



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus dem Institut für Physik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. C. Hübner**

**„VERKAPSELUNG UND pH-WERT INDUZIERTER FREISETZUNG VON
LIPOPOLYSACCHARID BINDENDEN PEPTIDEN IN
POLYSACCHARID-TRÄGERN“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Nicole Kuhlmann
aus Bassum

Lübeck, 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Hübner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Gutsmann

Weiterer Berichterstatter: Prof. Dr. U. Englisch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16. Juli 2018

Abstract

The work presented focuses on the encapsulation of Peptide 19-2.5 in polysaccharides. Peptide 19-2.5 is a lipopolysaccharide (LPS) binding peptide, which is able to treat intestinal infections. The transport of peptide without hydrolysis is difficult, because peptides are sensitive to chemical changes through changes in pH-values or salt concentrations. In the case of oral application, a drug vesicle passes different pH-values, changing salt concentrations and enzymes. The aim is to save Peptide 19-2.5 through polysaccharide-carrier-systems against these environmental influences. Because polysaccharides are able to form pH-sensitive hydrogels. These hydrogels have pores, which are able to change their pore size in dependence of pH-values.

Against this background three different polysaccharides are tested as drug vesicles. The polysaccharides tested are alginate, pectin and chitosan. Nearly linear polyanion alginate date back to bow alga *Ascophyllum nodosum*, partly negatively charged and branched sugar beet pectin was extracted from *Beta vulgaris L. var. altissima* Döll and the nearly linear polycation chitosan (Chitophram S from Dr. Wächter, Cognis/Henkel AG). Alginate and pectin came from in-house production.

The work started with the polysaccharide characterisation by means of gel-permeations-chromatography (GPC) with triple detection. The polysaccharide-peptide-complex can be produced using two different methods. One way is sonication and the other way is an oil-water-emulsion-technology (O/W-emulsion). The samples were tested with fluorescence detection of supernatant, isothermal titration calorimetry (ITC) and fluorescence correlation spectroscopies (FCS), for complexation of respective polysaccharide with Peptide 19-2.5. The binding capacity for alginate and peptide found during the experiments lies between 1:224 and 1:256 ([alginate]:[Peptide19-2.5]). The binding capacity of pectin and peptide ([pectin]:[Peptide 19-2.5]) lies between 1:95 and 1:112 (1:45 when fluorescence-labelled-peptide was used). The positively charged chitosan is not able to bind the peptide. Chitosan was used as a negative control in experiments.

Particle size analysis was done by photon cross correlation spectroscopy (PCCS), dynamic light scattering (DLS), FCS, scanning FCS, confocal microscopy and atomic force microscopy (AFM). Size analysis show the influence of particle production method, use of molar polysaccharide peptide ratio and use of fluorescence labelled peptide. The grown complexes are for the most part nanoparticles.

Binding characterization was done using different optical methods and ITC. The peptide interact across ionic interactions and hydrophobic effects with the polysaccharides alginate and pectin. Additionally to covalent binding the peptide interact with the fluorescence dye across hydrophobic effects.

ITC experiment results for the pectin-peptide-binding show a smaller binding constant, than for alginate-peptide-binding. In comparison to LPS-peptide-complexes [1] both show a smaller binding constant.

The release study carried out shows that both alginate and pectin are able to protect the Peptide 19-2.5 against acidic and basic pH-values, varying salt concentrations and a non-ionic surfactant. The peptide can be protected against a protease in simulated stomach. But none of the tested polysaccharides is able to protect the peptide in simulated pancreas or intestine against an α -Amylase mixture with undefined side activities.

The effectiveness of polysaccharide-peptide-complexes produced in vitro, the alginate-peptide-particles produced by O/W-emulsion technology and the pectin-peptide-particles produced by sonication show an effectiveness. It is striking that effective particles are nanoparticles.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Verkapselung von Peptid 19-2.5 mit Polysacchariden. Bei Peptid 19-2.5 handelt es sich um ein Lipopolysaccharid (LPS) bindendes Peptid, welches in der Lage ist, Darminfektionen zu behandeln. Problematisch bei einer solchen Behandlung ist allerdings der unbeschadete Transport des Peptids an seinen Wirkort. Nach oraler Applikation trifft das Peptid auf verschiedene pH-Werte, variierende Salzkonzentrationen und Enzyme. Der Schutz des Peptids vor diesen verschiedenen Umwelteinflüssen ist durch ein Polysaccharid-Trägersystem geplant. Polysaccharide besitzen die Eigenschaft Hydrogele zu bilden, welche durch pH-Einflüsse ihre Porengröße verändern können. Vor diesem Hintergrund wurden drei verschiedene Polysaccharide als Träger getestet. Verwendet wurden das annähernd lineare Polyanion Alginat aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum*, das verzweigte zum Teil negativ geladene Zuckerrüben-Pektin, gewonnen aus *Beta vulgaris L. var. altissima* Döll, und das Polykation Chitosan (Chitophram S von Dr. Wächter, Cognis / Henkel AG). Alginat und Pektin stammen aus hauseigener Herstellung.

Zu Beginn erfolgte die Charakterisierung der Polysaccharide mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) und anschließender Dreifachdetektion. Die verwendeten Peptid-Polysaccharid-Komplexe werden mittels zwei verschiedener Methoden hergestellt. Zum einen durch Sonifizieren und zum anderen durch eine Öl-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion). Die Proben wurden mittels Fluoreszenzdetektion des Partikelüberstands, isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) auf das Entstehen eines Polysaccharid-Peptid-Komplexes untersucht. Je nach Messmethode sind molare Bindungsverhältnisse zwischen Alginat und Peptid von 1:225 und 1:256 ([Alginat]:[Peptid19-2.5]), sowie für Pektin und Peptid ([Pektin]:[Peptid 19-2.5]) zwischen 1:95 und 1:112 (1:45 unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Peptid) messbar. Zwischen Chitosan und Peptid kann keine Bindung ausgebildet werden und das Chitosan fungiert damit als Negativkontrolle.

Die Partikelgröße der entstandenen Komplexe wurde mittels Photonen-Kreuz-Korrelations-Spektroskopie (PCCS), Dynamischer Lichtstreuung (DLS), FCS, scanning FCS, konfokaler Mikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (AFM) analysiert. Die Partikelgröße wird von der Herstellungsmethode, des eingesetzten molaren Verhältnisses und der Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Peptid beeinflusst. Bei den entstandenen Partikeln handelt es sich größtenteils um Nanopartikel.

Die Charakterisierung der Wechselwirkungen erfolgte durch verschiedene optische Methoden und der ITC. Das Peptid wechselwirkt über ionische Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten mit den Polysacchariden Alginat und Pektin. Zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und dem Peptid kommt es neben der kovalenten Bindung zusätzlich zu hydrophoben Effekten.

Aus den ITC-Experimenten geht hervor, dass die Bindungskonstante der Alginate-Peptid-Komplexe größer ist als die Bindungskonstante der Pektin-Peptid-Komplexe. Im Vergleich mit der Bindungskonstante der LPS-Peptid-Komplexe [1] weisen die Polysaccharid-Peptid-Komplexe jedoch geringere Bindungskonstanten auf.

Die durchgeführte Freisetzungsstudie zeigt, dass sowohl Pektin als auch Alginate in der Lage sind, das Peptid vor sauren als auch basischen pH-Werten, variierenden Salzkonzentrationen und einem nichtionischen Tensid zu schützen. Im simulierten Magen kann das Peptid vor einer Protease geschützt werden. Allerdings ist keines der beiden untersuchten Polysaccharide in der Lage, das Peptid in der simulierten Bauchspeicheldrüse oder im simulierten Darm unter Einfluss einer α -Amylase-Mischung mit undefinierten Nebenaktivitäten zu schützen.

Die Wirksamkeit der Polysaccharid-Peptid-Komplexe ist *in vitro* bei den durch die O/W-Emulsion hergestellten Alginate-Peptid-Partikel und die durch Sonifizieren hergestellten Pektin-Peptid-Partikel gegeben. Auffällig ist, dass es sich bei den wirksamen Partikeln um Nanopartikel handelt.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	III
Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
2 Problemstellung	21
3 Experimenteller Teil	22
3.1 Theoretischer Hintergrund der Methoden	22
3.1.1 Gelpermeationschromatographie mit Dreifachdetektion	22
3.1.2 Isotherme Titrationskalorimetrie	22
3.1.3 Lichtstreuung	24
3.1.4 Fluoreszenz	26
3.1.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	30
3.1.6 Photonen Zähl Histogramm	34
3.1.7 Circular dichroismus-Spektroskopie	35
3.1.8 Rasterkraftmikroskopie	36
3.1.9 LPS-induzierte Stimulierung mononukleärer Zellen	36
3.2 Materialien	37
3.2.1 Chemikalien	37
3.2.2 Geräte	39
3.2.3 Materialien	40
3.2.4 Puffersysteme	41
3.2.5 Polysaccharide	44
3.3 Methoden	45
3.3.1 Peptid-Fluoreszenzmarkierung	45
3.3.2 Gelpermeationschromatographie	46
3.3.3 Untersuchung von Peptid 19-2.5 auf Veränderung der Primärstruktur in Lösung	47
3.3.4 Verkapselung des Peptids mit Polysacchariden	47
3.3.5 Circular Dichroismus Spektroskopie	49
3.3.6 Chromatographische Trennung von Peptiden, Peptidfragmenten und Polysacchariden mittels C ₁₈ -Säule	49
3.3.7 Bindungsexperimente mittels chromatographischer Trennung über die C ₁₈ -Säule	51
3.3.8 Partikelgrößenbestimmung	52
3.3.9 Fluoreszenz-Messung	53

3.3.10	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	54
3.3.11	Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie-Messungen	56
3.3.12	Isotherme Titrationskalorimetrie	56
3.3.13	Freisetzung des Peptids aus den Polysaccharid-Peptid-Komplexen . .	57
3.3.14	Tumornekrosefaktor- α -Enzymimmunoassay	58
4	Ergebnisse & Diskussion	61
4.1	Die Charakterisierung der Ausgangsstoffe	61
4.1.1	Polysaccharid-Charakterisierung	61
4.1.2	Veränderung der Primärstruktur von Peptid 19-2.5 in Lösung	62
4.1.3	Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptid 19-2.5	63
4.1.4	Diskussion: Charakterisierung des Peptids, der Polysaccharide und der Komplexe	63
4.2	Die Bindungsstöchiometrie der Peptid-Polysaccharid-Komplexe	66
4.2.1	Bestimmung der Bindungsstöchiometrie der Polysaccharide für Peptid 19-2.5, ermittelt aus der Konzentration des freien Peptids	66
4.2.2	Isotherme Titrationskalorimetrie	68
4.2.3	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	68
4.2.4	Ermittlung der Anzahl der Polysaccharide pro Partikel	76
4.2.5	Diskussion der ermittelten Bindungsstöchiometrien	78
4.3	Die Partikelgröße	82
4.3.1	Photonen-Kreuzkorrelations Spektroskopie	82
4.3.2	Streulichtmessung	83
4.3.3	Rasterkraftmikroskopie	85
4.3.4	Scanning Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	91
4.3.5	Konfokale Mikroskopie	92
4.3.6	Diskussion der Partikelgrößenbestimmung	95
4.4	Die Polysaccharid-Peptid-Wechselwirkungen	100
4.4.1	Fluoreszenzspektren der Polysaccharid-Peptid-Komplexe	100
4.4.2	Charakterisierung der Wechselwirkungen mittels isothermer Titrati- onskalorimetrie	101
4.4.3	Ermittlung der Triplett-Zeit der Polysaccharid-Peptid-Komplexe . . .	103
4.4.4	Photonen-Zähl-Histogramme der Komplexe	107
4.4.5	Fluoreszenzlebensdauer-Messung	111
4.4.6	Anisotropie-Messung	113
4.4.7	Diskussion der Polysaccharid-Peptid-Wechselwirkungen	115
4.5	Die Freisetzungs-Experimente	120
4.5.1	Freisetzung des Peptids aus den Komplexen bei verschiedenen pH- Werten	120
4.5.2	Freisetzung des Peptids aus den Komplexen unter Verwendung eines nichtionischen Tensids	120
4.5.3	Enzymatische Freisetzung des Peptids aus den Komplexen	121

4.5.4	Diskussion der Freisetzungs-Experimente	121
4.6	LPS-induzierte Zellstimulations Experimente	124
4.6.1	TNF- α -ELISA der Polysaccharid-Peptid-Komplexe	124
4.6.2	Diskussion der LPS-induzierte Zellstimulations Experimente	126
5	Schlussfolgerung	128
6	Ausblick	132
7	Literaturverzeichnis	135
8	Abbildungsverzeichnis	153
9	Tabellenverzeichnis	156
10	Anhang	158
10.1	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Probenvorbereitung	158
10.2	Auswertung der Circular Dichroismus Spektroskopie	160
	Danksagung	163

Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
α -H.	α -Helix
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
AKF	Autokorrelationsfunktion
Alexa	Alexa-Fluor 488 C ₅ Maleimide (Fluoreszenzfarbstoff)
AMP	Antimikrobielle Peptide
AP	Alginat-Peptid-Komplex
APD	Avalanche Photodiode
AS	Aminosäure
β -S.	β -Faltblatt (engl. <i>β-Sheet</i>)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C ₁₈	Kieselgel mit kovalent gebundenen Octadecyl-Ketten (C ₁₈ -Ketten)
C ₁₈ -Säule	Vertex Plus Säule 250 x 4 mm Eurosil Bioselect 300-5 C18A
CD	Zirkular Dichroismus (engl. <i>circular dichroism</i>)
CPL	Zirkular polarisiertes Licht
D	Diffusionskoeffizient
dem.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fluoreszenzkorrelations Spektroskopie (engl. <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FDA	US Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
ISC	Interkombination (engl. <i>intersystem crossing</i>)
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>)
Kdo	2-Keto-3-Deoxyoctonat
LBP	LPS-binding Protein
Lifetime	Fluoreszenz Lebensdauer
LP	Lipopeptide
L-CPL	Links zirkular polarisiertes Licht (engl. <i>left circular polarized light</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
MNC	Mononukleäre Zellen
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
M_w	Molare Masse
N	Anzahl der Teilchen im Fokusvolumen
OCT	Octenidin-Dihydrochlorid
PBS	Phosphat-Puffer (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCCS	Photonenkreuzkorrelationsspektroskopie (engl. <i>photon cross-correlation spectroscopy</i>)

PEG	Polyethylenglykol
PEM	Photo-elastischer Modulator
PGA	Polygalacturonsäure
PHMB	Polyhexanid
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Poly(lactic-co-glycolid)
PP	Pektin-Peptid-Komplex
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PVP-Iod	Polyvinyl-Pyrrolidon-Iod
r. coil	random coil
R-CPL	Rechts zirkular polarisiertes Licht (engl. <i>right circular polarized light</i>)
rTNF	rekombinanter Tumornekrosefaktor (engl. <i>recombinant tumor necrosis factor</i>)
sFCS	Scanning Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. <i>scanning fluorescence correlation spectroscopy</i>)
S	Singulettzustand
SALPs	Synthetische Anti-Lipopolysaccharid Peptide
SOP	Standardarbeitsanweisung (engl. <i>Standard Operating Procedure</i>)
T	Triplett-Zustand
τ_D	Diffusionszeit
TLR	<i>Toll-Like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
tt	Triplett-Zeit
vAC	Intensitätsunterschiede zwischen zwei zirkularen Polarisierungen
vDC	Lichtintensität über viele PEM Oszillationen

1 Einleitung

Infektionskrankheiten sind seit Menschengedenken eine Gefahr für Menschen und Tiere. Im neunzehnten Jahrhundert begann ein Zeitalter, in dem Infektionskrankheiten als solche erkannt wurden. Dieses trug langsam zum Verständnis der Übertragungswege bei [2]. Seither hat sich die Hygiene in Krankenhäusern deutlich verbessert, ebenso gab es sehr große Fortschritte in der Medizin und auch im Verständnis von Mikroorganismen.

Trotz der Fortschritte sind bakterielle Infektionen heute auch weiterhin ein großes Thema. Deutlich wird dieses an der zunehmenden Intensität, mit welcher Schlagzeilen durch die Presse gehen, die vor einer weltweiten Gesundheitskrise warnen. Fakt ist, dass Infektionskrankheiten für 12-14 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich sind. Das sind 20 % der weltweiten Todesfälle [3]. Zur Sensibilisierung der Bevölkerung für dieses Problem trug beispielsweise vor zehn Jahren die Geschichte des US-Anwalts Andrew Speaker bei. Dieser begab sich trotz einer Infektion mit einer weitgehend medikamentresistenten Tuberkulose-Form auf eine Europareise. Dabei setzte er hunderte international reisende Passagiere einer Infektionsgefahr aus [4]. Der Fall des Andrew Speakers ist nur ein Beispiel für die Probleme, welche antibiotikaresistente Bakterien mit sich bringen. Besorgniserregend ist die steigende Anzahl an Infektionen, welche sich nicht durch die Verabreichung herkömmlicher Antibiotika behandeln lassen. Am bekanntesten ist vermutlich das Methicillin resistente Bakterium *Staphylococcus aureus* (MRSA), dessen Auftreten sich alleine in den Jahren von 1999 bis 2006 versiebenfacht hat [4].

Antibiotikaresistenzen kommen durch Mutationen der Bakterien zustande. Dabei kommt es oftmals zur Ausbildung von Multiresistenzen. Diese Entwicklung geht mit der Zunahme an nosokomialen Infektionen, sowie der steigenden Anzahl von Infektionen durch Gram-negative Erreger einher [5].

Dieser Trend veranschaulicht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapiemethoden für bakterielle Infektionen. Die Suche nach neuen Antibiotika gestaltet sich immer schwieriger, daher wird parallel an alternativen Behandlungsmöglichkeiten geforscht [6]. Infektionen wie z.B. Haut- und Weichgewebeanfektionen können sowohl durch Gram-positive, als auch Gram-negative Bakterien ausgelöst werden. Häufige Kandidaten sind *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ) [7].

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen zur Infektionsbehandlung ist bakterielle Sepsis auch heute noch ein großes Thema. Eine Sepsis muss jedoch nicht durch Bakterien ausgelöst werden. Allerdings sind Bakterien mit 90 % die Hauptursache [8]. Bei einer Sepsis handelt es sich um die führende Todesursache bei stationär aufgenommenen Patienten [9]. Umgangssprachlich ist diese Diagnose auch als Blutvergiftung bekannt und ein durch eine Infektion induziertes Syndrom. Patienten mit Sepsis verursachten im Jahr 2011 5,2 % der US Krankenhauskosten (20 Milliarden US \$) [10]. In den USA gilt Sepsis als dritthäufigste Todesursache. Die „Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania“ führte für das Jahr 2009 eine groß angelegte Sepsis Studie mit 8 Millionen Patienten in 1050 Krankenhäusern,

verteilt auf 44 Staaten, durch. Je nach Sepsis Definition ließen sich in diesem Jahr zwischen 894.013 und 3.110.630 Sepsis-Fälle mit einer Sterblichkeitsrate von 15 % - 30 % ermitteln [11]. Weitere Quellen berichten in den USA jährlich von ca. 200.000 Todesfällen durch die Folgen eines septischen Schocks [12] [13]. Schätzungen zu Folge treten in den Vereinigten Staaten jährlich 800.000 Fälle von schwerer Sepsis auf [14]. Weltweit sind 20-30 Millionen Menschen betroffen, von denen knapp 9 Millionen der Infektion zum Opfer fallen [15]. In Deutschland wurden im Jahr 2011 175.051 Sepsis-Fälle dokumentiert, von denen 50.000 für die Patienten tödlich endeten. Dabei lag die Mortalität aufgrund eines septischen Schocks bei über 60 % [15].

In Deutschland führte die „SepNet Critical Care Trials Group“ 2013 eine einmonatige Studie mit 11.883 Patienten auf Intensivstationen durch. Von diesen waren nach Sepsis-1-Definition 1.503 an einer schweren Sepsis oder an einem septischen Schock erkrankt. Die Mortalität betrug bei diesen Patienten 12,6 % [5]. Erfolgt die Definition einer Sepsis über Sepsis-3 [10], handelt es sich um 848 an Sepsis erkrankten Patienten mit einer Mortalität von 95 % [5]. Eine von Fleischmann et al. veröffentlichte Statistik berichtet 2013 von 279.530 Sepsis-Erkrankungen in Deutschland, von denen 67.849 Patienten die Krankheit nicht überleben [16]. „Die Zeit“ berichtet aktuell von 280.000 Sepsis-Fällen pro Jahr in Deutschland, mit 25 %iger Mortalität [17]. Die Zahlen aus den verschiedenen Studien stellen den Umfang des weltweiten Problems der Sepsis-Behandlung dar.

Wie können diese riesigen Zahlen angesichts eines sehr effektiven Abwehrsystems der Wirbeltiere, insbesondere des Menschen, auftreten?

Das Immunsystem

Um die zuvor gestellte Frage klären zu können soll hier das Immunsystem genauer betrachtet werden. Säugetiere besitzen ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem. Dieses schützt den Wirt vor Bakterien, Viren und Parasiten. Das Immunsystem hat zwei Aufgaben. Zum einen bildet es Rezeptoren, welche die Vielfalt der möglichen Pathogene erkennen. Zum anderen sind „Eindringlinge“ und ihre krankheitsauslösenden Produkte von körpereigenen Produkten zu unterscheiden. Das angeborene Immunsystem hat die Fähigkeit Strukturelemente, wie z.B. Glykopeptide oder Nucleinsäure Formen zu erkennen, die bei Krankheitserregern stark konserviert sind, allerdings nicht im Wirtsorganismus vorkommen. Das adaptive Immunsystem hat die Aufgabe, verschiedene Antikörper und T-Zell-Rezeptoren zu bilden. Das Zusammenspiel beider Immunsysteme ermöglicht die Erkennung und Bindung fremder Organismen, welche anschließend vernichtet werden [18].

Bei der Erkennung von Fremdorganismen durch das angeborene Immunsystem spielt der sogenannte *Pattern Recognition Receptor* (PRR) eine wichtige Rolle. Der PRR zielt auf Pathogen-assoziierte molekulare Muster ab. Es kommen membranständige und lösliche PRRs vor. Zu den membranständigen PRRs gehören u.a. CD14 und die *Toll-like Rezeptoren* (TLRs). Die PRRs binden an den Fremdorganismus und setzen dadurch Effektorzellen frei. Diese verschiedenen Zellen sind durch Zytokine und Chemokine koordinierbar. Dabei sollte sich ein

Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren einstellen. Stellt sich dieses Gleichgewicht nicht ein und überwiegen die pro-inflammatorischen Mediatoren, hat das fatale Folgen und kann in einem septischen Schock enden [19].

Ein wichtiges Pathogen-assoziiertes molekulares Muster sind Lipopolysaccharide (LPSs), eine spezifische Klasse von Glykolipiden, welche in der Zellwand Gram-negativer Bakterien vorkommen. LPS enthält ein hoch konserviertes Muster, das Lipid A, welches vom Immunsystem als pathogen erkannt wird. Daher löst es eine Signalkaskade aus, welche die Freisetzung von Entzündungshemmern wie z.B. Zytokinen zur Folge hat [20]. CD14 und LPS-bindendes Protein (LBP) binden über Lipid A an LPS, wobei LBP die Bindung von LPS am löslichen und membrangebundenen CD14 katalysiert. Dabei spielt der TLR-4 eine wesentliche Rolle. TLR-2 ist für die Erkennung von Gram-negativen Bakterien ebenfalls von Bedeutung, denn dieser erkennt die Lipoproteine in der Membran [21]. Vom Organismus, aus dem das LPS kommt, hängt ab wie groß die Beeinflussung von LPS auf TLR-4 ist. Beispielsweise beeinflusst LPS aus *Salmonella* den TLR-4 1000x stärker, als LPS aus *Bartonella henselae* [22].

Der TLR-4 besitzt bei der Erkennung von Krankheitserregern die Aufgabe, Zellen durch LPS zu aktivieren. Von der Anzahl der TLR-4's an der Oberfläche einer Zelle hängt die Empfindlichkeit gegenüber LPS ab. Bei einer mäßigen LPS-Konzentration ist die entstehende Immunreaktion für den Wirt von Vorteil und er ist in der Lage eine Infektion selbstständig zu bekämpfen [23]. Höhere LPS-Konzentrationen im Serum belaufen sich auf etwa 1 $\mu\text{g/l}$ und sind in der Lage eine Sepsis auszulösen [12].

Entsteht jedoch während einer Infektion eine Überempfindlichkeit, nimmt die benötigte LPS Konzentration stark ab und es besteht die Gefahr einer Sepsis - eine Gefährdung für das Leben des Patienten.

Gram-negative Bakterien sind ausschließlich über das LPS für das Immunsystem erkennbar. Gram-positive Bakterien hingegen haben Lipopeptide (LP) in ihrer Zellmembran. Diese induzieren ebenfalls die Zytokinproduktion wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$ [24].

Gram-positive Bakterien

Der Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und Bakterien soll genauer beleuchtet werden. Zu diesem Zweck soll mit einer genaueren Betrachtung Gram-positiver Bakterien begonnen werden.

Bei der Suche nach Antibiotika-Alternativen sind insbesondere in Krankenhäusern die Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und die *Enterococcus* Spezies relevant. Denn die Behandlung der Patienten erschwert sich mit dem sich erweiternden Spektrum der Resistenzen [25]. Für die Bindung eines Wirkstoffes an ein Bakterium ist die Beschaffenheit der Zellaußenseite essentiell.

Der detaillierte Aufbau der Membran Gram-positiver Bakterien ist in der Literatur beschrieben [26] und in Abbildung 1 dargestellt.

Die Murein-Schicht besteht bei *Staphylococcus aureus* aus etwa 25 Murein-Schichten, welche jeweils mit fünf Pentaglycinen verknüpft sind. Die Bindung entsteht zwischen dem

L-Lysin der ersten Kette und D-Alanin der zweiten Kette. Angelagert an dieses Peptidoglycan sind Teichonsäuren, welche für die negative Ladung der Zelloberfläche verantwortlich sind [26]. Im Bezug auf Sepsis sind die pathogen assoziierten Muster der Lipoproteine (LP) und Peptidoglycane von besonderer Bedeutung [27].

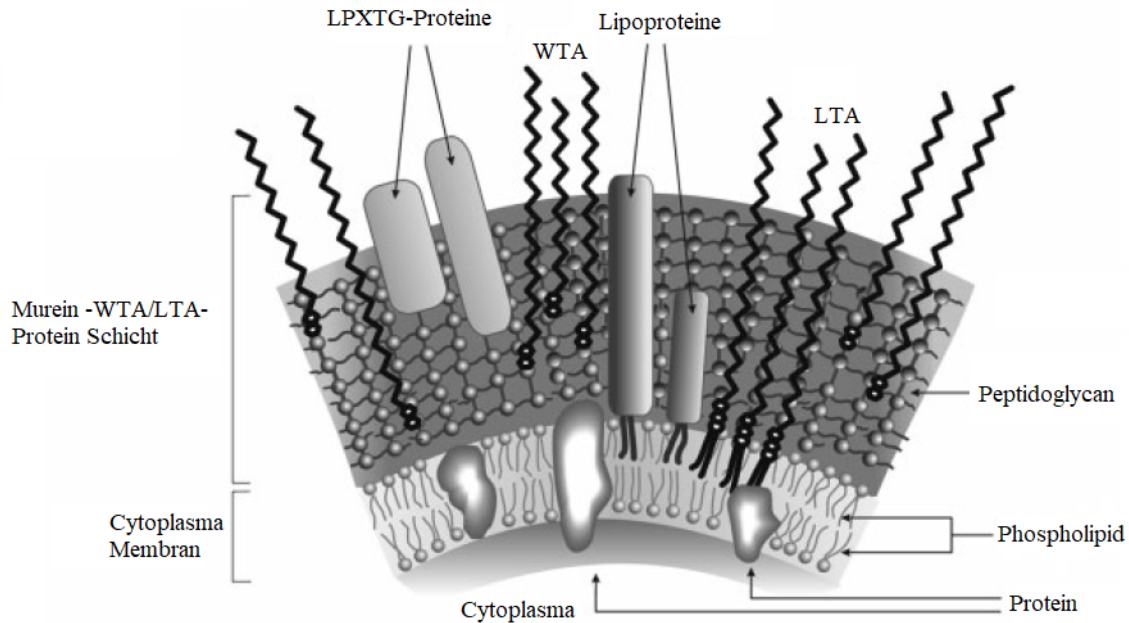


Abbildung 1: Bakterienzellwand vom Gram-positiven Bakterium *S. aureus* [27]. In der Zellwand sind bakterielle Lipoproteine und Peptidoglycane zu finden, welche zum haupt-pathogen-assoziierten molekularen Muster gehören. An der äußeren Oberfläche sind Lipoteichonsäuren (LTA) und Wandteichonsäuren (WTA) verankert. LPXTG steht für die Aminosäuren (AS) Leucin-Prolin- eine beliebige AS -Threonin-Glycin und stellt in *S. aureus* das Erkennungsmotiv für Sortasen dar [28].

Gram-negative Bakterien

Nach der Betrachtung von Gram-positiven Bakterien soll der Fokus nun auf Gram-negative Bakterien gelegt werden. Denn neben Sepsis werden auch andere Infektionskrankheiten, wie z.B. Keuchhusten, Typhus und Magengeschwüre durch Gram-negative Bakterien ausgelöst [29]. Bei der Bekämpfung der Bakterien durch das Immunsystem spielt ein Teil der Zellwand eine große Rolle.

Der detaillierte Aufbau der Membran Gram-negativer Bakterien ist in der Literatur beschrieben [26] und in Abbildung 2 dargestellt. Die äußere Membran ist lediglich für kleine Moleküle durchlässig und besteht aus Phospholipiden, Lipopolysacchariden (LPS), Proteinen und Lipoproteinen [26].

Dabei ist LPS ein Hauptbestandteil der Zellwand und bedeutend für die bakterielle Erkennung durch das Immunsystem. Wird jedoch LPS freigesetzt, führt es zu Symptomen wie Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen, kann aber auch zur Auslösung eines Endotoxinschocks führen [29]. Im Bezug auf Sepsis sind Lipopolysaccharide, Lipoproteine und Peptidoglycane die interessantesten Bestandteile der Zellwand [27].

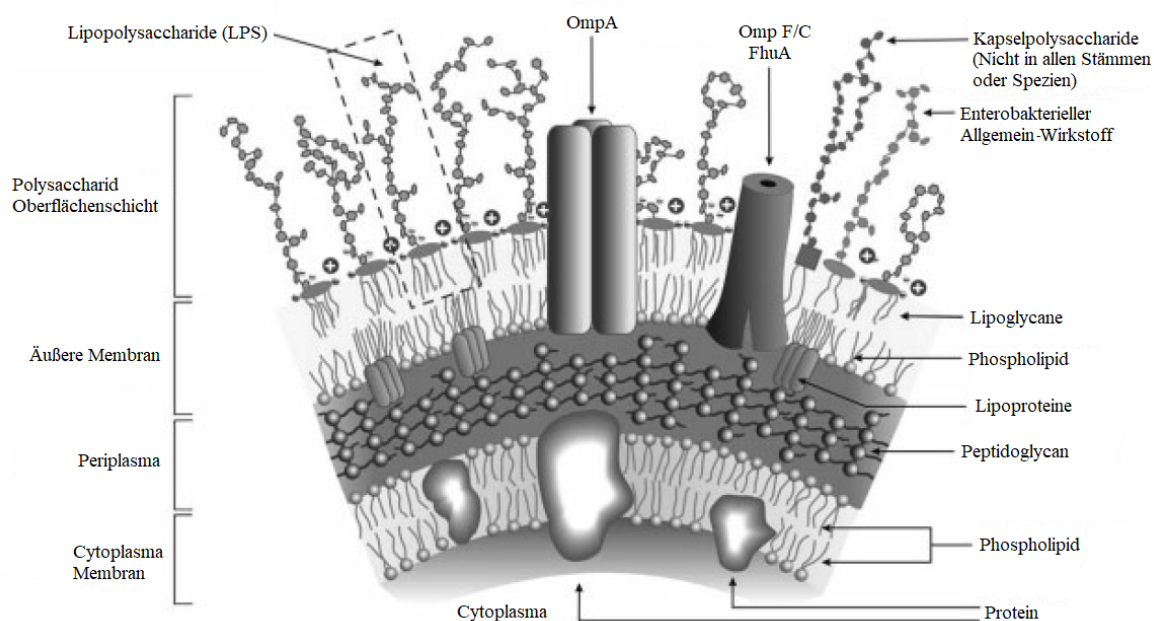


Abbildung 2: Bakterienzellwand von Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli* und *S. enterica* [27]. Die wichtigsten pathogen-assoziierten molekularen Muster in der Zellwand Gram-negativer Bakterien sind Lipopolysaccharide, Lipoproteine und Peptidoglycane. Omp A und Omp F/C, FhuA sind Membranproteine.

Infektionen

Allgemein handelt es sich bei einer Infektion um eine Abwehrreaktion des Organismus oder des Gewebes gegen verschiedenartige Reize.

Aus mikrobiologischer Sicht handelt es sich bei einer Infektion um eine Veränderung im Wirt. Diese kann sowohl positiv als auch negativ sein. Hervorgerufen wird eine solche Veränderung durch Pilze, Viren, ein- und mehrzellige Parasiten oder Bakterien. Die Infektionserreger lassen sich in drei Gruppen unterteilen [30]:

1. Subzelluläre Agenzien, zu denen Prionen, Viren und Viroide zählen.
2. Eukaryote und prokaryote Protisten, zu denen Bakterien, Pilze und Protozoen gehören.
3. Metazoische Parasiten, welche Helminthen, Acanthocephalen, Pentastomiden und Arthropoden beinhalten.

Bei einer endogenen Infektion vermehrt sich der Erreger an seinem Standort, um sich anschließend lokal auszubreiten und/oder an den Infektionsort übertragen zu werden. Dabei verläuft eine Infektion wie in Abbildung 3 dargestellt: Der erste Schritt ist die Adhärenz. In dieser Phase findet die Kolonisation meistens an Haut oder Schleimhaut statt. Als Zweites folgt die Invasion, bei der der Erreger in den Wirt eindringt. Der dritte Schritt ist die Etablierung. In dieser Phase bekämpft das Immunsystem des Wirts den Erreger. Wenn der Erreger sich gegenüber dem Wirt behaupten kann, folgt der vierte Schritt, die Schädigung. Diese kann auf zwei Arten verlaufen: zum einen durch die direkte Schädigung, beispielsweise durch intrazelluläre Vermehrung oder Exoprodukte, und zum anderen kann der Erreger

eine übermäßige Entzündungsreaktion induzieren und dadurch den Wirt schädigen. Der fünfte Schritt ist der Ausgang der Infektion. Es gibt in dieser Phase drei Möglichkeiten: Die erste Möglichkeit besteht in der Autosterilisation und der Erreger wird, nachdem der überstandenen Infektion, völlig eliminiert. Die zweite Option besteht darin, dass die Erreger nach einer Infektion ausgeschieden werden und auf einen neuen Wirt übergehen. Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass ein Wirt als Träger fungiert, ohne selbst Symptome einer Infektion zu zeigen [31].

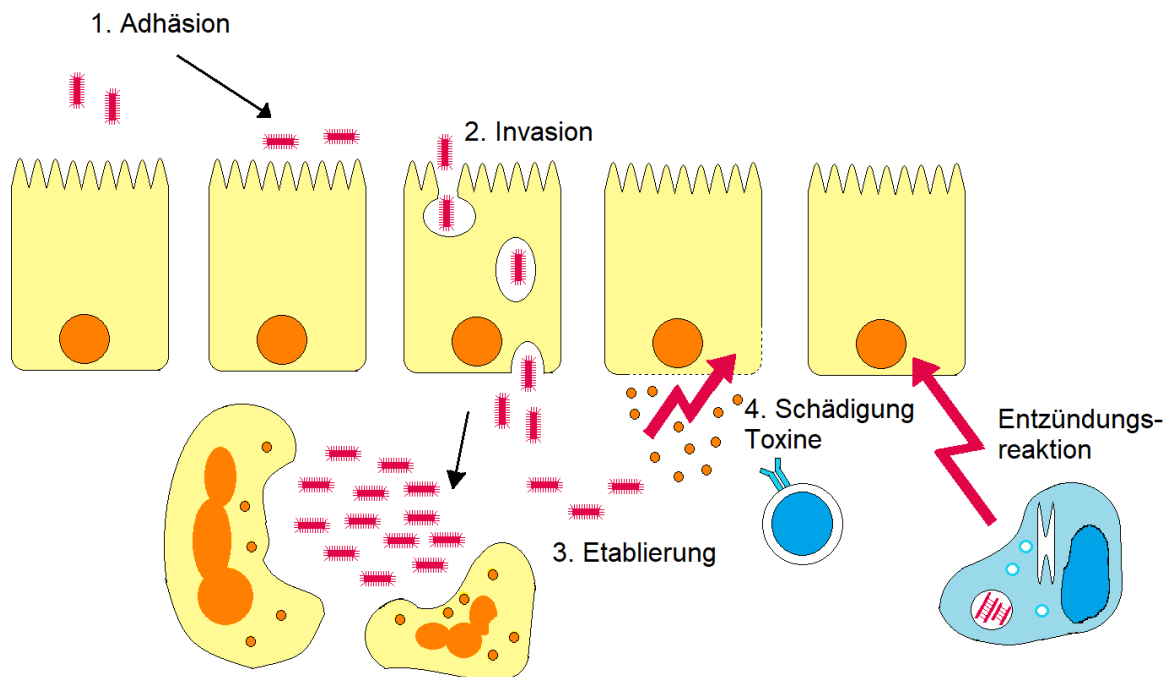


Abbildung 3: Darstellung einer endogenen Infektion bestehend aus folgenden Schritten: 1. Adhäsion, 2: Invasion, 3. Etablierung und 4 Schädigung durch Toxine oder eine Entzündungsreaktion, abgezeichnet von Imhoff et al. [31].

Endogene Infektionen können nach dem Verhalten der Erreger im Körper des Wirts unterteilt werden. Diese Unterteilung unterscheidet Lokalinfectionen, Sepsen, zyklische Allgemeininfektionen, Infektionen mit postinfektiöser Immunreaktion, Intoxikationen und Allergien [31].

In diesem Rahmen soll lediglich die Sepsis genauer betrachtet werden. Eine Sepsis kann auf zwei Arten entstehen. Zum einen als Folge einer unbehandelten Infektion [31] und zum anderen durch eine systemische Entzündung. Die systemische Entzündung eines Organismus wird häufig als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* bezeichnet. Infektionen und Entzündungsreaktionen sind anhand klinischer Kriterien zu erkennen [27].

Der Unterschied zwischen einer Infektion und einer Sepsis, sowie den drei Einteilungen der Sepsis ist im Folgenden erklärt [27]:

- Infektion:** Ein pathologischer Prozess, welcher durch das Eindringen von pathogenen oder potentiell pathogenen Mikroorganismen in Gewebe oder Flüssigkeiten verursacht wird.
- Sepsis:** Das Vorliegen einer Infektion, welche dokumentiert oder stark vermutet wird, oder eine systemische Entzündungsreaktion, die durch verschiedene Merkmale angezeigt werden kann (siehe Abbildung 4).
- Starke Sepsis:** Sepsis in Kombination mit einer Organ Dysfunktion.
- Septischer Schock:** Starke Sepsis in Kombination mit akutem Kreislaufversagen, welche trotz Flüssigkeitszufuhr durch anhaltende arterielle Hypotonie gekennzeichnet ist.

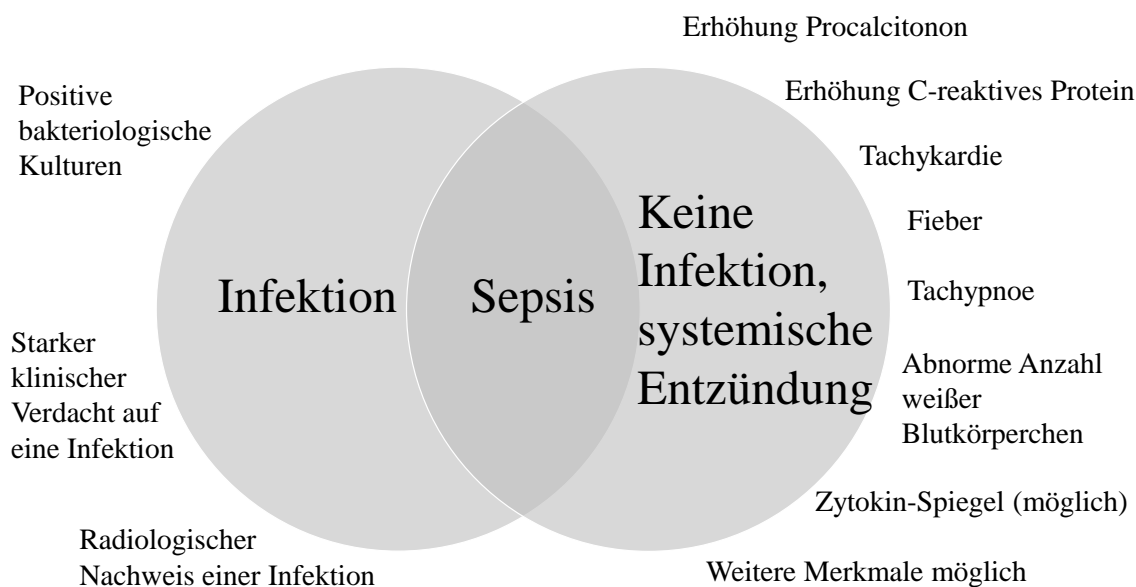


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Infektion, Sepsis und systemischer Entzündung. Zugeordnet sind die Merkmale, welche das Vorliegen einer systemischen Entzündung anzeigen können.

Eine Sepsis kann durch Bakterien, Pilze oder Parasiten ausgelöst werden. Die häufigsten bekannten Verursacher sind Bakterien. Dabei kommen Gram-positive und Gram-negative Bakterien heute mit annähernd gleicher Häufigkeit vor. Früher überwogen Infektionen mit Gram-negativen Bakterien. Doch in den letzten 25 Jahren haben Gram-positive, einhergehend mit der Entwicklung von Antibiotika Resistenzen, aufgeholt [32]. Etwa 40 % der Sepsisfälle, bei denen der Auslöser bekannt ist, gehen auf das Konto Gram-positiver Bakterien, 38 % hingegen können Gram-negativer Bakterien zugeordnet werden, hinzu kommen 17 % die durch Pilze verursacht werden und ein kleiner Teil welcher auf das Konto von Parasiten geht [27].

Die Bakterien sind dabei in der Lage Endotoxine freizusetzen. Gram-negative Bakterien setzen LPS frei, während Gram-positive Bakterien LP freisetzen. Diese Endotoxine sind in der Lage Infektionen auszulösen, welche in einer Sepsis oder einem septischen Schock enden können [33].

Dabei sind Gram-negative Bakterien mit höherer Mortalität assoziiert als Gram-positive Bakterien. Blutinfektionen werden häufig von *Koagulase-negativen Staphylococccen* (Gram-positiv) und *Escherichia coli* (*E. coli*, Gram-negativ) ausgelöst, welche mit 20 % (*Staphylococccen*) und 19 % (*E. coli*) eine relativ geringe Mortalität besitzen. Eine Infektion mit dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* weist eine Mortalität von 41 % auf. Die Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* besitzen eine Mortalität von 77 %, die Bakterien der Gattung *Acinetobacter* weisen eine Mortalität von 40 % auf, dazu gehört u.a. *Acinetobacter baumannii* und *Streptomyces pneumoniae* mit einer Mortalität von 13 % [27]. Weitere für Sepsis relevante Bakterien sind das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pyogenes* und die Gram-negativen Bakterien der *Klebsiella* Spezies [32].

Die durch Pilze ausgelösten Sepsis-Fälle werden besonders häufig von der Gattung *Candida* verursacht, welche eine Mortalität von 43 % aufweist. Von besonderem Interesse sind dabei *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* [27]. Parasiten sind ebenfalls in der Lage eine Sepsis zu induzieren. Ein Beispiel dafür ist die schwere Falcilarum Malaria, welche durch den einzelligen Parasiten *Plasmodium falciparum* ausgelöst wird [27].

Nicht außer Acht gelassen werden sollte, dass bei 42-47 % der Sepsis Patienten die Diagnose lediglich geschätzt wurde, ohne dass ein infizierender Organismus nachweisbar war [27].

Die Behandlung einer Sepsis gestaltet sich aus zwei Gründen schwierig:

Zum einen weist eine große Anzahl an Bakterien Antibiotikaresistenzen auf [34] [35]. Die wohl bekannteste Resistenzausbildung betrifft *Staphylococcus aureus*. Methicillin resistente *S. aureus* sind als MRSA bekannt geworden, 10 % der MRSA aus Haut- und Weichteilinfektionen weisen heute zusätzlich eine Resistenz gegenüber Clindamycin auf und 1 % ist bereits gegen Trimethoprim-Sulfamethoxazole resistent [34]. In den USA wurden tatsächlich bereits die ersten Vancomycinresistenten *S. aureus*-Stämmen nachgewiesen [36].

Zu diesem besorgniserregenden Trend kommt, dass Antibiotika für die Behandlung einer Sepsis problematisch sind. Die Problematik besteht darin, dass herkömmliche Antibiotika bei der Abtötung von Bakterien deren Endotoxine freisetzen, welche die Entzündungsreaktion noch weiter verstärken können [6].

Lipopolysaccharide

Bei der Behandlung einer Sepsis ist eine Neutralisation der Endotoxine in Kombination mit der Abtötung der Bakterien anzustreben. Für diesen Ansatz ist das LPS genauer zu betrachten.

LPS sind die sogenannten Endotoxine von Gram-negativen Bakterien. Sie bestehen aus drei Domänen: dem Lipid A, dem Kern Oligosaccharid und der O-Antigen Polysaccharid-Kette, wobei der Kern sich in die äußere und innere Kernregion unterteilen lässt.

Lipid A ist die innere hydrophobe Region, die das „endotoxine Prinzip“ von LPS darstellt. Dabei ist Lipid A der am geringsten variierende Teil des Moleküls zwischen den verschiedenen Bakterienarten. Es besteht aus einem Diglucosamin Grundgerüst, substituiert mit einer unterschiedlichen Anzahl (meistens vier bis sieben) Ester oder Amid gebundener Fettsäuren. Phosphate und/oder andere Substituenten sind an C-1 und C-4' Position des Glucosamin Disaccharids gebunden. 2-Keto-3-Deoxyoctonat (Kdo) verknüpfen das Lipid A mit dem Kern Oligosaccharid [22].

Das Kern Oligosaccharid umfasst 10-12 Saccharidreste und bindet an das O-Antigen. Dieses variable O-Ketten Polysaccharid besteht aus Oligosaccharid Einheiten und ist Immunogen, d.h. es kann eine Immunantwort auslösen.

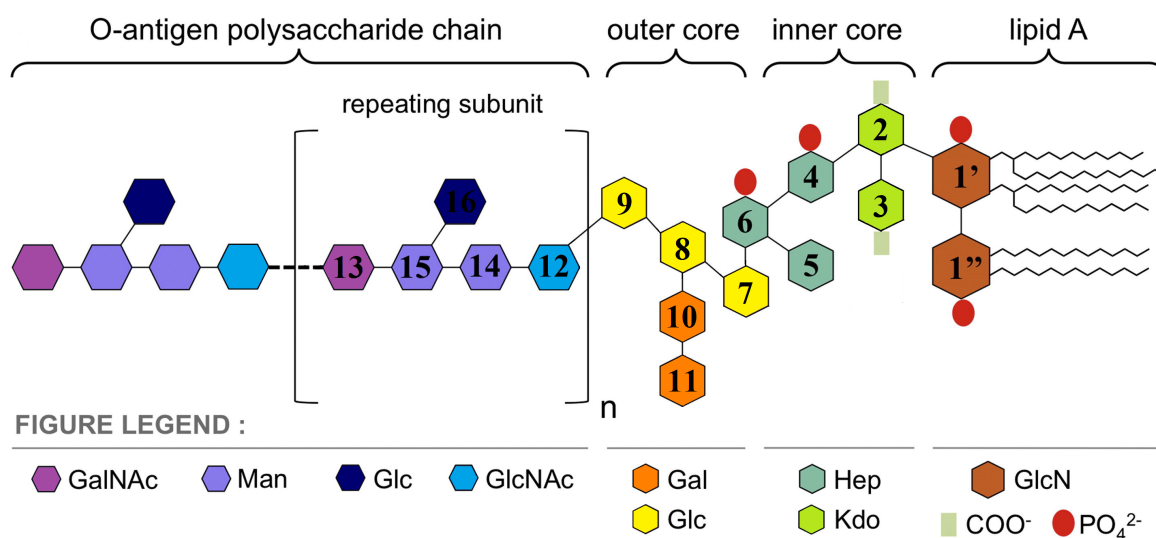


Abbildung 5: Prinzipieller Aufbau der chemischen Struktur von R1 O6 LPS aus *E. coli*. (Kdo: 2-Keto-3-Deoxyoctukosont; Hep: L-Glycero-D-Manno Heptose; Man: D-Mannose; Glc: D-Glukose; Gal: D-Galaktose; GlcN: D-Glucosamin; GlcNAc: N-Acetyl-D-Glucosamin; GalNAc: N-Acetyl-D-Galaktosamin) Quelle: Wu et al. 2013 [37].

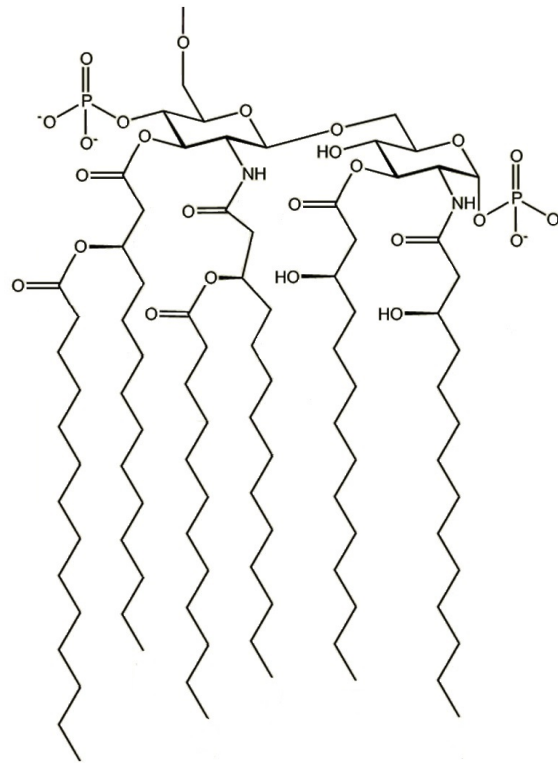


Abbildung 6: Chemische Struktur von Lipid A aus *E. coli*, Quelle: Wu et al. 2013 [37]. Bestehend aus zwei Diglucosaminen, substituiert mit zwei Ester und zwei Amid gebundener Fettsäuren. Die Phosphate sind an C-1 und C-4' Position des Glucosamin Disaccharids gebunden. Hier nicht dargestellt ist das 2-Keto-3-Deoxyoctanat (Kdo), welche das Lipid A mit dem Kern Oligosaccharid verknüpft.

In der vorliegenden Arbeit fand LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota R60 Verwendung, welches innerhalb des heterogenen Wildtyp-LPS die bioaktive Einheit darstellt [38].

Antimikrobielle Peptide

Auf der Suche nach einer Möglichkeit Bakterien abzutöten und gleichzeitig kein LPS frei zu setzen, ist die Stoffklasse der antimikrobiellen Peptide von Interesse. Antimikrobielle Peptide (AMP) sind in der Lage Bakterien abzutöten, ohne zur Entzündung führende Faktoren freizusetzen. Allerdings besitzen diese Peptide eine hohe Toxizität, Hämolyse, Nephrotoxizität und Neurotoxizität. Aus diesen Gründen konzentriert sich die Forschung auf synthetisch hergestellte Peptide, welche ohne Lebensgefahr für den Patienten zu verabreichen sind [33]. Biologisch aktive Peptide sind beispielsweise Hormone, Enzyme, Peptidtoxine und Peptidantibiotika. Peptidtoxine kommen häufig in der Natur vor. Beispiele dafür sind Amanitin und Phalloidin, die Gifte des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), sowie α - und β -Bungarotoxin, die Gifte der Schlange *Bungarus multicinctus*. Zu den Peptidantibiotika zählen beispielsweise Gramacidin S, welches hochaktiv gegen Gram-positive Bakterien ist und Nisin, welches die Cytoplasmamembran von *Streptococce*n und *Staphylococce*n zerstört [39]. Im menschlichen Organismus haben Peptide die Funktion von Botenstoffen oder Enzymsubstraten. Peptide sind aufgrund ihrer vielen verschiedenen Funktionen von hoher medizinischer Relevanz. Die Verabreichung eines Peptids als Medikament ist problematisch. Die Resorption ist durch das hohe Molekulargewicht und die hohe Polarität schwierig bis fast

unmöglich. Hinzu kommen Proteasen, die Proteine relativ schnell abbauen können. Körperfremde Proteine können über Leber und Niere sehr schnell ausgeschieden werden [40]. Diese, für die Verwendung von Proteinen als Wirkstoff negativen Eigenschaften, sollen durch Strukturmodifizierungen optimiert werden. Eine solche Modifizierung erfolgt unter Verwendung einer Leitstruktur. Die verschiedenen Variationen entstehen durch Peptid-Synthese. Synthetisch hergestellte Peptide oder Proteine sind spezifisch an die jeweilige Problemstellung anpassbar. Eben diese Prozedur durchliefen beispielsweise auch die synthetischen anti-LPS Peptide (SALPs) [12].

Die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie machen AMPs zunehmend zu attraktiven möglichen Therapeutika, da durch diese Technik die Herstellung solcher Therapeutika per Fermentation rentabel werden lässt. Allerdings gibt es derzeit noch Probleme bei AMPs. Die fehlende Spezifität für Zielzellen, welche problematisch zu erreichen sind, und die geringen Halbwertszeiten, machen hohe Dosen erforderlich. Aufgrund der Toxizität, geringen Spezifität und unerwünschten Nebenwirkungen ist es ratsam, geringe Dosen zu verwenden. Allerdings besteht dabei das Risiko der Resistenzen-Ausbildung [41].

Bereits entwickelt sind Peptide mit 17-23 Aminosäuren (AS), angepasst an die physikochemische Struktur von Lipid A. Als Vorlage für die Peptid-Struktur diente der *Limulus* anti-LPS Faktor [8] [12]. Diese positiv geladenen Peptide binden an das negativ geladene LPS. Es gelang bereits synthetische Peptide herzustellen, welche in einem Peptid-Endotoxin-Verhältnis von 10:1 wirksam sind [12].

Die neu designten synthetischen Anti-Lipopolysaccharid Peptide (SALPs), deren Toxizität geringer ist, können *in vitro* und *in vivo* LPS-Mediate Effekte neutralisieren [9] [42]. Daher haben diese SALPs eine gute Zukunftsprognose.

Antimikrobielle Peptide (AMPs), wie Peptidantibiotika, sind nicht nur gegen Bakterien wirksam, sondern auch gegen Hefen, Schimmelpilze, Viren und Krebszellen [43]. Die Wirkung dieser AMPs basiert auf den positiv geladenen AS-Resten, die sich an den negativ geladenen Teil der Membran anlagern. Im Fall von Gram-negativen Bakterien handelt es sich dabei um LPS [44]. AMPs sind eine eigene Stoffklasse und besitzen meistens einen kationischen Charakter. Die D-chirale Form von L-Peptiden ist effektiver gegen Bakterien, denn die Enzyme von Bakterien können die chemisch synthetisierten D-Isomere nicht hydrolysieren [45].

Die entwickelten synthetischen Anti-LPS Peptide (SALP's) wurden in Länge sowie primärer Sequenz variiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Bindung an Lipid A erhalten bleibt. Diese Peptide können effizient LPS neutralisieren und immunopathologische Folgen verhindern. Die SALPs sind selektiv für LPS, haben eine hohe neutralisierende Aktivität *in vitro* und einen hohen Schutz vor einem septischen Schock *in vivo*. Die geringe Zytotoxizität unter physiologischen Bedingungen macht diese SALPs zu möglichen Kandidaten für die Anwendung als Medikament zur Vorbeugung und Behandlung eines septischen Schocks [12].

Peptid 19-2.5

Bei dem Antimikrobiellen Peptid, welches in dieser Arbeit näher betrachtet wird, handelt es sich um das SALP Peptid 19-2.5. Dieses Peptid besitzt eine hohe *in vivo* und *in vitro* Endotoxin-Neutralisations-Effizienz. Gegen das Gram-negative Bakterium *Salmonella enterica* wirkt Peptid 19-2.5 allerdings in deutlich höherer Konzentration (128 $\mu\text{g/ml}$) als verschiedene Antibiotika wie Amoxicillin (0,25 $\mu\text{g/ml}$) und Tetracycline (0,25 $\mu\text{g/ml}$) [42]. Der Vorteil des Peptids liegt in der Bindung des LPS, durch welche es für die Behandlung einer Sepsis in Betracht kommen könnte. Neben einer möglichen Sepsis-Behandlung gibt es erste Anzeichen dafür, dass Peptid 19-2.5 für die Behandlung von Darminfektionen eingesetzt werden könnte. Im Mausmodell mit dem Darmbakterium *Salmonella enterica subsp. enterica* *sv. Typhimurium* schien Peptid 19-2.5 erfolgsversprechend zu sein, wenn es gelingt das Peptid vor enzymatischem Abbau zu schützen [46].

Alle Versuche mit dem Peptid 19-2.5 wurden nach Möglichkeit in Polypropylen oder Polyethylen durchgeführt, da das Peptid sich sehr schnell an Glas anlagert. Das Peptid 19-2.5 besteht aus 20 Aminosäuren (siehe Abb. 7) und weist eine molare Masse von 2711 Da auf. Synthetisiert wurde dieses Peptid von der Firma Bachem AG.

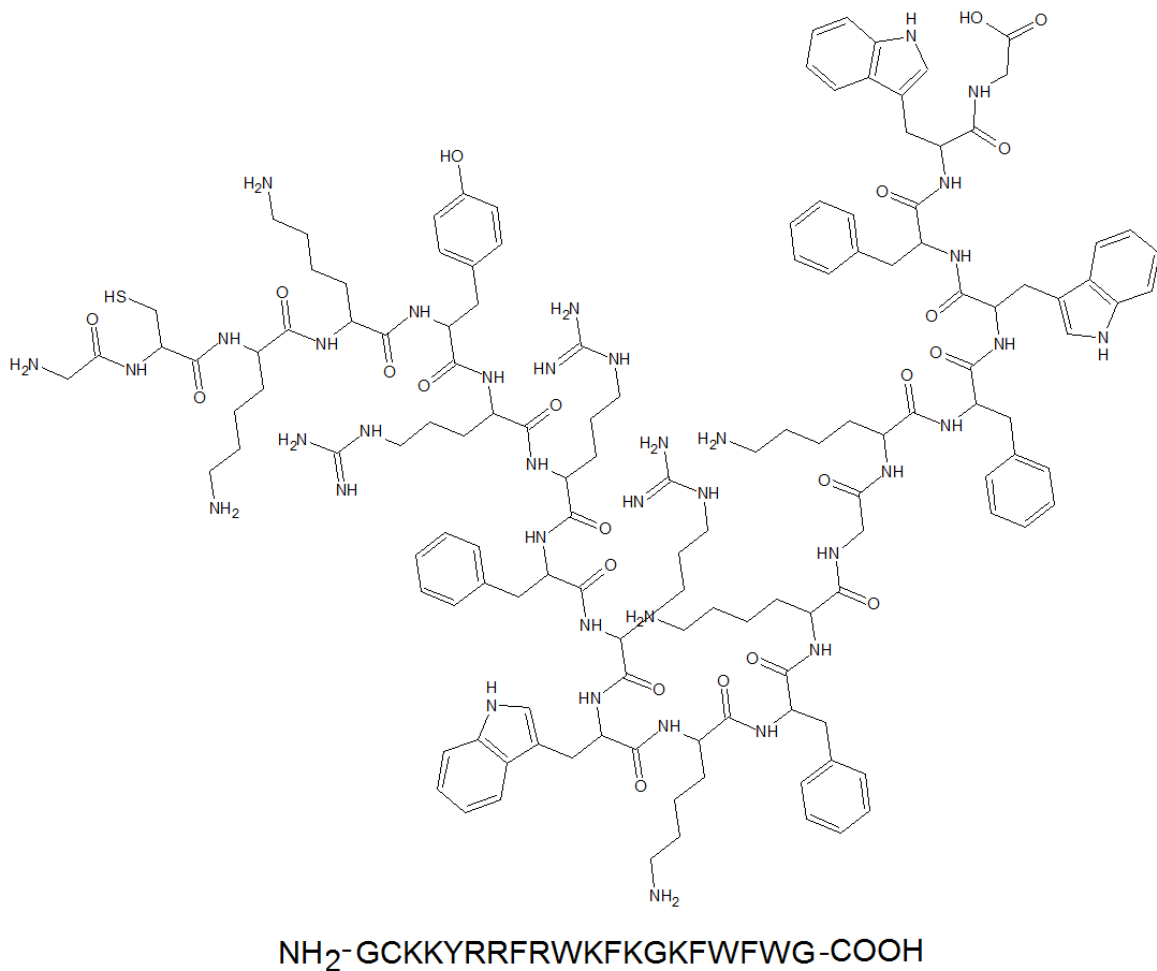


Abbildung 7: Primärstruktur von Peptid 19-2.5. Die Sequenz wurde bereits 2010 von Gutschmann et al. publiziert [12]. AS: G $\hat{=}$ Glycin; C $\hat{=}$ Cystein; Y $\hat{=}$ Tyrosin; R $\hat{=}$ Arginin; K $\hat{=}$ Lysin, F $\hat{=}$ Phenylalanin; W $\hat{=}$ Tryptophan [18]. Das von der Bachem AG synthetisch hergestellte Peptid besteht aus 20 AS und besitzt eine molare Masse von 2.711 Da.

Das Peptid besitzt durch die basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) bei neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung, wobei der C-Terminus des Peptids hydrophob ist. Der isoelektrische Punkt des Peptids liegt je nach Quelle bei 11,17 [47] bzw. 11,07 [48]. Die Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin haben folgende pK_R -Werte: Lysin $pK_R = 10,0$ und Arginin $pK_R = 12,5$ [18].

		Nettoladung
pH < 10,0	$\begin{array}{ccccccc} & + & + & + & + & + & + \\ \text{GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG} \end{array}$	+ 8
10,0 < pH < 12,5	$\begin{array}{ccccccc} & o & o & + & + & + & o & o & o \\ \text{GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG} \end{array}$	+ 3
pH > 12,5	$\begin{array}{ccccccc} & o & o & o & o & o & o & o & o \\ \text{GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG} \end{array}$	± 0

Abbildung 8: Ladung von Peptid 19-2.5 bei verschiedenen pH-Werten. Die Lysine und Arginine sind bei pH-Werten < 10 positiv geladen. Bei einem pH-Wert ≥ 10 liegt das Lysin ungeladen vor. Ab einem pH-Wert von $\geq 12,5$ liegt auch das Arginin ungeladen vor und die Nettoladung des Peptids beträgt 0.

Ein limitierender Faktor für die industrielle oder klinische Verwendung von AMPs ist die Instabilität der Formulierung [49]. Dazu kommt die fehlende Spezifität bei der gezielten Zustellung [50].

Die Stabilisierung von Antimikrobiellen Peptiden

Soll das SALP Peptid 19-2.5 als Wirkstoff verabreicht werden, muss es zuvor vor Hydrolyse und Abbau geschützt werden. Allgemein lassen sich antimikrobielle Peptide durch die Verkapselung mit Trägermaterialien stabilisieren und teilweise auch gezielt an ihren Wirkort transportieren.

Als Meilenstein für den Wirkstofftransport wurde die Größenreduktion der Peptid-Träger auf den Nanometer-Bereich gesehen. Denn Nanopartikel weisen, im Vergleich zu herkömmlichen Transportsystemen, eine erhöhte Stabilität in biologischen Flüssigkeiten auf. Zusätzlich können sie Peptide vor enzymatischem Abbau schützen und die Peptide verzögert freisetzen [51]. Ebenfalls können Nanopartikel in Bakterien oder Viren eindringen. Nanopartikel mit einem Durchmesser von 30 nm besitzen das Potential vom Immunsystem nicht erkannt zu werden [52].

Ein Wirkstofftransportsystem mit einer Größe im Nanometerbereich stellt allerdings eine Gefahr dar. Eben die Eigenschaft dieser Partikel biologische Barrieren einfach zu überwinden macht diese Partikel so gefährlich. Werden Nanopartikel inhaliert, über die Haut aufgenommen oder verschluckt, sind diese in der Lage eine reaktive Sauerstoffspezies, die

freien Sauerstoffradikale, zu induzieren. Diese Sauerstoffradikale produzieren im Körper oxidativen Stress, Entzündungen und Folgeschäden beispielsweise an DNA und Proteinen [53].

Die Wirkortspezifität von kationischen Peptiden könnte mit Hilfe funktionalisierter Trägersysteme erfolgen. Solche Träger könnten Liposomen, dendritische Polymere, feste Kernnanopartikel, Kohlenstoff-Nanoröhrchen und DNA-Käfige sein [41]. Die Oberfläche dieser Träger könnte mit Biomolekülen funktionalisiert werden [41]. Dieses kann durch eine Modifizierung der Oberfläche mit biologisch aktiven Funktionsmolekülen wie Antikörpern, Peptiden oder Lektinen geschehen [54]. Die Freisetzung der Wirkstoffe am Wirkort wird durch verschiedene Faktoren, wie die Partikelgröße und Wirkstoffbeladung, beeinflusst [54].

Für die Stabilisierung von Wirkstoffen stellt die orale Applikation eine besondere Herausforderung dar. Der proteolytische Abbau im Magen-Darm-Trakt, durch Pepsin im Magen, Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase und Elastasen in dem Sekret der Bauchspeicheldrüse, sowie Peptidasen im Dünndarm sind von Bedeutung. Die geringe Resorption in den Darmlumen ist zusätzlich nicht zu verkennen. Biopharmazeutika werden beispielsweise per Infusion, Injektion und Implantation verabreicht [55].

Beispiele für Trägersysteme sind Liposomen. Sie sind sowohl für hydrophile, als auch für hydrophobe Substanzen geeignet, besitzen eine hohe Biokompatibilität, geringe Toxizität, lösen keine Immunreaktion aus und sind in der Lage, bioaktive Komponenten freizusetzen [56]. Liposomen können in Mikro- und Nanometergrößenordnung hergestellt werden. Dabei ist eine Oberflächenfunktionalisierung mit Peptiden, Proteinen oder Antikörpern möglich. Anwendung finden sie oftmals in Impfstoffen [57].

Eine hydrophile Oberfläche kann durch die Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) erreicht werden. Liposomen können für die kontrollierte Freisetzung von Substanzen verwendet werden [56]. Das System ist allerdings durch folgende Punkte limitiert: Liposomen können instabil sein und besitzen relativ kurze Halbwertszeiten, da sie schnell abgebaut werden können. Die deutlich erhöhte Biokompatibilität, im Gegensatz zum synthetischen Kunststoffen basierten System, kann eben auch nachteilig sein [56]. In der Literatur wird die Verkapselung von Wirkstoffen mit diesen synthetischen Kunststoffen relativ häufig beschrieben [58] [59] [60] [61] [62] [63].

Die stabileren synthetischen Kunststoffsysteme sind in der Lage Substanzen langsam freizusetzen. Die Verkapselung von therapeutisch aktiven Substanzen mit PEG kann, durch die Hitzeentwicklung bei der Herstellung, einen Einfluss auf die Bioaktivität der Substanz haben [56].

Ein häufig verwendetes Polymer ist „Poly(lactic-co-glycolic)acid“ (PLGA) [3] [57], denn es besitzt die Eigenschaften der biologischen Abbaubarkeit und Biokompatibilität [57].

