

# Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der antimikrobiellen Peptide MSI-103 und Temporin A

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin Deniz Tiltak

aus Kaiserslautern

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2009



„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei (1564-1642)

## **Danksagung**

Prof. Dr. Anne S. Ulrich danke ich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit alle zur Verfügung stehenden Ressourcen nutzen zu können.

Dr. Erik Strandberg danke ich für die kompetente Betreuung und die fortwährende Unterstützung.

Dr. Parvesh Wadhvani danke ich für die konstruktiven Diskussionen und die stetige Hilfsbereitschaft.

Dr. Jochen Bürck danke ich für die Hilfe bei den CD- und OCD-spektroskopischen Messungen und Auswertungen.

Dr. Marina Berditsch danke ich für die Einführung in die Durchführung und Auswertung antimikrobieller Tests.

Dr. Johannes Reichert danke ich für die Einführung in die Herstellung multilamellarer Lipidvesikel.

Dr. Sonja Müller und Katja Koch (geb. Zimmermann) danke ich für die Zusammenarbeit als Assistentinnen des Biochemie-Praktikums im Bereich Genetik/Gentechnik.

Prof. Dr. Maria-Luisa Mangoni und ihrem Arbeitskreis an der Universität in Rom danke ich für die fruchtbare Kooperation in dem Temporin A-Projekt.

Ganz besonderer Dank gebührt dem Menschen, der mich in jederlei Hinsicht immerwährend unterstützt – meinem Vater, Süleyman Tiltak.

Die vorliegende Dissertation ist ihm gewidmet!

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ala-d <sub>3</sub>	Dreifach deuteriertes Alanin
AMP	Antimikrobielles Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
C	Kohlenstoff
<sup>13</sup> C	Kohlenstoffisotop 13
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	Engl.: Circular dichroism = Zirkulardichroismus
CF <sub>3</sub> -Bpg	Trifluormethylbicyclopentylglycin
CF <sub>3</sub> -Phg	Trifluormethylphenylglycin
CHOL	Cholesterin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
-COOH	Carboxylgruppe
cos	Kosinus
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLPC	Dilauroylglycerophosphatidylcholin
DMF	Dimethylformamid
DMoPC	Dimyristoleoylglycerophosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	Dioleoylglycerophosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerin
<sup>19</sup> F	Fluorisotop 19
FHK	Fraktionale Hemmkonzentration
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
<sup>1</sup> H	Proton
<sup>2</sup> H	Deuterium
HBTU	Benzotriazolyl- tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HCL	Salzsäure
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Engl.: High performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LB	Luria-Bertani
LC/MS	Engl.: Liquid chromatography/mass spectrometry = Flüssigchromatographie/Massenspektroskopie
MeOH	Methanol
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MHK	Minimale Hemmkonzentration
N	Stickstoff
<sup>15</sup> N	Stickstoffisotop 15
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
-NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
NMP	Methylpyrrolidon
NMR	Engl.: Nuclear magnetic resonance = Kernresonanzspektroskopie
OCD	Engl.: Oriented Circular dichroism = Orientierter Zirkulardichroismus
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<sup>31</sup> P	Phosphorisotop 31
P/L	Peptid zu Lipid
POPC	Palmitoyloleoylglycerophosphatidylcholin
POPE	Palmitoyloleoylglycerophosphatidylethanolamin
POPG	Palmitoyloleoylglycerophosphatidylglycerin
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TIS	Triisopropylsilan
wt	Wildtyp
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ, Δ	Delta

$\delta_{\parallel}$	„Delta parallel“
$\delta_{\perp}$	„Delta orthogonal“
$\hbar$	„h quer“
$\theta$	Theta
$\mu$	My
$\nu$	Ny
$\pi$	Pi
$\rho$	Rho
$\tau$	Tau
$\chi$	Chi
$\omega$	Omega

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.2. Methoden	20
4. Funktionelle Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides MSI-103 und weiterer kationischer, $\alpha$ -helikaler Peptide	38
4.1. Ergebnisse	38
4.2. Diskussion	42
5. Strukturelle Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides MSI-103	46
5.1. Ergebnisse	47
5.2. Diskussion	74
6. Strukturelle Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides Temporin A	82
6.1. Ergebnisse	82
6.2. Diskussion	94
7. Zusammenfassung	97
8. Literatur	99
9. Lebenslauf	107



## 1. Einleitung

Die Pest – der schwarze Tod – hat die Menschheit im Laufe der Geschichte immer wieder heimgesucht und durch epidemieartige Ausbreitungen ganze Bevölkerungen drastisch dezimiert. Dank der Einführung antibiotischer Therapien hat die Infektionskrankheit viel von ihrem Schrecken verloren und kann heute geheilt werden. Doch nach wie vor machen Infektionskrankheiten mit weltweit jährlich 17 Millionen Todesopfern ein Drittel aller krankheitsbedingten Todesfälle aus (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, 2006).

In den vergangenen Jahren haben viele Infektionserreger resistente Bakterienstämme gebildet und können mit den gängigen Antibiotika nicht mehr bekämpft werden. Häufige Ursachen sind die unsachgemäße Einnahme sowie falsche Dosierung und Anwendungsdauer von Antibiotika (Viamedica-Stiftung, 2008). Die Entwicklung neuartiger Antibiotika, die weniger anfällig gegenüber der Bildung bakterieller Resistenzen sind, ist daher von dringender medizinischer Notwendigkeit. In diesem Zusammenhang wurde eine der evolutionär ältesten Komponenten des angeborenen Immunsystems wiederentdeckt – die antimikrobiellen Peptide. Die meisten antimikrobiellen Peptide vernichten Bakterien durch Permeabilisierung und anschließender Zerstörung ihrer Membranen (Gallo, 1998; Ganz, 1999; Huang, 2000; Toke, 2005). Da ihre Wirkung ohne Bindung an spezifische Rezeptoren zustande kommt, ist die Bildung resistenter Keime unwahrscheinlich (Pazdzierny, 2003).

Antimikrobielle Peptide gewinnen immer mehr an Bedeutung als potenzielle Antibiotika der Zukunft, was sich in der drastisch zunehmenden Anzahl an neu entdeckten antimikrobiellen Peptiden und Veröffentlichungen widerspiegelt.

## 1.1. Antimikrobielle Peptide

### 1.1.1. Allgemeine Eigenschaften

Antimikrobielle Peptide sind kurze (10 bis 50 Aminosäuren), kationische, amphiphile Peptide und kommen in nahezu jeder Lebensform als eine der wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems vor (Hancock, 2006; Kamysz, 2003). Sie variieren erheblich in Länge, Sequenz und Struktur (Hancock, 2006; Toke, 2005). Antimikrobielle Peptide können in vier Gruppen unterteilt werden: a) Peptide mit  $\alpha$ -helicaler Struktur (z.B. Cecropine, Magainine), b) Peptide mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (z.B. Defensine, Protegrine), c) Schleife bildende Peptide (z.B. Brevinine, Tigerinine) und d) arginin-, glycin-, histidin-, prolin- oder tryptophanreiche Peptide (z.B. Histatine, Indolicidine) (Gallo, 1998; Ganz, 1999; Hancock, 2006).

Bisher wurden über 800 antimikrobielle Peptide entdeckt und sind auf diversen Online-Datenbanken wie zum Beispiel <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html> oder <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> gelistet (Kamysz, 2003; Toke, 2005). Einige geläufige antimikrobielle Peptide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tab. 1.1:** Einige geläufige antimikrobielle Peptide, ihre Aminosäuresequenz und Herkunft.

AMP	Aminosäuresequenz	Herkunft
Brevinin 1	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC	<i>Rana brevipoda</i>
Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	<i>Hyalophora cecropia</i>
$\alpha$ -Defensin 1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	<i>Homo sapiens</i>
Histatin 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY	<i>Homo sapiens</i>
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	<i>Bos taurus</i>
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	<i>Xenopus laevis</i>
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>	<i>Xenopus laevis</i>
Protegrin 1	RGGRLCYRRRFCVVCVGR	<i>Sus scrofa</i>
Temporin A	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana temporaria</i>
Tigerinin 1	FCTMIPIRCY	<i>Rana tigerina</i>

Die Aminosäuresequenz antimikrobieller Peptide ist im Genom des entsprechenden Organismus kodiert (Hancock, 2006; Toke, 2005). Die Transkription der jeweiligen Gene wird nach dem Eindringen von Pathogenen initiiert (Toke, 2005). Durch anschließende posttranslationale Modifikationen – im Allgemeinen die proteolytische Spaltung, die Disulfidbrückenbildung sowie in seltenen Fällen die Amidierung des C-Terminus und die Glykosylierung – werden die Vorläuferproteine aktiviert (Hancock, 2006; Toke, 2005).

Neben den oben beschriebenen ribosomalen antimikrobiellen Peptiden, die in nahezu jeder Lebensform vorkommen, gibt es auch nichtribosomale antimikrobielle Peptide, die nur von Mikroorganismen synthetisiert werden (Hancock, 1999; Hancock, 2006). Ihre Synthese erfolgt an multifunktionalen Enzymkomplexen, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (Hancock, 1999; Hancock, 2006). Nichtribosomale antimikrobielle Peptide weisen eine große strukturelle Vielfalt auf: Sie können nichtproteinogene Aminosäuren enthalten, zu einem heterozyklischen Ring geschlossen sowie acyliert oder glykosyliert sein (Hancock, 1999; Hancock, 2006). In der folgenden Tabelle sind einige nichtribosomale antimikrobielle Peptide aufgeführt.

