Stämmen, die sich gegenüber Gallidermin als sensitiv erwiesen haben. Membranen verschiedener Stämme von *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Lactococcus* weisen Fettsäuren unterschiedlicher Länge auf. Die Anzahl der Kohlenstoffatome variiert größtenteils im Bereich zwischen C14 und C18. In geringeren Anteilen kommen auch länger- und kürzerkettige Fettsäuren vor. Fast alle untersuchten Stämme wiesen neben unverzweigten Fettsäuren erhebliche Anteile an verzweigten Fettsäuren auf. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um anteiso-Fettsäuren, die eine Methylverzweigung an der drittletzten Position besitzen. In ganz geringen Mengen sind auch zyklische Verzweigungen in den Membranen zu finden. Der Anteil der anteiso-Fettsäuren variiert stark und kann bis ca. 50% der gesamten Fettsäuren ausmachen [150-157]. Es ist anzunehmen, dass die

verzweigt-kettigen Fettsäuren die Struktur der Zellmembran und auch von darin integrierten Elementen beeinflussen.

Möglicherweise ist die Wirkung von Gallidermin an das Vorhandensein verzweigt-kettiger Fettsäuren in den Zellmembranen der Zielorganismen gebunden. Um dies zu überprüfen, wurden in die DPoPC-Membranen 20 mol% Phospholipide eingebaut, die diese Fettsäuren enthielten. Die eingebauten 20 mol% entsprechen dem durchschnittlichen Gehalt der Literaturangaben. In Abbildung 24 (Kapitel 3.3.2) sind die Strukturen der von Dr. Rattay (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) synthetisierten und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellten Phospholipide 1-*O*-Hexadecyl-2-[12-Methyl]-Palmitoyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphocholin (PL3) und 1-*O*-Hexadecyl-2-[α -Hexyl]-Palmitoyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphocholin (PL5) dargestellt. Anstelle der Fettsäuren in Position 1 des Glycerols wurden Alkohole eingesetzt und mit den Hydroxylgruppen verestert. Das PL3 kommt dabei einer natürlichen anteiso-Verzweigung am nächsten.

Die Modellmembranen aus DPoPC mit PL3 oder PL5 enthielten für einen Teil der Versuche ebenfalls Lipid II, das wie bisher in die Membranen eingebaut wurde. Da alle Bestandteile nach der Kompression auf der Filmwaage keine Phasentrennung zeigten, konnten die Membranen problemlos auf die entsprechenden Quarzkristalle übertragen werden.

Zunächst sollte eine potenzielle veränderte Wirkung von Gallidermin an Modellmembranen untersucht werden, die das Phospholipid mit einer methylverzweigten Fettsäure enthielten. Bei der Beobachtung einer möglichen Zunahme der Permeabilität der Membran ergab sich aus den CV-Untersuchungen das in Abbildung 40 gezeigte Bild.

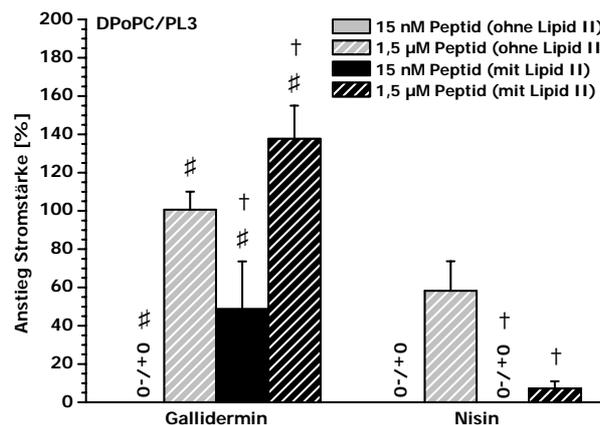


Abbildung 40: Permeabilitätsänderungen an DPoPC/PL3-Membranen nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin. Für das Gallidermin sind ausgeprägte unspezifische Effekte zu sehen, die auf einer verminderten Ordnung der Phospholipide durch die Methylverzweigung beruhen. Weiterhin lässt sich im Gegensatz zu Nisin eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung von der Anwesenheit des Lipid II erkennen. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit # und für DPoPC/PL3-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit + markiert.

Interessanterweise zeigt sich für Gallidermin erstmalig eine ausgeprägte Zunahme der Stromstärke. Das Ausmaß ist von der Konzentration des zugegebenen Peptids und der Anwesenheit von Lipid II abhängig. Die Zunahme der Stromstärke ist sogar stärker als die für das Nisin an DOPC-Membranen beobachtete (Abb. 33). Unspezifische Effekte zeigten sich auch nach Zugabe von Nisin. Eine Lipid II-spezifische Permeabilisierung der DPoPC/PL3-Membran wurde nicht oder nur in geringem Ausmaß detektiert.

Verschiedene ältere Arbeiten haben gezeigt, dass durch die Anwesenheit verzweigt-kettiger Fettsäuren die lokale Ordnung von Lipidfilmen gestört wird [158-159]. Nach Modellen von Rattay *et al.* sind Phospholipide, die Fettsäuren mit kurz-kettigen Verzweigungen besitzen, gegeneinander verschoben bzw. gegenüber der Ausrichtung unverzweigter Phospholipide gekippt [160]. Die verzweigten Seitenketten sind dabei entgegengesetzt ausgerichtet, wie in Abbildung 41 dargestellt ist.

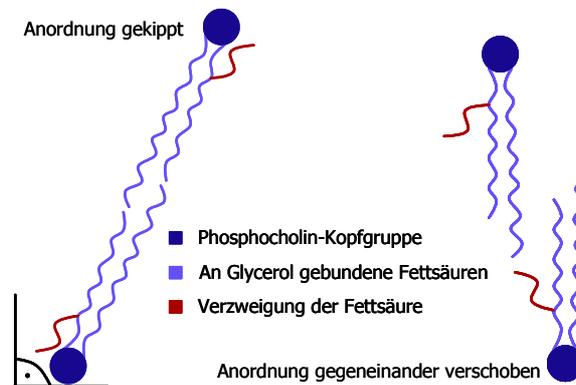


Abbildung 41: Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von Phospholipiden mit kürzerkettig verzweigten Fettsäuren. Die Phospholipide können gegeneinander verschoben sein. Dabei wird der Platzbedarf erhöht und die Dichte der Packung der Membran verringert. Bei sehr kurzen Verzweigungen sind die Seitenketten in Richtung der Kopfgruppen angeordnet. Der Platzbedarf der Phospholipide wird dadurch kaum beeinflusst. Allerdings kann sich dabei die Membran neigen [nach 160].

Die stabilisierende Interaktion zwischen den Alkanketten ist nicht mehr gegeben und die Membranstrukturen sind aufgelockert. Substanzen können sich in eine weniger geordnete Membran leichter einlagern als in eine hoch geordnete Schicht. Die verzweigte Methylgruppe des PL3 zeigt sich für die gesteigerte Unordnung der Membranen verantwortlich und hat damit einen indirekten Einfluss auf die Wirkweise der Lantibiotika. Die Zugabe von Gallidermin und Nisin in hohen Konzentrationen führt zu einer ausgeprägten unspezifischen Permeabilisierung der Membran, die durch den veränderten Ordnungsgrad der Schicht erleichtert ist. Die für das Gallidermin beobachtete sehr starke Zunahme der Stromstärke an Lipid II-haltigen Filmen ist zu einem Teil sicherlich auch durch die unspezifischen Effekte bedingt.

Möglicherweise beeinflusst die gebundene Methylgruppe neben der Ordnung der Phospholipide auch die Bindungskinetik der Lantibiotika an diesen Membranen. Um das zu überprüfen, wurden die Bindungskonstanten für Gallidermin und Nisin an DPOPC/PL3-Membranen mit und ohne Lipid II bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

		$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{diss}} [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{D}} [\text{M}]$
GALLIDERMIN	DPOPC/PL3	1116,08 $\pm 729,38$	$6,70 \cdot 10^{-4}$ $\pm 1,82 \cdot 10^{-4}$	$2,38 \cdot 10^{-7}$ $\pm 2,80 \cdot 10^{-8} \#$
	DPOPC/PL3/ 0,1 mol% Lipid II	1726,80 $\pm 626,48$	$1,50 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,05 \cdot 10^{-3} \diamond$	$8,43 \cdot 10^{-7}$ $\pm 3,7 \cdot 10^{-7} \dagger$
NISIN	DPOPC/PL3	1062,79 $\pm 136,40$	$2,07 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,30 \cdot 10^{-3}$	$1,35 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,54 \cdot 10^{-7}$
	DPOPC/PL3/ 0,1 mol% Lipid II	1645,67 $\pm 1115,79$	$2,61 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,03 \cdot 10^{-3}$	$1,89 \cdot 10^{-6}$ $\pm 7,69 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 14: Die Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an DPOPC/PL3-Membranen. Die durch das methylverzweigte PL3 geringere Membranordnung ermöglicht trotz gleichbleibender Assoziation eine bessere Einlagerung des Gallidermins in die Membran. Die Ursache dafür ist eine deutlich verlangsamte Dissoziation des Peptids. In Gegenwart von Lipid II ist die Assoziation des Gallidermins erhöht, vermutlich durch eine bessere Interaktion zwischen dem Peptid und Lipid II. Nisin zeigt an beiden DPOPC/PL3-Membranen eine schnellere Dissoziation als an DPOPC-Filmen. Eine dadurch bedingte geringere Einlagerung in die Membran, verglichen mit Gallidermin, kann angenommen werden. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit $\#$, für Lipid II-haltige im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit \dagger und für die DPOPC-Membranen mit PL3 im Vergleich zu den PL3-freien Membranen mit \diamond markiert.

Die Assoziation an reine DPOPC/PL3-Membranen ist für das Gallidermin im Vergleich zu DPOPC-Filmen ohne methylverzweigte Fettsäure nahezu gleich. Allerdings verläuft die Dissoziation in Gegenwart des methylverzweigten Phospholipids deutlich langsamer als ohne PL3. Die daraus resultierende sehr viel bessere Gesamtbindung korreliert mit den ausgeprägten unspezifischen Effekten der CV-Untersuchungen. Es scheint, als würde durch die gestörte Filmordnung die Interaktion zwischen der Membran und Gallidermin erhöht. Das Peptid kann sich in bestehende Fehlstellen besser einlagern. Eine daraus folgende partielle Integration von Gallidermin in die Membran würde auch die verlangsamte Dissoziation erklären.

In Gegenwart von Lipid II zeigt sich an DPOPC-Membranen erstmalig ein positiver Einfluss des bakteriellen Targets auf die Wirkung des Gallidermins. Die Assoziation ist, verglichen mit den Werten ohne methylverzweigte Phospholipide, mehr als doppelt so stark. Mögli-

cherweise liegt das Lipid II durch die gestörte Ordnung der Membran in einer Konformation vor, die es dem Gallidermin erlaubt, auch mit größeren Bereichen des Bactoprenols zu interagieren. Zusätzlich zu der beschriebenen unspezifischen Einlagerung des Gallidermins in die Membranen wird eine Ansammlung des Peptids durch Lipid II gefördert. Eine damit verbundene zusätzliche Aufweitung der Phospholipide erklärt auch den größeren Anstieg der Stromstärke. An dieser Stelle wird deutlich, dass die Verfügbarkeit des Lipid II in der Membran von der Zusammensetzung derselben abhängt. Durch unterschiedlich zusammengesetzte Membranen wird die bakterielle Zielstruktur unterschiedlich präsentiert. Die Interaktion zwischen Lipid II und den Lantibiotika wird neben der Struktur der Peptide auch durch die Anordnung des Lipid II in der Membran bestimmt. Diese Aussagen decken sich mit Untersuchungen von Bonelli *et al.* [79]. In dieser Arbeit konnte eine Porenbildung durch Gallidermin, im Gegensatz zu Nisin, in *Lactococcus lactis* nicht beobachtet werden. Allerdings war die MHK des Gallidermins um eine Zehnerpotenz geringer als die des Nisins. Unter Berücksichtigung der Aussagen in der vorliegenden Arbeit ist es möglich, dass die Membranzusammensetzung in *L. lactis* sich positiv auf die Anordnung des Lipid II auswirkt. Das Gallidermin kann trotz fehlender Porenbildung das Lipid II effektiver als Nisin binden und es damit der Zellwandbiosynthese entziehen.