Modellproteine können ebenfalls mit synthetischen Kunststoffen verkapselt werden [64] [65]. Zusätzlich ist die Kombination aus synthetischen Kunststoffen und Polysacchariden

wie Alginat und Chitosan beschrieben [3] [66].

Für eine neue Generation von Therapeutika werden neue Trägersysteme erprobt. Potential als neues Trägersystem weisen Polysaccharide auf [49] [67].

Das bedeutet, dass Oligosaccharide in der Lage sind Peptide zu stabilisieren. Neben der Stabilisierung von Peptiden wäre ein pH-abhängiger Schutz der Peptide wünschenswert. Deshalb erfüllen die bereits aufgeführten Oligosaccharide lediglich einen Teil der Anforderungen. Stattdessen könnten Polysaccharide möglicherweise in der Lage sein diese Anforderungen zu erfüllen.

Polymere werden über ihre molare Masse, die Ladung, den Aufbau, die Polydispersität und die Hydrophobizität charakterisiert [68] [69]. Diese charakteristischen Eigenschaften der Polymere haben einen Einfluss auf deren Löslichkeit, Biokompatibilität, Bioverfügbarkeit, den Weg, auf dem das Polymer aus dem Körper ausgeschieden wird und die Interaktion mit dem Immunsystem [68] [69] [70]. Neben der Polydispersität ist auch der hydrodynamische Radius wichtig für die Anwendung von Polymeren für biomedizinische Zwecke [71]. Die Größe der entstehenden Polysaccharid-Makromolekularer-Substanz-Komplexe hat einen entscheidenden Einfluss auf die Verteilung im Körper und die Interaktion mit den Zellmembranen [72]. Eine definierte molare Masse und keine Polydispersität wäre für die eine Struktur-Aktivitäts-Korrelation zwischen Träger und Makromolekül von Vorteil [70].

Alginat

Eine Möglichkeit AMPs zu stabilisieren liegt darin diese in einem Alginathydrogel zu komplexieren. Diese Hydrogele haben Poren, welche sich abhängig vom pH-Wert öffnen und schließen können. Zeeb et al. beschrieben, dass die Poren eines Alginat-Hydrogels sich mit steigendem pH-Wert (gemessen pH 2 bis 11) vergrößern [73]. Die Porengröße wird neben dem pH-Wert zusätzlich noch von der eingesetzten Alginat- und Calciumchloridkonzentration beeinflusst. Sie kann zwischen 5 und 200 nm variieren [73]. Zhang et al. beschreiben hingegen, dass Alginat bei den pH-Werten fünf bis sieben förmlich seine Poren öffnet [74]. Im Magen liegt das Alginat in saurer Umgebung vor. Dadurch werden die Carboxylgruppen protoniert d. h., dass das Alginat unlöslich wird und seine Hydrophobie erhöht. Gelangt das Alginat in neutrale oder basische wässrige Lösungen, wie z. B. im Darm, erfolgt eine Deprotonierung der Carboxylgruppen und das Alginat ist löslich und kann den transportierten Wirkstoff freisetzen. Das macht Alginat zu einem optimalen Visikel für orale Applikationen [75].

Publiziert ist die Alginatverwendung bei der Verkapselung von embryonalen Stammzellen, um Suspensionskulturen zu ermöglichen [76] oder Stammzellen über Peptide bzw. Proteine an Alginat-Hydrogele zu binden [77]. Ebenso findet Alginat Verwendung zur Verkapselung von *Lactobacillus helveticus* und *Lactobacillus delbrueckii* [78]. Alginat-Hydrogele sind für verschiedene Anwendungen beschrieben [79] [80] [81] [82] [83].

Alginat kann für die Verkapselung von Medikamenten auch mit weiteren Trägermaterialien kombiniert werden. Saravanan et al. beschrieb 2010 Verkapselungsversuche von Metronidazol Hydrochlorid (ein Antibiotikum), Diclofenac-Natrium (ein Nichtopioides Analgetikum) und Indomethacin (ein Analgetikum der Nichtsteroidalen Antirheumatika) mit einer Mischung aus Alginat und Gelatine, sowie Pektin und Gelatine [84].

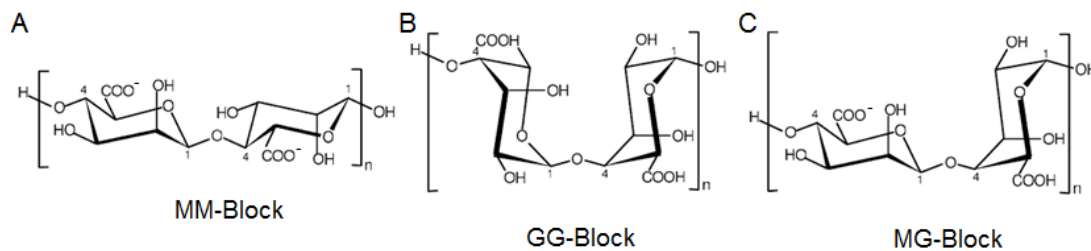


Abbildung 9: Alginat besteht aus Mannuronsäure (M) und Guluronsäure (G), diese Saccharide liegen als Blöcke vor. A: Mannuronsäure-Block, B: Guluronsäureblock und C: Mannuronsäure-Guluronsäure-Block [85]. Das in dieser Arbeit verwendete Alginat stammt aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum* und besitzt eine molare Masse von 351,7 kDa.

Das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Englisch im Centrum Industrielle Biotechnologie (CIB) der Fachhochschule Lübeck hergestellte Alginat aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum* besitzt eine molare Masse von 351,7 kDa. Dieses Polysaccharid ist aus den Monosacchariden Guluronsäure und Mannuronsäure aufgebaut, welche in Paley-Puffer bei pH = 6,8 negativ geladen sind. Der pKa-Wert von Mannuronsäure liegt bei 3,38 und der pKa-Wert von Guluronsäure liegt bei 3,65 [85].

Morris et al. [86] und Thom et al. [87] beschrieben bereits in der 1980er Jahren die Zusammensetzung des Alginats aus *Ascophyllum nodosum* mit 21 % Polyguluronat, 41 % gemischter Sequenz und 38 % Polymannuronat.

Pektin

Citruspektine in Kombination mit Peptiden finden in der Agrarindustrie Anwendung [88]. Allgemein ist Pektin ein Nahrungsmittelbestandteil. Pektin findet in der Nahrungsmittellindustrie Verwendung als Emulgator, Gelier- und Stabilisierungsmittel. Es wird Marmelade, Gellee, Fruchtsäften, Molkereiprodukten aber auch Desserts und Backzubereitungen zugesetzt [89]. In der Pharma- und Kosmetikindustrie findet dieses Polysaccharid ebenfalls Anwendung, sowie in der Enzymimmobilisierung [89].

Citruspektine sind in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet. Diese besitzen eine deutlich heterogene Hauptkette als Zuckerrübenpektine, deshalb werden die Zuckerrübenpektine für pharmakologische Anwendungen bevorzugt.

Pektine sind für Versuche als Darmspezifisches Vesikel für die Freisetzung von Medikamenten beschrieben [90] [91] [92].

Pektin wurde bereits unmodifiziert, modifiziert und in Verbindung mit anderen Polysacchariden für den Wirkstofftransport untersucht. Denn Pektin ist in der Lage sowohl als Trägermatrix, oder als Vesikel zu fungieren [92]. Durch die Kombination aus Pektin mit einem weiteren Polysaccharid kann die Medikamentenfreisetzung je nach Umgebungseinflüssen angepasst werden [92] [93].

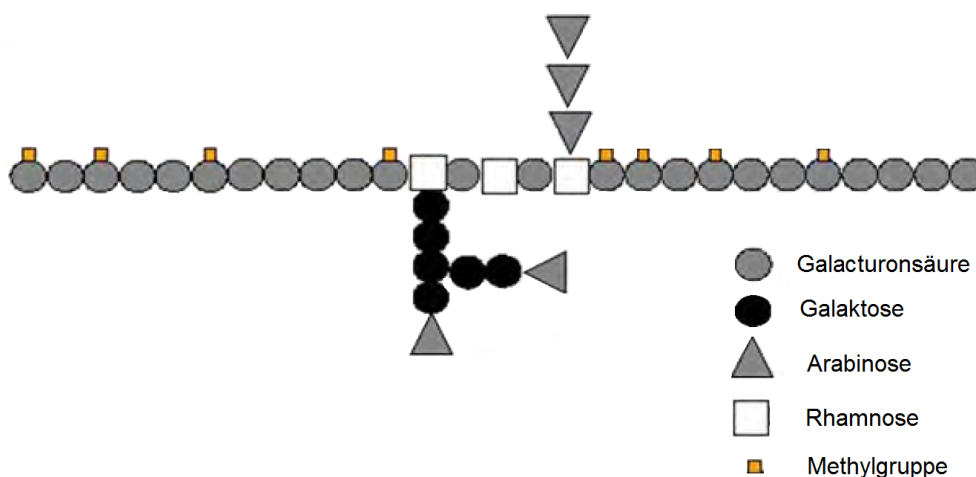


Abbildung 10: Pektin besteht aus Galacturonsäure, Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Methylgruppen an Galacturonsäure [94]. Das in dieser Arbeit verwendete Pektin stammt aus der Zuckerrübe *Beta vulgaris* und besitzt eine molare Masse von 621,3 kDa.

Das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Englisch im Centrum Industrielle Biotechnologie (CIB) der Fachhochschule Lübeck hergestellte Pektin aus der Zuckerrübe *Beta vulgaris* besteht aus Galacturonsäure, Galaktose, Arabinose und Rhamnose. Die einzelnen Saccharide besitzen die folgenden pKa-Werte: D-Galacturonsäure pKa = 3,51 [95], D-Galaktose pKa = 12,35 [96], D-Arabinose pKa = 12,34 [97] und L-Rhamnose pKa = 11,84 [98]. Das Pektin besteht zu 61 % aus Galacturonsäure. Diese ist in Paley-Puffer bei pH = 6,8 negativ geladen. Bei Pektin handelt es sich im Gegensatz zu Alginat um ein verzweigtes Polysaccharid mit einer molaren Masse von 621,3 kDa.

Chitosan

Chitosan ist in der Lage mit Proteinen oder Peptiden Hydrogele zu bilden, welche für den Wirkstofftransport eingesetzt werden können [99]. Ebenso kann Chitosan für den Transport von Modellpeptiden verwendet werden [55] [57] [100] [101] [102].

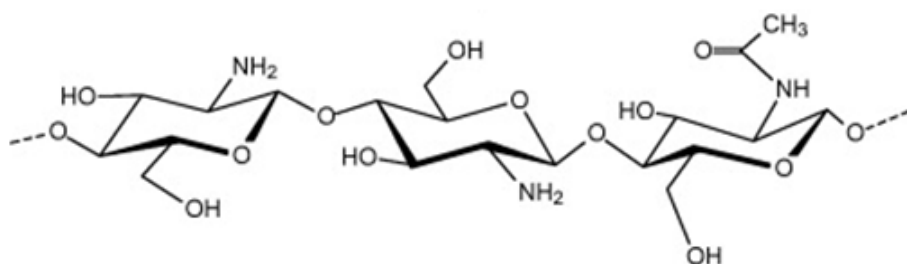


Abbildung 11: Chitosan besteht aus D-Glucosamin [103]. Bei dem in dieser Arbeit verwendet Chitosan handelt es sich um Chitopharm S, welches eine molare Masse von 84 kDa besitzt.

Das D-Glucosamin hat einen pKa-Wert von 7,58 [104]. Zur Bestimmung der molaren Masse des Chitosans wurde dieses in Acetat-Puffer pH = 4,8 gelöst. Bei diesem pH-Wert ist das D-Glucosamin positiv geladen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Chitosan handelt es sich um Chitopharm S, welches eine molare Masse von 84 kDa besitzt.

Mögliche Wechselwirkungen zwischen Anitimikrobiellen Peptiden und Polysacchariden

Doch wie kommt es, dass sich Komplexe zwischen Polysacchariden und AMPs bilden? Bezüglich auf kationische AMPs gibt es Berichte über die Bindung an Alginat. *Pseudomonas aeruginosa* kann chronische Lungeninfektionen auslösen, welche durch die Überproduktion von Alginat erkennbar sind. Die AMPs sind in der Lage mit diesem, von den Bakterien produzierten, Alginat in Wechselwirkungen zu treten. Toppazzini et al. beschreiben sowohl hydrophobe Effekte als auch ionische Wechselwirkungen zwischen AMPs und Alginat [105]. Solche ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Effekte kommen auch bei anderen Polysacchariden zum Tragen. Ein Beispiel dafür ist die Bindung eines antimikrobiellen Peptids an Poly(acrylsäure-co-acrylamid) [106].

Das SALP Peptid 19-2.5 ist ebenfalls ein kationisches Peptid. Zwischen diesem Peptid und den verschiedenen Polysacchariden könnte es ebenfalls zu ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten kommen.

2 Problemstellung

Auf der Wirkstoffsuche zur Behandlung von Infektionskrankheiten und der durch Bakterien ausgelösten Sepsis, besteht eine Möglichkeit darin, antimikrobielle Peptide zu verwenden. Problematisch ist jedoch die geringe Halbwertszeit von Peptiden *in vivo* [49]. Die Verabreichung von Peptid 19-2.5 verläuft bislang versuchsweise intravenös [42] und perkutan [107]. Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf der Behandlung von Darmerkrankungen mittels synthetisch hergestellter Lipopolysaccharid bindenden Peptide. Anhand des kationischen Peptids 19-2.5 ist die Stabilisierung von Peptiden mit Polysacchariden zu untersuchen, um das Peptid nach oraler Applikation vor pH-Einflüssen, varrierenden Salzkonzentrationen und der bereits beschriebenen enzymatischen Abbaubarkeit [46] zu schützen. Angestrebt ist eine Freisetzung des Peptids im Darm.

Die Arbeitshypothese stützt sich darauf, dass die Polyanionen Alginate und Pektin in der Lage sein sollten ionische Wechselwirkungen mit dem kationischen Peptid einzugehen. Chitosan hingegen sollte nicht in der Lage sein über ionische Wechselwirkungen mit dem Peptid zu interagieren und als Negativkontrolle fungieren. Zusätzlich sind diese Polysaccharide in der Lage Hydrogele zu bilden, welche das Peptid auf dem Transport zu seinem Wirkort vor Umgebungseinflüssen schützen sollten.

Zu Beginn der Arbeit werden die molare Masse, Polydispersität und intrinsische Viskosität der verwendeten Polysaccharide mittels Gelpermeationschromatographie mit Dreifachdetektion bestimmt. Ebenfalls wird Peptid 19-2.5 mittels Circular Dichroismus Spektroskopie auf die Ausbildung und mögliche Veränderung einer Sekundärstruktur durch bestimmte Umwelteinflüsse untersucht.

Anschließend erfolgen Versuche zu Bindungsexperimenten mit dem Peptid und den verschiedenen Polysacchariden. Das molare Verhältnis und die Anzahl der an der Komplexbildung beteiligten Moleküle sind mittels Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), Fluoreszenzdetektion und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zu ermitteln.

Die entstandenen Komplexe sind mittels verschiedener Spektroskopischer Methoden und Rasterkraftmikroskopie (AFM) auf ihre Größe zu untersuchen.

Es folgt die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Polysaccharid und Peptid, dem verwendeten Fluoreszenzmarker und dem Peptid bzw. den Polysacchariden. Für diese Analyse werden Fluoreszenzspektren, ITC, FCS, Photonen-Zähl-Histogramme, Fluoreszenzlebenszeit- und Anisotropie-Messungen herangezogen.

Nach der Charakterisierung der entstandenen Komplexe, folgen Freisetzungversuche des Peptids aus dem jeweiligen Polysaccharid. Zu betrachten sind die Freisetzung bei verschiedenen pH-Werten, der Einfluss nichtionischer Tenside auf die Partikel und das Verhalten der Partikel in einem simulierten Magen-Darm-Trakt. Das freigesetzte Peptid und mögliche Fragmente sind mittels Trennung dieser über eine C_{18} -Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion nachweisbar.

Abschließend ist die *in vitro* Wirksamkeit der Polysaccharid-Peptid-Komplexe mit Hilfe eines Zellstimulations Experiments zu ermitteln.

3 Experimenteller Teil

3.1 Theoretischer Hintergrund der Methoden

An dieser Stelle soll der theoretische Hintergrund einiger verwendeter Methoden genauer beleuchtet werden.

3.1.1 Gelpermeationschromatographie mit Dreifachdetektion

Vor der Verwendung der Polysaccharide sollen diese mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Dreifachdetektion charakterisiert werden. Diese Charakterisierung von Alginate, Pektin und Chitosan beinhaltet die Ermittlung der molaren Masse, der Polydispersität, den hydrodynamischen Radius und der intrinsischen Viskosität. Das Trennprinzip dieser Größenausschlusschromatographie ist in der Literatur hinreichend beschrieben [108].

Die Detektion erfolgt über einen Lichtstreuendetektor, einen Viskositätsdetektor und einen Brechungsindex- (RI) oder UV-Detektor. Eine Kombination der Detektoren ermöglicht mit dieser Methode eine Aussage über die absolute Molmasse, die molekulare Größe, die Grenzviskosität, eine Information über die makromolekulare Struktur, die Konformation, die Aggregation und die Verzweigung zu treffen [109].

3.1.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Eine Methode zum Nachweis einer Bindungsbildung und zur Charakterisierung einer entstandenen Polysaccharid-Peptid-Bindung ist die Isotherme Titrations Kalorimetrie (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC). Dabei handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung der thermodynamischen Charakterisierung der Bindung. Eine chemische Modifikation der Bindungspartner ist dabei nicht notwendig. Die Grundvoraussetzung für die Messung ist, dass die Substanzen in Puffer gelöst vorliegen [110] [111].

Häufig Verwendung findet die ITC bei der Messung von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Biomolekülen in wässrigen Medien. Durch chemische oder physikalische Reaktionen kommt es zu einer Enthalpieänderung welche in Form von Wärmeenergie freigesetzt oder absorbiert wird. Mit dieser Methode ist es möglich Makromolekül-Ligand-Interaktionen zu untersuchen. Bindungs- und Verteilungskurven sind aufnehmbar [111] [112].

Die Homogenität der Probe und eine geringe Zeit zur Einstellung eines Gleichgewichts sind durch ständiges Rühren während der Messung gewährleistet. Damit ist bereits nach einer Messung ein thermodynamisches Profil erkennbar [113].

Neben der Bindung zwischen zwei Reaktionspartnern ist es möglich mit der ITC die Kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) zu bestimmen [114].

Die Messung der Reaktionsenthalpie ΔH geht auf den ersten Hauptsatz der Thermodynamik zurück, welcher in diversen Literaturstellen nachzulesen ist [115] [116] [117].

Auf molekularer Ebene unterstützen zwei Effekte die Tendenz zu geringerer Gibbsenergie: Zum einen erhält die Enthalpieänderung ΔH ein negatives Vorzeichen unter Bindungsbildung [118]. Zum anderen ist die Brown'sche Molekularbewegung in der Lage Bindungen zu stören, daraus resultiert eine positive Entropieänderung [119].

Ein ITC-Experiment gibt Aufschluss über die Enthalpieänderung, die Gleichgewichtskonstante (bis 10^9 1/mol) und die Reaktionsstöchiometrie [120].

Die Auswertung der ITC ist unter Abschnitt 3.3.12 genauer beschrieben.

Das Prinzip der Isotherme Titrations Kalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie wird mit Hilfe einer isothermen Titrationskammer durchgeführt, mit welcher ausschließlich die durch eine Bindung entstehende Energiezunahme oder -abnahme gemessen werden kann. Das Gerät zur Bestimmung einer solchen Bindungsenergie hält die Temperatur in Mess- und Referenzzelle identisch. Jede Temperaturveränderung in der Messzelle wird sofort mit der Zu- oder Abnahme eines konstanten Stroms in der Referenzzelle kompensiert (engl. *Current feedback*). Somit lässt sich die Enthalpieänderung als Differenzstrom angeben [110].

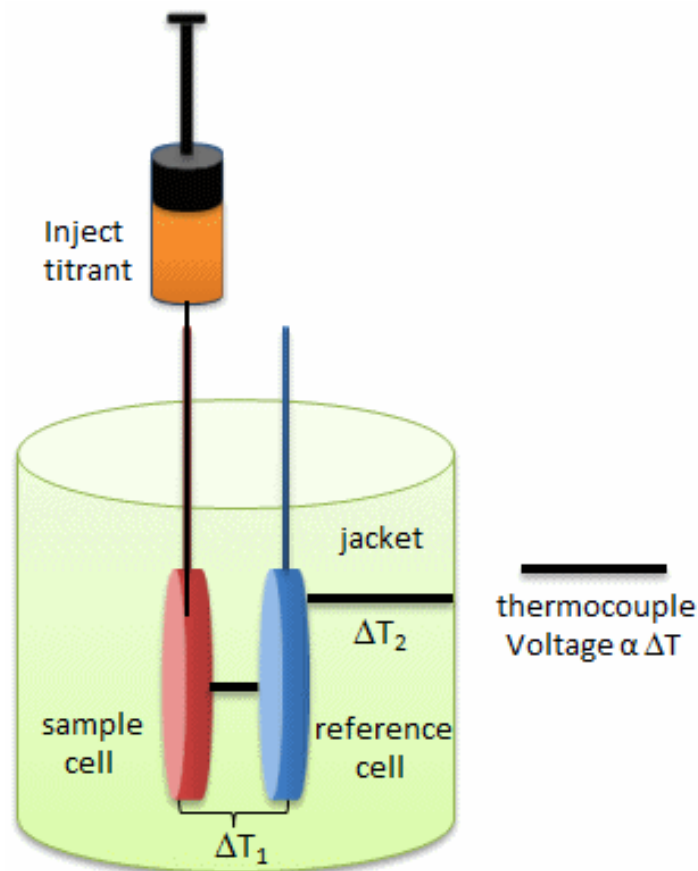


Abbildung 12: Geräteaufbau ITC Quelle: Jakubowski [121]. Dargestellt sind Mess- und Referenzzelle. In die Messzelle wird unter ständigem Rühren der Injektant titriert. Das ganze Experiment erfolgt unter isothermen Bedingungen. Der durch die Reaktion entstehende Temperaturunterschied wird durch Stromänderungen kompensiert.

Die zwei Substanzen, die miteinander reagieren sollen, befindet sich zu Beginn des Experiments getrennt voneinander in der Injektionsnadel und in der Messzelle (siehe Abb. 12). Die Substanz aus der Nadel gelangt langsam unter Rühren und in 1,5 μL Schritten in die Messzelle.

Es folgt eine algorithmische Auswertung der Daten, welche automatisch vonstatten geht.

Die Theorie der Isotherme Titrations Kalorimetrie

Die Gesamtwärme kann wie folgt beschrieben werden:

$$Q = \frac{n[P] * \Delta H * V_0}{2} \left(\left(1 + \frac{[L] + K_d}{n[P]} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{[L] + K_d}{n[P]} \right) - \frac{4[L]}{n[P]}} \right) \quad (1)$$

Diese Darstellung der Gesamtwärmeaufnahme oder -abgabe, ist für die gegebenen Parameter von K_d , n und ΔH aufzulösen. Dafür sind die Daten zu fitten. Eine Fit-Funktion ist für jede einzelne Injektion durchzuführen. Am Ende kommt es zur Aufsummierung der verschiedenen Fit-Funktionen. Dabei ist die Volumenkorrektur nicht zu vernachlässigen. Die Ableitung dieser Gleichung beschreibt die Änderung von Q in einem System mit einer einzelnen Bindungsstelle. Auch andere Bindungsstöchiometrien sind messbar, aber ebenfalls mit $n = 1$ zu fitten [110].

3.1.3 Lichtstreuung

Die Partikelgröße ist ein wichtiger Parameter für die Verteilung und Wirksamkeit von Wirkstoffen. Diese kann mittels verschiedener Streulichtmethoden ermittelt werden. Zurück geht dieses Messprinzip auf Tyndall [122], welcher 1869 beschrieb, dass Materialien Licht absorbieren oder streuen. Die erste Größenbestimmung von Partikeln wurde 1972 mittels Lichtstreuung von Lee beschrieben [123].

Heute findet Dynamische Lichtstreuung (DLS), welche in der Literatur auch die Bezeichnung Photonenkorrelationsspektroskopie oder Quasielastische Lichtstreuung trägt, Verwendung [124]. Das von den zu untersuchenden Partikeln gestreute Licht wird mit Hilfe eines Photodetektors aufgenommen. Die Bewegung der Partikel ist dabei durch die Brown'sche Molekularbewegung bestimmt [118] [125] [126]. Vom Detektor wird ein Muster des Streulichts aufgenommen. Die Rate der Änderung des Streulichts resultiert aus der Bewegung der Partikel.

Ein schematischer Messaufbau der DLS ist in Abbildung 13 dargestellt.

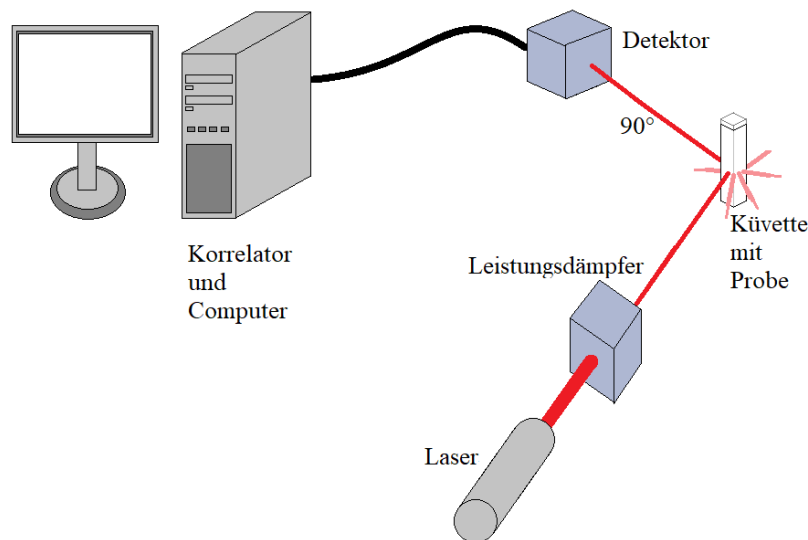


Abbildung 13: Geräteaufbau DLS abgezeichnet aus dem Zetasizer Nano Series user manual [125]. Der Laser wird in einem Dämpfer abgeschwächt. Anschließend trifft dieser auf die in der Küvette enthaltenen Probe. In der Küvette diffundieren die Partikel durch den Laserstrahl. Licht, welches im 90° Winkel gestreut wird, gelangt zu Detektor und wird in ein elektrisches Signal umgewandelt. Es folgt die Korrelation im Korrelator und die Ausgabe der aufgenommenen Daten über einen Computer.

Das Licht wird von der Probe in alle Richtungen gestreut. Licht, welches in einem 90° Winkel gestreut wird, gelangt zum Detektor. Der digitale Korrelator misst die Übereinstimmung zweier, mit einem Zeitabstand von δt , nacheinander detektierter Signalen. Dabei ist die Intensität eines Signals zum Zeitpunkt t und die Intensität zu einem etwas späteren Zeitpunkt $(t+\delta t)$ zu vergleichen. Liegen die zu vergleichenden Signale zeitlich dicht beieinander, lassen sie sich korrelieren. Je länger der zeitliche Abstand zwischen den zu vergleichenden Signalen ist, desto weniger stehen die Signale in einem Verhältnis zueinander und die Übereinstimmung der Signale geht gegen Null. Die Zeitschritte δt , zu denen die aufgenommenen Intensitäten miteinander verglichen werden, befinden sich in der Größenordnung zwischen ns und μs [125].

Die Frequenz der Fluktuation des gestreuten Lichts kommt durch die Diffusion der Partikel durch den Laserstrahl zu stande. Die Diffusionsrate ist wiederum von der Partikelgröße, der Viskosität des Lösungsmittels und der Temperatur abhängig [127]. Die resultierende Intensitätsfluktuation kommt durch konstruktive und destruktive Interferenz zustande [125] [128].

Die Lichtstreuung wird verwendet, um die molare Masse und Form von Polymeren in Lösung zu bestimmen [109]. Neben der Streulichtmessung in der GPC Detektion findet dynamische Lichtstreuung (DLS) in dieser Arbeit Verwendung. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Zetasizer können Partikelgrößen zwischen $0,6 \text{ nm}$ und $3 \mu\text{m}$ bestimmt werden [129].

In der vorliegenden Arbeit findet neben der DLS auch eine Erweiterung der DLS, die Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (engl. *Photon-Cross-Correlation-Spectroscopy*, PC-CS) Verwendung. Darunter ist ein mit der DLS vergleichbarer Messaufbau zu verstehen. Der Unterschied liegt in der Verwendung von zwei Lasern. Die Signale der beiden Laser lassen sich durch Kreuzkorrelation zu einem Ergebnis zusammenfassen. Bei dem Geräteaufbau müssen die Streuvektoren und das Streuvolumen identisch sein. Das Hintergrundrauschen der beiden Laser ist unterschiedlich, somit wirkt die Korrelation von zwei Ergebnissen wie ein Filter. Dieser filtert das gestreute Licht aus dem Hintergrundrauschen heraus. Daraus resultiert ein deutlich verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. Ebenfalls sind Mehrfachstreuungen mit dieser Methode vermeidbar [130].

3.1.4 Fluoreszenz

Das verwendete Peptid enthält drei Tryptophane, welche fluoreszieren können. Zusätzlich kann das Peptid fluoreszenzmarkiert werden. Diese fluoreszenzmarkierten Peptide werden zur Bestimmung des molaren Bindungsverhältnisses, sowie der Bindungscharakterisierung zwischen Polysaccharid und Peptid und der Bestimmung der Partikelgröße genutzt. Die Tryptophanfluoreszenz wird in einer weiteren Methode ebenfalls für die Ermittlung des Bindungsverhältnisses und den Nachweis von ungebundenem Peptid verwendet. In diesem Unterkapitel werden einige grundlegende physikalische Hintergründe zur Fluoreszenz beschrieben.

Elektronische Übergänge, werden in der Literatur über das Jablonski-Diagramm (Abbildung 14) beschrieben [131] [132].

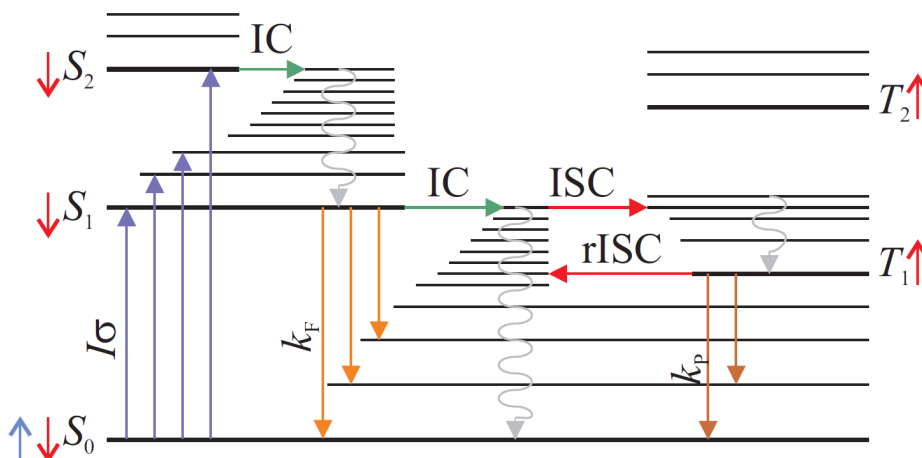


Abbildung 14: Jablonski-Diagramm Quelle: Kahra [133]. Das Jablonski-Diagramm zeigt die Anregung eines Moleküls durch Licht seiner Anregungswellenlänge. Dadurch gelangen Elektronen vom Grundzustand (S_0) in energetisch höher liegende Molekülorbitale (S_1 und S_2). Aus einem angeregten Zustand können die Elektronen über interne Konversion (IC) in einen anderen angeregten Zustand übergehen, der Übergang in den Triplett-Zustand (T_1) ist über Interkombination (ISC) ebenfalls möglich. Von einem angeregten Zustand relaxieren die Elektronen unter Emission von Fluoreszenz in den Grundzustand. Vom Triplett-Zustand gelangen die Elektronen unter Emission von Phosphoreszenz zurück in den Grundzustand.

Elektronische Übergänge beruhen auf der Eigenschaft von Molekülen, Energie in Form von Licht ihrer Anregungswellenlänge zu absorbieren. Wird von einem Molekül Licht in dessen Anregungswellenlänge absorbiert, gelangen die Elektronen von besetzten in energetisch höher liegende unbesetzte Molekülorbitale. Solche Elektronenübergänge können nach dem Frank-Condon-Prinzip nur vertikal vonstatten gehen. Die Relaxation der Elektronen in einen Grundzustand (S_0) kann durch verschiedene unimolekulare Prozesse erfolgen. Solche unimolekularen Prozesse können Emission von Strahlung in Form von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, den Übergang in Bewegungsenergie, photochemische Reaktion oder Energietransfer sein. Durch die Abgabe der aufgenommenen Energie gelangt ein Molekül zurück in seinen Ausgangszustand, den Grundzustand (S_0) [131] [132].

Das Jablonski-Diagramm (Abbildung 14) soll hier am Beispiel eines Fluorophors genauer erläutert werden. Die meisten organischen Moleküle, und somit auch viele der häufig verwendeten Fluorophore, besitzen eine gerade Anzahl an Elektronen. Daraus folgt, dass es im Grundzustand nur besetzte und unbesetzte Orbitale gibt. Der Singulett-Zustand (S) eines Moleküls beschreibt den Zustand, in dem die Summe der Elektronenspins Null beträgt $S = \sum m_s$. Die Spinmultiplizität ist in diesem Fall wie folgt beschrieben:

$$M = 2S + 1 = 2 \cdot 0 + 1 = 1.$$

Das Absorptionsspektrum zeigt Banden bei Wellenlängen, welche vom Fluorophor absorbiert werden. Diese Banden spiegeln die Anregung in angeregte Zustände im Jablonski-Diagramm wieder. Nach dem Frank-Codon-Prinzip entspricht das Absorptionsmaximum dem Energieniveau des angeregten Zustands, welches mit der höchsten Wahrscheinlichkeit besetzt wird. Aus einem im Grundzustand angeregten Molekül gelangen die Elektronen in ein energetisch höher liegendes Orbital. Im angeregten Zustand kann es zur internen Konversion (engl. *internal conversion*, IC) kommen. Diese beschreibt strahlungslose Energieübergänge zwischen den angeregten Singulett-Zuständen S_1 und S_2 bzw. S_1 und S_0 .

Zusätzlich kann es zu Interkombination (engl. *intersystem crossing*, ISC) kommen, dem strahlungslosen Übergang von einem angeregten Singulett-Zustand (S_1) in den Triplett-Zustand (T_1). Dabei kommt es zu einer Spinumkehr des angeregten Elektrons, ein Prozess, der ohne weitere Wechselwirkung gegen den Drehimpuls-Erhaltungssatz verstoßen würde und nur durch Spin Bahn Wechselwirkung ermöglicht wird. Ändert sich der Spin, kommt es zu einem Triplett-Zustand (T), welcher durch die Spinmultiplizität $M = 2S + 1 = 2 \cdot 1 + 1 = 3$ zu beschreiben ist [131].

Phosphoreszenz entsteht mit der Energiedifferenz, mit der die Elektronen vom Triplett-Zustand zurück in den Singulett-Grundzustand fallen [131].

Das Emissionsspektrum entspricht dem Übergang vom S_1 in den S_0 Zustand. Die Stokes-Verschiebung sorgt für die Emission von energieärmerem Licht im Vergleich zum absorbierten Licht. Die Energie des emittierten Lichtquants entspricht der Energiedifferenz der Singulett-Zustände. Dieses Lichtquant ist als Fluoreszenz sichtbar.

Die Fluoreszenzlebensdauer (engl. *Lifetime*) und die Quantenausbeute sind charakteristische Eigenschaften von Fluorophoren. Die Fluoreszenzlebensdauer liegt meistens zwischen 10^{-7} s und 10^{-9} s [132] [134].

Die Quantenausbeute ist durch die Anzahl der emittierten Photonen relativ zu den absorbierten Photonen anzugeben. Die Rate, mit der die Elektronen vom S_1 -Zustand in den Grundzustand zurückkehren beschreibt die Fluoreszenzlebensdauer. Die Fluoreszenzlebensdauer ist als die Zeit zu verstehen, in der das Fluorophor mit seiner Umgebung interagieren kann [132] [134].

Die Fluoreszenzlebensdauer τ der Probe kann durch Anregung mit kurzen Laserpulsen (Pulsdauer deutlich kleiner als die Lebensdauer) gemessen werden. Der negative Kehrwert der Steigung, in einem Diagramm in dem der Logarithmus der Intensität ($\log I(t)$) gegen die Zeit (t) aufzutragen ist, beschreibt die Fluoreszenzlebensdauer. Genauer ist allerdings eine nichtlineare Kurvenanpassung (engl. *Fit*). Der Polarisator misst eine solche Intensitätsabnahme, welcher auf den sogenannten magischen Winkel, einen Winkel von $54,7^\circ$ zur z-Achse eingestellt ist [132] [135]. Die Anfangskonzentration (n_0) wird in einen angeregten Zustand überführt. Die angeregte Konzentration n fällt mit einer Rate von $\Gamma + k_{nr}$ und lässt sich über Gleichung 2 beschreiben, die sich aus Γ der Emissionsrate und K_{nr} der strahlungslosen Zerfallsrate zusammensetzt:

$$\frac{dn(t)}{dt} = (\Gamma + k_{nr}) \cdot n(t) \quad (2)$$

Die Anzahl der angeregten Moleküle zum Zeitpunkt t ist $n(t)$. Die Emission ist zwar ein zufälliges Ereignis, jedoch hat jedes angeregte Fluorophor die gleiche Wahrscheinlichkeit, Licht in einer bestimmten Zeit zu emittieren. Es resultiert ein exponentieller Zerfall des angeregten Stadiums, gemäß:

$$n(t) = n_0 \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (3)$$

Allerdings kann die Anzahl der angeregten Moleküle nicht detektiert werden. Stattdessen wird die Fluoreszenzintensität $I(t)$ detektiert, welche proportional zu $n(t)$ ist.

Daher ist Gleichung 3 wie folgt zu beschreiben:

$$I(t) = I_0 \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (4)$$

Wobei I_0 die Intensität zur Zeit $t=0$ und der Kehrwert der Gesamtzerfallsrate ist.

$$\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1} \quad (5)$$

Alle Prozesse, die zu einer Entleerung des angeregten Zustandes S_1 führen, verkürzen die gemessene Fluoreszenzlebensdauer τ , also auch Energietransfer oder *Quenching*.

Quenching ist die englische Bezeichnung der Abnahme von Fluoreszenzintensität, welche auch die Bezeichnung Fluoreszenzlöschung trägt. Dieser Effekt kann verschiedene Gründe haben. Möglich wären Reaktionen im angeregten Zustand, Neuordnung der Moleküle,

Energietransfer, Komplexbildung im Grundzustand und Stöße zwischen angeregten und quencheden Molekülen [132].

Die Unterscheidung zwischen statischem und dynamischem *Quenching* wird anhand der Fluoreszenzlebensdauer getroffen. Bei statischem *Quenching* verändert sich die Fluoreszenzlebensdauer zusammen mit der eingesetzten Konzentration des *Quenchers* nicht, allerdings die Intensität, da nur ungebundene Fluorophore detektiert werden. Bei dynamischem *Quenching* hingegen verändert sich die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors [136].

Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt *Quenching* durch Stöße [132]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (6)$$

K ist die Stern-Volmer *Quenching*konstante, k_q die bimolekulare *Quenching*konstante, τ_0 die ungequenchte Lebensdauer und $[Q]$ ist die Konzentration des *Quenchers*.

Statisches *Quenching* kann Informationen zu einer Bindung zwischen Fluorophor und *Quencher* liefern, während sich über dynamisches *Quenching* die Diffusionsrate des *Quenchers* oder die Rate des Energietransfers bestimmen lässt. Diese ist allerdings abhängig vom Volumen und dem Abstand der Fluorophore in der Lösung. Der Raum in dem ein *Quencher* durch die Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustands (τ) diffundieren kann, ist über den quadratischen Mittelwert des Abstands, in Gleichung 7 gegeben [132]:

$$\sqrt{x^2} = \sqrt{2D\tau} \quad (7)$$

Wobei τ die Fluoreszenzlebensdauer und D der Diffusionskoeffizient ist [132].

Statisches *Quenching* führt zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums [132]. Das Absorptionsspektrum eines Stoffes verändert sich wiederum zusammen mit der Gesamtelektronenverteilung. Eine solche resultiert beispielsweise aus einer Komplexbildung eines Fluorophors mit einer kleinen aromatischen Komponente, die über hydrophobe Wechselwirkungen oder konjugierte π -Systeme verläuft [137].

Kommt es zu einer Komplexbildung zwischen einem Fluorophor und Proteinen oder Peptiden kann es zu Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und der Aminosäure Tryptophan kommen. Bei solchen Wechselwirkungen fungiert Tryptophan als Elektronen-Donor. Liegen Elektronen-Donor und -Akzeptor nahe beieinander (Van-der-Waals-Wechselwirkungen) ist ein Photoinduzierter Elektronentransfer möglich. Somit kann *Quenching* in Zusammenhang mit einer Rotverschiebung im Absorptionsspektrum auf Konformitätsänderungen in Makromolekülen hinweisen [137].

Oftmals kommt es zu einer Kombination aus dynamischem und statischem *Quenching*.

Die Fluoreszenzanisotropie gibt Aufschlüsse über Größe und Form von Proteinen. Anisotropiemessungen basieren auf der photosensitiven Anregung von Fluorophoren durch polarisiertes Licht. In einer Lösung liegen die Fluorophore ungeordnet vor. Werden sie durch polarisiertes Licht angeregt, kommt es zu einer selektiven Anregung parallel zur Polarisation orientierten Moleküle. Daraus resultiert eine partiell polarisierte Emission, die durch die Anisotropie r quantifiziert wird:

$$r = \frac{I_{\parallel}(t) + I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (8)$$

Für Anisotropiemessungen steht der Analysator relativ zum Polarisator abwechselnd aufrecht (\perp) und parallel (\parallel) zueinander. Die Rotation nach Anregung reduziert die Anisotropie, so dass eine zeitaufgelöste Messung der Anisotropie Information über die Geschwindigkeit der Rotationsdiffusion und damit über die Molekülgröße liefert. In Lösung rotieren die meisten Fluorophore innerhalb von 50 bis 100 ps. Daher können die Moleküle in einem Zeitraum von 1-10 ns oft rotieren. Je größer die Moleküle, desto langsamer die Rotation und um so höher ist die Anisotropie [132].

Der Anisotropie Abfall wird von folgenden Faktoren beeinflusst: der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Rotationsdiffusion, die Fluoreszenzlebensdauer, der Viskosität des Lösungsmittels und der dreidimensionalen Struktur des fluoreszierenden Moleküles [132].

Die Emissionsspektren können einen Hinweis darauf liefern, ob die angeregten Elektronen im S_1 Zustand einen Übergang in höhere Schwingungsniveaus erfahren. Der Kern verändert in dieser kurzen Zeit seine Position nicht. Ein solcher Übergang ist durch eine Rotverschiebung (Bathochromie) der Emissionsbanden gegenüber den Absorptionsbanden messbar.

Polare Lösungsmittel können ebenfalls mit dem Fluorophor wechselwirken. Die Absorption verläuft dabei so schnell ($< 10^{-15}$ s), dass sich das Lösungsmittel nicht umorientiert. Bei dem Singulett-Zustand S_1 hat das Lösungsmittel genügend Zeit sich zu günstigeren Wechselwirkungen umzuorientieren. Absorptions- und Emissionsbanden können sich überlappen, wodurch das Fluorophor Photonen reabsorbieren kann. Diese Eigenschaft hat ebenfalls eine Rotverschiebung des Bandenschwerpunkts zur Folge [134].

3.1.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. *Fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) ist eine der in dieser Arbeit angewendeten Methoden um das Bindungsverhältnis, sowie den Diffusionskoeffizienten und darüber den hydrodynamischen Radius der Polysaccharid-Peptid-Komplexe zu bestimmen. Diese Methode geht auf Fluktuationmessungen zurück. Solche sind von Partikeln mit einem Durchmesser $< 1 \mu\text{m}$ seit der Erfindung des Ultramikroskops Anfang des 19. Jahrhunderts möglich [138].

Das erste Mal erwähnten Elson [139] und Magde et al. [140] Fluoreszenzkorrelationspek-

roskopie in den frühen 1970er Jahren. Der Durchbruch dieser Methode kam etwa 20 Jahre später mit der Entwicklung des Avalanche Photodiode (APD) Detektors, stabilen Lasern, Multiphotonenanregung und kommerziell erhältlichen Geräten [132]. Als großer Fortschritt erwies sich dabei die Nutzung des konfokalen Prinzips.

FCS detektiert wenige, bis hin zu einzelnen Molekülen in einer Lösung. Im Gegensatz zu Einzelmolekülnachweisen ist die Detektion nur möglich, wenn sich die Moleküle in Lösung befinden. Dabei bewegen sich die Moleküle durch ein spezielles Beobachtungsvolumen, welches über eine gewisse Zeit zu analysieren ist. Sowohl translationale Diffusion, als auch Rotationsdiffusion, sind in verschiedenen Systemen messbar. Dazu gehören z.B. chemische Reaktionen, Triplett-Zustände, Kinetik und Protein-Ligand Wechselwirkungen [138]. Betrachtet werden Fluorophore, die in das Fokusvolumen diffundieren und dort durch multiple Anregungs-Emissions-Zyklen Photonen freisetzen. Der Diffusionskoeffizient der Fluorophore ist über die Zeit der Photonenfreisetzung im Fokusvolumen bestimmbar. Bei den eingesetzten Fluorophoren kommt es selten zum Photobleichen, allerdings ist ein Übergang der angeregten Elektronen in ein Triplett-Stadium wahrscheinlich [132].

Im Fall der reinen Translationsdiffusion ist die Anzahl der Moleküle im Beobachtungsvolumen und der Diffusionskoeffizient direkt aus der Autokorrelationsfunktion (AKF) zu ermitteln. Die Amplitude der Fluktuation ist durch die Verteilungswahrscheinlichkeit charakterisiert. Bei der Auswertung sind daher die möglichen Gründe für Intensitätsfluktuation zu berücksichtigen. Diese könnten Rotationsdiffusion, Intersystemübergänge, Ligand-Makromolekül-Bindung, Reaktionen im Anregungsstadium und intramolekulare Moleküldynamiken sein. Da meistens mindestens zwei Prozesse gleichzeitig die molekularen Bewegungen beeinflussen, ist es unerlässlich, das Beobachtungsvolumen exakt zu beschreiben. Denn alle auftretenden Prozesse sind in der Korrelationsfunktion zu berücksichtigen [132] [138].

Anwendungen findet die FCS in der Biochemie beispielsweise in Protein assoziierten Reaktionen, ebenso wie in dem Diffusionsnachweis gelabelter intrazellulärer Proteine und Immunoassays [132].

Das Prinzip der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Anregung der frei diffundierenden Moleküle in einer Lösung erfolgt mit einem Laser, wobei darauf zu achten ist, dass sich nur wenige Moleküle im Fokusvolumen befinden. Das konfokale Mikroskop zeichnet sich dadurch aus, dass eine punktförmige Lichtquelle Fluorophore in der Fokusebene anregt. Durch eine Lochblende, das so genannte *Pinhole* erfolgt die punktförmige Detektion dieser Fokusebene. Dabei wird das emittierte Licht auf das *Pinhole* fokussiert. Dieses konfokale *Pinhole* ermöglicht, dass nur die Signale aus dem Fokusvolumen zum Detektor gelangen. Das Licht aus unfokussierten Ebenen wird ausgeblendet. Das Beobachtungsvolumen wird näherungsweise als Ellipsoid beschrieben, welches mit der länglichen Seite in Richtung der optischen Achse liegt [132].

Die Fluorophore diffundieren zufällig durch das Fokusvolumen, somit kommt es zu einer Fluktuation der Moleküle im Fokusvolumen. Die FCS kann die daraus resultierende Intensitätsfluktuation der Fluorophore detektieren. Diese Intensitätsfluktuation und die Amplitude

kann über die Basis der FCS-Theorie Molekülinformationen liefern [132].

Diese FCS-Theorie basiert auf der Poissonstatistik für zufällige Ereignisse, welche in der Literatur ausführlich beschrieben ist [132].

Die Theorie der FCS

Aus dem FCS-Experiment resultiert der zeitaufgelöste Zerfall der Fluktuation, welchen die Autokorrelationsfunktion (AKF) beschreibt. Diese ergibt sich aus dem Produkt der Intensität zu einem bestimmten Zeitpunkt $F(0)$, welcher auf Null gesetzt wird, da die Verzögerungszeit τ immer relativ zu einem früheren Zeitpunkt und damit relevant ist [138]. Dabei beschreibt die Zeit hier immer die tatsächliche Zeit, zu der die jeweilige Intensität gemessen wurde. Die Zeit der Datenaufnahme kann zwischen Sekunden und Minuten variieren.

Die in der FCS zu Grunde liegende AKF ist wie folgt beschrieben [132]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (9)$$

Um FCS-Daten interpretieren zu können, ist ein theoretisches Modell vonnöten, welches die Fluktuation beschreibt. Aufgrund einer geringen Anzahl an Fluorophoren liefert die Anzahl an Photonen, die über eine bestimmte Zeit aufgenommen werden, die Daten für das Modell. Die Intensität hängt von der Anzahl an Photonen ab, die in einer bestimmten Zeit, von jedem Fluorophor detektiert wurden. Für die FCS wird herkömmlicher Weise der Parameter Helligkeit, auch *Brightness* B genannt, verwendet. Dieser wird wie folgt definiert:

$$B = q\sigma Q \quad (10)$$

Dabei entspricht q der Quantenausbeute für die Detektion der emittierten Photonen, σ der durchschnittlichen Absorption und Q der Quantenausbeute für die Emission des Fluorophors [132].

Die *Brightness* ist über die Anzahl an Photonen pro Fluorophor definiert, welche innerhalb von einer Sekunde für den gegebenen Satz an optischen Bedingungen detektiert werden. Die detektierte Intensität hängt von der räumlichen Verteilung der Moleküle, der Anregung, der Detektionseffizienz und der *Brightness* des Fluorophors ab. Daher ist die wahrgenommene Intensität vom angeregten und detektierten Volumen abhängig [132].

Der typische Aufbau eines FCS Instruments ist in Abbildung 15 dargestellt. Das Objektiv fokussiert den Laser auf das Fokusvolumen. Das emittierte Licht kann mit Hilfe eines dichromatischen Spiegels, über die Stokes-Verschiebung (engl. *Stokes Shift*), von dem Licht der Anregungswellenlänge getrennt werden. Über eine Linse und einen Emissions-Filter gelangt das emittierte Licht zu einem *Pinhole*, dessen Aufgabe es ist, emittiertes Licht, welches aus einem Bereich außerhalb des Fokusbereichs stammt, zu eliminieren. Ein Detektor, welcher einzelne Photonen detektiert und für jedes Photon ein elektrisches Signal generiert, ist nach dem *Pinhole* eingebaut. Ein Computer mit entsprechender Datenerfassungs-Software nimmt parallel die Photonendaten der Messung auf [141].

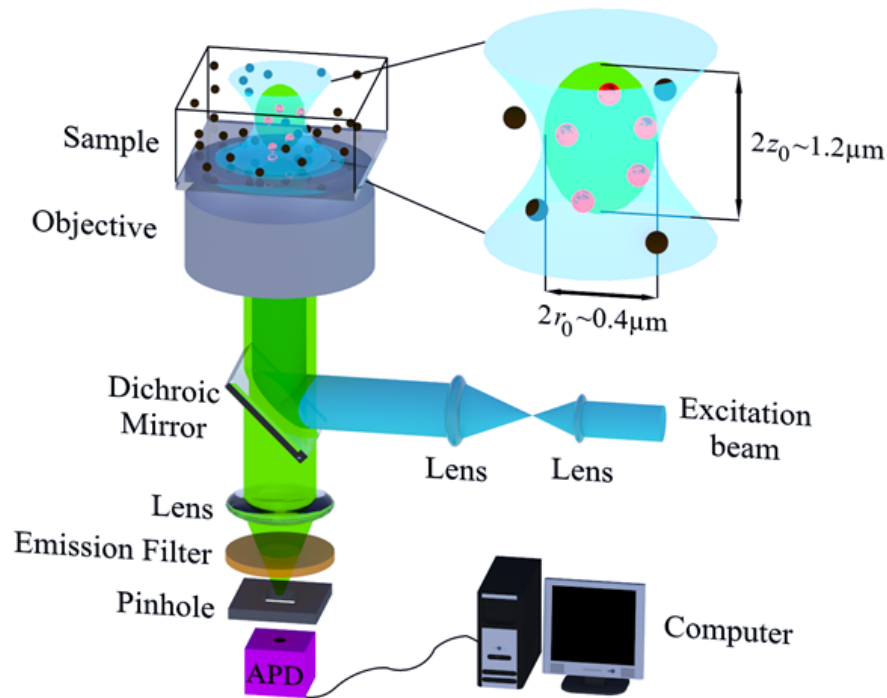


Abbildung 15: Fluoreszenzkorrelationspektroskopie Quelle: Koynow [142]. Der Laser mit der Anregungswellenlänge wird über einen dichromatischen Spiegel auf das Fokusbereich gerichtet. Das emittierte Licht besitzt durch die Stokes Verschiebung eine andere Wellenlänge als das Anregungslicht und gelangt damit durch den dichromatischen Spiegel. Das emittierte Licht trifft auf das *Pinhole*, welches Licht aus nicht fokussierten Ebenen vom Detektor fern hält.

Das Intensitätsprofil des fokussierten Lasers wird als Gaußverteilung angenommen, so dass die *Brightness* ebenfalls eine dreidimensionale Gaußverteilung, einen Ellipsoid, darstellt. Das heißt, dass die Zählrate für ein diffundierendes Fluorophor abhängig von der Region, in die es eintritt, je nach Detektionsprofil $p(r)$ kleiner oder größer wird [132].

Translationale Diffusion

Die Diffusionsrate eines Moleküls ist von dessen Größe und Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen abhängig [132].

Eine 10.000-fache Veränderung des Molekulargewichts beeinflusst den Diffusionskoeffizienten mit einer etwa 100-fachen Veränderung [132].

Die Amplitude $G(0)$ beschreibt die relative Stärke der Fluktuation im zeitlichen Mittel. Mit Hilfe der Poisson-Statistik und der AKF lässt sich die Anzahl der Teilchen im Beobachtungsvolumen ermitteln:

$$G(0) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (11)$$

Somit steigt die Amplitude mit einer sinkenden Anzahl an Molekülen im Fokus [141]. Von der *Brightness* einer einzelnen Molekülspezies ist $G(\tau)$ unabhängig, obwohl die *Brightness* eines Partikels die Fähigkeit beeinflusst einen solchen vor dem Hintergrund zu detektieren. Allerdings ist die *Brightness* unabhängig von der Korrelationsfunktion und $G(0)$ hängt ledig-

lich von der Molekülanzahl ab. Die Konzentration an Fluorophoren kann somit bestimmt werden, wenn das effektive Volumen der Messanordnung bekannt ist.

Bei dem Diffusionskoeffizient D handelt es sich um eine molekulare Eigenschaft, die nicht von der Messapparatur beeinflussbar ist. Die Diffusionszeit τ_D ist hingegen sowohl vom Diffusionskoeffizienten als auch vom Radius des Beobachtungsvolumens abhängig [132]. Für eine Diffusion, die ausschließlich auf der Brown'schen Molekularbewegung basiert, kann durch eine für Brown'sche Molekularbewegung und eine dreidimensionale Gaußverteilung angepasste AKF beschrieben werden:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (12)$$

Dabei ist N die Anzahl an Molekülen im Fokus, τ_D die mittlere Diffusionszeit, ω_0 der Radius der kleinen Halbachse des Beobachtungsvolumens, z_0 der Radius der mittleren Halbachse des Beobachtungsvolumens und s ist der Strukturparameter $\frac{\omega_0}{z_0}$, welcher durch die Geometrie des Anregungsvolumens zustande kommt [141].

Übergänge in den Triplet-Zustand führen ebenfalls zu Fluktuationen in der Fluoreszenz Intensität, die entsprechend in der AKF sichtbar werden. Dabei wird in der Regel davon ausgegangen, dass das Blinken der Fluorophore schneller verläuft, als die Diffusion der Teilchen durch das Beobachtungsvolumen. In diesem Fall ergibt sich für die AKF:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right) \right] \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\omega_0^2 r}{z_0^2 \tau_D} \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (13)$$

Dabei ist N die Anzahl an Molekülen im Fokus, τ_D die mittlere Diffusionszeit, ω_0 der Radius der kleinen Halbachse des Beobachtungsvolumens, z_0 der Radius der mittleren Halbachse des Beobachtungsvolumens, T die mittlere Anzahl Moleküle im Triplet-Zustand bzw. der Zeitanteil eines Moleküls im Triplet-Zustand und τ_T die Zeitkonstante des exponentiellen Abfalls.

3.1.6 Photonen Zähl Histogramm

Das Photonen Zähl Histogramm (engl. *Photon Counting Histogram*, PCH) bietet die Möglichkeit, die Helligkeit der mittels FCS detektierten Moleküle oder Partikel zu betrachten.

Die Amplitude der AKF ist von der Verteilungswahrscheinlichkeit der Moleküle im Beobachtungsvolumen abhängig. Somit kann mittels der AKF das zeitliche Verhalten der Fluktuation ermittelt werden. Zur Betrachtung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der zu detektierenden Photonen k in einem Messintervall kann das sogenannte *Photon Counting Histogram* zu Rate gezogen werden. Für eine einzige Molekülspezies haben zwei Faktoren einen Einfluss auf die *Photonen Counts*. Zum einen die Anzahl der Teilchen im Fokosvolumen N und zum anderen die molekulare Helligkeit der fluoreszierenden Teilchen ε . Dabei ist die molekulare Helligkeit ε der Mittelwert der detektierten Photonen pro Messzeit und Molekül. Diese mo-

lekuläre Helligkeit unterscheidet sich von der im vorigen Abschnitt eingeführten *Brightness* dadurch, dass die Anregung mit einbezogen wird. Die Helligkeit eines Moleküls spielt eine elementare Rolle in der statistischen Genauigkeit der FCS-Messung. Eine PCH Auswertung der experimentell aufgenommenen FCS-Messdaten ermöglicht die Berechnung von N und ε . Dabei ist anstelle des Zeitintervalls die Verteilung der Signale von Interesse. Die Aufnahme der *Photonen Counts* ermöglicht es die Helligkeit eines Partikels in die charakteristischen Eigenschaften einer bestimmten Partikelspezies eingehen zu lassen [138].

Das PCH arbeitet mit derselben Fluoreszenzfluktuation wie die AKF, allerdings in Bezug auf die Fluoreszenzintensität an Stelle der Zeit. Das ergibt eine Abschätzung der molekularen *Brightness* ε der fluoreszierenden Spezies im konfokalen Volumen. In einem Komplex ist die molekulare *Brightness* proportional zu dem Anteil der fluoreszierenden Partikel. Dieser direkte Zusammenhang macht die PCH zu einem deutlich empfindlicheren Indikator für Oligomerisation [143]. Beispielsweise würde eine Dimerisierung zu einer Änderung der Diffusionszeit etwa um den Faktor $\sqrt[3]{2}$ führen, während im PCH ungefähr eine Verdoppelung der Helligkeit zu beobachten wäre.

Die Annahmen und Herleitungen für die PCH sind in der folgenden Literatur beschrieben [138] [144]. Diese sollen hier nicht weiter betrachtet werden, da die PCHs im Rahmen dieser Arbeit lediglich qualitativ ausgewertet wurden.

Festzuhalten ist stattdessen, dass ein Photonen Zähl Histogramm eine negative Steigung besitzt. Abhängig von der eingesetzten Konzentration eines Fluorophors pro Partikel verändert sich diese Steigung. Je mehr Photonen in einem Messintervall detektiert werden, desto geringer ist die Steigung [138] [145].

3.1.7 Circulardichroismus-Spektroskopie

Verwendung findet die Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) zur Einschätzung der Sekundärstruktur von Makromolekülen, wie Proteine oder Polysacchariden. Denn durch Einflüsse, wie z.B. pH-Wert Veränderung, Hitzeeinwirkungen oder Bindungspartner kann es zu Konformitätsänderungen kommen [146] [147]. Der Zusammenhang zwischen circular polarisiertem Licht (CPL), chiralen Molekülen und Circular Dichroismus Spektroskopie ist in der Literatur beschrieben [86] [87] [148].

Charakteristische Banden in den CD-Spektren lassen in der Protein-Analytik Rückschlüsse auf eine Sekundärstruktur zu. So sind negative Banden bei 222 nm und 208 nm [45] [134] [149] [150], kombiniert mit einer positiven Bande bei 196 nm [146], charakteristisch für eine α -Helix Struktur. Ein anti-paralleles β -Faltblatt hingegen zeigt eine negative Bande bei 216 nm [45] bzw. ein β -Faltblatt zeigt allgemein eine negative Bande zwischen 215 nm und 218 nm [150]. Ungeordnete Proteine zeichnen sich durch ein Maximum bei 218 nm [146] und ein breites Minimum bei 197 nm [146] bzw. 192 nm [134] aus.

3.1.8 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM) bietet die Möglichkeit Partikel mit einer Auflösungsgrenze $< 0,1$ nm, sowohl getrocknet als auch in Flüssigkeit abzubilden und deren Größe zu ermitteln. 1986 erfolgte die Vorstellung der AFM als Abbildungsmethode für verschiedene Oberflächen von Binning et al. [151]. Das AFM gehört zu den Rastersondenmikroskopen. Bei diesen kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Sonde und Probe.

Das Funktionsprinzip der AFM ist bereits ausführlich in verschiedenen Literaturstellen [108] [134] [152] [153] [154] [155] beschrieben und soll an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden.

3.1.9 LPS-induzierte Stimulierung mononukleärer Zellen

Die LPS-induzierte Stimulierung mononukleärer Zellen ist die Methode, welche in dieser Arbeit herangezogen wird, um Aussagen über die Wirksamkeit des SALPs Peptid 19-2.5 und der Polysaccharid-Peptid-Komplexe auf die Zellstimulation machen zu können. Werden human mononukleäre Zellen hohen LPS-Konzentrationen ausgesetzt, sorgt dieses für die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α . Zytokine sind vielversprechende Biomarker, besonders die TNF-Konzentration steigt schon zu Beginn einer Sepsis an [27]. Eine antimikrobiell wirkende Substanz, welche gegen Gram-negative Bakterien wirkt, ist somit in der Lage einen durch LPS hervorgerufenen Anstieg der TNF-Konzentration vorzubeugen.

TNF- α kann mit Hilfe eines *Tumor Nekrosis Factor- α -Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (TNF- α -ELISA) nachgewiesen werden. Dieser Sandwich ELISA ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt.

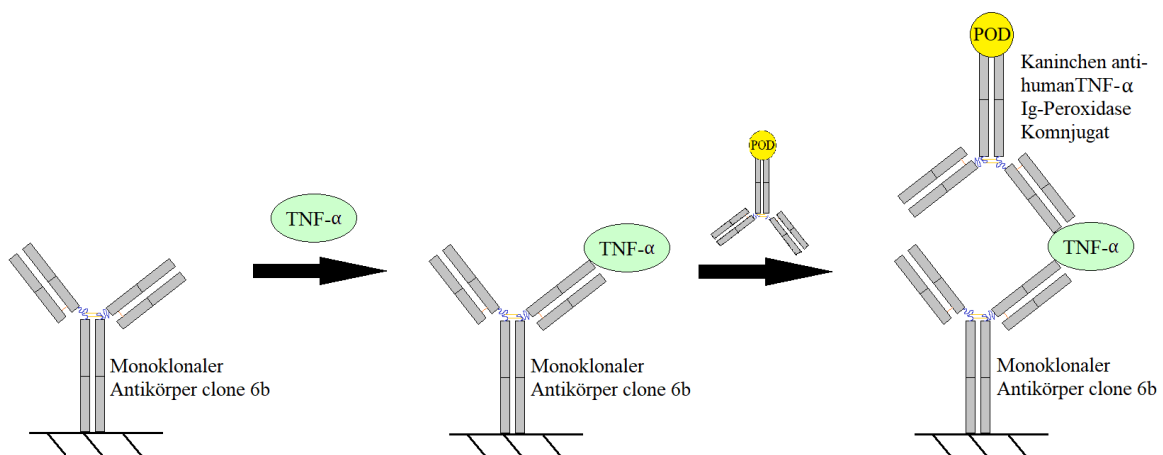


Abbildung 16: Schematischer Ablauf des Sandwich ELISAs zum Nachweis von TNF- α . Der Monoklonale Antikörper *clone 6b* ist an einer 96-Well-Platte immobilisiert. In der Probe gelöstes TNF- α bindet an diesen Antikörper. Anschließend erfolgt die Zugabe von einem Kaninchen anti-human TNF- α Ig-Peroxidase (POD) Konjugat, welches an TNF- α bindet. Die Farbreaktion zum Nachweis der gebundenen TNF- α -Konzentration wird durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in alkoholischer Lösung gestartet. Beendet wird diese Reaktion durch die Zugabe von 1M Schwefelsäure. Die photometrische Bestimmung des Produkts der Farbreaktion erfolgt bei 450 nm.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
α -Chymotrypsin	0238.1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acetonitril Chromasolv for HPLC	34851-2.5L	Honeywell (Seelze, Deutschland)
Alexa-Fluor 488 C ₅ Maleimide	A10254	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Ammoniak 25 %	2610.2	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumchlorid	2668.1000	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Borat-Puffer	1119.1000	Th. Geyer GmbH (Renningen, Deutschland)
Calcium Chlorid	1023782500	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Chitosan	Chitopharm S	Cognis/Henkel AG (Düsseldorf, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	D8418-50 ML	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat	1.06579.0200	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	2234.1000	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Fungamyl 800 L	AFN 0079	Novozymes (Bagsvaerd, Dänemark)
Glycin	50046	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Hanks Gleichgewichte Lösung		
Heparin		
Kaliumchlorid	1632.1000	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat	104852	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat	A3620.0500	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kaninchen anti-human TNF- α Ig-Peroxidase Konjugat	555212	BD biosciences BD OptEIA (Heidelberg, Deutschland)
L-Glutamin	56859	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Lipopolysaccharid	LPS R60 HL186	
Methanol	1481.2500	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Monoklonaler Antikörper clone 6b		Intex AG (Muttenz, Schweiz)
Natriumacetat	106236	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumazid	1.06688.0100	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchloride	1367.1000	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	1.06329.1000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat	1.37018.1000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge	72064-500 ML	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Peptid 19-2.5	Charge 1053821	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
Protease S02	Muster 3665	ASA Spezialenzyme GmbH (Wolfenbüttel, Deutschland)
Rapsöl	L508900916	Mazola (Elmshorn, Deutschland)
RPMI 1640 Medium		
Salzsäure	836100	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Schwefelsäure (95 Vol %)	1229/02/13	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Span 80	85548-250ML	Fluka Analytical (München, Deutschland)
Streptomycin	9013201	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Tetramethylbenzidin	54827177	Fluka (München, Deutschland)
Trifluoressigsäure	P088.1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	X100-500ML	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Wasser	Reinstwasser	Aus TKA Anlage, Leitfähigkeit 0,055 μ S, 0,2 μ m filtriert
Wasserstoffperoxid	19.2192311500	Th. Geyer Gruppe (Renningen, Deutschland)
Zitronensäure	X863.1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.2.2 Geräte

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Artikelnummer	Hersteller
Atomic Force Microscope	MFP-3D	Asylum Research eine Oxford Instruments Unternehmen (Wiesbaden, Deutschland)
ConcentratorPlus		Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Gelpermeationschromatographie-System	Model 302 TDA	Viscotek (Houston, Texas)
Ebzyme-linked immunosorbent Assay reader	Rainbow	Tecan (Crailsheim, Deutschland)
HPLC Autosampler	3950	Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
HPLC Dynamische Mischkammer	V7119-1	Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
HPLC Fluoreszenz Detektor	RF-20A	Shimadzu Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
HPLC Säulenofen	Jet Stream 11 Plus	Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
HPLC Smartline Manager	5050	Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
HPLC Smartline Pumpe	1050	Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
HPLC Smartline UV-Detektor	2520	Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
Jasco J-715 Spectrophotometer		Jasco Labor- Und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt, Deutschland)
MicroCal iTC200 System	SYS80001	GE Healthcare Life Science (München, Deutschland)
Nanophox		Sympatec GmbH (Clausthal-Zellerfeld, Deutschland)
Pulverisette 14		Fritsch (Rudolstadt, Deutschland)
Reinstwassersystem	TKA X-CAD	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (Niederelbert, Deutschland)

Gerät	Artikelnummer	Hersteller
Rührplatte VARIOMAG Poly 15	31505	H + P Labortechnik AG (Oberschleißheim, Deutschland)
Thermomixer comfort		Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallgerät	UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow, Deutschland)
Ultraschallbad Bandelin Sonorex	RK 510 H	Bandelin electronic (Berlin, Deutschland)
Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer		Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Zetasizer	Nano series Nano ZS90	Malvern (Herrenberg, Deutschland)
Zentrifuge	Micro Star17R 521-1647	VWR (Leuven, Belgien)

3.2.3 Materialien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Materialien.

Material	Artikelnummer	Hersteller
96-Well-Platte		Greiner (Solingen, Deutschland)
96-Well-Kulturplatte		
Acryl Küvette	Ref 67.755	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Cantelever	CSG10 (01/2017) Pos.4	NT-MDT America Inc (Tempe, USA)
Cellulose Acetat Filter	12342-47-N	Sartorius Stedim BioTech GmbH (Göttingen, Deutschland)
Centri Pure P25 (MWCO: 5000 D)	CP-0108	emp Biotech GmbH (Berlin, Deutschland)
Dichroweb	www.cryst.bbk.ac.uk	Dr. L. Whitmore, in the lab of Professor B.A. Wallace at the Department of Crystallography, Institute of Structural and Molecular Biology, Birkbeck College, University of London (London, Großbritannien)
Float-A-LyzerG2 Dialyse Device MWCO: 500-1000 D	KLK 235051	Spectrum Labs (Frankfurt, Deutschland)
Hamilton-Spritze		
Magnetrührkern (11 mm x 4 mm)		

Material	Artikelnummer	Hersteller
Mikroküvette	Malvern ZEN0118	Malvern (Herrenberg, Deutschland)
Miscovite MICA, V-1 Quality	71855-01	Science Services (München, Deutschland)
Nylon-Filter	KC 92.1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polystyrol/Polystyrene Küvetten	Ref 67.754	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
PP Schnappdeckeldosen	9402774	Erich Eydam KG (Kiel, Deutschland)
Pulverisette 14		Fritsch (Rudolstadt, Deutschland)
Quarzküvette, Schichtdicke 1,0 cm		Starna GmbH (Pfungstadt, Deutschland)
Quarzküvette, Schichtdicke 0,1 cm		
Reinstwassersystem	TKA X-CAD	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (Niederelbert, Deutschland)
Sonotrode	MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow, Deutschland)

3.2.4 Puffersysteme

Tris-Puffer für Peptid-Fluoreszenzmarkierung:

Tabelle 4: Tris-Puffer für Peptid-Fluoreszenzmarkierung mit Alexa-Fluor 488.