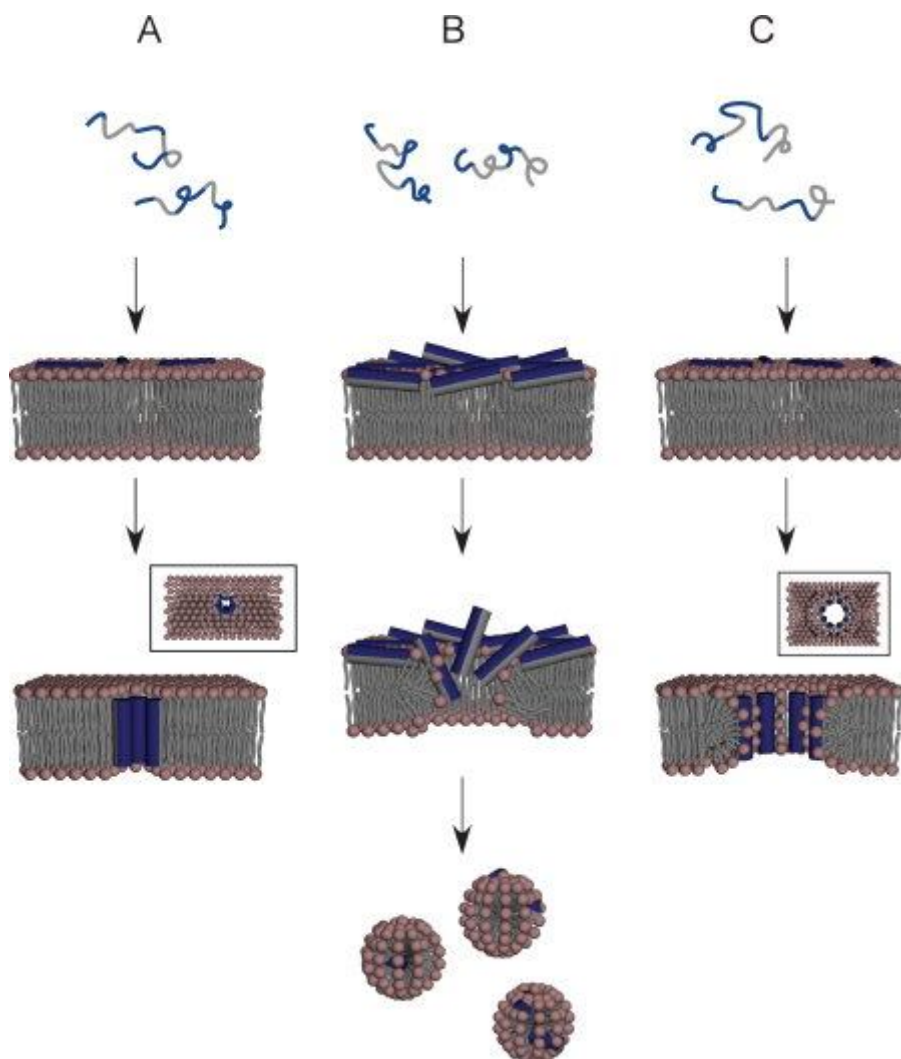
**Tab. 1.2:** Einige nichtribosomale antimikrobielle Peptide, ihre Aminosäuresequenz und Herkunft. Aminosäuren in Klammern sind zu einem Ring geschlossen. Aminosäuren mit vorne hochgestelltem D liegen als D-Enantiomer vor. B= Diaminobutyrat.

AMP	Aminosäuresequenz	Herkunft
Bacitracin A	(IC) <sup>D</sup> LEI(K <sup>D</sup> OI <sup>D</sup> FH <sup>D</sup> DN)-NH <sub>2</sub>	<i>Bacillus licheniformis</i>
Gramicidin S	(VOL <sup>D</sup> FP) <sub>2</sub>	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxin B	Isooctanoyl-BTB(BB <sup>D</sup> FLBBT)	<i>Bacillus polymyxa</i>

### 1.1.2. Wirkmechanismus

Antimikrobielle Peptide können antibakteriell, antifungal sowie antiviral wirken (Hancock, 1999; Kamysz, 2003). Ihr genauer Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt. Allerdings wird ihr kationischer amphiphiler Charakter mit ihrer Wirkungsweise in Verbindung gesetzt. Die positiv geladenen antimikrobiellen Peptide interagieren in einem *ersten Schritt* mit der negativ geladenen Membran – bei grampositiven Bakterien durch Teichonsäuren bzw. Lipoteichonsäuren, bei gramnegativen Bakterien durch Lipopolysaccharid und bei Pilzen durch Proteoglykane – des Pathogens (Hancock, 2006; Huang, 2000). Für die Interaktion antimikrobieller Peptide mit der äußeren Membran gramnegativer Bakterien wurde ein Modellmechanismus aufgestellt (Hancock, 1999). Danach verdrängen die eine hohe Affinität zu Lipopolysaccharid aufweisenden, kationischen antimikrobiellen Peptide membranstabilisierende, zweiwertige Kationen wie Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> von ihren Bindungsstellen in der Lipopolysaccharidschicht der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und zerstören sie somit (Hancock, 1999). In einem *zweiten Schritt* führen die antimikrobiellen Peptide schließlich zur Permeabilisierung der Membran (Hancock, 2006; Huang, 2000). Drei wesentliche Modellmechanismen der Membranpermeabilisierung wurden aufgestellt: a) Barrel-Stave-Modell, b) Carpet-Modell und c) Toroidal-Modell (Huang, 2004; Oren, 1998; Shai, 1999; Shai, 2002; Toke, 2005).

Nach dem *Barrel-Stave-Modell* aggregieren die an die Membranoberfläche gebundenen Peptide und insertieren in der Art und Weise in die Lipiddoppelschicht, dass die hydrophoben Bereiche des Peptides mit den Acylketten der Phospholipide interagieren und die hydrophilen Bereiche des Peptides das Innere der Pore bilden (Abbildung 1.1 A) (Oren, 1998). Nach dem *Carpet-Modell* orientieren sich die Peptide parallel zur Membranoberfläche und bilden eine großflächige Schicht, die zunächst zu einer Spannung zwischen den beiden Lipidschichten und schließlich zur Zerstörung der Lipiddoppelschicht führt (Abbildung 1.1 B) (Oren, 1998). Nach dem *Toroidal-Modell* aggregieren die an die Membranoberfläche gebundenen Peptide und bewirken, dass sich die beiden Lipidschichten kontinuierlich durch die Pore von einer Seite der Lipiddoppelschicht zur anderen zu krümmen, so dass das Poreninnere von den insertierten Peptiden und den Lipidkopfgruppen gebildet wird (Abbildung 1.1 C) (Huang, 2004).



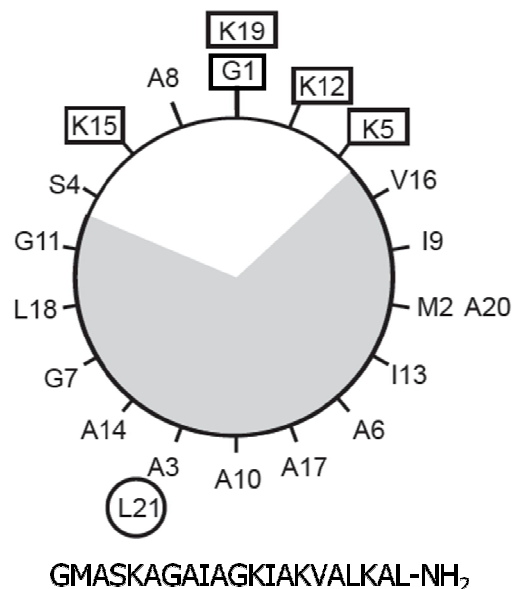
**Abb. 1.1:** A) Barrel-Stave-, B) Carpet- und C) Toroidal-Modell (Toke, 2005). Die Peptide sind als Zylinder dargestellt – hydrophile Bereiche sind blau, hydrophobe Bereiche grau koloriert. Draufsichten sind eingerahmt.

Einige antimikrobielle Peptide üben ihre Wirkung ohne Membranpermeabilisierung aus. Pathogene Pilze werden zum Beispiel von Defensinen und Histatinen durch nichtlytische Freisetzung zellulären ATPs, welches daraufhin an putative purinergische Rezeptoren bindet und zytotoxische Zellwege aktiviert, zerstört (Edgerton, 2000). Behüllte Viren werden durch das Binden von Defensinen oder synthetischer Analoga von Magainin an die Virushülle unschädlich gemacht (Daher, 1986; Aboudy, 1994).

## 1.2. Das antimikrobielle Peptid PGLa und sein Analogon MSI-103

### 1.2.1. PGLa

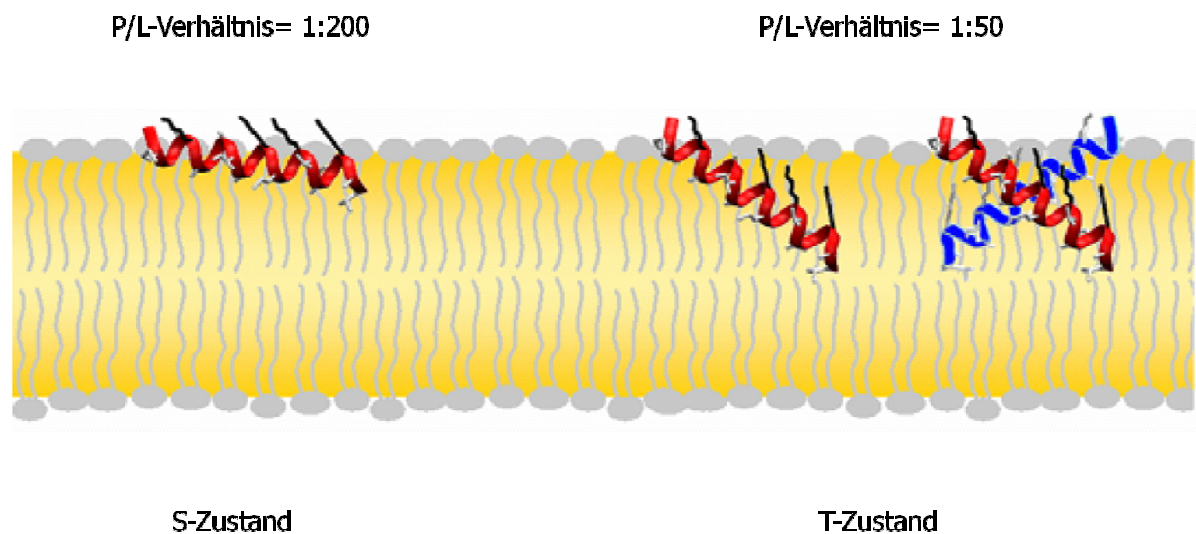
Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid (PGLa) ist ein antimikrobielles Peptid, das ursprünglich in der Hautsekretion des Afrikanischen Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, später außerdem in seinem Gastrointestinaltrakt gefunden wurde (Andreu, 1985; Hoffmann, 1983; Moore, 1991). Es ist linear, 21 Aminosäuren lang, basisch, fünffach positiv geladen und enthält einen hohen Anteil an hydrophoben Resten sowie an Alanin. PGLa liegt in wässriger Lösung ungefaltet vor und nimmt nach der Bindung an Lipidmembranen eine amphiphile,  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur an (Bechinger, 1998; Wieprecht, 2000). In der folgenden Abbildung sind die Helical-Wheel-Projektion und Aminosäuresequenz von PGLa dargestellt.



**Abb. 1.2:** Helical-Wheel-Projektion und Aminosäuresequenz von PGLa. Der hydrophobe Bereich der Helix ist grau schattiert, kationische Reste sind eingetrahmt, der amidierte C-Terminus ist eingekreist.