Eine schnellere Dissoziation des Gallidermins von Lipid II-haltigen DPoPC/PL3-Membranen im Vergleich zu Lipid II-haltigem DPoPC führt dazu, dass die Gesamtbindungsfähigkeit durch die Methylverzweigung nur geringfügig verbessert ist.

Nisin zeigt an den Lipid II-freien DPoPC/PL3-Membranen eine Bindungskinetik, die mit der an DPoPC-Filmen vergleichbar ist. Gegenüber dem Gallidermin ist die Assoziation in etwa gleich, die Dissoziation allerdings deutlich schneller. Eine dem Gallidermin ähnliche Einlagerung des Peptids in bestehende Fehlstellen des Films erscheint durch die schnelle Dissoziation nicht in gleichem Ausmaß gegeben. Möglicherweise ist sie auch durch die größere räumliche Ausweitung des Nisins erschwert. Dieses Verhalten würde auch das geringere Ausmaß der Membranpermeabilisierung, wie es die CV-Ergebnisse zeigten, erklären.

An Lipid II-haltigen DPoPC/PL3-Membranen zeigt Nisin im Vergleich zu Gallidermin einen höheren k_D -Wert, der durch eine etwas langsamere Assoziation und eine schnellere Dissoziation bedingt ist. Diese Tatsache alleine mag vielleicht eine etwas geringere Permeabilität der Membran erklären, nicht aber die ausgeprägten Unterschiede der CV-Daten zwischen den beiden Peptiden. Zusätzlich wird vermutlich auch in DPoPC/PL3-Membranen die Interaktion zwischen Nisin und Lipid II so vermindert sein, dass eine Porenbildung ähnlich wie in DPoPC-Membranen ohne PL3 nicht möglich ist.

Unabhängig von der Bindungskinetik werden die Membranen durch die Interaktion mit Gallidermin oder Nisin in ihrer Fluidität kaum verändert, wie die Werte aus der Dämp-

fungsanalyse in Tabelle 15 zeigen. Die D/f-Werte für die DPoPC/PL3-Membranen liegen bei $0,315 \pm 0,047$ für Lipid II-freie und $0,345 \pm 0,157$ für Lipid II-haltige Membranen.

	DPoPC/PL3	DPoPC/PL3/ 0,1 mol% Lipid II
GALLIDERMIN	$0,344 \pm 0,202$	$0,320 \pm 0,183$ [◊]
NISIN	$0,187 \pm 0,107$	$0,420 \pm 0,312$

Tabelle 15: Die Dämpfung von DPoPC/PL3-Membranen nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin. Die Membran toleriert die Einlagerung von Gallidermin, eine Zunahme der Dämpfung ist nicht zu beobachten. An Lipid II-freie Membranen lagern sich im Vergleich zu Gallidermin weniger Nisinmoleküle an, wie die geringere Dämpfung vermuten lässt. An DPoPC/PL3-Membranen mit Lipid II wirken die bakterielle Zielstruktur und die Struktur des Nisins einer ähnlich wie Gallidermin tolerierten Einlagerung in die Membran entgegen. Entsprechend stärker fällt auch die Dämpfung aus. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für die DPoPC-Membranen mit PL3 im Vergleich zu den PL3-freien Membranen mit [◊] markiert.

Nach Zugabe von Gallidermin verändern sich diese Werte kaum. Auch hier besteht wieder die Möglichkeit, dass sich relativ wenige Moleküle an der Oberfläche der Membran befinden, oder das angelagerte Peptid sich wenig dämpfend auswirkt. Eine eindeutige Differenzierung ist schwierig. Jedoch deutet die Wirksamkeit des Gallidermins in den CV-Untersuchungen darauf hin, dass sich in diesem Fall die angelagerten Moleküle wenig dämpfend auswirken. Eine gute Tolerierung der eingelagerten Galliderminmoleküle durch die Membran und die darin enthaltenen Fehlstellen kann angenommen werden.

Dass sich an Lipid II-freien DPoPC/PL3-Membranen mehr Gallidermin- als Nisinmoleküle befinden, ließ sich schon anhand der kinetischen Analyse und der besseren Bindung für das Gallidermin vermuten. Die geringe Dämpfung durch Nisin lässt auch auf eine Anlagerung in kleineren Mengen schließen. Die wenigen Moleküle, die sich in die Membran einlagern, werden, ähnlich wie beim Gallidermin, gut toleriert. An Lipid II-haltigen Membranen kommt wieder die größere räumliche Ausweitung des Nisins gegenüber dem Gallidermin zum Tragen. Durch die nach wie vor stabilisierende Wirkung des Lipid II auf die Membran ist eine Einlagerung des Nisins in die Fehlstellen der Membran erschwert. Das Peptid findet sich in größerem Ausmaß an der Membranoberfläche wieder, was eine stärkere Dämpfung nach sich zieht. Bei Gallidermin ist dieser Effekt deutlich schwächer ausgeprägt. Das kleinere Molekül kann sich trotz Lipid II in die Fehlstellen der Membran einlagern.

Methylverzweigte Fettsäuren sorgen in den Phospholipidmembranen für eine Abnahme des Ordnungszustandes und verursachen möglicherweise Fehlstellen innerhalb der Filme. Es konnte gezeigt werden, dass es dadurch zu ausgeprägten unspezifischen Effekten nach

Zugabe von Gallidermin kommt. Um die Fehlstellen in den Membranen zu verringern und den Ordnungszustand zu erhöhen, wurde das PL3 durch das bereits beschriebene PL5 ersetzt. Dieses Phospholipid enthält an Position zwei des Glycerols eine Fettsäure, die am zweiten Kohlenstoff eine Hexylkette aufweist. Den Modellvorstellungen von Rattay *et al.* zufolge zeigen die Phospholipide mit steigender Kettenlänge der Verzweigung ein anderes Verhalten in der Membran. Längerkettige Verzweigungen führen dazu, dass die Phospholipide sich wieder in einer aufrechten Position in der Membran befinden. Dadurch ist die Stabilität der Membran erhöht. Je nach Anordnung der Seitenketten zueinander bzw. zu den Fettsäureketten benachbarter Phospholipide ist die Anzahl der Fehlstellen in der Membran im Vergleich zu kürzerkettigen Verzweigungen reduziert. In Abbildung 42 sind die beiden möglichen Anordnungen der Phospholipide mit längerkettigen Verzweigungen schematisch dargestellt.

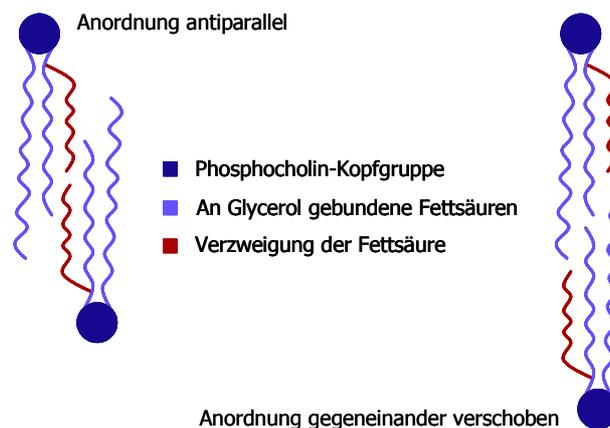


Abbildung 42: Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von Phospholipiden mit längerkettig verzweigten Fettsäuren. Die einzelnen Lipidmoleküle können antiparallel oder gegeneinander verschoben vorliegen. In beiden Fällen befindet sich die Membran in einer senkrechten Anordnung [nach 160].

Die Phospholipide können antiparallel vorliegen, das heißt, dass sich die Phosphocholin-köpfe innerhalb einer Doppelschicht nicht mehr gegenüber befinden. Liegen die Phospholipide gegeneinander verschoben vor, so stehen sich die Kopfgruppen nahezu direkt gegenüber. Die Anordnung der Fettsäuren ist seitenverkehrt. In beiden Fällen ist, durch die Verzweigung einer Fettsäure bedingt, der Platzbedarf der Phospholipide erhöht. Durch die relativ gleichmäßige Anordnung der Alkylreste und das Ineinandergreifen der Ketten kommt es zur schon angesprochenen Verringerung der Fehlstellen in der Membran.

Mit dem Einbau des hexylverzweigten Phospholipids in die DPoPC-Membranen sollte eine solche Verringerung der Fehlstellen angestrebt werden. Die Möglichkeit unspezifischer Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und einer defekten Membran sollte so eingeschränkt werden. Dennoch ist es möglich, die Auswirkung der verzweigten Fettsäuren auf

die spezifische Wirkung von Gallidermin in DPoPC-Membranen mit und ohne Lipid II zu untersuchen.

Aufgrund geringerer unspezifischer Effekte sollte die Zunahme der Permeabilität nach Zugabe von Gallidermin zu DPoPC/PL5-Membranen deutlich geringer ausfallen als an DPoPC/PL3-Filmen. Um dies zu überprüfen, wurden auch an dieser Stelle CV-Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse von Gallidermin und Nisin an DPoPC/PL5-Membranen mit und ohne Lipid II sind in Abbildung 43 dargestellt.

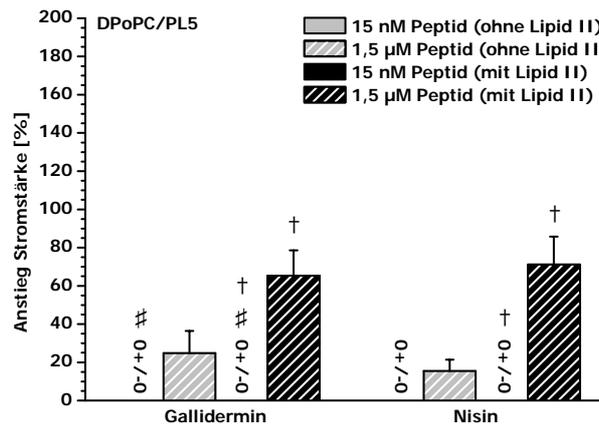


Abbildung 43: Die durch die Zugabe von Gallidermin und Nisin verursachten Änderungen in der Permeabilität von DPoPC/PL5-Membranen. Beide Peptide zeigen Effekte nur in hohen Konzentrationen. Unspezifische Effekte fallen relativ gering aus. Die Gegenwart von Lipid II führt zu einem starken Anstieg der Stromstärke, der sich auf die Interaktionen zwischen den Peptiden und Lipid II zurückführen lässt. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit # und für DPoPC/PL5-Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen mit † markiert.

Beim ersten Betrachten fällt auf, dass sich Gallidermin und Nisin in ihrem Verhalten an DPoPC/PL5-Membranen ähneln. Die permeabilisierende Wirkung beider Substanzen ist abhängig von der Gegenwart des Lipid II und der Peptidkonzentration. Das Ausmaß der unspezifischen Permeabilisierung ist deutlich reduziert. In niedrigen Konzentrationen zeigen beide Peptide keine Effekte mehr. Nach Zugabe hoher Peptidkonzentrationen zu Lipid II-freien Membranen ist die Zunahme der Stromstärke im Vergleich zu DPoPC/PL3-Membranen um mindestens 50% reduziert. In Gegenwart von Lipid II liegt die Zunahme des Stroms durch beide Peptide bei etwa 70%. Sie fällt damit für das Gallidermin an DPoPC/PL5-Membranen geringer aus als an DPoPC/PL3-Membranen. Den Werten in Abbildung 40 liegt eine Addition spezifischer und unspezifischer Effekte zugrunde. Die geringeren Werte an DPoPC/PL5-Membranen zeigen dagegen, dass die Stabilität und der Ordnungsgrad tatsächlich im Vergleich zu DPoPC/PL3-Membranen erhöht sind.

Auch wird an dieser Stelle erneut deutlich, dass das Gallidermin für eine Porenbildung in

Membranen verzweigt-kettige Fettsäuren benötigt. Dabei fällt nach Einsatz von hohen Galliderminkonzentrationen die Permeabilisierung der Membran in Gegenwart von Lipid II stärker aus als an Lipid II-freien Filmen.

Nisin zeigt in Gegenwart von Lipid II an Membranen mit hexylverzweigten Fettsäuren eine größere Zunahme der Stromstärke als an DPOPC/PL3-Membranen. Anscheinend ermöglicht die jetzt wieder aufrechte Anordnung der Phospholipide eine erneute Umorientierung des Lipid II. Die Konformation der bakteriellen Zielstruktur in DPOPC/PL5-Membranen ähnelt der in DOPC-Membranen und ermöglicht eine für die Porenbildung ausreichende Wechselwirkung zwischen Nisin und Lipid II.