Tris-Puffer pH 7,2		
Tricine	50 mM	6,06 g
Salzsäure	bis pH = 7,2	
Reinstwasser		Endvolumen 1 l

Puffer für die Gelpermeationschromatographie:

Tabelle 5: Paley-Puffer für GPC.

Paley-Puffer pH 6,8		
Di-Natrium-Hydrogenphosphat	12,8 mM	9,19 g
Kaliumdihydrogenphosphat	11,5 mM	3,122 g
Natriumchlorid (NaCl)	50,0 mM	5,846 g
Natriumazid	3,8 mM	0,5g
Reinstwasser		Endvolumen 2 l

Tabelle 6: Acetat-Puffer für GPC.

Acetat-Puffer pH 4,8		
Essigsäure 99,5 %	0,3 M	36 ml
Natriumacetat	0,3 M	42,22 g
Natriumazid	0,05 %	1,0g
Natronlauge		bis pH = 4,8
Reinstwasser		Endvolumen 2 l

Tris-Puffer für die isotherme Titrationskalorimetrie:**Tabelle 7:** Tris-Puffer für ITC-Messungen.

Tris-Puffer pH 7,4		
Tricine	20 mM	605,7 mg
Salzsäure	bis pH = 7,4	
Reinstwasser		Endvolumen 250 ml

Puffer für Freisetzungs- und CD-Versuche mit verschiedenen pH-Werten:

Eingesetzt werden die Puffer in einer 1:10 Verdünnung als 50 mM Puffer. Der jeweilige pH-Wert wird mit Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt.

Tabelle 8: Citrat-Puffer für pH = 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 und 6,0.

Citrat-Puffer		
Zitronensäure	500 mM	4,80 mg
Reinstwasser		Endvolumen 50 ml

Tabelle 9: Phosphat-Puffer für pH = 7,0.

Phosphat-Puffer		
Di-Natrium Hydrogen Phosphat	500 mM	8,95 mg
Reinstwasser		Endvolumen 50 ml

Tabelle 10: Tris-Puffer für pH = 8,0 und 9,0.

Tris-Puffer		
Tricine	500 mM	4,48mg
Reinstwasser		Endvolumen 50 ml

Tabelle 11: Glycin-Puffer für pH = 10,0; 11,0; 12,0 und 13,0.

Glycin-Puffer		
Glycin	500 mM	1,88mg
Reinstwasser		Endvolumen 50 ml

Puffer für den simulierten Magen-Darm-Trakt: Die Puffer Zusammensetzung wurde aus dem Buch Basiswissen Physiologie von Florian und Philipp Lang (2. Auflage, 2007) übernommen [156].

Tabelle 12: Simulierter Magen-Puffer.

Simulierter-Magen-Puffer		
Natriumchlorid	60 mM	70,13 mg
Kaliumchlorid 0,2 M	20 mM	0,2 ml
Salzsäure 1 M	20 mM	0,4 ml
Protease S02 (frisch)	12 mg/ml	60 μ l
Reinstwasser		Endvolumen 20 ml

Tabelle 13: Simulierter Pankreas-Puffer.

Simulierter-Pankreas-Puffer pH 4,8		
Natriumchlorid	60 mM	70,12 mg
Natriumhydrogencarbonat	65 mM	108,62 mg
Kaliumhydrogencarbonat	5 mM	10,02mg
Natronlauge 0,1 M	15 mM	3,0 ml
α -Chymotrypsin (frisch)	3 mg/ml	108 μ l
α -Amylase Fungamyl 800 L	118 mg/ml	6 μ l
Reinstwasser		Endvolumen 20 ml

Tabelle 14: Simulierter Darm-Puffer.

Simulierter-Darm-Puffer pH 4,8		
Natriumchlorid	100 mM	116,88 mg
Natriumhydrogencarbonat	20 mM	33,60 mg
Kaliumhydrogencarbonat	5 mM	10,02mg
Calciumchlorid	1,5 mM	3,33 mg
α -Amylase Fungamyl 800 L	118 mg/ml	6 μ l
Reinstwasser		Endvolumen 20 ml

Auf Lipasen wurde verzichtet, da diese nicht zur Spaltung von Peptiden bzw. Proteinen und Polysacchariden eingesetzt werden.

3.2.5 Polysaccharide

Alginat

Alginat wurde nach Standardarbeitsanweisung (engl. *standard operating procedure*, SOP) im CIB aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum* hergestellt.

Dafür wurde die Alge *Ascophyllum nodosum* bei -57 °C für 48 h gefriergetrocknet. Die trockene Alge wurde mit der Pulverisette und 9000 rpm zu einem Pulver mit der Partikelgröße von 0,2 μm gemahlen.

Zu 5 g Algenmehl wurden 125 ml 0,1 M Schwefelsäure gegeben. Für 30 min bei 250 rpm und 30 °C gerührt. Die löslichen Bestandteile wurden über einen Cellulose Filter (4-6 μm) abgetrennt. Der Filterkuchen wurde in 125 ml 0,37 % (v/v) Formaldehyd-Lösung gegeben und für 30 min bei 250 rpm und Raumtemperatur gerührt. Die löslichen Bestandteile wurden erneut über Filtration abgetrennt. Zu dem Filterkuchen wurden 125 ml 1,5 % (w/v) Natrium Carbonat Lösung gegeben und für 2 h bei 50 °C und 500 rpm gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 M HCl auf $\text{pH} = 7$ gebracht und 450 ml dem. Wasser zugegeben. Natrium Alginat und andere lösliche Inhaltsstoffe wurden durch Zentrifugation, bei $20.000 \times g$ für 30 min, aus dem Überstand gewonnen. Zu der Natrium Alginat Lösung wurden 100 ml 10 % (w/v) Calciumchlorid-Lösung gegeben und 30 min bei 250 rpm gerührt. Das Calcium-Alginat fiel aus und wurde durch Filtration abgetrennt. Zu dem Calcium-Alginat wurden 100 ml 10 % (v/v) Wasserstoffperoxid gegeben, 30 min bei 250 rpm gerührt und zusätzlich mit einem Spatel zerfasert. Erneut wurde filtriert und das Filtrat dreimal mit 200 ml 0,5 M HCl gewaschen und erneuert für 30 min bei 250 rpm gerührt. Über Filtration wurde die Alginsäure von der Lösung getrennt. Zu der Alginsäure wurden unter Rühren 200 ml dem. Wasser und 1 M NaOH gegeben, bis das Na-Alginat gelöst wurde. Die Lösung wurde 0,45 μm filtriert und 400 ml 95 % (v/v) Ethanol zugegeben. Über Zentrifugation (s.o.) wurde das Na-Alginat vom Wasser-Ethanol-Gemisch getrennt. Um das Endprodukt zu erhalten, wurde der Rückstand bei 40 °C unter Vakuum getrocknet und auf 200 μm gemahlen.

Pektin

Das Pektin wurde nach SOP im CIB aus der Zuckerrübe Hanibal *Beta vulgaris L. var. altissima Döll* gewonnen.

Die Zuckerrüben wurden durch Waschen von Erde befreit und in faustgroße Stücke zerkleinert. Im Anschluss erfolgte die Zerkleinerung über eine Wasserstrahltechnologie. Mit einem Druck von 1.600 bar wurden die Zuckerrüben über ein Trichtersieb mit 8 mm großen Löchern zu allen Seiten, unter Verwendung von sechs Düsen, zerkleinert. Der Aufbau dieser Anlage entsprach Hauptpatent DE 102012013298 A1 [157], sowie den Zusatzpatenten DE 102012022313 A [158] und DE102013011524 A1 [159].

Die Saccharose-Konzentration wurde im resultierenden Zuckerrübenbrei durch Waschen mit Wasser, bei 7 °C , reduziert. Es folgte die Gefriertrocknung des Breis und Mahlen auf 1 mm.

Die Hydrolyse erfolgte innerhalb von 5 h im 2 l Reaktor mit 2 M HCl bei $\text{pH} = 2,5$, 50 °C und 500 rpm. Nach der Hydrolyse erfolgte die Entfernung des Feststoffs durch die Filtration über Gaze mit 10 μm Poren. Die Fällung des Pektins erfolgte innerhalb von 24 h aus

der Flüssigphase mit 85 % (v/v) 2-Propanol bei 7 °C. Der Feststoff wurde mit 85 % (v/v) 2-Propanol bei 7 °C gewaschen und über Gaze (s.o.) abfiltriert. Trockenes Pektin wurde über eine 24 stündige Trocknung bei 20 °C unter Vakuum und anschließendem Mahlen erhalten.

Chitosan

Chitosan wurde als Chitopharm S zur Verfügung gestellt von Dr. Wachter, Cognis/Henkel AG.

3.3 Methoden

3.3.1 Peptid-Fluoreszenzmarkierung

Für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren, die FCS Messungen, sowie die PCHs, die scanning FCS und die konfokale Mikroskopie wurde fluoreszenzmarkiertes Peptid verwendet. Diese Fluoreszenzmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide wurde im Folgenden beschrieben:

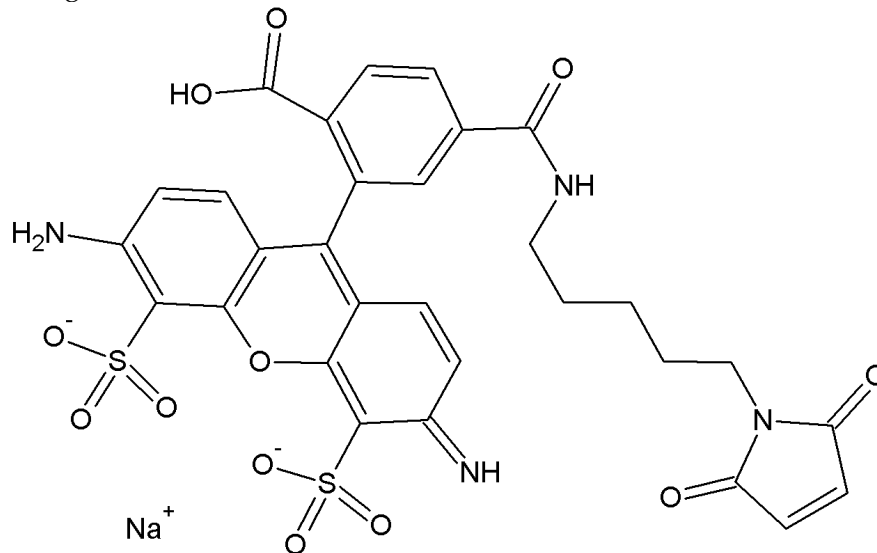


Abbildung 17: Chemische Struktur des Fluoreszenzmarkers Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide. Gezeichnet nach der Vorlage von Sigma Aldrich [160].

1 mg des Fluoreszenz-Markers Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide wurde vor der Verwendung in 100 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Das Lösen erfolgte dabei durch vorsichtiges Klopfen. Die Lösung wurde in 5 μ l Aliquote aufgeteilt und im Speed Vac Concentrator unter Vakuum für wässrige Lösungen bei 45 °C in 120 min getrocknet. Anschließend konnten die Aliquote bei -16 °C gelagert werden.

3 mg Peptid wurden in 3 ml 50 mM Tris-Puffer (siehe Tabelle 4) gelöst. Zwei der Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide Aliquote wurden in jeweils 5 μ l DMSO gelöst. Zu 3 ml Peptid-Lösung kamen 10 μ l Farbstoff-Lösung. Die Reaktion verlief innerhalb von 2 h, unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

Für die Trennung des fluoreszenzmarkierten Peptids vom freien Fluoreszenzfarbstoff kamen zwei Methoden in Frage.

1. Gelfiltration

Unter Verwendung einer Centri Pure P25 Gelfiltrationssäule (MWCO 5000 Da) welche fünf Mal mit Tris-Puffer äquilibriert wurde. Anschließend folgte die Aufgabe des fluoreszenzmarkierten Peptids. Das Eluat wurde jeweils in Fraktionen mit der Größe von 11 Tropfen aufgefangen.

2. Dialyse

Die Peptid-Lösung wurde in Float-A-Lyzer G2 (MWCO 500 - 1000 Da) gegeben und 24 h bei 8 °C gegen Tris-Puffer dialysiert. Während der Dialyse wurde der Tris-Puffer bei 150 rpm gerührt.

Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Peptids konnte mittels Trennung über eine Vertex Plus Säule 250 x 4 mm Eurosil Bioselect 300-5 C18A-Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion bestimmt werden (wie unter Punkt 3.3.6 beschrieben). Mit dem Nachweis von ungelabeltem Peptid, dessen Konzentration kalibrierbar war, ließ sich aus der Konzentration des ungelabelten Peptids die Konzentration des gelabelten Peptids durch Substraktion berechnen ($[Peptid - Alexa] = [Peptid]_{eingesetzt} - [Peptid]_{frei}$).

3.3.2 Gelpermeationschromatographie

Die Charakterisierung der Polysaccharide erfolgte durch die Ermittlung der molaren Masse, der Polydispersität, des hydrodynamischen Radius und der intrinsischen Viskosität. Bei dieser Messung mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) handelt es sich jeweils um eine Vierfachbestimmung.

Vor Beginn der Messung von Alginat und Pektin wurde der Paley-Puffer, wie in Tabelle 5 beschrieben, hergestellt. Für die Messung von Chitosan wurde Acetat-Puffer, wie in Tabelle 6 beschrieben, hergestellt. Die verwendeten Eluenten wurden vor der Verwendung mit einem Filter der Porengröße von 0,2 μm filtriert. Die GPC Dreifachdetektion (Viskotek Model 302 TDA) wurde von dem Lagereluenten, 20 % Methanol, auf 10 % Methanol und anschließend auf Wasser umgestellt. Des Weiteren erfolgte die Äquilibrierung mit Puffer. Das Umspülen und Äquilibrieren wurde mit einer Flussrate von 0,1 ml/min durchgeführt.

5 mg der Chitosan-Probe wurden in 5 ml Acetat-Puffer gelöst. Dafür wurde die Probe für 24 h bei RT mit 400 rpm gerührt und zusätzlich sonifiziert.

20 mg Pektin- oder Alginat-Probe wurden in 10 ml Paley-Puffer gelöst. Dafür wird die Probe für 72 h bei RT mit 250 rpm gerührt. Die Proben wurden vor der Messung über einen 0,2 μm Cellulose-Acetat-Filter filtriert, welcher zur exakten Massenbestimmung getrocknet und ausgewogen wurde.

Für die Messung der Proben wurde der jeweilige Puffer als Eluent verwendet. Für die jeweilige Messung wurde eine Flussrate von 0,7 ml/min verwendet. Das Probeninjektionsvolumen belief sich auf 100 μl . Die Messung der Probe verlief innerhalb von 60 min. Die

Messungen von Pektin und Alginat wurden von Dr. habil. Ralf Moll im Centrum Industrielle Biotechnologie der FH Lübeck durchgeführt.

Die Berechnung der physikochemischen Parameter aus der GPC Dreifachdetektion erfolgte mit der Omnisec-Software von Viskotek/Malvern.

3.3.3 Untersuchung von Peptid 19-2.5 auf Veränderung der Primärstruktur in Lösung

Die Primärstruktur des Peptids könnte sich durch Lösen verändern. Von besonderem Interesse sind die Lösungsmittel Wasser und 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung. Für die nachfolgenden Versuche zur Peptid-Verkapselung wurde das Peptid häufig in Wasser gelöst. Daher sollte das Peptid über eine gewisse Zeit in Wasser gelöst stabil sein. Ein weiterer Ansatz zur Verabreichung des Peptids ist die Verabreichung des Peptids per Infusion in einer Natriumchlorid-Lösung. Daher wurde die Stabilität der Primärstruktur des Peptids über eine Woche in diesen Lösungen analysiert. Die Analyse erfolgte im Rahmen einer Dreifachbestimmung.

Für die jeweilige Probe wurden 100 μM Peptid in Wasser bzw. 0,9 % (w/v) Natriumchlorid-Lösung gelöst. Die Proben wurden über eine Woche betrachtet. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung bei drei verschiedenen Temperaturen, unter Lichtausschluss, durchgeführt. Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlschrank, bei Raumtemperatur (20 °C) und bei 50 °C im Thermomixer inkubiert.

Die Probentrennung und -analyse erfolgten über eine Vertex Plus Säule 250 x 4 mm Eurosil Bioselect 300-5 C18A-Säule und Fluoreszenzdetektor. Verwendung findet dabei die „Peptid-Fragment und Aminosäuren Nachweis Methode“ (Tabelle 16), wie im Abschnitt 3.3.6 „Chromatographische Trennung von Peptiden, Peptidfragmenten und Polysacchariden mittels C₁₈-Säule“ beschrieben.

3.3.4 Verkapselung des Peptids mit Polysacchariden

Angelehnt ist die Durchführung der Verkapselung von Peptid 19-2.5 an Mata et al. [3] und Kailasapathy [161]. Mata et al. [3] beschreiben die Verkapselung von Malaria synthetischen Peptiden mit einer Mischung aus PLGA und Alginat (MW 200.000-300.000 g/mol). Dabei wird eine Emulsions-Technik verwendet, in der als letztes 0,6 mM Calciumchlorid-Lösung hinzugegeben wird. Kailasapathy [161] beschreibt die Verkapselung von Flavourzyme mit Alginat. Die Ausbildung der Kapseln ist durch Zugabe von 0,1 M Calciumchlorid-Lösung beschrieben. Die Ausgangslösungen der Verkapselungen sind in Wasser anzusetzen, da sowohl das Peptid als auch die Polysaccharide wasserlöslich sind. Für die sonifizierten Komplexe ist ein Ultrasonic Processor UP50H von Hielscher zu verwenden.

Alginat-Peptid-Komplex Bildung durch Sonifizieren

Es wurden eine 100 μM Peptid 19-2.5-Lösung, eine 1 μM Alginat-Lösung und eine 0,5 mM Calciumchlorid-Lösung angesetzt. Das Alginat ist bei 45 °C im Ultraschallbad löslich. Die

Verkapselung fand unter Eiskühlung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß statt. 250 μl Peptid-Lösung wurde in das Reaktionsgefäß gegeben. Unter Sonifizieren (Amplitude 50 % und Ausgabezyklus 0,5) wurde innerhalb von 5 min 100 μl Alginat-Lösung hinzugegeben. Das ergab ein Bindungsverhältnis für [Alginat]:[Peptid] von 1:250. Es war möglich, die Partikel durch Zentrifugieren vom Wasser zu trennen und in Puffer zu emulgieren. Für eine solche Zentrifugation wurden die Partikel über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend bei 17.000 \times g, 4 °C für 30 min zentrifugiert. Für die Versuche wurden die Komplexe in 250 μl Puffer oder Wasser emulgiert.

Alginat-Peptid-Komplex Bildung in einer O/W-Emulsion

Es wurden eine 100 μM Peptid 19-2.5-Lösung, 1 μM Alginat-Lösung und 2,0 mM Calciumchlorid-Lösung angesetzt. Das Alginat wurde bei 45 °C im Ultraschallbad gelöst. Die Verkapselung fand in einem 5 ml Reaktionsgefäß mit flachem Boden auf einer Rührplatte statt. Verwendung fand dabei ein Magnetrührkern mit den Abmessungen 11 mm \times 4 mm. 2 ml Rapsöl und 50 μl Span 50 wurden in das Reaktionsgefäß gegeben und bei 800 rpm gemischt. Für ein Bindungsverhältnis von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) wurden die folgenden Volumina eingesetzt. 1,0 ml Peptid-Lösung wurde in das Öl gegeben, hinzu kamen 400 μl Alginat-Lösung. Die Emulsion wurde 20 min gerührt. Anschließend wurde 1 ml Calciumchlorid-Lösung hinzugegeben und erneut 20 min gerührt. Die Emulsion wurde in vier 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Alginat-Peptid-Komplexe ließen sich nach einer Lagerung über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C bei 17.000 \times g und 4 °C für 30 min durch Zentrifugieren von der Ölphase trennen. Die Komplexe wurden durch dreimaliges Waschen mit Wasser von dem Ölfilm befreit. Zur Versuchsdurchführung wurden die Komplexe in 250 μl Puffer oder Wasser resuspendiert.

Pektin-Peptid-Komplex Bildung durch Sonifizieren

Es wurden eine 1000 μM Peptid 19-2.5-Lösung und eine 2 μM Pektin-Lösung angesetzt. Das Pektin war innerhalb von 72 h bei 35 °C im Thermomixer bei 750 rpm gelöst. Die Verkapselung fand unter Eiskühlung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß statt. 270 μl Pektin-Lösung wurden in das Reaktionsgefäß gegeben. Unter Sonifizieren (Amplitude 50 % und Ausgabezyklus 0,5) wurden innerhalb von 5 min 100 μl Peptid-Lösung hinzugegeben. Das ergab ein eingesetztes Bindungsverhältnis von [Pektin]:[Peptid] von 1:185, aber ein resultierendes Bindungsverhältnis von 1:110 ([Pektin]:[Peptid]). Es war möglich die Partikel durch Zentrifugieren vom Wasser zu trennen und in Puffer zu emulgieren. Für eine solche Zentrifugation wurden die Partikel über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend bei 17.000 \times g, 4 °C für 30 min zentrifugiert. Für die Versuche wurden die Komplexe in 250 μl Puffer oder Wasser emulgiert.

Pektin-Peptid-Komplex Bildung in einer O/W-Emulsion

Es wurden eine 540 μM Peptid 19-2.5-Lösung und 2 μM Pektin-Lösung angesetzt. Das Pektin wurde innerhalb von 72 h bei 35 °C im Thermomixer bei 750 rpm gelöst. Die Verkapselung fand in einem 5 ml Reaktionsgefäß mit flachem Boden auf einer Rührplatte statt. Verwen-

ung fand dabei ein Magnetrührkern mit den Abmessungen 11 mm x 4 mm. 2 ml Rapsöl und 50 μ l Span 50 wurden in das Reaktionsgefäß gegeben und bei 800 rpm gemischt. Für ein resultierendes Bindungsverhältnis von 1:110 ([Pektin]:[Peptid]) wurde ein Bindungsverhältnis von 1:185 ([Pektin]:[Peptid]) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte durch emulgieren von 1,0 ml Peptid-Lösung in Öl, hinzu kamen 2,0 ml Pektin-Lösung. Die Emulsion wurde 20 min gerührt. Die Emulsion wurde 18 x in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Pektin-Peptid-Komplexe ließen sich nach einer Lagerung über Nacht im Kühlschrank (4 °C) bei 17.000 x g und 4 °C für 30 min durch Zentrifugieren von der Ölphase trennen. Die Komplexe wurden durch dreimaliges Waschen mit Wasser von einem Ölfilm befreit. Zur Versuchsdurchführung wurden die Komplexe in 250 μ l Puffer oder Wasser resuspendiert.

3.3.5 Circular Dichroismus Spektroskopie

Zur Bestimmung, ob Peptid 19-2.5 eine Sekundärstruktur ausbildet und ob bzw. wie diese von Umgebungseinflüssen beeinflussbar ist, wurde die Circular Dichroismus Spektroskopie verwendet. Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Proben für die CD-Messungen enthielten 370 μ M Peptid 19-2.5. Vor der jeweiligen Messung wurden die zu messenden Lösungen durch fünfminütige Ultraschallbehandlung entgast. Verwendet wurden die unter Punkt 3.2.4 beschriebenen 50 mM Pufferlösungen. Als Kontrollen wurden die Pufferlösungen ohne Zugabe von Peptid gemessen.

Die CD-Messungen wurden am J-715 Spectropolarimeter, in Quarzküvetten mit 1 mm Schichtdicke, durchgeführt.

Im Folgenden ist die Messdurchführung beschrieben: Das Spektropolarimeter wurde mit einem Gasfluss von 2 l/min geflutet. In der Messsoftware *Spectral* wurde der Wellenlängenbereich mit 180 - 260 nm in 0,1 nm Schritten angegeben. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte nach Abzug des Hintergrund-Signals mit der *Dichroweb-Software* [162] mit dem Programm *CDSSTR*.

Die Versuche wurden bei verschiedenen pH-Werten mit reinem Peptid-19-2.5, Peptid 19-2.5 mit 150 mM NaCl, Peptid 19-2.5 mit 1 M NaCl, Alginat-Peptid-Partikel und Pektin-Peptid-Partikel durchgeführt. Gelöst wurden die Proben in Wasser, 0,1 M HCl, den in Tabelle 8 bis 11 beschriebenen Puffern bzw. 0,1 M NaOH.

3.3.6 Chromatographische Trennung von Peptiden, Peptidfragmenten und Polysacchariden mittels C₁₈-Säule

Mit der in der HPLC verwendeten Vertex Plus Säule 250 x 4 mm Eurosil Bioselect 300-5 C18A können Aminosäuren, Peptid-Fragmente und Peptide voneinander, sowie von den Polysacchariden getrennt werden. Die anschließende Fluoreszenzdetektion ermöglicht die Bestimmung der Konzentration an intaktem Peptid und bestimmten Peptidfragmenten. Alle

Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Durchführung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *Highperformance liquid chromatography*, HPLC) Messung erfolgte mit einer Knauer HPLC der Smartline Serie. Die HPLC besteht aus einem Manager 5050, Pumpe 1050, Dynamischer Mischkammer, Autosampler 3950, Säulenofen der Jetstream Serie und Fluoreszenz Detektor RF-20A von Shimadzu. Die Probentrennung erfolgte über eine Vertex Plus Säule 250 x 4 mm Eurosil Bioselect 300-5 C18A mit integrierter Vorsäule. Eluent A bestand aus Wasser (Leitfähigkeit 0,055 μ S) mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), Eluent B bestand aus Acetonitril mit 0,1 % TFA, die Spüeluenten C und D enthielten 70 % Acetonitril.

Die Messmethoden wurden in Tabelle 15 und 16 dargestellt.

Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 350 nm.

Tabelle 15: Peptid Nachweis Methode.

Zeit /min	Durchfluss /(ml/min)	Anteil Eluent A /%	Anteil Eluent B /%
0	0,8	80	20
5	0,8	75	25
14	0,8	50	50
16	0,8	30	70
20	0,8	50	50

Tabelle 16: Peptid-Fragment und Aminosäuren Nachweis Methode.

Zeit /min	Durchfluss /(ml/min)	Anteil Eluent A /%	Anteil Eluent B /%
0	0,9	100	0
2	0,9	90	10
5	0,9	90	10
10	0,9	75	25
11	0,9	75	25
16	0,9	50	50
20	0,9	50	50
23	0,9	30	70
24	0,9	75	25
25	0,9	100	0
30	0,9	100	0

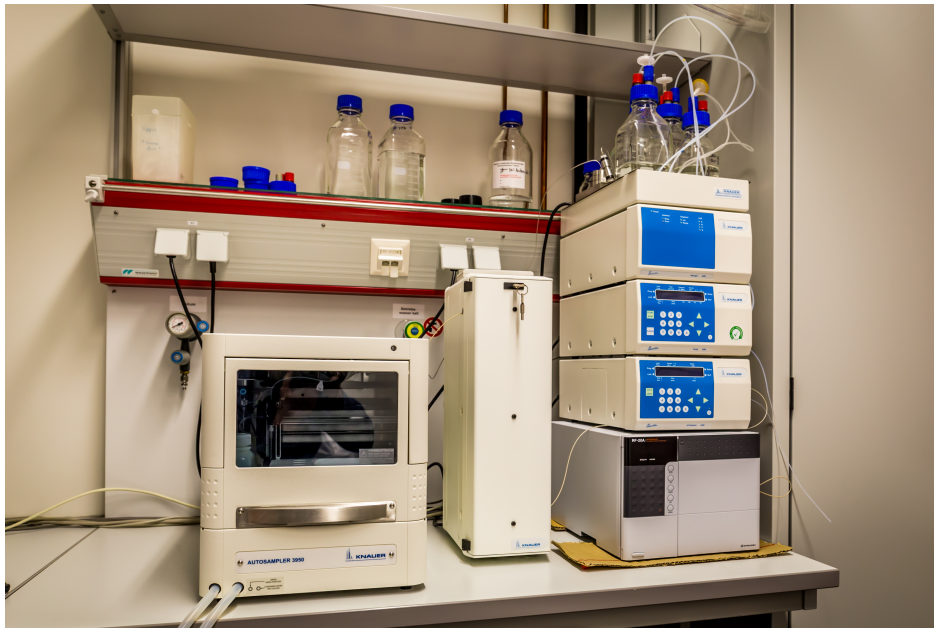


Abbildung 18: Die HPLC an der die Trennung von Peptiden, Peptidfragmenten und Polysacchariden über die C₁₈-Säule und Fluoreszenzdetektion stattfanden.

3.3.7 Bindungsexperimente mittels chromatographischer Trennung über die C₁₈-Säule

Die Bindungsexperimente mittels chromatographischer Trennung über eine C₁₈-Säule beruhen auf dem Nachweis an ungebundenem Peptid. Für diese Dreifachbestimmung wurde jedes untersuchte Bindungsverhältnis dreimal unabhängig voneinander hergestellt und analysiert.

Die Bindungsexperimente wurden mit diversen Polysaccharid-Peptid-Verhältnissen durchgeführt. Die Verkapselung verlief wie unter Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Die Überstände der Polysaccharid-Peptid-Komplexe wurden über eine Trennung mittels C₁₈-Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion auf freies Peptid untersucht. Die verwendete HPLC-Methode wurde in Tabelle 15 beschrieben. Ab einem molaren Verhältnis, bei welchem freies Peptid im Überstand nachweisbar war, zeigte dieses ein eingesetztes molares Verhältnis an, bei welchem die Bindungskapazität des jeweiligen Polysaccharids überschritten wurde. Berechnung der Konzentration des komplexierten Peptids aus der eingesetzten und nachgewiesenen Peptidkonzentration:

$$[\text{Peptid}_{\text{komplexiert}}] = [\text{Peptid}_{\text{eingesetzt}}] - [\text{Peptid}_{\text{unkomplexiert}}] \quad (14)$$

Für die Alginat-Peptid-Bindung wurden die molaren Verhältnisse von 1:25 bis 1:400 ([Alginat]:[Peptid]) in 25er Schritten analysiert.

Der Überstand der Pektin-Peptid-Bindung wurde vom molaren Verhältnis 1:10 bis 1:300 ([Pektin]:[Peptid]) in 10er Schritten gemessen.

Die Chitosan-Peptid-Bindung wurde im molaren Verhältnis 1:1 ([Chitosan]:[Peptid]) eingesetzt.

3.3.8 Partikelgrößenbestimmung

Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie

Die Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie wurde als Vierfachbestimmung durchgeführt. Dabei erfolgte die Herstellung der Peptid-Polysaccharid-Komplexe wie unter Punkt 3.3.4 beschrieben. Die durch Rühren hergestellten Komplexe wurden zentrifugiert und in 500 μl Wasser emulgiert. Bei den sonifizierten Partikeln war eine Zentrifugation nicht notwendig.

Die Messungen wurden am Nanophox (Sympatec) durchgeführt. Für die Messungen der Proben fanden Acryl Küvetten Verwendung. Bei der verwendeten Bedienungs- und Auswertesoftware handelte es sich um die *Nanophox Software*. Die Messtemperatur betrug, sofern nicht anders angegeben, 25 °C.

In der Software wurden die Dichte des Lösungsmittels und der Brechungsindex angegeben. Die Auswertung erfolgte mittel Auswertemodus NNLS der Nanophox Software.

Dynamische Lichtstreuung

Für die Messung der Dynamischen Lichtstreuung wurden die Proben wie folgt hergestellt: Zur Probenvorbereitung wurde das Pektin innerhalb von 72 h bei 37 °C und 1200 rpm im Thermomixer gelöst. Das Alginat hingegen ließ sich innerhalb von 45 min im Ultraschallbad bei 35 °C lösen.

Die Proben wurden aus einer 10 μM Alginat-Lösung, einer 10 μM Pektin-Lösung und einer 1000 μM Peptid-Lösung hergestellt. Vor der Messung wurden alle Proben mit dem Verdünnungsfaktor 1:100 verdünnt.

Die Herstellung der sonifizierten Alginat-Peptid-Partikel erfolgte unter Mischung der einzelnen Komponenten durch Sonifizieren. Die Sonotrode wurde auf eine Amplitude von 50 % und einen Ausgabezyklus von 0,5 eingestellt. 40 μl Alginat-Lösung, 120 μl Wasser und 40 μl Peptid-Lösung wurden unter Eiskühlung in einem 500 μl Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurde die Sonifikation für 5 min fortgesetzt.

Für die Herstellung der durch eine O/W-Emulsion hergestellten Alginat-Peptid-Komplexe wurden Polypropylen-Dosen, Magnetrührkerne und eine Magnetrührplatte verwendet. Unter Rühren bei 800 rpm wurden, unter Einhaltung der exakten Reihenfolge, 2 ml Rapsöl, 50 μl Span80, 100 μl Peptid-Lösung, 300 μl Wasser und 100 μl Alginat-Lösung gemischt. Das Rühren der Emulsion wurde nach der Zugabe aller Komponenten noch für 20 min fortgesetzt. Zur Trennung der Phasen wurden die Proben 30 min bei 4 °C und 17.000 x g zentrifugiert. Die Öl-Reste wurden durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt. Im Anschluss ließen sich die Partikel in 500 μl Wasser resuspendieren.

Die Herstellung der Pektin-Peptid-Partikel verlief ebenso wie die Herstellung der Alginat-Peptid-Partikel. Änderungen gab es allerdings bei den Volumina. Für die sonifizierten Pektin-Peptid-Partikel wurden 40 μl Pektin-Lösung, 148 μl Wasser und 12 μl Peptid-Lösung verwendet. Die emulgierten Pektin-Peptid-Partikel wurden aus 30 μl Peptid-Lösung, 370 μl Wasser und 100 μl Pektin-Lösung hergestellt.

Die DLS-Messungen wurde am Nano Series Zetasizer Nano ZS90 von Malvern als Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die sonifizierten Proben wurden Mikroküvetten verwendet, während für die emulgierten Proben Polystyrol/Polystyrene Küvetten verwendet wurden. Die Equilibrierungszeit jeder Probe betrug 180 s. Die Messtemperatur wurde auf 25 °C eingestellt, der Messwinkel betrug 90° und jeder der drei Messwerte ergab sich aus einer Messung von 10 x 10s, welche durch die Software automatisch bewertet und gemittelt wurde.

Rasterkraftmikroskopie

Die Durchführung der AFM-Messung begann mit der Partikelherstellung. Diese verlief identisch mit der Probenvorbereitung für die Messung der Dynamischen Lichtstreuung (s.o.). Die Alginat-Peptid-Komplexe wurden mit Wasser 1:10.000 verdünnt und die Pektin-Peptid-Komplexe wurden mit Wasser 1:500 verdünnt. Im Ergebnisteil werden für jeder Probe zwei von 12 aufgenommenen Bildern dargestellt.

Die verwendeten MICA-Slides wurden jeweils in eine Petrischale eingeklebt. Die Oberfläche der MICA-Slides wurden vor der Probenaufgabe gereinigt und durch Aufdrücken und Abziehen eines Tesa Kristallklar Streifens entfernt. Etwa 300 µl Probe wurden auf das MICA aufgegeben und eingetrocknet.

Die Probenmessungen wurden am Gerät MFD-3D von Asylum Research durchgeführt. Die Probe ist bei Raumtemperatur und im getrockneten Zustand gemessen worden. Die Datenerfassung gelang mit der *MFP3D14.20.152* Software (Asylum Reserch), welche zu diesem Zweck in *Igor Pro 6.37* implementiert wurde. Für die durchgeführten Messungen wurde der Cantilever CSG10 (01/2017) Position vier verwendet. Eingestellt wurde der Modus *Contact-Mode*. Für die Darstellung der Bilder wurde die Software verwendet.

Scanning Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und die Konfokale 3D-Mikroskopie

Diese Experimente sind unter Abschnitt 3.3.10 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie beschrieben.

3.3.9 Fluoreszenz-Messung

Der Einfluss des Fluoreszenzmarkers auf das Peptid und das mit Polysacchariden komplexierte Peptid auf die Absorptions- und Emissionsspektern stellen einen Teil der Bindungscharakterisierung dar. Die Messungen wurden mit einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Aufnahme von Absorptions- und Emissionsspektren erfolgte mit Hilfe einer Quarzküvette. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wurde eine Emmissionswellenlänge von 350 nm eingestellt. Für die Emissionsspektren wurde eine Anregungswellenlänge von 280 nm gewählt.

3.3.10 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die FCS dient zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse, sowie zu Bestimmung der hydrodynamischen Radien der Partikel über den ermittelten Diffusionskoeffizienten. Die Messungen wurden jeweils als Dreifachbestimmung mit frisch angesetzten Proben durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die jeweiligen Ausgangslösungen wurden in Wasser gelöst. Die Konzentrationen der verwendeten Lösungen wurden wie folgt angesetzt: 10 μM Alginat-Lösung, 10 μM Pektin-Lösung und 1000 μM Peptid-Lösung. Dialysiertes fluoreszenzmarkiertes Peptid enthielt 180 μM Peptid 19-2.5-Alexa-Fluor. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 dargestellt, während die zugehörigen Pipettierschemata im Anhang in Tabelle 34 bis Tabelle 36 zu finden sind.

Für die Versuche mit unterschiedlichen Verhältnissen (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) an fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid wurden Alginat-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis von 1:100 und 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) und Pektin-Peptid-Komplexe mit den Bindungsverhältnissen 1:30 und 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) eingesetzt.

Tabelle 17: Konzentrationen der FCS-Proben der Alginat-Peptid-Partikel.

Molares Verhältnis [Alginat] : [Peptid]	c(Alginat) / μM	c(Peptid-Alexa) / μM	c(Peptid) / μM
1:5	2,0	1,0	9,0
1:10	2,0	2,0	18,0
1:25	2,0	5,0	45,0
1:50	2,0	10,0	90,0
1:75	2,0	15,0	135,0
1:100	2,0	20,0	180,0
1:125	2,0	25,0	225,0
1:150	2,0	30,0	270,0
1:175	2,0	35,0	315,0
1:200	2,0	40,0	360,0
1:225	2,0	45,0	405,0
1:250	2,0	50,0	450,0

Tabelle 18: Konzentrationen der FCS-Proben der Pektin-Peptid-Partikel.

Molares Verhältnis [Pektin] : [Peptid]	c(Pektin) /μM	c(Peptid-Alexa) /μM	c(Peptid) /μM
1:5	2,0	1,0	9,0
1:10	2,0	2,0	18,0
1:15	2,0	3,0	27,0
1:30	2,0	6,0	54,0
1:45	2,0	9,0	81,0
1:60	2,0	12,0	108,0
1:75	2,0	15,0	135,0
1:90	2,0	18,0	162,0
1:105	2,0	21,0	189,0
1:120	2,0	24,0	216,0
1:135	2,0	27,0	243,0
1:150	2,0	30,0	270,0

Durchführung der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die FCS Messungen wurden mit einer Anregungsleistung von 1,2 μW durchgeführt. Für die jeweilige Messung wurde ein Messvolumen von 20 μl Probe auf das Deckglas gegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Igor Pro 6.37*. Der Hydrodynamische Radius der Partikel konnte mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten und der Stokes-Einstein-Gleichung 15 berechnet werden.

$$R_0 = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (15)$$

In Gleichung 15 beschreibt k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, η die Viskosität des Lösungsmittels und D den ermittelten Diffusionskoeffizienten.

Scanning Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die sFCS dient als Vergleich für die Partikelgrößenbestimmung mittels FCS und wurde mit jeweils einer frisch angesetzten Probe durchgeführt. Die Anregungsleistung wurde auf 0,75 μW eingestellt und es wurden 20 μl Probe pro Messung auf ein Deckgläschen gegeben. Für die Messungen wurden 16, 64, 128 oder 256 Pixel, ein Scannbereich S zwischen 10 μm und 100 μm, sowie die Messzeit t von 1 ms eingestellt. Für die Messungen wurden die APD 1 und 2 eingeschaltet.

Die AKF der scanning FCS ist bei langsamer Diffusion im Vergleich zur Scangeschwindigkeit mit einer Gauß-Funktion auswertbar. Die Diffusionszeit eines Partikels τ_D ist über die Halbwertsbreite beschrieben, welche in diesem Fall als *width* angegeben ist. Aus der Halbwertsbreite lässt sich mit Gleichung 16 unter Berücksichtigung der Anzahl der eingestellten *Pixel*, den eingestellten Scannbereich S und der eingestellten Messzeit t der Partikelradius aus der Gaußfunktion berechnen.

$$R_0 = \frac{S}{\text{Pixel} \cdot t} \cdot \text{width} \quad (16)$$

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software *Igor Pro 6.37*.

Konfokale 3D Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde für die Proben der sFCS durchgeführt. Dieses bildgebende Verfahren stellt Schnappschüsse aus der jeweiligen Probe dar. Diese Bilder wurden bei einer Auflösung mit 256 Pixel, ein Scanbereich S zwischen $10 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$, sowie einer Messzeit t von 1 ms aufgenommen. APD 1 und 2 wurden bei dieser Messung ebenfalls eingeschaltet.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software *Igor Pro 6.37*.

3.3.11 Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie-Messungen

Einen weiteren Teil der Bindungscharakterisierung stellen die Anisotropie- und Fluoreszenzlebensdauer-Messungen dar, welche als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Proben

Der freie Fluoreszenz-Farbstoff Alexa-Fluor 488 gelöst in Wasser, $175 \mu\text{M}$ Peptid-Alexa, $2 \mu\text{M}$ Alginat-Peptid-Alexa-Komplexe mit einem molaren Verhältnis von [Alginat]:[Peptid-Alexa] von 1:50 und $2 \mu\text{M}$ Pektin-Peptid-Alexa-Komplexe mit einem molaren Verhältnis von [Pektin]:[Peptid-Alexa] von 1:30 fanden Verwendung.

Messungen

Am Data Station v2.4 - HORIBA Jubin Yvon wurden die Messungen durchgeführt. PROMPT Streulichtmessungen wurden bei 463 nm durchgeführt, während die Messung der Probe (Decay) bei 517 nm durchgeführt wurde. Bei den PROMPT-Messungen wurde die Spaltbreite 8 eingestellt, bei den Decay-Messungen veränderte sich diese auf 32. Für die Lifetime-Messungen wurde ein Anregungswinkel von 90° und ein Emissions-Winkel von 57° eingestellt.

3.3.12 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Polysaccharid und Peptid wurden mittels ITC in einer Dreifachbestimmung näher untersucht.

Probenvorbereitung

Die ITC-Proben wurden ausnahmslos in 20 mM Tris-Puffer $\text{pH} = 7,4$ gelöst, welcher wie in Tabelle 7 beschrieben hergestellt wurde. Vor der Messung erfolgte das Entgasen der Proben für 5 min im Ultraschallbad. Titriert wurde 1 mM Peptid 19-2.5 gegen $0,22 \mu\text{M}$ Alginatlösung, $1,00 \mu\text{M}$ Pektinlösung oder $0,22 \mu\text{M}$ Chitosanlösung.

Durchführung der ITC-Messungen

Durchgeführt wurden die Titrations mit der Micro cal iTC 200 GE. Für die jeweilige Messung wurden 200 μl Peptid-Lösung in ein Reaktionsgefäß eingefüllt und daraus mit der Nadel aufgezogen. Die Polysaccharid-Lösung gelangte mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Reaktionskammer. Mit der Hamilton-Spritze wurden 350 μl Polysaccharid-Lösung aufgenommen. Mit 50 μl dieser Lösung wurden die Luftblasen aus der Spritze entfernt, 300 μl Probe wurden in die Reaktionskammer injiziert, von denen wiederum 50 μl mit den oben aufschwimmenden Luftblasen entnommen wurden.

Für die Messung werden die Konzentration der jeweiligen Polysaccharid- und Peptidlösung, eine Rührergeschwindigkeit von 500 rpm, eine Zelltemperatur von 37 °C eingestellt. Es werden 20 Injektionen im Abstand von 240 s mit einem Volumen von jeweils 1,5 μl durchgeführt. Die Injektionszeit beträgt dabei 3 s. Die Referenzenergie beträgt während der Messung 5 $\mu\text{cal}/\text{sec}$.

3.3.13 Freisetzung des Peptids aus den Polysaccharid-Peptid-Komplexen

Die Freisetzung des mit Polysacchariden komplexierten Peptids wurde unter verschiedenen Umgebungseinflüssen jeweils im Rahmen einer Dreifachbestimmung analysiert.

Für die Freisetzungsversuche wurde das Peptid, wie unter Abschnitt 3.3.4 „Verkapselung des Peptids mit Polysacchariden“ beschrieben, verkapselt. Die entstehenden Lösungen wurden 0,2 μm filtriert und mittels Trennung über eine C_{18} -Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion, wie bereits in Abschnitt 3.3.6 „Chromatographische Trennung von Peptiden, Peptidfragmenten und Polysacchariden mittels C_{18} -Säule“ beschrieben, auf ungebundenes Peptid getestet.

Freisetzung durch pH-Wert Änderung

Die Suspension der Polysaccharid-Peptid-Komplexe erfolgte nach der Zentrifugation in 300 μl Säure, Base oder Puffer während der Inkubation bei 37 °C und 1400 rpm im Thermomixer. Für den Start der pH-Messreihe fungierte 0,1 M HCl mit dem pH-Wert 1,0. Für die pH-Werte von 2,0 bis 13,0 wurden die in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Puffer als 1:10 Verdünnung verwendet. 0,1 M NaOH fungierte als Endpunkt der pH-Reihe mit dem pH-Wert 14,0. Die Peptid-Freisetzung wurde stündlich zwischen den Zeitpunkten $t = 0$ min und $t = 300$ min mittels Trennung über eine C_{18} -Säule und anschließende Fluoreszenzdetektion kontrolliert.

Freisetzung durch Tensid Zugabe

Bei Triton X-100 handelt es sich um ein nichtionisches Tensid, welches in der vorliegenden Arbeit als Vertreter der Tensid-Stoffklasse steht.

Durchgeführt wurden die Versuche mit einer 100 μM wässrigen Triton X-100-Lösung. Die verschiedenen Komplexe wurden in 300 μl Triton X-100-Lösung emulgiert und im Thermo-

mixer bei 37 °C und 1400 rpm inkubiert. Alle 60 min erfolgte in einem Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 300$ min die Probennahme.

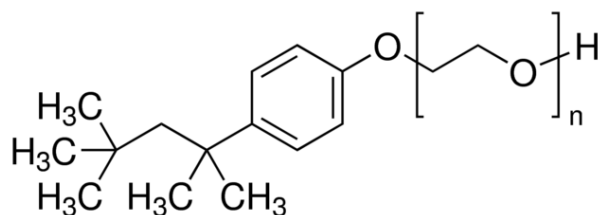


Abbildung 19: Strukturformel des nichtionischen Tensids Triton X-100 [163].

Enzymatische Freisetzung durch Carbohydrasen

Die Betrachtung der enzymatischen Spaltung der Polysaccharid-Peptid-Komplexe erfolgte im simulierten Magen-Darm-Trakt, für welchen die in Tabelle 12, 13 und 14 beschriebenen Puffer verwendet wurden. Die Inkubation der Komplexe in den Puffern erfolgte unter stündlicher Kontrolle auf Peptid-Freisetzung mittels der zuvor beschriebenen (Tabelle 16) Fluoreszenzdetektion samt vorheriger Trennung über eine C_{18} -Säule. Die Inkubationstemperatur war bei den verschiedenen Inkubationen mit 37 °C identisch, ebenso wie das Schwenken bei 500 rpm im Thermomixer. Die jeweilige Probe war in 300 μ l Puffer enthalten. Zuerst erfolgte eine dreistündige Inkubation in Magen-Puffer, anschließend folgte eine Zentrifugation bei 17.000 x g und 4 °C. Der Zentrifugations-Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgte eine einstündige Inkubation im Pankreas-Puffer, gefolgt von der zuvor beschriebenen Zentrifugation und anschließender dreistündiger Inkubation in Darm-Puffer.

Parallel erfolgte die Durchführung von Versuchen mit 100 μ M Peptid 19-2.5. Diese wurde jeweils lediglich in einem Puffer durchgeführt, da das Peptid nicht abzentrifugiert werden konnte wie die Polysaccharid-Peptid-Komplexe.

3.3.14 Tumornekrosefaktor- α -Enzymimmunoassay

Die biologische Aktivität der Polysaccharid-Peptid-Komplexe ist im Vergleich mit dem unkomplexierten Peptid mittels einer LPS-induzierten Stimulierung mononukleärer Zellen zu bestimmen. Diese Untersuchung wurde mit den Zellen von drei verschiedenen Spendern durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die Herstellung der Polysaccharid-Peptid-Komplexe folgte wie in Abschnitt 3.3.4 „Verkapselung des Peptids mit Polysacchariden“ beschrieben. Die Herstellung der O/W-Emulsion Alginat-Peptid-Komplexe mit einem molaren Verhältnis von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) erfolgte zweimal mit und zweimal ohne Calciumchlorid-Zugabe. Sonifizierte Alginat-Peptid-Komplexe 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) wurden in achtfacher Ausführung mit Calciumchlorid hergestellt, ebenso wie die Ansätze ohne Calciumchlorid.

Die Pektin-Peptid-Partikel O/W-Emulsion wurde in vierfacher Ausführung angesetzt. Um

ein molares Verhältnis von 1:110 ([Pektin]:[Peptid]) erreichen zu können, wurde für die Proben ohne Calciumchlorid ein molares Verhältnis von 1:190 ([Pektin]:[Peptid]) eingesetzt und für die Proben mit Calciumchlorid ein molares Verhältnis von 1:260 ([Pektin]:[Peptid]). Diese eingesetzten molare Verhältnisse galten ebenfalls für die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe, welche jeweils in vierfacher Ausführung angesetzt wurden.

Durchführung des Tumornekrosefaktor- α -Enzymimmunoassays

Der Tumornekrosefaktor- α -Enzymimmunoassay (engl. *Tumor Nekrosis Factor- α -Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, TNF- α -ELISA) wurde wie folgt durchgeführt. Die Durchführung wurde bereits von Brandenburg et al. 2003 [164] publiziert und ist ein Test auf biologische Wirksamkeit des Peptids, der häufig angewendet wird [1] [12].

Das Testsystem beinhaltet die Stimulierung von Humanen Mononukleären Zellen (MNC) durch LPS. Die MNC stammten aus dem Blut gesunder Spender. Zur Gerinnungsverhinderung enthielt das Blut den Gerinnungshemmer Heparin (20 IU/ml). Zu den isolierten MNC wurde das gleiche Volumen Hanks-Gleichgewichts Lösung gegeben. Diese Mischung wurde mit einem Ficoll Dichte-Gradienten für 40 min mit 500 x g bei 21 °C zentrifugiert. Die entnommene Zwischenschicht der MNC wird zweimal mit Hanks Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte das Emulgieren der Zellen in serumfreies RPMI 1640 Medium, welches 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin enthielt. Anschließendes Resuspendieren der Zellen mit einer Zellzahl von 5×10^6 /ml erfolgte in serumfreiem Medium.

Die Stimulierungsversuche benötigten 200 μ l MNC Suspension (1×10^6 Zellen) pro Well einer 96-Well-Kulturplatte.

Als Stimulation wurde LPS von *S. minnesota* R60 verwendet und der inhibierende Einfluss von Peptid und Polysaccharid-Peptid-Komplexen getestet. Das LPS wurde in HEPES-Puffer gelöst. Die Vorbereitung der Stimulatoren benötigte eine 30 min Inkubation bei 37 °C. 20 μ l des jeweiligen Stimulators wurden zur Zellkultur gegeben. Die Platteninkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C unter 5 % CO₂ Zugabe. Die Zellen exprimierten den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in den Zellüberstand. Nach der Inkubation folgte die Zentrifugation der Platte für 10 min bei 400 x g. Eine Lagerung des Zellüberstandes kann an dieser Stelle bei -20 °C erfolgen.

Die immunologische Bestimmung der TNF- α -Konzentration erfolgte mit einem Sandwich-ELISA. TNF bindet über dem Monoklonalen Antikörper clone 6b Coating an eine 96-Well-Platte. Der Zellkulturüberstand und der verwendete rekombinante TNF (rTNF) Standard wurden identisch in Puffer gelöst. Standard und Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen auf die Platte gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Kaninchen anti-human TNF- α Ig-Peroxidase Konjugat, welches an TNF bindet.

Die Proben reagierten innerhalb von 16 - 24 h unter Schwenken bei 4 °C. Die ungebundenen Antikörper wurden durch sechsmaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Ge-

startet wird die Farbreaktion durch Zugabe von Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxid in alkoholischer Lösung. Nach 5 - 15 min wird die Farbreaktion durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure beendet. Die photometrische Bestimmung des Produkts der Farbreaktion erfolgte bei 450 nm mit einem ELISA *Reader*. Die Messwerte bezogen sich immer auf den Standard, der auf derselben Platte mit gemessen wurde.

Die Genehmigung zur Versuchsdurchführung mit humanem Blut und Blutbestandteilen wurde durch das Votum der Universität zu Lübeck Ethikkommission, unter dem Aktenzeichen (Blutspenden): 11-061, erteilt.

4 Ergebnisse & Diskussion

4.1 Die Charakterisierung der Ausgangsstoffe

Wie in der Problemstellung eingeführt, sollten zunächst folgende Aspekte untersucht werden:

- Welche molare Masse, Polydispersität und hydrodynamischen Radius besitzen die verwendeten Polysaccharide?
- Ist Peptid 19-2.5 in Lösung stabil?
- Besitzt Peptid 19-2.5 eine Sekundärstruktur und wird eine mögliche Sekundärstruktur durch Umgebungseinflüsse oder die Bindung an Polysaccharide verändert?

4.1.1 Polysaccharid-Charakterisierung

Die Charakterisierung der verwendeten Polysaccharide erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie und anschließender Dreifachdetektion. Bei den in Tabelle 19 dargestellten Ergebnissen handelt es sich jeweils um die Mittelwerte samt Standardabweichung aus einer Vierfachbestimmung.

Tabelle 19: Ergebnisse der Polysaccharid Charakterisierung, n = 4.

Poly-saccharid	Massenmittel der molaren Masse Mw /kDa	Polydispersität (Mw/Mn)	Intrinsische Viskosität IV /(dl/g)	Hydrodynamischer Radius R_h /nm
Alginat	457,5 ± 23,7	1,3 ± 0,1	14,2 ± 0,1	45,0 ± 0,8
Pektin	621,3 ± 13,1	2,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1	31,7 ± 0,6
Chitosan	83,8 ± 1,7	2,1 ± 0,1	4,7 ± 0,1	25,2 ± 0,5

Bei dem verwendeten Chitosan handelt es sich laut gemessener molarer Masse (83,8 kDa) und dem bestimmten hydrodynamischen Radius (25,2 nm), um das kleinste der drei Polysaccharide. Pektin hingegen besitzt mit 621,3 kDa die höchste molare Masse, weist allerdings nicht den größten hydrodynamischen Radius auf. Alginat besitzt mit 45,0 nm den größten hydrodynamischen Radius, gefolgt von Pektin mit 31,7 nm und Chitosan mit 25,2 nm. Die molare Masse von Alginat ist mit 457,5 kDa mehr als fünf Mal so groß wie die molare Masse des Chitosans (83,8 kDa). Damit könnten Alginat und Pektin vom Immunsystem eher erkannt werden als Chitosan. Andererseits weisen Alginat und Pektin durch die höhere Anzahl an Monomereinheiten wesentlich mehr mögliche Bindungsstellen auf als das Chitosan.

4.1.2 Veränderung der Primärstruktur von Peptid 19-2.5 in Lösung

Um die Frage zu klären, ob das Peptid 19-2.5 in Lösung stabil ist, wird dieses auf Peptid-Fragmente und der Zusammenlagerung von zwei oder mehreren Peptiden untersucht. Mit einer Vetex Plus Säule 250 x 4 mm Eurosil Bioselect 300-5 C₁₈A (im Folgenden C₁₈-Säule genannt) lässt sich Peptid 19-2.5 von eventuellen Peptid-Fragmenten, sowie Peptid-Aggregaten trennen. Die Veränderung der Primärstruktur wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen im Rahmen einer Dreifachbestimmung analysiert. Die Untersuchung ergab, dass das Peptid bei drei verschiedenen Temperaturen (5 °C, 20 °C und 50 °C) in Wasser stabil ist. Nach vier Tagen nimmt die Peakfläche des in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung gelösten Peptids ab, wobei diese bei einer Inkubationstemperatur von 50 °C am stärksten abnimmt. Fragmente können allerdings nicht nachgewiesen werden, was auf eine Veränderung der Sekundärstruktur schließen lässt. Das Peptid scheint in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung demnach vier Tage stabil zu sein. Die geringere Peakfläche der in Natriumchlorid gelösten Probe ist durch *Quenching* des Peptids in dieser Lösung erklärbar. Das in NaCl-Lösung gelöste Peptid zeigt lediglich 50 % der Peakfläche des in Wasser gelösten Peptids.

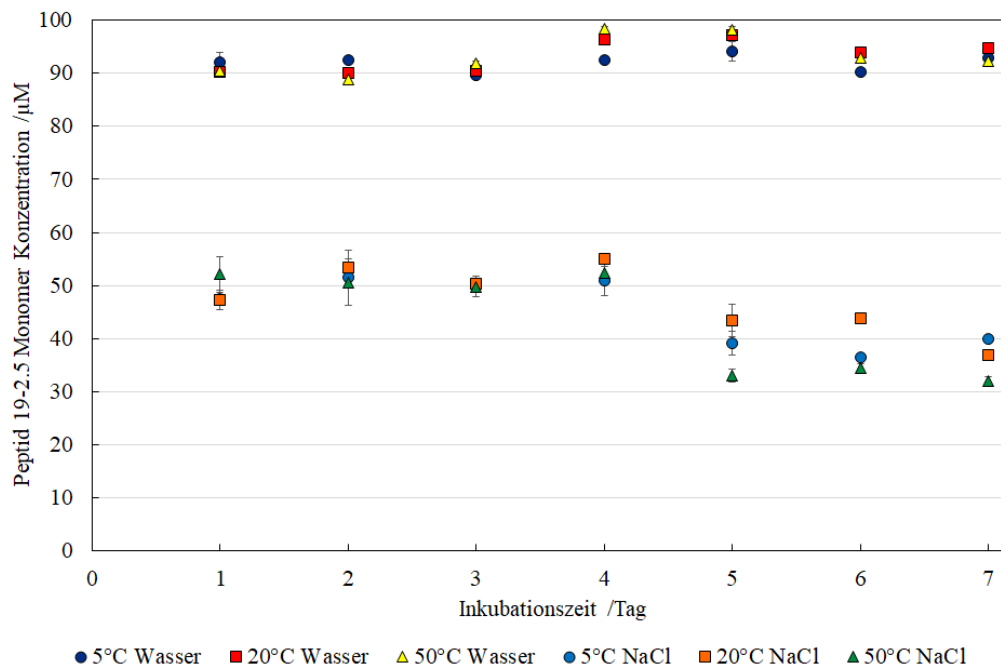


Abbildung 20: Untersuchung des Peptids in Wasser und 0,9 % Natriumchlorid-Lösung auf Veränderung der Primärstruktur. Das Peptid 19-2.5 soll in Wasser und 0,9 % Natriumchlorid-Lösung nicht hydrolisieren und sich nicht zu Agglomeraten zusammenlagern. Während der Messung über sieben Tage bei drei verschiedenen Temperaturen (5 °C, 20 °C und 50 °C) konnten im Rahmen einer Dreifachbestimmung bei allen Temperaturen keine Peptid-Fragmente oder Agglomerate nachgewiesen werden. Die geringere Peakfläche in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung ist auf *Quenching* zurückzuführen.

4.1.3 Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptid 19-2.5

Ob Peptid 19-2.5 eine Sekundärstruktur ausbildet wurde mittels CD-Spektroskopie im Rahmen einer Dreifachbestimmung untersucht.

Die aufgenommenen Spektren des CD-Spektrometers zeigen für Peptid 19-2.5 lediglich bei drei verschiedenen pH-Werten eine Sekundärstruktur. Das Peptid bildet in Phosphat-Puffer pH = 7,0 eine Sekundärstruktur mit 45 % β -Faltblatt-Anteil und 35 % random coil aus. In Glycin-Puffer mit pH = 11,0 und 12,0 bildet das Peptid hauptsächlich eine α -Helix-Struktur aus. Die Messergebnisse sind im Anhang in Tabelle 37 dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sekundärstruktur von Peptid 19-2.5 abhängig von den Umgebungseinflüssen variiert.

4.1.4 Diskussion: Charakterisierung des Peptids, der Polysaccharide und der Komplexe

Der Unterschied in der Fluoreszenzintensität des Peptids, gelöst in Wasser oder Natriumchlorid-Lösung, geht höchstwahrscheinlich auf den Einfluss des Chlorids zurück. Chlorid ist in der Lage als Fluoreszenz-Quencher zu fungieren [132].

Das Alginat hat von den drei Polysacchariden mit 45 nm den größten hydrodynamischen Radius, wobei Pektin das Polysaccharid mit der höchsten molaren Masse (621,3 kDa) ist. Alginat besteht aus Guluronsäure und Mannuronsäure, welche in Paley-Puffer bei pH = 6,8 negativ geladen sind, ebenso wie die in Pektin enthaltene D-Galakturonsäure. Der Unterschied zwischen diesen beiden Polysacchariden liegt in der Struktur. Während es sich bei Alginat um ein eher lineares Polysaccharid handelt, ist Pektin ein verzweigtes Polysaccharid. Daher könnte der hydrodynamische Radius des linearen Alginats größer sein als der hydrodynamische Radius des verzweigten Pektins, welches sich zu einer Knäuelstruktur zusammenlagern könnte.

Chitosan ist in Acetat-Puffer bei pH = 4,8 positiv geladen [101] und ebenso wie das Alginat unverzweigt. Jedoch ist das Molekül so klein, dass der hydrodynamische Radius (25,2 nm) und die molare Masse (83,8 kDa) des Polymers am kleinsten sind.

Das in dieser Arbeit verwendete Alginat stammt aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum*. Es weist eine molare Masse von 457,5 kDa, eine Polydispersität von 1,3 und einen hydrodynamischen Radius von 45,0 nm auf. In einigen publizierten Arbeiten wird kommerziell erworbenes Alginat verwendet. Es gibt Veröffentlichungen mit nicht weiter charakterisierten Alginaten [77] [78] [80] [83] [84] [105]. Das kommerziell zu erwerbende Alginat wird meistens aus Braunalgen gewonnen [165]. Bei diesen Braunalgen kann es sich laut Pereira et al. um *Laminaria*, *Ascophyllum nodosum*, *Lessonia*, *Alaria*, *Ecklonia*, *Eisenia*, *Nereocystis*, *Sargassum*, *Cysterira*, *Fucus* und *Macrocystis pyrifera* handeln [165]. Rosas-Flores et al. nennt zusätzlich *Laminaria hyperborean*, sowie *Laminaria digitata* und *Laminaria japonica* [78]. Bakterien sind

ebenfalls in der Lage Alginat als Biofilm zu produzieren. Zu solchen alginatproduzierenden Spezies zählen die *Pseudomonas*-Spezies, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* [45] [78], *Azotobacter vinelandii* [78], *Macrocystis pyrifera* [166], *Laminaria digitata* [166] und *Laminaria saccharina* [166].

Die in der Literatur angegebenen molekularen Massen für Alginat streuen über einen Bereich von 100 kDa bis hin zu 400 kDa. Diese molaren Massen (M_w) könnten vom herstellenden Organismus abhängen, welcher jedoch nicht immer angegeben ist. Sapir et al. beschreibt Natrium-Alginat mit $M_w = 100$ kDa und mit einem Galakturonsäure-Anteil von über 65 % [79]. Ein kommerziell erworbenes Alginat mit 60 % Galakturonsäure-Gehalt besitzt eine molare Masse von 200 - 300 kDa [3]. Shin et al. beschreibt Natrium-Alginat aus Braunalgen mit einer molaren Masse von $M_w = 200 - 300$ kDa [82]. Venkatesan et al. beschreiben für kommerziell erworbene Alginat molare Massen zwischen 32 kDa und 400 kDa [167]. Die zuvor genannten Alginat könnten alle aus Braunalgen stammen. Genauere Angaben dazu liegen nicht vor.