PGLa wird durch die proteolytische Spaltung des 24 Aminosäuren langen Vorläufers PYLa, welches seinerseits von einem 64 Aminosäuren langen Polypeptid stammt, gebildet und in den sekretorischen Vesikeln der Granulardrüsen gespeichert (Gibson, 1986; Giovannini, 1987). In der Haut des *Xenopus laevis* wird PGLa besonders in einer Stresssituation sezerniert, was auf eine Abwehrfunktion des Peptides deutet (Giovannini, 1987). Im Magen desselben wird eine aktive Kontrolle des Bakterienwachstums durch PGLa vermutet – was insofern sinnvoll ist, da der Afrikanische Krallenfrosch seine Beute unversehrt verschluckt und bis zur Verdauung einige Zeit im Magen lagert (Moore, 1991).

PGLa besitzt ein sehr breites antimikrobielles Wirkspektrum und ist dabei nur geringfügig hämolytisch aktiv (Soravia, 1988). Seine Wirkungsweise beruht vermutlich auf der Bildung transmembraner Poren (Soravia, 1988). Anhand Festkörper-NMR-spektroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PGLa eine konzentrationsabhängige Reorientierung in Modellmembranen erfährt (Abbildung 1.3) (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006).

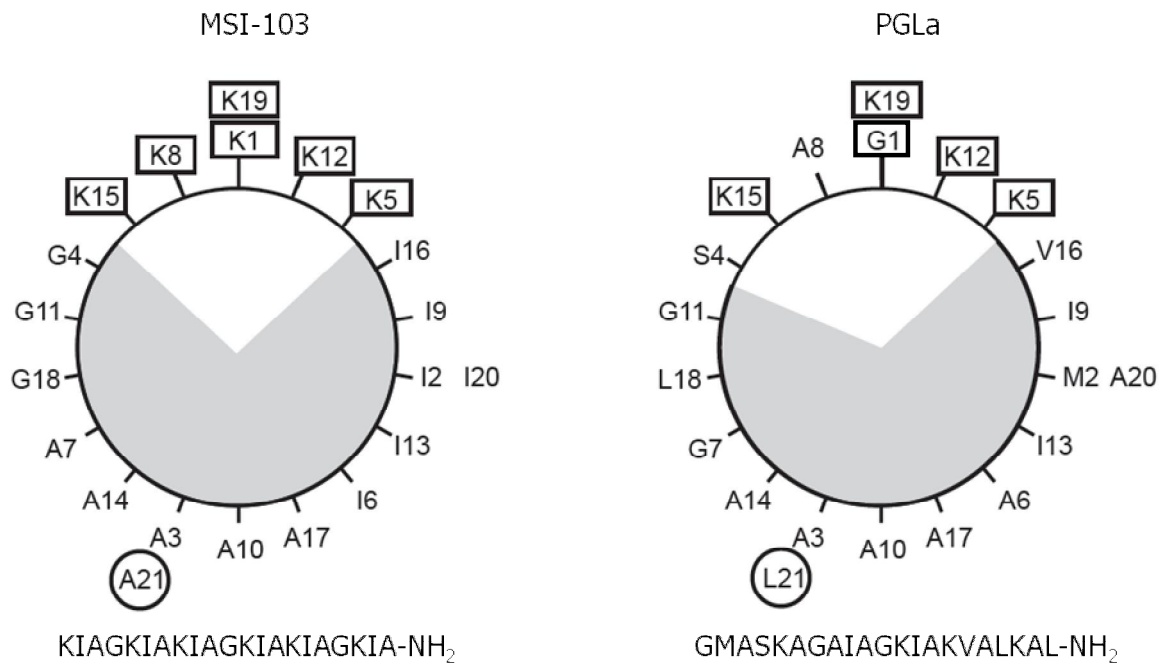


**Abb. 1.3:** Konzentrationsabhängige Reorientierung von PGLa in Modellmembranen (nach Strandberg, 2005). Der schräg inserierte T-Zustand wird auf eine Dimerisierung (blau) zurückgeführt (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006).

In Modellmembranen bestehend aus DMPC und DMPG in einem molaren Lipidverhältnis von 3 zu 1 erfährt PGLa bei einer Temperatur von 35°C mit dem Anstieg der Peptidkonzentration einen Wechsel aus dem sogenannten S-Zustand (aus dem Englischen: surface= oberflächlich) in den sogenannten T-Zustand (aus dem Englischen: tilted= geneigt) (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006). Dabei liegt PGLa bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 im S-Zustand vor, bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 im T-Zustand (Abbildung 1.3) (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006). Vermutlich liegt das antimikrobielle Peptid im S-Zustand als Monomer und im T-Zustand als Dimer vor (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006). Ein transmembraner Zustand von PGLa, der auf eine Porenbildung des Peptides deutet und somit Aufschluss über dessen Wirkmechanismus gibt, wurde unter diesen Bedingungen nicht entdeckt. Bei Temperaturen unterhalb der Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase des Membranlipides hingegen konnte ein solcher, sogenannter I-Zustand (aus dem Englischen: inserted= durchspannend) nachgewiesen werden (Afonin, 2008).

### **1.2.2. MSI-103**

MSI-103 (auch unter dem Namen K3 bekannt) ist ein antimikrobielles Peptid, das künstlich hergestellt wurde und auf der Aminosäuresequenz des natürlich vorkommenden PGLa basiert (Blazyk, 2001; Maloy, 1995). Ebenso wie PGLa ist auch MSI-103 linear, 21 Aminosäuren lang, basisch, enthält einen hohen Anteil an hydrophoben Resten und nimmt nach der Bindung an Lipidmembranen eine amphiphile,  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur an (Blazyk, 2001; Maloy, 1995; Toke, 2004 a). Der Hauptunterschied zwischen den beiden Peptiden liegt darin, dass in der Aminosäuresequenz von PGLa die beiden Aminosäuren Glycin-1 und Alanin-8 durch jeweils ein geladenes Lysin ersetzt wurden – was dem MSI-103 zwei zusätzliche Ladungen verleiht und es somit amphiphiler macht als sein Vorgängerpeptid. Sowohl die Ladung als auch die Amphiphilie eines antimikrobiellen Peptides scheinen einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des Peptides zu haben (Maloy, 1995; Zelezetsky, 2005). In der folgenden Abbildung sind die Helical-Wheel-Projektion und die Aminosäuresequenz von MSI-103 und PGLa im Vergleich dargestellt.



**Abb. 1.4:** Helical-Wheel-Projektion und Aminosäuresequenz von MSI-103 und PGLa. Der hydrophobe Bereich der Helix ist jeweils grau schattiert, kationische Reste sind eingerahmt, der amidierte C-Terminus ist eingekreist.

Ursprünglich wurden – basierend auf der Aminosäuresequenz von PGLa – Peptide der heptameren Aminosäureabfolge (KxxxKxx)<sub>n</sub> synthetisiert und auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet (Blazyk, 2001; Maloy, 1995). Dabei zeigte das Peptid MSI-103 mit der Aminosäuresequenz (KIAGKIA)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> die höchste Aktivität (Blazyk, 2001; Maloy, 1995). Es wies im Vergleich zu PGLa eine vier bis acht Mal geringere minimale Hemmkonzentration gegen drei getestete Bakterienstämme auf, was einer vier bis acht Mal höheren antimikrobiellen Aktivität entspricht (Blazyk, 2001; Maloy, 1995). Allerdings wies MSI-103 auch eine höhere hämolytische Aktivität als PGLa auf (Tabelle 1.3) (Blazyk, 2001; Maloy, 1995).

**Tab. 1.3:** Antimikrobielle und hämolytische Aktivität von PGLa, MSI-103 und zwei weiteren Peptiden der heptameren Aminosäureabfolge (KxxxKxx)<sub>n</sub> (nach Blazyk, 2001).

Peptid	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml]			Hämolyse [%]
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
PGLa	32	64	128	1
MSI-103	8	8	32	9
(KLAGLAK) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	8	16	128	9
(KIGAKI) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	8	8	32	3



Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DPPC und DPPG, in einem molaren Lipidverhältnis von 1:1, wurden in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 durchgeführt (Toke, 2004 a; Toke, 2004 b). Dabei konnte gezeigt werden, dass MSI-103 parallele Dimere zu bilden scheint, die in Kontakt mit den Phospholipidkopfgruppen der Modellmembranen bleiben (Toke, 2004 a; Toke, 2004 b). Weiterhin scheint MSI-103 gleichzeitig sowohl als Monomer als auch als Dimer vorzuliegen (Toke, 2004 b). Dabei scheint das antimikrobielle Peptid als Monomer an die Membranoberfläche gebunden zu sein und als Dimer transmembrane Poren zu bilden – was einen Hinweis auf dessen Wirkmechanismus gibt (Toke, 2004 b).

### 1.3. Temporine, die größte Familie antimikrobieller Peptide bei Amphibien

#### 1.3.1. Allgemeine Eigenschaften

Temporine bilden eine Familie antimikrobieller Peptide, die ursprünglich in der Hautsekretion des Grasfrosches, *Rana temporaria*, später außerdem in nordamerikanischen und eurasischen Fröschen sowie in Wespengift gefunden wurden (Mangoni, 2006; Simmaco, 1996). Mit mehr als 50 Vertretern ist die Familie der Temporine die größte Familie antimikrobieller Peptide bei Amphibien (Mangoni, 2008). Zudem gehören Temporine mit 10 bis 16 Aminosäuren zu den kleinsten amphiphilen,  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptiden und sind mit bis zu drei positiven Ladungen nur schwach geladen (Mangoni, 2006; Mangoni, 2008; Rosenfeld, 2006). Sie sind linear und enthalten einen hohen Anteil an hydrophoben Resten – insbesondere Leucin (Mangoni, 2000; Simmaco, 1996). In wässriger Lösung liegen sie ungefaltet vor und nehmen nach der Bindung an Lipidmembranen eine amphiphile,  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur an (Mangoni, 2000; Simmaco, 1996). In der folgenden Tabelle sind einige Temporine aufgeführt.