Theoretisch sollte sich die an diesen Filmen verstärkte Interaktion zwischen Nisin und Lipid II und die spezifische Permeabilisierung der Membran durch Gallidermin in einem Bindungsverhalten an DPOPC/PL5-Filmen widerspiegeln, das sich von dem an DPOPC/PL3-Membranen unterscheidet. Deshalb wurden von beiden Peptiden k_{ass} , k_{diss} und k_{D} an den hexylverzweigten Membranen bestimmt. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 16 dargestellt.

		k_{ass} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_{diss} [s^{-1}]	k_{D} [M]
GALLIDERMIN	DPOPC/PL5	1177,96 $\pm 309,53$	$3,77 \cdot 10^{-4}$ $\pm 2,35 \cdot 10^{-4} \diamond$	$2,94 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,46 \cdot 10^{-7} \diamond$
	DPOPC/PL5/ 0,1 mol% Lipid II	1121,1 $\pm 454,65 \#$	$1,05 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,68 \cdot 10^{-4} \diamond$	$9,06 \cdot 10^{-7}$ $\pm 2,95 \cdot 10^{-7} \dagger$
NISIN	DPOPC/PL5	2692,84 $\pm 1419,92$	$8,47 \cdot 10^{-4}$ $\pm 2,48 \cdot 10^{-4} \diamond$	$2,36 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,02 \cdot 10^{-7}$
	DPOPC/PL5/ 0,1 mol% Lipid II	9040,87 $\pm 3266,11$	$2,09 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,48 \cdot 10^{-3} \dagger$	$3,41 \cdot 10^{-7}$ $\pm 2,26 \cdot 10^{-7} \diamond$

Tabelle 16: Die kinetischen Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an DPOPC/PL5-Membranen. Die Bindung von Gallidermin ist in Gegenwart von Lipid II schlechter. Dagegen zeigt Nisin eine durch Lipid II geförderte deutlich stärkere Bindung. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit $\#$, mit \dagger für Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen und für die DPOPC-Membranen mit PL5 im Vergleich zu den PL5-freien Membranen mit \diamond markiert.

Gallidermin zeigt eine insgesamt schlechtere Bindung an Membranen, die Lipid II enthalten. Dieses Verhalten war anhand der CV-Daten nicht zu erwarten gewesen. Entscheidend für die Bindungskinetik ist in diesem Fall die Dissoziation, die an Lipid II-haltigen DPOPC/PL5-Schichten bei unveränderter Assoziation schneller als an Lipid II-freien Filmen

verläuft. Die Fähigkeit des Gallidermins, DPoPC/PL5-Membranen zu permeabilisieren, scheint insgesamt zwar von der Anwesenheit des Lipid II, nicht aber von der Bindungsintensität abzuhängen.

Schaut man sich dagegen das Verhalten des Nisins an, so fällt eine starke Abhängigkeit der Assoziation von der Anwesenheit des Lipid II auf. Die beiden k_{ass} -Werte unterscheiden sich um den Faktor 3,4. Hier lässt sich eindeutig ein Zusammenhang zwischen stärkerer Assoziation und einer erhöhten Permeabilisierung der Modellmembran erkennen. Die Dissoziation an Lipid II-haltigen DPoPC-Membranen verläuft ca. 2,4-mal schneller als an Lipid II-freien Schichten. Daraus resultiert eine insgesamt schlechtere Bindungsfähigkeit. Wie die CV-Untersuchungen erkennen lassen, ist die schlechtere Dissoziation für eine Porenbildung in Lipid II-haltigen Membranen weniger entscheidend als die Assoziation.

Im Gegensatz zu den anderen Schichten zeigt sich für Gallidermin an DPoPC/PL5-Schichten auch anhand der Dämpfungsanalyse eine Abhängigkeit von Lipid II. Die Werte der D/f-Anstiege liegen ohne Peptidzugabe bei $0,597 \pm 0,103$ für Lipid II-freie und $0,351 \pm 0,188$ für Lipid II-haltige Filme. Der Lipid II-freie DPoPC/PL5-Film ist stärker fluid als reine DPoPC-Membranen. Der durch die antiparallele Anordnung der Phospholipide bedingte erhöhte Platzbedarf der Phospholipide lässt die Membran stärker dämpfend wirken. Enthält der Film Lipid II, so wird die DPoPC/PL5-Membran stabilisiert und die Dämpfung ist entsprechend geringer. Welche Veränderungen der Dämpfung Gallidermin und auch Nisin verursachen, soll anhand der D/f-Anstiege in Tabelle 17 gezeigt werden.

	DPoPC/PL5	DPoPC/PL5/ 0,1 mol% Lipid II
GALLIDERMIN	$0,946 \pm 0,158$ [#] [◇]	$0,663 \pm 0,439$ [†]
NISIN	$0,321 \pm 0,182$	$0,407 \pm 0,003$

Tabelle 17: Das Dämpfungsverhalten von DPoPC/PL5-Membranen nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin. Nisin zeigt eine deutliche Stabilisierung der Membran. Im Falle des Gallidermins lagern sich dagegen mehr Moleküle an die Membran und dämpfen diese stärker. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind für Gallidermin im Vergleich zu Nisin mit [#], mit [†] für Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen und für die DPoPC-Membranen mit PL5 im Vergleich zu den PL5-freien Membranen mit [◇] markiert.

Die Zugabe von Nisin bewirkt in der Lipid II-freien Membran eine deutliche Stabilisierung und damit eine deutlich reduzierte Dämpfung. An Lipid II-haltigen Membranen kommt dieser Effekt nicht zum Tragen, da die bakterielle Zielstruktur schon ausreichend stabilisierend wirkt.

Der recht hohe Wert des D/f -Anstieges für DPoPC/PL5-Membranen nach Zugabe von Gallidermin kann seine Ursache in einer verstärkten Interaktion zwischen der Membran und dem Peptid haben. Dagegen sprechen aber zwei Punkte. Zum einen wäre dann eine ausgeprägte Zunahme der Stromstärke an Lipid II-freien Membranen zu erwarten gewesen, was aber nicht der Fall war. Zum anderen hätte bei einer verstärkten Interaktion die Assoziationskonstante deutlich höher ausfallen müssen, was aber nicht beobachtet werden konnte. Alternativ kommt als Ursache für die hohe Dämpfung die Anlagerung von deutlich mehr Molekülen als nach Nisinzugabe in Betracht. Dies erscheint insofern wahrscheinlich, als dass die Galliderminmoleküle langsamer von der Membran dissoziieren. Gibt man Gallidermin zu Lipid II-haltigen DPoPC/PL5-Membranen, so fällt das Ausmaß der Dämpfung geringer aus, verglichen mit Lipid II-freien Filmen. Ein Eindringen des Gallidermins in die Membran mit gekoppelter Permeabilisierung kann sich wiederum stabilisierend auf die Membran auswirken und so die Dämpfung verringern. Das Ausmaß der Verringerung der Dämpfung fällt nicht so stark aus wie beim Nisin. Der Effekt der membranstabilisierenden Wirkung des Lipid II kommt weniger deutlich zum Tragen. Aufgrund der Bindungskonstanten erscheint es unwahrscheinlich, dass sich mehr Gallidermin- als Nisinmoleküle an der Membran anlagern. Der Wert des D/f -Anstieges muss also aus einer anderen Art der An- bzw. Einlagerung resultieren. Es ist eher unwahrscheinlich, dass sich das Gallidermin in gleicher Weise wie das Nisin in die Membran einlagert und diese durchspannen kann. Das Gallidermin bindet zwar an Lipid II, kann aber die Membran nicht durchspannen. Sofern es sich im Bereich der Membranoberfläche befindet, kann es – im Komplex mit Lipid II – die Phospholipide gegeneinander verschieben. Der Film wird dadurch flüdrer und dämpft den Quarz deutlich stärker.

Bisherige Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Gallidermins haben gezeigt, dass das Peptid *in vitro* keine Poren in Membranen bildet, deren Phospholipide zu lang sind. Eine im Gegensatz dazu stehende gute *in vivo*-Wirksamkeit lässt weitere Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit des Gallidermins vermuten.

Da bakterielle Membranen zum Teil erhebliche Mengen an verzweigt-kettigen Fettsäuren besitzen, wurden in dieser Arbeit entsprechende Phospholipide in die Modellmembranen eingebaut. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl kürzerkettige als auch längerkettige Verzweigungen die Wirkung des Gallidermins auf Modellmembranen positiv beeinflussen. Verzweigt-kettige Fettsäuren in Bakterien besitzen fast immer Methylverzweigungen. In dieser Arbeit traten starke und vor allem Lipid II-unabhängige Effekte an Membranen auf, die methylverzweigte Fettsäuren enthielten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Modellmembranen die Anordnung des Lipid II beeinflusst und des-

sen Verfügbarkeit gegenüber den Lantibiotika verändert. Es ist anzunehmen, dass aufgrund dieser Ergebnisse die gute *in vivo*-Wirksamkeit des Gallidermins in hohem Maß auf den Einfluss der Membran zurückzuführen ist.

4.4 Lacticin 3147

Für das Zweikomponenten-Lantibiotikum Lacticin 3147 wurde die synergistische Wirkung beider Einzelpeptide von Wiedemann *et al.* gezeigt [90]. Während das Lacticin A1 als Einzelpeptid die Zellwandsynthese hemmen kann, zeigt die alleinige Gabe von Lacticin A2 keine Wirkung. Beide Peptide besitzen Strukturelemente, die typischen Lantibiotika ähneln. Die Struktur des Ltn A1 enthält das Lipid II-Bindungsmotiv des Mersacidins. Daher wäre eine ähnlich gute Bindung wie das Typ B-Lantibiotikum zu erwarten. Das Ltn A2 besitzt zwar eine ähnlich langgestreckte Gestalt wie Nisin, weist aber einen anderen N-Terminus auf. Für das Ltn A2 ist demnach auch ein anderes Bindungsverhalten als für Nisin anzunehmen. Um das Bindungsverhalten der Einzelpeptide charakterisieren zu können, wurden die kinetischen Bindungskonstanten zunächst für die beiden Einzelpeptide bestimmt. Anschließend wurde die Bindungsfähigkeit der Kombination beider Peptide untersucht. Die zeitverzögerte Injektion von Ltn A1 und Ltn A2 gestaltete sich als schwierig. Eine mögliche Dissoziation von Ltn A1 konnte nicht eindeutig ausgewertet werden, da sie von der Assoziation des später dazu gegebenen Ltn A2 überlagert wurde. Aus diesem Grund wurden beide Peptide zeitgleich in die jeweilige Messzelle injiziert und der Gesamtverlauf von Assoziation und Dissoziation ausgewertet. In Tabelle 18 sind die ermittelten Bindungskonstanten sowohl für die Einzelpeptide als auch für die kombinierte Gabe an DOPC-Membranen mit und ohne Lipid II zusammengefasst.

Lacticin A1 zeigt eine recht starke Assoziation an reinen DOPC-Membranen. Im Vergleich zum strukturähnlichen Mersacidin (Tab. 8) ist k_{ass} mehr als dreimal so groß. Damit ist die Gesamtbindung des Ltn A1 an reinen DOPC-Membranen trotz etwas schnellerer Dissoziation im Vergleich zu Mersacidin verbessert. Ähnliche Tendenzen zeigen sich in Gegenwart von Lipid II. Die bakterielle Zielstruktur führt zu einer deutlich besseren Bindung des Ltn A1.

Die Bindungskonstanten des Ltn A2 zeigen ganz deutlich, dass dieses Peptid trotz ähnlicher langgestreckter Gestalt wie das Nisin nicht dessen Lipid II-Bindungsmotiv besitzt. An reinen DOPC-Filmen ist die Gesamtbindung des Ltn A2 schlechter als die des Nisins. Hauptursache ist eine sehr schnelle Dissoziation des Peptids von der Membran. In Gegenwart von Lipid II zeigt sich eine im Vergleich zu Nisin (Tab. 5) etwa fünffach schlechtere Assoziation. Bei fast unveränderter Dissoziation ist die Gesamtbindung des Ltn A2 somit

wie erwartet deutlich schlechter als die des Nisins. Die Assoziation des Ltn A2 ist verglichen mit Ltn A1 in Gegenwart von Lipid II auch mehr als dreimal schwächer. Die im Vergleich zu Ltn A1 bessere Gesamtbindung resultiert aus einer deutlich langsameren Dissoziation. Die Assoziationskonstanten beider Einzelpeptide unterstützen den von Wiedemann *et al.* aufgestellten dreistufigen Wirkmechanismus mit einer bevorzugten Bindung des Ltn A1 an Lipid II und einer nachfolgenden Anlagerung des Ltn A2.