Damit liegt das in dieser Arbeit verwendete Alginat, mit seiner molaren Masse von $M_w = 457,5$ kDa, oberhalb der Literaturwerte. Auf Polydispersität des Alginats wird in der Literatur nicht weiter eingegangen. Doch bei den breiten Molmassenbereichen kommerzieller Alginat muss die Polydispersität weit entfernt von der Polydispersität (1,3) des hier verwendeten Alginats liegen. Das bedeutet, dass die in der Literatur [3] [82] [167] verwendeten Alginat deutlich inhomogener sind als das hier verwendete Alginat. Ein hydrodynamischer Radius ist für die zitierten Alginat nicht angegeben. Das bedeutet, dass ein Vergleich mit den Literaturwerten äußerst fragwürdig ist, wenn molare Massen, Polydispersität und hydrodynamischer Radius nicht angegeben sind. Diese charakteristischen Eigenschaften besitzen Einflüsse auf die Löslichkeit, Biokompatibilität, Bioverfügbarkeit, den Weg auf den das Polymer aus dem Körper ausgeschieden wird und auf die Interaktion mit dem Immunsystem [68] [69] [70] [71]. Die Größe der entstehenden Alginat-Wirkstoff-Komplexe hat einen entscheidenden Einfluss auf die Verteilung im Körper und die Interaktion mit Zellmembranen [72], ebenso wie für die detaillierte Struktur-Aktivitäts-Korrelation zwischen Alginat und Wirkstoff [70]. Gleiches gilt für alle Polysaccharide.

Das polymolekulare und polydisperse Pektin ist in der Literatur mit einer molaren Masse von $M_w = 50 - 150$ kDa angegeben [90]. Die Seitenketten des Pektins können aus hundert bis tausenden Saccharid-Einheiten bestehen [90]. Kommerziell erworbenes Citruspektin weist hingegen eine molare Masse von $M_w = 227$ kDa auf und das Pektin der Beangalischen Quitte vom *A. marnelos* Baum $M_w = 173$ kDa [89]. Diese Werte weisen auf eine Abhängigkeit der molaren Masse vom Pektin Ursprung hin. In einer anderen Veröffentlichung wird Citruspektin mit einer molaren Masse von 30 bis 100 kDa angegeben [168].

In dieser Arbeit findet Zuckerrübenpektin aus *Beta vulgaris* Verwendung. Dieses besteht in den Seitenketten aus Galaktose, Arabinose und Rhamnose [94]. Die molare Masse beläuft sich auf 621,3 kDa. Diese molare Masse ist ein vielfaches der publizierten molaren Massen [89] [90] [168]. Dabei kann bei dem Zuckerrübenpektin keineswegs die Rede von einer hohen Polydispersität sein. Mit einer Polydispersität von 2,1 ist diese zwar höher als die des Algi-

nats (1,3), trotzdem ist diese Polydispersität für ein solch verzweigtes Polysaccharid gering. Wan et al. publizierte, dass kommerziell erworbene Chitosane folgende Molmassen besitzen: hohe Molmasse $M_w = 1240$ kDa und geringe Molmasse $M_w = 400$ kDa [169]. Bekale et al. beschreibt hingegen Chitosane mit einer molare Masse von 15 kDa, 100 kDa und 200 kDa für kommerziell erworbene Chitosane mit einem Deacetylierungsgrad von jeweils 90 % [170]. Das in dieser Arbeit verwendete Chitosan (83,8 kDa) kommt der Angabe in der Veröffentlichung von Saladini et al. näher, welche für Chitosan eine molare Masse von 110 kDa bis 150 kDa beschreibt [168]. Die molare Masse und Polydispersität für Quartäres Ammonium-Palmitol-Glycol-Chitosan (GCPQ) sind samt Polydispersität angegeben. Mit dem Anstieg der Untereinheiten von sechs bis zu 50, steigt die molare Masse 6,0 kDa bis 40,5 kDa und die Polydispersität steigt von 1,11 auf 1,48 [102].

Das in dieser Arbeit verwendete Chitosan gehört zu den Chitosanen mit geringer molarer Masse. Das zeigen neben den Herstellerangaben auch die GPC-Messungen, welche eine molare Masse von 83,8 kDa ergaben. Lalatsa et al. [102] gibt hingegen eine geringere Polydispersität für Chitosane an. Die Polydispersität des verwendeten Chitosans beträgt 2,1.

Peptide, als auch Proteine, besitzen eine hoch flexible Sekundärstruktur. Diese Struktur lässt sich durch Temperaturunterschiede, Druckvariation, pH-Werte und Denaturierung verändern [171]. Bei Proteinen besteht die Gefahr, dass sie durch hohe Salzkonzentrationen, wie z.B. beim Ausfällen durch Salze, denaturiert werden. Das spricht dafür, dass auch Salze in der Lage sein könnten die Sekundärstruktur des Peptids zu verändern. Nguyen et al. beschrieb bereits 2010 die Inaktivierung eines Arginin- und Tryptophanreichen Hexapeptids durch physiologische Salzkonzentrationen [172]. Durch physiologische Salzkonzentrationen kommt es nicht zu einer Inaktivierung von Peptid 19-2.5, denn es ist per Infusion in einer Natriumchlorid-Lösung verabreicht *in vivo* in einem Mausmodell wirksam [42].

Die CD-Spektren des Peptids in reinem Wasser und in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung konnte keinem Sekundärstruktur-Element zugeordnet werden. Die CD-Spektren sind im Anhang in Abbildung 62 und 63 dargestellt.

Es ist beschrieben, dass Oligo- und Polysaccharide die Sekundärstruktur von Peptiden beeinflussen können [45] [105] [171] [173]. Alginat ist laut der in dieser Arbeit durchgeführten CD-Messungen in der Lage eine Sekundärstrukturausbildung des Peptids in 0,1 M Salzsäure und Citrat-Puffer pH = 2,0 zu begünstigen. Bei den anderen pH-Werten ist keine Sekundärstruktur bestimmbar. Pektin hingegen zeigt seinen Einfluss in Citrat-Puffer bei pH = 6,0, indem es ähnlich wie 150 mM NaCl-Lösung eine Sekundärstrukturausbildung begünstigt. In Phosphat-Puffer pH = 7,0 gelöst bildet das Peptid in Gegenwart von Pektin ebenfalls eine Sekundärstruktur aus.

Aus der Sekundärstrukturabschätzung des Peptids geht klar hervor, dass das Peptid seine Sekundärstruktur in Abhängigkeit von seiner Umgebung verändert. Eine direkte Korrelation zwischen einer bestimmten Sekundärstruktur und dem Einfluss eines Polysaccharids ist nicht zu erkennen.

4.2 Die Bindungsstöchiometrie der Peptid-Polysaccharid-Komplexe

Es ist zu untersuchen, ob Peptide und Polysaccharide miteinander Komplexe bilden. An dieser Stelle liegt der Fokus auf dem molaren Verhältnis, in dem sich Peptide und Polysaccharide zusammenlagern:

- Ist Peptid 19-2.5 in der Lage an die ausgewählten Polysaccharide zu binden?
- Mit welcher Bindungsstöchiometrie bindet das jeweilige Polysaccharid Peptid 19-2.5?
- Aus wie vielen Polysaccharid- und Peptid-Molekülen besteht ein Polysaccharid-Peptid-Komplex?

In diesem Zusammenhang beschreibt die Bindungsstöchiometrie, das molare Verhältnis in dem Polysaccharid und Peptid miteinander wechselwirken.

4.2.1 Bestimmung der Bindungsstöchiometrie der Polysaccharide für Peptid 19-2.5, ermittelt aus der Konzentration des freien Peptids

Die Bindung zwischen dem jeweiligen Polysaccharid und Peptid lässt sich mittels Fluoreszenzdetektion bestimmen, indem der Überstand der Komplexe durch eine 0,2 μm Filtration und die Trennung über eine C_{18} -Säule auf freies Peptid untersucht wird. Diese Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Alginat-Peptid-Komplexe zeigen zwischen einem eingesetzten molaren Verhältnis von 1:50 bis 1:500 ([Alginat]:[Peptid]), angesetzt in 50er-Schritten, ab einem Bindungsverhältnis von 1:350 ([Alginat]:[Peptid]) ist nachweisbares freies Peptid in Lösung. Mit der Konzentration an gemessenem und damit ungebundenem Peptid lässt sich durch Substraktion (siehe Gleichung 14 in Abschnitt 3.3.7) auf eine Bindungsstöchiometrie von [Alginat]:[Peptid] $1:224 \pm 5$ zurückrechnen.

Die untersuchten Bindungsverhältnisse der Pektin-Peptid-Partikel zeigt ein anderes Verhalten als die Alginat-Peptid-Partikel. In Abbildung 21 ist das eingesetzte molare Verhältnis und das, aus der Konzentration des freien Peptids ermittelte, Bindungsverhältnis dargestellt.

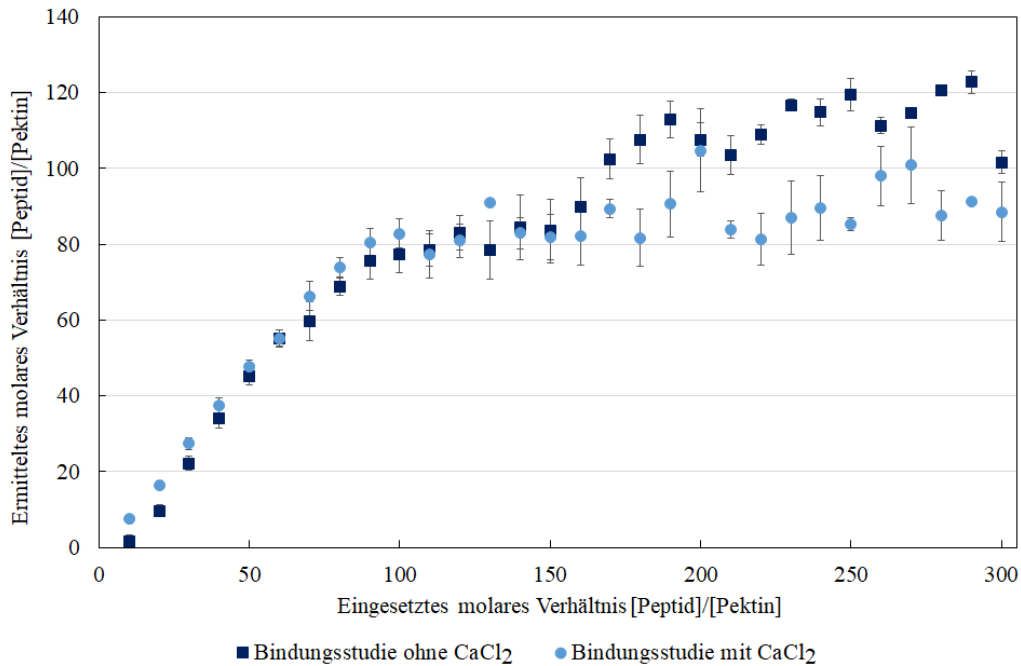


Abbildung 21: Bindungsstöchiometrie der Pektin-Peptid-Komplexe mittels Tennung über eine C_{18} -Säule mit anschließender Fluoreszenzdetektion. Die ermittelten molaren Verhältnisse sind samt Standardabweichung gegen die eingesetzten molaren Verhältnisse aufgetragen. Dabei wurde die Konzentration des Peptids in jedem Schritt um $10 \mu\text{M}$ erhöht. Dargestellt sind die Ergebnisse der Dreifachbestimmung samt Standardabweichung.

Diese Darstellung zeigt, dass das Peptid für eine Bindung zwischen Peptid und Pektin im molaren Überschuss vorliegen muss. Es scheinen sich zwei Gleichgewichte der molaren Bindungsstöchiometrie einzustellen. Unter der Verwendung von Calciumchlorid liegt die ermittelte Bindungsstöchiometrie bei einem eingesetzten Verhältnis von [Pektin]:[Peptid] zwischen 1:80 und 1:160 bei $1:81 \pm 4$. Dieses steigt auf ein mittleres Bindungsverhältnis von $1:89 \pm 7$ ([Pektin]:[Peptid]), wenn die eingesetzten Bindungsverhältnisse zwischen 1:170 und 1:300 ([Pektin]:[Peptid]) liegen.

Die Verwendung von Calciumchlorid scheint die als zweite ermittelte Bindungsstöchiometrie von $1:89 \pm 7$ ([Pektin]:[Peptid]) zu beeinflussen. Unter Ausschluss von Calciumchlorid entspricht das erste Gleichgewicht einer mittleren Bindungsstöchiometrie von $1:79 \pm 5$ ([Pektin]:[Peptid]) und liegt zwischen einem eingesetzten Bindungsverhältnis von 1:80 und 1:150 ([Pektin]:[Peptid]). Bei einem eingesetzten molaren Verhältnis von 1:160 ([Pektin]:[Peptid]) steigt die resultierende Bindungsstöchiometrie an, bis zwischen einem eingesetzten Verhältnis von 1:170 und 1:300 ([Pektin]:[Peptid]) eine mittlere Bindungsstöchiometrie von $1:112 \pm 7$ ([Pektin]:[Peptid]) resultiert.

Bei einem eingesetzten Chitosan-Peptid-Bindungsverhältnis von 1:1 ([Chitosan]:[Peptid]) ist das komplette eingesetzte Peptid nachweisbar und damit keine Bindung detektierbar.

4.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Gesamtergebnisse aus den ITC-Messungen sind in Kapitel 4.4.2 Charakterisierung der Wechselwirkungen mittels isothermer Titrationskalorimetrie dargestellt. Die ermittelten Bindungsstöchiometrien aus der ITC-Dreifachbestimmung soll hier vorab beschrieben werden und liegen für Alginat-Peptid-Komplexe bei $1:256 \pm 20$ ([Alginat]:[Peptid]) und für Pektin-Peptid-Komplexe bei $1:95 \pm 6$ ([Pektin]:[Peptid]). Zwischen Chitosan und Peptid ist die Detektion einer Bindung nicht möglich.

4.2.3 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Für die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) wird fluoreszenzmarkiertes Peptid 19-2.5 verwendet. Bei dem Fluoreszenzmarker handelt es sich um Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide. Die FCS-Messungen wurden als Dreifachbestimmung mit einem molaren Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:10 durchgeführt.

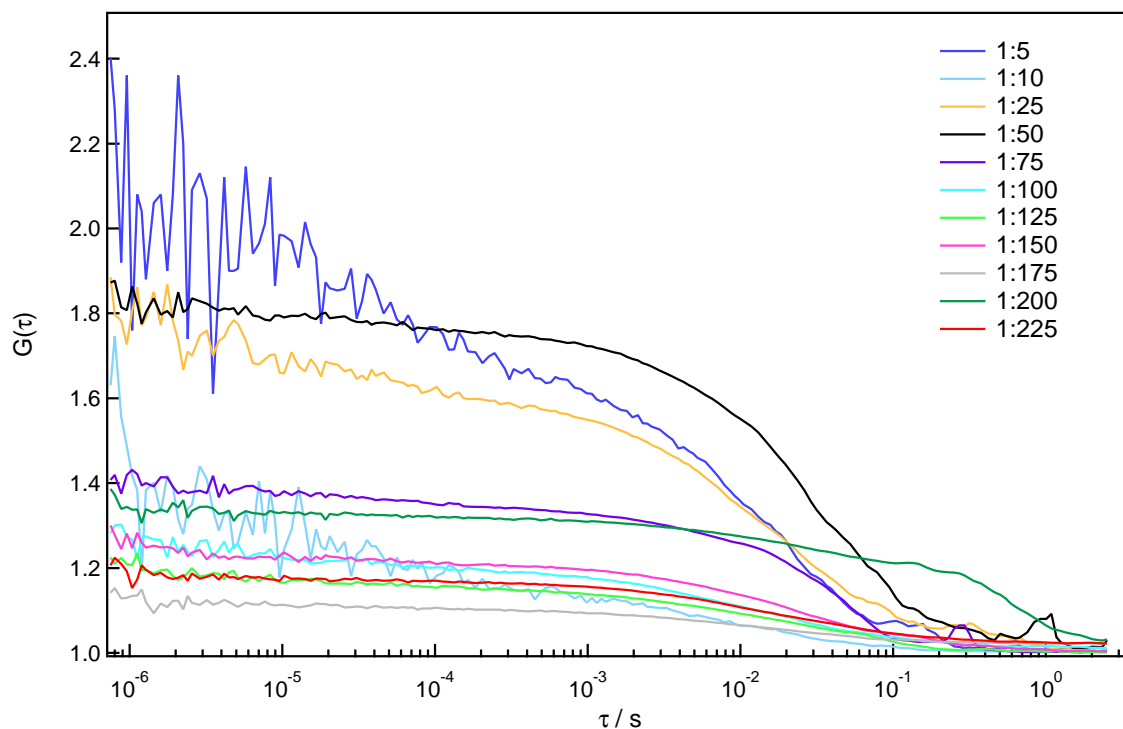


Abbildung 22: Beispielhafte Darstellung der aufgenommenen Korrelations-Kurven aus einer der drei FCS-Messungen von den Alginat-Peptid-Komplexen mit verschiedenen [Alginat]:[Peptid] Verhältnissen. In der Legende sind die jeweiligen eingesetzten [Alginat]:[Peptid] Verhältnisse dargestellt. Die Amplitude spiegelt umgekehrt proportional die Anzahl der Teilchen im Fokus wieder. Aus diesen Korrelations-Kurven lässt sich die Diffusionszeit grob abschätzen. Für eine genauere Auswertung werden diese jedoch mit Hilfe der AKF angepasst.

Abbildung 22 zeigt die verschiedenen Korrelations-Kurven der Alginat-Peptid-Komplexe mit den unterschiedlich eingesetzten molaren Verhältnissen. Direkt sichtbar ist die Anzahl der detektierten Teilchen anhand der umgekehrten Proportionalität zur Amplitude. Zudem können die Diffusionszeiten schon grob abgeschätzt werden, bevor die Kurven angepasst

werden. Die Parameter der Anpassung dieser Kurven mit Hilfe einer AKF sind in Tabelle 20 dargestellt.

Der Triplett-Zusand und die Triplett-Zeit wurden mit in die Tabelle aufgenommen, weil der Anteil der Moleküle, welche sich im Triplett-Zustand befinden, die AKF beeinflusst. Der Übergang von Molekülen in den Triplett-Zustand kann die Messung einer Intensitätsfluktuation zur Folge haben, welche schneller verläuft als die Diffusion. Damit zeigen Moleküle, welche in den Triplett-Zustand übergehen können, eine erhöhte Amplitude. Der Anteil einer Molekülspezies, welche sich im Triplett-Zustand befindet, ist für einen Komplex mit bestimmter Bindungsstöchiometrie charakteristisch. Die Triplett-Zeit kann einen Hinweis auf Agglomeration geben. Dieses ist der Fall, wenn die Triplett-Zeit ansteigt.

Tabelle 20: Mittelwerte aus drei Alginat-Peptid-Partikel FCS-Messungen.

Molares Verhältnis [Alg.] : [Pep.]	Teilchen- zahl N	Diffusions- koeffizient D/(m ² /s)	Triplett- Zustand T	Triplett- Zeit tt/s
1:5	2,7 ± 1,7	13 · 10 ⁻¹³ ± 4,9 · 10 ⁻¹³	0,43 ± 0,26	0,1 · 10 ⁻⁵ ± 0,0
1:10	4,7 ± 3,3	4,7 · 10 ⁻¹³ ± 0,11 · 10 ⁻¹³	0,00 ± 0,00	1,6 · 10 ⁻⁵ ± 0,36 · 10 ⁻⁵
1:25	2,0 ± 0,8	7,1 · 10 ⁻¹³ ± 2,1 · 10 ⁻¹³	0,21 ± 0,08	5,8 · 10 ⁻⁵ ± 2,6 · 10 ⁻⁵
1:50	2,0 ± 1,4	4,9 · 10 ⁻¹³ ± 3,7 · 10 ⁻¹³	0,18 ± 0,11	2,2 · 10 ⁻⁵ ± 1,3 · 10 ⁻⁵
1:75	5,3 ± 1,7	4,9 · 10 ⁻¹³ ± 1,9 · 10 ⁻¹³	0,12 ± 0,00	9,1 · 10 ⁻⁵ ± 6,1 · 10 ⁻⁵
1:100	8,3 ± 2,1	6,6 · 10 ⁻¹³ ± 1,1 · 10 ⁻¹³	0,15 ± 0,01	17 · 10 ⁻⁵ ± 8,6 · 10 ⁻⁵
1:125	8,3 ± 1,8	5,1 · 10 ⁻¹³ ± 0,5 · 10 ⁻¹³	0,15 ± 0,02	18 · 10 ⁻⁵ ± 14 · 10 ⁻⁵
1:150	9,6 ± 5,0	6,0 · 10 ⁻¹³ ± 2,9 · 10 ⁻¹³	0,13 ± 0,04	12 · 10 ⁻⁵ ± 4,3 · 10 ⁻⁵
1:175	13,0 ± 0,6	6,2 · 10 ⁻¹³ ± 2,4 · 10 ⁻¹³	0,17 ± 0,01	26 · 10 ⁻⁵ ± 17 · 10 ⁻⁵
1:200	9,7 ± 4,0	5,5 · 10 ⁻¹³ ± 3,9 · 10 ⁻¹³	0,16 ± 0,03	7,3 · 10 ⁻⁵ ± 0,1 · 10 ⁻⁵
1:225	6,7 ± 5,4	0,55 · 10 ⁻¹³ ± 0,057 · 10 ⁻¹³	0,29 ± 0,18	1153 · 10 ⁻⁵ ± 427 · 10 ⁻⁵

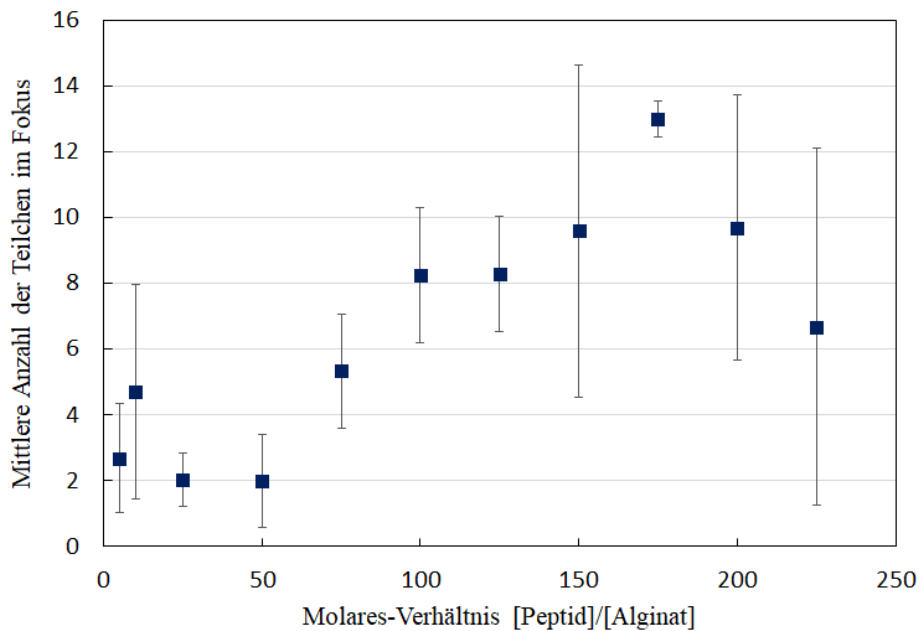


Abbildung 23: Darstellung der mittleren Anzahl der Teilchen im Fokus samt Standardabweichung aus den Messungen ($n=3$) der Alginat-Peptid-Komplexe. Die scheinbare Anzahl der Teilchen im Fokus steigt bis zu einem eingesetzten Alginat-Peptid-Verhältnis von 1:200 ([Alginat]:[Peptid]). Möglicherweise könnte es nach diesem Verhältnis zu einer Agglomeration der Teilchen kommen.

Die scheinbare Anzahl der Teilchen im Fokus steigt mit dem eingesetzten molaren Verhältnis von Peptid zu Alginat an. Das ist auf eine erhöhte Anzahl an Fluorophoren pro Partikel zurückzuführen. Ab einem molaren Alginat-Peptid-Verhältnis von 1:200 ([Alginat]:[Peptid]) nimmt die Anzahl der Teilchen im Fokus ab. Das könnte auf eine Agglomeration der Partikel hindeuten. Wenn es zu einer Agglomeration kommt, müsste die Helligkeit der Partikel theoretisch ansteigen. Die Helligkeit der Partikel ist unter Punkt 4.4.4 dargestellt. Die Helligkeit steigt deutlich ab einem Bindungsverhältnis von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) an.

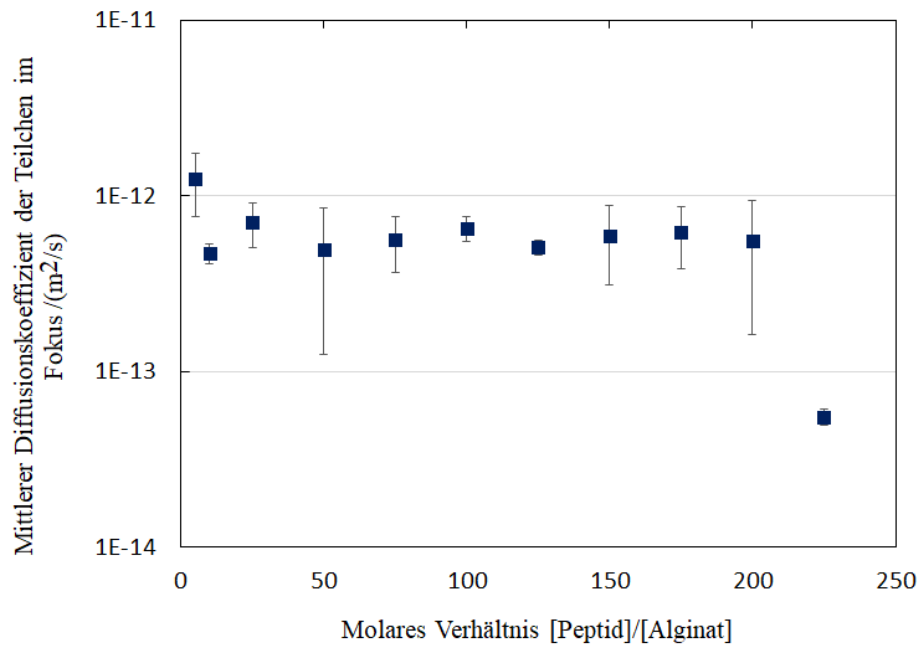


Abbildung 24: Logarithmische Auftragung des Diffusionskoeffizienten der Alginat-Peptid-Komplexe gegen das molare Bindungsverhältnis ($[Peptid]:[Alginat]$). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung ($n=3$) samt Standardabweichung. Eine drastische Abnahme des mittleren Diffusionskoeffizienten ist ab einem molaren Verhältnis von 1:225 ($[Alginat]:[Peptid]$) erkennbar.

Der mittlere Diffusionskoeffizient der Partikel sinkt drastisch, ab einem molaren Verhältnis von Alginat zu Peptid von 1:225. Das bedeutet, dass der hydrodynamische Radius der Partikel drastisch ansteigt.

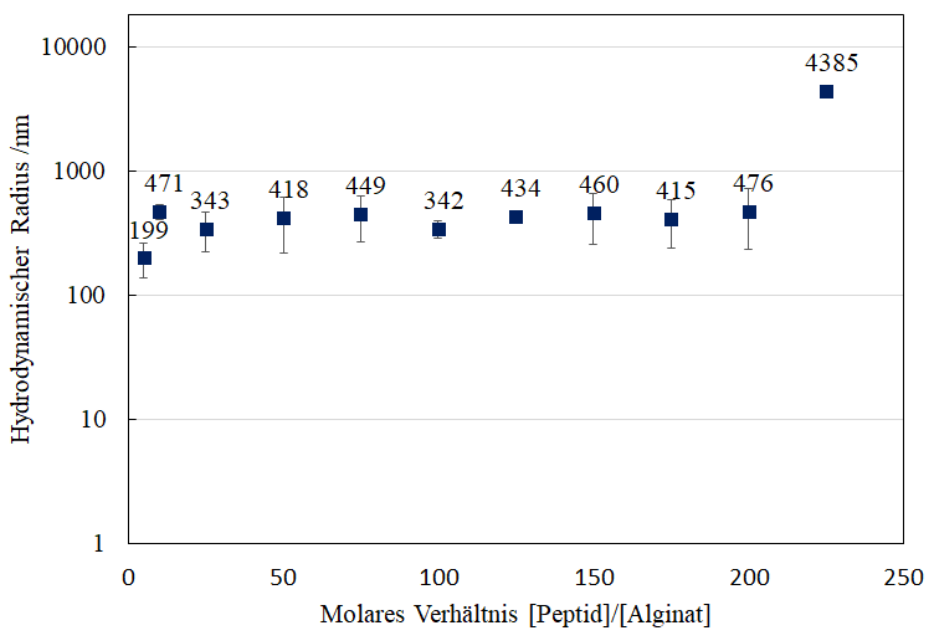


Abbildung 25: Dargestellt ist der mittlere hydrodynamische Radius samt Standardabweichung der Alginat-Peptid-Komplexe, abhängig vom molaren Verhältnis ($[Peptid]:[Alginat]$). Der hydrodynamische Radius kann über Gleichung 15 (Abschnitt 3.3.10) mit Hilfe der Diffusionszeit aus drei Experimenten ($n=3$) ermittelt werden.

Aus der mittleren Diffusionszeit lässt sich der hydrodynamische Radius der Alginate-Peptid-Komplexe berechnen. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

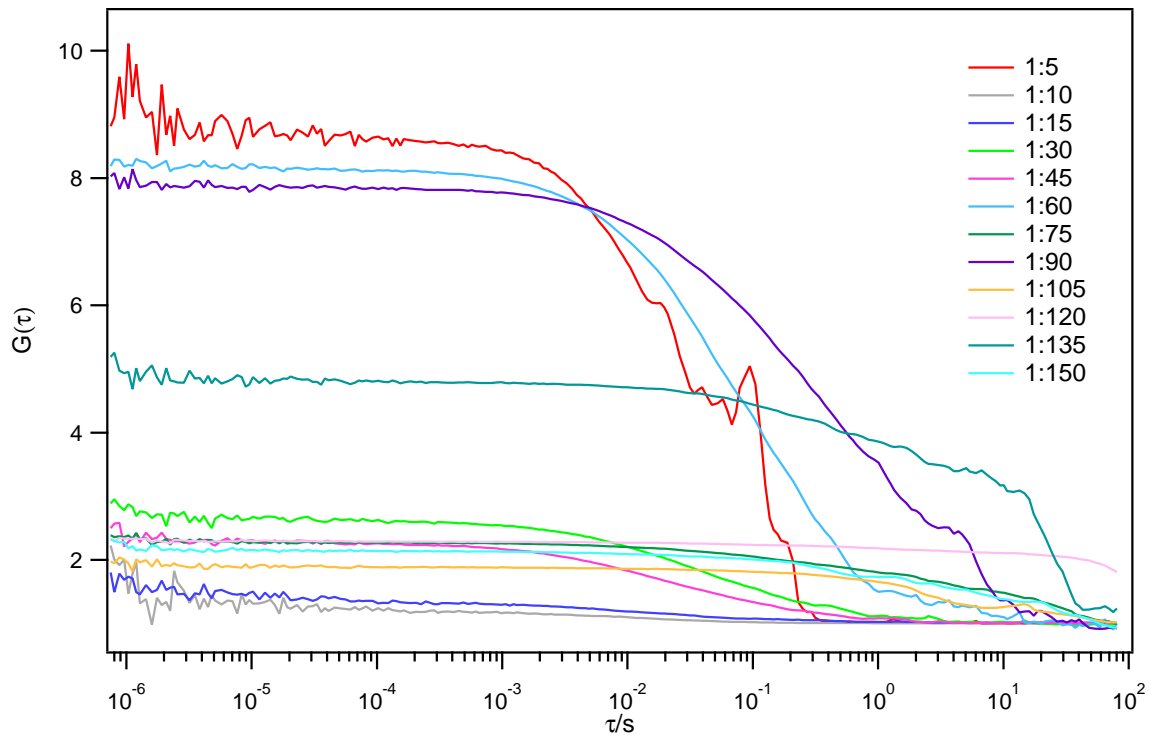


Abbildung 26: Beispielhafte Darstellung der aufgenommenen Korrelations-Kurven aus einer der drei FCS-Messungen von den Pektin-Peptid-Komplexen mit verschiedenen [Pektin]:[Peptid] Verhältnissen. In der Legende sind die jeweiligen eingesetzten [Pektin]:[Peptid] Verhältnisse dargestellt. Die Amplitude spiegelt umgekehrt proportional die Anzahl der Teilchen im Fokus wieder. Aus diesen Korrelations-Kurven lässt sich die Diffusionszeit grob abschätzen. Für eine genauere Auswertung werden diese jedoch mit Hilfe der AKF angepasst.

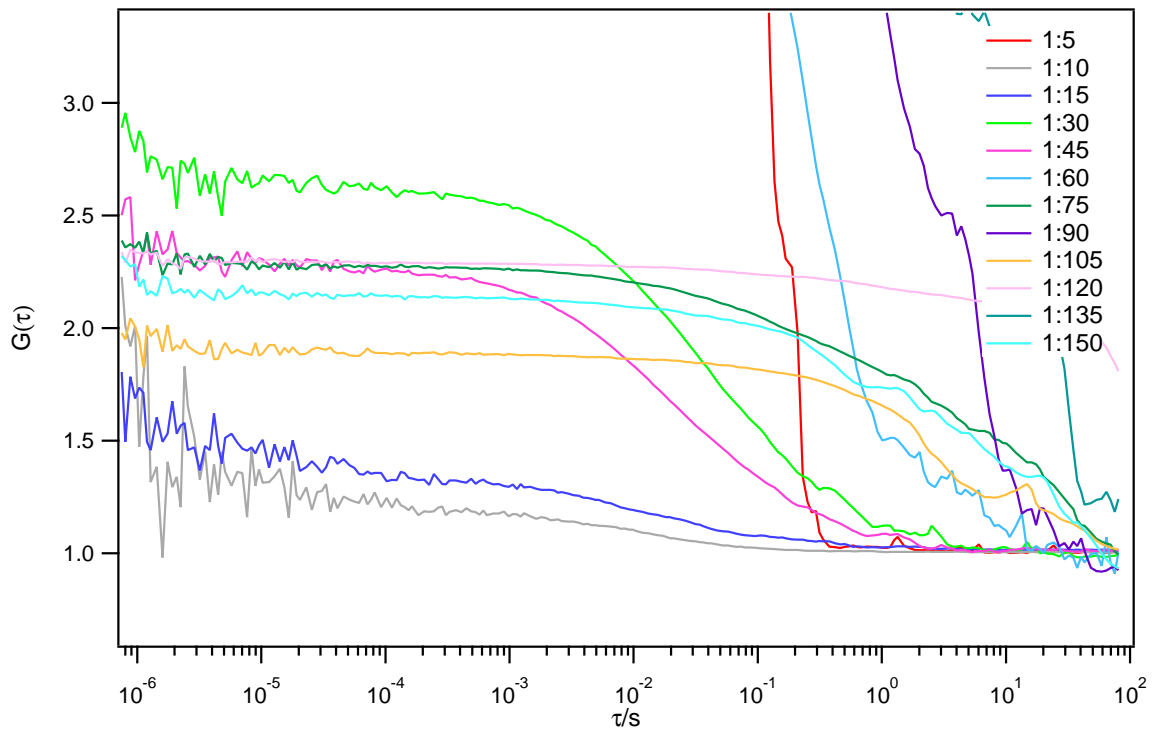


Abbildung 27: Eine Vergrößerung der aufgenommenen Korrelations-Kurven auf Abbildung 26. In der Legende sind die jeweiligen eingesetzten [Pektin]:[Peptid] Verhältnisse dargestellt.

Abbildung 26 zeigt die verschiedenen Korrelations-Kurven der Pektin-Peptid-Komplexe mit den unterschiedlich eingesetzten molaren Verhältnissen. Ein vergrößerter Ausschnitt dieser Abbildung ist in Abbildung 27 dargestellt. Direkt sichtbar ist die Anzahl der detektierten Teilchen anhand der umgekehrten Proportionalität zur Amplitude. Zudem können die Diffusionszeiten schon grob abgeschätzt werden, bevor die Kurven angepasst werden. Die Parameter der Anpassung dieser Kurven mit Hilfe einer AKF sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Mittelwerte aus drei Pektin-Peptid-Partikel FCS-Messungen.

Molares Verhältnis [Pek.] : [Pep.]	Teilchenzahl N	Diffusionskoeffizient $D/(m^2/s)$	Triplet-Zustand T	Triplet-Zeit tt/s
1:5	$0,27 \pm 0,12$	$3,4 \cdot 10^{-13} \pm 1,4 \cdot 10^{-13}$	$0,15 \pm 0,01$	$3,0 \cdot 10^{-3} \pm 2,9 \cdot 10^{-3}$
1:10	$4,1 \pm 1,2$	$8,7 \cdot 10^{-13} \pm 2,6 \cdot 10^{-13}$	$0,34 \pm 0,08$	$0,099 \cdot 10^{-3} \pm 0,033 \cdot 10^{-3}$
1:15	$1,5 \pm 1,3$	$3,4 \cdot 10^{-13} \pm 2,5 \cdot 10^{-13}$	$0,26 \pm 0,12$	$16 \cdot 10^{-3} \pm 22 \cdot 10^{-3}$
1:30	$0,85 \pm 0,23$	$2,1 \cdot 10^{-13} \pm 0,78 \cdot 10^{-13}$	$0,20 \pm 0,09$	$4,2 \cdot 10^{-3} \pm 3,9 \cdot 10^{-3}$
1:45	$0,89 \pm 0,18$	$2,8 \cdot 10^{-13} \pm 1,0 \cdot 10^{-13}$	$0,20 \pm 0,10$	$3,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,2 \cdot 10^{-3}$
1:60	$0,45 \pm 0,20$	$1,3 \cdot 10^{-13} \pm 1,1 \cdot 10^{-13}$	$0,26 \pm 0,09$	$22 \cdot 10^{-3} \pm 18 \cdot 10^{-3}$
1:75	$0,63 \pm 0,27$	$0,049 \cdot 10^{-13} \pm 0,028 \cdot 10^{-13}$	$0,22 \pm 0,19$	$48 \cdot 10^{-3} \pm 53 \cdot 10^{-3}$
1:90	$0,20 \pm 0,05$	$0,18 \cdot 10^{-13} \pm 0,078 \cdot 10^{-13}$	$0,47 \pm 0,13$	$58 \cdot 10^{-3} \pm 14 \cdot 10^{-3}$
1:105	$0,97 \pm 0,58$	$0,022 \cdot 10^{-13} \pm 0,011 \cdot 10^{-13}$	$0,09 \pm 0,02$	$31 \cdot 10^{-3} \pm 27 \cdot 10^{-3}$
1:120	$0,23 \pm 0,0$	$0,41 \cdot 10^{-13} \pm 0,051 \cdot 10^{-13}$	$0,18 \pm 0,05$	$41 \cdot 10^{-3} \pm 25 \cdot 10^{-3}$
1:135	$0,46 \pm 0,17$	$0,025 \cdot 10^{-13} \pm 0,012 \cdot 10^{-13}$	$0,33 \pm 0,24$	$24 \cdot 10^{-3} \pm 32 \cdot 10^{-3}$
1:150	$0,67 \pm 0,37$	$0,51 \cdot 10^{-13} \pm 0,50 \cdot 10^{-13}$	$0,27 \pm 0,11$	$150 \cdot 10^{-3} \pm 89 \cdot 10^{-3}$

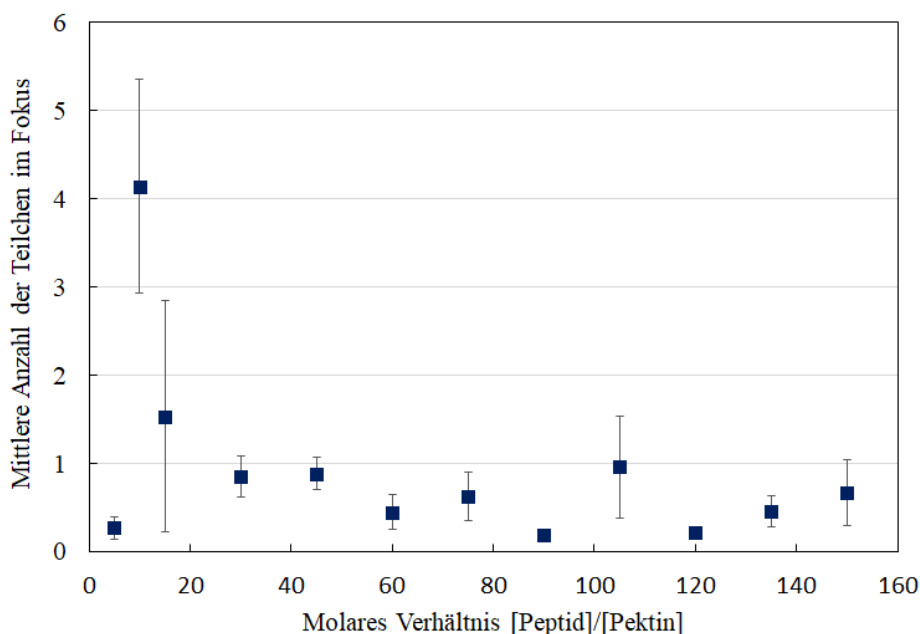


Abbildung 28: Darstellung der mittleren Anzahl der Teilchen im Fokus samt Standardabweichung aus den Messungen ($n=3$) der Pektin-Peptid-Komplexe. Die scheinbare Anzahl der Teilchen im Fokus nimmt zusammen mit dem eingesetzten Pektin-Peptid-Verhältnis ab. Möglicherweise könnte es nach einem [Pektin]:[Peptid] Verhältnis von 1:60 zu einer Agglomeration der Teilchen kommen.

Die scheinbare Anzahl der Teilchen im Fokus nimmt mit dem eingesetzten molaren Verhältnis von Peptid zu Pektin ab. Das könnte eventuell auf eine Agglomeration der Partikel, ab einem molaren Pektin:Peptid-Verhältnis von etwa 1:60, hindeuten. Eine mögliche Agglomeration soll unter 4.4.4 genauer betrachtet werden.

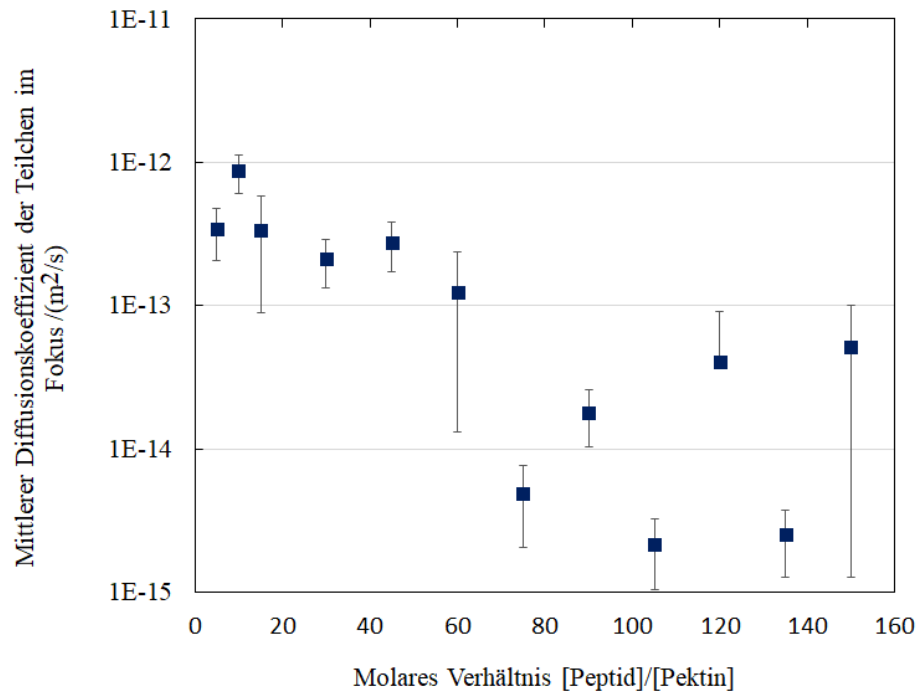


Abbildung 29: Logarithmische Auftragung des Diffusionskoeffizienten der Pektin-Peptid-Komplexe gegen das molare Bindungsverhältnis ($[\text{Peptid}]:[\text{Pektin}]$). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung ($n=3$) samt Standardabweichung. Eine drastische Abnahme des mittleren Diffusionskoeffizienten ist ab einem molaren Verhältnis von 1:60 ($[\text{Pektin}]:[\text{Peptid}]$) erkennbar.

Der mittlere Diffusionskoeffizient der Partikel sinkt drastisch, ab einem molaren Verhältnis von Pektin zu Peptid von 1:60. Das bedeutet, dass der hydrodynamische Radius der Partikel drastisch ansteigt.

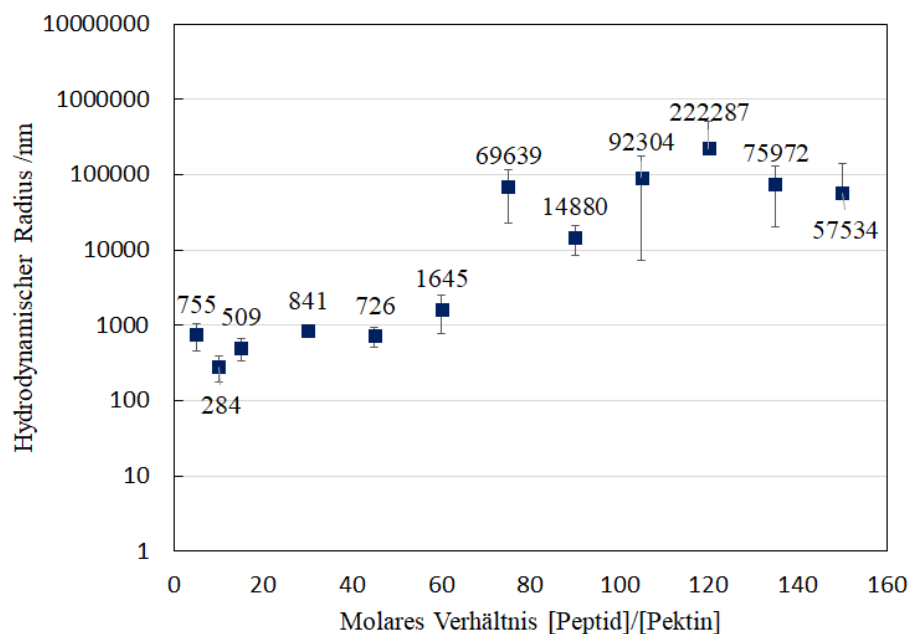


Abbildung 30: Dargestellt ist der mittlere hydrodynamische Radius samt Standardabweichung der Pektin-Peptid-Komplexe, abhängig vom molaren Verhältnis ($[\text{Peptid}]:[\text{Pektin}]$). Der hydrodynamische Radius kann über Gleichung 15 (Abschnitt 3.3.10) mit Hilfe der Diffusionszeit aus drei Experimenten ($n=3$) ermittelt werden.

Aus der mittleren Diffusionszeit lässt sich der hydrodynamische Radius der Pektin-Peptid-Komplexe berechnen. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt.

4.2.4 Ermittlung der Anzahl der Polysaccharide pro Partikel

Nachdem die Bindungsstöchiometrie der Polysaccharid-Peptid-Komplexe ermittelt wurde, kann die Anzahl der Polysaccharide pro Partikel abgeschätzt werden. Eine solche Abschätzung ist möglich, indem die hydrodynamischen Radien der Peptid-Polysaccharid-Komplexe aus den FCS-Experimenten mit dem hydrodynamischen Radius der unkomplexierten Polysaccharide, unter Berücksichtigung der räumlichen Struktur, in das Verhältnis gesetzt werden (siehe Gleichung 17).

Die Berechnung der Anzahl der Polysaccharide pro Partikel erfolgt mit der folgenden Formel:

$$n = \sqrt[3]{\frac{R_{hPartikel}}{R_{hPolys.}}} \quad (17)$$

Die Anzahl der Polysaccharide wird durch n beschrieben, während $R_{hPartikel}$ den hydrodynamischen Radius des Partikels und $R_{hPolys.}$ den hydrodynamischen Radius des Polysaccharids beschreibt.

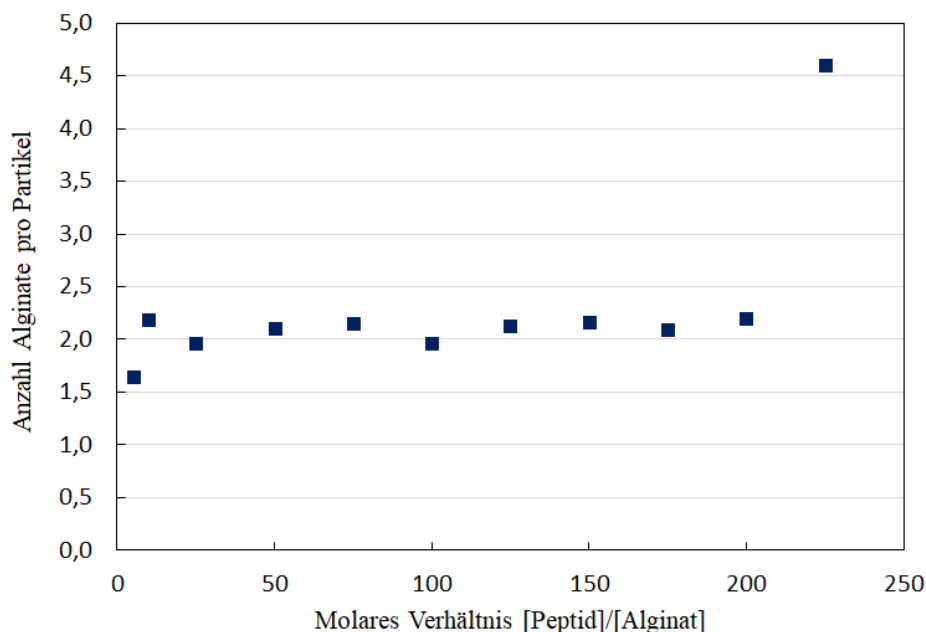


Abbildung 31: Die Abschätzung der Anzahl der Alginate im Alginate-Peptid-Komplex beruht auf dem Verhältnis des mittels GPC ($n=4$) ermitteltem hydrodynamischen Radius des Alginats und dem mittels FCS ($n=3$) ermitteltem hydrodynamischen Radius der Alginate-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Bindungsverhältnissen.

Die GPC-MALLS-Auswertung zeigt für das verwendete Alginate einen hydrodynamischen Radius von 45 nm. Aus dem mit der FCS ermitteltem hydrodynamischen Radius (Abbildung 25) ergibt sich, dass ein Partikel aus zwei Alginaten besteht. Ab einer Bindungs-

stöchiometrie von [Alginat]:[Peptid] 1:200 erhöht sich der hydrodynamische Radius der Partikel auf etwa fünf Alginate pro Partikel. Alle Messungen zeigen monodisperse Partikel. Bei einem Bindungsverhältnis von [Alginat]:[Peptid] 1:225 agglomerieren die Alginat-Peptid-Partikel und fallen aus.

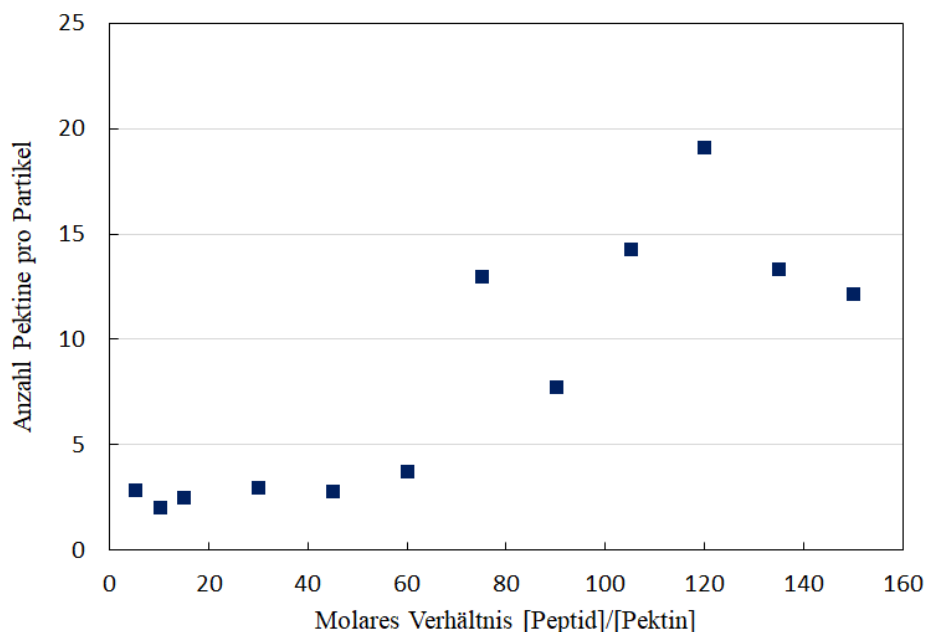


Abbildung 32: Die Abschätzung der Anzahl der Pektine im Pektin-Peptid-Komplex beruht auf dem Verhältnis des mittels GPC (n=4) ermitteltem hydrodynamischen Radius des Pektins und dem mittels FCS (n=3) ermittelten hydrodynamischen Radius der Pektin-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Bindungsverhältnissen.

Die GPC-MALLS zeigt für das verwendete Pektin einen hydrodynamischen Radius von 32 nm. Aus dem mit der FCS ermitteltem hydrodynamischen Radius ergibt sich, dass bei Bindungsverhältnissen von [Pektin]:[Peptid] 1:5 bis 1:45 die Partikelgröße eines Partikels gleich bleibt und aus drei Pektinen besteht. Ab einem Bindungsverhältnis von 1:60 ([Pektin]:[Peptid]) erhöht sich der hydrodynamische Radius der Partikel. Die Anzahl der Pektine pro Partikel steigt bei diesem Bindungsverhältnis auf 13. Steigt das molare Verhältnis auf [Pektin]:[Peptid] 1:75 bis 1:150, schwankt die Partikelgröße in dem Größenbereich zwischen 12 und 19 Pektine pro Partikel.

Die ermittelte Bindungsstöchiometrie beträgt für Pektin-Peptid-Komplexe 1:45 ([Pektin]:[Peptid]). Anschließend lagern sich die Partikel zu einem Agglomerat zusammen. Auffällig ist, dass es sich auch bei den Pektin-Peptid-Partikeln um eine monodisperse Spezies handelt.

Bei einem Bindungsverhältnis von [Pektin]:[Peptid] 1:5 enthält jeder zweite Partikel ein Peptid mit Fluoreszenzmarkierung.

Die ermittelte Bindungsstöchiometrie stellt sich mit [Pektin]:[Peptid] 1:45 dar.

4.2.5 Diskussion der ermittelten Bindungsstöchiometrien

Gerundet lässt sich für die Alginat-Peptid-Komplexe mittels Peptid-Nachweis im Überstand eine Bindungsstöchiometrie von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) und mittels ITC-Messungen eine Bindungsstöchiometrie von 1:255 ([Alginat]:[Peptid]) ermitteln. Die FCS-Messungen deuten auf eine Bindungsstöchiometrie von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) hin. Die Verkapselungseffizienz beträgt bei einem Bindungsverhältnis unter 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) 100 %.

Die Verkapselungseffizienz der Malaria-Synthetischen-Peptide ist ganz ähnlich [3], wie die von Peptid 19-2.5 in Alginat. Die Verkapselungseffizienz von *Flavourzyme* in Alginat [161] und verschiedener Medikamente in Alginat-Gelatine-Komplexe [84] fällt hingegen deutlich geringer aus.

Für die Pektin-Peptid-Komplexe ohne die Verwendung von Calciumchlorid zeigt die Auswertung der Trennung über eine C_{18} -Säule mit anschließender Fluoreszenzdetektion eine gerundete Bindungsstöchiometrie von 1:80 bzw. 1:110 ([Pektin]:[Peptid]). Mittels ITC lässt sich für diese Komplexe eine Bindungsstöchiometrie von 1:95 ([Pektin]:[Peptid]) ermitteln. Die mittels FCS ermittelte Bindungsstöchiometrie von 1:45 ([Pektin]:[Peptid]) weicht von der vorherigen Bindungsstöchiometrie etwa um den Faktor zwei ab.

Die Messung des Überstandes der verschiedenen Pektin-Peptid-Bindungsverhältnisse deutet auf das Vorliegen einer kooperativen Bindung hin.

Die Pektin-Peptid-Bindungsverhältnisse zeigen abhängig vom Bindungsverhältnis unterschiedliche Verkapselungseffizienzen. Von einem eingesetzten Bindungsverhältnis von 1:20 bis 1:100 ([Pektin]:[Peptid]), unter Verwendung von Calciumchlorid, liegen die Verkapselungseffizienz zwischen 83 % und 95 %. Bei höheren Bindungsverhältnissen nimmt die Bindungseffizienz ab. Wird Calciumchlorid verwendet, steigt die Verkapselungseffizienz, im Gegensatz zu Versuchen ohne Calciumchlorid, von einem eingesetzten Bindungsverhältnis von 1:10 ([Pektin]:[Peptid]) von 17 % auf 75 %. Zwischen den Bindungsverhältnissen von 1:50 bis 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) liegt die Verkapselungseffizienz zwischen 85 % und 90 %. Anschließend nimmt die Verkapselungseffizienz wieder ab. Diese Verkapselungseffizienzen liegen höher als die Verkapselungseffizienz von Insulin in Chitosan-Pektin-Partikeln (maximal 62 %) [174]. Komplexe aus Pektin und Gelatine sind in der Lage mit 5,32 %iger Effizienz Metronidazol Hydrochlorid, mit 57,61 %iger Effizienz Diclofenac-Natrium und mit 62,42 %iger Effizienz Indomethacin einzukapseln [84]. Laut der Ergebnisse und Literatur scheint Pektin in der Lage zu sein Peptide zu binden. Scheinbar wird die Bindung bei geringen Peptidkonzentrationen durch Calciumchlorid begünstigt. Bei hohen Peptidkonzentrationen scheinen Calcium und Peptid jedoch um die Bindungsstellen zu konkurrieren. Die höhere Bindungseffizienz bei molaren Pektin-Peptid-Verhältnissen von 1:10 bis 1:50 ([Pektin]:[Peptid]), unter Verwendung von Calciumchlorid, deutet ebenfalls in Richtung einer kooperativen Bindung.

Neben der Bindungsstöchiometrie lassen sich mit der FCS auch die Teilchenanzahl im Fokus, der Triplet-Anteil samt Triplet-Zeit und der mittlere Diffusionskoeffizient ermitteln.

Damit stellt die FCS eine Methode zur Partikelcharakterisierung dar, welche Hinweise auf Aggregation, Zusammensetzung der Partikel, sowie Wechselwirkungen zwischen Peptid-19-2.5 oder Polysaccharid und dem Fluoreszenzmarker liefern kann. In der Literatur werden für die FCS Anwendungen, wie die Analyse der Oligomerisation von Proteinen [175], Partikelgrößenbestimmungen und Homogenitäts-Analysen [176] genannt.

Die FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Partikel zeigen einen Anstieg der Partikel im Fokusvolumen einhergehend mit dem Anstieg der Bindungsstöchiometrie. Zu erwarten wäre eine gleichbleibende Anzahl der Partikel im Fokusvolumen, da sich die Partikelanzahl nicht verändern sollte. Gleichzeitig kommt es zu der Bindung einer höheren Anzahl Fluoreszenzmarkierter Peptide pro Partikel. Somit steigen die Anzahl der detektierbaren Fluorophore im Fokusvolumen und damit die Anzahl der detektierbaren Teilchen im Fokus. Je dichter ein Polysaccharid mit Peptiden besetzt ist, desto schwieriger ist die Detektion des Triplet-Anteils und der zugehörigen Triplet-Zeit der Fluorophore. Der Triplet-Anteil beträgt bei einem Bindungsverhältnis von 1:5 ([Alginat]:[Peptid]) 45 %. Dieser Anteil entfällt bei einem Bindungsverhältnis von 1:10 ([Alginat]:[Peptid]) fast vollständig und stellt sich anschließend zwischen 10 % und 20 % ein. Die gemessene Triplet-Zeit steigt mit dem Bindungsverhältnis an. Das Bindungsverhältnis von 1:200 ([Alginat]:[Peptid]) zeigt eine Abnahme der Triplet-Zeit, während diese einen Sprung um den Faktor 1000 zwischen den Bindungsverhältnissen 1:200 und 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) aufweist. Bei dieser vermeintlichen Agglomeratbildung steigt der Triplet-Anteil auf 29 %.

Die Anzahl der Teilchen im Fokus pendelt sich, mit Ausnahme der Pektin zu Peptid Bindungsverhältnisse von 1:10 und 1:15 ([Pektin]:[Peptid]), zwischen 0,20 und 0,89 Partikel im Beobachtungsvolumen ein. Die größte Teilchenanzahl weist das Bindungsverhältnis 1:10 ([Pektin]:[Peptid]) auf, welches gleichzeitig den größten Diffusionskoeffizienten und damit den geringsten hydrodynamischen Radius der Partikel aufweist. Der Triplet-Anteil der Fluorophore scheint bei dem Bindungsverhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) ein Maximum von 47 % zu besitzen. Zwischen einem Bindungsverhältnis von 1:15 und 1:75 ([Pektin]:[Peptid]) pendelt sich dieser Triplet-Anteil bei etwa 20 % ein. Für die weiteren Messwerte liegt dieser Wert zwischen 9 % und 34 %. Die kürzeste Triplet-Zeit weist ein Bindungsverhältnis von 1:10 ([Pektin]:[Peptid]) auf, während dieses Bindungsverhältnis neben dem maximalen Triplet-Anteil auch die maximale Teilchenzahl im Fokus aufweist. Ab einem Bindungsverhältnis von 1:60 ([Pektin]:[Peptid]) nimmt die ermittelte Triplet-Zeit deutlich zu. Dieses Ergebnis könnte auf eine Aggregation hinweisen. Ausgehend vom eingesetzten molaren Verhältnis von Peptid mit Fluoreszenzmarker und Peptid ohne Fluoreszenzmarker kann ein Pektin-Molekül bei einem Bindungsverhältnis von 1:10 ([Pektin]:[Peptid]) ein fluoreszenzmarkiertes Peptid-Molekül binden. Damit sind die Ergebnisse des molaren Pektin-Peptid-Verhältnisses von 1:5 ([Pektin]:[Peptid]) besonders im Bezug auf die Teilchen im Fokus kritisch zu betrachten.

Sind mehrere Fluorophore in einem Partikel vorhanden, kann dieses die Messung von Triplet-Anteil und Triplet-Zeit stören. Um einen sauberen Hinweis auf eine mögliche Ag-

glomerisation zu bekommen, sind weitere Versuche mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Peptid zu unmarkierten Peptid Verhältnissen durchgeführt worden. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Abschnitt 4.4.3 dargestellt.

Das Alginat-Peptid-Bindungsverhältnis von 1:5 ([Alginat]:[Peptid]) weist mit $1,3 \cdot 10^{-12}$ den größten Diffusionskoeffizienten und damit den geringsten hydrodynamischen Radius auf. Der Diffusionskoeffizient sinkt bei einem Bindungsverhältnis von [Alginat]:[Peptid] 1:10 bis 1:200 etwa um den Faktor 10. Anschließend sinkt der Diffusionskoeffizient erneut um den Faktor 10. Über den aus dem mittleren Diffusionskoeffizienten ermitteltem hydrodynamischen Radius lässt sich zusammen mit dem aus der GPC ermitteltem hydrodynamischen Radius des Alginats eine Zusammensetzung aus zwei Alginaten pro Partikel ermitteln, welche sich ab einem Bindungsverhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) mindestens verdoppelt.

Für die Pektin-Peptid-Partikel ist eine Verringerung des Diffusionskoeffizienten ab einem Bindungsverhältnis von [Pektin]:[Peptid] 1:60 messbar. Diese Veränderung zeigt sich in dem deutlichen Anstieg des hydrodynamischen Durchmessers der Partikel. Der hydrodynamische Radius liegt zwischen einem Bindungsverhältnis von [Pektin]:[Peptid] 1:75 bis 1:150 etwa um den Faktor 10 über dem hydrodynamischen Radius der Partikel mit einem Bindungsverhältnis zwischen [Pektin]:[Peptid] 1:5 und 1:45. Möglicherweise ist das Bindungsverhältnis von [Pektin]:[Peptid] 1:60 der Übergang zur Entstehung größerer Pektin-Peptid-Agglomeraten. Die Partikelgröße soll in Abschnitt 4.3 eingehender diskutiert werden.

Die Messungen sind alle bei neutralem pH-Wert durchgeführt worden. Unter der Annahme, dass Alginat zu gleichen Anteilen aus Mannuronsäure und Gularonsäure besteht, lässt sich eine theoretisches Bindungsverhältnis für das Peptid berechnen. Durch Teilen der Molmasse des Alginats in Monosaccharid-Einheiten ergeben sich 1997 mögliche negative Ladungen an einem Polysaccharid. Das Peptid liegt in dem verwendeten Puffer achtfach positiv geladen vor, d.h. es ergibt sich eine theoretische Bindungsstöchiometrie von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]). Die mit der ITC ermittelte Bindungsstöchiometrie von $1:256 \pm 20$ ([Alginat]:[Peptid]) liegt sehr dicht an der theoretisch ermittelten Bindungsstöchiometrie. Wobei die mittels Trennung über eine C_{18} -Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion ermittelte Bindungsstöchiometrie von $1:224 \pm 5$ ([Alginat]:[Peptid]) und mittels FCS ermittelte Bindungsstöchiometrie von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) ebenfalls sehr nahe am Theoriewert liegen.

Im Pektin-Molekül sind 61 % Galakturonsäure enthalten. Von dieser sind wiederum 79 % verestert. Die unveresterten Galakturonsäuren sind bei annähernd neutralem pH-Wert negativ geladen und könnten das Peptid ionisch binden. Ausgehend davon, dass 621,3 kDa 100 % sind, handelt es sich bei dem Galakturonsäure-Anteil um eine Masse von 379,0 kDa, von der wiederum 79,6 kDa unverestert vorliegen. Dividiert durch die molare Masse, von in einer Kette gebundener Galakturonsäure die jeweils eine negative Ladung enthält, resultieren 417 negative Ladungen pro Pektin-Molekül, welche imstande wären, 52 Peptide ionisch

zu binden, wenn acht negative Ladungen des Polysaccharids mit acht positiven Ladungen des Peptids wechselwirken können. Die mit der ITC ermittelte Bindungsstöchiometrie liegt, ebenso wie die mittels Trennung über eine C₁₈-Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion ermittelte Bindungsstöchiometrie, um den Faktor zwei über diesem theoretischen Wert. Die mittels FCS ermittelte Bindungsstöchiometrie passt zu dem Theoriewert. Für die FCS-Messungen wurde zusätzlich fluoreszenzmarkiertes Peptid verwendet. Dieses Erkenntnis soll unter Punkt 4.4 erneut aufgegriffen werden.

4.3 Die Partikelgröße

Nachdem die Bindungsstöchiometrie der entstandenen Komplexe bekannt ist, liegt der Fokus in diesem Kapitel auf der Größe der entstandenen Partikel:

- Welche Partikelgrößen besitzen die hergestellten Partikel?
- Gibt es Unterschiede in der Partikelgröße aufgrund der Herstellungsmethode?

4.3.1 Photonen-Kreuzkorrelations Spektroskopie

Die PCCS-Messungen wurde als Vierfachbestimmung durchgeführt. Dabei wurden jeweils fünf verschiedene Temperaturen (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C und 35 °C) untersucht, um einen eventuellen Temperatureinfluss auf die Partikelgröße sichtbar zu machen. Das Bindungsverhältnis der Alginat-Peptid-Komplexe beträgt 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) und das Bindungsverhältnis der Pektin-Peptid-Komplexe beträgt 1:110 ([Pektin]:[Peptid]).