**Tab. 1.4:** Einige Temporine, ihre Aminosäuresequenz und Herkunft.

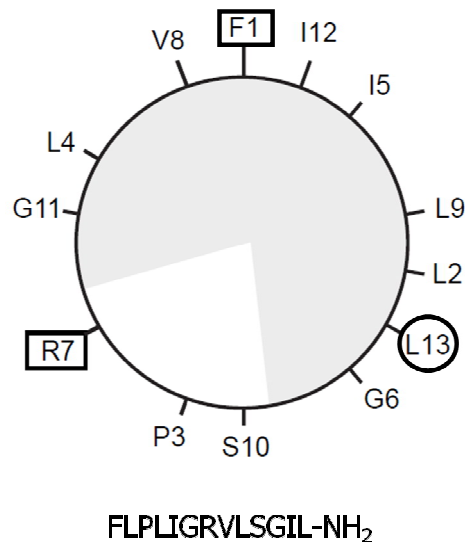
AMP	Aminosäuresequenz	Herkunft
Temporin A	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana temporaria</i>
Temporin B	LLPIVGNLLKSLL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana temporaria</i>
Temporin L	FVQWFSKFLGRIL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana temporaria</i>
Temporin 1Ca	FLPFLAKILTGVL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana clamitans</i>
Temporin 1Ja	ILPLVGNLLNDLL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana japonica</i>
Temporin 1La	VLPLISMALGKLL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana luteiventris</i>

Temporine werden als große Vorläuferproteine synthetisiert, die neben einer einzigen Kopie des reifen Peptides am C-Terminus eine hochkonservierte Region einschließlich eines 22 Aminosäuren langen Signalpeptides und eine saure intervenierende Sequenz enthalten (Mangoni, 2006). Durch die proteolytische Spaltung des jeweiligen Vorläuferproteins wird das entsprechende Temporin gebildet. Aufgrund weiterer posttranslationaler Modifikation sind Temporine am C-Terminus amidiert (Mangoni, 2006).

Temporine wirken gegen grampositive Bakterien und sind gegen gramnegative Bakterien sowie gegen Erythrozyten nahezu inaktiv (Mangoni, 2005; Mangoni, 2006; Simmaco, 1996). Temporin L bildet eine Ausnahme – es weist neben seiner Aktivität gegen grampositive Bakterien zudem Aktivität gegen gramnegative Bakterien sowie hämolytische Aktivität auf (Rinaldi, 2002). Darüber hinaus können Temporine antiviral, antifungal sowie gegen Protozoen wirken (Mangoni, 2005; Mangoni, 2006). Im Gegensatz zu den meisten antimikrobiellen Peptiden behalten Temporine ihre biologische Funktion in Blutserum bei (Mangoni, 2005; Mangoni, 2006). Ihre Wirkungsweise beruht vermutlich auf der Bildung transmembraner Poren, wobei sich jeweils zwei Moleküle mit ihren N-terminalen Enden zu einem Dimer verbinden und so lang genug sind die Membran zu durchspannen (Mangoni, 2006; Simmaco, 1996).

### 1.3.2. Temporin A, Temporin B und Temporin L aus *Rana Temporaria*

Temporin A gehört neben Temporin B und Temporin L zu den ersten, aus der Hautsekretion des Grasfrosches, *Rana temporaria*, isolierten Temporinen (Simmaco, 1996). In der folgenden Abbildung sind die Helical-Wheel-Projektion und Aminosäuresequenz von Temporin A dargestellt.



**Abb. 1.5:** Helical-Wheel-Projektion und Aminosäuresequenz von Temporin A. Der hydrophobe Bereich der Helix ist grau schattiert, kationische Reste sind eingrahmt, der amidierter C-Terminus ist eingekreist.

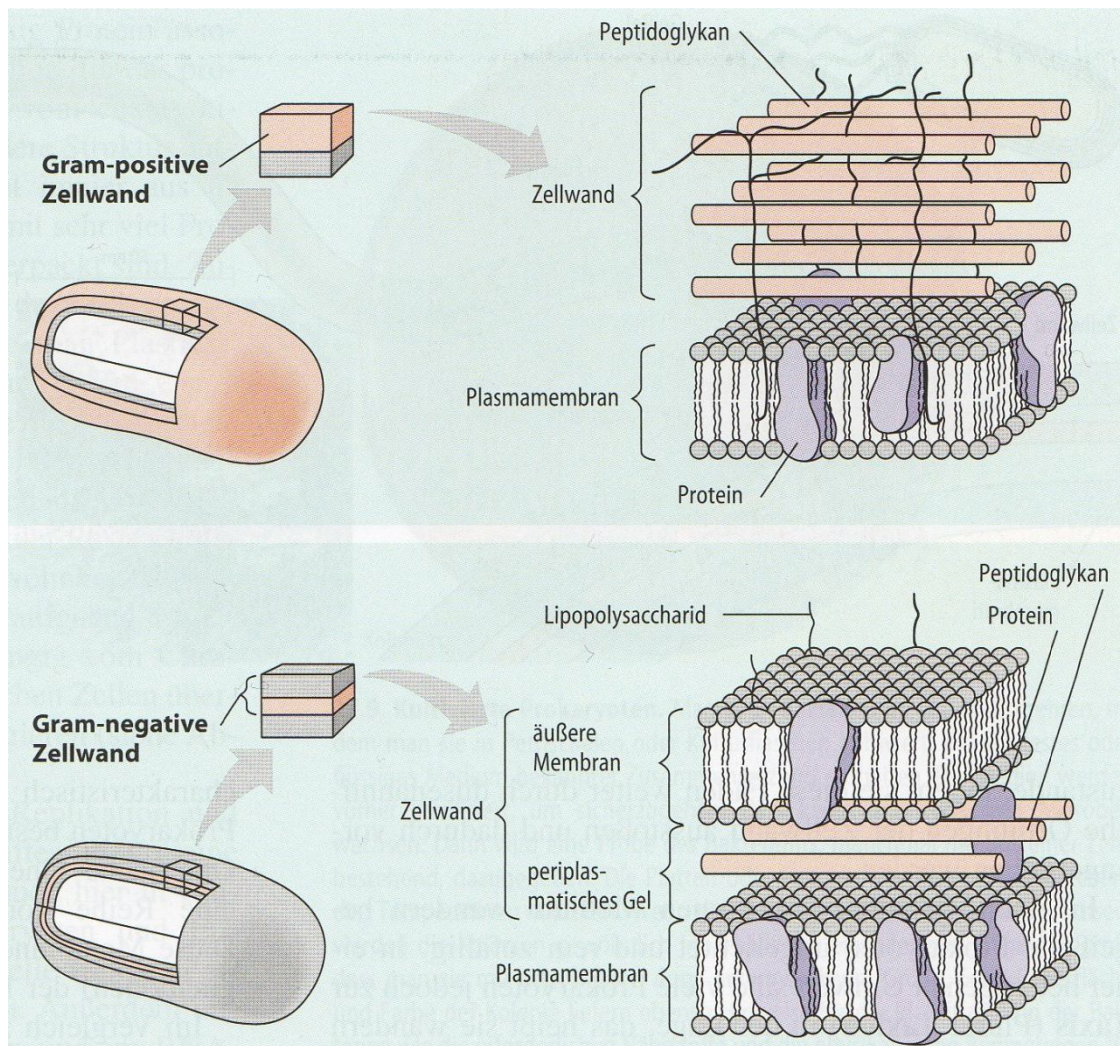
Temporin A und Temporin B wirken gegen grampositive Bakterien, den Pilz *Candida albicans* und das Protozoon *Leishmania donovani* (Mangoni, 2005). Sie sind beide hämolytisch nahezu inaktiv (Mangoni, 2005). Temporin L hingegen wirkt gegen grampositive sowie gramnegative Bakterien, antifungal, anticancerogen und hämolytisch (Rinaldi, 2002).

Eine Besonderheit von Temporinen ist, dass in einem einzelnen Organismus bis zu 10 Vertreter gleichzeitig vorkommen können (Rosenfeld, 2006). Anhand von Temporin A, Temporin B und Temporin L konnte gezeigt werden, dass diese einen synergistischen Effekt untereinander haben können (Rosenfeld, 2006).

**Tab. 1.5:** Minimale Hemmkonzentrationen und Indices der fraktionierten Hemmkonzentrationen von Temporin A, Temporin B und Temporin L (nach Rosenfeld, 2006). FHK-Indices werden folgendermaßen interpretiert:  $\leq 0,5$ = Synergismus,  $0,51 - 4,0$ = keine Interaktion und  $> 4,0$ = Antagonismus.

	MHK-Wert [ $\mu\text{mol/ml}$ ]			FHK-Index		
	Temporin A	Temporin B	Temporin L	Temporin A+L	Temporin B+L	Temporin A+B
<b>Gramnegativ</b>						
<i>E. coli</i> D21	100	50	10	0.48	0.50	0.56
<i>E. coli</i> ATCC 25922	100	50	10	0.50	0.50	0.87
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	200	200	20	0.43	0.46	2.00
<i>A. hydrophila</i> RT-6	400	200	40	0.34	0.41	2.00
<b>Grampositiv</b>						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3	3	1.25	0.79	0.69	0.55
<i>S. aureus</i> Cowan I	6	12	2.50	0.70	0.56	2.00
<i>B. megaterium</i> Bm11	3	6	2.50	0.75	0.75	0.75
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3	6	1.25	0.70	0.55	0.55

In Tabelle 1.5 ist ersichtlich, dass Temporin A und Temporin B gegen gramnegative Bakterien nahezu inaktiv sind. Bei der jeweiligen Kombination mit Temporin L hingegen ist ein synergistischer Effekt zu erkennen (FHK-Index:  $\leq 0,5$ ), wohingegen bei der Kombination aus Temporin A und Temporin B keine Interaktion zu beobachten ist (FHK-Index:  $0,51 - 4,0$ ). Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass Temporin A und Temporin B bei Kontakt mit der Lipopolysaccharidschicht gramnegativer Bakterien oligomerisieren und somit nicht die äußere Membran passieren können, um durch die Zellwand zur Plasmamembran zu gelangen und dort ihre Wirkung auszuüben (Abbildung 1.6), wohingegen Temporin L die Oligomerisierung von Temporin A bzw. Temporin B verhindert und die Passage durch die äußere Membran ermöglicht (Rosenfeld, 2006). Gegen grampositive Bakterien, die keine äußere Membran mit einer Lipopolysaccharidschicht als Barriere besitzen (Abbildung 1.6), weisen Temporin A und Temporin B eine hohe antimikrobielle Aktivität auf, und bei den Kombinationen aus Temporin A und Temporin L, Temporin B und Temporin L sowie Temporin A und Temporin B ist keine Interaktion zu beobachten.



