

BMBF-Verbund

“Septischer Schock: Molekulare Pathophysiologie und therapeutische Ansätze”

Förderkennzeichen 01 KI 9851, Teilprojekt A6

**“Mechanismen der antibakteriellen Wirkung
polykationischer Proteine aus Granulozyten”**

Projektleiter: Ulrich Seydel und Ernst Th. Rietschel

Autoren: Dr.rer.nat. Thomas Gutschmann
Prof.Dr.rer.nat. Ernst Th. Rietschel
Prof.Dr.rer.nat. Ulrich Seydel
Dr.rer.nat. Andre Wiese

Forschungszentrum Borstel, Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Parkallee 1-40, 23845 Borstel

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	AUFGABENSTELLUNG	5
1.2	HINTERGRUND UND STAND DER FORSCHUNG ZU BEGINN DES PROJEKTS	6
2	EIGENER KENNTNISSTAND UND OFFENE FRAGEN ZU BEGINN DES PROJEKTS	9
2.1	DIE ÄUSSERE MEMBRAN GRAM-NEGATIVER BAKTERIEN	9
2.2	PLANARE MEMBRANEN ALS BIOPHYSIKALISCHES MODELLSYSTEM	13
2.3	DIE ELEKTRISCHEN/ELEKTROSTATISCHEN EIGENSCHAFTEN EINER MEMBRAN 15	
3	EINZELHEITEN ZU DEN EINGESETZTEN MESSVERFAHREN	18
3.1	PLANARE MEMBRANEN	18
3.1.1	Symmetrische und asymmetrische Membranen nach der Montal- Mueller Methode	18
3.1.1.1	<i>Mechanischer Aufbau</i>	18
3.1.1.2	<i>Elektrischer Aufbau</i>	19
3.1.1.3	<i>Membranpräparation</i>	20
3.1.2	Messung der Membrankapazität	22
3.1.3	Strom/Spannungs (I/U)-Kurven	23
3.2	WEITERE BIOPHYSIKALISCHE MESSVERFAHREN	24
3.2.1	Monolayermessungen am Langmuir-Trog	24
3.2.2	ζ -Potential Messungen	25
3.2.3	Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR)-Spektroskopie	25
3.2.4	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Spektroskopie	26
3.2.5	Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie	28
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
4.1	CATIONIC ANTIBACTERIAL PEPTIDE 18 kDA (CAP18)	30
4.1.1	Ergebnisse	32
4.1.1.1	<i>Untersuchungen am Langmuir-Trog</i>	32
4.1.1.2	<i>Untersuchungen mit der FRET-Spektroskopie</i>	35

	4.1.1.3 <i>Elektrische Messungen an planaren Membranen</i>	36
	4.1.1.4 <i>Untersuchungen mit der FTIR-Spektroskopie</i>	41
	4.1.2 Diskussion	44
4.2	LIPOPOLYSACCHARID BINDENDEN PROTEIN (LBP)	54
	4.2.1 Ergebnisse	55
	4.2.1.1 <i>LBP-vermittelte Aktivierung von MNC</i>	55
	4.2.1.2 <i>Wechselwirkung zwischen LBP und Phospholipidmatrizes</i> ..	56
	4.2.1.3 <i>LBP-vermittelter Einbau von LPS</i>	57
	4.2.1.4 <i>LPS-Neutralisation durch LBP</i>	58
	4.2.2 Diskussion	59
4.3	ANTIKÖRPER GEGEN DAS BACTERICIDAL/PERMEABILITY-INCREASING PROTEIN	62
	4.3.1 Ergebnisse	63
	4.3.1.1 <i>Untersuchungen mit der FRET-Spektroskopie</i>	63
	4.3.1.2 <i>Bestimmung der inneren Membranpotentialdifferenz</i>	64
	4.3.2 Diskussion	64
4.4	AMÖBAPORE, NK-LYSIN	65
	4.4.1 Ergebnisse	66
	4.4.1.1 <i>Untersuchungen mit der FRET- Spektroskopie</i>	66
	4.4.1.2 <i>Untersuchungen am Langmuir-Trog</i>	67
	4.4.1.3 <i>Elektrische Messungen an planaren Membranen</i>	68
	4.4.2 Diskussion	69
5	DANKSAGUNG	73
6	LITERATURVERZEICHNIS	75

1 EINLEITUNG

1.1 AUFGABENSTELLUNG

Ziel des Projektes war es, die molekularen Mechanismen der Wechselwirkung polykationischer Peptide aus polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) mit Gram-negativen Bakterien am Beispiel von 'Bactericidal/Permeability-Increasing Protein' (BPI) und 'Cationic Antibacterial Peptide 18 kDa' (CAP18) sowie davon abgeleiteter und synthetischer Peptide zu untersuchen. Hierzu sollten an planaren Membransystemen einschließlich eines Rekonstitutionsmodells der Lipidmatrix der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien - eine Seite der Doppelschicht besteht ausschließlich aus Lipopolysaccharid (LPS), die andere Seite aus einem Phospholipidgemisch (PL) - die durch die Peptide hervorgerufenen Veränderungen der Membranstruktur bzw. -eigenschaften über die Messung elektrischer Parameter erfaßt werden. Die Messungen an den planaren Rekonstitutionsmodellen sollten durch Untersuchungen an anderen Membranmodellen verschiedener Lipide ergänzt werden. Durch die Beschreibung der grundlegenden Prozesse der antibakteriellen Wirkung dieser Peptide sollte ein Beitrag für ihre mögliche therapeutische Anwendbarkeit geleistet werden. Darüber hinaus sollten diese Untersuchungen aber auch generelle Aussagen über grundsätzliche Mechanismen der Peptid-LPS Wechselwirkungen liefern.

Um die antibakterielle Wirkung dieser polykationischen PMN-Peptide für therapeutische Zwecke nutzen zu können, ist ein Verständnis der bei der Wechselwirkung mit der bakteriellen äußeren und inneren Membran beteiligten Mechanismen auf molekularer Ebene eine Grundvoraussetzung. Diese Wechselwirkung kann grundsätzlich die Fluidität der Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide, d.h. den Ordnungszustand der Membran beeinflussen oder aber zur Induktion von Diffusionsporen (statisch oder transient) führen. Zur Beschreibung dieser Prozesse sollten an speziellen Modellmembransystemen die Wechselwirkungsmechanismen dieser Peptide untersucht werden, um Aufschluß über die molekulare Grundlagen der Wechselwirkung zu gewinnen.

Des weiteren sollte die unterschiedliche Funktion von BPI und dem LPS-bindenden Protein (LBP) als Hemmer bzw. Verstärker der von LPS in Makrophagen/Monozyten induzierten Ausschüttung proinflammatorischer Enzyme untersucht werden. Hierzu wurden einerseits Unterschiede der Interaktion von BPI und LBP (alleine und in Verbin-