		$k_{\text{ass}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{diss}} [\text{s}^{-1}]$	$K_{\text{D}} [\text{M}]$
LACTICIN A1	DOPC	2174,37 $\pm 1083,19$	$2,49 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,27 \cdot 10^{-3}$	$1,22 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4,5 \cdot 10^{-7}$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	3204,07 $\pm 378,01^{\diamond}$	$9,85 \cdot 10^{-3}$ $\pm 6,89 \cdot 10^{-4} \# \dagger \diamond$	$3,49 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,10 \cdot 10^{-7} \# \dagger \diamond$
LACTICIN A2	DOPC	3042,09 $\pm 1871,57$	$1,27 \cdot 10^{-2}$ $\pm 6,44 \cdot 10^{-3} \#$	$5,15 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,13 \cdot 10^{-6} \#$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	951,66 $\pm 378,35 \#$	$1,02 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,65 \cdot 10^{-4} \# \dagger$	$1,26 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,76 \cdot 10^{-7} \#$
LACTICIN A1/ LACTICIN A2	DOPC	1342,89 $\pm 1084,70$	$3,04 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,43 \cdot 10^{-3} \#$	$2,75 \cdot 10^{-6}$ $\pm 6,07 \cdot 10^{-7}$
	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II	1883,27 $\pm 286,78 \# \Delta \square$	$3,94 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,11 \cdot 10^{-3} \Delta$	$1,21 \cdot 10^{-6}$ $\pm 2,40 \cdot 10^{-7} \# \Delta$

Tabelle 18: Die Bestimmung der Bindungskonstanten von Lacticin 3147. Die Assoziation an DOPC/Lipid II-Membranen ist für das Ltn A1 am stärksten, was die Annahme einer initialen Bindung des Peptids an Membranen fördert. Die Dissoziation verläuft relativ schnell. Die Assoziation von Ltn A2 verläuft in Gegenwart von Lipid II deutlich langsamer, ebenso die Dissoziation. Bei simultaner Gabe beider Einzelpeptide befinden sich die Werte der Bindungskonstanten zwischen denen der Einzelpeptide. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind im Vergleich zu Nisin (Ltn A2 und Kombination) bzw. zu Mersacidin (Ltn A1) mit $\#$, mit \dagger für Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen, für Ltn A1 im Vergleich zu Ltn A2 mit \diamond , für die Kombination im Vergleich zu Ltn A1 mit Δ und für die Kombination im Vergleich zu Ltn A2 mit \square markiert.

Die kombinierte Injektion beider Einzelpeptide zeigt an reinen DOPC-Membranen eine Assoziationskonstante, die niedriger als die der beiden Einzelpeptiden ist. Möglicherweise behindern sich beide Peptide gegenseitig, und ein Ausmaß der Assoziation, wie es für die Einzelkomponenten gezeigt wurde, kann nicht erreicht werden. Der Wert der Gesamtbindungsfähigkeit steht zwischen dem der Einzelpeptide. In Gegenwart von Lipid II ist die Assoziation gesteigert, und die Dissoziation verläuft geringfügig schneller. Daraus resultiert eine bessere Gesamtbindungsfähigkeit gegenüber reinem DOPC. Die Bindungskonstanten

der kombinierten Gabe der Lacticine zu Lipid II-haltigen Membranen können auch mit denen der Einzelpeptide verglichen werden. Die Assoziation fällt stärker aus als bei alleiniger Zugabe von Ltn A2, aber deutlich geringer im Vergleich zur alleinigen Ltn A1-Gabe. Anscheinend ist durch die Gegenwart von Ltn A2 die komplette Assoziation von Ltn A1 gestört. Im Gegenzug verhindert Ltn A2 aber auch die schnelle Dissoziation des Ltn A1 von der Membran. Die Dissoziationskonstante der Kombination liegt zwischen denen der Einzelpeptide. Dies spricht dafür, dass für die volle Wirksamkeit beide Peptide benötigt werden. Lacticin A1 kann zwar als Einzelpeptid deutlich besser an die Membranen binden, kann eine mögliche Wirkung aber aufgrund der schnellen Dissoziation nicht entfalten. Lacticin A2 dagegen dissoziiert zwar weniger schnell von der Membran, kann aber nicht in dem Ausmaß assoziieren wie Ltn A1 und daher als Einzelpeptid nicht wirken. Durch die simultane Injektion beider Peptide wird die Dissoziation des Ltn A1 gehemmt, und dieses Peptid befindet sich in größerem Ausmaß an der Membran. Damit steht es, dem dreistufigen Wirkmechanismus entsprechend, für die Bindung von Ltn A2 zur Verfügung. Die Assoziation von Ltn A2 ist somit erhöht. Beide Peptide können dann in Kombination die Modellmembranen permeabilisieren.

Wie anhand der bisher untersuchten Peptide zu erwarten war, zeigte die Analyse der absolut gebundenen Peptidmengen keine Unterschiede zwischen den Einzelpeptiden und der Kombination aus Ltn A1 und Ltn A2 bzw. der An- und Abwesenheit von Lipid II. Die bestimmten Frequenzänderungen lagen mit Werten zwischen - 1,98 Hz und - 4,56 Hz im Bereich der anderen untersuchten Lantibiotika.

Die unterschiedlichen Bindungskinetiken der Einzelpeptide und der kombinierten Gabe sollten sich aber in Unterschieden der Permeabilisierung der Membran niederschlagen. Die entsprechenden CV-Ergebnisse sind in Abbildung 44 zu sehen.

Beim Betrachten der Abbildung 44 fällt zunächst auf, dass Lacticin A1 und A2 an reinen DOPC-Filmen keine Zunahme der Stromstärke hervorrufen. Eine Permeabilisierung der Membran findet somit nicht statt. Für Lacticin A2 ist die fehlende Permeabilisierung mit der sehr schnellen Dissoziation und der damit verbundenen fehlenden Verweildauer an der Membran erklärbar. Die Bindungskonstanten des Ltn A1 an reinem DOPC würden allerdings eine fehlende Permeabilisierung des Films erwarten lassen. Eine Korrelation zwischen der vergleichsweise guten Bindung und den CV-Ergebnissen kann nicht aufgestellt werden.

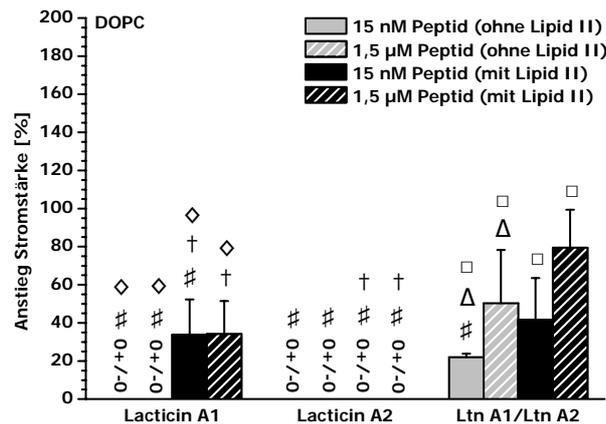


Abbildung 44: Der Anstieg der Stromstärke nach Zugabe von Lacticin 3147 zu DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II. Aufgrund der stärkeren Assoziation ist eine Permeabilisierung durch das Einzelpeptid nur bei Ltn A1 zu erkennen. Für eine volle Wirksamkeit sind aber erwartungsgemäß beide Peptide essentiell. Bei simultaner Gabe von Ltn A1 und A2 zeigt sich demzufolge auch eine Abhängigkeit der Wirkintensität von der Peptidkonzentration und der Anwesenheit von Lipid II. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind im Vergleich zu Nisin (Ltn A2 und Kombination) bzw. zu Mersacidin (Ltn A1) mit #, mit + für Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen, für Ltn A1 im Vergleich zu Ltn A2 mit °, für die Kombination im Vergleich zu Ltn A1 mit Δ und für die Kombination im Vergleich zu Ltn A2 mit □ markiert.

Enthält die Modellmembran Lipid II, so stellt man eine Übereinstimmung zwischen den CV-Daten und bereits veröffentlichten Ergebnissen fest [90]. Während Ltn A2 keinen Anstieg der Stromstärke zeigt, ist das Lacticin A1 auch als Einzelpeptid in der Lage, die Membran zu permeabilisieren. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass sich die Dissoziation und die Gesamtbindung für das Ltn A1 verglichen mit Ltn A2 als schlechter herausstellten. Lediglich die Assoziation ist für Ltn A1 deutlich stärker ausgeprägt und ist damit vermutlich der für die Permeabilisierung entscheidende Schritt. Es wird an dieser Stelle einmal mehr deutlich, dass es nicht ausreicht, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante zu bestimmen. Entscheidend und notwendig ist die Betrachtung der Assoziation und der Dissoziation als Einzelprozesse.

Injiziert man Ltn A1 und Ltn A2 zeitgleich in die Messzelle, so ist an allen Modellmembranen eine deutliche Zunahme der Stromstärke zu beobachten. Das Ausmaß der Zunahme hängt von der Peptidkonzentration und der Anwesenheit von Lipid II ab. Die bessere Permeabilisierung der Lipid II-haltigen Membran korreliert wiederum mit der stärkeren Assoziation. Eine etwas schnellere Dissoziation ist für die Permeabilisierung in diesem Fall nicht entscheidend. Obwohl sich k_{ass} und k_{diss} der Peptidkombination zwischen den Werten der Einzelpeptide befindet, ist eine Zunahme der Stromstärke zu verzeichnen. Es kann angenommen werden, dass die deutlich bessere Permeabilisierung der Membran tatsächlich auf additiven Effekten beider Einzelpeptide beruht. Damit bestätigen sich die Überlegungen

von Wiedemann *et al.* hinsichtlich des Zusammenwirkens von Lacticin A1 und A2 und einem mehrstufigen Wirkmechanismus.

Eine bevorzugte Einlagerung in die Membran bei gleichzeitiger Gabe beider Lacticine zeigt auch die Dämpfungsanalyse. Tabelle 19 zeigt die Anstiege der D/f-Graphen, die im Rahmen der kinetischen Analyse bestimmt wurden.

	DOPC	DOPC/ 0,1 mol% Lipid II
LACTICIN A1	0,110 ± 0,017 ^{#◇}	0,334 ± 0,085 [†]
LACTICIN A2	0,848 ± 0,351	0,314 ± 0,285 [#]
LACTICIN A1/A2	0,875 ± 0,290 ^{#△}	0,958 ± 0,762

Tabelle 19: Die Dämpfungsanalyse an DOPC-Membranen nach Zugabe von Lacticin 3147. Aufgrund der guten Assoziation befindet sich Ltn A1 dicht an der Membran und dämpft diese weniger stark. Die Zugabe von Ltn A2 führt wegen einer schwächeren Interaktion zu einer stärkeren Dämpfung. Recht hohe Dämpfungswerte für die Kombination beider Peptide sind auf die größere Peptidmenge und daraus resultierende additive Effekte beider Einzelpeptide zurückzuführen. Statistisch signifikante Werte bei $p \leq 0,05$ sind im Vergleich zu Nisin (Ltn A2 und Kombination) bzw. zu Mersacidin (Ltn A1) mit [#], mit [†] für Membranen mit Lipid II im Vergleich zu Lipid II-freien Membranen, für Ltn A1 im Vergleich zu Ltn A2 mit [◇] und für die Kombination im Vergleich zu Ltn A1 mit [△] markiert.