**Abb. 1.6:** Zellwand grampositiver und gramnegativer Bakterien (Campbell, 2006).

Anhand CD- und NMR-spektroskopischer Untersuchungen sowie molekulardynamischer Simulationen konnte gezeigt werden, dass Temporin A und Temporin L eine unterschiedliche Orientierung in Bakterienmembran-imitierenden Mizellen bestehend aus SDS und in Eukaryotenmembran-imitierenden Mizellen bestehend aus DPC aufweisen (Carotenuto, 2008). In SDS-Mizellen sind Temporin A und Temporin L an die Mizellenoberfläche gebunden, wobei ihr N-Terminus jeweils zwischen Mizelleninnerem und Mizellenäußeren wechselt (Carotenuto, 2008). In DPC-Mizellen sind Temporin A und Temporin L senkrecht zur Mizellenoberfläche gerichtet, wobei ihr N-Terminus jeweils in das Mizelleninnere eingebettet ist (Carotenuto, 2008). Weiterhin weist Temporin L in beiden Mizellensystemen eine höhere  $\alpha$ -Helizität als Temporin A auf und kann somit beide Mizellenmembranen besser durchdringen (Carotenuto, 2008).

## 2. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die antimikrobiellen Peptide MSI-103 und Temporin A sowohl strukturell als auch funktionell untersucht werden.

Der Wirkmechanismus beider antimikrobieller Peptide beruht vermutlich auf der Bildung transmembraner Poren (Mangoni, 2006; Simmaco, 1996; Toke, 2004 b). OCD- und Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen ermöglichen Aussagen über den jeweiligen strukturellen Aufbau dieser Poren und somit über die genauere Wirkungsweise beider antimikrobieller Peptide.

Für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollten verschiedene Mutanten des MSI-103 und Temporin A durch die jeweilige Substitution einer in Frage kommenden Aminosäure durch eine  $^2\text{H}$ - bzw.  $^{19}\text{F}$ -markierte Aminosäure hergestellt werden.

Um zu gewährleisten, dass die durch Einführung einer Deuterium- bzw. Fluormarkierung modifizierten Peptide ihre Struktur und Funktion im Vergleich zur natürlichen Form beibehalten, sollten funktionelle Untersuchungen (antimikrobieller Test und Hämolysetest) sowie qualitative Strukturanalysen (CD-Spektroskopie) durchgeführt werden.

Anschließend sollten die MSI-103- und Temporin A-Mutanten in Modellmembranen unter verschiedenen Bedingungen (Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses, der Temperatur) mittels  $^2\text{H}$ - bzw.  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR untersucht werden.

Weiterhin sollte der Einfluss einer C-terminalen Amidierung auf die antimikrobielle und hämolytische Aktivität des MSI-103 sowie auf weitere kationische,  $\alpha$ -helikale Peptide untersucht werden.

Abschließend sollten die erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen und diskutiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

Abzug:	· Waldner
Autoklav:	· 2540 EL, Systec · Sanoclav S-ECZ, Adolf Wolf · Varioklav, Thermo Fisher Scientific
Brutschrank:	· Incucell, Münchener Medizin Mechanik · B5042 E, Heraeus Instruments
CD-Spektrometer:	· J-815, Jasco Labor- und Datentechnik
Extruder:	· Avanti Polar Lipids
Festkörper-NMR-Spektrometer:	· Avance 500, Bruker Biospin · Avance 600, Bruker Biospin
Folienschweißgerät:	· Folio FS 3602, Severin Elektrogeräte
Gasbrenner:	· Schütt Flammy S, Schütt Labortechnik
Gefriertrockner:	· Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen
Heizblock:	· HB-2, Wealtec
HPLC-Gerät:	· 2000 Serie, Jasco Labor- und Datentechnik
Kühlschrank:	· Bosch und Siemens Hausgeräte · Engmann Kühlsysteme · Herafreeze, Heraeus Instruments · Liebherr Hausgeräte
LC/MS-Gerät:	· Micro TOF LC, Bruker Daltonics
Magnetrührer:	· Heidolph Instruments · RCT Basic Ikamag Safety Control, IKA Labortechnik
OCD-Spektrometer:	· J-810, Jasco Labor- und Datentechnik
Peptidsynthesegerät:	· 433A, Applied Biosystems
pH-Messgerät:	· QpH 70, VWR International
Pipette:	· Eppendorf · Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe:	· Pipetus, Hirschmann Laborgeräte
Reinstwasseranlage:	· Millipore

Schüttelgerät:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reax Top, Heidolph Instruments</li> <li>· Vortex-Genie, Bender und Hobein</li> </ul>
Schüttelinkubator:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· G25, New Brunswick Scientific</li> <li>· KM-2, Edmund Bühler</li> </ul>
Sterilbank:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Herasafe, Heraeus Instruments</li> </ul>
Trockenschrank:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Memmert</li> </ul>
Ultraschallgerät:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Branson Sonifier,</li> <li>· G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik</li> <li>· Sonorex, Bandelin electronic</li> </ul>
UV/VIS-Spektrometer:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· SmartSpec Plus, Bio-Rad Laboratories</li> </ul>
Vakuumpumpe:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Minni, Leybold-Heraeus</li> <li>· Vacuubrand</li> </ul>
Waage :	<ul style="list-style-type: none"> <li>· PB3001, Mettler-Toledo</li> <li>· Sartorius</li> </ul>
Wasserbad:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· U3-7A, Julabo Labortechnik</li> </ul>
Zentrifuge:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Eppendorf Zentrifugen</li> <li>· 3-18K, Sigma Laborzentrifugen</li> </ul>

### 3.1.2. Gebrauchsmaterial

Exsikkator:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Flasche:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Impföse:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Kulturkolben:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Magnetührstäbchen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Messzylinder:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Peleusball:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Quarzküvette:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hellma Optik</li> </ul>
Quarzplatte:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hellma Optik</li> </ul>
Rundkolben:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>
Spatel:	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carl Roth</li> </ul>



### 3.1.3. Verbrauchsmaterial

Aluminiumfolie:	· Carl Roth
Aminosäurekartusche:	· Applied Biosystems
Autoklavierband:	· 3M
Einmalglaspipette:	· Carl Roth
Einmalküvette:	· Sarstedt
Einmalplastikpipette:	· Carl Roth
Einmalspritze:	· B. Braun
Einschweißfolie:	· Carl Roth
Extruder-Membranfilter:	· Whatman
Extruder-Stützfilter:	· Avanti Polar Lipids
Filterpapier:	· Carl Roth
Klarsichtfolie:	· Carl Roth
LC/MS- Probenfläschchen:	· Carl Roth
Lochplatte:	· Sarstedt
NMR-Glasplättchen:	· Paul Marienfeld
Parafilm:	· American National Can
Pasteurpipette:	· Carl Roth
Petrischale:	· Sarstedt
Pipettenspitze:	· Sarstedt
	· Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäß:	· Sarstedt
Wägeschälchen:	· Carl Roth

### 3.1.4. Biologisches Material

Bakterienstämme:	· Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Erythrozytenkonzentrat:	· Städtisches Klinikum Karlsruhe

### 3.1.5. Chemikalien

Acetonitril	· Fisher Scientific
Argon	· Messer Group
Bactotrypton	· Applichem
Chloroform	· Merck
DCM	· Biosolve
Deuteriumarmes Wasser	· Sigma-Aldrich
DIPEA	· Iris Biotech
DMF	· Biosolve
	· Merck
DMSO	· Sigma-Aldrich
Essigsäureanhydrid	· Merck
Ether	· Merck
Harz	· Novabiochem
HBTU	· Biosolve
HCL	· Carl Roth
Hefeextrakt	· Applichem
HOBT	· Biosolve
	· Iris Biotech
Lipide	· Avanti Polar Lipids
MeOH	· Fisher Scientific
NaCl	· Fisher Scientific
NaOH	· Riedel-de Haen
N- $\alpha$ -Fmoc-Ala-d <sub>3</sub>	· Cambridge Isotope Laboratories
N- $\alpha$ -Fmoc-CF <sub>3</sub> -Bpg	· Pavel Mykhailiuk, Universität Kiew
N- $\alpha$ -Fmoc-CF <sub>3</sub> -Phg	· ABCR
N- $\alpha$ -Fmoc-geschützte Aminosäuren	· Novabiochem
NMP	· Biosolve
Piperidin	· Biosolve
Stickstoff	· Messer Group

TFA	· Biosolve
TFE	· Merck
TIS	· Sigma-Aldrich
Tris	· Applichem
Triton X-100	· Sigma-Aldrich

### 3.1.6. Lösungen, Kulturmedien und Puffer

Lösung A: 200 ml Acetonitril, 10 ml HCl, 1790 ml Wasser

Lösung B: 1800 ml Acetonitril, 10 ml HCl, 190 ml Wasser

LB-Medium: 10 g NaCl, 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt in 1 l Wasser; pH 7,4

LB-Medium  
(salzfrei): 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt in 1 l Wasser; pH 7,4

Puffer D: 9 ml Puffer W, 1 ml DMSO

Puffer E: 20,8 g Tris in 1 l Wasser; pH 7,4 bei 4°C

Puffer W: 20,8 g Tris in 1 l Wasser; pH 7,4 bei 37°C

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Festphasenpeptidsynthese

Bei der Festphasenpeptidsynthese erfolgt die Synthese des Peptides an einer festen Phase – dem unlöslichen polymeren Träger Harz (Merrifield, 1963).