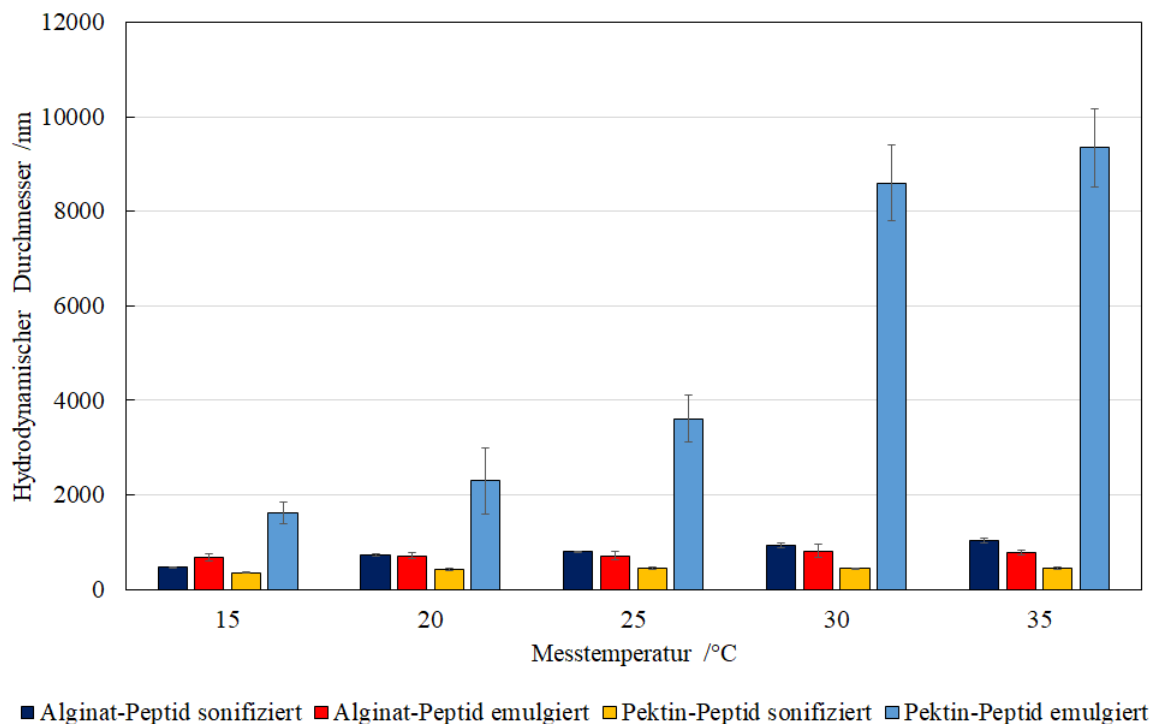


Abbildung 33: Gegenüberstellung der PCCS-Ergebnisse (n=4) samt Standardabweichung der Polysaccharid-Peptid-Komplexe gelöst in Wasser bei verschiedenen Temperaturen. Die Partikelgröße der durch eine O/W-Emulsion hergestellten Pektin-Peptid-Partikel liegen bei Messtemperaturen von 30 °C und 35 °C nur noch knapp im messbaren Bereich. Die Partikelgröße scheint hier mit der Messtemperatur und-zeit anzusteigen.

Die durch eine O/W-Emulsion hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe sinken mit der Zeit auf den Boden der Küvette. Die Messung dieser Proben gestaltet sich nicht trivial, da die Partikel sich scheinbar zusammenlagern und dadurch mit einem Durchmesser von über 10 µm durch das Messvolumen diffundieren. Da das Messgerät maximal Partikel mit einem

Durchmesser von 10 μm messen kann, brach das Gerät die Messung solch großer Partikel automatisch ab.

Bei den sonifizierten Alginat-Peptid-Partikeln scheint sich ein Zusammenhang zwischen Größe und Messtemperatur der Partikel herstellen zu lassen, ebenso wie bei den emulgierten Pektin-Peptid-Komplexen. Die emulgierten Alginat-Peptid-Komplexe und die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe zeigen keinen, bzw. einen deutlich geringeren Temperatureinfluss auf die Partikelgröße. Die Veränderung der Partikelgröße könnte bei diesen beiden Messungen auch auf die längere Messzeit zurückzuführen sein, denn bei diesem Versuch steigt mit der Temperatur auch die Zeit, welche zwischen Partikelherstellung und der jeweiligen Messung vergeht.

Auffällig ist, dass die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe bei allen Temperaturen immer den geringsten Partikeldurchmesser zeigen, während die emulgierten Pektin-Peptid-Komplexe bei jeder Messung den größten Durchmesser aufweisen.

Tabelle 22: Mit der PCCS ermittelte Partikeldurchmesser der Polysaccharid-Peptid-Komplexe.

Temperatur /°C	Alginat-Peptid-Komplex sonifiziert /nm	Alginat-Peptid-Komplex emulgiert /nm	Pektin-Peptid-Komplex sonifiziert /nm	Pektin-Peptid-Komplex emulgiert /nm
15	465 ± 14	685 ± 73	357 ± 13	1611 ± 235
20	722 ± 18	714 ± 57	425 ± 31	2292 ± 704
25	791 ± 7	712 ± 87	450 ± 26	3610 ± 498
30	930 ± 56	811 ± 137	442 ± 12	8598 ± 796
35	1032 ± 49	768 ± 53	455 ± 28	9348 ± 822

4.3.2 Streulichtmessung

Die DLS-Messungen wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Temperatur von 25 °C ausgewählt. Untersucht wurden sowohl durch Sonifizieren hergestellte, als auch durch eine O/W-Emulsion hergestellte, Polysaccharid-Peptid-Komplexe. Das Bindungsverhältnis der Alginat-Peptid-Komplexe beträgt 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) und das Bindungsverhältnis der Pektin-Peptid-Komplexe beträgt 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 34 und Tabelle 23 dargestellt.

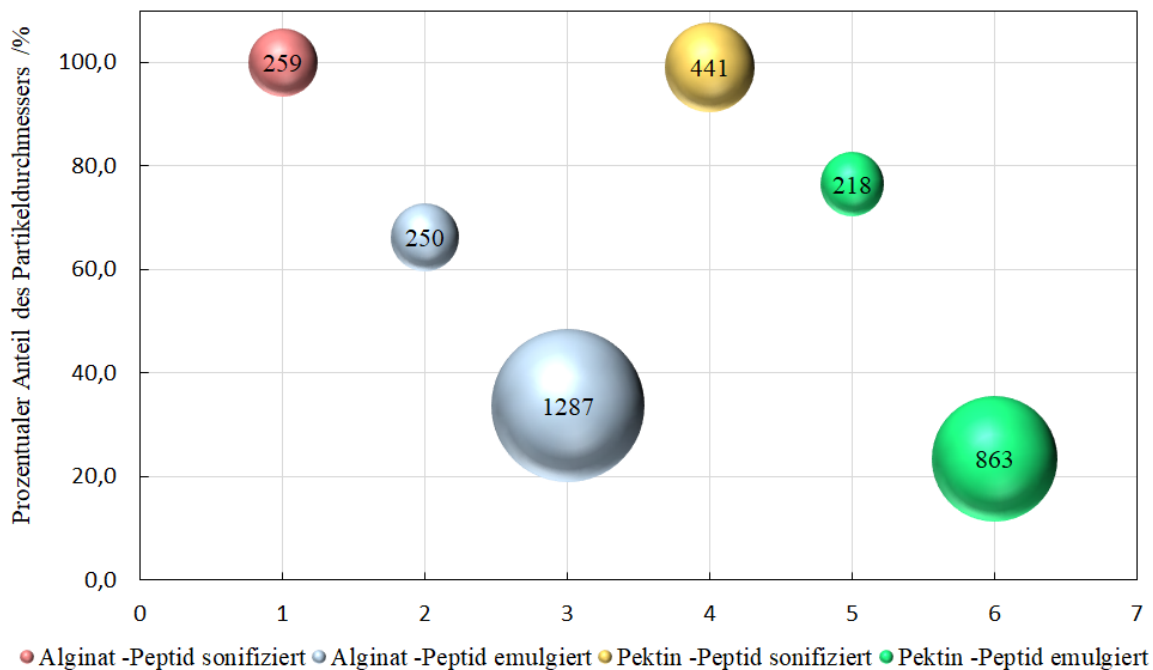


Abbildung 34: Der mittlere Partikeldurchmesser aus einer Dreifachbestimmung ($n=3$) wird in nm angegeben. Bestimmt wurde dieser mit dem Zetasizer. Die jeweiligen gemessenen Partikeldurchmesser sind als Kugelgröße dargestellt. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Partikelspezies ist auf der Ordinate dargestellt, während die Abszisse lediglich die verschiedenen Partikelspezies unterteilt. Das Bindungsverhältnis der Alginat-Peptid-Komplexe beträgt 1:100 ($[\text{Alginat}]:[\text{Peptid}]$) und das Bindungsverhältnis der Pektin-Peptid-Komplexe beträgt 1:30 ($[\text{Pektin}]:[\text{Peptid}]$).

Tabelle 23: Der Partikeldurchmesser der Polysaccharid-Peptid-Komplexe wurde mit dynamischer Lichtstreuung am Zetasizer bestimmt. Die Herstellungsmethode der jeweiligen Komplexe ist mit angegeben. Wobei „sonifiziert“ für die Herstellung mittels Sonifizieren und „emulgiert“ für die Herstellung mittels einer O/W-Emulsion steht.

Probe	Partikel- durchmesser der 1. Spezies /nm	Anteil der 1. Spezies /%	Partikel- durchmesser der 2. Spezies /nm	Anteil der 2. Spezies /%
Alginat-Peptid- Komplex sonifiziert	259 ± 2	100 ± 0	-	-
Alginat-Peptid- Komplex emulgiert	250 ± 14	66 ± 17	1287 ± 190	34 ± 9
Pektin-Peptid- Komplex sonifiziert	441 ± 4	99 ± 0	-	-
Pektin-Peptid- Komplex emulgiert	218 ± 3	77 ± 13	863 ± 102	23 ± 9

Die Streulicht-Messungen ergeben für die sonifizierten Algitat-Peptid-Komplexe des molaren Verhältnisses von 1:100 ($[\text{Alginat}]:[\text{Peptid}]$) einen Durchmesser von 259 nm. Die emulgierten Partikel dieses molaren Verhältnisses enthalten scheinbar zwei verschiedene

Partikel-Spezien. 66 % der Partikel weisen einen Durchmesser von 250 nm auf und ähneln damit den sonifizierten Partikeln. 34 % der gemessenen Partikel sind etwa fünfmal so groß und weisen einen Durchmesser von 1287 nm auf.

Ähnlich verhalten sich die Pektin-Peptid-Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). 99 % der sonifizierten Partikel besitzen einen Durchmesser von 441 nm. Lediglich 1 % der gemessenen Partikel weicht von diesem Wert ab. Die Abweichung von 1 % der Messwerte ist zu gering um eine Aussage zuzulassen und soll im Rahmen dieser Arbeit vernachlässigt werden. Die emulgierten Pektin-Peptid-Partikel mit einem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) weisen zwei Partikel-Spezies auf. Bei 77 % dieser Partikel konnte ein Durchmesser von 218 nm ermittelt werden, während 23 % der Partikel einen Durchmesser von 863 nm aufweisen.

Die Ermittlung von zwei Partikelspezies ist kritisch zu betrachten und soll in Abschnitt 4.3.6 „Diskussion der Partikelgrößenbestimmung“ noch eingehender betrachtet werden.

4.3.3 Rasterkraftmikroskopie

Die AFM-Messungen stellen im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Partikelgrößenbestimmung dar, welche die Partikel im getrockneten Zustand visualisiert. Die Berechnung der Partikelgröße kann durchgeführt werden, ohne dass eine Kugelstruktur angenommen wird. Die Annahme einer Kugelstruktur wird bei den weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Methoden zur Bestimmung der Partikelgröße zugrunde gelegt.

Für die Vorbereitung der AFM-Proben wurden zwei Trocknungsmethoden verglichen. Zum einen die Gefriertrocknung und zum anderen die Trocknung bei 37 °C. Die gefriergetrockneten Alginat-Peptid-Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) sind in Abbildung 35 dargestellt, während die bei 37 °C getrockneten Alginat-Peptid-Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) in Abbildung 36 dargestellt sind.

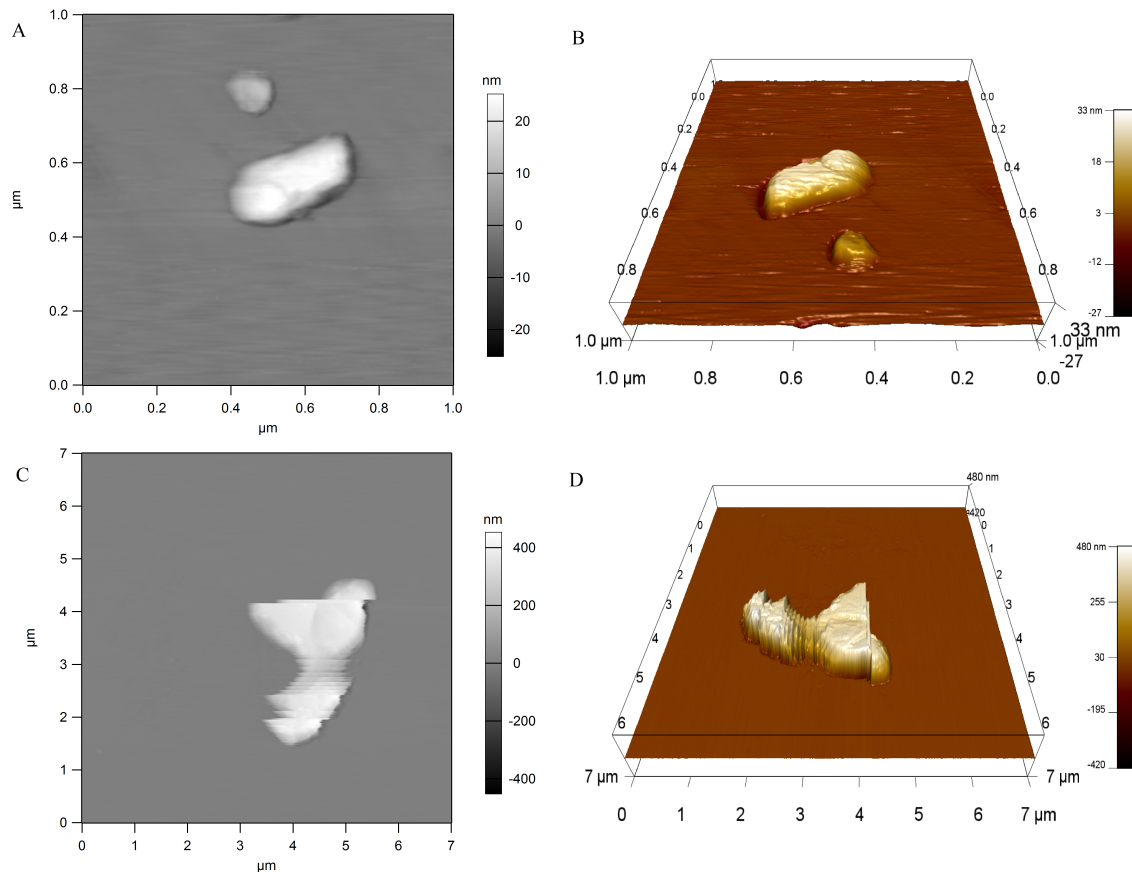


Abbildung 35: Zwei von 12 aufgenommenen AFM-Bildern der durch Sonifizieren hergestellten und gefriergetrockneten Alginat-Peptid-Komplexe des molaren Verhältnisses von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]). **A:** $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ Bild eines am MICA-Slide festgetrockneten Partikels (*canteliver* CSG 10), **B:** 3D-Darstellung von Bild A, **C:** $7\ \mu\text{m} \times 7\ \mu\text{m}$ Bild eines während der Messung verrutschten Partikels (*canteliver* CSG 10), **D:** 3D-Darstellung von Bild C. Durch die Probenvorbereitung mittels Gefrierdrying sind mit dem AFM kaum Partikel auf dem MICA-Slide auffindbar.

Der durch Sonifizieren hergestellte und gefriergetrocknete Alginat-Peptid-Partikel in Abbildung 35 A und B besitzt ein Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]). Dieser Partikel besitzt Abmessungen von (LxBxH) ca. $400\ \text{nm} \times 200\ \text{nm} \times 25\ \text{nm}$. Der verschobene Partikel in 35 C und D scheint deutlich größer zu sein und besitzt Abmessungen von ca. $2200\ \text{nm} \times 2200\ \text{nm} \times 400\ \text{nm}$. In der Probe sind kaum messbare Partikel auffindbar, da diese durch die Gefrierdrying wie ein Pulver auf dem MICA lagen. Deshalb wird im Folgenden von einer Probenvorbereitung mittels Gefrierdrying abgesehen.

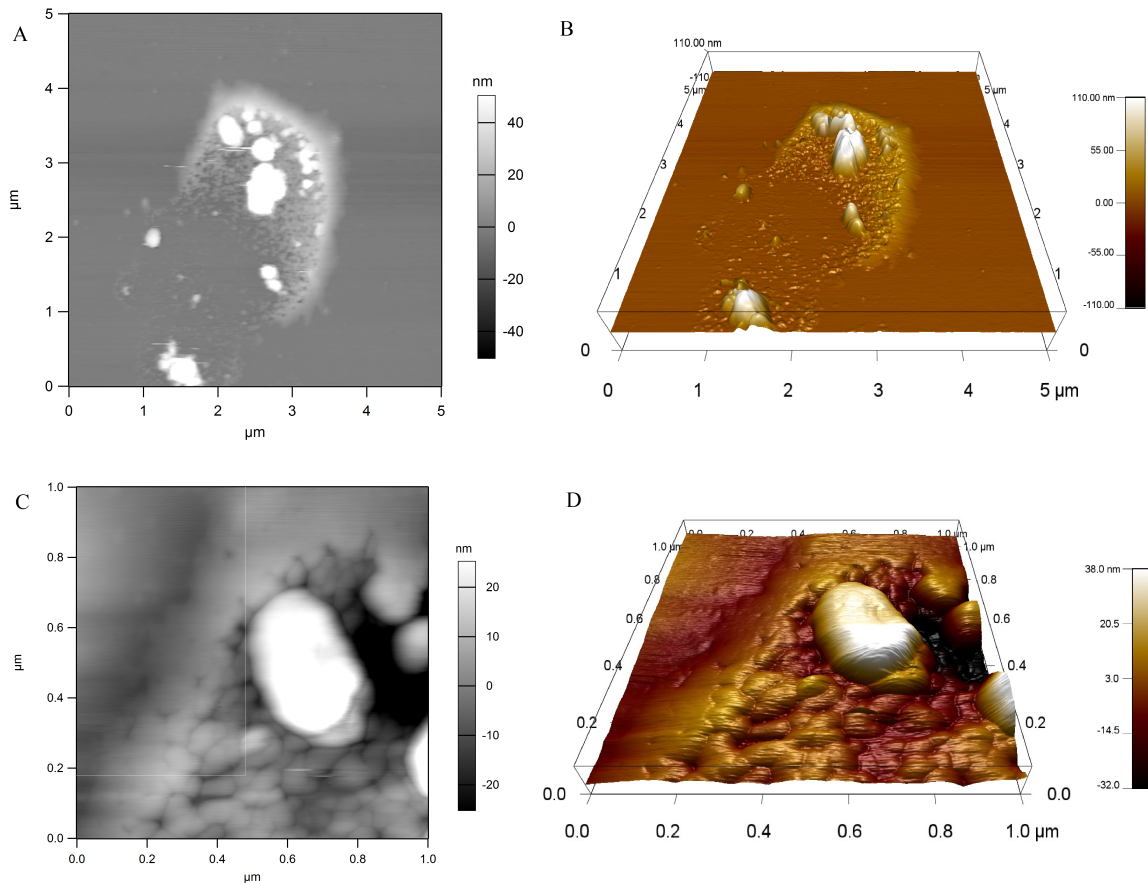


Abbildung 36: AFM-Bilder der durch Sonifizieren hergestellten und bei 37 °C getrockneten Alginat-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]). Es sind zwei von 12 aufgenommenen Bildern dargestellt. **A:** 5 µm x 5 µm Übersichtsbild des Partikelauftommens (*canteliver* CSG 10), **B:** 3D-Darstellung von Bild A. **C:** Eine 1 µm x 1 µm Vergrößerung eines Partikels aus dem Übersichtsbild (*canteliver* CSG 10), **D:** 3D-Darstellung von Bild C.

Werden die durch Sonifizieren hergestellten Alginat-Peptid-Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) bei 37 °C getrocknet sind deutlich mehr Partikel auf dem MICA aufzufinden. Der getrocknete Partikel aus Abbildung 36 C und D ist stellvertretend für die aufgenommenen Partikel dargestellt. Dieser Partikel hat Abmessungen von 400 nm x 300 nm x 35 nm (LxBxH). Diese Größe ähnelt der Größe des gefriergetrockneten Partikels aus Abbildung 35 A und B. Das heißt, die Partikel scheinen sich durch die Gefrier Trocknung nicht stark zu verändern. Für die folgenden Versuche wird eine Probenvorbereitung mittels Trocknung bei 37 °C präpariert.

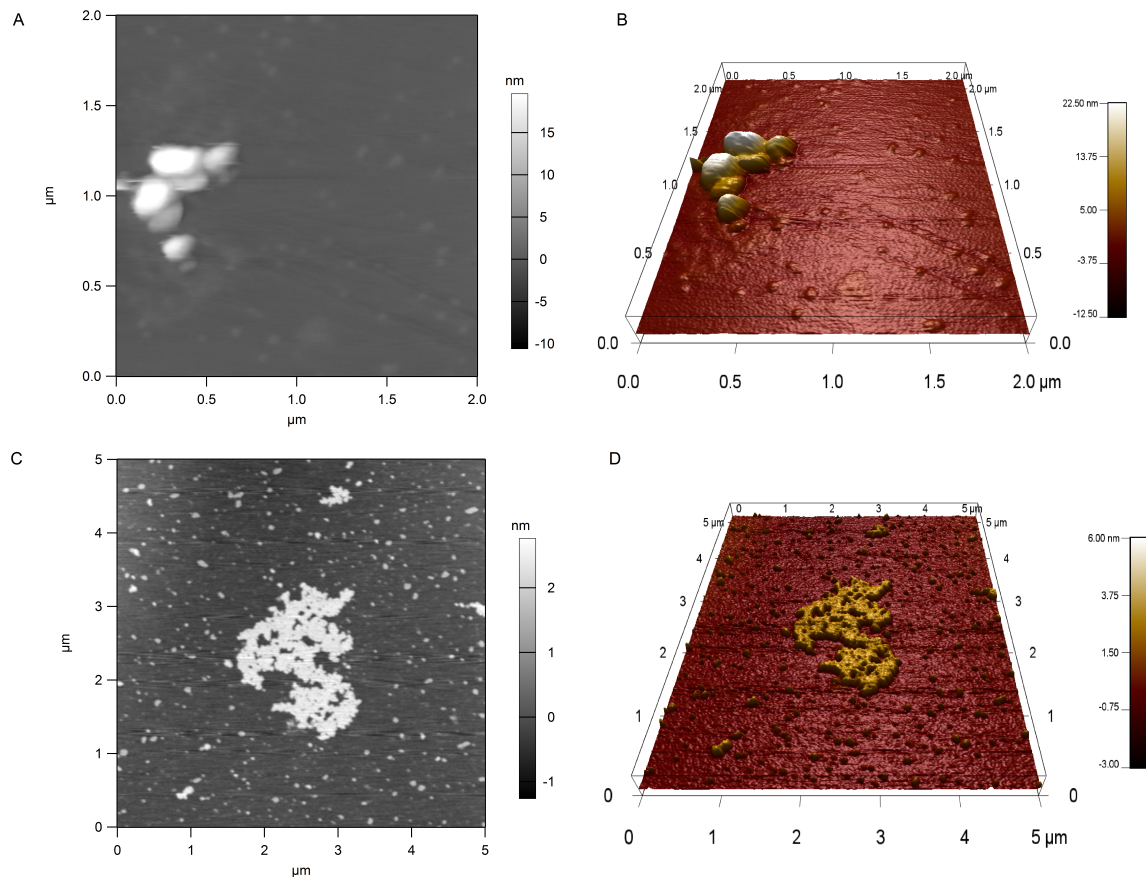


Abbildung 37: AFM-Bilder der bei 37 °C getrockneten Alginat-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) hergestellt mit O/W-Emulsionstechnik. Dargestellt sind zwei von 12 aufgenommenen Bildern. **A:** 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ Bild von nebeneinander liegenden Partikeln (*canteliver* CSG 10), **B:** 3D-Darstellung von Bild A, **C:** Übersichtsbild des Partikelauftommens mit den Abmessungen 5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ (*canteliver* CSG 10), **D:** 3D-Darstellung von Bild C. Diese Abbildungen stellen Partikel aus zwei Partikelspezies mit unterschiedlicher Größe dar. Zum einen die nebeneinander liegenden zwei und zum anderen sehr kleine Partikel, welche sich zu einem Agglomerat zusammenlagern.

Die bei 37 °C getrockneten Alginat-Peptid-Partikel, welche über die O/W-Emulsion hergestellt wurden, zeigen zwei Partikelspezies. Eine Spezies ist in Abbildung 37 A und B gezeigt und besitzt Abmessungen (LxBxH) zwischen 280 nm x 170 nm x 23 nm und 170 nm x 110 nm x 23 nm.

Die Partikel in Abbildung 37 C und D gehören zu der zweiten Spezies und lagern sich zu einem Agglomerat mit der Größe von 1590 nm x 1980 nm zusammen. Dabei haben die einzelnen Partikel Größen (LxBxH) zwischen 82 nm x 137 nm x 4 nm und 55 nm x 55 nm x 4 nm.

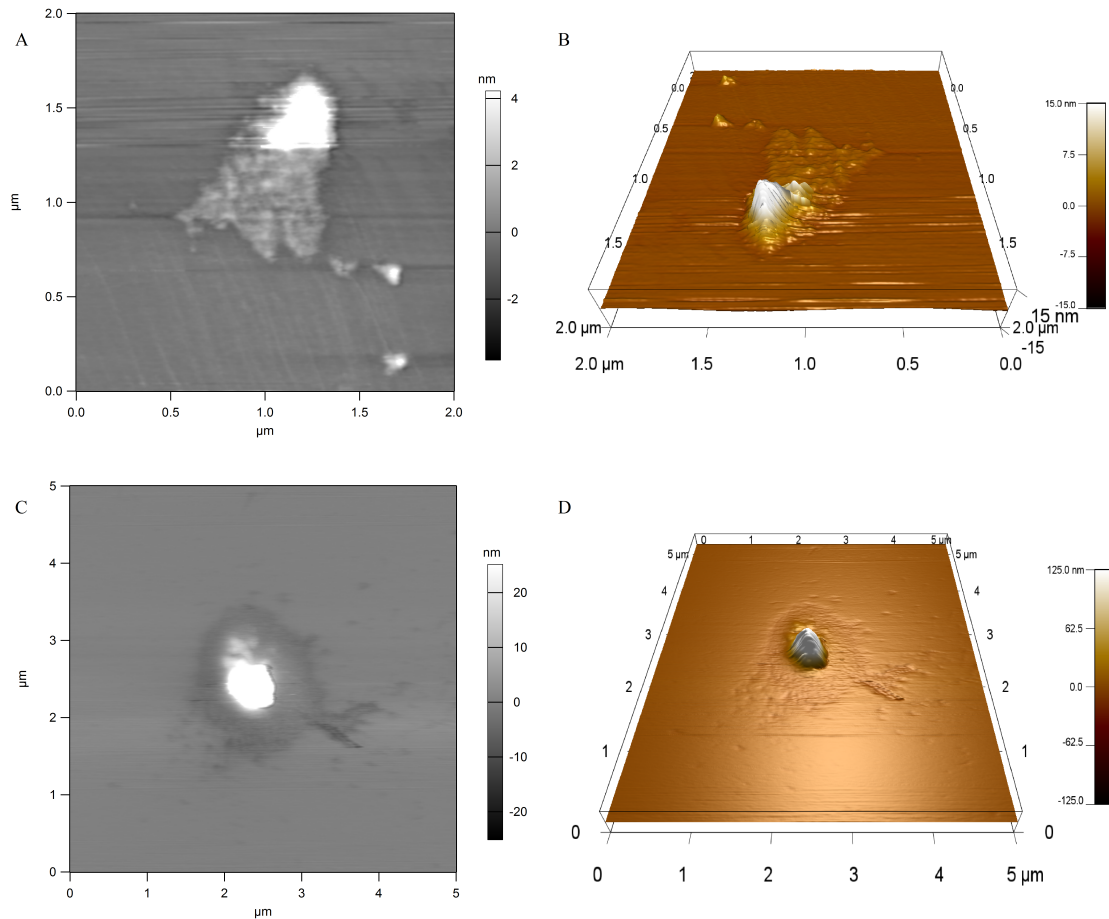


Abbildung 38: AFM-Bilder der durch Sonifizieren hergestellten und bei 37 °C getrockneten Pektin-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). Es sind zwei der 12 aufgenommenen Bilder dargestellt. **A:** 2 µm x 2 µm Abbildung eines Pektin-Peptid-Partikels (*cantilever* CSG 10), **B:** 3D-Darstellung von Bild A, **C:** 5 µm x 5 µm Abbildung eines Pektin-Peptid-Partikels (*cantilever* CSG 10), **D:** 3D-Darstellung von Bild C.

In Abbildung 38 A und B wirkt es so, als lagerten sich die durch Sonifizieren hergestellten Pektin-Peptid-Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) während des Trocknungsprozesses zusammen. Um eine solche Zusammenlagerung zu vermeiden wurde das gleiche Volumen (300 µl) einer geringer konzentrierten Partikellösung (67 pM statt 1 nM) auf das MICA-Slide gegeben und die Messung wiederholt. In Abbildung 38 C und D zeigt sich jedoch, dass die Ausgangskonzentration in den untersuchten Bereichen keinen Einfluss auf die Partikelgröße hat. Das Partikel in Abbildung 38 A und B besitzt eine Größe von etwa 750 nm x 433 nm x 15 nm (LxBxH), während das Partikel aus Abbildung 38 C und D eine Größe von etwa 1000 nm x 615 nm x 125 nm (LxBxH) besitzt.

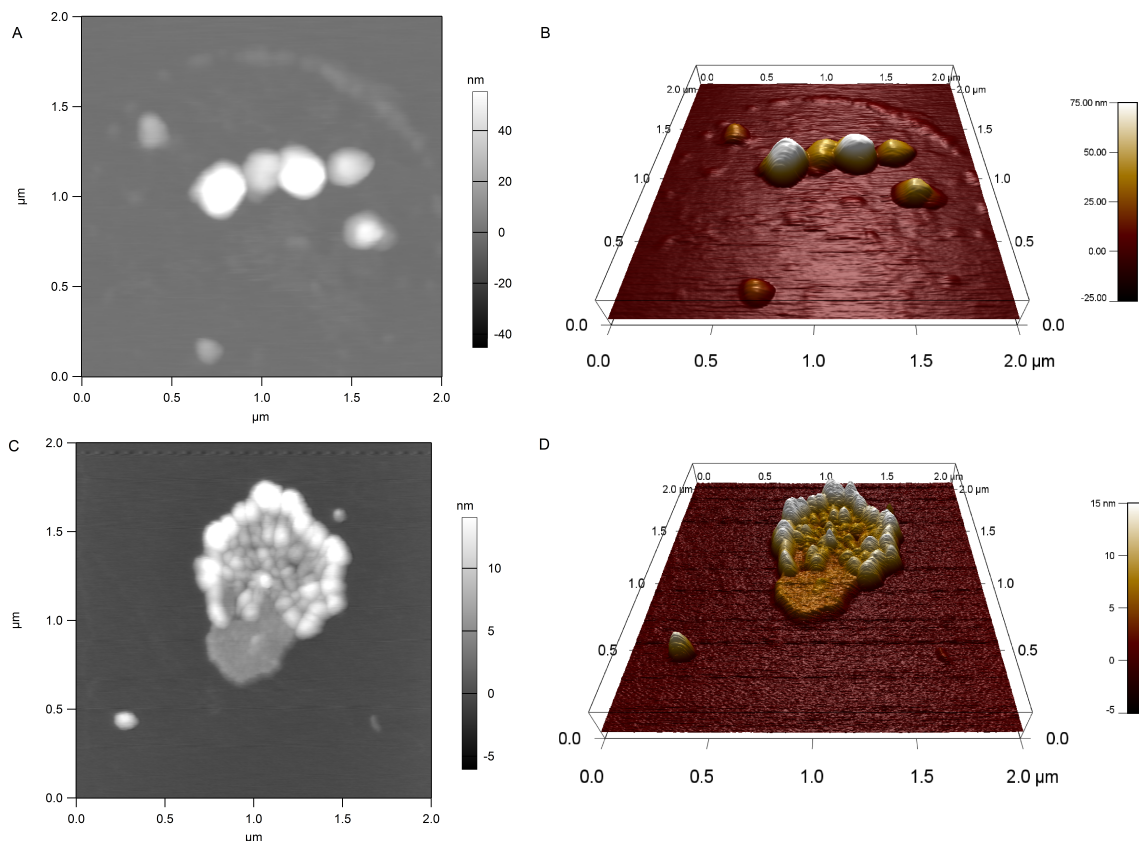


Abbildung 39: AFM-Bilder der bei 37 °C getrockneten Pektin-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) hergestellt mit O/W-Emulsionstechnik. Es sind zwei der 12 aufgenommenen Bilder dargestellt. **A:** 2 µm x 2 µm Übersichtsbild des Partikelauftommens (*canteliver* CSG 10), **B:** 3D-Darstellung von Bild A, **C:** 2 µm x 2 µm Abbildung zusammengelagerter Partikel (*canteliver* CSG 10), **D:** 3D-Darstellung von Bild C. Diese Abbildungen stellen Partikel aus zwei Partikelspezies mit unterschiedlicher Größe dar. Zum einen die nebeneinander liegenden und zum anderen sehr kleine Partikel, welche sich zu einem Agglomerat zusammenlagern.

Die getrockneten Pektin-Peptid-Partikel mit einem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]), hergestellt mittels O/W-Emulsion, aus Abbildung 39 A und B haben Abmessungen (LxBxH) von 330 nm x 330 nm x 75 nm bis 220 nm x 220 nm x 60 nm. Damit stellen sie Partikel einer anderen Größenordnung dar als die Partikel aus Abbildung 39 C und D. Denn die Partikel aus Abbildung 39 C und D lagern sich zu einem Agglomerat mit der Größe von 1150 nm x 820 nm zusammen. Dabei haben die einzelnen Partikel Größen (LxBxH) von etwa 131 nm x 100 nm x 15 nm. Die Frage ist, ob ein solches Agglomerat sich erst während des Trocknens bildet oder ob es sich möglicherweise schon in Lösung zusammenlagert.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Partikel durch das Eintrocknen an Höhe einbüßen können. Die AFM-Messungen zeigen, für keinen der untersuchten Partikel eine Kugelinform, aber auch keine langen verzweigten Stränge. Somit ist die Annahme einer Kugelstruktur für die Auswertung von Messungen zwar fehlerbehaftet, jedoch nicht komplett abwegig. Möglicherweise nähert sich die Struktur in Lösung eine Kugelstruktur an.

4.3.4 Scanning Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die scanning FCS stellt eine weitere Methode der Partikelgrößenbestimmung dar. An die aufgenommenen Kurven kann eine Gauß-Kurve angepasst werden, welche eine Berechnung der Partikelgröße zulässt.

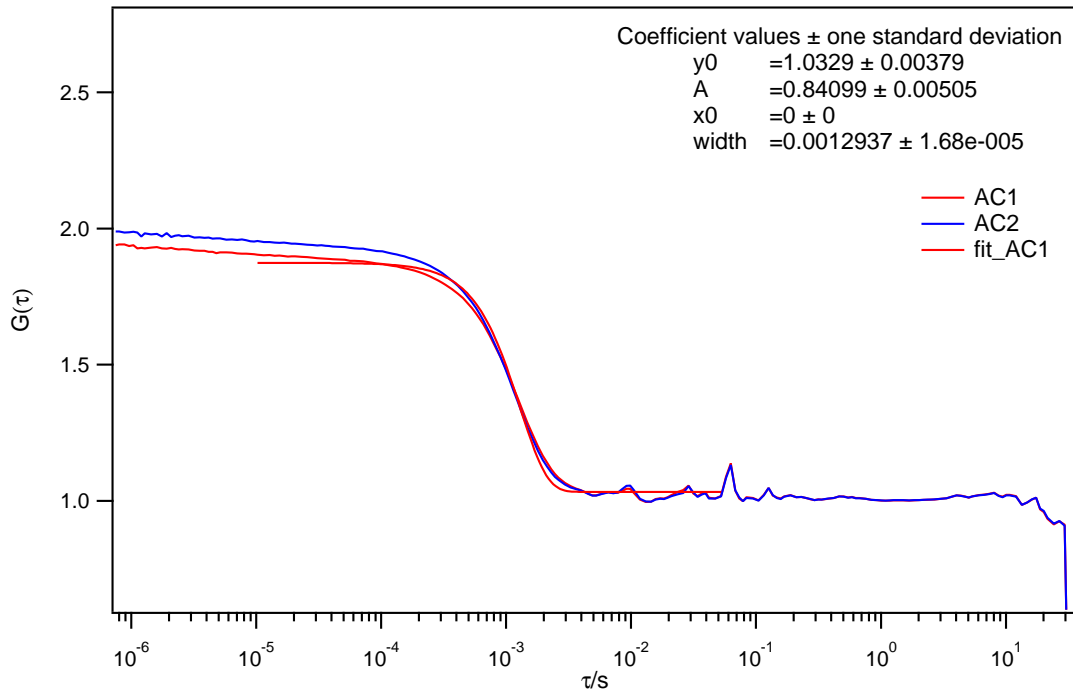


Abbildung 40: FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]), gemessen mit 256 Pixeln. Die steile Gauß-Kurve spricht für eine schmale Größenverteilung der Partikel.

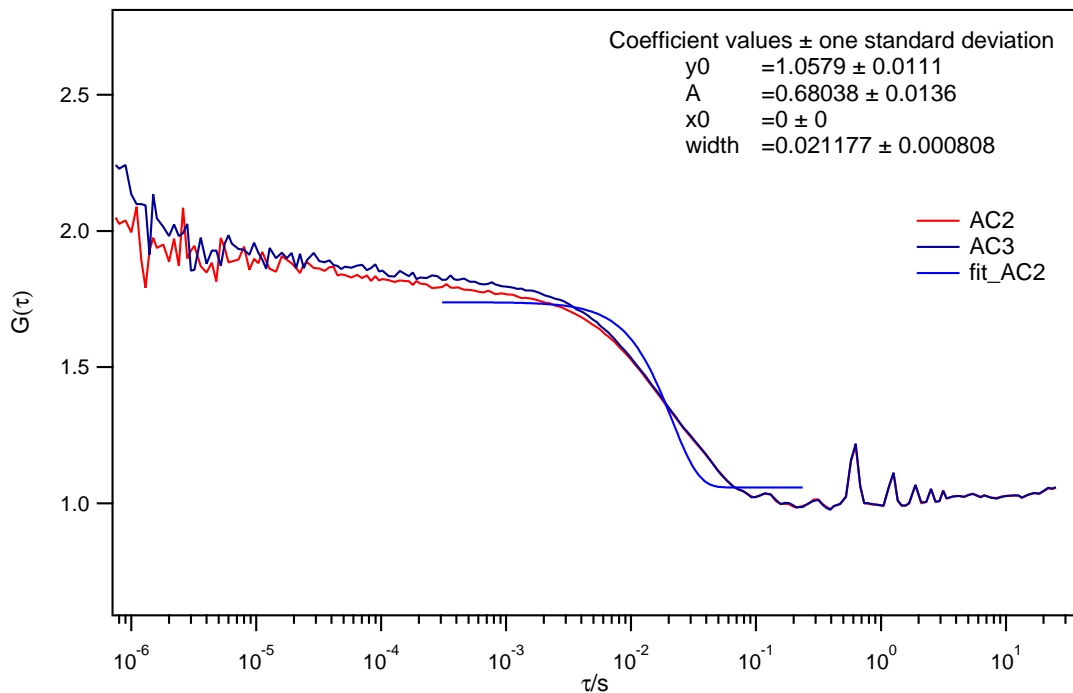


Abbildung 41: FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]), gemessen mit 256 Pixeln. Die flachere Gauß-Kurve im Vergleich mit Abbildung 40 deutet auf eine breitere Größenverteilung Partikel im Vergleich mit den Alginat-Peptid-Komplexen hin.

Tabelle 24: Auswertung sFCS-Messung zur Größenbestimmung der Polysaccharid-Peptid-Komplexe.

Molares Verhältnis Polysaccharid:Peptid	Radius /nm
Alginat-Peptid-Komplex 1:100 16 Pixel	14
Alginat-Peptid-Komplex 1:100 64 Pixel	30
Alginat-Peptid-Komplex 1:100 256 Pixel	505
Alginat-Peptid-Komplex 1:150 16 Pixel	13
Alginat-Peptid-Komplex 1:225 16 Pixel	89
Pektin-Peptid-Komplex 1:30 16 Pixel	119
Pektin-Peptid-Komplex 1:30 64 Pixel	327
Pektin-Peptid-Komplex 1:30 128 Pixel	569
Pektin-Peptid-Komplex 1:30 256 Pixel	827

Die Verteilungsfunktion der Gauß-Kurve steigt bei den Alginat-Peptid-Partikeln mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) steiler an als bei den Pektin-Peptid-Partikeln mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). Das weist darauf hin, dass es bei den Alginat-Peptid-Partikeln hauptsächlich Partikel einer Größe gibt, während es bei Pektin-Peptid-Partikeln zu einer Größenverteilung kommt.

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass die Pektin-Peptid-Partikel größer sind als die Alginat-Peptid-Partikel. Obwohl die Pektin-Peptid-Partikel lediglich ein Drittel der Peptide enthalten, die in den Alginat-Peptid-Partikeln enthalten sind. Hinzu kommt auch, dass der mit der GPC bestimmte hydrodynamische Radius von Alginat 45,0 nm beträgt und der hydrodynamische Radius von Pektin 31,7 nm.

4.3.5 Konfokale Mikroskopie

Mittels konfokaler Mikroskopie können die fluoreszenzmarkierten Partikel in der Fokusebene sichtbar gemacht werden. Anhand der eingestellten Scannbereichs und der daraus resultierenden Skalierung des aufgenommenen Bildes, sind Rückschlüsse auf die Größe der abgebildeten Partikel möglich.

In Abbildung 42 sind die Bilder aus der konfokalen Mikroskopie der Alginat-Peptid-Komplexe mit den Bindungsverhältnissen 1:100 (A) und 1:225 (B und C) ([Alginat]:[Peptid]), sowie die Pektin-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:30 (D und E) ([Pektin]:[Peptid]) dargestellt.

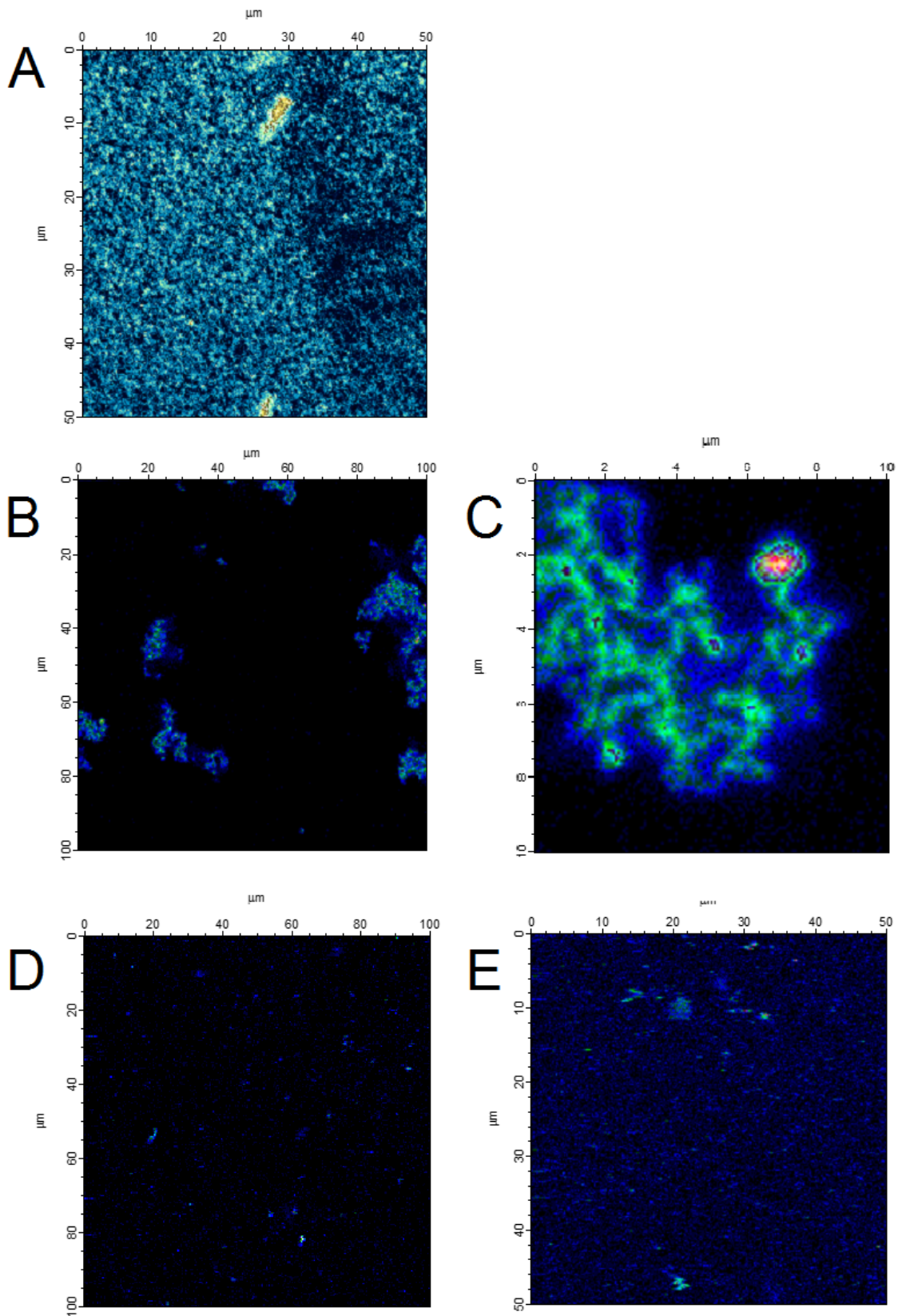


Abbildung 42: Mit der Konfokal-Mikroskopie aufgenommene Bilder der Partikel: **A:** Alginat-Peptid-Komplex 1:100 ([Alginat]:[Peptid]), 256 Pixel, 50 μm , 1ms, **B:** Alginat-Peptid-Komplex 1:225 ([Alginat]:[Peptid]), 256 Pixel, 100 μm , 1ms, **C:** Alginat-Peptid-Komplex 1:225 ([Alginat]:[Peptid]), 256 Pixel, 10 μm , 1ms, **D:** Pektin-Peptid-Komplex 1:30 ([Pektin]:[Peptid]), 256 Pixel, 100 μm , 1ms und **E:** Pektin-Peptid-Komplex 1:30 ([Pektin]:[Peptid]), 256 Pixel, 50 μm , 1ms. Die Alginat-Peptid-Komplexe sind bei einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) in der Lösung verteilt. Steigt das Bindungsverhältnis jedoch auf 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) sind Agglomerate erkennbar. Die Pektin-Peptid-Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) diffundieren ebenfalls durch die Lösung.

Abbildung 42 A zeigt die Alginat-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]). Diese Partikel sind in der Messlösung verteilt und zeigen hauptsächlich eine kleine Partikelspezies und in dieser Abbildung einen Partikel einer größeren Spezies. Die kleinen dicht zusammen liegenden Partikel weisen einen Durchmesser von etwa 670 nm auf. Der große Partikel hat Ausmaße von etwa 2800 nm x 4300 nm. Nach unten hin ist der Partikel wahrscheinlich etwas diffundiert und dadurch nur verschwommen sichtbar. Abbildung 42 B und C zeigen die Alginat-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]). Da die Komplexe mit diesem hohen Bindungsverhältnis sehr schnell auf das Deckglas absinken sind in der Fokusebene nur wenige Partikel sichtbar. Der Hauptanteil der Partikel liegt vermutlich in einer Art lockerer Zusammenlagerung auf dem Deckglas. Ein Teil dieser Zusammenlagerung ist in Abbildung 42 C vergrößert dargestellt und besitzt Abmessungen von ca. 1100 nm x 700 nm.

Abbildung 42 D zeigt wenige Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). Diese sind in Abbildung 42 E leicht vergrößert und besitzen einen Durchmesser von ca. 1900 nm. Auffällig ist, dass die Pektin-Peptid-Komplexe deutlich weniger Fluorophore beinhalten als die Alginat-Peptid-Komplexe. Diese Beobachtung entspricht den zuvor ermittelten Bindungsverhältnissen.

Die Partikel scheinen annähernd eine globuläre Struktur aufzuweisen.

Tabelle 25: Größenbestimmung durch konfokale Mikroskopie.

Probe	Partikel Abmessungen /nm
Alginat-Peptid-Komplex 1:100	ø 670 2800 x 4300
Alginat-Peptid-Komplex 1:225	700 x 1100
Pektin-Peptid-Komplex 1:30	ø 1900

4.3.6 Diskussion der Partikelgrößenbestimmung

Zu Beginn der Diskussion sollen die mit den verschiedenen Messmethoden ermittelten Partikelgrößen gegenüber gestellt werden.

Tabelle 26: Überblick der mit verschiedenen Methoden ermittelten Partikelgrößen angegeben als Durchmesser \varnothing , hydrodynamischer Radius R_h oder in Länge x Breite x Höhe angegeben. In Klammern sind die jeweiligen Polysaccharide zu Peptid Verhältnissen angegeben. Nicht gemessene Proben sind mit „n.g.“ gekennzeichnet.

Methode	Alginat-Peptid sonifiziert /nm	Alginat-Peptid emulgiert /nm	Pektin-Peptid sonifiziert /nm	Pektin-Peptid emulgiert /nm
PCCS	\varnothing 791 (1:250)	\varnothing 712 (1:250)	\varnothing 450 (1:110)	\varnothing 3610 (1:110)
DLS	\varnothing 259 (1:100)	\varnothing 250 (1:100) \varnothing 1287 (1:100)	\varnothing 441 (1:30)	\varnothing 218 (1:30) \varnothing 863 (1:30)
AFM	400x200x25 (1:100) 400x300x35 (1:100)	280x170x23 (1:100) 170x110x23 (1:100) 1590x1980x4 (1:100)	1000x615x125 (1:30) 750x433x15 (1:30)	270x220x75 (1:30) 1150x820x15 (1:30)
sFCS256 Pixel	R_h 505 (1:100)	n.g.	R_h 827 (1:30)	n.g.
Konfokale Mikroskopie	\varnothing 670 (1:100) 2800x4300 (1:100)	n.g.	\varnothing 1900 (1:30)	n.g.
FCS	R_h 342 (1:100) R_h 1384 (1:225)	n.g.	R_h 841 (1:30) R_h 14880 (1:90)	n.g.

Die Messmethoden des Zetasizers und der PCCS sind sehr ähnlich. Trotzdem kommt es zu Unterschieden in der ermittelten Partikelgröße zwischen diesen beiden Methoden. Diese Differenzen könnten auf die Unterschiede in eingesetzten Bindungsverhältnissen oder die Unterschiede in den Messmethoden zurückgehen. Beide Methoden verwenden die dynamische Lichtstreuung und messen die Streuintensität. Der Unterschied liegt im Messaufbau. Identisch ist die Verwendung eines 90° Winkels. Die PCCS verwendet allerdings zwei Laser, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden und das Hintergrundsignal somit zu verringern. Der Zetasizer verwendet hingegen einen Laser und das Hintergrundsignal wird durch eine stark verdünnte Lösung gering gehalten.

Die verschiedenen Messarten mit dem konfokalen Mikroskop (konfokale Mikroskopie, FCS und sFCS) liefern insbesondere bei den Alginat-Peptid-Partikeln unterschiedliche Ergebnisse. Diese Beobachtung könnte zum einen auf eine ungleichmäßige Fluorophor Verteilung in den Komplexen zurückzuführen sein. Diese scheint in den Pektin-Peptid-Partikeln gleichmäßiger zu sein. Eine andere Erklärung könnte der Einfluss der Halbwertsbreite des Laserfokusses sein, welcher mit 250 nm für die Bestimmung von Partikeln mit einem Durch-

messer $\leq 1 \mu\text{m}$ nur bedingt geeignet ist. Die Pektin-Peptid-Partikel weisen einen größeren Durchmesser auf, wodurch der Einfluss der Laserfokus-Halbwertsbreite abnimmt.

Die Partikelgröße ist eine nicht zu unterschätzende Eigenschaft von Wirkstoffvesikeln. Für die inhalative Anwendung sind andere Partikelgrößen essentiell als bei intravenösen oder oralen Applikationen. Für die Anwendung zur Inhalation sind Partikel $\leq 1 \mu\text{m}$ ungeeignet, denn sie würden direkt wieder ausgeatmet werden, was hohe Verluste zur Folge hätte. Partikelgrößen zwischen $1 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$ sind hingegen optimal für diese Applikationsart. Partikelgrößen zwischen $5 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ sind zu groß und würden sich direkt an Mund oder Rachen anlagern [60]. Intravenös verabreichte Partikel sind ab einer Partikelgröße $> 5 \mu\text{m}$ problematisch, denn solch große Partikel können Blutkapillaren verstopfen [177]. Tumor-Antigen-Peptide lassen sich mit PLGA komplexieren. Die entstehenden Partikel sind rund und wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop analysiert. Die Größenverteilung liegt zwischen 150 nm und 500 nm, mit einem Maximum zwischen 300 nm und 400 nm [62]. *Chlamydia trachomatis* rekombinantes MOMP-187 Peptid, verkapselt mit PLGA, zeigt unter dem AFM Partikelgrößen von 202 nm und 229 nm [178]. Mit Liposomen verkapselte Antibiotika zeigen im Cryo-Elektronenmikroskop eine Partikelgröße von 150 nm bis 190 nm [58].

Die Partikelgröße der emulgierten Alginat-Peptid-Partikel unterscheidet sich je nach Messmethode. Die PCCS zeigt einen Partikeldurchmesser von 712 nm. Die DLS hingegen zeigt zwei Partikelgrößen. Zum einen zeigen 66 % der Partikel einen Durchmesser von 250 nm und zum anderen zeigen 34 % der Partikel einen Durchmesser von 1287 nm. Im Mittel beträgt die mittels DLS gemessene Partikelgröße 603 nm. Das legt die Vermutung nahe, dass die PCCS eine Partikelgröße misst, während die Zetasizer Software zwei unterschiedliche Partikelgrößen zeigt. Die Differenz von 100 nm im Durchmesser aus den Partikeln kann auf die verschiedenen molaren Alginat-Peptid-Verhältnisse zurückzuführen sein, denn die mittels PCCS analysierten Alginat-Peptid-Partikel besitzen ein molares Verhältnis von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) während die mittels DLS analysierten Partikel ein molares Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) aufweisen. Die AFM-Messungen der emulgierten Alginat-Peptid-Partikel in einem molaren Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) weisen Partikelgrößen zwischen 100 nm und 280 nm auf. Hinzu kommen Agglomerate im Größenbereich von $> 1000 \text{ nm}$, welche aus vielen Partikeln im Größenbereich zwischen 50 nm und 100 nm bestehen. Der Nachweis von zwei Partikelspezies mit diesen von Grund auf verschiedenen Messmethoden (DLS und AFM) spricht für sich.

Die sonifizierten Alginat-Peptid-Partikel weisen je nach Messmethode unterschiedliche Partikeldurchmesser auf. Diese lassen sich grob in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden die Ergebnisse der AFM- und DLS-Messungen, welche für ein molares Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) einen Partikeldurchmesser $< 500 \text{ nm}$ messen. Die zweite Gruppe ist für einen Partikeldurchmesser zwischen 500 nm und 1000 nm definiert. Die Ergebnisse der sFCS bei 256 Pixeln des Bildes der konfokalen Mikroskopie des molaren Verhältnisses 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) und die PCCS für ein molares Verhältnis von 1:250

([Alginat]:[Peptid]) liegen damit im Bereich der zweiten Gruppe. Ein Partikeldurchmesser >1000 nm wird der dritten Gruppe zugeordnet. Dazu gehören der große, mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommene, Partikel in Abbildung 42 A für ein Alginat-Peptid-Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) und die FCS Ergebnisse für ein molares Verhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]).

Diese Ergebnisse könnten wie folgt interpretiert werden. Scheinbar erhöht sich der Partikeldurchmesser mit dem molaren Verhältnis, sowie durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide. Das molare Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) kann ohne die Verwendung von Alexa in die erste Gruppe eingeordnet werden. In der zweiten Gruppe befinden sich Partikel, deren eingesetzte Peptidkonzentration 10 % Fluoreszenzmarkierte Peptide enthält. Ein großer Partikel mit dem molaren Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) liegt in der dritten Gruppe. Bei diesem Partikel handelt es sich allem Anschein nach um eine Ausnahme. Der mittels PCCS ermittelte Partikeldurchmesser des molaren Verhältnisses von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) kann der zweiten Gruppe zugeordnet werden. Unter der Verwendung von Alexa kann mittels FCS bei einem molaren Verhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) der Partikeldurchmesser der dritten Gruppe zugeordnet werden. Bei einem molaren Verhältnis von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) bilden die Partikel ein großes Agglomerat, welches direkt ausfällt und mit dieser Methode nicht mehr analysierbar ist.

Auffällig ist, dass sich die Partikelgröße der emulgierten und sonifizierten Alginat-Peptid-Partikel innerhalb einer Messmethode ähneln.

Die emulgierten Alginat-Peptid-Partikel sind deutlich kleiner als die meisten in der Literatur [3] [76] [83] [84] [161] genannten Partikelgrößen für Alginat-Komplexe. Das könnte an der Verwendung von dem Emulgator Span80 während der Verkapselung liegen, denn dieses könnte die Agglomeration der Partikel verhindern. Malaria-Synthetische Peptide verkapselt mit PLGA und Alginat kommen mit ihrer Größenordnung (gerundet 900 nm bis 950 nm) [3] eher in die Nähe, der in dieser Arbeit gemessenen Partikelgrößen, wobei die PLGA-Partikel ähnliche Größenordnungen besitzen [58] [62] [178].

Die sonifizierten Alginat-Peptid-Partikel sind in der Größenordnung ähnlich, wie die emulgierten Alginat-Peptid-Partikel. Die Partikel, welche fluoreszenzmarkierte Peptide enthalten, sind deutlich größer.

Die Pektin-Peptid-Komplexe sind in der Lage, Agglomerate zu bilden oder anzuschwellen. Das Anschwellen von Pektin-Partikeln ist in der Literatur beschrieben. Dieses ist allerdings abhängig vom pH-Wert bzw. von der Salzkonzentration [179]. Eine weitere Literaturstelle beschreibt eine Abhängigkeit des Anschwellens von der Temperatur, aber unabhängig vom pH-Wert [180]. In der FCS treten diese großen Partikel bei den sonifizierten Partikeln bei einem molaren Verhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) mit einem Durchmesser von $30 \mu\text{m}$ auf. Ebenfalls treten während der PCCS-Messung vermeintliche Agglomerate bei den durch die O/W-Emulsion hergestellten Pektin-Peptid-Partikeln auf. Diese nehmen in ihrem Durch-

messer von 4 μm auf über 10 μm mit steigender Messzeit und Temperatur zu.

Emulgierte Pektin-Peptid-Partikel mit einem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) zeigen mittels DLS zwei Partikelgrößen. Beide Partikeldurchmesser liegen unterhalb von einem μm . Mit dem AFM sind sowohl Partikel als auch Agglomerate nachweisbar. Diese Agglomerate besitzen einen Durchmesser von etwa 800 nm bis 1150 nm und bestehen aus Partikeln mit etwa 100 nm Durchmesser.

Die durch Sonifizieren hergestellten Partikel weisen mittels PCCS, Zetasizer und AFM einen ähnlichen Durchmesser auf. Dieser liegt bei allen Messungen unterhalb von 1 μm . Der mittels PCCS und Zetasizer ermittelte Durchmesser unterscheidet sich lediglich um 9 nm, obwohl die molaren Verhältnisse sich mit 1:30 und 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) deutlich unterscheiden. Die AFM-Messungen zeigen Partikel in einer ähnlichen Größenordnung wie die Streulichtmessungen. Das spricht im Vergleich mit den Alginat-Peptid-Komplexen für einen geringeren Einfluss der eingesetzten molaren Polysaccharid-Peptid-Verhältnisses.

Die Scanning FCS und die FCS-Messung zeigen einen Partikeldurchmesser von $>1 \mu\text{m}$. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich die Partikelgröße unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide deutlich vergrößert. Bei einem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) und sonifizierten Partikeln zeigt sich durch Alexa etwa eine Vervierfachung des Partikeldurchmessers.

Pektin-Gelatine-Komplexe bilden bei der Komplexierung von Metronidazol Hydrochlorid, Diclofenac-Natrium und Indomethacin Partikel im zwei- bis dreistelligen Mikrometerbereich, genau wie die Alginat-Gelatine-Komplexe [84]. Diese Unterschiede sind auf die Unterschiede in der Herstellungsmethode zurückzuführen. Bei Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden Partikel durch Zusammenführen, unter Rühren, von in Wasser gelösten Polysacchariden und Peptid ohne Sonifizieren, sowie ohne die Verwendung von Span80 hergestellt. Die Partikelgröße dieser Partikel lagen ebenfalls im Mikrometerbereich.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Pektin-Peptid-Partikel sind kleiner als die meisten Größe der publizierten Partikel. Lediglich die mittels FCS bestimmte Partikelgröße der Pektin-Peptid-Partikel im molaren Verhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) unter der Verwendung von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid im Verhältnis 1:10 ähnelt der Partikelgröße der von Saravanan et al. publizierten Pektin-Gelatine Mikrosphären [84].

Melo et al. beschreibt die Größenbestimmung eines Lysozyms, welches ebenfalls mit Alexa fluoreszenzmarkiert ist. Dieses Enzym wird an Liposomen gebunden. Für das Lysozym resultiert eine Diffusionszeit von 93 μs , welche mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung zu einem Durchmesser von 81 nm umgerechnet wird [176]. Für die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 15) ist jedoch der Diffusionskoeffizient ausschlaggebend. Somit muss erst von der Diffusionszeit auf den Diffusionskoeffizienten umgerechnet werden. Dazu wird das exakte Diffusionsvolumen samt Achsenverhältnissen benötigt, welches ausschließlich durch die Kalibrierung mit einem bekannten Fluorophor ermittelt werden kann [181]. Die Umrechnung scheint trotzdem erfolgreich gewesen zu sein, denn die Liposomen besitzen Poren mit

einem Durchmesser von 100 nm. Durch die Bindung des Enzyms an die Liposomen bleibt dessen Diffusionszeit unverändert [176]. Das lässt darauf schließen, dass das Enzym in den Poren bindet. Daher muss es einen Durchmesser von < 100 nm besitzen. Die Diffusionszeit der monodispersen Liposomen liegt im Bereich von $1,5 \text{ ms} \pm 0,1 \text{ ms}$ [176]. Diese Größenordnung entspricht in etwa einem Zehntel der Diffusionszeit der durch sonifizieren hergestellten Alginat-Peptid-Komplexe (1:100 [Alginat]:[Peptid]) und Pektin-Peptid-Komplexe mit einem molaren Verhältnissen bis 1:45 ([Pektin]:[Peptid]). Die Pektin-Peptid-Komplexe mit molaren Verhältnissen zwischen 1:60 ([Pektin]:[Peptid]) und 1:135 ([Pektin]:[Peptid]) liegen um den Faktor 1.000 bis 10.000 höher. Diese Tendenz zeigt, dass Liposomen als Vesikel kleiner sind als Polysaccharide, wie Pektin und Alginat. Dieses Ergebnis entspricht dem Trend, der auch der Literatur entnommen werden kann [58] [83] [161].

Mit Ausnahme der AFM-Messung gehen alle Methoden zur Partikelgrößenbestimmung von der Annahme aus, dass es sich um kugelförmige Partikel handelt. Möglicherweise weisen die Pektin-Peptid-Partikel in Lösung eine annähernd kugelförmige Struktur auf. Das macht die Ergebnisse der Messungen miteinander vergleichbar.

Die Alginat-Peptid-Partikel weichen scheinbar von der Kugelstruktur ab, denn die Messergebnisse variieren deutlich stärker als die Ergebnisse der Pektin-Peptid-Partikel. Dieses Ergebnis zeigt die gleiche Tendenz wie das Ergebnis der GPC-Messung der Polysaccharide, denn Alginat weist den größten hydrodynamischen Radius auf, obwohl Pektin die größte molare Masse der drei gemessenen Polysaccharide aufweist.

Jedoch gibt es auch mit der hier durchgeführten AFM-Messung ein Problem. Die Proben wurden für die Messungen getrocknet. Abbildung 36 A / B zeigt deutlich, dass die Partikel sich beim Trocknen zusammenlagern und es scheint, als ob die Zugkraft des verdampfenden Wassers die zusammengelagerten Partikel förmlich auseinander reißt. Trotz Zusammenlagerung und anschließendem Auseinanderreißen dieser Zusammenlagerungen sind einzelne Partikel erkennbar und messbar.

Auffällig ist, dass es sich bei den durch Sonifizieren hergestellten Partikeln jeweils um eine monodisperse Spezies handelt, während es sich bei den durch eine O/W-Emulsion hergestellten Partikeln eher um polydisperse Spezies, bestehend aus zwei Komponenten, handelt.

4.4 Die Polysaccharid-Peptid-Wechselwirkungen

Nachdem ermittelt wurde mit welcher Bindungsstöchiometrie die jeweiligen Polysaccharide und Peptid 19-2.5 wechselwirken, sind die Wechselwirkungen genauer zu charakterisieren:

- Zu welcher Art von Wechselwirkungen kommt es zwischen Polysaccharid und Peptid 19-2.5?
- Wechselwirkt der Fluoreszenzmarker Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide mit Peptid 19-2.5?
- Wechselwirkt der Fluoreszenzmarker Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide mit den Polysacchariden?

Denkbar wären zwischen dem anionischen Alginat oder Pektin und dem kationischen Peptid 19-2.5 ionische Wechselwirkungen. Zusätzlich könnte es auch zu hydrophoben Effekten oder Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuren des Peptids und den Monosaccharid-Einheiten der Polysaccharide kommen. Ionische Wechselwirkungen zwischen dem kovalent an das Peptid gebundenen Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide und den Polysacchariden sind aufgrund der negativen Ladungen am Fluoreszenzfarbstoff eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher sind hingegen ionische Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Peptid und dem Fluoreszenzmarker.

4.4.1 Fluoreszenzspektren der Polysaccharid-Peptid-Komplexe

Kommt es zwischen dem Fluoreszenzmarker (Alexa) und dem Peptid oder dem Peptid-Polysaccharid-Komplex zu Wechselwirkungen, gehen solche Wechselwirkungen mit einer Veränderung des Fluoreszenzspektrums einher.

Tabelle 27: Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzspektren des ungebundenen Fluoreszenzmarkers Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide (Alexa), des fluoreszenzmarkierten Peptids (Peptid-Alexa), der Polysaccharide und den Polysaccharid-Peptid-Komplexen.

Probe	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa	491 nm	515 nm
Peptid-Alexa	496 nm	524 nm
Alginat	257 nm	518 nm
Alginat-Peptid-Alexa	493 nm	517 nm
Pektin	250 nm	500 nm
Pektin-Peptid-Alexa	496 nm	518 nm

Das Emissionsspektrum erfährt durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide an das Peptid eine Rotverschiebung um 9 nm. Die aromatischen Aminosäuren des Peptids wechselwirken mit dem Fluorophor des Farbstoffs. Bindet das fluoreszenzmarkierte Peptid an Alginat, nimmt diese Rotverschiebung um 7 nm ab und die

Bindung von fluoreszenzmarkiertem Peptid an Pektin bewirkt eine Abnahme dieser Verschiebung um 6 nm.