Lacticin A1 reduziert die Dämpfung unabhängig von der Anwesenheit des Lipid II. Die verminderte Dämpfung kann durch die relativ dichte Anlagerung des Ltn A1 an die Membran verursacht sein. Möglich sind eine intensive Wechselwirkung vor allem mit den oberen Bereichen der Membran und eine zusätzliche Stabilisierung derselben. Lacticin A2 zeigt eine Abhängigkeit des Dämpfungsverhaltens von der Anwesenheit des Lipid II. An reinen DOPC-Filmen kommt die ausgeprägte Dämpfung wahrscheinlich durch die Anzahl der gut assoziierenden Ltn A2-Moleküle zustande. Die schnelle Dissoziation scheint keinen Einfluss darauf zu haben. Die Kombination beider Lacticine führt unabhängig von Lipid II zu einer Zunahme der Dämpfung. Es ist vorstellbar, dass selbst nach Interaktion beider Peptide und partieller Einlagerung in die Membran noch ein ausreichend großer Teil des Komplexes aus der Membran herausragt. Die überstehenden Teile des Komplexes werden auch nicht in enger Nachbarschaft stehen und so keine Möglichkeit eines Kontaktes untereinander haben. Folglich werden sie auch nicht in der Lage sein, die Schwingung des Quarzes gut aufzunehmen. Entsprechend groß ist die Dämpfung in diesem Fall.

Das Verhalten der Lacticine A1 und A2 in dieser Arbeit bestätigt die Annahme eines mehr-

stufigen Wirkmechanismus, an dem beide Komponenten beteiligt sind. Eine ausgeprägte Permeabilisierung der Membran zeigt sich nur nach simultaner Injektion beider Peptide. Lacticin A1 alleine kann nicht nur an die DOPC/Lipid II-Membran binden, es kann sie anscheinend auch permeabilisieren. Detaillierte kinetische Untersuchungen zeigten, dass die Veränderungen in den Stromstärken nicht vollständig mit den kinetischen Bindungskonstanten zu korrelieren sind. Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Assoziation eine wichtige Rolle spielt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit einer Gruppe antimikrobieller Substanzen, den Lantibiotika. Einzelne Schritte im Wirkprozess der Lantibiotika wurden detailliert mit Hilfe der Quarzmikrowaage und der Zyklischen Voltammetrie unter *in vitro*-Bedingungen simuliert. Die Wirkung der Lantibiotika konnte an verschiedenen Modellmembranen untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem initialen Bindungsschritt der Peptide und der damit verbundenen Bindungskinetik. Mit Hilfe der Quarzmikrowaage wurden nicht nur die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten bestimmt. Es war erstmalig möglich, die an der Bindung der Lantibiotika beteiligten Prozesse der Assoziation und der Dissoziation getrennt zu betrachten und Bindungskonstanten zu bestimmen. Anhand der Dämpfungsanalyse ermöglichte der Einsatz der Quarzwaage darüber hinaus Aussagen zu den viskoelastischen Eigenschaften der Modellmembranen.

Durch die Anwendung der Zyklischen Voltammetrie konnten Permeabilitätsänderungen in den Modellmembranen verfolgt werden, die sich aus Lipid II-unabhängigen und Lipid II-abhängigen Prozessen zusammensetzten.

Zusammengefasst ergab die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Simulierung der antimikrobiellen Aktivität ausgewählter Lantibiotika mittels kombinierter Biosensortechniken folgende Ergebnisse:

Nisin

Die Bestimmung der Bindungskonstanten zeigte, dass an ungeladenen DOPC-Modellmembranen vor allem die Assoziation durch die Anwesenheit von Lipid II positiv beeinflusst wird. Die durch Lipid II verstärkte Bindung wird an DOPG-Membranen durch die negative Ladung der Phospholipide überdeckt.

Die Bestimmung der absolut gebundenen Nisinmengen mittels QCM zeigte keine Korrelation mit den Bindungsparametern.

In Gegenwart negativ geladener Phospholipide zeigten sich nach Zugabe von Nisin ausgeprägte Lipid II-unabhängige Effekte, die mit dem Modell des „carpet mechanism“ beschrieben werden können. Die Gegenwart der bakteriellen Zielstruktur wirkt den unspezifischen Effekten durch die Stabilisierung der Membran entgegen. Der Einsatz bildgebender Verfahren unterstützte die Aussage einer Membranstabilisierung durch Lipid II.

Nach Zugabe von Nisin zeigte sich an DOPC- und DOPG-Filmen eine Permeabilisierung der Membran. Deren Ausmaß war in Gegenwart von Lipid II und negativ geladenen Phospholipiden deutlich verstärkt.

Mersacidin

Auch für das Mersacidin wurden erstmalig kinetische Bindungskonstanten bestimmt. Das Ausmaß der Assoziation wurde wiederum durch die Anwesenheit von Lipid II günstig beeinflusst. Die Analyse des Bindungsschritts hat gezeigt, dass nicht die kompakte Gestalt des Moleküls, sondern auch eine sehr schnelle Dissoziation von der Membran einer möglichen Porenbildung entgegensteht.

Unter Anwendung der CV konnte eine Permeabilisierung der Membran nur in hohen Mersacidinkonzentrationen und in Gegenwart von Lipid II beobachtet werden. Da eine spezifische Porenbildung wie für Nisin ausgeschlossen wird, ist dies am Wahrscheinlichsten auf eine Störung der Filmordnung nach der Bindung des Mersacidins zurückzuführen.

Gallidermin

In Gegenwart von Lipid II zeigte Gallidermin eine ähnlich gute Affinität gegenüber DOPC-Membranen wie Nisin, obwohl die Assoziation des Gallidermins schwächer ist als die des Nisins. Der trotzdem ähnlich guten Affinität der beiden Peptide an DOPC/Lipid II-Membranen liegt die im Vergleich zu Nisin langsamere Dissoziation des Gallidermins zugrunde. Eine anhand der Bindungsdaten vermutete Porenbildung durch Gallidermin konnte an DOPC-Membranen nicht gezeigt werden.

Aufgrund der geringeren Länge des Gallidermins ließ sich vermuten, dass dieses Peptid in kürzeren Modellmembranen zur Porenbildung befähigt ist. Die CV-Analyse zeigte jedoch keine Permeabilisierung verkürzter Membranen. Anhand der Bestimmung der kinetischen Bindungsparameter ließ sich erkennen, dass die Ursache dafür im Bindungsverhalten des Gallidermins liegt.

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung von Gallidermin auf Modellmembranen mit verzweigt-kettigen Fettsäuren untersucht. Die Wirkung des Gallidermins auf die Modellmembranen wurde durch die verzweigt-kettigen Fettsäuren positiv beeinflusst. Die Zusammensetzung der Membran beeinflusste dabei vor allem die Anordnung des Lipid II und damit dessen Zugänglichkeit gegenüber den Lantibiotika. Gallidermin zeigte an Modellmembranen mit verzweigt-kettigen Fettsäuren eine deutlich verbesserte Bindungskinetik und die Fähigkeit zur Permeabilisierung der Membran. Damit konnten von anderen Arbeitsgruppen beobachtete Unterschiede des Gallidermins zwischen fehlender Porenbildung *in vitro* und sehr guter Wirksamkeit *in vivo* erklärt werden.

Lacticin 3147

Das Verhalten von Lacticin 3147 an DOPC-Membranen bestätigte die bereits existierende Annahme eines mehrstufigen Prozesses, in dem die beiden Einzelpeptide Ltn A1 und

Ltn A2 zusammenwirken. Die Bindungsanalyse der Einzelpeptide zeigt eine deutliche bessere Bindung für Ltn A1 im Vergleich zu Ltn A2 und untermauert damit die Rolle des Ltn A1 im initialen Bindungsschritt des Lacticin 3147.

Wie anhand der CV-Daten gezeigt werden konnte, hat die schlechtere Bindung des Ltn A2 zur Folge, dass dieses Peptid nicht alleine in der Lage ist, die Membran zu permeabilisieren. Die CV-Analyse zeigte weiterhin, dass die volle Permeabilisierung der Modellmembran tatsächlich nur durch die Kombination der beiden Einzelpeptide erreicht werden kann.

Die Untersuchung aller in dieser Arbeit vorgestellten Lantibiotika zeigte, dass sich die QCM und die CV ideal ergänzen. Durch die kombinierte Anwendung beider Techniken wurden detaillierte Beiträge zum Wirkmechanismus der Lantibiotika geliefert. Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung von Modellmembranen eine einfache und vor allem variable Simulation bakterieller Membranen. Der Einfluss der Zusammensetzung der Membranen auf die Wirkung der Lantibiotika konnte damit eindrucksvoll demonstriert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] KAYSER F.H., BIENZ K.A., ECKERT J., ZINKERNAGEL R.M. (1998) Medizinische Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart • New York*, 45 ff.
- [2] EL ZOEIBY A., SANSCHAGRIN F., LEVESQUE R.C. (2003) Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecul. Microbiol.* **47** (1), 1-12.
- [3] SILVER L.L. (2003) Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **6** (5), 431-438.
- [4] TIPPER D.J. (1968) Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls. *J. Biol. Chem.* **243** (11), 3169-3179.
- [5] MURRAY B.E., MOELLERING R.C. (1981) Cephalosporins. *Ann. Rev. Med.* **32**, 559-581.
- [6] SINGH G.S. (2004) β -Lactams in the New Millennium. Part-I: Monobactams and Carbapenems. *Mini-Rev. Med. Chem.* **4** (1), 69-92.
- [7] STONE K.J., STROMINGER, J.L. (1971) Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C₅₅-Isoprenyl Pyrophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68** (12), 3223-3227.
- [8] BREUKINK E., DE KRUIJFF B. (2006) Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (4), 321-332.
- [9] BARNA J.C.J., WILLIAMS D.H. (1984) The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the Vancomycin group. *Ann. Rev.* **38**, 339-357.
- [10] REYNOLDS P.E. (1989) Structure, Biochemistry and Mechanism of Action of Glycopeptide Antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8** (11), 943-950.
- [11] HE H. (2005) Mannopectimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67** (4), 444-452.
- [12] MCCAFFERTY D.G., CUDIC P., FRANKEL B.A., BARKALLAH S., KRUGER R.G., LI W. (2002) Chemistry and Biology of the Ramoplanin Family of Peptide Antibiotics. *Biopolymers* **66** (4), 261-284.
- [13] REDDY K.V.R., YEDERY R.D., ARANHA C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrobiol. Ag.* **24** (4), 536-547.
- [14] SHAI Y. (2002) Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **66** (4), 236-248.
- [15] LOHNER K., BLONDELLE S.E. (2005) Molecular Mechanisms of Membrane Perturbation by Antimicrobial Peptides and the Use of Biophysical Studies in the Design of Novel Peptide Antibiotics. *Comb. Chem. High Through. Scr.* **8** (3), 241-256.
- [16] BROGDEN K.A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.* **3** (3), 238-250.
- [17] KLAENHAMMER T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **12** (1-3), 39-86.

- [18] O'SULLIVAN L., ROSS R.P., HILL C. (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* **84** (5-6), 593-604.
- [19] GARNEAU S., MARTIN N.I., VEDERAS J.C. (2002) Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* **84** (5-6), 577-592.
- [20] HÉCHARD Y., SAHL H.-G. (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84** (5-6), 545-557.
- [21] JACK R.W., TAGG J.R., RAY B. (1995) Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* **59** (2), 171-200.
- [22] COTTER P.D., HILL C., ROSS R.P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* **3** (10), 777-788.
- [23] SZEKAT C., JACK R.W., SKUTLAREK D., FÄRBER H., BIERBAUM G. (2003) Construction of an Expression System for Site-Directed Mutagenesis of the Lantibiotic Mersacidin. *Appl. Environment. Microbiol.* **69** (7), 3777-3783.
- [24] GUDER A., WIEDEMANN I., SAHL H.-G. (2000) Posttranslationally Modified Bacteriocins - The Lantibiotics. *Biopolymers* **55** (1), 62-73.
- [25] PAG U., SAHL H.-G. (2002) Multiple Activities in Lantibiotics – Models for the Design of Novel Antibiotics? *Curr. Pharm. Design* **8** (9), 815-833.
- [26] WIRAWAN R.E., KLESSE N.A., JACK R.W., TAGG J.R. (2006) Molecular and genetic Characterization of a Novel Nisin Variant Produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environment. Microbiol.* **72** (2), 1148-1156.
- [27] VAN KRAAIJ C., DE VOS W.M., SIEZEN R.J., KUIPERS O.P. (1999) Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* **16** (5), 575-587.
- [28] SABLON E., CONTRERAS E., VANDAMME E. (2000) Antimicrobial Peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetics and Biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng.* **68**, 21-60.
- [29] INGRAM L. (1970) A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochim. Biophys. Acta* **224** (1), 263-265.
- [30] TWOMEY D., ROSS R.P., RYAN M., MEANEY B., HILL C. (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek* **82** (1-4), 165-185.
- [31] PATTON G.C., VAN DER DONK W.A. (2005) New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.* **8** (5), 543-551.
- [32] HILLE M., KIES S., GÖTZ F., PESCHEL A. (2001) Dual Role of GdmH in producer Immunity and Secretion of the Staphylococcal Lantibiotics Gallidermin and Epidermin. *Appl. Environment. Microbiol.* **67** (3), 1380-1383.
- [33] MCAULIFFE O., ROSS R.P., HILL C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25** (3), 285-308.
- [34] CHEIGH C.-I., PYUN Y.-R. (2005) Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.* **27** (21), 1641-1648.