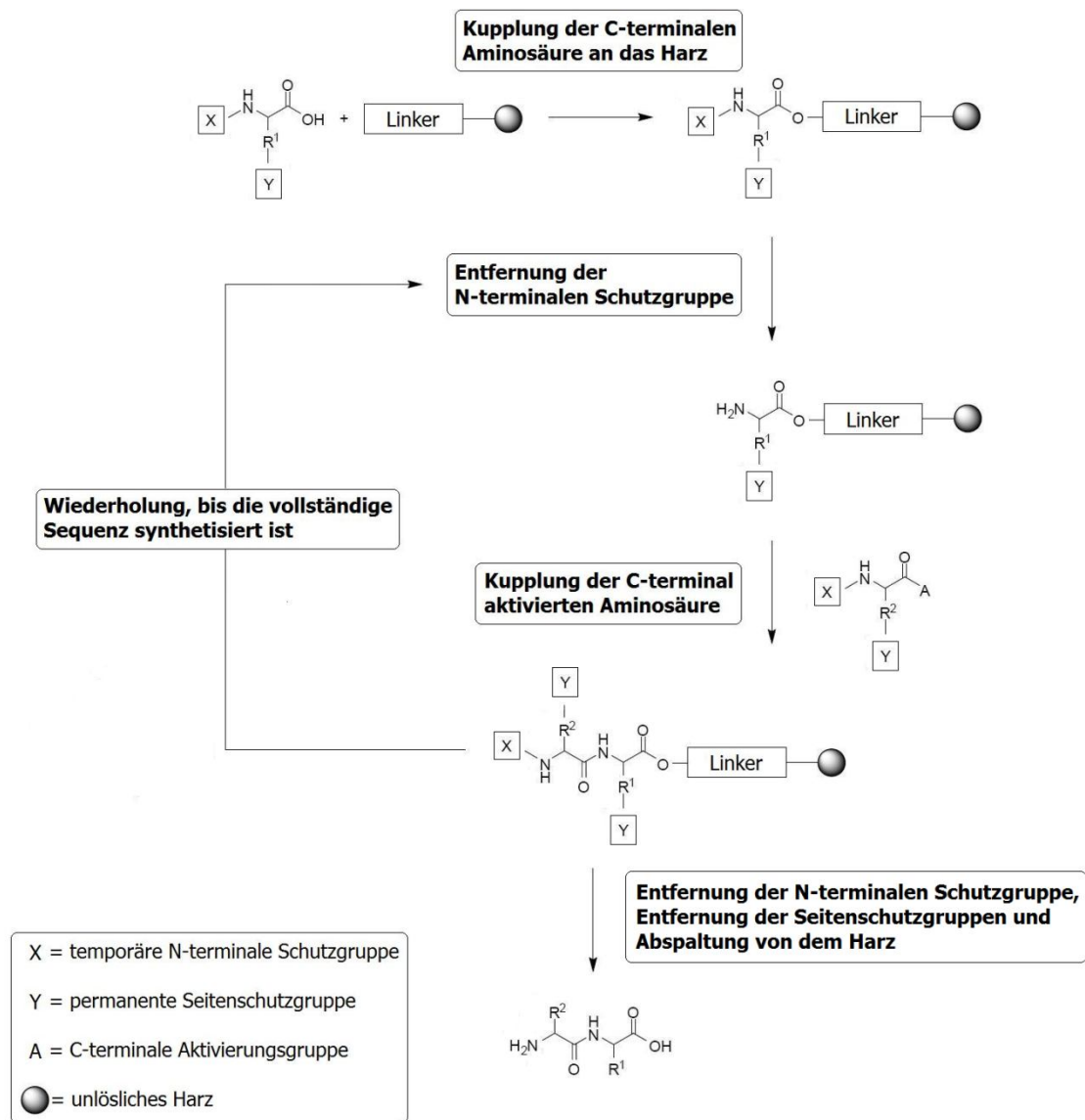


Abb. 3.1: Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.

*Zunächst* wird die C-terminale Aminosäure des zu synthetisierenden Peptides über eine abspaltbare Ankergruppe, den sogenannten Linker, an das Harz gebunden. Dabei ist die  $\alpha$ -Aminofunktion der Aminosäure mit einer temporären Schutzgruppe geschützt. Bei Aminosäuren mit einer weiteren funktionellen Gruppe in der Seitenkette sind diese zusätzlich mit einer orthogonalen Schutzgruppe, der sogenannten Seitenschutzgruppe, geschützt. Die temporäre Schutzgruppe muss vor dem Knüpfungsschritt mit der folgenden Aminosäure entfernt werden. Hingegen muss eine orthogonale Schutzgruppe gegenüber den während der gesamten Synthese vorherrschenden Bedingungen stabil sein. *Anschließend* erfolgt die als Kupplung bezeichnete Verknüpfung der ersten und der darauffolgenden, ebenfalls temporär und gegebenenfalls orthogonal geschützten Aminosäure über die Ausbildung einer Peptidbindung. Dabei muss die zu kuppelnde Aminosäure vorher C-terminal aktiviert werden. Die Schritte des Entschützens der  $\alpha$ -Aminofunktion der zuletzt verknüpften Aminosäure, der C-terminalen Aktivierung der darauffolgend zu kuppelnden Aminosäure sowie der Kupplung an sich werden wiederholt, bis die vollständige Sequenz des gewünschten Peptides synthetisiert ist. *Zum Schluss* wird die temporäre Schutzgruppe der  $\alpha$ -Aminofunktion entfernt und das Peptid von dem Harz, im Idealfall unter gleichzeitiger Entfernung der Seitenschutzgruppen, abgespalten.

Bei der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield erfolgt die Synthese des Peptides vom C- zum N-Terminus der Aminosäuresequenz – entgegengesetzt zur Proteinbiosynthese. Die Vorteile der Peptidsynthese an fester Phase sind im Wesentlichen: a) die Synthese am festen Träger lässt sich gut automatisieren, b) durch Immobilisierung am festen Träger erübrigt sich eine physikalische Reinigung der Reaktionsprodukte, da alle Reagenzien einfach abgespült werden können und die Festphase auf einem Filter zurückgehalten wird, c) die Ausbeuten können dadurch erhöht werden, dass die einzelnen Kupplungsbausteine zum Teil in erheblichem Überschuss zugegeben werden können sowie d) alle Reaktionen erfolgen im gleichen Gefäß, somit treten keine Verluste durch Umfüllen auf (Bulle, 2000). Die Nachteile der Festphasenpeptidsynthese sind im Wesentlichen: a) die Kinetik wird heterogen, dadurch komplizierter und oft langsamer, b) die Festphasenoberfläche kann unerwünschte Nebenreaktionen katalysieren, c) es können nur Reaktionen verwendet werden, die sehr hohe Ausbeuten erzielen, d) man benötigt moderne analytische Methoden, die für Untersuchungen an Festphasen geeignet sind sowie e) die Festphase muss inert gegenüber den verwendeten Reagenzien und Lösungsmitteln sein (Bulle, 2000).

### 3.2.1.1. Synthese des MSI-103

Das antimikrobielle Peptid MSI-103 und seine Mutanten wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese, mit dem Peptidsynthesegerät, synthetisiert. Dabei wurde nach dem Standardprotokoll der Fmoc-Peptidchemie gearbeitet (Fields, 1990), wonach Fmoc als temporäre Schutzgruppe der  $\alpha$ -Aminofunktion verwendet wird.

Die entsprechenden N- $\alpha$ -Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden zu jeweils 1 mmol und einem Überschuss von 5-10 mg in dafür vorgesehene Kartuschen abgewogen und in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptides am Peptidsynthesegerät angebracht. Weiterhin wurde in die dafür vorgesehenen Flaschen am Peptidsynthesegerät Piperidin, eine Mischung aus 22 ml Essigsäureanhydrid, 10 ml DIPEA, 800 mg HOBT und 400 ml NMP, eine Mischung aus 400 ml DMF, 27 g HOBT und 75 g HBTU sowie eine Mischung aus 80 ml DIPEA und 120 ml NMP eingefüllt. Außerdem wurde abgewogenes Harz in den dafür vorgesehenen Behälter gefüllt. Anschließend wurden die einzelnen Peptide nacheinander synthetisiert. Bei Bedarf wurden die Chemikalien bzw. das Harz aufgefüllt. Fluormarkierungen wurden durch Substitution der entsprechenden Aminosäure durch N- $\alpha$ -Fmoc-CF<sub>3</sub>-Phg erreicht (Afonin, 2003; Glaser, 2004), Deuteriummarkierungen durch Substitution der entsprechenden Aminosäure durch N- $\alpha$ -Fmoc-Ala-d<sub>3</sub>. Ein carboxylierter C-Terminus wird durch Verwendung von Wang-Harz anstelle von Rink-Harz erreicht.

### 3.2.1.2. Synthese des Temporin A

Das antimikrobielle Peptid Temporin A und seine Mutanten wurden mittels manueller Festphasensynthese, in Einmalspritzen mit 5 ml Volumen, synthetisiert. Dabei wurde nach dem Standardprotokoll der Fmoc-Peptidchemie gearbeitet (Fields, 1990), wonach Fmoc als temporäre Schutzgruppe der  $\alpha$ -Aminofunktion verwendet wird.

Abgewogenes Harz wurde in die Einmalspritzen eingefüllt, jeweils mit DMF überschichtet und 30 min quellen gelassen. Anschließend erfolgte das Entschützen. Hierzu wurde das DMF abgelassen, jeweils 2 ml 25% Piperidin in DMF eingefüllt und unter Schütteln 20 min inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Der entscheidende Vorgang bei dem Entschützen ist die Deprotonierung des Fluorenylringes des Fmoc unter Ausbildung eines Dibenzofulvens und CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das Piperidin aus den Einmalspritzen abgelassen und das Harz mit jeweils 20 ml DMF gewaschen. Danach wurde die entsprechende N- $\alpha$ -Fmoc-geschützte

Aminosäure sowie 510 mg HOBt und 1,42 g HBTU abgewogen, unmittelbar vor der Kupplung mit DMF zu 8,5 ml gelöst, mit DIPEA auf 10 ml aufgefüllt und unter Schütteln 2 h mit dem gewaschenen Harz inkubiert. Die Schritte des Entschützens, des Waschens und der Kupplung wurden wiederholt bis die vollständige Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptides synthetisiert wurde. Fluormarkierungen wurden durch Substitution der entsprechenden Aminosäure durch N- $\alpha$ -Fmoc-CF<sub>3</sub>-Bpg erreicht (Afonin, 2007; Mikhailiuk, 2006).

### **3.2.1.3. Abspaltung des MSI-103 und des Temporin A von dem Harz**

Die antimikrobiellen Peptide MSI-103 und Temporin A sowie ihre Mutanten wurden mit einem Gemisch aus TFA, TIS und Wasser von dem Harz abgespalten.

Nach der vollständigen Synthese der Peptide wurde die temporäre Schutzgruppe der  $\alpha$ -Aminofunktion aller Peptide entfernt. Hierzu wurde jeweils 2 ml 25% Piperidin in DMF in die Einmalspritzen eingefüllt und unter Schütteln 20 min inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit jeweils 20 ml DMF, 20 ml DCM und 20 ml MeOH gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Danach wurde das Harz in Reaktionsgefäße mit 50 ml Volumen überführt, mit jeweils 20 ml einer Mischung aus 92,5% TFA, 5% TIS und 2,5% Wasser versetzt und unter Schütteln 4 h inkubiert. Bei diesem Vorgang werden die Peptide von dem Harz abgespalten sowie alle Seitenschutzgruppen entfernt. Anschließend wurde das Harz filtriert und die Filtrate mit Argon eingeeengt. Danach wurden die Peptide durch Zugabe von kühlem Ether gefällt und jeweils bei 10 000 rpm 3 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Peptide jeweils in einer Mischung aus 50% Acetonitril und 50% Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

### **3.2.1.4. Analyse des MSI-103 und des Temporin A mittels LC/MS**

Bei der LC/MS handelt es sich um die Koppelung einer analytischen HPLC mit einem Massenspektrometer, wobei jede Messung ein Chromatogramm mit zugehörigem Massenspektrum liefert.