4.4.2 Charakterisierung der Wechselwirkungen mittels isothermer Titrationskalorimetrie

Wie stark das Peptid mit dem jeweiligen Polysaccharid in Wechselwirkung tritt lässt sich durch die, mittels ITC bestimmte, Bindungskonstante K angeben. Für diese Versuche wurden Peptid 19-2.5 und die Polysaccharide in 20 mM Tris-Puffer pH = 7,4 (Tabelle 7) gelöst.

Tabelle 28: ITC Messwerte Alginat-Peptid-Wechselwirkung.

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert
K /(1/mol)	$3,05 \cdot 10^6$	$1,62 \cdot 10^6$	$5,63 \cdot 10^6$	$(3,43 \pm 1,65) \cdot 10^6$
ΔH /(kJ/mol)	-161,1	-145,7	-176,6	$-161,1 \pm 12,6$
ΔS /(J/mol/°C)	9,5	27,8	-28,6	$2,9 \pm 23,5$
T /(°C)	37,0	37,0	37,0	37,0
ΔG /(kJ/mol)	-161,4	-146,7	-175,5	$-161,2 \pm 11,8$
Molares Verhältnis	1:281	1:257	1:231	$1:256 \pm 20$

Tabelle 29: ITC Messwerte Pektin-Peptid-Wechselwirkungen.

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert
K /(1/mol)	$1,18 \cdot 10^4$	$4,26 \cdot 10^4$	$7,32 \cdot 10^4$	$(7,79 \pm 3,10) \cdot 10^4$
ΔH /(kJ/mol)	-112,7	-121,2	-110,9	$-114,9 \pm 4,5$
ΔS /(J/mol/°C)	4,06	19,8	32,3	$18,7 \pm 11,6$
T /(°C)	37,0	37,0	37,0	37,0
ΔG /(kJ/mol)	-112,8	-121,9	-112,1	$-115,6 \pm 4,5$
Molares Verhältnis	1:87	1:97	1:100	$1:95 \pm 6$

Das Peptid bindet mit einer Bindungskonstante $K = (7,79 \pm 3,10) \cdot 10^4$ 1/M an das Pektin. Damit ist diese Wechselwirkung schwächer als die Wechselwirkung zwischen Peptid und Alginat mit $K = (3,43 \pm 1,66) \cdot 10^6$ 1/M.

Wird das Peptid gegen Chitosan titriert, wird Energie aufgenommen. Diese entspricht der Lösungsenthalpie, die auch bei der Titration des Peptids in Tris-Puffer gemessen wurde. Das heißt es ist keine Bindung zwischen Chitosan und Peptid nachweisbar. Chitosan ist in Tris-Puffer pH = 7,4 teilweise positiv und teilweise ungeladen. Das positiv geladene Chitosan stößt das positiv geladene Peptid ab.

Die ermittelte freie Enthalpie bei der Pektin-Peptid- und Alginat-Peptid-Wechselwirkung ist negativ. Somit liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Produkt Seite. Die freie Enthalpie der Alginat-Peptid-Wechselwirkung ist geringer als die freie Enthalpie der Pektin-Peptid-Wechselwirkung. Durch das negative Vorzeichen der freien Enthalpie sind die Wechselwir-

kungen zwischen Alginat und Peptid 19-2.5 stärker, als die Wechselwirkungen zwischen Pektin und Peptid 19-2.5.

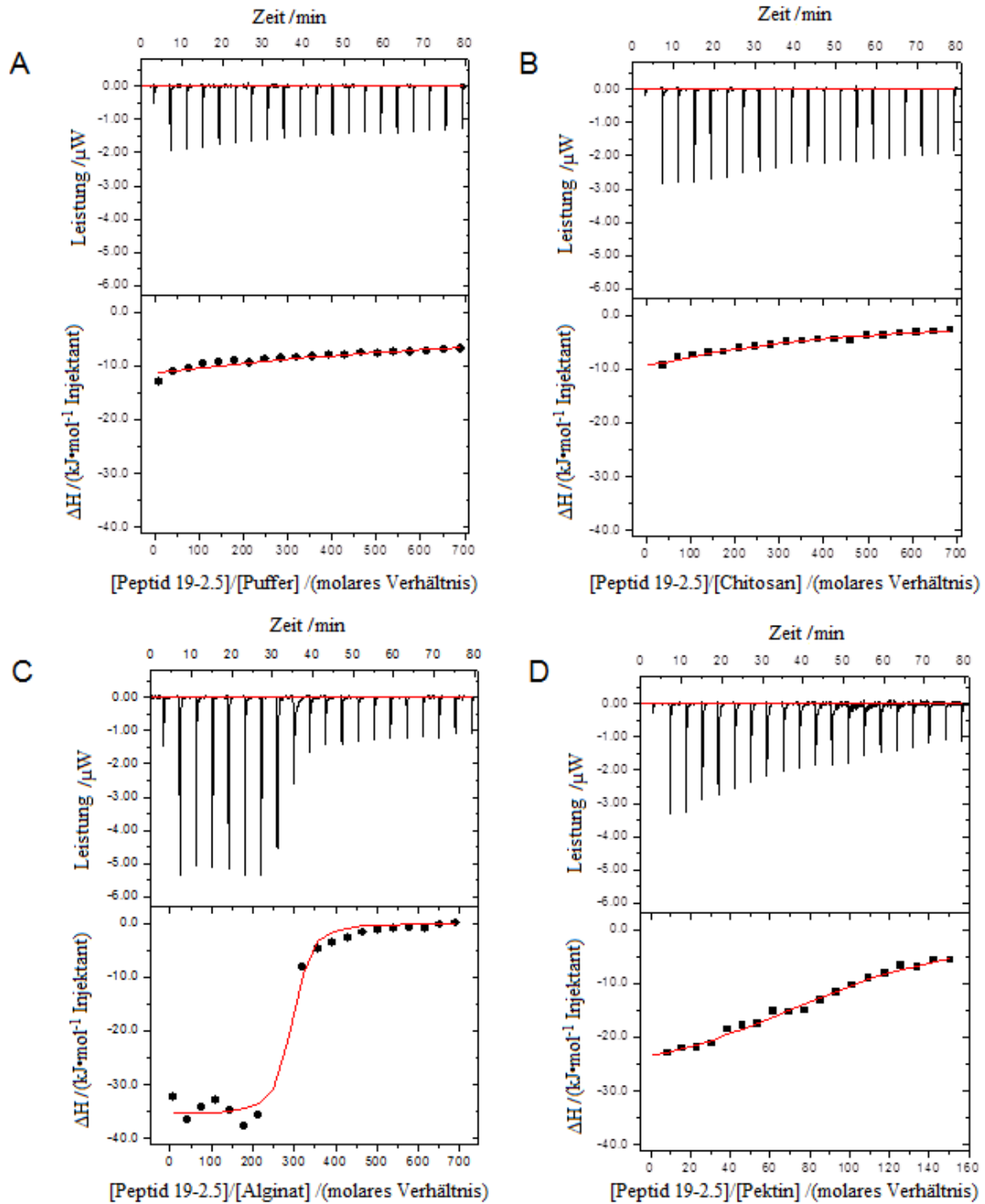


Abbildung 43: ITC-Messung **A:** 1 mM Peptid titriert gegen 20 mM Tris-Puffer pH = 7,4; **B:** 1 mM Peptid titriert gegen 0,22 μ M Chitosan; **C:** 1 mM Peptid titriert gegen 0,22 μ M Alginat und **D:** 1 mM Peptid titriert gegen 1,00 μ M Pektin.

4.4.3 Ermittlung der Triplett-Zeit der Polysaccharid-Peptid-Komplexe

Die Wahl des Verhältnisses von fluoreszenz markierten Peptiden zu unmarkierten Peptiden ist für die Ermittlung des Triplett-Anteils und der Triplett-Zeit entscheidend. Bei einem Alginat-Peptid-Verhältnis von 1:100 ([Alginat]:[Peptid]) enthält ein Partikel theoretisch zwei Alginate und 20 fluoreszenzmarkierte Peptide. Enthält ein Partikel mehr als ein Fluorophor, erschwert dies die Ermittlung der Triplett-Zeit eines Fluorophors. Ebenso verhält es sich bei Pektin-Peptid-Partikeln mit einem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). Diese enthalten beispielsweise bei einem Zehntel fluoreszenzmarkierter Peptide 9 Fluorophore pro Partikel.

Zur Ermittlung des Triplett-Anteils und der Triplett-Zeit ist das molare Verhältnis von Peptid zu fluoreszenzmarkiertem Peptid verändert worden, während das molare Verhältnis von Polysaccharid zu Peptid innerhalb einer Versuchsreihe konstant gehalten wurde.

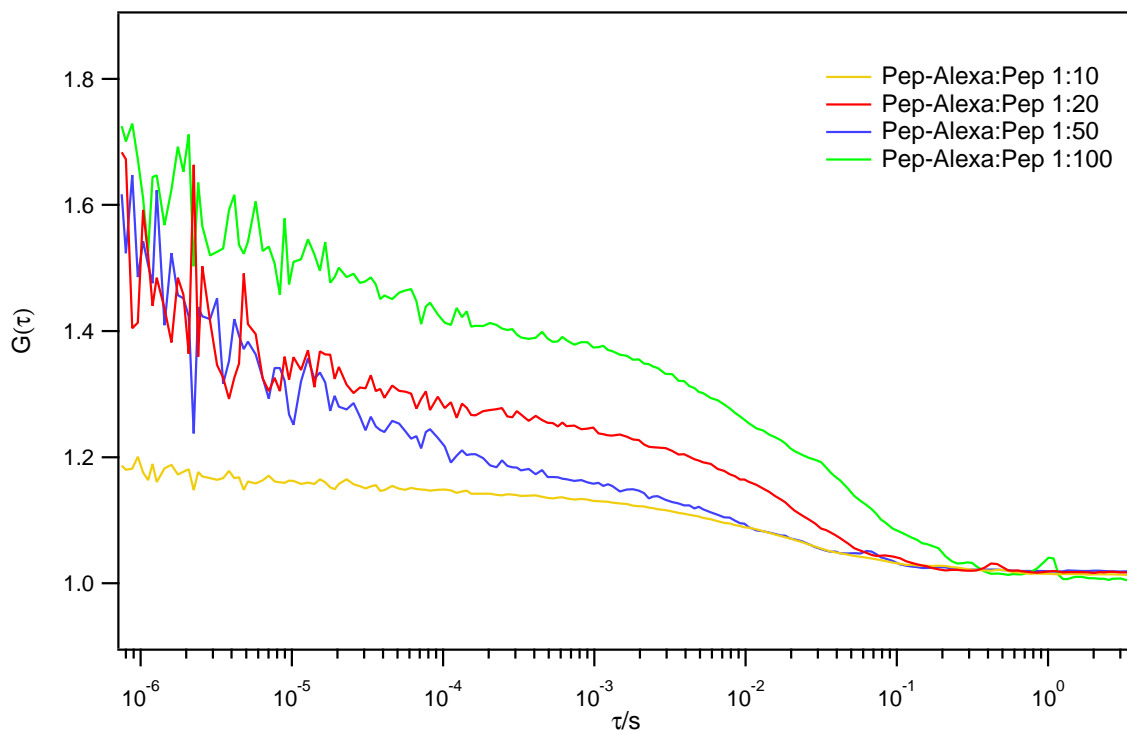


Abbildung 44: FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:100 ([Alginat]:[Peptid]). Die Verhältnisse von fluoreszenzmarkiertem Peptid (Pep-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Pep) variieren und sind der Legende zu entnehmen.

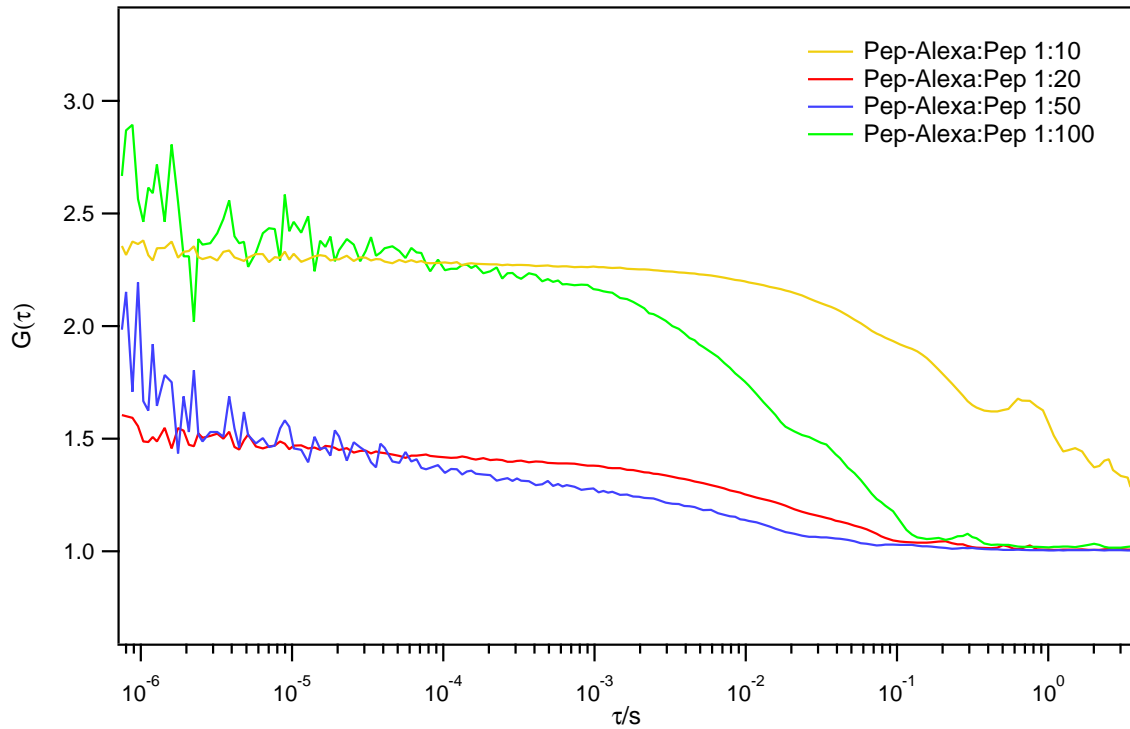


Abbildung 45: FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:225 ([Alginat]:[Peptid]). Die Verhältnisse von fluoreszenzmarkiertem Peptid (Pep-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Pep) variieren und sind der Legende zu entnehmen.

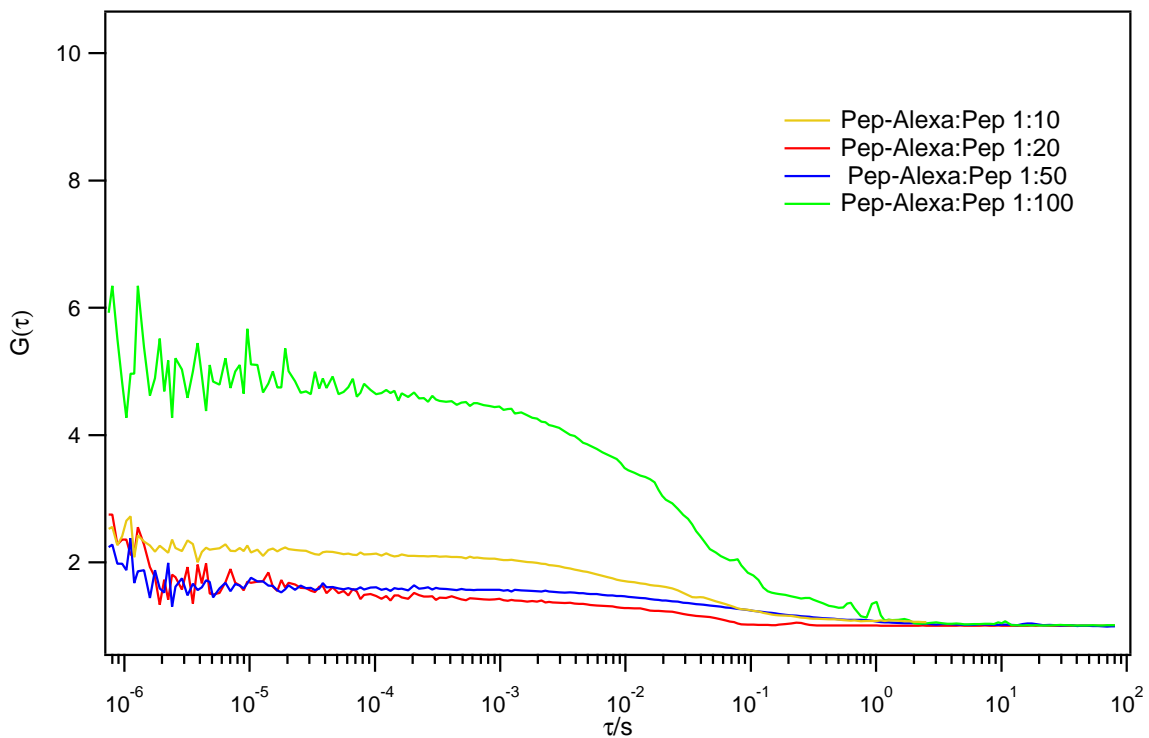


Abbildung 46: FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:30 ([Pektin]:[Peptid]). Die Verhältnisse von fluoreszenzmarkiertem Peptid (Pep-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Pep) variieren und sind der Legende zu entnehmen.

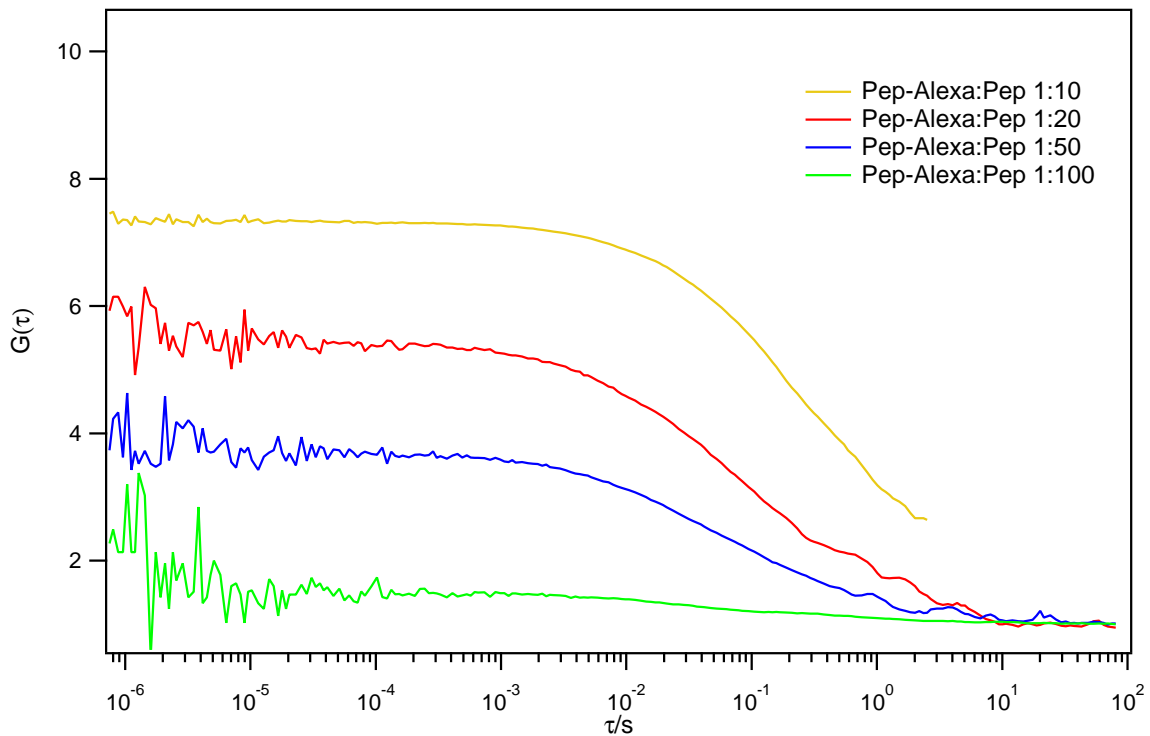
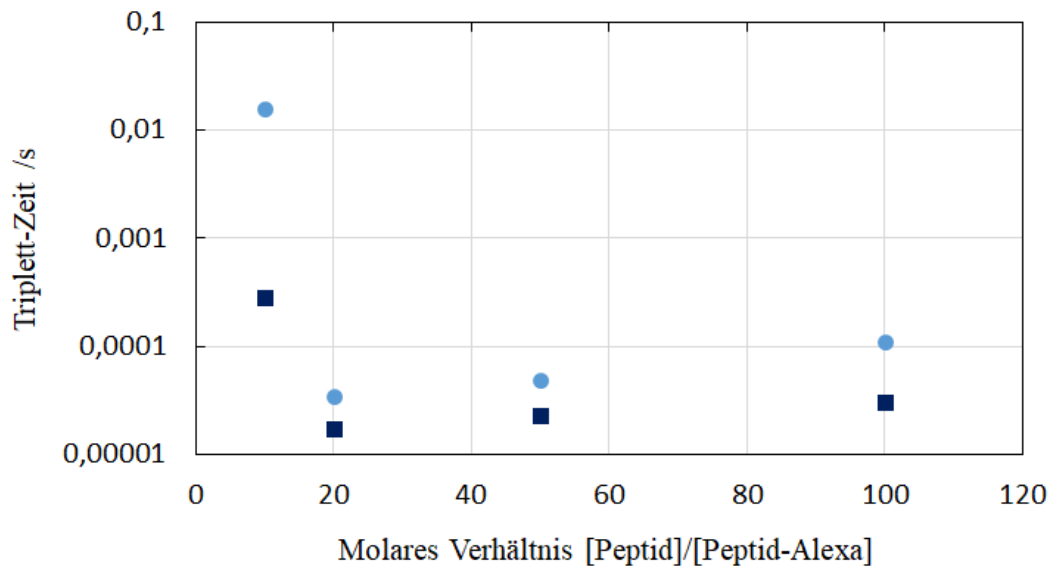


Abbildung 47: FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:90 ([Pektin]:[Peptid]). Die Verhältnisse von fluoreszenzmarkiertem Peptid (Pep-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Pep) variieren und sind der Legende zu entnehmen.

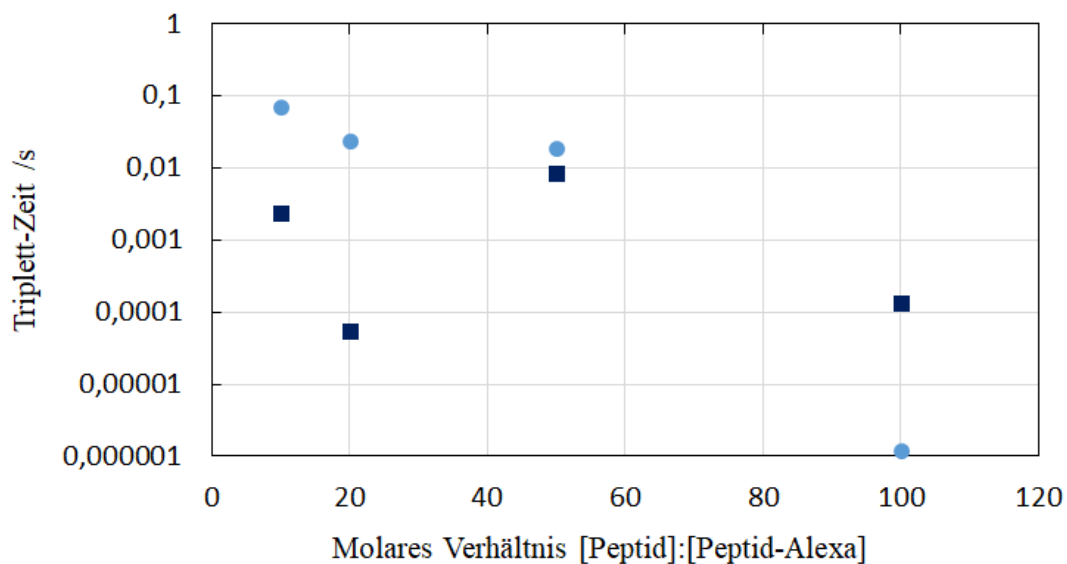
Tabelle 30: Auswertung FCS-Messung Polysaccharid-Peptid-Partikel mit verschiedenen Peptid-Alexa zu Peptid-Verhältnissen. Die Abkürzung „AP“ steht für die Alginate-Peptid-Komplexe, während die Abkürzung „PP“ für die Pektin-Peptid-Komplexe steht.

Molares Verhältnis Polysaccharid:Peptid	Teilchenzahl N	Diffusionskoeffizient $D/(1/s)$	Triplett-Anteil T	Triplett-Zeit tt/s
AP 1:100 mit 1:10	8,3	$6,4 \cdot 10^{-13}$	0,14	$28 \cdot 10^{-5}$
AP 1:100 mit 1:20	3,9	$9,7 \cdot 10^{-13}$	0,37	$1,7 \cdot 10^{-5}$
AP 1:100 mit 1:50	5,6	$17 \cdot 10^{-13}$	0,55	$2,3 \cdot 10^{-5}$
AP 1:100 mit 1:100	2,5	$4,7 \cdot 10^{-13}$	0,33	$3,0 \cdot 10^{-5}$
AP 1:225 mit 1:10	1,2	$0,50 \cdot 10^{-13}$	0,11	$1580 \cdot 10^{-5}$
AP 1:225 mit 1:20	2,5	$6,4 \cdot 10^{-13}$	0,19	$3,4 \cdot 10^{-5}$
AP 1:225 mit 1:50	3,1	$16 \cdot 10^{-13}$	0,41	$4,9 \cdot 10^{-5}$
AP 1:225 mit 1:100	0,8	$6,8 \cdot 10^{-13}$	0,12	$11,0 \cdot 10^{-5}$
PP 1:30 mit 1:10	1,1	$3,0 \cdot 10^{-13}$	0,22	$235 \cdot 10^{-5}$
PP 1:30 mit 1:20	2,3	$6,3 \cdot 10^{-13}$	0,36	$5,0 \cdot 10^{-5}$
PP 1:30 mit 1:50	2,3	$0,70 \cdot 10^{-13}$	0,29	$800,0 \cdot 10^{-5}$
PP 1:30 mit 1:100	0,3	$3,8 \cdot 10^{-13}$	0,12	$13,0 \cdot 10^{-5}$
PP 1:90 mit 1:10	0,25	$0,10 \cdot 10^{-13}$	0,33	$7179 \cdot 10^{-5}$
PP 1:90 mit 1:20	0,4	$0,25 \cdot 10^{-13}$	0,42	$2400 \cdot 10^{-5}$
PP 1:90 mit 1:50	0,6	$0,36 \cdot 10^{-13}$	0,42	$1900 \cdot 10^{-5}$
PP 1:90 mit 1:100	2,1	$1,5 \cdot 10^{-13}$	0,83	$0,1 \cdot 10^{-5}$



■ Molares Verhältnis Alginat:Peptid 1:100 ● Molares Verhältnis Alginat:Peptid 1:225

Abbildung 48: Triplet-Zeit der Alginat-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Peptid-Alexa:Peptid-Verhältnissen. Dabei bezeichnet [Peptid-Alexa] die Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid und [Peptid] die Konzentration des Peptids ohne Fluoreszenzmarkierung. Die Triplet-Zeit verlängert sich mit steigender Peptid-Konzentration. Das molare Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:10 stellt einen Ausreißer dar.



■ Molares Verhältnis Pektin:Peptid 1:30 ● Molares Verhältnis Pektin:Peptid 1:90

Abbildung 49: Triplet-Zeit der Pektin-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Peptid-Alexa:Peptid-Verhältnissen. Dabei bezeichnet [Peptid-Alexa] die Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid und [Peptid] die Konzentration des Peptids ohne Fluoreszenzmarkierung. Bei einem Pektin-Peptid-Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) ist kein Trend erkennbar. Während die Tripletzeit bei einem Bindungsverhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) mit sinkendem Anteil an Alexa abnimmt.

Die analysierten Alginat-Peptid-Komplexe (Bindungsverhältnisse 1:100 und 1:225 [Alginat]:[Peptid]) mit einem molaren Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:10 weisen die längste Triplett-Zeit auf. Für diese Komplexe liegt die niedrigste bestimmte Triplett-Zeit bei einem molaren Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:20. Anschließend steigt die Triplett-Zeit mit sinkendem Anteil an verwendetem fluoreszenzmarkiertem Peptid.

Bei den Pektin-Peptid-Komplexen mit dem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) und einem fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid-Verhältnis von 1:100 könnte es sich um einen Ausreißer handeln. Denn bei diesen molaren Verhältnissen enthält nicht jeder Partikel ein Fluorophor. Auch unter der Berücksichtigung dieses möglichen Ausreißers ist für ein Pektin-Peptid-Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) kein Trend erkennbar. Bei einem Pektin-Peptid-Bindungsverhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) scheint die Triplett-Zeit zusammen mit dem sinkendem Anteil an fluoreszenzmarkiertem Peptid abzunehmen.

4.4.4 Photonen-Zähl-Histogramme der Komplexe

Die während der FCS Messungen aufgenommenen Photonen-Zähl-Histogramme lassen eine Aussage über die Helligkeit der Partikel zu. Diese sind in Abbildung 50 bis 55 dargestellt.

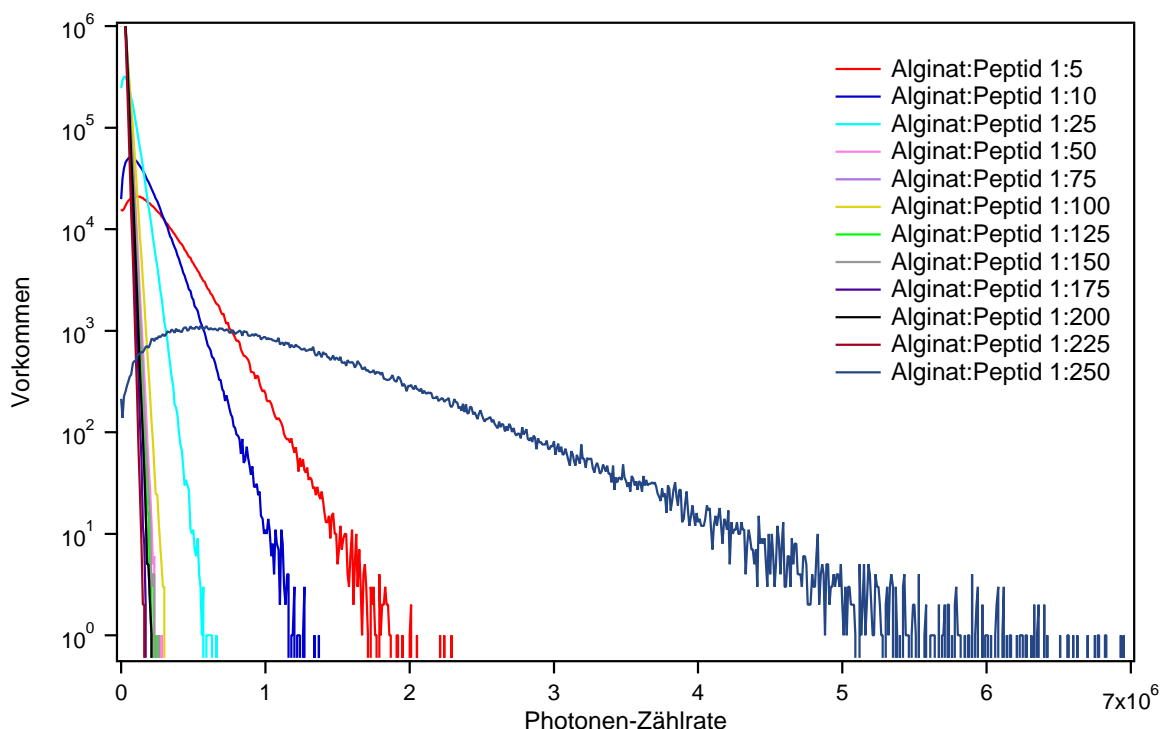


Abbildung 50: Photonen-Zähl-Histogramm der Alginat-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Bindungsverhältnissen und einem molaren Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:10. Das zugehörige Alginat-Peptid-Bindungsverhältnis ist der Legende zu entnehmen. Auffällig ist, dass die Helligkeit der Partikel mit zunehmender Peptid-Konzentration abnimmt, während die Amplitude stetig steigt. Ab einem Alginat-Peptid-Verhältnis von 1:250 kommt es zu einer deutlichen Veränderung und sehr hellen Partikeln, welche im Vergleich zu anderen Bindungsverhältnissen relativ selten durch das Fokusvolumen diffundieren.

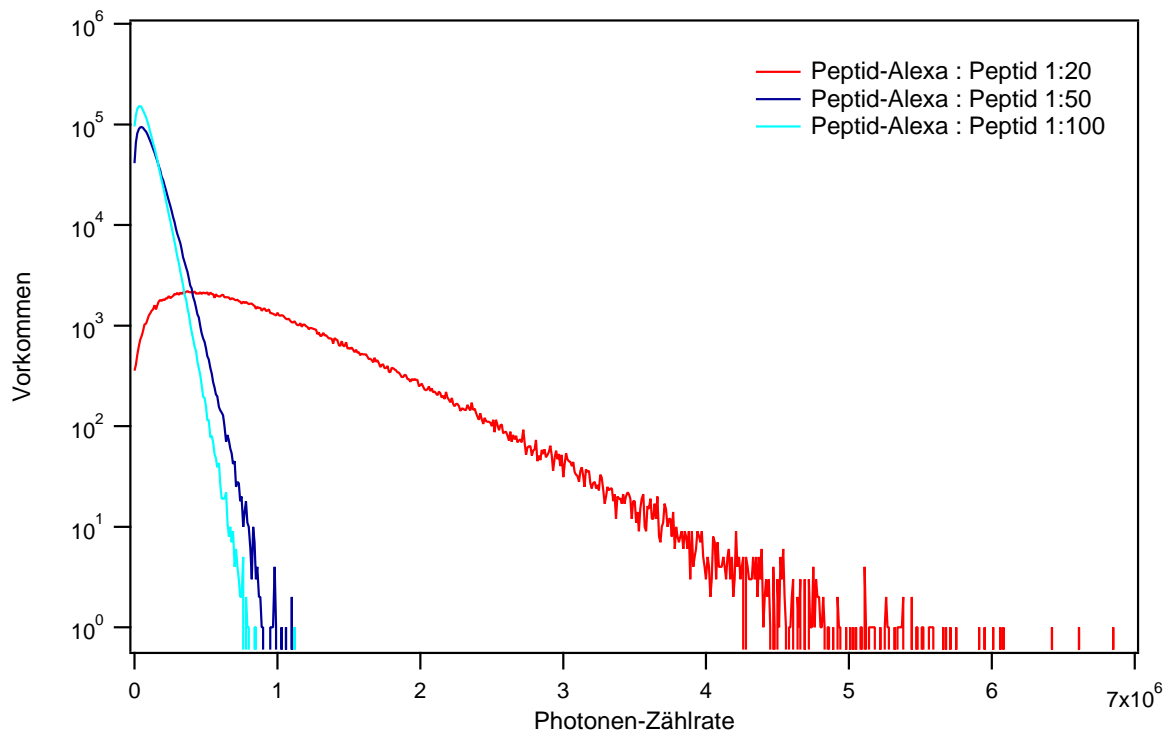


Abbildung 51: Photonen-Zähl-Histogramm der Alginate-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 ([Alginate]:[Peptid]) mit verschiedenen Verhältnissen an fluoreszenzmarkiertem Peptid (Peptid-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Peptid). Die eingesetzten Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnisse sind 1:20, 1:50 und 1:100. Die Helligkeit der Partikel steigt mit der verwendeten Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid an.

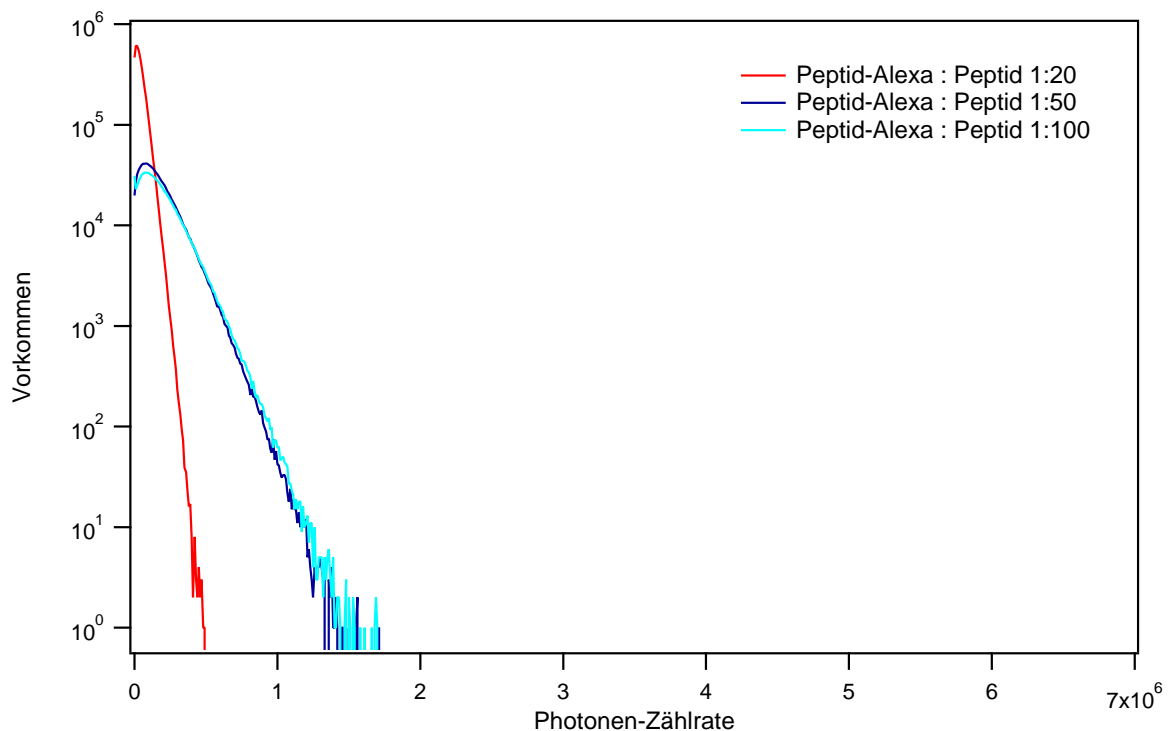


Abbildung 52: Photonen-Zähl-Histogramm der Alginate-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:225 ([Alginate]:[Peptid]) mit verschiedenen Verhältnissen an fluoreszenzmarkiertem Peptid (Peptid-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Peptid). Die eingesetzten Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnisse sind 1:20, 1:50 und 1:100. Die Helligkeit der Partikel scheint sich bei einem fluoreszenzmarkiertem Peptid zu Peptid Verhältnis von 1:100 und 1:50 nicht zu verändern. Wird die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Peptids weiter erhöht nimmt die Helligkeit der Partikel ab.

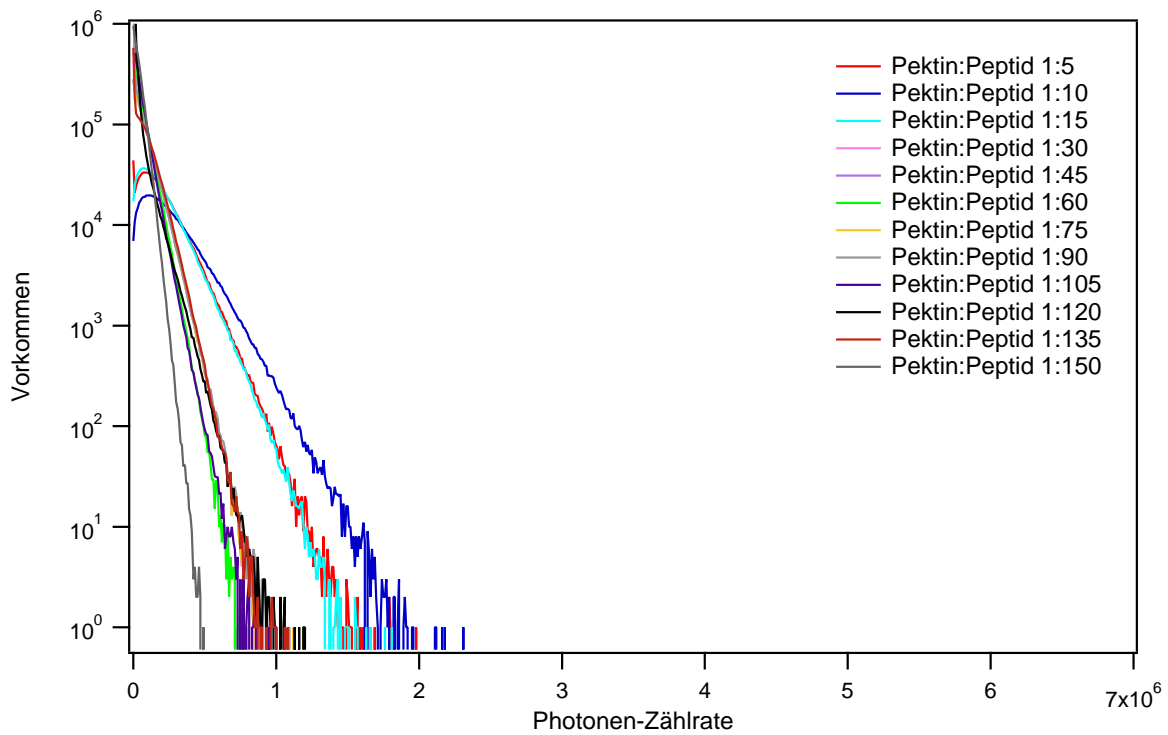


Abbildung 53: Photonen-Zähl-Histogramm der Pektin-Peptid-Komplexe mit verschiedenen molaren Verhältnissen und einem molaren Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:10. Das zugehörige Pektin-Peptid-Bindungsverhältnis ist der Legende zu entnehmen. Auffällig ist der Trend, dass die Helligkeit der Partikel mit zunehmender Peptid-Konzentration abnimmt, während die Amplitude stetig steigt.

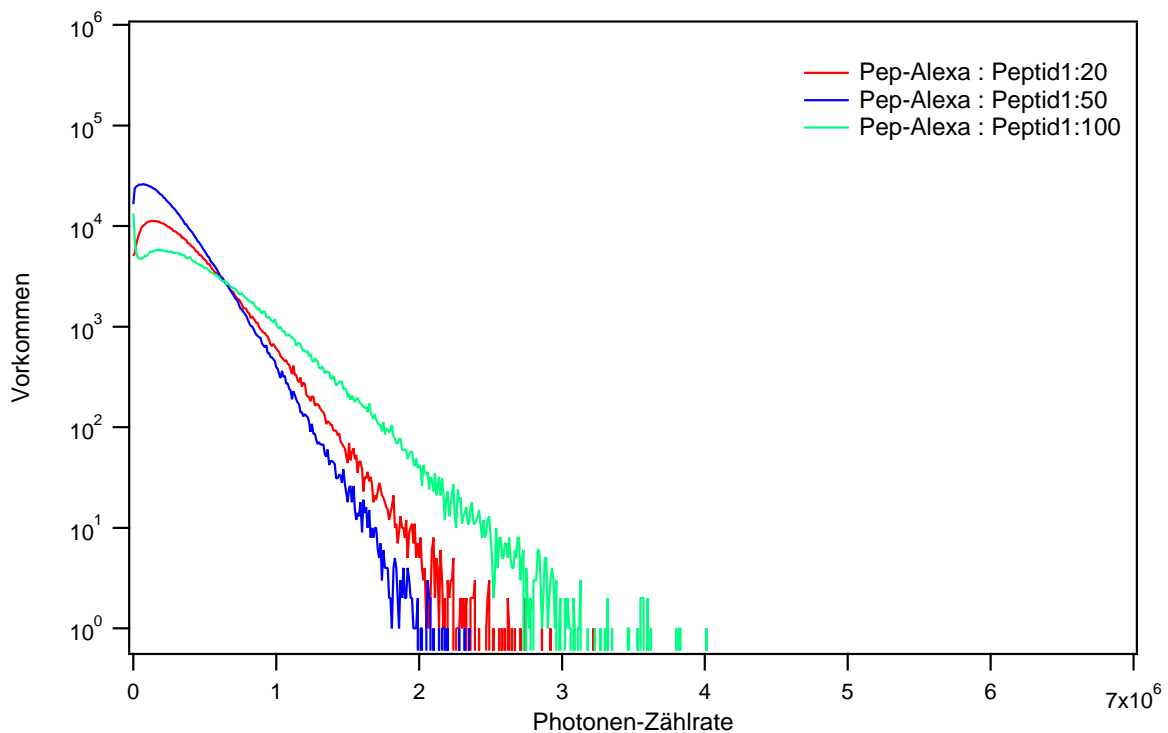


Abbildung 54: Photonen-Zähl-Histogramm der Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) mit verschiedenen Verhältnissen an fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid (Peptid-Alexa) zu Peptid. Die eingesetzten Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnisse sind 1:20, 1:50 und 1:100.

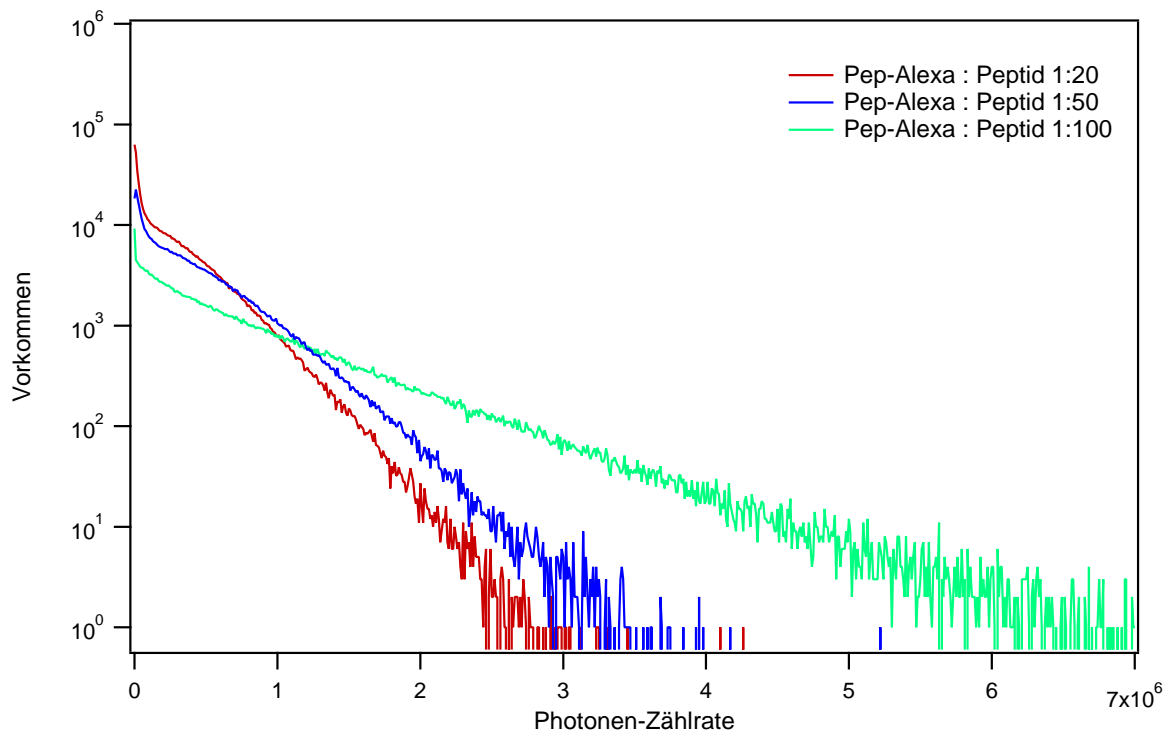


Abbildung 55: Photonen-Zähl-Histogramm der Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) mit verschiedenen Verhältnissen an fluoreszenzmarkiertem Peptid (Peptid-Alexa) zu unmarkiertem Peptid (Peptid). Die eingesetzten Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnisse sind 1:20, 1:50 und 1:100. Die Helligkeit der Partikel steigt, während die Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid sinkt.

Abbildung 50 zeigt, dass bei einem molaren Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid von 1:10 mit steigendem Alginate-Peptid-Verhältnis die Helligkeit der Partikel abnimmt. Dieser Anstieg deutet auf eine Agglomeration hin. Bei einem Bindungsverhältnis von 1:250 ([Alginate]:[Peptid]) steigt die Helligkeit der Partikel schlagartig an. Die Helligkeit der Pektin-Peptid-Partikel in Abbildung 53 nimmt mit steigendem Bindungsverhältnis ab.

Vor der Sättigung der Polysaccharide mit Peptid nimmt die Steigung im PCH zu, wenn die Fluorophorkonzentration pro Partikel abnimmt (Abbildung 51 und 54). Eine Ausnahme sind die Pektin-Peptid-Partikel mit dem molaren Verhältnis 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) und einem [Peptid-Alexa]:[Peptid]-Verhältnis von 1:100. In dieser Probe bilden drei Polysaccharide einen Partikel. Das heißt, dass nicht jeder Partikel ein Fluorophor enthält. Die PCHs der Agglomerate bildenden Polysaccharid-Peptid-Partikel bei molaren Verhältnissen von 1:225 ([Alginate]:[Peptid], Abbildung 52) und 1:90 ([Pektin]:[Peptid], Abbildung 55) verhalten sich genau entgegengesetzt. Je mehr Fluorophor enthalten ist, desto geringer wird die Photonenzählrate.

Verändert sich das molare Verhältnis von Polysaccharid und Peptid, bei gleichbleibendem Peptid:Peptid-Alexa-Verhältnis, nimmt die Photonenzählrate mit steigender Peptid-Konzentration ab. Eine Ausnahme ist das Alginate-Peptid-Verhältnis von 1:250 ([Alginate]:[Peptid]). Diese Probe ist allerdings während der Messung als eine Art locker vernetztes Agglomerat ausgefallen. Möglicherweise diffundierten während der Messung relativ wenig

Alexa-Fluorophore durch das Fokusvolumen.

Die Betrachtung des Photonenvorkommens der Alginat-Peptid-Partikel zeigt mit steigender Peptid-Konzentration einen Anstieg des Photonenvorkommens bis zu einem molaren Verhältnis von 1:50 ([Peptid-Alexa]:[Peptid]). Von diesem Verhältnis bis zu einem molaren Verhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) verändert sich das Aufkommen der Photonen im Fokus kaum. Das Aufkommen der Photonen im Fokus sieht bei den Pektin-Peptid-Komplexen anders aus. Bei dieser Betrachtung des PCHs besitzt das molare Verhältnis von 1:10 ([Pektin]:[Peptid]) die größte Photonenzählrate im Fokus, danach folgen die molaren Verhältnisse 1:5 ([Pektin]:[Peptid]) und 1:15 ([Pektin]:[Peptid]). Das PCH des molaren Verhältnisses 1:150 ([Pektin]:[Peptid]) enthält die geringste Photonenzählrate, aber die größte Steigung. Prinzipiell scheint die Steigung mit der Peptid-Konzentration zuzunehmen.

Auffällig ist in den verschiedenen PCHs, dass die aufgenommenen Kurven mit einem Maximum oder direkt mit einem Abfall der Steigung beginnen. Die Alginat-Peptid-Komplexe zeigen eher ein Maximum Abbildung 51 und Abbildung 52. Während die Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) in Abbildung 54 ein Maximum und die Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) in Abbildung 55 einen steilen Abfall zeigen. Dieser Beginn der Kurve ist auf das Partikelauftreten im Fokus N zurück zu führen. Zu einem steilen Abfall der Kurve kommt es, wenn $N < 1$ ist [182].

4.4.5 Fluoreszenzlebensdauer-Messung

Bei den Fluoreszenzlebensdauer-Messungen handelt es sich um Dreifachbestimmungen. Diese Messungen können Hinweise darauf liefern, ob es zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und Peptid zu Wechselwirkungen kommt, welche sich in Form von *Quenching* äußern. Zusätzlich wird der Einfluss der Polysaccharide auf mögliches *Quenching* untersucht. In den Polysaccharid-Peptid-Komplexen wurden die Bindungsverhältnisse von 1:50 ([Alginat]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]) und 1:30 ([Pektin]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]) analysiert. Zwei Beispielspektren sind in Abbildung 56 und 57 dargestellt.

Tabelle 31: Mittelwerte der Fluoreszenzlebensdauer-Messungen aus drei Messungen. Die Bindungsverhältnisse der Polysaccharid-Peptid-Komplexe sind 1:50 ([Alginat]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]) und 1:30 ([Pektin]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]).

Probe	Fluoreszenzlebensdauer /ns	Anteil /%	Speziell Anzahl
Alexa	$4,2 \pm 0,0$	66 ± 0	3
Peptid-Alexa	$2,1 \pm 0,3$	27 ± 4	5
	$3,9 \pm 0,2$	56 ± 8	
Alginat-Peptid-Alexa	$4,1 \pm 0,1$	80 ± 2	5
Pektin-Peptid-Alexa	$4,3 \pm 0,0$	80 ± 3	3

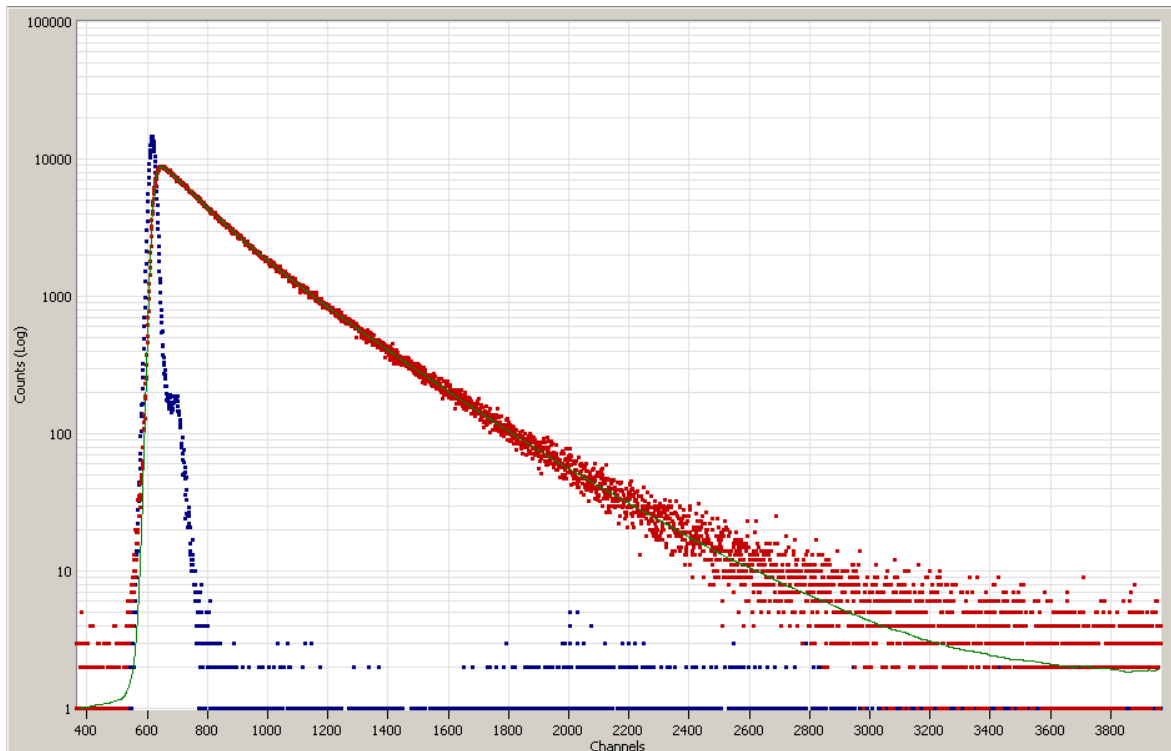


Abbildung 56: Fluoreszenzlebensdauer Alexa-Farbstoff gelöst in Wasser, auf der Ordinate wird die aus mehreren Messungen erhaltene Photonenzahl aufsummiert und logarithmisch dargestellt, während die Abszisse die gerätespezifische Zeiteinheit darstellt. Blaue Punkte: PROMPT-Messungen, rote Punkte: Fluoreszenz-Messungen und grüne Kurve: Anpassungsfunktion.

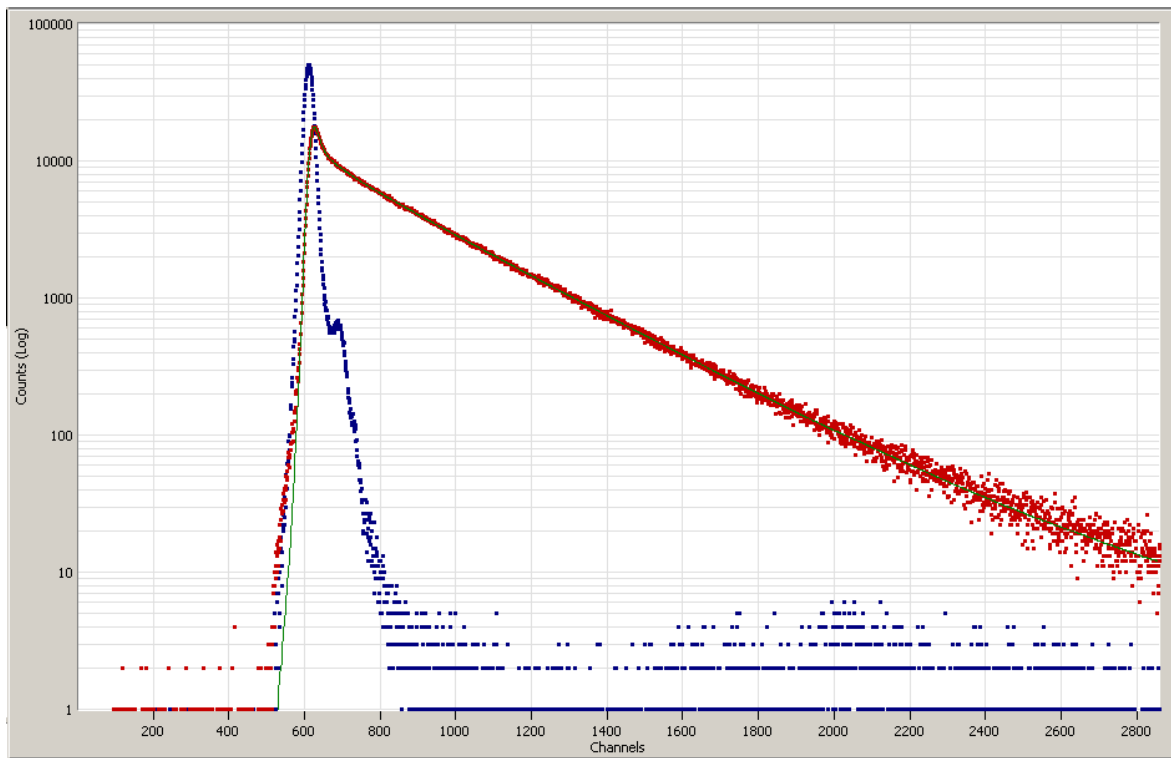


Abbildung 57: Fluoreszenzlebensdauer Alginat:Peptid-Alexa 1:50 gelöst in Wasser, auf der Ordinate wird die aus mehreren Messungen erhaltene Photonenzahl aufsummiert und logarithmisch dargestellt, während die Abszisse die gerätespezifische Zeiteinheit darstellt. Blaue Punkte: PROMPT-Messungen, rote Punkte: Fluoreszenz-Messungen und grüne Kurve: Anpassungsfunktion.

Die Fluoreszenzlebensdauer weicht nur bei der Peptid-Alexa-Probe von der Fluoreszenzlebensdauer des freien Farbstoffs ab. Vermutlich kommt es zwischen einem der Tryptophane des Peptids und dem Farbstoff zu Wechselwirkungen und dadurch zu *Quenching*. Auffällig ist, dass die Hauptkomponente in diesem Fall lediglich 56 % besitzt. Ist das Peptid an einem Polysaccharid gebunden, scheint die zum *Quenching* führende Wechselwirkung zwischen Peptid und Fluoreszenzfarbstoff aufgehoben zu sein.

Vamosi et al. [183] beschreibt eine Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer um 4 %, eine minimale Varianz, welche auf keinen oder nur einen geringen Energietransfer zwischen den fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Untereinheiten gibt. Das heißt für die hier vorliegenden Ergebnisse, dass es einen Energietransfer zwischen Peptid und Fluorophor gibt. Dieser Energietransfer wird jedoch unterbrochen, sobald das Peptid an ein Polysaccharid bindet.

Die Fluoreszenzlebensdauer verringert sich, wenn ein Akzeptor zu einem Donor gelangt. Das Peptid wäre in diesem Fall der Akzeptor und Alexa der Donor.

4.4.6 Anisotropie-Messung

Bei den Anisotropie-Messungen handelt es sich um Dreifachbestimmungen. Diese können einen weiteren Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen dem Fluoreszenzmarker und Peptid bzw. an ein Polysaccharid gebundenes Peptid geben. Zwei ausgewählte Spektren sind in Abbildung 58 und 59 dargestellt.

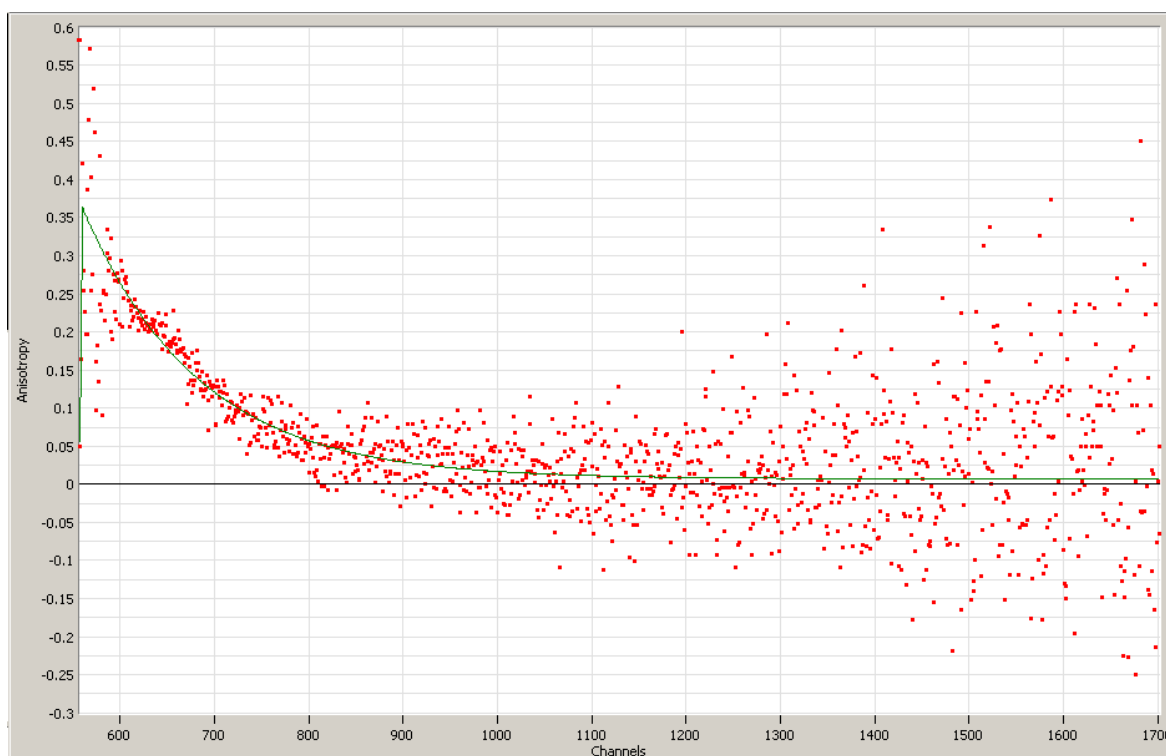


Abbildung 58: Anisotropie-Messung Peptid-Alexa gelöst in Wasser, auf der Ordinate wird die Anisotropie aufgetragen, während auf der Abszisse die gerätespezifische Zeiteinheit aufgetragen wird. Die rote Punkte stellen die Messwerte dar, während die grüne Kurve die Anpassungsfunktion darstellt.

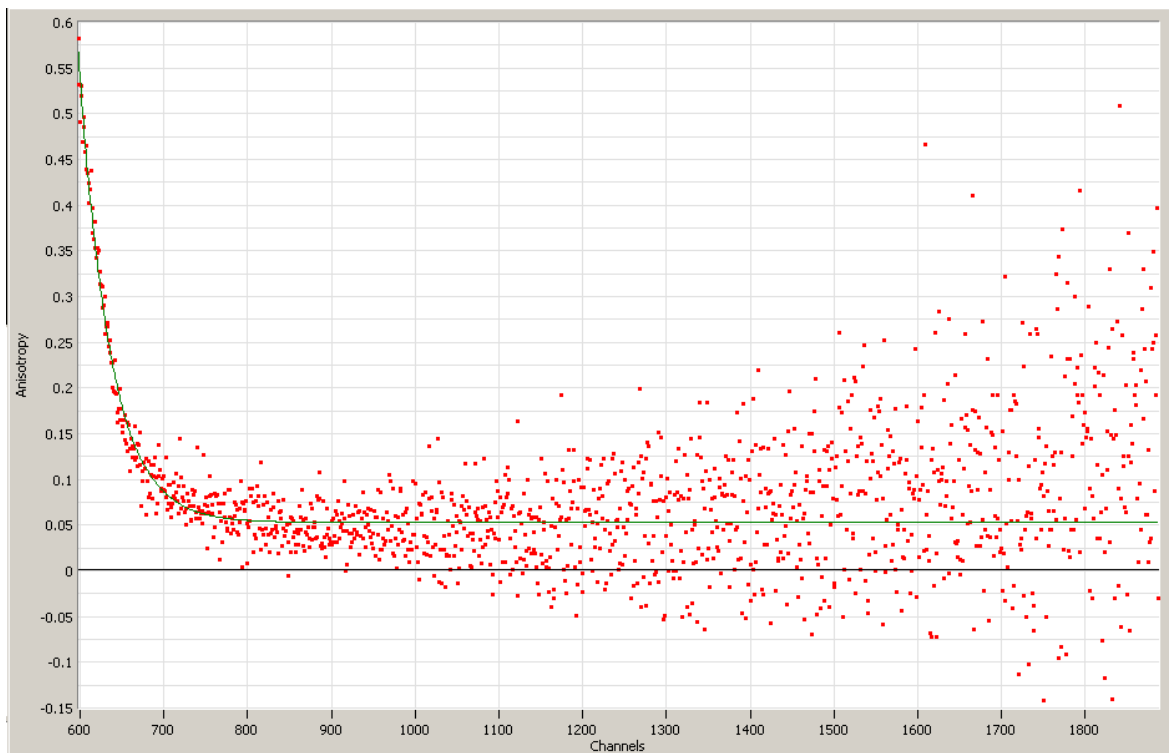


Abbildung 59: Anisotropie-Messung [Pektin]:[Peptid-Alexa] 1:30 gelöst in Wasser, auf der Ordinate wird die Anisotropie aufgetragen, während auf der Abszisse die gerätespezifische Zeiteinheit aufgetragen wird. Die rote Punkte stellen die Messwerte dar, während die grüne Kurve die Anpassungsfunktion darstellt.

Tabelle 32: Mittelwerte der gemessenen Anisotropie aus drei Messungen. Die Bindungsverhältnisse der Polysaccharid-Peptid-Komplexe sind 1:50 ([Alginat]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]) und 1:30 ([Pektin]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]).

Probe	Anisotropie-Zerfallszeit /ns	Probe	Anisotropie-Zerfallszeit /ns
Alexa	$0,52 \pm 0,00$	Alginat-Peptid-Alexa	$0,66 \pm 0,01$
Peptid-Alexa	$1,77 \pm 0,04$	Pektin-Peptid-Alexa	$0,52 \pm 0,00$

Zu erwarten wäre ein Anstieg der Anisotropie zusammen mit der Molekülgröße [132]. Ein solcher Anstieg ist mit der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an das Peptid messbar. Die gemessenen Anisotropieänderung zwischen Peptid mit Fluoreszenzmarker und Fluoreszenzmolekül beläuft sich dabei auf 1,21 ns.