- [35] COTTER P.D., DRAPER L.A., LAWTON E.M., MCAULIFFE O. HILL C., ROSS R.P. (2006) Overproduction of Wild-Type and Bioengineered Derivatives of the Lantibiotic Lacticin 3147. *Appl. Environment. Microbiol.* **72** (6), 4492-4496.
- [36] JUNG G. (1991) Lantibiotics – Ribosomally Synthesized Biologically Active Polypeptides containing Sulfide Bridges and α , β – Didehydroamino Acids. *Angew. Chem.* **30** (9), 1051-1192.
- [37] FREUND S., JUNG G., GUTBROD O., FOLKERS G., GIBBONS W.A., ALLGAIER H., WERNER R. (1991) The Solution Structure of the Lantibiotic Gallidermin. *Biopolymers* **31** (6), 803-811.
- [38] SAHL H.-G., JACK R.W., BIERBAUM G. (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230** (3), 827-853.
- [39] ENTIAN K.-D., KLEIN C. (1993) Lantibiotika, eine Klasse ribosomal synthetisierter Peptid-Antibiotika. *Naturwissenschaften* **80** (10), 454-460.
- [40] BIERBAUM G., BRÖTZ H., KOLLER K.-P., SAHL H.-G. (1995) Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiol. Lett.* **127** (1-2), 121-126.
- [41] GROSS E., MORELL J.L. (1970) Nisin. The Assignment of Sulfide Bridges of β -Methylanthionine to a Novel Bicyclic Structure of Identical Ring Size. *J. Amer. Chem. Soc.* **92** (9), 2919-2920.
- [42] GROSS E., MORELL J.L. (1971) The Structure of Nisin. *J. Amer. Chem. Soc.* **93** (18), 4634-4635.
- [43] MOLL G.N., KONINGS W.N., DRIESSEN A.J.M. (1999) Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* **76** (1-4), 185-198.
- [44] ZENDO T., FUKAO M., UEDA K., HIGUCHI T., NAKAYAMA J., SONOMOTO K. (2003) Identification of the Lantibiotic Nisin Q, a New Natural Nisin Variant Produced by *Lactococcus lactis* 61-14 Isolated from a River in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76** (7), 1616-1619.
- [45] BREUKINK E., VAN KRAAIJ C., DEMEL R.A., SIEZEN R.J., KUIPERS O.P., DE KRUIJFF B. (1997) The C-terminal Region of Nisin is Responsible for the Initial Interaction of Nisin with the Target Membrane. *Biochemistry* **36** (23), 6968-6976.
- [46] WIEDEMANN I., BREUKINK E., VAN KRAAIJ C., KUIPERS O.P., BIERBAUM G., DE KRUIJFF B., SAHL H.-G. (2001) Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *J. Biol. Chem.* **276** (2), 1772-1779.
- [47] KUIPERS O.P., ROLLEMA H.S., YAP W.M.G.J., BOOT H.J., SIEZEN R.J., DE VOS W.M. (1992) Engineering Dehydrated Amino Acid Residues in the Antimicrobial Peptide Nisin. *J. Biol. Chem.* **267** (34), 24340-24346.
- [48] CHAN W.C., LEYLAND M., CLARK J., DODD H.M., LIAN L.-Y., GASSON M.J., BYCROFT B.W., ROBERTS G.C.K. (1996) Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: antibacterial activity of fragments of nisin. *FEBS Lett.* **390** (2), 129-132.

- [49] VAN KRAAIJ C., BREUKINK E., ROLLEMA H.S., BONGERS R.S., KOSTERS H.A., DE KRUIJFF B., KUIPERS O.P. (2000) Engineering a disulfide bond and free thiols in the lantibiotic nisin Z. *Eur. J. Biochem.* **267** (3), 901-909.
- [50] VAN DE VEN F.J.M., VAN DEN HOOVEN H.W., KONINGS R.N.H., HILBERS C.W. (1991) NMR Studies of lantibiotics; the structure of nisin in aqueous solution. *Eur. J. Biochem.* **202** (3), 1181-1188.
- [51] MATTICK A.T.R., HIRSCH A. (1944) A Powerful Inhibitory Substance produced by Group N Streptococci. *Nature* **3913**, 551.
- [52] DELVES-BROUGHTON J., BLACKBURN P., EVANS R.J., HUGENHOLTZ J. (1996) applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* **69** (2), 193-202.
- [53] SAHL H.-G., BIERBAUM G. (1998) Lantibiotics: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 41-79.
- [54] RUHR E., SAHL H.-G. (1985) Mode of Action of the Peptide Antibiotic Nisin and Influence on the Membrane Potential of Whole Cells and on Cytoplasmic and Artificial Membrane Vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** (5), 841-845.
- [55] DRIESSEN A.J., VAN DEN HOOVEN H.W., KUIPER W., VAN DE KAMP M., SAHL H.-G., KONINGS R.N.H., KONINGS W.N. (1995) Mechanistic Studies of Lantibiotic-Induced Permeabilization of Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **34** (5) 1606-1614.
- [56] BREUKINK E., GANZ P., DE KRUIJFF B., SEELIG J. (2000) Binding of Nisin Z to Bilayer Vesicles As Determined with Isothermal Titration Calorimetry. *Biochemistry* **39** (33), 10247-10254.
- [57] BREUKINK E., DE KRUIJFF B. (1999) The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim. Biophys. Acta* **1462** (1-2), 223-234.
- [58] MOLL G.N., KONINGS W.N., DRIESSEN A.J.M. (1998) The Lantibiotic nisin Induces Transmembrane Movement of a Fluorescent Phospholipid. *J. Bacteriol.* **189** (24), 6565-6570.
- [59] BREUKINK E., VAN KRAAIJ C., VAN DALEN A., DEMEL R.A., SIEZEN R.J., DE KRUIJFF B., KUIPERS O.P. (1998) The Orientation of Nisin in Membranes. *Biochemistry* **37** (22), 8153-8162.
- [60] LINNETT P.E., STROMINGER J.L. (1973) Additional Antibiotic Inhibitors of Peptidoglycan Synthesis. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **4** (3), 231-236.
- [61] REISINGER P., SEIDEL H., TSCHESCHE H., HAMMES W.P. (1980) The Effect of Nisin on Murein Synthesis. *Arch. Microbiol.* **127** (3), 187-193.
- [62] BRÖTZ H., JOSTEN M., WIEDEMANN I., SCHNEIDER U., GÖTZ F., BIERBAUM G., SAHL H.-G. (1998) Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* **30** (2), 317-327.
- [63] HOFFMANN A., PAG U., WIEDEMANN I., SAHL H.-G. (2002) Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Il Farmaco* **57** (8), 685-691.

- [64] BRÖTZ H., SAHL H.-G. (2000) New insights into the mechanism of action of lantibiotics – diverse biological effects by binding to the same molecular target. *J. Antimicrob. Chemother.* **46** (1), 1-6.
- [65] WIEDEMANN I., BENZ R., SAHL H.-G. (2004) Lipid II – Mediated Pore Formation by the Peptide Antibiotic Nisin: a Black Lipid Membrane Study. *J. Bacteriol.* **186** (10), 3259-3261.
- [66] VAN HEUSDEN H.E., DE KRUIJFF B., BREUKINK E. (2002) Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry* **41** (40), 12171-12178.
- [67] BREUKINK E., VAN HEUSDEN H.E., VOLLMERHAUS P.J., SWIEZEWSKA E., BRUNNER L., WALKER S., HECK A.J.R., DE KRUIJFF B. (2003) Lipid II is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. *J. Biol. Chem.* **278** (22), 19898-19903.
- [68] HASPER H.E., DE KRUIJFF B., BREUKINK E. (2004) Assembly and Stability of Nisin – Lipid II Pores. *Biochemistry* **43** (36), 11567-11575.
- [69] HSU S.-T.D., BREUKINK E., TISCHENKO E., LUTTERS M.A.G., DE KRUIJFF B., KATEIN R., BONVIN A.M.J.J., VAN NULAND N.A.J. (2004) The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11** (10), 963-967.
- [70] BONEV B.B., BREUKINK E., SWIEZEWSKA E., DE KRUIJFF B., WATTS A. (2004) Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *FASEB J.* **18** (15), 1862-1869.
- [71] ARANHA C., GUPTA S., REDDY K.V.R. (2004) Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies. *Contraception* **69** (4), 333-338.
- [72] MORGAN S.M., O'CONNOR P.M., COTTER P.D., ROSS R.P., HILL C. (2005) Sequential Actions of the Two Component Peptides of the Lantibiotic Lacticin 3147 Explain Its Antimicrobial Activity at Nanomolar Concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (7), 2606-2611.
- [73] DELVES-BROUGHTON J. (2005) Nisin as food preservative. *Food Australia* **57** (12), 525-527.
- [74] COTTER P.D., HILL C., ROSS R.P. (2005) Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Therapeutic Potential. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **6** (81), 61-75.
- [75] KELLNER R., JUNG G., HÖRNER T., ZÄHNER H., SCHNELL N., ENTIAN K.-D., GÖTZ F. (1988) Gallidermin: a new lanthionine – containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* **177** (1), 53-59.
- [76] MEYER H.E., HEBER M., EISERMANN B., KORTE H., METZGER J.W., JUNG G. (1994) Sequence Analysis of Lantibiotics: Chemical Derivatization Procedures Allow a Fast Access to Complete Edmann Degradation. *Anal. Biochem.* **223** (2), 185-190.
- [77] PESCHEL A., SCHNELL N., HILLE M., ENTIAN K.-D., GÖTZ F. (1997) Secretion of the lantibiotics epidermin and gallidermin: sequence analysis of the genes *gdmT* and *gdmH*, their influence on epidermin production and their regulation by EpiQ. *Mol. Gen. Genet.* **254** (3), 312-318.

- [78] SCHNELL N., ENTIAN K.-D., GÖTZ F., HÖRNER T., KELLNER R., JUNG G. (1989) Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. *FEMS Microb. Lett.* **49 (2-3)**, 263-267.
- [79] BONELLI R.R., SCHNEIDER T., SAHL H.-G., WIEDEMANN I. (2006) Insights into In Vivo Activities of Lantibiotics from Gallidermin and Epidermin Mode-of-Action Studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50 (4)**, 1449-1457.
- [80] BRÖTZ H., BIERBAUM G., REYNOLDS P.E., SAHL H.-G. (1997) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.* **246 (1)**, 193-199.
- [81] PRASCH T., NAUMANN T., MARKERT R.L.M., SATTLER M., SCHUBERT W., SCHAAL S., BAUCH M., KOGLER H., GRIESINGER C. (1997) Constitution and solution conformation of the antibiotic mersacidin determined by NMR and molecular dynamics. *Eur. J. Biochem.* **244 (2)**, 501-512.
- [82] BRÖTZ H., BIERBAUM G., MARKUS A., MOLITOR E., SAHL H.-G. (1995) Mode of Action of the Lantibiotic Mersacidin: Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis via a Novel Mechanism? *Antimicrob. Agents Chemother.* **39 (3)**, 714-719.
- [83] CHATTERJEE S., CHATTERJEE D.K., JANI R.H., BLUMBAHC J., GANGULI B.N. (1992) Mersacidin, a new antibiotic from bacillus/In vitro and in vivo antibacterial activity. *J. Antibiotics* **45 (6)**, 839-845.
- [84] BRÖTZ H., BIERBAUM G., LEOPOLD K., REYNOLDS P.E., SAHL H.-G. (1998) The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42 (1)**, 154-160.
- [85] HSU S.-T.D., BREUKINK E., BIERBAUM G., SAHL H.-G., DE KRUIJFF B., KAPTEIN R., VAN NULAND N.A.J., BONVIN A.M.J.J. (2003) NMR Study of Mersacidin and Lipid II Interaction in Dodecylphosphocholine Micelles. *J. Biol. Chem.* **278 (15)**, 13110-13117.
- [86] MCAULIFFE O., RYAN M.P., ROSS R.P., HILL C., BREEUWER P., ABEE T. (1998) Lacticin 3147, a Broad-Spectrum Bacteriocin Which Selectively Dissipates the Membrane Potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **64 (2)**, 439-445.
- [87] MARTIN N.I., SPRULES T., CARPENTER M.R., COTTER P.D., HILL C., ROSS R.P., VEDERAS J.C. (2004) Structural Characterization of lacticin 3147, a two-Peptide lantibiotic with Synergistic Activity. *Biochemistry* **43 (11)**, 3049-3056.
- [88] COTTER P.D., O'CONNOR P.M., DRAPER L.A., LAWTON E.M., DEEGAN L.H., HILL C. (2005) Posttranslational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lacticin 3147. *PNAS* **102 (51)**, 18584-18589.
- [89] ROSS R.P., GALVIN M., MCAULIFFE O., MORGAN S.M., RYAN M.P., TWOMEY D.P., MEANY W.J., HILL C. (1999) Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* **76 (1-4)**, 337-346.
- [90] WIEDEMANN I., BÖTTIGER T., BONELLI R.R., WIESE A., HAGGE S.O., GUTSMANN T., SEYDEL U., DEEGAN L., HILL C., ROSS R.P., SAHL H.-G. (2006) the mode of action of the