Die von dem Harz abgespaltenen und gefriergetrockneten Peptide wurden mittels LC/MS analysiert und identifiziert. Hierzu wurde eine kleine Spatelspitze Peptid in jeweils 300  $\mu$ l MeOH gelöst, in ein geeignetes Probenfläschchen überführt und in den Probenbehälter des LC/MS-Gerätes gestellt. Anschließend wurden die Messungen nacheinander durchgeführt.

### **3.2.1.5. Aufreinigung des MSI-103 und des Temporin A mittels HPLC**

Die HPLC ist eine Form der Säulenchromatographie, bei der die mobile Phase unter hohem Druck durch eine speziell konstruierte Säule gepresst und somit die Trennung der aufgetragenen Stoffmischung erheblich beschleunigt wird.

Die analysierten und identifizierten Peptide wurden mittels HPLC aufgereinigt. Es wurde eine RP-Säule (aus dem Englischen: reversed phase= umgekehrte Phase) verwendet, bei der die Oberfläche des Füllmaterials – die stationäre Phase – mit Kohlenstoffketten überzogen und somit apolar ist. Als mobile Phase wurden die polaren Lösungen A und B verwendet. Jedes synthetisierte Peptid wurde mit einer anderen Methode, unter Optimierung des Wasser/Acetonitril-Gradienten, der Laufzeit, der Flussrate sowie der Temperatur, aufgereinigt. Hierzu wurde eine Spatelspitze Peptid in jeweils 1 ml einer Lösung – bei MSI-103 und seinen Mutanten in Lösung A, bei Temporin A und seinen Mutanten in einer Mischung aus 50% MeOH und 50% Lösung A – gelöst, auf die Säule aufgetragen und chromatographisch getrennt. Die einzelnen Peptide wurden nacheinander aufgereinigt, die entsprechenden Fraktionen aufgesammelt und gefriergetrocknet.

### **3.2.2. Antimikrobieller Test**

Anhand des antimikrobiellen Tests wurde die antimikrobielle Aktivität der synthetisierten Peptide bestimmt. Dabei wurde die minimale Hemmkonzentration ermittelt. Sie ist die kleinste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, die die Keimvermehrung im Kulturansatz noch verhindert. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Medien wurden vorher im Autoklaven bei 121°C und 1 bar 20 min sterilisiert. Die verwendeten Glasgeräte wurden vorher mit Aluminiumfolie verschlossen und im Trockenschrank bei 200°C 4 h sterilisiert. Die Impföse wurde vorher durch Abflammen mit dem Bunsenbrenner sterilisiert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden Flaschen- und Kolbenhäse kurz mit dem Bunsenbrenner abgeflammt.

Zunächst wurde eine Übernachtskultur des Bakterienstammes hergestellt, gegen den das antimikrobielle Peptid getestet werden sollte. Hierzu wurden 10 ml LB-Medium mit der entsprechenden Glycerinstammlösung bzw. Sporensuspension angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 240 rpm über Nacht inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde umgeimpft, indem erneut 10 ml LB-Medium damit angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 240 rpm inkubiert wurden bis die Bakterienkultur dicht gewachsen war.



Anschließend wurde eine Verdünnung der Bakterienkultur in LB-Medium hergestellt, dessen OD<sub>600</sub> jeweils nach Bakterienstamm zwischen 0,12 und 0,2 liegen muss. Diese Verdünnung wurde mit LB-Medium zehnfach weiterverdünnt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des zu testenden antimikrobiellen Peptides in salzfreiem LB-Medium in einer 96er Lochplatte zu jeweils 50 µl/Loch hergestellt. Anschließend wurde die vorbereitete Bakterienkultur zu jeweils 50 µl/Loch hinzupipettiert und die 96er Lochplatte im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die letzte Reihe enthielt weder antimikrobielles Peptid noch Bakterienkultur, sie diente als Sterilitätskontrolle des salzfreien LB-Mediums. Die vorletzte Reihe enthielt kein antimikrobielles Peptid, sie diente als Wachstumskontrolle der Bakterienkultur. Für jedes antimikrobielle Peptid wurden vier Spalten der 96er Lochplatte verwendet, so dass auf einer 96er Lochplatte zwei antimikrobielle Peptide getestet werden konnten. Die Auswertung des antimikrobiellen Tests erfolgte durch eine visuelle Auswertung der 96er Lochplatten. Dabei zeugte eine Trübung der Lochinhalte von bakteriellem Wachstum. Die Konzentrationsreihe mit mehr als 50% ungetrübter Lochinhalte lieferte die minimale Hemmkonzentration des getesteten antimikrobiellen Peptides.

### **3.2.3. Hämolysetest**

Anhand des Hämolysetests wurde die hämolytische Aktivität der synthetisierten Peptide bestimmt. Die verwendeten Lösungen wurden vorher im Autoklaven bei 121°C und 1 bar 20 min sterilisiert.

Zunächst wurde das verwendete Erythrozytenkonzentrat gewaschen. Hierzu wurden 5 ml davon in 45 ml Puffer E aufgenommen und bei 4°C und 1700 rpm 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde erneut in 45 ml Puffer E aufgenommen und bei 4°C und 1700 rpm 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 9 ml Puffer E aufgenommen und auf Eis gelagert. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des zu testenden antimikrobiellen Peptides in Puffer D in Reaktionsgefäßen mit 2 ml Volumen zu jeweils 200 µl/Reaktionsgefäß hergestellt. Anschließend wurde die vorbereitete Erythrozytensuspension mit Puffer W 20fach verdünnt, im Wasserbad bei 37°C 3 min inkubiert und zu jeweils 200 µl in jedes Reaktionsgefäß der Peptidverdünnungsreihe hinzupipettiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße im Schüttelheizblock bei 37°C 20 min inkubiert und anschließend bei 26°C und 13000 rpm 5 min zentrifugiert. Jeweils 350 µl des Zentrifugates wurden in eine Küvette pipettiert und die Absorption des durch die Lyse der Erythrozyten freigewordenen Hämoglobins bei 540 nm bestimmt. Ein zusätzliches Reaktionsgefäß enthielt kein

antimikrobielles Peptid, dieses lieferte den Absorptionswert für 0% Hämolyse. Ein weiteres zusätzliches Reaktionsgefäß enthielt 0,2%iges Triton X-100 anstatt Puffer D, dieses lieferte den Absorptionswert für 100% Hämolyse. Die Auswertung des Hämolysetests erfolgte durch die Berechnung der prozentualen Hämolyse, die durch jede Peptidkonzentration ausgelöst wurde. Dabei wurden die gemessenen Absorptionswerte mit denen für 0% bzw. 100% Hämolyse in Relation gebracht. Die Ergebnisse wurden in einem Graphen, bei dem die Peptidkonzentration gegen die ausgelöste prozentuale Hämolyse aufgetragen wurde, dargestellt.

### 3.2.4. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV/VIS-Bereich und beruht auf dem Zirkulardichroismus. Darunter versteht man die Differenz der Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht beim Durchgang durch optisch aktive Verbindungen, wie z.B. chirale Moleküle. Linear polarisiertes Licht kann man als Summe zweier, mit gleicher Frequenz gegenläufig um die Ausbreitungsrichtung rotierender, zirkular polarisierter E-Feldvektoren ( $\epsilon_L$  und  $\epsilon_R$ ) betrachten. Beim Durchgang polarisierten Lichtes durch eine optisch aktive Verbindung ändert sich die Polarisation des austretenden Strahls zu elliptisch polarisiertem Licht. Die Elliptizität ist proportional zu der Differenz der Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht und wird im CD-Spektrum in Abhängigkeit von der Wellenlänge (im UV-Bereich, zwischen 180 und 260 nm) gemessen (Kranz, 2007).

Anhand der CD-Spektroskopie wurde die Sekundärstruktur der synthetisierten Peptide bestimmt. Proteinsekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Schleife und ungeordnete Knäuelstruktur weisen in einem CD-Spektrum charakteristische Linienformen auf. Die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente der gemessenen Peptide wurden mit Hilfe mathematischer Algorithmen quantitativ ermittelt (Kranz, 2007; Lobley, 2002; Whitmore, 2004; Whitmore, 2008).

Zunächst wurde eine Stammlösung des zu untersuchenden Peptides in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) hergestellt. Anschließend wurden die zu messenden Proben und die entsprechenden Referenzen hergestellt. Danach wurden die Messungen nacheinander mit dem CD-Spektrometer durchgeführt, indem jeweils 250  $\mu$ l einer Probe in eine geeignete Quarzküvette pipettiert und gegen den entsprechenden Referenzwert gemessen wurde.

### 3.2.4.1. Herstellung multilamellarer Lipidvesikel

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur der synthetisierten Peptide mittels CD-Spektroskopie wurden diese neben den üblichen Messungen in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) und TFE zudem in multilamellaren Lipidvesikeln mit einem Durchmesser von 100 nm gemessen.

Zur Herstellung dieser multilamellaren Lipidvesikel wurde zunächst das gewünschte Lipid bzw. Lipidgemisch abgewogen und in 1 ml Chloroform gelöst. Nach dem Abdampfen des Chloroforms wurde der Lipidfilm unter Vakuum 3-4 h getrocknet und anschließend zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) aufgenommen. Danach wurde die Lipidsuspension in flüssigem Stickstoff gefroren, in heißem Wasser wieder aufgetaut und anschließend gut durchmischt. Diese Schritte des Einfrierens, des Auftauens und des Durchmischens wurden zehnmal wiederholt. Die erhaltene homogene Lipidsuspension wurde mit Hilfe des Extruders 21 Mal durch eine Membran mit einer Porengröße von 100 nm gepresst.

### 3.2.5. OCD-Spektroskopie

Die OCD-Spektroskopie ist eine Form der CD-Spektroskopie und beruht darauf, dass in einer  $\alpha$ -Helix bestimmte elektronische Übergänge parallel zur Helixachse polarisiert sind und daher die Stärke der Absorption verschieden zirkular polarisierten Lichtes von der Orientierung der Helix bezüglich der Lichtquelle abhängig ist. Wie im CD-Spektrum wird auch im OCD-Spektrum die Elliptizität optisch aktiver Verbindungen, die proportional zu der Differenz der Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes ist, in Abhängigkeit von der Wellenlänge (im UV-Bereich, zwischen 180 und 260 nm) gemessen (Bürck, 2008; Olah, 1988; Wu, 1990).

Anhand der OCD-Spektroskopie wurde die Orientierung der synthetisierten Peptide in Modellmembranen bestimmt. In einem OCD-Spektrum weisen  $\alpha$ -Helices im S-Zustand (aus dem Englischen: surface= oberflächlich), T-Zustand (aus dem Englischen: tilted= geneigt) und I-Zustand (aus dem Englischen: inserted= durchspannend) charakteristische Linienformen auf. Die zeitlich gemittelten Summen aller Sekundärstrukturen der gemessenen Peptide und deren Orientierungen in Modellmembranen wurden mit Hilfe mathematischer Algorithmen ermittelt (Bürck, 2008; Olah, 1988; Wu, 1990).