Entsteht ein Komplex zwischen einem Polysaccharid und dem fluoreszenzmarkiertem Peptid, nimmt die Anisotropie ab. Die Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide und dem Peptid werden vollständig aufgehoben, sobald das Peptid an Pektin bindet. Das heißt, das Fluorophor ist in den Pektin-Peptid-Komplexen frei drehbar. Es scheint, als wenn die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluorophor durch die Bindung des Peptids an Alginat abgeschwächt und durch die Bindung des Peptids an Pektin sogar aufgehoben werden könnten.

4.4.7 Diskussion der Polysaccharid-Peptid-Wechselwirkungen

Die Fluoreszenz-Messung zeigt durch die Blauverschiebung im Emissionsspektrum, dass die Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäuren des Peptids und Fluoreszenzfarbstoffen schwächer werden, wenn es an Alginate oder Pektin bindet. Das bedeutet, dass weniger aromatische Aminosäuren als zuvor mit dem Farbstoff wechselwirken, was auch durch die in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung nachgewiesene Abnahme des *Quenchings* belegt wird. Eine Wechselwirkung zwischen nicht kovalent und kovalent gebundenem Fluoreszenzfarbstoff wäre ebenfalls möglich. Die Abschwächung solcher Wechselwirkungen kann durch eine Veränderung der Sekundärstruktur des Peptids, die Bindung an ein Polysaccharid oder Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Aminosäuren und dem jeweiligen Polysaccharid zustande kommen.

Eine Blauverschiebung in der Tryptophan-Fluoreszenz-Emission wurde bereits durch die Entstehung hydrophober Wechselwirkungen beschrieben [184]. Eine Blauverschiebung im Fluoreszenzspektrum kann mit einer Veränderung der Peptid-Sekundärstruktur einhergehen [185].

Von freiem Fluoreszenzfarbstoff zu dem an Peptid gebundenen bzw. dem Polysaccharid-Peptid-Komplex, gibt es eine Rotverschiebung. Diese Rotverschiebung geht mit dem Auftreten von Wechselwirkungen zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Peptid oder fluoreszenzmarkiertem Peptid und dem jeweiligen Polysaccharid einher. Vamosi et al. [183] beschreibt eine Rotverschiebung in den Emissionsspektren durch Oligomerisation. Diese Rotverschiebung zwischen dem fluoreszierenden Protein-Monomeren und -Tetrameren beträgt im Emissionsspektrum 2 nm. Zhou et al. [186] beschreibt ebenfalls eine Rotverschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren durch Polymerisierung. Für Einzelkomponenten Dual-emissiver Materialien beläuft sich die Rotverschiebung im Absorptionsspektrum auf 32 nm und im Emissionsspektrum auf 22 nm, wenn ein Monomer zu einem Polymer aus 20 Monomeren wird [186].

Die Rotverschiebung ist im Emissionsspektrum für den lediglich an Peptid gebundenen Fluoreszenzfarbstoff am größten und im Absorptionsspektrum für Peptid-Alexa sowie den Pektin-Peptid-Alexa-Komplex annähernd identisch. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die Rotverschiebung durch Wechselwirkungen im Polysaccharid-Peptid-Komplex bzw. durch Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluoreszenzmarker beeinflusst wird. Um den Einfluss der Oligomerisation zu betrachten sollen ausschließlich der freie Fluoreszenzfarbstoff und die Polysaccharid-Peptid-Komplexe genauer beleuchtet werden. Bei einer solchen Betrachtung ergäbe sich ein Anstieg der Rotverschiebung in folgender Reihenfolge: Alexa → Alginate-Peptid-Alexa-Komplex → Pektin-Peptid-Alexa-Komplex.

Der Fluoreszenzfarbstoff weist keine Anzeichen einer Oligomerisation auf. Für Alginate-Peptid-Komplexe mit einem molaren Verhältnis von 1:100 ([Alginate]:[Peptid]) weisen die FCS-Messungen auf eine Oligomerisation der Alginate-Peptid-Komplexe bestehend aus zwei Alginaten hin. Die Pektin-Peptid-Komplexe mit einem molaren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) weisen in diesen Messungen auf eine Oligomerisierung bestehend aus drei

Pektinen hin. Damit geht die Rotverschiebung mit einem Anstieg der Oligomerisation einher, wie in der Literatur beschrieben [183] [186].

Peptid-Alexa kann als Ausreißer betrachtet werden, da es zu Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Aminosäuren des Peptids und dem Fluoreszenzfarbstoff oder den Fluoreszenzfarbstoffmolekülen untereinander kommt, welche durch die Wechselwirkung des Peptids mit einem Polysaccharid anscheinend abnehmen.

Sowohl Gelfiltration, als auch Dialyse sind nicht in der Lage, den freien Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide von gelabeltem Peptid zu trennen. Dieses Problem mit Alexa-Fluor 488 und Peptiden ist ebenfalls in der Literatur beschrieben [176]. Das anionische Alexa 488 kann in nicht kovalenter Form an kationische Peptide oder Proteine binden. Durch die Bindung von Lysozymen an Liposomen [176] oder Peptid 19-2.5 an kationische Polysaccharide wird das nicht kovalent gebundene Alexa verdrängt und liegt als freier Farbstoff im Experiment vor. Dieser freie Farbstoff tritt in der vorliegenden Arbeit insbesondere bei den Anisotropie- und Fluoreszenzlebensdauer-Messungen auf. In diesen Messungen ist die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Peptids höher als in den FCS-Messungen, in denen maximal 10 % des eingesetzten Peptids eine Fluoreszenzmarkierung tragen.

Die Fluoreszenzlebensdauer verändert sich mit der Oligomerisation. Während eine Zunahme der Fluoreszenzlebensdauer zusammen mit der Oligomerisation publiziert ist [186], wurde ebenso eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer mit einem Anstieg der Oligomerisation publiziert [183]. Eine Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer ist zwischen dem freien Farbstoff und dem am Peptid gebundenen Fluoreszenzfarbstoff zu beobachten. Bindet das fluoreszenzmarkierte Peptid an eines der Polysaccharide, kehrt die Fluoreszenzlebensdauer etwa zu dem Wert der Fluoreszenzlebensdauer des freien Farbstoffs zurück. Das weist auf ein Verschwinden der Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluoreszenzfarbstoff hin, denn das *Quenching* wird durch Bindung des Peptids an das jeweilige Polysaccharide aufgehoben.

Die Anisotropie des freien Farbstoffs nimmt durch die Bindung an das Peptid deutlich zu, das belegt, dass der Fluoreszenzfarbstoff durch Bindung an das Peptid in seiner Rotation vollkommen frustriert ist. Bindet das fluoreszenzmarkierte Peptid an ein Polysaccharid, gewinnt der Fluoreszenzfarbstoff seine freie Drehbarkeit zurück. Diese Ergebnisse zeigen starke Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluoreszenzfarbstoff, welche durch die Bindung des fluoreszenzmarkierten Peptids an Pektin vollständig und durch die Bindung des fluoreszenzmarkierten Peptids an Alginate nahezu vollständig aufgehoben werden.

Damit ergeben sich aus den Fluoreszenz-, Fluoreszenzlebensdauer - und Anisotropie-Messungen eine Abnahme der Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluoreszenzfarbstoff durch die Wechselwirkung des Peptids mit einem Polysaccharid.

Das Photonen Counting Histogramm zeigt für die nicht vollständig besetzten Peptid-Polysaccharid-Komplexe den Trend, je weniger Fluorophor im Komplex enthalten ist, desto steiler verläuft die Kurve. Wobei die Messung der Pektin-Peptid-Komplexe mit einem mo-

laren Verhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) und einem Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnis von 1:100 Ausnahmen darstellen, da nicht alle Partikel ein Fluorophor enthalten und damit auch nicht detektierbar sind. Die Ergebnisse der ungesättigten Partikel sind vergleichbar mit dem Ergebnis von Chen et al. [138]. Diese Arbeitsgruppe hat Versuche mit Fluorescein durchgeführt. Je geringer die Fluorescein-Konzentration, desto steiler der Kurvenanstieg und desto kleiner die Photonenzählrate.

Bleibt das Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid gleich, wird jedoch das Polysaccharid-Peptid-Verhältnis verändert, resultieren für die geringste Peptidkonzentration die größeren Photonenzählraten. Ähnlich stellen sich die Ergebnisse der Alginat-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) und die Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) mit variierenden Verhältnissen von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Peptid dar. Der in diesen Versuchen beobachtete Trend verhält sich genau entgegengesetzt zu der Literatur [138]. Je geringer die Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Peptid, desto größer die Photonenzählrate. Aufgrund der Fluoreszenzlebensdauer-Messungen sah es so aus als wäre *Quenching* eher unwahrscheinlich, da die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors mit der Bindung des fluoreszenzmarkierten Peptids an das Polysaccharid wieder zunimmt. Die Fluoreszenzlebensdauer-Messungen wurden mit molaren Verhältnissen von 1:50 ([Alginat]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]) und 1:30 ([Pektin]:[fluoreszenzmarkiertem Peptid]) durchgeführt. Die Ergebnisse der PCHs deuten allerdings in eine andere Richtung. Es könnte zwei Möglichkeiten geben, welche die Helligkeit der Partikel trotz steigendem Anteil an fluoreszenzmarkiertem Peptid negativ beeinflussen. Eine Möglichkeit ist, dass es zu der Ausbildung von Grundzustandskomplexen kommt, welche in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung nicht sichtbar wären. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es doch zu *Quenching* kommt, welches so stark ist, dass von den meisten Farbstoffen kaum noch Signale erhalten werden und in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung lediglich ein geringer Teil *ungequenchter* Fluorophore sichtbar ist.

Für die ITC-Messung liegen Peptid, Alginat und Pektin in Tris-Puffer pH = 7,4 gelöst vor. Bei diesem pH-Wert ist das Peptid positiv geladen, während die Polysaccharide negativ geladen sind. Daher kommt es wahrscheinlich zu ionischen Wechselwirkungen zwischen Peptid und Polysaccharid. Zusätzlich könnte es zu polaren Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten kommen.

Wie bereits in Kapitel 4.2.5 „Diskussion der ermittelten Bindungsstöchiometrien“ beschrieben, entspricht das molare Verhältnis zwischen Alginat und Peptid dem theoretischen molaren Verhältnis, welches über die Ladungen berechnet wurde. Für die Pektin-Peptid-Partikel liegt das mittels ITC und Überstandsmessung ermittelte molare Verhältnis um den Faktor zwei über diesem theoretischen Wert. Das mittels FCS ermittelte molare Verhältnis stimmt annähernd mit dem Theoriewert überein.

Die ermittelte Bindungskonstante für Alginat-Peptid-Komplexe liegt um den Faktor 44 höher als die Bindungskonstante für Pektin-Peptid-Komplexe. Zusammen mit dem Theoriewert des molaren Verhältnisses weist dieses Ergebnis auf ionische Wechselwirkungen zwischen Alginat und Peptid hin. Jedoch ist nicht erwiesen, ob ein Peptid acht negative Ladungen neutralisieren kann. Somit könnten neben ionischen Wechselwirkungen auch polare und Van-der-Waals-Wechselwirkungen auftreten. Ebenso ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen denkbar. Im Pektin-Peptid-Komplex muss es schon aufgrund des ermittelten molaren Verhältnisses neben ionischen Wechselwirkungen zu weiteren Wechselwirkungen kommen. Dafür spricht ebenfalls die deutlich niedrigere Bindungskonstante. Im FCS-Experiment könnte der Fluoreszenzfarbstoff des Peptids an Stelle von weiteren Peptiden mit dem Pektin über Van-der-Waals-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken.

Kaconis et al. [1] haben am gleichen ITC Gerät für die Bindung zwischen Peptid 19-2.5 und LPS eine Bindungskonstante von $K = (2,8 \pm 3,0) \cdot 10^8$ 1/M ermittelt. Das heißt die Wechselwirkungen zwischen Peptid und LPS sind stärker als zwischen dem Peptid und Alginat oder Pektin. Die Bindungskonstanten lassen sich in die folgende Reihenfolge bringen: $k_{LPS-Peptid} = 2,8 \cdot 10^8$ 1/mol $> k_{Alginat-Peptid} = 3,4 \cdot 10^6$ 1/mol $> k_{Pektin-Peptid} = 7,8 \cdot 10^4$ 1/mol .

Eine kovalente Bindung besitzt die größte Bindungsenergie, gefolgt von der Bindungsenergie einer ionischen Bindung. Die Bindungsenergie der Wasserstoffbrückenbindung liegt etwa um den Faktor 10 unter der Größenordnung einer kovalenten Bindung, während die Van-der-Waals-Kräfte die geringste Bindungsenergie besitzen [134].

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Bindungsenergien weisen auf ionische Wechselwirkungen, sowie hydrophobe Effekte zwischen Alginat und Peptid hin. In der Literatur sind Bindungen zwischen Alginaten und Peptiden beschrieben. Calcium-Alginat und ein Peptid, bestehend aus vier Aminosäuren, von denen drei kationischen Charakter besitzen, wechselwirken miteinander. Diese Wechselwirkungen nehmen durch die Anwesenheit von Natriumchlorid oder Imidazol ab. Diese beiden Ionen sind in der Lage, das Peptid aus dem Alginat zu verdrängen [83]. Das Aufheben einer Bindung durch eine erhöhte Ionenstärke weist auf ionische- oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen hin. Zwischen Alginat und kationischen Peptiden kommt es zu hydrophoben Effekten und ionischen Wechselwirkungen, wobei die ionischen Wechselwirkungen dominieren [105]. Damit weisen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ITC-Messungen auf ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Effekte hin.

Bei den Pektin-Peptid-Komplexen handelt es sich um schwächere Wechselwirkungen als zwischen Peptid und Alginat.

Sollte es sich um eine Kombination aus ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten handeln, dürfte sich das Peptid in den folgenden Freisetzungsexperimenten nicht alleine durch die Veränderung des pH-Wertes aus den Polysacchariden verdrängen lassen.

Neben der kovalenten Bindung des Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide kommt es zusätzlich zu weiteren Wechselwirkungen zwischen Fluoreszenzmarker und

Peptid. Denkbar wären ionische Wechselwirkungen zwischen dem anionischen Fluoreszenzmarker und dem kationischen Peptid. Ebenfalls könnte es zu hydrophoben Effekten zwischen den Aromaten des Fluoreszenzmarkers und den aromatischen Aminosäuren des Peptids kommen. Diese Wechselwirkungen sind im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert worden.

In der Literatur wird der kationische Charakter des Peptids als Eigenschaft für die Bindung des Peptids an LPS genannt [1] [12]. Die Bindung des Peptids an LPS verläuft in zwei Schritten. Zuerst kommt es zu Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den kationischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) von Peptid 19-2.5 und den negativ geladenen Gruppen des LPS (Phosphate und Carboxylate). Anschließend folgt die Faltung des hydrophoben C-Terminus des Peptids in den Lipid A-Teil des LPS [187].

Aufgrund des theoretischen molaren Verhältnisses und dem geringen Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs im FCS-Experiment kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Alginate-Peptid-Komplexierung um ionische Wechselwirkungen handelt, welche durch hydrophobe Effekte unterstützt werden. Solche hydrophoben Effekte könnten zwischen den Ringsystemen der einzelnen Monosaccharid-Einheiten der verwendeten Polysaccharide und den aromatischen Aminosäuren des Peptids entstehen.

Das theoretische molare Verhältnis sowie das mittels FCS ermittelte molare Verhältnis der Pektin-Peptid-Komplexe lassen vermuten, dass es sich bei etwa 50 % der gebundenen Peptide in der ITC um ionische Wechselwirkungen handelt. Die schwächeren Wechselwirkungen lassen sich durch den Fluoreszenzfarbstoff im FCS-Experiment aufheben.

Die Peptid-LPS-Bindung besitzt die größte der gemessenen Bindungskonstanten. Dadurch sollte das Peptid trotz Komplexbildung noch gegen LPS wirksam sein. Die Wirksamkeit der Peptid-Polysaccharide gegen LPS wird in Kapitel 4.6 untersucht.

4.5 Die Freisetzungs-Experimente

Die Wechselwirkungen zwischen Peptid 19-2.5 und dem jeweiligen Polysaccharid wurden bereits charakterisiert. Im Folgenden werden verschiedene Umgebungseinflüsse auf die Komplexe simuliert:

- Sind die Polysaccharide in der Lage Peptid 19-2.5 vor bestimmten pH-Werten zu schützen?
- Können die Polysaccharide Peptid 19-2.5 bei neutralem pH-Werten freisetzen?
- Erfolgt eine Freisetzung des Peptids aus dem Polysaccharid-Peptid-Komplex in Gegenwart eines nichtionischen Tensids?
- Erfolgt eine Freisetzung des Peptids aus dem Polysaccharid-Peptid-Komplex im simulierten Magen-Darm-Trakt?

4.5.1 Freisetzung des Peptids aus den Komplexen bei verschiedenen pH-Werten

Durch den pH-Wert alleine ist bei 0,1 M Salzsäure, den unter Punkt 3.2.4 beschriebenen Puffern in ihrer 1:10 Verdünnung als 50 mM Puffer und 1,0 M Natronlauge keine Freisetzung des Peptids aus den Komplexen zu erkennen.

Die Betrachtung über einen längeren Zeitraum ist irrelevant, da aufgenommene Nahrung maximal 5 h im menschlichen Magen verweilt [156].

Die Magensäure hat bei den meisten Menschen einen pH-Wert von 1,5 [188]. Im Darm kann der pH-Wert in den basischen Bereich übergehen.

Um eine Konzentrationsabhängigkeit der nicht vorhandenen Peptid-Freisetzung ausschließen zu können, wurde die Freisetzung zusätzlich zwischen pH = 2,0 und 13,0 mit weiteren Puffern untersucht. Der pH = 2,0 Puffer besteht dabei aus 31 mM Citronensäure und 61 mM Natriumchlorid, pH = 3,0 Puffer aus 40 mM Citronensäure und 60 mM Natriumchlorid, pH = 4,0 Puffer aus 56 mM Citronensäure und 47 mM Natriumchlorid, pH = 5,0 Puffer aus 96 mM Citronensäure, pH = 6,0 Puffer aus 60 mM Citronensäure, pH = 7,0 Puffer aus 26 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 41 mM Natriumhydrogenphosphat, pH = 8,0 und 9,0 aus Borat-Puffer, pH = 10,0 1 M Ammoniumchlorid, pH = 11,0 105 mM Glycin und 105 mM Natriumchlorid, pH = 12,0 84 mM Glycin und 123 mM Natriumchlorid, pH = 11,0 11 mM Glycin und 12 mM Natriumchlorid. Unter Verwendung dieser Puffer zeigten die Polysaccharid-Peptid-Komplexe ebenfalls keine Peptid-Freisetzung.

4.5.2 Freisetzung des Peptids aus den Komplexen unter Verwendung eines nichtionischen Tensids

Die Verwendung von Triton-X-100 führt zu keiner Peptid-Freisetzung aus den Polysaccharid-Peptid-Komplexen.

4.5.3 Enzymatische Freisetzung des Peptids aus den Komplexen

Peptid 19-2.5 soll durch die Verkapselung mit Polysacchariden nach oraler Applikation auf seinem Weg durch den Magen-Darm-Trakt vor Enzymen und variierenden pH-Werten geschützt werden. Eine Freisetzung des Peptids im Darm wird dabei angestrebt. Die Versuche im simulierten Magen-Darm-Trakt sollen den Einfluss von verschiedenen Enzymen zeigen.

Tabelle 33: Enzymatisch freigesetztes Peptid aus den Polysaccharid-Peptid-Komplexen.

	Alginat-Peptid sonifiziert	Alginat-Peptid emulgiert	Pektin-Peptid sonifiziert	Pektin-Peptid emulgiert
Magen	9 % ± 1 %	2 % ± 1 %	65 % ± 29 %	6 % ± 2 %
Bauchspei- cheldrüse	100 % ± 0 %	100 % ± 0 %	100 % ± 0 %	100 % ± 0 %
Darm	100 % ± 0 %	100 % ± 0 %	100 % ± 0 %	100 % ± 0 %

Die Polysaccharide können das Peptid im simulierten Magen schützen, aber nicht vor dem simulierten Sekret der Bauchspeicheldrüse oder dem simulierten Darm. Verantwortlich dafür ist vermutlich die Kombination aus der α -Amylase Fungamyl 800 L, welche diverse Nebenaktivitäten enthält, und der Protease Chymotrypsin in der Bauchspeicheldrüse. Eine Protease alleine ergäbe ein anderes Spaltmuster des Peptids. Die aus der Spaltung resultierenden Peptid-Fragmente sind mit steigender Zeit immer schwieriger mit dem Fluoreszenzdetektor zu detektieren. Da für die einzelnen Fragmente keine Kalibration durchgeführt wurde, ist das Fragmentierungsmuster ausschließlich mit dem Fragmentierungsmuster des reinen Peptids zu vergleichen.

4.5.4 Diskussion der Freisetzungs-Experimente

Die Polysaccharide schützen das Peptid vor den verschiedensten pH-Werten, Salzen, sogar einem nichtionischen Tensid, jedoch nicht vor einer Protease, wenn zusätzlich eine α -Amylase anwesend ist. Eigentlich sollte die α -Amylase Fungamyl 800 L Pektin und Alginat nicht spalten. Da es sich jedoch um keine reine α -Amylase, sondern um eine Mischung handelt, kommt es zu Nebenaktivitäten.

Die durch Sonifizieren oder Emulgieren hergestellten Alginat-Peptid-Komplexe und die durch O/W-Emulsionen hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe sind in der Lage, das Peptid im simulierten Magen zu schützen. Die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe sind im simulierten Magen in der Lage, maximal 35 % des Peptids zu schützen.

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Wirkstoffträgern wurde bereits in anderen Wirkstoffträger-Konstellationen untersucht. Freigesetzte Peptide lassen sich mittels Zentrifugation, Trennung über eine C₁₈-Säule oder einer Kombination aus beiden Methoden von Trägermaterial und Komplexen trennen und können anschließend analysiert werden [58] [189]. Dabei

ist die Geschwindigkeit der Wirkstofffreisetzung von Träger, Wirkstoff und untersuchten Freisetzungsbedingungen abhängig [58] [83] [189].

Das Antibiotikum Azithromycin kann aus Liposomen freigesetzt werden. Dieses geschieht in Phosphat-Puffer (PBS) pH = 7,8. Aus den reinen Liposomen können innerhalb von 24 h 70 % des Antibiotikums freigesetzt werden. Dieser Wert erhöht sich innerhalb von 72 h nicht. Mit Cholesterol modifizierte Liposomen zeigen hingegen eine langsamere Freisetzung. Bei einem Liposomen-Cholesterol-Verhältnis von 4:1 werden nach 24 h 20 % und nach 72 h 50 % Antibiotikum freigesetzt. Wird das Verhältnis auf 2:1 verändert, werden nach 24 h lediglich 5 % und nach 72 h 72 % Antibiotikum freigesetzt [58].

Die Freisetzungsgeschwindigkeit von einem aus vier Aminosäuren bestehenden kationischen Peptid aus Calcium-Alginat-Mikrokugeln, welche mit HSA beschichtet sind, verläuft zwischen fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem Peptid mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten [83].

¹²⁵I-IgG kann in Partikel, bestehend aus einem Alginat-Kern und einer Chitosan Ummantelung, verkapselt werden. Die Freisetzung aus diesen Partikeln wird im simulierten Magen, (Pepsin enthalten und pH = 1,2) und in simulierter Darmflüssigkeit (pH = 7,8) untersucht. Die Partikel wurden zwei Stunden in der simulierten Magenflüssigkeit inkubiert und anschließend vier Stunden in der simulierten Darmflüssigkeit. Nach einer Stunde in der simulierten Darmflüssigkeit kommt es zu einer Freisetzung von 75 % bis 80 % [190].

Malaria-Synthetische-Peptide können innerhalb von 140 Tagen komplett aus einer PLGA-Beschichtung freigesetzt werden, dabei verläuft die Freisetzung linear. Wird das PLGA mit Alginat modifiziert, kann die lineare Freisetzung verlangsamt werden. Für SPf66 beträgt die Freisetzung nach 140 Tagen 50 % und für S3 70 % [3].

Die Medikamente Metronidazol Hydrochlorid, Diclofenac-Natrium und Indomethacin können *in vitro* in simulierter Magenflüssigkeit innerhalb von 16 Stunden freigesetzt werden. Die Freisetzung aus Alginat-Gelatine und Pektin-Gelatine beginnt in allen Fällen nach zwei Stunden [84].

Pektin wird von Wong et al. zur Freisetzung von Wirkstoffen im Darm empfohlen. Denn bei pH-Werten zwischen pH = 2 - 4 beginnt die Hydrolyse der Seitenketten. Erst bei pH = 5 - 6, dem pH-Wert des Dünndarms, beginnt die β -Eliminierung oder Veresterung der Hauptkette. Problematisch ist jedoch, dass Pektin wasserlöslich ist. Eine aus Pektin hergestellte Matrix ist daher anfällig für Anschwellen und Durchlöchern in wässrigen Medien. Somit kann es zu Arzneimittelfreisetzungen im oberen Magen-Darm-Trakt kommen [90]. Die Untersuchung von der Wirkstofffreisetzung aus Pektin und Chitosan-Pektin-Komplexen im simulierten Magen-Darm-Trakt ergab, dass die Freisetzung von Wirkstoffen aus Pektin durch den Zusatz von Chitosan verlangsamt wird [93]. Das könnte mit dem Schwellverhalten zusammenhängen. Besagtes Schwellverhalten von Chitosan-Pektin-Partikeln ist vom pH-Wert und der Zusammensetzung des jeweiligen Komplexes abhängig [93]. Tacrin kann mit einer Mischung aus Chitosan und Pektin verkapselt werden. Saladini et al. haben die Freisetzung

von Tacrin aus solchen Komplexen in Phosphatpuffer bei $\text{pH} = 5,5$ untersucht. Diese Experimente zeigen eine Abhängigkeit der Freisetzung von der molaren Zusammensetzung der Komplexe, aber noch viel deutlicher von der Herstellungsmethode der Komplexe [168]. Der Einfluss der Herstellungsmethode konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bei der Freisetzung des Peptids aus den Pektin-Peptid-Komplexen festgestellt werden.

Doch nicht ausschließlich in der Pharmaindustrie ist eine kontrollierte Freisetzung von Interesse. Auch in der Lebensmittelindustrie ist eine solche relevant. Untersucht wird vor diesem Hintergrund beispielsweise die Freisetzung von Vitamin B_2 aus Alginat-Chitosan-Nanopartikeln bei verschiedenen pH -Werten ($\text{pH} = 2$ und $\text{pH} = 7$) und verschiedenen Temperaturen (25°C und 37°C) [191].

Entgegen den Erfahrungen von Wong et al. [90] wird bei den pH -Werten fünf und sechs kein Abbau des Pektins beobachtet. Trotzdem sind sowohl Alginat als auch Pektin wasserlöslich. Werden diese Polysaccharide zur Verkapselung des antimikrobiellen Peptids verwendet, sind die entstehenden Partikel nicht länger wasserlöslich. Gegen das in der Literatur beschriebene Schwellverhalten der Pektin-Partikel [179] [180] zeigt sich in der sFCS eher die Bildung von Agglomeraten.

Für die Freisetzung wird häufig der pH -Wert als charakteristische Umgebungseigenschaft genannt [83] [93]. Das konnte in den Freisetzungsversuchen der Polysaccharid-Peptid-Partikel nicht bestätigt werden. Auf Versuche mit hohen Salzkonzentrationen wurde verzichtet, da es um Versuche mit annähernd physiologischer Ähnlichkeit ging.

Das Enzym Pektinase begünstigt den Abbau von Pektin-Laktose-Partikeln [192]. Die Freisetzung des Peptids 19-2.5 aus den Alginat- oder Pektin-Peptid-Partikeln gelang in Gegenwart einer α -Amylase-Mischung mit Nebenaktivitäten. Damit spielen Enzyme eine wichtige Rolle bei der Wirkstofffreisetzung.

Der in dieser Arbeit nachgewiesenen Schutz des Peptids durch Alginat und die durch Rühren hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe vor simulierter Magenflüssigkeit ist auch von Ghaffarian et al. für IgG in Alginat-Chitosan-Partikeln nachgewiesen worden [190].

Die nicht vorhandene Freisetzung des Peptids bei den verschiedenen pH -Werten unterstützt die Theorie, dass es zwischen Peptid 19-2.5 und den Polysacchariden zu ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten kommt. Eine rein ionische Wechselwirkung ließe sich über den pH -Wert aufheben. Die Polysaccharide Alginat und Pektin liegen bei einem pH -Wert von ≤ 3 ungeladen vor. Bei pH -Werten ≥ 12 läge das Pektin sogar positiv geladen vor, während das Peptid 19-2.5 ab einem pH -Wert von $> 12,5$ komplett ungeladen vorliegen würde. Damit müssten bei den pH -Werten 1, 2, 3, 12, 13 und 14 freies Peptid in Lösung nachweisbar sein, wenn es sich alleine um ionische Wechselwirkungen handelt. Da bei keinem der getesteten Polysaccharid-Peptid-Komplexe und pH -Wert freies Peptid nachweisbar ist, beruht die Bindung zwischen Polysaccharid und Peptid neben ionischen Wechselwirkungen zusätzlich auf hydrophoben Effekten.

4.6 LPS-induzierte Zellstimulations Experimente

Wie bereits in der Aufgabenstellung beschrieben, folgt abschließend die Untersuchung auf die *in vitro* Wirksamkeit der Polysaccharid-Peptid-Komplexe:

- Sind die Polysaccharid-Peptid-Komplexe *in vitro* wirksam?

4.6.1 TNF- α -ELISA der Polysaccharid-Peptid-Komplexe

Es stellt sich die Frage, ob Peptid 19-2.5 trotz Verkapselung mit dem jeweiligen Polysaccharid noch vergleichbar mit dem reinen Peptid 19-2.5 auf die LPS-induzierte TNF- α -Produktion wirkt. Zur Klärung dieser Frage bietet sich der TNF- α -ELISA an, welcher die aus Humanzellen gewonnene TNF- α -Konzentration nach Stimulierung der Zellen mit LPS, in Verbindung mit dem verkapseltem Peptid, analysiert. Der Test wurde dreimal mit Blutzellen von jeweils verschiedenen Spendern und einer Doppelbestimmung pro Spender durchgeführt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der ermittelten TNF- α -Konzentration, die von Spender zu Spender variiert, kann der ermittelte Wert für reines LPS auf 100 % gesetzt werden. Daraufhin lassen sich die ermittelten Werte prozentual im Vergleich zu LPS darstellen.

Nach dem in Abbildung 60 und 61 dargestellten TNF- α -ELISA sind vier der acht getesteten Komplexe wirksam. Die durch die O/W-Emulsion hergestellten Alginate-Peptid-Komplexe sowie die durch Sonifizieren hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe, jeweils unabhängig von der Calciumchlorid-Verwendung, weisen eine herunterregulierte TNF- α -Konzentration auf.

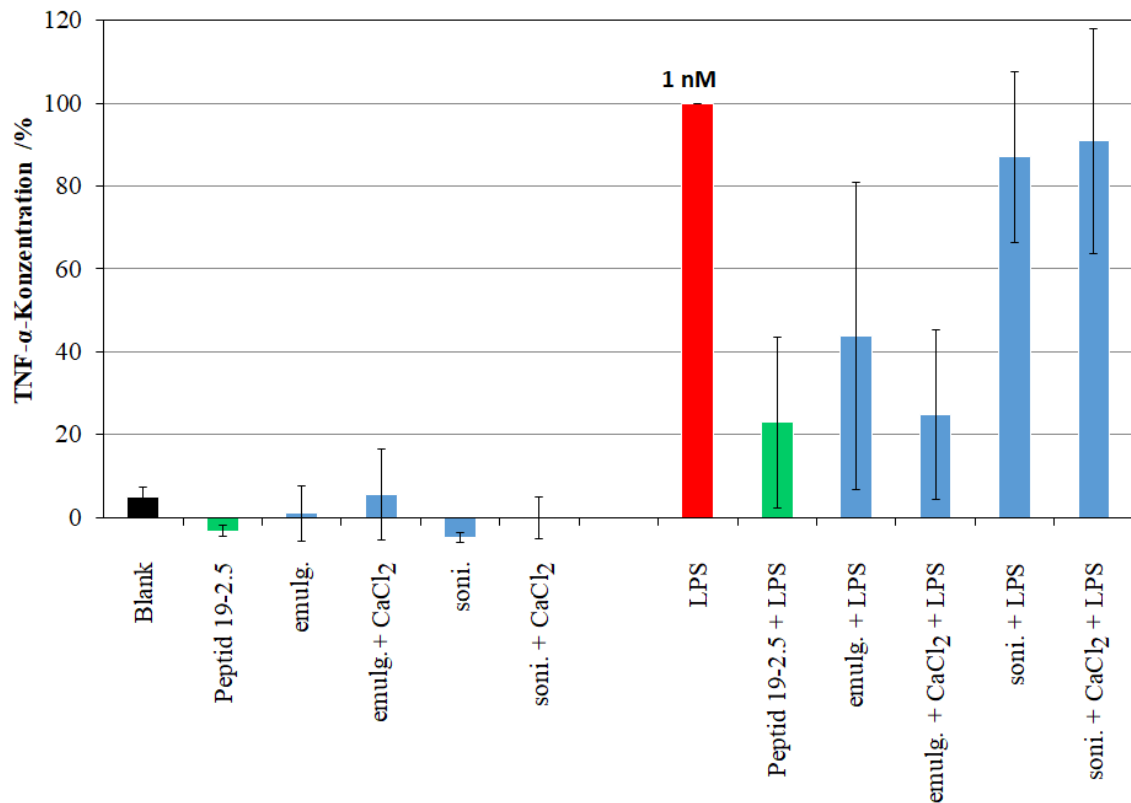


Abbildung 60: LPS induzierte TNF- α -Konzentration der Alginate-Peptid-Komplexe ($n=3$), die Partikel werden so eingesetzt, dass jede der Proben 100 nM Peptid enthält. Die Abkürzungen auf der x-Achse beschreiben die folgenden Proben: Blank: Probe des zur Probenvorbereitung verwendetes Wassers, Peptid 19-2.5: Peptid 19-2.5 gelöst in Wasser (100 nM), emulg.: Alginate-Peptid-Komplexe hergestellt mit einer O/W-Emulsionstechnik (100 nM Peptid enthalten), emulg.+CaCl₂: Alginate-Peptid-Komplexe hergestellt mit einer O/W-Emulsionstechnik unter Verwendung von Calciumchlorid (100 nM Peptid enthalten), soni.: Alginate-Peptid-Komplexe hergestellt durch Sonifizieren (100 nM Peptid enthalten), soni.+CaCl₂: Alginate-Peptid-Komplexe hergestellt durch Sonifizieren unter Verwendung von Calciumchlorid (100 nM Peptid enthalten) und LPS: Zugabe von LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota R60. Im linken Teil des Diagramms sind Kontrollen zu sehen, welche sicherstellen, dass die Proben kein TNF- α freisetzen. Im rechten Teil ist der Einfluss von 1 nM LPS auf die Proben aufgetragen.

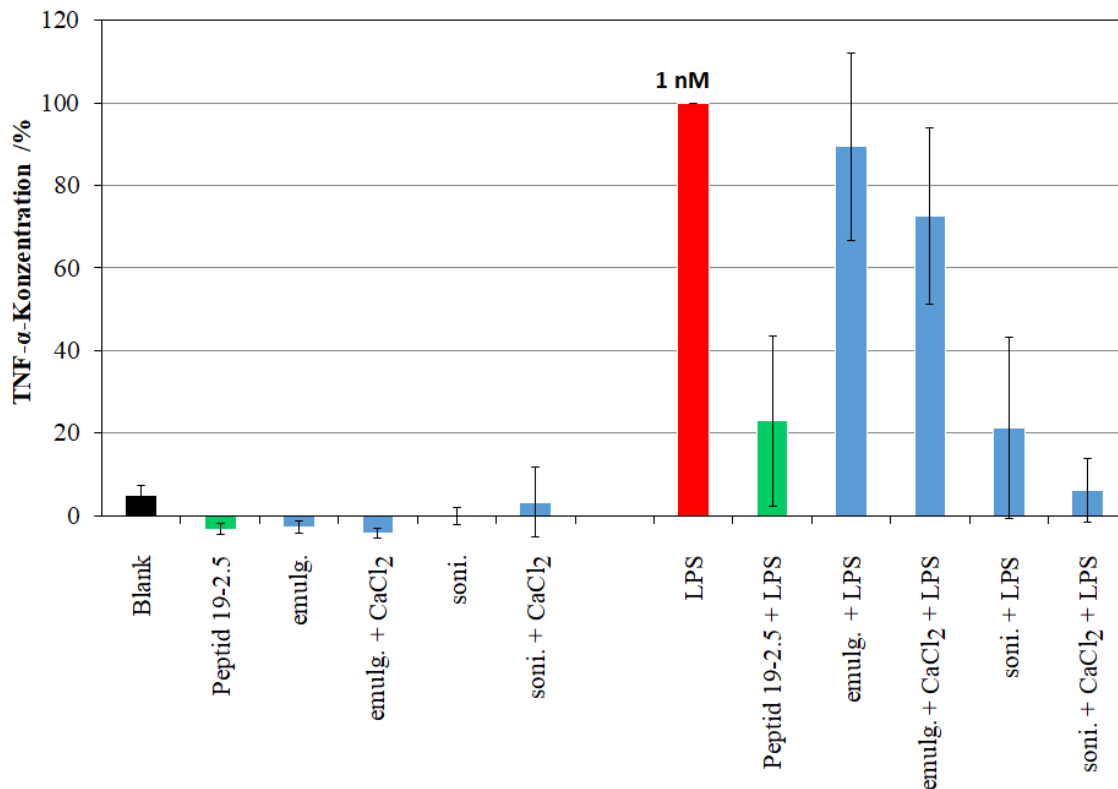


Abbildung 61: LPS induzierte TNF- α -Konzentration der Pektin-Peptid-Komplexe (n=3), die Partikel werden so eingesetzt, dass jede der Proben 100 nM Peptid enthält. Die Abkürzungen auf der x-Achse beschreiben die folgenden Proben: Blank: Probe des zur Probenvorbereitung verwendetes Wassers, Peptid 19-2.5: Peptid 19-2.5 gelöst in Wasser (100 nM), emulg.: Pektin-Peptid-Komplexe hergestellt mit einer O/W-Emulsionstechnik (100 nM Peptid enthalten), emulg. + CaCl₂: Pektin-Peptid-Komplexe hergestellt mit einer O/W-Emulsionstechnik unter Verwendung von Calciumchlorid (100 nM Peptid enthalten), soni.: Pektin-Peptid-Komplexe hergestellt durch Sonifizieren (100 nM Peptid enthalten), soni. + CaCl₂: Pektin-Peptid-Komplexe hergestellt durch Sonifizieren unter Verwendung von Calciumchlorid (100 nM Peptid enthalten) und LPS: Zugabe von LPS von *Salmonella enterica* serovar Minnesota R60. Im linken Teil des Diagramms sind Kontrollen zu sehen, welche sicherstellen, dass die Proben kein TNF- α freisetzen. Im rechten Teil ist der Einfluss von 1 nM LPS auf die Proben aufgetragen.

4.6.2 Diskussion der LPS-induzierte Zellstimulations Experimente

Der TNF- α -ELISA zeigt, dass entgegen der Annahme in Kapitel 4.4.7 nicht alle hergestellten Partikel gegen LPS wirksam sind. Potential haben demnach die durch eine O/W-Emulsion hergestellten Alginate-Peptid-Komplexe und die durch Sonifizieren hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe. In Kapitel 4.5.4 sind die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe als die Komplexe mit der geringsten Stabilität im simulierten Magen aufgeführt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich das Pektin durch das Sonifizieren entwirrt und sich das Peptid an der Oberfläche des Pektins anordnet. Daher lässt sich das Peptid, trotz Komplexbildung mit dem Pektin, durch eine Protease spalten und kann gleichzeitig an LPS binden. Trotzdem sind diese Partikel in der Lage, das Peptid von verschiedenen pH-Werten und nichtionischen Tensiden zu schützen.

Im TNF- α -ELISA wurden die Partikel gegen LPS aus Gram-negativen Bakterien verwendet. Jedoch sind hitzegetötete MRSA ebenfalls in der Lage, TNF- α freizusetzen. Eine solche

Freisetzung kann durch Peptid 19-2.5 unterbunden werden [42]. Im ITC-Experiment bindet Peptid 19-2.5 jedoch deutlich stärker an die durch Erhitzen getöteten Gram-negativen Bakterien *Samonella enterica* als an die durch Erhitzen getöteten Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus* [42]. Der Wirkmechanismus von Peptid 19-2.5 an Gram-positiven Bakterien ist derzeit noch nicht vollständig bekannt. Wahrscheinlich verläuft der Wirkmechanismus über die Blockade der für die Zytokinproduktion verantwortlichen Lipoproteine, wie z. B das Lipoprotein SitC von *Staphylococcus aureus* [24].

Die von Toppazzini et al. [105] publizierte verringerte Wirksamkeit von hydrophoben kationischen AMPs durch Komplexbildung mit Alginat kann, nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, nur teilweise bestätigt werden. Ausschlaggebend scheint die Herstellungsmethode zu sein.

Eine mögliche Erklärung für die Wirksamkeit von lediglich 50 % der hergestellten Partikel ist, dass die TNF- α -ELISA nicht direkt nach der Verkapselung durchgeführt wurde, sondern die Proben vorher im Kühlschrank lagerten. Die nicht wirksamen Partikel sind dabei genau jene Partikel, welche bei der Größenbestimmung bei Entsprechendem Bindungsverhältnis einen Partikeldurchmesser >1000 nm aufweisen. Die durch O/W-Emulsionen hergestellten Pektin-Peptid-Partikel mit einem molaren Verhältnis von 1:90 ([Pektin]:[Peptid]) agglomerieren schon innerhalb einiger Stunden nach der Herstellung und weisen im PCCS-Experiment teilweise Partikelgrößen $> 10 \mu\text{m}$ auf. Die durch Sonifizieren hergestellten Alginat-Peptid-Partikel weisen unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs bei dem molaren Verhältnis von 1:225 ([Alginat]:[Peptid]) Agglomerate auf. Die PCCS-Messungen deuten ebenfalls auf eine Agglomeration bei diesen Proben hin, welche bei den durch O/W-Emulsionen hergestellten Alginat-Peptid-Partikeln nicht zu beobachten ist.

Es scheint, als ob die *in vitro* Wirksamkeit der Komplexe abhängig von ihrer Größe und Größenverteilung ist.

5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit finden die Polysaccharide Alginat, Chitosan und Pektin Verwendung. Natrium-Alginat und Pektin wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Englisch im Centrum Industrielle Biotechnologie (CIB) der Fachhochschule Lübeck hergestellt. Das Alginat wurde aus der Braunalge *Ascophyllum nodosum* gewonnen, während das Pektin aus der Zuckerrübe *Beta vulgaris* stammt.

Das Alginat besitzt eine molare Masse von 457,5 kD, die für ein Alginat sehr geringe Polydispersität von 1,3 und einen hydrodynamischen Radius von 45,0 nm. Damit liegt das Massenmittel der molaren Masse des Alginats über dem in der Literatur angegebenen Bereich [3] [79] [167]. Das Zuckerrübenpektin liegt ebenfalls mit seiner molaren Masse von 621,3 kDa über den publizierten molaren Massen für Pektine [89] [90]. Die Polydispersität dieses Polysaccharids liegt bei 2,1 und der hydrodynamische Radius beläuft sich auf 31,7 nm. Das verwendete Chitosan wurde kommerziell erworben und zählt mit einer molaren Masse von 83,8 kDa (Polydispersität 2,1 und hydrodynamischer Radius 25,2 nm) zu den Chitosanen mit geringer molarer Masse. Diese molare Masse liegt im Rahmen der publizierten molaren Massen für Chitosan [102] [168] [170].

Damit handelt es sich bei Chitosan nach der molaren Masse und dem hydrodynamischen Radius um das kleinste der drei verwendeten Polysaccharide. Pektin besitzt die höchste molare Masse der drei Polysaccharide, während Alginat den größten hydrodynamischen Radius aufweist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Pektin eher eine Knäuelstruktur aufweist, während Alginat annähernd linear vorliegt. Auffällig ist, dass die selbst hergestellten Polysaccharide Alginat und Pektin bei geringer Polydispersität mit ihren molaren Massen über den Literaturwerten liegen.

Die Polysaccharide sollen zum Wirkstofftransport verwendet werden. Dabei liegt das Augenmerk auf der oralen Applikation eines LPS bindenden Peptids. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Modellpeptid handelt es sich um Peptid 19-2.5, ein kationisches Peptid, bestehend aus 20 Aminosäuren. Neben dem Schutz des Peptids vor verschiedenen pH-Werten, varrierenden Salzkonzentrationen und Enzymen im Magen-Darm-Trakt, kommt es auf die Größe der entstandenen Partikel an, denn die Größe von Wirkstoffvesikeln kann über die Wirksamkeit entscheiden [60].

Nachdem die Ausgangsstoffe charakterisiert wurden ist festzustellen, ob das Peptid an das jeweilige Polysaccharid bindet. Zwischen den Polykationen Chitosan und Peptid 19-2.5 entsteht keine Bindung. Damit kann Chitosan als Negativkontrolle verwendet werden. Für die entstehenden Polysaccharid-Peptid-Komplexe lässt sich eine Bindungsstöchiometrie ermitteln. Diese liegen bei den Alginat-Peptid-Komplexen bei etwa 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) und bei den Pektin-Peptid-Komplexen variieren die Bindungsstöchiometrie je nach Messmethode zwischen 1:95 ([Pektin]:[Peptid]) und 1:110 ([Pektin]:[Peptid]). Unter der Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Peptid ist die Bindungsstöchiometrie mit 1:45 ([Pektin]:[Peptid]) deutlich geringer. Das heißt, der Fluoreszenzmarker zeigt einen deutlichen Einfluss auf die

Bindungsstöchiometrie. Ein Alginatmolekül ist in der Lage eine deutlich höhere Anzahl Peptide zu binden als ein Pektinmolekül.

Die durch Emulgieren hergestellten Alginat-Peptid-Partikel (Bindungsverhältnis 1:100 [Alginat]:[Peptid]) besitzen zwei Partikelspezies. 66 % der Partikel zeigen einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 250 nm und 34 % der Partikel einen hydrodynamischen Durchmesser von 1300 nm. Partikel mit einem Bindungsverhältnis von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) weisen einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 700 nm auf. Damit sind die gemessenen Größenordnungen deutlich geringer als die bisher publizierten Partikelgrößen für Alginat-Partikel, welche ausnahmslos im μm -Bereich und größtenteils im dreistelligen μm -Bereich liegen [76] [83] [161] [190]. Lediglich emulgierte PLGA-Alginat-Peptid-Partikel zeigen von der Partikelgrößenordnung her sehr ähnliche Partikelgrößen, wie die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Partikel [3].

Die durch Sonifizieren hergestellten Alginat-Peptid-Partikel weisen je nach Messmethode unterschiedliche Partikelgrößen auf. Partikel mit einem Bindungsverhältnis von Alginat zu Peptid von 1:100 weisen einen Durchmesser 260 nm auf. Dieser kann unter Verwendung von Alexa-Fluor 488 auf über 1000 nm anwachsen.

Die Ergebnisse deuten auf eine begünstigte Agglomeration der Alginat-Peptid-Partikel durch höhere Peptid-Konzentrationen hin, ebenso kommt es durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa-Fluor 488 zu einer Partikelvergrößerung. Diese Agglomeration tritt bei den sonifizierten Partikeln auf, da für die Emulsionen der Emulgator Span80 verwendet wurde, welcher dafür bekannt ist, Agglomeration zu verringern oder gar zu verhindern [193]. Andere Publikationen beschreiben das Anschwellen von Pektin in wässriger Lösung [179] [180]. Von einem Anschwellen wird bei Alginat nicht ausgegangen, denn sonst hätte Span80 nicht den beobachteten Effekt.

Die hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe verhalten sich anders als die Alginat-Peptid-Komplexe. Die emulgierten Pektin-Peptid-Partikel mit einem Pektin-Peptid-Bindungsverhältnis von 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) sind nicht monodispers sondern zeigen in den DLS- und AFM-Experimenten zwei Partikelspezies. 77 % der Partikel zeigen einen hydrodynamischen Durchmesser von 220 nm bis 270 nm und 23 % der Partikel zeigen einen hydrodynamischen Durchmesser von 860 nm bis 1000 nm. Erhöht sich das Bindungsverhältnis auf 1:90 ([Pektin]:[Peptid]), entstehen Mikropartikel mit einem Durchmesser von 3,6 μm . Die Pektin-Peptid-Komplexe sind kleiner als publizierte Pektin-Gelatine-Komplexe für den Wirkstofftransport [84].

Span80 scheint hier keinen Einfluss zu haben. Der Agglomeration dieser Partikel kann durch Sonifizieren in der Herstellung vorgebeugt werden. Jedoch führt die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa-Fluor 488 zur Partikelvergrößerung. Die sonifizierten Pektin-Peptid-Partikel mit den Bindungsverhältnissen 1:110 und 1:30 ([Pektin]:[Peptid]) besitzen einen Partikeldurchmesser von etwa 450 nm. Die mittels AFM bestimmte Partikelgröße (Bin-

dungsverhältnis 1:30 [Pektin]:[Peptid]) liegt höher, denn die Partikel könnten beim Trocknen agglomerieren.

Die Partikelgröße der hergestellten Polysaccharid-Peptid-Komplexe wird sowohl vom eingesetzten molaren Verhältnis als auch von der Verwendung des Fluoreszenzmarkers Alexa-FluorC₅ Maleimide beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit kam es hauptsächlich zur Herstellung von Nanopartikel.

Die Fluoreszenz-, Fluoreszenzlebensdauer- und Anisotropie- Messungen zeigen eine Abnahme der Wechselwirkungen zwischen Peptid und Fluoreszenzfarbstoff durch die Wechselwirkung des Peptids mit einem Alginat oder Pektin. Dabei werden die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Alexa-Fluor 488 völlig aufgehoben, sobald das fluoreszenzmarkierte Peptid an Pektin bindet. Durch die Bindung an Alginat werden die Wechselwirkungen erheblich abgeschwächt.

Bei den Wechselwirkungen zwischen Alginat und Peptid soll es sich laut Literatur um ionische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen handeln [83] [105]. Auf ionische Wechselwirkungen in Verbindung mit hydrophoben Effekten weisen die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls hin.

Die Bindung des Peptids an das Pektin ist schwächer, sollte aufgrund der Ladungen aber trotzdem zum Teil ionischen Charakter besitzen. An das kationische Chitosan bindet das Peptid nicht. Die Bindung zwischen LPS und Peptid 19-2.5 ist unter anderem als ionisch in Verbindung mit hydrophoben Effekten zwischen C-Terminus des Peptids und Lipid A beschrieben [1] [12] [187] und stärker als die Bindung zwischen Peptid und Alginat oder Pektin.

Die Bindung des Modellpeptids an das Pektin scheint kooperativ zu verlaufen, da Calcium-Ionen die Bindung bei geringen Peptidkonzentrationen fördern, bei hohen Peptidkonzentrationen jedoch stören. Zusätzlich werden bei keinem der eingesetzten Bindungsverhältnisse 100 % des eingesetzten Peptids gebunden. Die Literaturwerte beschreiben ebenfalls, dass Pektin keine 100 %ige Verkapselungseffizienz besitzt [84] [174].

Im Gegensatz dazu konnten die Literaturwerte für Alginat-Wirkstoffbindungen oder Alginat-Komplex-Wirkstoffbindung, welche keine 100 %ige Verkapselungseffizienz aufweisen [3] [84] [161], widerlegt werden. Bis die Bindungsstöchiometrie von 1:250 ([Alginat]:[Peptid]) erreicht ist, bindet Peptid 19-2.5 zu 100 % an das Alginat.

Die Sekundärstruktur von Peptiden kann sich durch Umgebungseinflüsse, wie Temperaturunterschiede, Druckveränderungen, pH-Wert, Denaturierung und Einflüsse von Polysacchariden verändern [105] [171] [173]. Daher wurde der Einfluss von verschiedenen pH-Werten, Salzkonzentrationen und Polysacchariden mittels CD analysiert. Salze, bestimmte Puffer-Lösungen und auch die Polysaccharide scheinen in bestimmten Kombinationen eine Sekundärstrukturausbildung von Peptid 19-2.5 zu begünstigen. Die Sekundärstruktur kann je nach Umgebung sowohl als α -Helix oder als β -Faltblatt vorliegen.

Die Polysaccharide Pektin und Alginat sind beide in der Lage, das Peptid vor verschiedenen pH-Werten, physiologischen Salzkonzentrationen und nichtionischen Tensiden zu schützen. Die Freisetzung erfolgt unter Verwendung von Enzymen. Die Freisetzung eines Wirkstoffs wird jedoch nicht nur durch die Umgebungsbedingungen beeinflusst [84] [90], sondern auch durch Träger und Wirkstoff selbst [58] [83] [189]. Die Herstellung der Komplexe könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung haben [168]. Der Einfluss der Partikelherstellung konnte bei der Freisetzungsstudie in simulierten Magenflüssigkeit und in den Zellstimulations-Experimenten bestätigt werden. Die durch Sonifizieren oder Emulgieren hergestellten Alginat-Peptid-Komplexe und die durch Emulgieren hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe sind in der Lage, das Peptid im simulierten Magen zu schützen. Die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe sind im simulierten Magen in der Lage, maximal 35 % des Peptids zu schützen. Ein Schutz vor dem Sekret der simulierten Bauchspeicheldrüse und dem simulierten Darm können diese Polysaccharide nicht bieten. In den LPS-induzierten Zellstimulations-Experimenten sind die durch eine O/W-Emulsion hergestellten Alginat-Peptid-Komplexe und die durch sonifizieren hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe wirksam. Das sind genau die Komplexe, bei denen es sich um Nanopartikel handelt.

Da die sonifizierten Pektin-Peptid-Partikel in der Lage sind, maximal 35 % des Peptids im simulierten Magen zu schützen, drängt sich der Verdacht auf, dass 65 % des Peptids an der Oberfläche der Partikel binden. Dieser Wert liegt deutlich über den Literaturwerten für PLGA Partikel, welche abhängig vom Peptid von einer maximalen Bindung zwischen 18 % oder 38 % an der Oberfläche von PLGA-Partikeln beschreibt [3].

Die Oberflächenbindung von Peptiden lässt sich durch die Modifizierung des PLGAs mit Alginat verringern [3]. Die durch eine O/W-Emulsion hergestellten Pektin-Peptid-Komplexe scheinen kein Peptid in nachweisbarer Konzentration an ihre Oberfläche zu binden. Gleiches gilt für die Alginat-Peptid-Komplexe bei denen es, im Gegensatz zu den Pektin-Peptid-Komplexen, nicht auf die Herstellungsmethode ankommt. Diese Ergebnisse lassen in Kombination mit der Literatur [3] vermuten, dass Alginat die Eigenschaft besitzen könnte, Peptide bevorzugt einzuschließen, statt sie an der Oberfläche zu binden. Unterstützt wird diese Vermutung von dem mittels bildgebender FCS in Abbildung 42 C abgebildete Alginat-Peptid-Agglomerat, welches im Inneren stärker zu fluoreszieren scheint als am Rand.

6 Ausblick

Die Wirksamkeit, welche die emulgierten Alginat-Peptid-Komplexe und die sonifizierten Pektin-Peptid-Komplexe *in vitro* zeigen, soll im nächsten Schritt in einem Mausmodell überprüft werden. Die Versuche mit der Peptid-Freisetzung im simulierten Magen-Darm-Trakt sind im Gegensatz zu dem Magen-Darm-Trakt eines Lebewesens stark vereinfacht. Des Weiteren sollten die *in vitro* Versuche mit sonifizierten Alginat-Peptid-Partikeln und durch eine O/W-Emulsion hergestellten Pektin-Peptid-Partikeln, die nicht vollständig besetzt sind, wiederholt werden. Die freien Ladungen der Polysaccharide könnten eine Agglomeration vermeiden und die Partikelgröße samt der Wirksamkeit dieser Komplexe beeinflussen.

Die AFM-Messungen der Polysaccharid-Peptid-Partikel sollten zusätzlich in Wasser durchgeführt werden. Dafür ist eine Immobilisierung der Partikel am MICA-Slide vonnöten. Das „Zerreißen“ der sich beim Eintrocknen bildenden Agglomerate durch die Zugkraft des verdunstenden Wassers, kann bei einer solchen Messung umgangen werden. Zusätzlich sollte eine solche Messung Aufschluss darüber geben, ob es durch Eintrocknung der Probe zu einer Agglomeratbildung kommt. Mit Hilfe weiterer AFM-Messungen könnte die Frage geklärt werden, ob eine mögliche Agglomeratbildung durch Trocknung der Partikel mittels Gefrier Trocknung vermeidbar ist. Die Messung soll für solche Versuche noch weiter optimiert werden, da die gemessenen gefriergetrockneten Alginat-Peptid-Partikel in dieser Arbeit lose auf dem MICA-Slide lagen und durch den Cantilever während der Messung verschoben wurden.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Kryo-Elektronen-Mikroskopie dar, eine Methode, welche für die Strukturaufklärung von Proteinen entwickelt wurde [194]. Mit Hilfe dieses hochauflösenden bildgebenden Verfahrens könnte die dreidimensionale Struktur der Polysaccharid-Peptid-Partikel ohne Immobilisierung bestimmt werden. Die Partikel würden durch Einfrieren fest an einer Stelle bleiben.

Die Polysaccharid-Peptid-Komplexe bilden hauptsächlich Nanopartikel. Die Komplexe könnten als Nanopartikel durch die Magen- oder Darmschleimhaut in die Blutbahn diffundieren. Da es jedoch zu einer Agglomeration kommen kann, sind vor einer eventuellen Verabreichung weitere Versuche zum Agglomerationsverhalten notwendig, da Partikel mit einer Größe $> 5 \mu\text{m}$ in der Lage wären Kapillaren zu verstopfen [177].

Die Bindungscharakterisierung zwischen Pektin und Peptid soll fortgesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit kam es zu der Annahme, dass das Peptid über eine Mischung aus ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten an die Polysaccharide bindet. Wenn diese Annahme zutrifft, müsste der Methylierungsgrad des Pektins einen Einfluss auf die Bindung des Peptids haben. Mit der Verwendung eines unmethylierten Pektins, sollte das ermittelte Bindungsverhältnis mittels FCS ansteigen. Zusätzlich sollte dieses ebenfalls bei den ITC-Messungen und Messungen im Fluoreszenzdetektor nach Trennung über eine C_{18} -Säule

ansteigen. Die mittels ITC ermittelte Bindungskonstante sollte zunehmen. Im Vergleich sollten die Versuche mit einem komplett methylierten Pektin wiederholt werden. Unter diesen Bedingungen dürfte in der FCS keine Bindung des fluoreszenzmarkierten Peptids an das Pektin sichtbar sein und die ermittelten Bindungsverhältnisse mittels ITC und Fluoreszenzdetektion nach Trennung über eine C₁₈-Säule sowie die Bindungskonstante müssten sich verringern.

Im Rahmen dieser Arbeit ist das Problem aufgetreten, dass sowohl Gelfiltration, als auch Dialyse nicht in der Lage sind, den freien Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide von gelabeltem Peptid zu trennen. Vor diesem Hintergrund sollte ein Kompetitionsassay für den Farbstoff durchgeführt werden.

Unter der Verwendung des Fluoreszenzmarkers Alexa-Fluor 488 C₅ Maleimide stellt sich in den PCHs die Frage, ob sich durch die Bindung des fluoreszenzmarkierten Peptids an die Polysaccharide, Grundzustandskomplexe bilden könnten, welche in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung nicht sichtbar wären, oder ob das *Quenching* so stark ist, dass in der Fluoreszenzlebensdauer-Messung lediglich ein kleiner Teil *ungequenchter* Farbstoff sichtbar ist. Welche der beiden Theorien eintritt ließe sich in weiteren Experimenten bestimmen.

In der bisherigen Arbeit stand der Transport des Peptids nach oraler Applikation mit der Freisetzung in den Darmlumen im Vordergrund. Im simulierten Magen-Darm-Trakt scheinen die α -Amylasen im Sekret der Bauchspeicheldrüse ausschlaggebend für die Peptid-Freisetzung aus den hergestellten Partikeln zu sein. Aus den Ergebnissen des Mausmodells sollte hervorgehen, ob die verwendeten Polysaccharide in der Lage sind, das Peptid auf dem Weg von der oralen Einnahme bis zu ihrem Wirkort zu schützen.

Sollten die verwendeten Polysaccharide das Peptid im Mausmodell, ebenso wie im simulierten Magen-Darm-Trakt, nicht vollständig schützen können, sollen Versuche mit weiteren Polysacchariden oder der Kombination von verschiedenen Systemen durchgeführt werden. Ein anderes Polysaccharid könnte beispielsweise Xylan sein, welches ebenfalls für eine Verkapselung in Frage kommt [195]. Die Verkapselung mit Chitosan hatte bei dem Peptid aufgrund der gleichen Ladungen nicht funktioniert. In der Literatur wird Chitosan häufig zum Verkapseln von Peptiden beschrieben [102] [196], wobei es sich oft auch um eine Kombination mit Chitosan handelt. Beispiele dafür sind: die Kombination aus Chitosan und Dextran [57] und Chitosan kombiniert mit Alginat [73] [190]. Die Kombination von Alginat und Pektin mit Chitosan könnte Potential haben und sollte zukünftig betrachtet werden. Ein Vergleich mit der Verkapselung durch ein Copolymer aus Milch- und Glycolsäure (engl. *Poly-lactic-co-Glycolic-Acid*, PLGA) und der Wirkung im Mausmodell könnte weitere Informationen über Bindungseigenschaften und das Verhalten des Peptid *in vivo* liefern. Solche Verkapselungen sind in der Literatur ebenfalls für verschiedene Peptide oder Proteine beschrieben [57] [61] [178] [197].

Lalatsa et al. [102] beschreibt die Herstellung von Chitosan-Peptid-Partikeln mit Quar-tärem Ammoniumpalmitolglykolchitosan. Die entstandenen Nanopartikel sollen sich in die Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts einlagern und eine Permeation des Peptids sowohl über die Magen-Darm-Schleimhaut als auch durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Kann etwas Ähnliches für die in dieser Arbeit hergestellten Partikel mit Peptid 19-2.5 oder optimierter Partikel nachgewiesen werden? Diese Fragestellung eröffnet ein weiteres Feld von Fragestellungen zur Wirksamkeit der Polysaccharid-Peptid-Partikel.

Oral an Mäuse verabreichtes Peptid 19-2.5 lagert sich in der Schleimschicht im Dün- und Dickdarm an [46]. 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Peptid 19-2.5 sind *in vitro* in der Lage, innerhalb von 7 min lebende Gram-negative Bakterien des Stamms *S.typhimurium* um den Faktor 1000 zu reduzieren. Für Gram-positiven Bakterien liegt dieser Faktor bei 100. In Versuchen mit *S.typhimurium* infizierten Mäusen kann bei der oralen Verabreichung von 100 μg Rhodamin-markiertem Peptid lediglich der Gewichtsverlust während des Krankheitsverlaufs aufgehalten werden [46]. Die in der Literatur und in dieser Arbeit durchgeführten Versuche könnten darauf hinweisen, dass Enzyme im Magen-Darm-Trakt die Aktivität des Peptids nach oraler Verabreichung reduzieren. Im Hinblick auf die mögliche Behandlung von Darmerkrankungen sollten weitere Versuche mit verkapseltem Peptid durchgeführt werden.

Neben weiteren Versuchen mit Peptid 19-2.5 wäre auch die Verkapselung des strukturell verwandten Peptids 19-4LF eine Aufgabe für die Zukunft.

7 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] KACONIS, Yani et al., 2011. Biophysical Mechanisms of Endotoxin Neutralization by Cationic Amphiphilic Peptides. *In: Biophysical Journal*, 100:S. 2652–2661. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.04.041.
- [2] THANHEISER, Marc, 2013. Medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie. *Aufbereitung von Medizinprodukten in Klinik und Praxis*. In: KRAUSS, Mario, Hamburg, Behrs Verlag GmbH & Co KG, Seite 1-11, ISBN 978-3-95468-079-5.
- [3] MATA, Elena et al., 2011. Enhancing immunogenicity to PLGA microparticulate system by incorporation of alginate and RGD-modified Alginate. *In: European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44:S. 32–40. DOI: 10.1016/j.ejps.2011.05.015.
- [4] KESSELHEIM, Aaron S. & OUTTERSON, Kevin, 2010. Fighting Antibiotic Resistance: Marrying New Financial Incentives To Meeting Public Health Goals. *In: Health Affairs*, 29(9):S. 1689–1696. DOI: 10.1377/hlthaff.2009.0439.
- [5] ROESNER, Jan P. 2016. Schwere Sepsis und septischer Schock auf deutschen Intensivstationen. *In: Intensive Care Med*, 42(6):S. 1980–1989. DOI: 10.1055/s-0043-102094.
- [6] PFALZGRAFF, Anja et al. 2016. Synthetic antimicrobial and LPS-neutralising peptides suppress inflammatory and immune responses in skin cells and promote keratinocyte migration. *In: Scientific Reports*, 6:S. 1–12. DOI: 10.1038/srep31577.
- [7] DRYDEN, Matthew S., 2010. Complicated skin and soft tissue infection. *In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3):S. iii35–44. DOI:10.1093/jac/dkq302.
- [8] BRANDENBURG Klaus, ANDRÄ, Jörg, GARIDEL, Patrick & GUTSMANN, Thomas, 2011. Peptide-based treatment of sepsis. *In: Appl. Microbiol Biotechnol*, 90:S. 799–808. DOI 10.1007/s00253-011-3185-7.
- [9] HEINBOCKEL, Lena et al. 2015. Therapeutical Administration of Peptide Pep19-2.5 and Ibuprofen Reduces Inflammation and Prevents Lethal Sepsis. *IN: PLOS one*, 10(7):S. 1–16. DOI: 10.1371/journal.pone.0133291.
- [10] SINGER, Mervyn, 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *In: Journal of American Medical Association.*, 315(8):S. 801–810. DOI:10.1001/jama.2016.0287.
- [11] 2013. Average annual incidence of sepsis varies depending on method used. *In: News-medical [online]* 16.04.2013. [Zugriff am : 19.05.2017] Verfügbar unter: <http://www.news-medical.net/news/20130416/Average-annual-incidence-of-sepsis-varies-dependending-on-method-used.aspx>.