- lantibiotic lactacin 3147-a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* **61** (2), 285-296.
- [91] HOLO H., JEKNIC Z., DAESCHEL M., STEVANOVIC S., NES I.F. (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* **147** (Pt 3), 643-651.
- [92] KRAMER N.E., SMID E.J., KOK J., DE KRUIJFF B., KUIPERS O.P., BREUKINK E. (2004) resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by Lipid II levels. *FEMS Microbiol. Lett.* **239** (1), 157-161.
- [93] BONEV B.B., CHAN W.C., BYCROFT B.W., ROBERTS G.C.K., WATTS A. (2000) Interaction of the Lantibiotic Nisin with Mixed Lipid Bilayers: A ^{31}P and ^2H NMR Study. *Biochemistry* **39** (37), 11425-11433.
- [94] THÉVENOT D.R., TOTH K., DURST R.A., WILSON G.S. (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16** (1-2), 121-131.
- [95] CHAUBEY A., MALHOTRA B.D. (2002) Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **17** (6-7), 441-456.
- [96] VO-DINH T., CULLUM B. (2000) Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366** (6-7), 540-551.
- [97] SCHMID R.D., BILITEWSKI U. (1992) Biosensoren. *Chemie in unserer Zeit* **4** (5), 163-174.
- [98] THUST M., SCHÖNING M.J., VETTER J., KORDOS P., LÜTH H. (1996) A long-term stable penicillin-sensitive potentiometric biosensor with enzyme immobilized by heterobifunctional cross-linking. *Anal. Chim. Acta* **323** (1-3), 115-121.
- [99] ALTERMAN M., SJÖBOM H., SÄFSTEN P., MARKGREN P.-O., DANIELSON U.H., HÄMÄLÄINEN M., LÖFÅS S., HULTÉN J., CLASSON B., SAMUELSSON B., HALLBERG A. (2001) P1/P1' modified HIV protease inhibitors as tools in two new sensitive surface plasmon resonance biosensor screening assays. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13** (2), 203-212.
- [100] GIULIANO K.A., TAYLOR D.L. (1998) Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends Biotechnol.* **16** (3), 135-140.
- [101] MINUNNI M., MASCINI M., GUILBAULT G.G., HOCK B. (1995) The quartz crystal microbalance as biosensor. A status report on its Future. *Anal. Lett.* **28** (5), 749-764.
- [102] O'SULLIVAN C.K., GUILBAULT G.G. (1999) Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **14** (8), 663-670.
- [103] MARX K.A. (2003) Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *Biomacromolecules* **4** (5), 1099-1120.
- [104] SAUERBREY G. (1959) Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift der Physik* **155** (2), 206-222.

- [105] VOINOVA M.V., JONSON M., KASEMO B. (2002) ‚Missing mass‘ effect in biosensor’s QCM applications. *Biosens. Bioelectron.* **17** (10), 835-841.
- [106] RODAHL M., HÖÖK F., FREDRIKSSON C., KELLER C.A., KROZER A., BRZEZINSKI P., VOINOVA M., KASEMO B. (1997) Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.* **107**, 229-246.
- [107] Internetseite der Abteilung Lebensmitteltechnologie/-biotechnologie des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (<http://www.uni-bonn.de/www/LMT/Studium/Studienunterlagen/bilder/Kinetik.pdf>).
- [108] SCHUNK A., GASTEIGER J. Chemie für Mediziner: Energetik und Kinetik“ (<http://www.chemgapedia.de>).
- [109] MAK C., KRIM J. (1997) Quartz crystal microbalance studies of disorder-induced lubrication. *Faraday Discuss.* **107**, 389-397.
- [110] JUREVICIUTE I., BRUCKENSTEIN S., HILLMANN A.R., JACKSON A. (2000) Kinetics of redox switching of electroactive polymers using the electrochemical quartz crystal microbalance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2** (18), 4193-4198.
- [111] KUROSAWA S., AIZAWA H., MIYAKE J., YOSHIMOTO M., HILBORN J., TALIB Z.A. (2002) Detection of deposition rate of plasma-polymerized silicon-containing films by quartz crystal microbalance. *Thin Solid Films* **407** (1-2), 1-6.
- [112] MODIN C., STRANNE A.-L., FOSS M., DUCH M., JUSTESEN J., CHEVALLIER J., ANDERSEN L.K., HEMMERSAM A.G., PEDERSEN F.S., BESENBACHER F. (2006) QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces. *Biomaterials* **27** (8), 1346-1354.
- [113] ANDERSSON M., ANDERSSON J., SELLBORN A., BERGLIN M., NILSSON B., ELWING H. (2005) Quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring (QCM-D) for real time measurements of blood coagulation density and immune complement activation on artificial surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **21** (1), 79-86.
- [114] SU X., WU Y.-J., KNOLL W. (2005) Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization. *Biosens. Bioelectron.* **21** (5), 719-726.
- [115] HENNE W.A., DOORNEWEERD D.D., LEE J., LOW P.S., SAVRAN C. (2006) Detection of Folate Binding Protein with Enhanced Sensitivity Using a Functionalized Quartz Crystal Microbalance Sensor. *Anal. Chem.* **78** (14), 4880-4884.
- [116] DENG T., LI J.-S., HUAN S.-Y., YANG H.-F., WANG H., SHEN G.-L., YU R.-Q. (2006) Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for biotin based on mixed self-assembled monolayers and metastable molecular complex receptor. *Biosens. Bioelectron.* **21** (8), 1545-1552.
- [117] MATSUNO H., FURUSAWA H., OKAHATA Y. (2004) Kinetic Study of Phosphorylation-Dependent Complex Formation between the Kinase-Inducible Domain (KID) of CREB and the KIX Domain of CBP on a Quartz Crystal Microbalance. *Chem. Eur. J.* **10** (23), 6172-6178.

- [118] NIHIRA T., MIZUNA M., TONOZUKA T., SAKANO Y., MORI T., OKAHATA Y. (2005) Kinetic Studies of Site-Directed Mutational Isomalto-dextranase-Catalyzed Hydrolytic Reactions on a 27 MHz Quartz-Crystal-Microbalance. *Biochemistry* **44** (27), 9456-9461.
- [119] MABBOTT G.A. (1983) An Introduction to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **60** (9), 697-701.
- [120] KISSINGER P.T., HEINEMANN W.R. (1983) Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **60** (9), 702-706.
- [121] EVANS D.H., O'CONNELL K.M., PETERSEN R.A., KELLY M.J. (1983) Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **60** (4), 290-293.
- [122] CARLSSON S., KONTURRI A.K., KONTTURI K. (2006) Improving membrane activity of oligonucleotides by cetylpyridinium chloride: An electrochemical study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29** (5), 451-459.
- [123] LIU H.H., ZOU G.L. (2006) Electrochemical investigation of immobilized haemoglobin: redox chemistry and enzymatic catalysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* **68** (2), 87-99.
- [124] APILUX A., TABATA M., CHAILAPAKUL O. (2007) Electrochemical behaviours of native and thermally denatured fish DNA in the presence of cytosine derivatives and porphyrin by cyclic voltammetry using boron-doped diamond electrode. *Bioelectrochemistry* **70** (2), 435-439.
- [125] HONEYCHURCH K.C., O'DONOVAN M.R., HART J.P. (2007) Voltammetric behaviour of DNA bases at a screen-printed carbon electrode and its application to a simple and rapid voltammetric method for the determination of oxidative damage in double stranded DNA. *Biosens. Bioelectron.* **22** (9-10), 2057-2064.
- [126] WANG L., LIN L., YE B. (2006) Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (5), 625-629.
- [127] GHONEIM M.M., ABUSHOFFA A.M., MOHARRAM Y.I., EL-DESOKY H.S. (2007) Voltammetry and quantification of the contraceptive drug norethisterone in bulk form and pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2), 499-505.
- [128] CHRIST K., RÜTTINGER H.-H., HÖPFNER M., ROTHE U., BENDAS G. (2005) The Detection of UV-Induced Membrane Damages by a Combination of Two Biosensor Techniques. *Photochem. Photobiol.* **81** (6), 1417-1423.
- [129] CHRIST K. (2003) Die Kombination von Quarzmikrowaage und Cyclischer Voltammetrie zur Untersuchung UV-induzierter Schädigungen an Modellmembranen. *Diplomarbeit des Fachbereichs Pharmazie/Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- [130] CHRIST K., WIEDEMANN I., BAKOWSKY U., SAHL H.-G., BENDAS G. (2007) The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1768** (3), 694-704.

- [131] DOTTAVIO-MARTIN D., RAVEL J.M. (1978) Radiolabelling of Proteins by Reductive Alkylation with [¹⁴C] Formaldehyde and Sodium Cyanoborohydrid. *Anal. Biochem.* **87** (2), 562-565.
- [132] CHATTERJEE S., CHATTERJEE S., LAD S.J., PHANSALKAR M.S., RUPP R.H., GANGULI B.N. (1992) Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*; fermentation, isolation, purification and chemical characterisation. *J. Antibiot.* **45** (6), 832-838.
- [133] SCHNEIDER T., SENN M.M., BERGER-BÄCHI B., TOSSI A., SAHL H.-G., WIEDEMANN I. (2004) In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly₅) of *Staphylococcus aureus*. *Molecul. Microbiol.* **53** (2), 675-685.
- [134] HOUK K.N., LEACH A.G., KIM S.P., ZHANG X. (2003) Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42** (40), 4872-4897.
- [135] GREEN N.M. (1975) Avidin. *Adv. Protein Chem.* **29**, 85-133.
- [136] HASPER H.E., KRAMER N.E., SMITH J.L., HILLMAN J.D., ZACHARIAH C., KUIPERS O.P., DE KRUIJFF B., BREUKINK E. (2006) An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science* **313** (5793), 1636-1637.
- [137] HALLOCK K.J., LEE D.K., OMNAAS J., MOSBERG H.I., RAMAMOORTHY A. (2002) Membrane composition determines Pardaxin's mechanism of lipid bilayers disruption. *Biophys. J.* **83** (2), 12171-12178.
- [138] PINISETTY D., MOLDOVAN D., DEVIRESSY R. (2006) The effect of methanol on lipid bilayers: an atomistic investigation. *Ann. Biomed. Eng.* **34** (9), 1442-1451.
- [139] PATRA M., SALONEN E., TERAMA E., VATTULAINEN I., FALLER R., LEE B.W., HOLOPAINEN J., KARTTUNEN M. (2006) Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophys. J.* **90** (4), 1121-1135.
- [140] CHIOU J.S., KRISHNA P.R., KAMAYA H., UEDA I. (1992) Alcohols dehydrate lipid membranes: an infrared study on hydrogen bonding. *Biochim. Biophys. Acta* **1110** (2), 225-233.
- [141] KUČERKA N., UHRÍKOVÁ D., TEIXEIRA J., BALGAVÝ P. (2004) Bilayer thickness in unilamellar phosphatidylcholine vesicles: small-angle neutron scattering using contrast variation. *Physica B* **350** (1-3), E639-E642.
- [142] TAHARA Y., FUJIYOSHI Y. (1994) A New Method to Measure Bilayer Thickness: Cryo-electron Microscopy of Frozen Hydrated Liposomes and Image Simulation. *Micron.* **25** (2), 141-149.
- [143] LEWIS B.A., ENGELMANN D.M. (1983) Lipid Bilayer Thickness Varies Linearly with Acyl Chain Length in Fluid Phosphatidylcholine Vesicles. *J. Mol. Biol.* **166** (2), 211-217.
- [144] DEMEL R.A., DE KRUYFF B. (1976) The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **457** (2), 109-132.
- [145] DEMEL R.A., GEURTS VAN KESSEL W.S.M., VAN DEENEN L.L.M. (1972) The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interaction of these lecithins with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* **266** (1), 26-40.