- [12] GUTSMANN, Thomas et al., 2010. New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9):S. 3817–3824. DOI: 10.1128/AAC.00534-10.
- [13] MARTIN, Greg S., 2012. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *In: Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(6):S. 701–706. ISSN 1478-7210.
- [14] KUMAR, Anand, 2014. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock - Implications for optimizing antimicrobial therapy. *In: Landes Bioscience*, 5(1):S. 80–97. DOI: 10.4161/viru.26913.
- [15] JOANNIDID, M. & KLUGE, S. 2014. Sepsis im Jahr 2014. *In: Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 109(8):S. 566–567. DOI: 0.1007/s00063-013-0273-8.
- [16] FLEISCHMANN, Carolin et al., 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis - An Analysis of Hospital Episode (DRG) Statistics in Germany From 2007 to 2013. *In: Deutsches Aerzteblatt International*, 113:S. 159–166. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159.
- [17] HEINRICH, Christian, 2017. Der unbekannte Killer [online] 09.03.2017 [Zugriff am 19.05.2017]. *In: Die Zeit*, 09. Verfügbar unter: <http://www.zeit.de/2017/09/sepsis-blutvergiftung-aerzte-diagnose-immunsystem>.
- [18] BERG, Jeremy M., TYMOCZKO, John L., GATTO jr, Gregory J. & STRYER, Lubert, 2017. Stryer Biochemie. 8. Auflage, Berlin, Springer Verlag GmbH Deutschland, ISBN 978-3-662-54619-2.
- [19] THIMMULAPPA, Rajesh K. et al., 2016. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *In: The Journal of Clinical Investigation*, 116(4):S. 984–995. DOI: 10.1172/JCI25790.
- [20] LACY, Paige & STOW, Jennifer L., 2011. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *In: The American Society of Hematology*, 118(1):S. 9–18. DOI 10.1182/blood-2010-08-265892.
- [21] RANO, Diana Rose E., KELLY, Stacy L. & TAPPING, Richard I. 2013. Human Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP) and CD14 Independently Deliver Triacylated Lipoproteins to Toll-like Receptor 1 (TLR1) and TLR2 and Enhance Formation of the Ternary Signaling Complex. *In: The Journal of Biological Chemistry*, 288(14):S. 9729–9741. DOI: 10.1074/jbc.M113.453266.
- [22] FOCA, Alfredo, LIBERTO, Maria Carla, QUIRINO, Angela & MATERA Giovanni, 2012. Lipopolysaccharides: From Erinyes to Charites. *In: Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, 2012:S. 1–6. DOI:10.1155/2012/684274.

- [23] ANDRÄ, Jörg et al. 2007. Rationale for the Design of Shortened Derivatives of the NK-lysin-derived Antimicrobial Peptide NK-2 with Improved Activity against Gram-negative Pathogens. *In: The Journal of Biological Chemistry*, 282(20):S. 14719–14728. DOI: 10.1074/jbc.M608920200.
- [24] MARTINEZ DE TEJADA, Guillermo et al., 2015. Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides. *In: Scientific Reports*, 5(14292):S. 1–15. DOI: 10.1038/srep14292.
- [25] VENTOLA, C. Lee, 2015. The Antibiotic Resistance Crisis. *In: Pharmacy and Therapeutics*, 40(4):S. 277–283.
- [26] WÖSTEMEYER; Johannes, 2009. Mikrobiologie. 1. Auflage, Stuttgart, UTB basics Ulmer, ISBN 978-3-8252-3284-9.
- [27] CAVAILLON, Jean-Marc & ADRIE, Christophe, 2009. Sepsis and Non-infectious Systemic Inflammation - From Biology to Critical Care. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN 978-3-527-31935-0.
- [28] DAVIES, Julia R., SVENSAETER, Gunnel & HERZBERG, Mark C., 2009. Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. *In: Microbiology*, 155:S. 1977–1988. DOI 10.1099/mic.0.027854-0.
- [29] FREUDBERG, Marina A., 2005. Die Rolle von Lipopolysaccharid im Wechselspiel zwischen Bakterien und Immunsystem [online]. *In: Max-Planck-Institut fuer Immunologie und Epigenetik*, [Zugriff am: 19.07.2013], Verfügbar unter: <http://www.mpg.de/819084/forschungsSchwerpunkt>.
- [30] ROLLE, Michael et al., 2006. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. *In: MAYR, Anton, Hrsg.*, 8. überarbeitete Auflage, Stuttgart, MVS Medizinverlage, ISBN 978-3-8304-1060-7. ISBN 3-8304-1060-3.
- [31] HAHN, Helmut, KAUFMANN, Stefan H. E., SCHULZ, Thomas F. & SUERBEUM, Sebastian, 2009. Medizinische Mikrobiologie und Infektologie. 6. Auflage, Heidelberg, Springer Medizinischer Verlag, ISBN 978-3-540-46359-7.
- [32] RAMACHANDRAN, Girish, 2014. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis - A brief review. *In: Virulence*, 5(1):S. 213–218. ISSN: 2150-5594.
- [33] SCHÜRHOLOZ, Tobias et al. 2013. The anti-inflammatory effect of the synthetic antimicrobial peptide 19-2.5 in a murine sepsis model: a prospective randomized study [online]. *In: Critical Care*, 17(R3):S. 1–9. [Zugriff am: 24.07.2013], Verfügbar unter: <http://ccforum.com/content/17/1/R3>.
- [34] COSTELLO, Céire et al., 2010. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *In: BMJ*, 340:S. 1–11. DOI: 10.1136/bmj.c2096.

- [35] DE FRANCESCO, Vincenzo et al., 2010. Worldwide H. pylori Antibiotic Resistance: a Systematic Review. *In: Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*, 19(4):S. 409–414. PMID: 21188333.
- [36] LIMBAGO, Brandi M. et al., 2014. Report of the 13th Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Isolate from the United States. *In: Journal of Clinical Microbiology*, 52(3):S. 998–1002. DOI: 10.1128/JCM.02187-13.
- [37] WU, Emilia L. et al., 2013. Molecular Dynamics and NMR Spectroscopy Studies of E. coli Lipopolysaccharide Structure and Dynamics. *In: Biophysical Journal*, 105:S. 1444–1455. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.08.002>.
- [38] BRANDENBURG, Klaus, HEINBOCKEL, Lena, CORREA, Wilmar & LOHNER, Karl, 2016. Peptides with dual mode of action: Killing bacteria and preventing endotoxin-induced sepsis. *In: Biochemica et Biophysica Acta*, 1858:S. 971–979. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.011>.
- [39] HABERMEHL, Gerhard, HAMMANN, Peter E. & KREBS, Hans C., 2008. Naturstoffchemie - Eine Einführung. 3. Auflage, Heidelberg, Springer Verlag, ISBN 978-3-540-73732-2.
- [40] JR, Laszlo Otvos & WADE, John D., 2014. Current challenges in peptide-based drug discovery. *In: Frontiers in CHEMISTRY*, 2(62):S.1–4. DOI: 10.3389/fchem.2014.00062.
- [41] URBÁN, Patricia et al. 2012. Nanotools for the Delivery of Antimicrobial Peptides. *In: Current Drug Targets*, 13:S. 1158–1172.
- [42] HEINBOCKEL, Lena et al., 2013. Preclinical Investigations Reveal the Broad-Spectrum Neutralizing Activity of Peptide Pep19-2.5 on Bacterial Pathogenicity Factors. *In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3):S. 1480–1487.
- [43] ZHANG, Ling-juan & GALLO, Richard L., 2016. Antimicrobial peptides. *In: Current Biology*, 26(1):S. R14–R19. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.
- [44] SUN, Yun & SHANG, Dejing, 2015. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *In: Mediators of Inflammation*, 2015:S. 1–8. DOI: 10.1155/2015/167572.
- [45] YIN, Lois M. et al, 2013. Differential Binding of L- vs. D-isomers of Cationic Antimicrobial Peptides to the Biofilm Exopolysaccharide Alginate. *In: Protein & Peptide Letters*, 20:S. 843–847. ISSN: 1875-5305/13.
- [46] DUPONT, Aline et al., 2014. Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered antibacterial and anti-inflammatory peptide. *In: Gut immunity*, 64(2):S. 222–232. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307150.
- [47] SWISS Institute of Bioinformatics, 2017. Compute pI/Mw tool [online]. [Zugriff am: 22.02.2017], Verfügbar unter: https://web.expasy.org/compute_pi/.

- [48] KOZLOWSKI, Lukasz P., 2016. Protein isoelectric point calculator [online]. Verfügbar unter: <http://isoelectric.ovh.org/>, [Zugriff am: 22.02.2017].
- [49] ACHMANN, Finn L., LARSEN, Kim L. & WIMMER, Reinhard, 2012. Interactions of cyclodextrins with aromatic amino acids a basis for protein interactions. *In: Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 73:S. 349–357. DOI 10.1007/s10847-011-0071-y.
- [50] COSTA, Joana, SILVA, Nadia C., SARMENTO, Bruno & PINTADO, Manuela, 2017. Delivery Systems for Antimicrobial Peptides and Proteins: Towards Optimization of Bioavailability and Targeting. *In: Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(2):S. 108–120. DOI: 10.2174/1389201017666161207112244.
- [51] PATEL, Ashaben, PATEL, Mitesh, YANG, Xiaoyan & MITRA, Ashim K., 2014. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. *In: Protein and Peptide Letters*, 21(11):S. 1102–1120.
- [52] TRESSET, Guillaume & ILIESCU, Ciprian, 2016. Microfluidics-Directed Self-Assembly of DNABased Nanoparticles. *In: Journal of Microelectronics*, 46(4):S. 183–189.
- [53] SHIN, Seung Won, SONG, In Hyun & UM, Soong Ho, 2015. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *In: Nanomaterials*, 5:S. 1351–1365. DOI:10.3390/nano5031351.
- [54] NICOLAS, Julien et al., 2013. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *In: The Royal Society of Chemistry*, 42:S. 1147–1235. DOI: 10.1039/c2cs35265f.
- [55] GRUBER-TRAUB, Cermen et al., 2012. Sprühtrocknung von BSA- und Interferon- β beladenen Chitosan-Partikeln. *In: Chemie Ingenieur Technik*, 84:S. 343–348. DOI: 10.1002/cite.201100191.
- [56] MUFAMADI, Maluta S. et al, 2011. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *In: Journal of Drug Delivery*, 2011:S. 1–19. DOI: 10.1155/2011/939851.
- [57] WIEBER, Alena, SELZER, Torsten & KREUTER, Jörg, 2011. Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptid in different adjuvant drug delivery system: A comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 421:S. 151–159. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.09.011.
- [58] WALLACE, Stephanie J., NATION, Roger L., LI, Jian & BOYD, Ben J., 2013. Physicochemical Aspect of the Coformulation of Colistin and Azithromycin Using Liposomes for Combination Antibiotic Therapies. *In: Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102:S. 1578–1587. DOI 10.1002/jps.23508.

- [59] GIRI, Tapan Kumar et al., 2013. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *In: Saudi Pharmaceutical Journal*, 21:S. 125–141. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.009>.
- [60] PIROOZANIA, Nazanin, HASANNIA, Sedegh, LOTFI, Abbas Sahebghadam & GHANEI, Mostafa, 2012. Encapspeptide of Alpha-1 antitrypsin in PLGA nanoparticles: In Vitro characterization as an effective aerosol formula-form in pulmonary diseases. *In: Nanobiotechnology*, 10(20):S. 1–15. URL: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/20>.
- [61] SILVA, A. L. et al., 2013. Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticle: Low-brust release is crucial for efficient CD8+ T cell activation. *In: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3):S. 338–345. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.11.006.
- [62] MA, Wenxue et al., 2012. Plga nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses. *In: International Journal of Nanomedicine*, 2012(7):S. 1475–1487. URL: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S29506>.
- [63] BELOGUROV, Alexey, A. et al., 2013. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis. *In: The FASEB*, 27:S. 222–231. DOI: 10.3109/03639045.2012.699069.
- [64] RAYAPROLU, Bindhu Madhavi & STROM, James G., 2013. Design and evaluation of D- α tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate emulsified poly- ϵ -caprolactone nanoparticles fpt protein/peptide drug delivery. *In: Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(7):S. 1046–1052. DOI: 10.3109/03639045.2012.699069.
- [65] XIA, Yujie, XU, Qingxing, WANG, Chi-Hwa & PACK, Daniel W., 2013. Protein Encapsulation in and Release from Monodisperse Double-Wall Polymer Microspheres. *In: Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(5):S. 1601–1609. DOI 10.1002/jps.23511.
- [66] CASETTARI, Luca et al., 2011. Surface Characterisation of Bioadhesive PLGA/Chitosan Microparticles Produced by Supercritical Fluid Technology. *In: Pharmaceutical Research*, 28:S. 1668–1682. DOI: 10.1007/s11095-011-0403-z.
- [67] SENNI, Karim et al., 2011. Marine Polysaccharides: A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering. *In: Marine Drugs*, 9:S. 1664–1681. DOI: 10.3390/md9091664.
- [68] ELDAR-BOOCK, Anat, POLYAK, Dina, SCOMPARIN, Anna & SATCHI-FAINARO, Ronit, 2013. Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. *In: Current Opinion in Biotechnology*, 24:S. 682–689. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.014>.

- [69] MARKOVSKY, Ela et al., 2012. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *In: Journal of Controlled Release*, 161:S. 446–460. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.12.021.
- [70] TEASDALE, Ian & BRÜGGEMANN, Oliver, 2013. Polyphosphazenes: Multifunctional, Biodegradable Vehicles for Drug and Gene Delivery. *In: Polymers*, 5:S. 161–187. DOI: 10.3390/polym5010161.
- [71] GUPTA, Shilpi et al., 2012. Polyether based amphiphiles for delivery of active components. *In: Polymer*, 53:S. 3053–3078. DOI:10.1016/j.polymer.2012.04.047.
- [72] ALLMEROOTH, Mareli, BARZ, Matthias & ZENTEL, Rudolf, 2010. Polymere Therapeutika. *In: NATUR GEIST - Das FORSCHUNGSMAGAZIN der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*, 1:S. 8–11. ISBN 0178-4757.
- [73] ZEEB, Benjamin, HOSSEIN, SABERI, Amir Hossein, WEISS, Jochen & MCCLEMENTS, David Julian, 2015. Retention and release of oil-in-water emulsions from filled hydrogel beads composed of calcium alginate: impact of emulsifier type and pH. *In: Royal Society of Chemistry*, 11:S. 2228–2236. DOI: 10.1039/c4sm02791d.
- [74] ZHANG, Zipei, ZHANG, Ruojie, ZOU, Liqiang & MCCLEMENTS, David Julian, 2016. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *In: Food Hydrocolloids*, 58:S. 308–315. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.015.
- [75] AIKAWA, Tatsuo et al., 2015. A drug formulation using an alginate hydrogel matrix for efficient oral delivery of the manganese porphyrin-based superoxide dismutase mimic. *In: Biomaterial Sciences*, 3:S. 861–869. DOI: 10.1039/c5bm00056d.
- [76] WILSON, Jenna L., NAJIA, Mohamad Ali, SAEED, Rabbia & MC DEVITT, Todd C., 2014. Alginate encapsulation parameters influence the differentiation of microencapsulated embryonic stem cell aggregates. *In: Biotechnology and Bioengineering*, 111(3):S. 618–631. DOI: 10.1002/bit.25121.
- [77] MADL, Christopher M. et al., 2013. Presentation of BMP-2 Mimicking peptides in 3D Hydrogels Directs Cell Fate Commitment in Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells. *In: BioMacromolecules*, 15:S. 445–455.
- [78] ROSAS-FLORES, Walfred, RAMOS-RAMÍREZ, Emma Gloria & SALZAR-MONTOYA Juan Alfredo, 2013. Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *In: Carbohydrate Polymers*, 98:S. 1011–1017. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.077>.
- [79] SAPIR, Yulia, KRYUKOV, Olga & COHEN, Smadar, 2011. Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration. *In: Biomaterials*, 32:S. 1838–1847. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.008.

- [80] YAN, Jing, CHEN, Fei & AMSDEN, Brian G., 2016. Cell sheets prepared via gel-sol transition of calcium RGD-alginate. *In: Acta Biomaterialia*, 30:S. 277–284. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.046>.
- [81] PEREZ, Roman A. et al., 2014. Utilizing Core Shell Fibrous Collagen-Alginate Hydrogel Cell Delivery System for Bone Tissue Engineering. *In: TISSUE ENGINEERING: Part A*, 20(1 und 2):S. 103–114. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0198.
- [82] SHIN, Seung-Hwa et al., 2013. Sequential delivery of TAT-HSP27 and VEGF using microsphere/hydrogel hybrid systems for therapeutic angiogenesis. *In: Journal of Controlled Release*, 166:S. 38–45. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.020>.
- [83] CALLEWAERT, Maité et al., 2009. Serum albumin-alginate coated microspheres: Role of the inner gel binding and release of the KRFLK peptide. *In: International Journal of Pharmaceutics*, 366:S. 103–110. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.011.
- [84] SARAVANAN, Muniyandy & RAO, K. Panduranga, 2010. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *In: Carbohydrate Polymers*, 80:S. 808–816. URL: <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.036>.
- [85] HÄNSEL, Rudolf & STEINEGGER, Ernst, 2014. Pharmakognosie Phytopharmazie. *In: STICHER, Otto, HEILMANN, Jörg und ZÜNDORF, Ilse, Hrsg.*, 10. Auflage, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 978-3-8047-3144-8.
- [86] MORRIS, Edwin R., REES, David A. & THOM, David, 1980. Characterisation of alginate composition and block-structure by circular dichroism. *In: Carbohydrate Research*, 81:S. 305–314.
- [87] THOM, David, GRANT, Gregor T., MORRIS, Edwin R. & REES, David A., 1982. Characterisation of cation binding and gelation of polyuronates by circular dichroism. *In: Carbohydrate Research*, 100:S. 29–42.
- [88] WARREN, Jeremy G., KASUN, George W., LEONARD, Takara & KIRKPATRICK, Bruce C., 2016. A phage display-selected peptide inhibitor of *Agrobacterium vitis* polygalacturonase. *In: Molecular Plant Pathology*, 14(4):S. 480–486. DOI: 10.1111/mpp.12293.
- [89] JINDAL, Manish, KUMAR, Vineet, RANA, Vikas & TIWARY, A.K., 2013. Aegle marmelos fruit pectin for food and pharmaceuticals: Physico-chemical, rheological and functional performance. *In: Carbohydrate Polymers*, 93:S. 386–394. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.12.012.
- [90] WONG, Tin Wui, COLOMBO, Gaia & SONVICO, Fabio, 2011. Pectin matrix as Oral Drug Delivery Vehicle for Colon Cancer Treatment. *In: American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(1):S. 201–214. DOI: 10.1208/s12249-010-9564-z.

- [91] BERMÚDEZ-ORIA, Alejandra et al., 2017. Complexation of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol with pectin and their potential use for colon targeting. *In: Carbohydrate Polymers*, 163:S. 292–300. URL: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.027>.
- [92] CARBINATTO, Fernanda M., DE CASTRO, Ana Dòris, EVANGELISTA, Raul C. & CURY, Beatriz S. F., 2014. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *In: Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9:S. 27–34. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.12.002>.
- [93] LUO, Yangchao & WANG, Qin, 2014. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, 64:S. 353–367. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017>.
- [94] MORRIS, Gordon A. et al., 2010. Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *In: Carbohydrate Polymers*, 82:S. 1161–1167. URL: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.049>.
- [95] KUIVANEN, Joosu et al., 2012. Engineering Filamentous Fungi for Conversion of D-Galacturonic Acid to L-Galactonic Acid. *In: Applied and Environmental Microbiology*, 78(24):S. 8676–8683. DOI: 10.1128/AEM.02171-12.
- [96] WANG, Xing et al., 2013. A One-Step Method for the Simultaneous Determination of Five Wood Monosaccharides and the Corresponding Aldonic Acids in Fermentation Broth Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with a Pulsed Amperometric Detector. *In: Journal of Wood Chemistry and Technology*, 34(1):S. 67–76. DOI: 10.1080/02773813.2013.838268.
- [97] INOUE, Kadumi et al., 2011. HPLC Separation of All Aldopentoses and Aldohexoses on an Anion-Exchange Stationary Phase Prepared from Polystyrene-Based Copolymer-electrophoresis The Effect of NaOH Eluent Concentration. *In: Molecules*, 16:S. 5905–5915. DOI: 10.3390/molecules16075905.
- [98] PHARMA KB, 2015. L-Rhamnose [online] 11.11.2015. [Zugriff am: 29.05.2017], Verfügbar unter: <http://www.pharmakb.com/l-rhamnose/>.
- [99] REIS, Lewis A. et al., 2012. A peptide-modified chitosan-collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery. *In: Acta Biomaterialia*, 8:S. 1022–1036. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.11.030.
- [100] WANG, Xiaoqin & ZHANG, Xuewu, 2013. Separation, Antitumor Activities, and Encapsulation of Polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*. *In: American Institute of Chemical Engineers*, 29(3):S. 681–687. DOI: 10.1002/btpr.1725.
- [101] AMIDI, Maryam, MASTROBATTISTA, Enrico, JISKOOT, Wim & HENNINK, Wim E., 2010. Chitosan based delivery system for protein therapeutics and antigens. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:S. 59–82. DOI:10.1016/j.addr.2009.11.009.

- [102] LALATSA, A. et al. 2012. Delivery of peptides to the blood and brain after oral uptake of quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan nanoparticles. *In: Molecular Pharmaceutics*, 9:S. 1764–1774. DOI: 10.1021/mp300068j.
- [103] TRAN, Dai Lam et al., 2011. Some biomedical applications of chitosan-based hybrid nanomaterials. *In: Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2:S. 1–6. DOI: 10.1088/2043-6262/2/4/045004.
- [104] PUBCHEM, 2018. D-glucosamine. *In: PubChem Open Chemistry Database [online]*, [Zugriff am 10.02.2018]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-glucosamine>.
- [105] TOPPAZZINI, Mila et al., 2011. Can the interaction between the antimicrobial peptide LL-37 and alginate be exploited for the formulation of new biomaterials with antimicrobial properties? *In: Carbohydrate Polymers*, 83:S. 578–585. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.08.020.
- [106] BYSELL, Helena, MÅNSSON, Ronja, HANSSON, Per & MALMSTEN, Martin, 2011. Microgels and microcapsules in peptide and protein drug delivery. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 63:S. 1172–1185. DOI: 10.1016/j.addr.2011.08.005.
- [107] KUHLMANN, Nicole et al., 2018. Peptide drug stability: The anti-inflammatory drugs Pep19-2.5 and Pep19-4LF in salve formulations. *In: EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 115:S. 240–247. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.01.022.
- [108] LOTTSPREICH, Friedrich & ENGELS, Joachim W., 2012. Bioanalytik. 3. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 978-3-8274-2942-1.
- [109] VISCOTEK. Model 302 TDA Detectors Instrument Manual 1002. *In: Manual Viscotek The Leader in Polymer Characterisation*, Revision 2.00, Huston, Texas, Verfügbar unter: <https://timothyspringer.org/files/tas/files/tdadetector-302.pdf>, [Zugriff am 11.02.2018]. Beschreibung liegt im CIB der FGH Luebeck vor.
- [110] MALECEK, Kathryn & RUTHENBURG, Alexander, 2012. Chapter Nine - Validation of Histone-Binding Partners by Peptide Pull-Downs and Isothermal Titration Calorimetry. *In: Methods in Enzymology*, 512:S. 187–220. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391940-3.00009-3>.
- [111] CIULLI, Alessio, 2013. Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. *In: Methods Molecular Biology*, 1008:S. 357–388. DOI: 10.1007/978-1-62703-398-5-13.
- [112] BRAUTIGAM, Chad A. et al., 2016. Integration and global analysis of isothermal titration calorimetry data for studying macromolecular interactions. *In: Nature Protocols*, 11:S. 882–894. DOI: 10.1038/nprot.2016.044.

- [113] JOHNSON, Rachel A., MANLEY, Olivia M., SPUCHES, Anne M. & GROSSOEHME, Nicholas E., 2016. Dissecting ITC data of metal ions binding to ligands and proteins. *In: Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(5):S. 892–901. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.018.
- [114] ZHANG, Hui et al., 2014. Solubilization of octane in electrostatically-formed surfactant-polymer complexes. *In: Journal of Colloid and Interface Science*, 417:S. 9–17. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.11.018>.
- [115] ATKINS, Peter W. & DE PAULA, Julio, 2013. *Physikalische Chemie*. 5. Auflage, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN 978-527-33247-2.
- [116] DOBRINSKI, Paul, KRAKAU, Gunter & VOGEL; Anselm, 2010. *Physik Fuer Ingenieure*. 12. Auflage, Wiesbaden, Vieweg + Teubler GWV Fachverlage GmbH, ISBN 978-3-8348-0580-5.
- [117] HALLIDAY, David, RESNICK, Robert & WALKER, Jearl, 2017. *Halliday Physik. KOCH, Stephan W. (Hrsg.)*, 3. Auflage, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, ISBN-10 3527413561.
- [118] BANIPAL, Tarlok S., KAUR, Amandeep & BANIPAL, Parampaul K., 2017. Physico-chemical aspects of the energetics of binding of sulphanilic acid with bovine serum albumin. *In: Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 170:S. 214–225. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2016.07.022>.
- [119] ESCOBEDO, Fernando A., 2014. Engineering Entropy in Soft Matter: The Bad, the Ugly and the Good. *In: Soft Matter*, 10(42):S. 1–12. DOI: 10.1039/c4sm01646g.
- [120] LE, Vu H., BUSCAGLIA, Robert, CHAIRES, Jonathan B. & LEWIS, Edwin A., 2013. Modeling complex equilibria in isothermal titration calorimetry experiments: Thermodynamic parameters estimation for a three-binding-site model. *In: Analytical Biochemistry*, 434:S. 233–241. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.030>.
- [121] JAKUBOWSKI, Henry, 2016. Chapter 5 - Binding A: Introduction to reversible binding [online: 25.03.2016]. [Zugriff am: 06.08.2016]. Verfügbar unter: <https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bind/BD5A8LInksReferences.html>.
- [122] TYNDALL, John, L.L.D & F.R.S, 1869. On the blue color of the sky, the polarization of sky - light, and polarization of light by cloudy matter generally. *In: Journal of the Franklin Institute*, 88:S. 34–40.
- [123] LEE, S. P., TSCHARNUTER, W. & CHU, B., 1972. Calibration of an Optical Self-Beating Spectrometer by Polystyrene Latex Spheres and Confirmation of the Stokes-Einstein Formula. *In: JOURNAL OF POLYMER SCIENCE*, 10:S. 2453–2459.
- [124] LABRIE, Audrey, MARSHALL, Andrea, BEDI, Harjot & MAURER-SPUREJ, Elisabeth, 2013. Characterization of Platelet Concentrates Using Dynamic Light Scattering. *In: Transfus Medicine and Hemother*, 40:93–100. DOI: 10.1159/000350362.

- [125] MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2013. Zetasizer nano series user manual [online]. [Zugriff am: 24.05.2017]. Verfügbar unter: <http://www.chem.uci.edu/.../manuals/Malvern>
- [126] KHAMANI, Mehul, RAO, Usha, BAHADUR, Prashant & BAHADUR, Pratap, 2014. Calorimetric and Scattering Studies on Micellization of Pluronics in Aqueous Solutions: Effect of the Size of Hydrophilic PEO End Blocks, Temperature, and Added Salt. *In: Journal of Dispersion Science and Technology*, 35:S. 1599–1610. DOI: 10.1080/01932691.2013.858349.
- [127] HASSAN, Puthusserickal A., RANAN, Suman & VERMA, Gunjan, 2015. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *In: Lagmiur*, 31(1):S. 3–12. DOI: 10.1021/la501789z.
- [128] DORONIN, Alexander, RADOSEVICH, Andrew J., BACKMAN, Vadim & MEGLINSKI, Igor, 2014. Two electric field Monte Carlo models of coherent backscattering of polarized light. *In: Journal of the Optical Society of America A*, 31(11):S. 2394–2400. URL: <https://doi.org/10.1364/JOSAA.31.002394>.
- [129] MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Zetasizer nano ZS90, The ultimate in desktop particle characterization [online]. [Zugriff am: 24.05.2017]. Verfügbar unter: www.praeger-elektronik.at/datenblaetter/.../ZetasizerNanoZS90.....
- [130] VARENNE, Fanny et al., 2016. Multimodal Dispersion of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. *In: Pharmaceutical Research*, 33(5):S. 1220–1234. DOI: 10.1007/s11095-016-1867-7.
- [131] LAMBERT, Joseph B., GRONERT, Scott, SHURVELL, Herbert F. & LIGHTNER, David A., 2012. Spektroskopie Strukturaufklärung in der organischen Chemie. 2. Auflage, München, PEARSON, S. 608-614, ISBN 9783-86894-146-3.
- [132] LAKOWICZ, Joseph R., 2010. Principles of Fluorescence Spektroskopie. 3. Auflage, New York, Springer Science + Business Media, ISBN-10 0-387-31278-1.
- [133] KAHRA, Dana, 2012. Die Energielandschaft von Proteinen: Von der Faltung zur Katalyse - Einzelmolekül-FRET-Studien an einem Zwei-Domänen-Protein [Inauguraldissertation]. Lübeck: Universität zu Lübeck.
- [134] MÄNTELE, Werner, 2012. Biophysik. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer (UTB), S. 173-215, ISBN 978-3-8252-3270-2, 2012.
- [135] PETERSON, B. M. et al., 2015. Lifetime measurement of the cesium 6P_{3/2} level using ultrafast pump-probe laser pulses. *In: Physical Review A*, 91(012506):S. 1–11. DOI: 10.1103/PhysRevA.91.012506.
- [136] JIN, Jun-Cheng et al., 2015. Two porous luminescent metal-organic frameworks: quantifiable evaluation of dynamic and static luminescent sensing mechanisms towards Fe³⁺. *In: Dalton Transactions*, 44:S. 17222–17228. DOI: 10.1039/C5DT03038B.

- [137] DOOSE, Sören, NEUWEILER, Hannes & SAUER, Markus, 2009. Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. *In: ChemPhysChem*, 10:1389–1398. DOI: 10.1002/cphc.200900238.
- [138] CHEN, Yan, MÜLLER, Joachim D., SO, Peter T. C. & GRATTON, Enrico, 1999. The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *In: Biophysical Journal*, 77:S. 553–567. URL: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76912-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76912-2).
- [139] ELSON, Elliot L. & MAGDE, Douglas, 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *In: Biopolymers*, 13(1):S. 1–27. DOI: 10.1002/bip.1974.360130102.
- [140] MAGDE, Douglas, ELSON, Elliot L. & WEBB, Watt W., 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *In: Biopolymers*, 13(1):S. 29–61. DOI: 10.1002/bip.1974.360130103.
- [141] EGELMAN, Edward H., 2012. Comprehensive Biophysics. 1. Ausgabe, Oxford, Elsevier B.V., ISBN: 978-0-08-095718-0.
- [142] KOYNOV, Kaloian & BUTT, Hans-Jürgen, 2012. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *In: Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17:S. 377–387. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003.
- [143] KILPATRICK, Laura E. & HILL, Stephen, 2016. The use of fluorescence correlation spectroscopy to characterize the molecular mobility of fluorescently labelled G protein-coupled receptors. *In: Biochemical Society Transactions*, 44(2):S. 624–629. DOI: 10.1042/BST20150285.
- [144] HUANG, Bo, PERROUD, Thomas D. & TARE, Richard N., 2004. Photon Counting Histogram: One-Photon Excitation. *In: ChemPhysChem*, 5:S. 1523–1531. DOI: 10.1002/cphc.200400176.
- [145] GAMBIN, Yann et al. 2017. Single-Molecule Fluorescence Reveals the Oligomerization and Folding Steps Driving the Prion-like Behavior of ASC. *In: Journal of Molecular Biology*, 430(4):S. 491–508. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.013>.
- [146] GAO, Haiyang et al., 2014. Synthesis of amphiphilic polyethylene-b-poly(L-glutamate) block copolymers with vastly different solubilities and their stimuli-responsive polymeric micelles in aqueous solution. *In: Polymer*, 55:S. 4593–5600.
- [147] LU, Rui et al., 2015. Probing the secondary structure of bovine serum albumin during heat-induced denaturation using mid-infrared fiberoptic sensors. *In: Analyst*, 140:S. 765–770. DOI: 10.1039/C4AN01495B.
- [148] SHEN, Zhaocun et al., 2015. Strong circularly polarized luminescence from the supramolecular gels of an achiral gelator: tunable intensity and handedness. *In: Chemical Science*, 6:S. 4267–4272. DOI: 10.1039/C5SC01056J.

- [149] DING Xueqin et al., 2014. Design of functional guanidinium ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient purification of protein. *In: Analytica Chimica Acta*, 815:S. 22–32. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.030>.
- [150] BHATIA, Nidhi Kaur & DEEP, Shashank, 2013. Diagnostic tools for structural characterization and elucidation of fibrils and their precursors in amyloid fibril formation pathway. *In: Journal of Proteins and Proteomics*, 4(2):S. 149–164. ISSN : 0975-8151.
- [151] BINNING, G., QUATE, C. F. & GERBER, Ch., 1986. Atomic Force Microscope. *In: Physical review letters*, 56(9):S. 930–933.
- [152] ZHOU, Lulu, CAI, Mingjun, TONG, Ti & WANG, Hongda, 2017. Progress in the Correlative Atomic Force Microscopy and Optical Microscopy. *In: Sensors*, 17(938):S. 1–15. DOI:10.3390/s17040938.
- [153] FRANCIS, Lewis W., LEWIS, Paul D., WRIGHT, Chris J. & CONLAN, R. Steve, 2010. Atomic force microscopy comes of age. *In: Biol. Cell*, 102:S. 133–143. DOI: 10.1042/BC20090127.
- [154] MORANDAT, S. & EL KIRAT, K., 2010. Exploring the Properties and Interactions of Supported Lipid Bilayers on the Nanoscale by Atomic Force Microscopy. *In: Microscopy Science, Technology, Applications and Education*, S. 1925-1939.
- [155] MÜLLER, Daniel J. & DUFRÊNE, Yves F., 2011. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *In: Trends in Cell Biology*, 21(8):S. 461–469. DOI:10.1016/j.tcb.2011.04.008.
- [156] LANG, Florian & LANG, Philipp, 2007. Basiswissen Physiologie. 2. Auflage, Heidelberg, Springer Medizin Verlag, S. 160-190, ISBN-10 3540714014 trovatos tv now.
- [157] AQU Gesellschaft fuer Arbeitsschutz, Qualitaet und Umwelt mbH, 2014. Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von Brei aus landwirtschaftlichen Produkten. Erfinder: Olaf SCHÄTZCHEN, Wolfgang BEGLER & Michael JARCHAU. 09.01.2014, Anmeldung: 04.07.2012, DE102012013298 A1.
- [158] AQU Gesellschaft fuer Arbeitsschutz, Qualitaet und Umwelt mbH, 2014. Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von Brei aus landwirtschaftlichen Produkten. Erfinder: Friedrich W. PETERSEN, Wolfgang BEGELER & Perter GRASSHOFF. 15.05.2014, Anmeldung: 14.11.2012, DE102012022313 A1.
- [159] AQU Gesellschaft fuer Arbeitsschutz, Qualitaet und Umwelt mbH, 2015. Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von Brei aus landwirtschaftlichen Produkten. Erfinder: Wolfgang BEGLER & Michael JARCHAU. 08.01.2015, Anmeldung: 03.07.2013, DE102013011524 A1.
- [160] THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017. Alexa Fluor™ 488 C5 Maleimide [online]. [Zugriff am: 30.10.2017], Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10254>, 2017. Katalognummer: A10254.

- [161] KAILASAPATHY, Kasipathy, PERERA, Chaminda & PHILLIPS, Michael, 2006. Evaluation of Alginate-Starch PPolymer for Preparation of Enzyme Microcapsules. *In: International Journal of Food Engineering*, 2(8):S. 1–11. DOI: 10.2202/1556-3758.1109.
- [162] WHITMORE, L. & WALLACE, B.A., 2018. DichroWeb [online]. *Department of Crystallography, Institute of Structural and Molecular Biology, Birkbeck College, University of London, UK*. 31.01.2018 [Zugriff am: 17.02.2018], Verfügbar unter: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>.
- [163] SIGMA ALDRICH, 2016. Trito X-100 [online]. [Zugriff am: 15.05.2017], Verfügbar unter: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/x100?lang=de®ion=DE&gclid=CPup8OV2s4CFXQo0woddcIPNA>.
- [164] BRANDENBURG, Klaus et al., 2003. Cross-linked Hemoglobin Converts Endotoxically Inactive Pentaacyl Endotoxins into a Physiologically Active Conformation. *In: The Journal of Biological Chemistry*, 278(48):S. 47660–47669. DOI: 10.1074/jbc.M304743200.
- [165] PEREIRA, Leonel, GHEDA, Saly F. & RIBEIRO-CLARO, Paulo J. A., 2013. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries. *In: International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 22(7):S. 1–7. DOI: 10.1155/2013/537202.
- [166] POOR, Alexander E. et al., 2014. Control of Multi-Drug-Resistant Pathogens with Non-Thermal-Plasma-Treated Alginate Wound Dressing. *In: Surgical Infections*, 15(3):S. 233–243. DOI: 10.1089/sur.2013.050.
- [167] VENKATESAN, Jayachandran et al., 2015. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, 72:S. 269–281. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>.
- [168] SALADINI, Bruno et al., 2013. Microparticles based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes for nasal delivery of tacrine hydrochloride. *In: Drug Delivery and Translational Research*, 3(1):S. 33–41. DOI: 10.1007/s13346-012-0086-y.
- [169] WAN, Ajun, XU, Qing, SUN, Yan & LI, Huili, 2013. Antioxidant Activity of High Molecular Weight Chitosan and N,O Quaternized Chitosans. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:S. 6921–6928. DOI: 10.1021/jf402242e.
- [170] BEKALE, Laurent Adonis, AGUDELO, D. & TAJMIR-RIAAHI, H. A., 2014. Effect of polymer molecular weight on chitosan protein interaction. *In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125:S. 309–317. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.037>.
- [171] YAMAMOTO, Tatsuyuki & YOSHIKIYO, Keisuke, 2011. The effect of cyclodextrins on the conformation of proteins. *In: Current Organic Chemistry*, 15:S. 831–838. ISSN: 1385-2728.

- [172] NGUYEN, Leonard T. et al., 2010. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *In: plosone*, 5(9):S. 1–8. URL: <http://www.cihrrsc.gc.ca/e/193.html>.
- [173] SRIVASTAVA, Saurabh & GHOSH, Jimut Kanti, 2014. Introduction of a Lysine Residue Promotes Aggregation of Temporin L in Lipopolysaccharides and Augmentation of Its Antiendotoxin Property. *In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6):S. 3004–3010. DOI: 10.1128/AAC.00169-13.
- [174] MACIEL, Vinicius B. V. et al., 2017. Electrostatic Self-Assembled Chitosan-Pectin Nano- and Microparticles for Insulin Delivery. *In: Molecules*, 22:S. 1–21. DOI:10.3390/molecules22101707.
- [175] HERRICK-DAVIS, Katharine, GRINDE, Ellinor, COWAN, Ann & MAZURKIEWICZ, Joseph E., 2013. Fluorescence Correlation Spectroscopy Analysis of Serotonin, Adrenergic, Muscarinic, and Dopamine Receptor Dimerization: The Oligomer Number Puzzle. *In: Molecular Pharmacology*, 84:S. 630–642. URL: <http://dx.doi.org/10.1124/mol.113.087072>.
- [176] MELO, Ana M., PRIETO, Manuel & COUTINHO, Ana, 2011. The effect of variable liposome brightness on quantifying lipid protein interactions using fluorescence correlation spectroscopy. *In: Biochimica et Biophysica Acta*, 1808:S. 2559–2568. DOI:10.1016/j.bbmem.2011.06.001.
- [177] WU, Libo, ZHANG, Jian & WATANABE, Wiwik, 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *In: Advanced Drug Delivery Reviews*, 63:S. 456–469. DOI: 10.1016/j.addr.2011.02.001.
- [178] TAHA, Murtada A., SINGH, Shree R. & DENNIS, Vida A., 2012. Biodegradable PLGA85/15 nanoparticles as a delivery vehicle for Chlamydia trachomatis recombinant MOMP-187 peptide. *In: Nanotechnology*, 23(325101):S. 1–13. DOI: 10.1088/0957-4484/23/32/325101.
- [179] GÜNTER, Elena A. et al., 2014. Swelling and morphology of calcium pectinate gel beads obtained from *Silene vulgaris* callus modified pectins. *In: Carbohydrate Polymers*, 103:S. 550–557. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.071>.
- [180] WU, Bi-cheng, DEGNER, Brian & MC CLEMENTS, David Julian, 2014. Soft matter strategies for controlling food texture: formation of hydrogel particles by biopolymer complex coacervation. *In: Journal of Physics: Condensed Matter*, 26(464104):S. 1–12. DOI: 10.1088/0953-8984/26/46/464104.
- [181] MÜTZE, Jörg et al., 2012. Excitation Spectra and Brightness Optimization of Two-Photon Excited Probes. *In: Biophysical Journal*, 102:S. 934–944. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.056.
- [182] HÜBNER, Christian, 2018. Persönliches Gespräch. Lübeck, 14.03.2018.

- [183] VÁMOSI, György, 2016. EGFP oligomers as natural fluorescence and hydrodynamic standards. *In: Scientific Reports*, 6(33022):S. 1–12. DOI: 10.1038/srep33022.
- [184] SPONTON, Osvaldo E., PEREZ, Adrián A., CARRARA, Carlos & SANTIAGO, Liliana G., 2014. Effect of limited enzymatic hydrolysis on linoleic acid binding properties of β -lactoglobulin. *In: Food Chemistry*, 146:S. 577–582. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.089>.
- [185] MARCHESAN, Silvia et al., 2013. Self-assembly of ciprofloxacin and a tripeptide into an antimicrobial nanostructured hydrogel. *In: Biomaterials*, 34:S. 3678–3687. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.096>.
- [186] ZHOU, Cao et al., 2015. Waterborne Polyurethanes with Tunable Fluorescence and Room-Temperature Phosphorescence. *In: ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7:S. 17709–17216. DOI: 10.1021/acsami.5b04075.
- [187] HEINBOCKEL, Lena et al., 2015. Mechanism of Hb gamma-35-induced an increase in the activation of the human immune system by endotoxins. *In: Innate Immunity*, 21(3):S. 305–313. DOI: 10.1177/1753425914535957.
- [188] BEASLEY, DeAnna E. et al., 2015. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *In: Plos One*, 0134116:S. 1–12. DOI:10.1371.
- [189] SOPHOCLEOUS, Andreas M. et al., 2013. The nature of peptide Interactions with acid eng-group PLGA and facile adequos-based microencapsulation of therapeutic Peptides. *In: Journal of Controlled Release*, 172:S. 662–670. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.295>.
- [190] GHAFFARIAN, Rasa et al., 2016. Chitosan-Alginate Microcapsules Provide Gastric Protection and Intestinal Release of ICAM-1-Targeting Nanocarriers, Enabling GI Targeting In Vivo. *In : Advanced Functional Materials*, 26:S. 3382–3393. DOI: 10.1002/adfm.201600084.
- [191] AZEVEDO, Maria A., BOURBON, Ana I., VICENTE, António A. & CERQUEIRA, Miguel A. Cerqueira, 2014. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, 71:S. 141–146. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036>.
- [192] HUANG, Yuanrui et al. 2013. A novel plug controlled colon specific pulsatile capsule with tablet of curcumin loaded SMEDDS. *In: Carbohydrate Polymers*, 92:S. 2218–2223. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.105>.
- [193] HASSAN, Mohammad M.& BHAGVANDAS, Meetal, 2017. Sustainable low liquor ratio dyeing of wool with acid dyes: Effect of auxiliaries on agglomeration of dye molecules in a dyebath and dyeing uniformity. *In: Journal of Cleaner Production*, 152:S. 464–473. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.139>.

- [194] DOERR, Allison, 2016. Single-particle cryo-electron microscopy, A brief overview of how to solve a macromolecular structure using single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM). *In: Nature Methods*, 13(1):23. DOI:10.1038/nmeth.3700.
- [195] CHIMPHANGO, A. F. A., ROSE, S. H., VAN ZYL, W. H. & GOERGENS, J. F., 2012. Production and characterisation of recombinant α -L-arabinofuranosidase for production of xylan hydrogels. *In: Applied Microbiology Biotechnology*, 95:S. 101–112. DOI 10.1007/s00253-012-4018-z.
- [196] PIRAS, Anna M. et al., 2015. Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity invitro against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *In: frontiers in Microbiology*, 6(372):S. 1–10. DOI: doi:10.3389/fmicb.2015.00372.
- [197] MA, Wenxue et al., 2012. PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses. *In: International Journal of Nanomedicine*, 7:S. 1475–1487. URL: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S29506>.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Bakterienzellwand Gram-positiver Bakterien	6
2	Bakterienzellwand Gram-positiver Bakterien	7
3	Endogene Infektion	8
4	Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Infektion, Sepsis und systemischer Entzündung	9
5	Prinzipieller Aufbau der chemischen Struktur von R1 O6 LPS aus <i>E.coli</i>	11
6	Chemische Struktur von Lipid A aus <i>E. coli</i>	12
7	Primärstruktur von Peptid 19-2.5	14
8	Ladung von Peptid 19-2.5 bei verschiedenen pH-Werten	15
9	Alginate Struktur	18
10	Pektin Struktur	19
11	Chitosan Struktur	19
12	Geräteaufbau ITC	23
13	Geräteaufbau DLS	25
14	Jablonski-Diagramm	26
15	Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	33
16	Schematischer Ablauf des Sandwich ELISAs	36
17	Chemische Struktur von Alexa-Fluor 488 C ₅ Maleimide	45
18	Die HPLC	51
19	Triton X-100	58
20	Untersuchung des Peptids in Wasser und 0,9 % Natriumchlorid-Lösung auf Veränderung der Primärstruktur	62
21	Bindungsstöchiometrie der Pektin-Peptid-Komplexe mittels Trennung über eine C ₁₈ -Säule mit anschließender Fluoreszenzdetektion	67
22	FCS-Messungen der Alginate-Peptid-Komplexe	68
23	Anzahl der Teilchen im Fokus der Alginate-Peptid-Komplexe	70
24	Diffusionszeit der Alginate-Peptid-Komplexe	71
25	Hydrodynamischer Radius der Alginate-Peptid-Komplexe	71
26	FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe	72
27	FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe vergrößert	73
28	Anzahl der Teilchen im Fokus der Pektin-Peptid-Komplexe	74
29	Diffusionszeit der Pektin-Peptid-Komplexe	75
30	Hydrodynamischer Radius der Pektin-Peptid-Komplexe	75
31	Anzahl der Alginat im Alginate-Peptid-Komplex	76
32	Anzahl der Pektine im Pektin-Peptid-Komplex	77
33	PCCS der Polysaccharid-Peptid-Komplexe in Wasser	82
34	Partikeldurchmesser in nm, bestimmt mit dem Zetasizer	84

35	AFM-Bilder der durch Sonifizieren hergestellten und gefriergetrockneten Alginat-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:100	86
36	AFM-Bilder der durch Sonifizieren hergestellten und bei 37 °C getrockneten Alginat-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:100	87
37	AFM-Bilder der bei 37 °C getrockneten Alginat-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:100 hergestellt mit O/W-Emulsionstechnik	88
38	AFM-Bilder der durch Sonifizieren hergestellten und bei 37°C getrockneten Pektin-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:30	89
39	AFM-Bilder der bei 37 °C getrockneten Pektin-Peptid-Probe im molaren Verhältnis von 1:30 hergestellt mit O/W-Emulsionstechnik	90
40	FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Komplexe 1:100, gemessen mit 256 Pixel	91
41	FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe 1:30, gemessen mit 256 Pixel . .	91
42	Mit der Konfokal-Mikroskopie aufgenommene Bilder der Partikel	93
43	ITC-Messung	102
44	FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:100	103
45	FCS-Messungen der Alginat-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:225	104
46	FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:30	104
47	FCS-Messungen der Pektin-Peptid-Komplexe mit dem Bindungsverhältnis 1:90	105
48	Triplett-Zeit der Alginat-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Peptid-Alexa:Peptid-Verhältnissen	106
49	Triplett-Zeit der Pektin-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Peptid-Alexa:Peptid-Verhältnissen	106
50	Photonen-Zähl-Histogramm der Alginat-Peptid-Komplexe mit verschiedenen Bindungsverhältnissen	107
51	Photonen-Zähl-Histogramm der Alginat-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:100 mit verschiedenen Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnissen	108
52	Photonen-Zähl-Histogramm der Alginat-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:225 mit verschiedenen Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnissen	108
53	Photonen-Zähl-Histogramm der Pektin-Peptid-Komplexe mit verschiedenen molaren Verhältnissen	109
54	Photonen-Zähl-Histogramm der Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:30 mit verschiedenen Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnissen .	109
55	Photonen-Zähl-Histogramm der Pektin-Peptid-Komplexe mit einem Bindungsverhältnis von 1:90 mit verschiedenen Peptid-Alexa zu Peptid Verhältnissen .	110
56	Fluoreszenzlebensdauer Alexa-Farbstoff gelöst in Wasser	112
57	Fluoreszenzlebensdauer Alginat:Peptid-Alexa 1:50 gelöst in Wasser	112
58	Anisotropie-Messung Peptid-Alexa gelöst in Wasser	113
59	Anisotropie-Messung Pektin:Peptid-Alexa 1:30 gelöst in Wasser	114

60	LPS induzierte TNF- α -Konzentration der Alginat-Peptid-Komplexe	125
61	LPS induzierte TNF- α -Konzentration der Pektin-Peptid-Komplexe	126
62	CD Spektrum Peptid 19-2.5 in Wasser	160
63	CD Spektrum Peptid 19-2.5 in 0,9 %(w/v) NaCl-Lösung	160
64	CD-Spektren des Peptids in Phosphat-Puffer pH = 7,0 unter verschiedenen Bedingungen	161

9 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Chemikalien	37
2	Verwendete Geräte	39
3	Verwendete Materialien	40
4	Tris-Puffer für Peptid-Labeling mit Alexa-Fluor 488	41
5	Paley-Puffer für GPC	41
6	Acetat-Puffer für GPC	42
7	Tris-Puffer für ITC-Messungen	42
8	Citrat-Puffer für pH = 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 und 6,0	42
9	Phosphat-Puffer für pH = 7,0	42
10	Tris-Puffer für pH = 8,0 und 9,0	42
11	Glycin-Puffer für pH = 10,0; 11,0; 12,0 und 13,0	42
12	Simulierter Magen-Puffer	43
13	Simulierter Pankreas-Puffer	43
14	Simulierter Darm-Puffer	43
15	Peptid Nachweis Methode	50
16	Peptid-Fragment und Aminosäuren Nachweis Methode	50
17	Konzentrationen der FCS-Proben der Alginat-Peptid-Partikel	54
18	Konzentrationen der FCS-Proben der Pektin-Peptid-Partikel	55
19	Ergebnisse der Polysaccharid Charakterisierung	61
20	Mittelwerte aus drei Alginat-Peptid-Partikel FCS-Messungen	69
21	Mittelwerte aus drei Pektin-Peptid-Partikel FCS-Messungen	74
22	Mit der PCCS ermittelte Partikeldurchmesser der Polysaccharid-Peptid-Komplexe	83
23	Partikeldurchmesser der Polysaccharid-Peptid-Komplexe, bestimmt mit dynamischer Lichtstreuung	84
24	Auswertung der sFCS-Messung zur Größenbestimmung der Polysaccharid-Peptid-Komplexe	92
25	Größenbestimmung durch konfokale Mikroskopie	94
26	Überblick der mit verschiedenen Methoden ermittelten Partikelgrößen	95
27	Auswertung der Polysaccharid-Peptid-Fluoreszenzspektren	100
28	ITC Messwerte Alginat-Peptid-Wechselwirkung	101
29	ITC Messwerte Pektin-Peptid-Wechselwirkungen	101
30	Auswertung FCS-Messung Polysaccharid-Peptid-Partikel mit verschiedenen Peptid-Alexa zu Peptid-Verhältnissen	105
31	Mittelwerte der Fluoreszenzlebensdauer-Messungen	111
32	Mittelwerte der gemessenen Anisotropie	114
33	Enzymatisch freigesetztes Peptid aus den Polysaccharid-Peptid-Komplexen .	121
34	Pipettierschema für FCS-Probenvorbereitung der Alginat-Peptid-Partikel . .	158
35	Pipettierschema für FCS-Probenvorbereitung der Pektin-Peptid-Partikel . . .	158

36	Pipettierschema für FCS-Probenvorbereitung der Polysaccharid-Peptid-Partikel	159
37	Zusammenfassung der CD Ergebnisse für die Peptid-Sekundärstruktur von Peptid 19-2.5	162

10 Anhang

10.1 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie-Probenvorbereitung

Tabelle 34: Pipettierschema für die FCS-Probenvorbereitung der Alginat-Peptid-Partikel.

Molares Verhältnis [Alginat] : [Peptid]	V(Alginat) /μl	V(Peptid-Alexa) /μl	V(Peptid) /μl	V(Wasser) /μl
1:5	40	11 (1:10)	18 (1:10)	131
1:10	40	22 (1:10)	36 (1:10)	102
1:25	40	5,6	9,0	145
1:50	40	11	18	131
1:75	40	17	27	116
1:100	40	22	36	102
1:125	40	28	45	87
1:150	40	33	54	73
1:175	40	39	63	58
1:200	40	44	72	44
1:225	40	50	81	29
1:250	40	56	90	14

Tabelle 35: Pipettierschema für die FCS-Probenvorbereitung der Pektin-Peptid-Partikel.

Molares Verhältnis [Pektin] : [Peptid]	V(Pektin) /μl	V(Peptid-Alexa) /μl	V(Peptid) /μl	V(Wasser) /μl
1:5	40	1,1	1,8	157
1:10	40	2,2	3,6	154
1:15	40	3,3	5,4	151
1:30	40	6,7	10,8	143
1:45	40	10,0	16,2	134
1:60	40	13,3	21,6	125
1:75	40	16,7	27,0	116
1:90	40	20,0	32,4	108
1:105	40	23,3	37,8	98,9
1:120	40	26,7	43,2	90,1
1:135	40	30,0	48,6	81,4
1:150	40	33,3	54,0	72,7

Tabelle 36: Pipettierschema für die FCS-Probenvorbereitung der Polysaccharid-Peptid-Partikel. Die Abkürzung „AP“ steht für die Alginat-Peptid-Komplexe, während die Abkürzung „PP“ für die Pektin-Peptid-Komplexe steht.

Molares Verhältnis [Polysaccharid] : [Peptid]	V(Polysaccharid) /μl	V(Peptid-Alexa) /μl	V(Peptid) /μl	V(Wasser) /μl
AP 1:100 mit 1:20	40	8,0	38	114
AP 1:100 mit 1:50	40	3,2	39	118
AP 1:100 mit 1:100	40	1,6	40	119
AP 1:225 mit 1:20	40	18	86	57
AP 1:225 mit 1:50	40	7,2	88	65
AP 1:225 mit 1:100	40	3,6	89	67
PP 1:30 mit 1:20	40	24 (1:10)	11,4	125
PP 1:30 mit 1:50	40	9,6 (1:10)	11,8	139
PP 1:30 mit 1:100	40	4,8 (1:10)	11,9	143
PP 1:90 mit 1:20	40	72 (1:10)	34	54
PP 1:90 mit 1:50	40	29 (1:10)	35	96
PP 1:90 mit 1:100	40	14 (1:10)	36	107

10.2 Auswertung der Circular Dichroismus Spektroskopie

Gegenüberstellung der CD Spektren von Peptid 19-2.5 gelöst in Wasser und 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung.

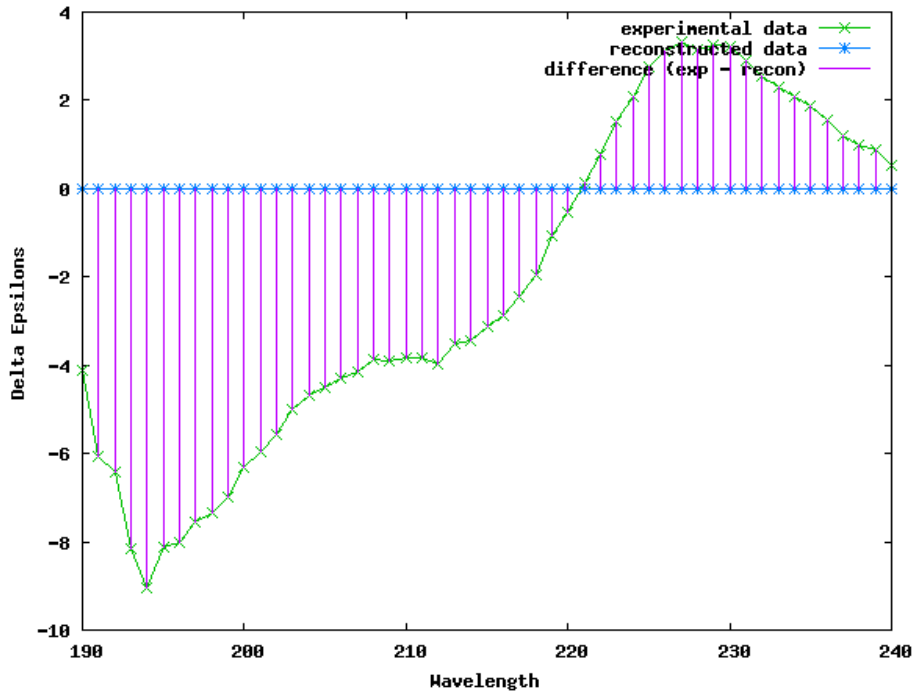


Abbildung 62: CD Spektrum Peptid 19-2.5 in Wasser. Ausgewertet über DichroWeb [162]. Dieses CD-Spektrum lässt sich keiner Sekundärstruktur zuordnen.

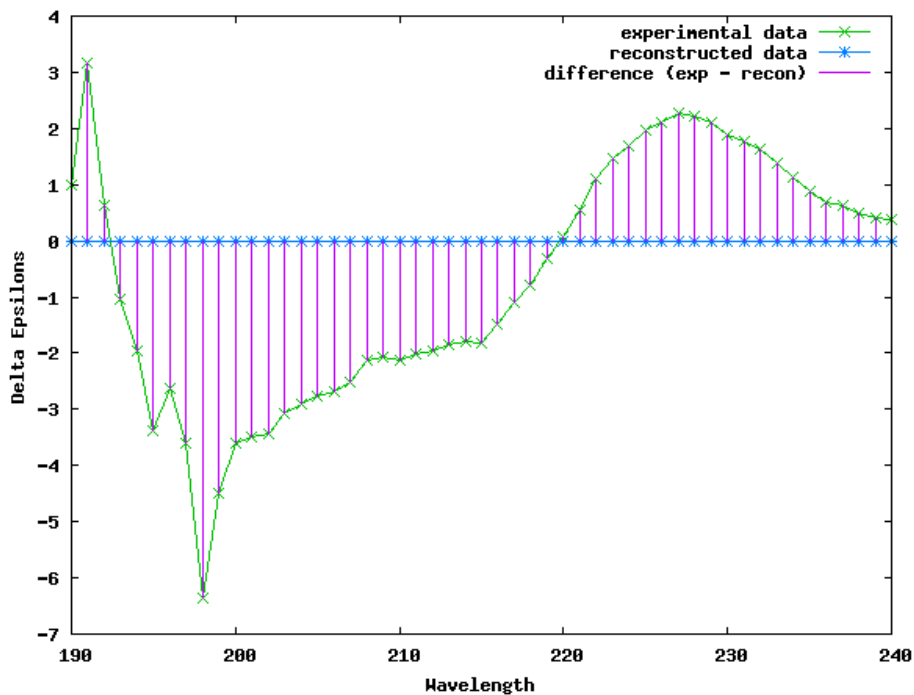


Abbildung 63: CD Spektrum Peptid 19-2.5 in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung. Ausgewertet über DichroWeb [162]. Dieses CD-Spektrum lässt sich keiner Sekundärstruktur zuordnen.

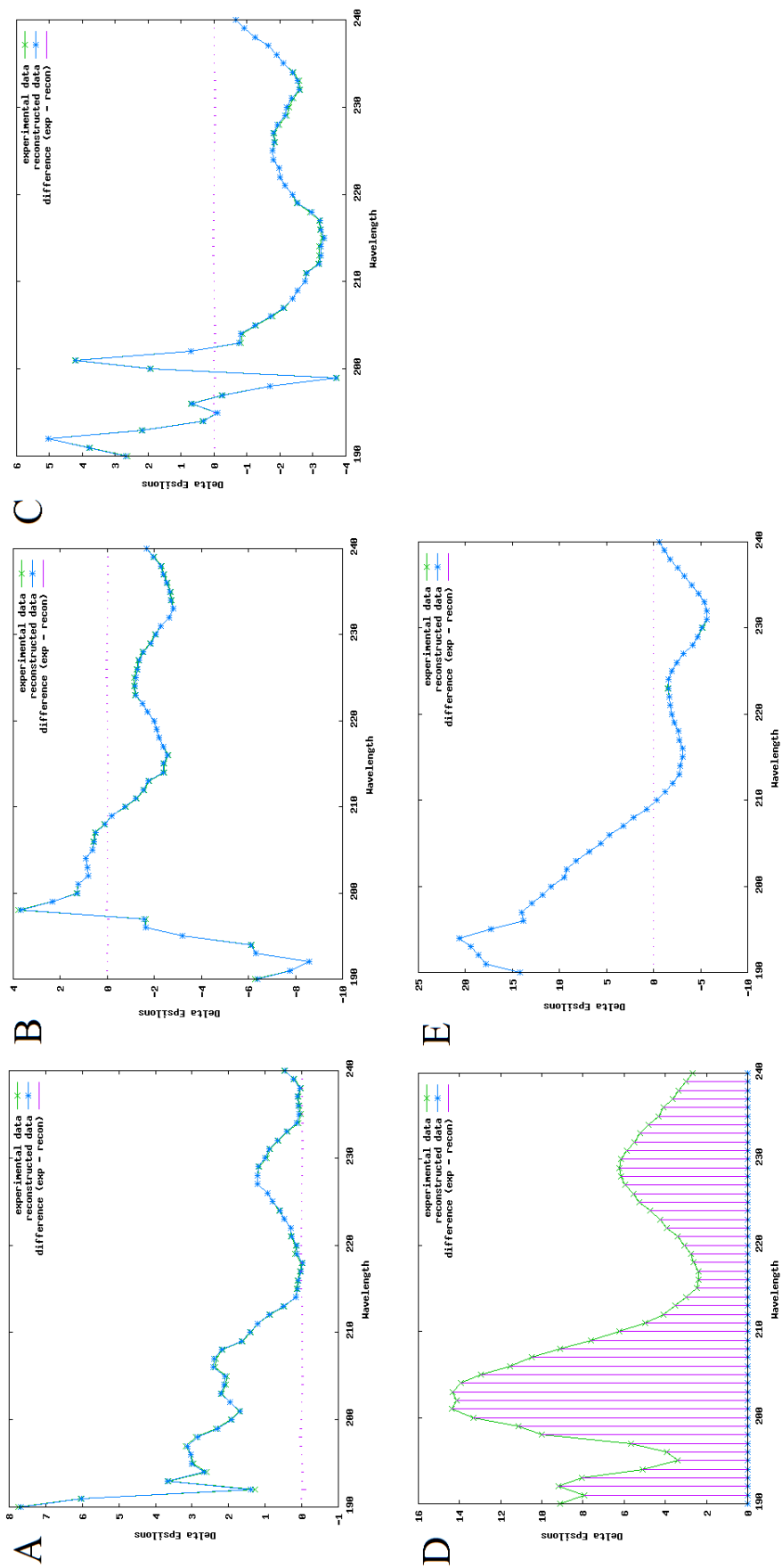


Abbildung 64: CD-Spektren des Peptids in Phosphat-Puffer pH = 7,0 unter verschiedenen Bedingungen. **A:** Peptid 19-2.5, **B:** Peptid 19-2.5 mit 150 mM NaCl **C:** Peptid 19-2.5 mit 1 M NaCl, **D:** Alginate-Peptid-Komplex und **E:** Pektin-Peptid-Komplex. Ausgewertet über DichroWeb [162].

Tabelle 37: Zusammenfassung der CD Ergebnisse für die Peptid-Sekundärstruktur von Peptid 19-2.5. Ausgewertet über DichroWeb [162].
 Legende: freie Felder $\hat{=}$ nicht gemessen, - $\hat{=}$ Spektrum kann keiner Sekundärstruktur zugeordnet werden.

pH- Wert	Peptid 19-2.5			Peptid 19-2.5 + 150 mM NaCl			Peptid + 1M NaCl			Alginat-Peptid- Komplex			Pektin-Peptid- Komplex		
	α -H.	β -S.	r. coil	α -H.	β -S.	r. coil	α -H.	β -S.	r. coil	α -H.	β -S.	r. coil	α -H.	β -S.	r. coil
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	0,08	0,51	0,28	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	0,05	0,50	0,29	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	0,39	0,31	0,21	-	-	-	-	-	-	0,60	0,15	0,10
7	0,09	0,45	0,35	0,14	0,36	0,30	0,01	0,41	0,31	-	-	-	0,26	0,37	0,23
8	-	-	-	-	-	-	0,30	0,37	0,19	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	0,24	0,37	0,20	0,22	0,36	0,26	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	0,58	0,18	0,20	0,56	0,21	0,17	-	-	-	-	-	-
11	0,54	0,23	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,42	0,31	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	0,23	0,44	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei der Sekundärstrukturaufklärung mittels CD-Spektroskopie um eine abschätzende Methode handelt. Somit geben die mit dieser Methode ermittelten strukturellen Anteile lediglich eine Abschätzung, aber keine definitiven Werte für die Strukturelemente ab.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. U. Englisch, dem Leiter des Centrums für industrielle Biotechnologie (CIB) der FH Lübeck für die Bereitstellung des interessanten Themas und meines Arbeitsplatzes. Die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und die Bereicherung dieser mit inspirierenden Fragestellungen, aus denen interessante Diskussionen folgten. An dieser Stelle möchte ich ihm auch für die Förderung meiner fachlichen, beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung danken.

Prof. Dr. C. G. Hübner danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft und das Begleiten meiner Dissertation. Besonders möchte ich mich auch für die Ermöglichung der Durchführung der Experimente in der Physik der Universität zu Lübeck und die anschließenden inspirierenden Diskussionen bedanken.

Ohne die Bereitstellung des Peptids 19-2.5 von Prof. Dr. K. Brandenburg, aus dem Forschungszentrum Borstel, wäre die Durchführung meiner Dissertation nicht möglich gewesen. Dafür danke ich ihm ebenso, wie für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung der Literatur.

Aus der Arbeitsgruppe der Physik der Universität zu Lübeck danke ich Dr. V. Hirschfeld, Lars Kreuzburg und Jan Pavlita für die Unterstützung bei den FCS-Experimenten, sowie Dr. Y.-H. Song für die Möglichkeit CD-Messungen durchzuführen. Ebenso wie für die Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Hinweise im Bezug auf meine Arbeit.

Aus dem Forschungszentrum Borstel möchte ich Dr. W.-A. Correa-Vargas und Dr. L. Heinbockel für die Begleitung der ITC-Messungen und Vorbereitung der TNF- α -ELISA danken. Sabrina Groth möchte ich für die Durchführung der TNF- α -ELISA danken. Dr. C. Nehls danke ich für die Durchführung der AFM-Messungen und die Begleitung der Partikelgrößenbestimmung am Zetasizer.

Für die Ermöglichung der Durchführung von Partikelgrößenbestimmungen mittels PCS im Institut für Medizintechnik der Universität zu Lübeck danke ich Dr. K. Lüdtke-Buzug.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche und familiäre Arbeitsatmosphäre. Ulrike Scheffé danke ich für die Bereitstellung des Zuckerrüben Pektins und Jean Pascal Knocke für die Bereitstellung des Alginats. Für die Charakterisierung dieser Polysaccharide mittels Gelpermeationschromatographie danke ich Dr. R. Moll, ebenso wie für die fachliche Unterstützung und die Diskussionsbereitschaft. Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Mitstreitern Ann-Katrin Lehmann, Johanna Gasser und Christian Grünewald für die Unterstützung in jeglicher Art, die vielen Diskussionen und Anmerkungen zu meiner Arbeit bedanken. Ebenso danke ich Eva Ziehm und Meike Mohr-Pape für ihre Fähigkeit zuzuhören und anschließend Fragen zu stellen, die mich auf dem Weg meiner Dissertation

weiterbrachten, sowie die Beratung bei Problemen mit analytischen Systemen.

Mein größter Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die uneingeschränkte Unterstützung auf meinem Weg und dafür, dass sie mir bei meiner Dissertation so oft den Rücken gestärkt haben.

Mein liebster Dank gilt meinem Mann, der mich auf meinem Weg immer unterstützt und mir sowohl Ruhe, als auch Kraft für die Erstellung dieser Arbeit gab.