- [146] JOHNSON S.M. (1973) The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **307** (1), 27-41.
- [147] ZHAO H., SOOD R., JUTILA A., BOSE S., FIMLAND G., NISSEN-MEYER J., KINNUNEN P.K.J. (2006) Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1758** (9), 1461-1474.
- [148] PRENNER E.J., LEWIS R.N.A.H., JELOKHANI-NIARAKI M., HODGES R.S., MCELHANEY R.N. (2001) Cholesterol attenuates the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with phospholipid bilayers membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1510** (1-2), 83-92.
- [149] RAGHURAMAN H., CHATTOPADHYAY A. (2004) Interaction of Melittin with Membrane Cholesterol: A Fluorescence Approach. *Biophys. J.* **87** (4), 2419-2432.
- [150] MONTGOMERIE J.Z., KALMANSON G.M., GUZE L.B. (1973) Fatty Acid Composition of L-Forms of *Streptococcus faecalis* Cultured at Different Osmolalities. *J. Bacteriol.* **115** (1), 73-75.
- [151] GIRARD A.E., COSENZA B.J. (1971) Fine structure and fatty acid composition of a motile streptococcus. *Antonie van Leeuwenhoek* **37** (1), 65-74.
- [152] MACLEOD P., BROWN J.P. (1963) Fatty acid composition of lipids from *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. *J. Bacteriol.* **85**, 1056-1060.
- [153] JOHANSSON T., NIKKILÄ P., TOIVONEN L., ROSENQVIST H., LAAKSO S. (1995) Cellular Fatty Acids Profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* Strains in Relation to the Oleic Acid Content of the Cultivation Medium. *Appl. Environment. Microbiol.* **61** (12), 4497-4499.
- [154] IN'T VELD G., DRIESSEN A.J.M., OP DEN KAMP J.A.F., KONINGS W.N. (1991) Hydrophobic membrane thickness and lipid-protein interactions of the leucine transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1065** (2), 203-212.
- [155] THEODORE T.S., PANOS C. (1973) Protein and Fatty Acid Composition of Mesosomal Vesicles and Plasma Membranes of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **116** (2), 571-576.
- [156] TSUCHIYA H., SATO M., KATO M., NAMIKAWA I., HAYASHI T., TATSUMI M., TAKAGI N. (1986) High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Bacterial Fatty Acid Composition for Chemotaxonomic Characterization of Oral Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **24** (1), 81-85.
- [157] LAMBERT, L.H., COX, T., MITCHELL, K., ROSELLÓ-MORA R.A., DEL CUETO C., DODGE D.E., ORKAND P., CANO R.J. (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48** (2), 511-518.
- [158] MACDONALD P.M., MCDONOUGH B., SYKES B.D., MCELHANEY R.N. (1983) Fluorine-19 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Lipid Fatty Acyl Chain Order and Dynamics in *Acholeplasma laidlawii* B Membranes. Effects of Methyl-Branch Substitution and of Trans Unsaturation upon Membrane Acyl-Chain Orientational Order. *Biochemistry* **22** (22), 5103-5111.

- [159] MACDONALD P.M., SYKES B.D., MCELHANEY R.N. (1985) Fluorine-19 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Lipid Fatty Acyl Chain Order and Dynamics in *Acholeplasma laidlawii* B Membranes. Gel-State Disorder in the Presence of Methyl Iso- and Anteiso-Branched-Chain Substituents. *Biochemistry* **24** (10), 2412-2419.
- [160] RATTAY B., BREZESINSKI G., DOBNER B., FÖRSTER G., NUHN P. (1995) Influence of α -branched fatty acid chains on the thermotropic behaviour of racemic 1-*O*-hexadecyl-2-acyl-glycero-3-phosphocholines. *Chem. Phys. Lipids* **75** (1), 81-91.

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1: Die bakterielle Zellwandsynthese und mögliche Angriffspunkte (ohne Lipid II).
- Abb. 2: Die Strukturen der Bestandteile der bakteriellen Zellwand.
- Abb. 3: Die Struktur des Lipid II.
- Abb. 4: Die posttranslationalen Modifikationen des Präpeptids.
- Abb. 5: Weitere in Lantibiotika vorkommende modifizierte Aminosäuren neben Lan und MeLan.
- Abb. 6: Die Strukturen des Nisin A und seiner drei natürlichen Varianten.
- Abb. 7: Die verschiedenen Mechanismen unspezifischer Membraninteraktionen von Lantibiotika und anderen antimikrobiellen Peptiden.
- Abb. 8: Die Strukturen des Gallidermins und seiner natürlichen Variante Epidermin.
- Abb. 9: Die Strukturen von Pep5 und Subtilin.
- Abb. 10: Die Struktur des Mersacidins.
- Abb. 11: Die Struktur des Actagardine.
- Abb. 12: Die Struktur des Cinnamycins.
- Abb. 13: Die Struktur des Lacticin 3147.
- Abb. 14: Der Aufbau eines Biosensors mit seinen Hauptkomponenten Biorezeptor und Wandler am Beispiel des Glukosesensors.
- Abb. 15: Herstellung und Funktionsweise von Quarzkristallen.
- Abb. 16: Der beispielhafte Verlauf von Frequenz und Dämpfung eines Quarzkristalls.
- Abb. 17: Die Bestimmung kinetischer Parameter aus dem Frequenzverlauf.
- Abb. 18: Der zeitliche Verlauf der bei der Zyklischen Voltammetrie auftretenden Spannung.
- Abb. 19: Ein typisches Zyklovoltammogramm eines reversiblen Redoxsystems.
- Abb. 20: Die Darstellung der verwendeten Quarzkristalle.
- Abb. 21: Die Darstellung der Langmuir-Blodgett-Filmwaage.
- Abb. 22: Der Druckverlauf der Kompression von Phospholipiden auf einer Langmuir-Blodgett-Filmwaage.
- Abb. 23: Die Komplettierung der Modellmembran.
- Abb. 24: Die Strukturen der mit der Langmuir-Blodgett-Technik übertragenen und in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide.
- Abb. 25: Die Darstellung der für die QCM-Messungen verwendeten Messzelle.
- Abb. 26: Das QCM-Messsystem LiquiLab 21.

- Abb. 27: Die schematische Darstellung der für die CV-Messungen verwendeten Messzelle.
- Abb. 28: Die Struktur der oxidierten B-Kette des Insulins.
- Abb. 29: Die absoluten Frequenzänderungen der mit verschiedenen Modellmembranen beschichteten Quarzkristalle nach Zugabe von Nisin, NisinM oder Insulin.
- Abb. 30: AFM-Aufnahmen verschiedener Modellmembranen vor und nach Zugabe von Nisin.
- Abb. 31: Die Diffusion fluoreszenzmarkierter Phospholipide in gebleichte Bereiche von DOPC- und DOPG-Membranen ohne und mit Lipid II.
- Abb. 32: Die Auswertung zyklischer Voltammogramme.
- Abb. 33: CV-Ergebnisse von Nisin, NisinM und Insulin an DOPC- und DOPG-Membranen ohne und mit Lipid II.
- Abb. 34: An DOPG/Lipid II-Membranen führt die Zugabe von Nisin und Insulin nach einer anfänglichen Zunahme der Stromstärke zu einer Abnahme der Permeabilität.
- Abb. 35: Absolute Frequenzänderungen an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II nach Zugabe unterschiedlicher Mengen Mersacidin.
- Abb. 36: Absolute Frequenzänderungen an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II nach Zugabe unterschiedlicher Mengen Mersacidin.
- Abb. 37: Die Änderung der Membranpermeabilität nach Zugabe von Mersacidin in unterschiedlichen Lösungsmitteln.
- Abb. 38: Absolute Frequenzänderungen der mit DOPC-Membranen beschichteten Quarzkristalle nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin.
- Abb. 39: Die CV-Ergebnisse von Gallidermin im Vergleich zu Nisin an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II.
- Abb. 40: Permeabilitätsänderungen an DPoPC/PL3-Membranen nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin.
- Abb. 41: Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von Phospholipiden mit kürzerkettig verzweigten Fettsäuren.
- Abb. 42: Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von Phospholipiden mit längerkettig verzweigten Fettsäuren.
- Abb. 43: Die durch die Zugabe von Gallidermin und Nisin verursachten Änderungen in der Permeabilität von DPoPC/PL5-Membranen.
- Abb. 44: Der Anstieg der Stromstärke nach Zugabe von Lacticin 3147 zu DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II.

- Tab. 1: Die Einteilung der Lantibiotika nach Jung in Typ A- und Typ B-Lantibiotika.
- Tab. 2: Die Einteilung der Lantibiotika entsprechend ihrer funktionellen Charakteristika und Primärsequenzen.
- Tab. 3: Der Einsatz von Nisin als Konservierungsmittel in verschiedenen Lebensmitteln.
- Tab. 4: Eine Übersicht über die verwendeten Lantibiotika und Lipid II, ihre Produzentenstämme und die entsprechenden Referenzen mit Details zur Isolierung.
- Tab. 5: Die kinetischen Bindungsparameter von Nisin, NisinM und Insulin (B-Kette, oxidiert) an Modellmembranen aus DOPC bzw. DOPG ohne und mit 0,1 mol% Lipid II.
- Tab. 6: Die Anstiege der Dämpfung-Frequenz-Graphen nach Anlagerung von Nisin, NisinM und Insulin (B-Kette, oxidiert) an Modellmembranen aus DOPC bzw. DOPG ohne und mit 0,1 mol% Lipid II.
- Tab. 7: Weitere Untersuchungen zur membranstabilisierenden Wirkung von Lipid II.
- Tab. 8: Die kinetischen Bindungskonstanten von Mersacidin an DOPC-Membranen.
- Tab. 9: Die Dämpfungsanalyse nach Zugabe von Mersacidin in unterschiedlichen Lösungsmitteln.
- Tab. 10: Die Bindungskonstanten von Gallidermin an DOPC-Membranen ohne und mit Lipid II.
- Tab. 11: Die Dämpfung des Quarzkristalls nach Zugabe von Gallidermin zu DOPC-Membranen mit und ohne Lipid II.
- Tab. 12: Die kinetischen Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an verkürzten DPoPC-Membranen.
- Tab. 13: Die Dämpfungsanalyse nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin zu verkürzten DPoPC-Membranen.
- Tab. 14: Die Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an DPoPC/PL3-Membranen.
- Tab. 15: Die Dämpfung von DPoPC/PL3-Membranen nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin.
- Tab. 16: Die kinetischen Bindungskonstanten von Gallidermin und Nisin an DPoPC/PL5-Membranen.
- Tab. 17: Das Dämpfungsverhalten von DPoPC/PL5-Membranen nach Zugabe von Gallidermin oder Nisin.
- Tab. 18: Die Bestimmung der Bindungskonstanten von Lacticin 3147.
- Tab. 19: Die Dämpfungsanalyse an DOPC-Membranen nach Zugabe von Lacticin 3147.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn,

Publikationsliste

HÖPFNER M., CHRIST K., BENDAS G. (2005) Schwingquarze – Von der Quarzuhr zum Biosensor. *Pharmazeutische Zeitung* **14**, 17-23.

CHRIST K., RÜTTINGER H.-H., HÖPFNER M., ROTHE U., BENDAS G. (2005) The Detection of UV-Induced Membrane Damages by a Combination of Two Biosensor Techniques. *Photochem. Photobiol.* **81 (6)**, 1417-1423.

CHRIST K., WIEDEMANN I., BAKOWSKY U., SAHL H.-G., BENDAS G. (2007) The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1768 (3)**, 694-704.

SIMONIS D., CHRIST K., ALBAN S., BENDAS G. (2007) Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin. *Sem. Thromb. Haemost.* (Artikel angenommen)