Zunächst wurde eine Stammlösung des zu untersuchenden Peptides und eine DMPC-Stammlösung in einer Mischung aus Chloroform und MeOH (1:1) hergestellt. Anschließend wurden die zu messenden Proben hergestellt, auf eine geeignete Quarzplatte pipettiert und unter Vakuum 3-4 h getrocknet. Danach wurden die Messungen nacheinander mit dem OCD-Spektrometer durchgeführt, indem jeweils eine Quarzplatte in die Messzelle des OCD-Spektrometers eingebaut, bei 30°C über Nacht hydratisiert und gegen einen geeigneten Referenzwert gemessen wurde.

### 3.2.6. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem externen Magnetfeld. Das magnetische Moment wiederum wird durch den Kernspin des Atomkerns – eine quantenmechanische Eigenschaft, die auch als Eigendrehimpuls des Atomkerns bezeichnet wird – verursacht. Einen Kernspin und somit ein magnetisches Moment weisen nur Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl an Protonen und/oder Neutronen auf. Die Stärke der Wechselwirkung des magnetischen Moments mit dem äußeren Magnetfeld wird durch das gyromagnetische Verhältnis beschrieben. In der folgenden Tabelle sind einige für die NMR-Spektroskopie relevante Atomkerne aufgeführt.

**Tab. 3.1:** Einige für die NMR-Spektroskopie relevante Atomkerne, ihr Kernspin, ihr gyromagnetisches Verhältnis, ihre natürliche Häufigkeit und ihre relative Empfindlichkeit. GV= gyromagnetisches Verhältnis.

Atomkern	Kernspin	GV	Natürliche Häufigkeit [%]	Relative Empfindlichkeit
<sup>1</sup> H	½	26,7519	99,985	1,00
<sup>2</sup> H	1	4,1066	0,015	9,65*10 <sup>-3</sup>
<sup>13</sup> C	½	6,7283	1,108	1,59*10 <sup>-2</sup>
<sup>15</sup> N	½	-2,7126	0,37	1,04*10 <sup>-3</sup>
<sup>19</sup> F	½	25,1815	100	0,83
<sup>31</sup> P	½	10,8394	100	6,63*10 <sup>-2</sup>

Für die Strukturaufklärung antimikrobieller Peptide sind hauptsächlich die Atomkerne <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N und <sup>19</sup>F von Bedeutung (Strandberg, 2004; Ulrich, 2005). Diese werden an einer geeigneten Stelle des zu untersuchenden Peptides selektiv eingeführt. Im Gegensatz zu <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N weist <sup>19</sup>F eine hohe Empfindlichkeit auf und kommt nicht in natürlichen Biomolekülen vor. Daher ist ein <sup>19</sup>F-NMR-Spektrum intensiver und weist zudem kein störendes Hintergrundsignal auf.

### 3.2.6.1. Kernspinwechselwirkungen im Festkörper

Die bereits beschriebene Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem externen Magnetfeld wird als *Zeeman-Wechselwirkung* bezeichnet. Zusätzlich treten Wechselwirkungen mit internen Magnetfeldern auf. Zu diesen zählen a) die *chemische Verschiebung*, b) die *dipolare Kopplung*, c) die *quadrupolare Kopplung* und d) die *J-Kopplung*. Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die J-Kopplung von geringer Bedeutung, da sie von anderen Wechselwirkungen überlagert wird. In der folgenden Tabelle sind die genannten Wechselwirkungen näher beschrieben.

**Tab. 3.2:** Wechselwirkungen, ihre Ursache, ihre Abhängigkeit vom externen Magnetfeld und ihre Linienbreite.  $B_0$ = externes Magnetfeld, WW= Wechselwirkung.

Wechselwirkung	Ursache	Abhängigkeit von $B_0$	Linienbreite [Hz]
Zeeman-WW	externes Magnetfeld	Ja	$10^6$ bis $10^9$
Chemische Verschiebung	elektronische Umgebung	Ja	0 bis $10^5$
Dipolare Kopplung	andere Atomkernspins (WW über den Raum)	Nein	0 bis $10^5$
Quadrupolare Kopplung	elektrisches Quadrupolmoment	in erster Näherung Nein	0 bis $10^9$
J-Kopplung	andere Atomkernspins (WW über die Bindungselektronen)	Nein	0 bis $10^2$

#### *Die Zeeman-Wechselwirkung*

In einem externen Magnetfeld spalten sich die zuvor entarteten Energiezustände der Atomkernspins in diskrete Energieniveaus, sogenannte Zeeman-Niveaus, auf (Zeeman-Aufspaltung), die entsprechend der Boltzmann-Verteilung besetzt werden. Ein Atomkern mit dem Kernspin  $I=1/2$  kann zwei und ein Atomkern mit dem Kernspin  $I=1$  drei Energieniveaus besetzen. Die Differenz der Energieniveaus ist proportional zum externen Magnetfeld und definiert als:

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0 = \hbar \omega_0.$$

$\Delta E$ = Energiedifferenz,  $\hbar$ = Plancksche Konstante,  $\gamma$ = gyromagnetisches Verhältnis des entsprechenden Atomkerns,  $B_0$ = externes Magnetfeld,  $\omega_0$ = Larmorfrequenz.

Wird ein oszillierendes Magnetfeld – in Form einer elektromagnetischen Radiofrequenzwelle – mit der Larmorfrequenz senkrecht zum externen Magnetfeld eingestrahlt, können die Atomkernspins mit dem Magnetfeldvektor dieser, die Resonanzbedingung erfüllender Strahlung in Wechselwirkung treten. Die im rotierenden Koordinatensystem vorher in z-Richtung zeigende Magnetisierung wird im einfachsten Fall durch ein oszillierendes Magnetfeld geeigneter Dauer, einem sogenannten 90°-Impuls, in die x-y-Ebene "geklappt", in der sie anschließend durch Induktion ein messbares Signal in der NMR-Spule erzeugt.

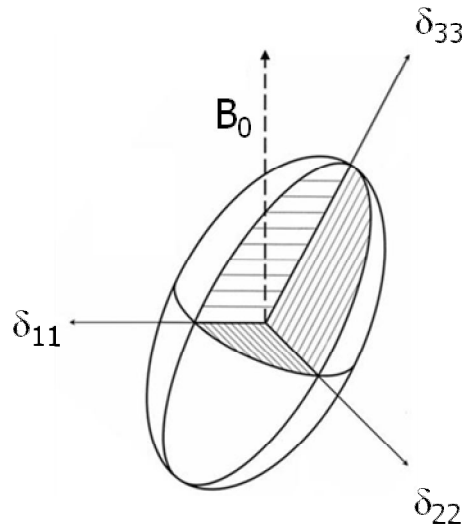
### *Die chemische Verschiebung*

Die den Atomkern umgebenden Elektronen treten ebenfalls mit dem externen Magnetfeld in Wechselwirkung und induzieren ein lokales Magnetfeld. Dadurch wird das externe Magnetfeld am Ort des Atomkerns, abhängig von der Molekülgeometrie und Elektronendichte, verstärkt oder abgeschwächt. Durch diese Wechselwirkung wird die Resonanzfrequenz des Atomkernspins geringfügig verschoben – ein Effekt, der als chemische Verschiebung bezeichnet wird. Da die chemische Verschiebung wesentlich kleiner ist als die Zeeman-Aufspaltung, wird sie in Millionstel der Larmorfrequenz (ppm, aus dem Englischen: parts per million= „Teile pro Million“) angegeben. Um die chemische Verschiebung unabhängig von der Magnetfeldstärke des NMR-Spektrometers angeben zu können, wird sie in Relation zu einer geeigneten Referenzsubstanz angegeben und ist definiert als:

$$\delta = [(v_0 - v_{\text{ref}})/v_{\text{ref}}] * 10^6.$$

$\delta$ = chemische Verschiebung,  $v_0$ = Resonanzfrequenz des entsprechenden Atomkerns,  $v_{\text{ref}}$ = Resonanzfrequenz der entsprechenden Referenzsubstanz.

Die Orientierungsabhängigkeit der chemischen Verschiebung lässt sich durch einen Tensor beschreiben, den sogenannten CSA-Tensor (aus dem Englischen: chemical shift anisotropy= Anisotropie der chemischen Verschiebung), der mathematisch durch eine 3x3-Matrix in einem gegebenen Koordinatensystem dargestellt und durch ein Ellipsoid veranschaulicht werden kann. In der folgenden Abbildung ist ein solches Ellipsoid dargestellt.



**Abb. 3.2:** Als Ellipsoid dargestellter CSA-Tensor.  $B_0$  = externes Magnetfeld,  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$  und  $\delta_{33}$  = Tensorkomponenten.

Die in Abbildung 3.1 dargestellten Tensorkomponenten  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$  und  $\delta_{33}$  sind definiert als:

$$\delta_{11} \geq \delta_{22} \geq \delta_{33},$$

wobei  $\delta_{33}$  die am meisten und  $\delta_{11}$  die am wenigsten abgeschirmte Komponente ist.

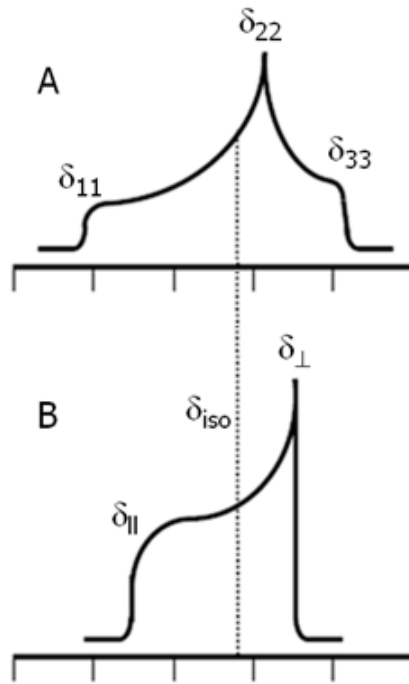
In einer unorientierten Probe nehmen die Moleküle alle im Raum möglichen Orientierungen an. Wird eine Raumrichtung durch eine schnelle Bewegung der Lipidmoleküle um die eigene Achse ausgemittelt, resultiert ein axialsymmetrischer CSA-Tensor mit nur zwei Tensorkomponenten. Bewegen sich die Moleküle in einer Probe schnell um alle Raumrichtungen, werden die den Atomkern umgebenden Elektronenhüllen gemittelt. Dieser sogenannte isotrope Wert ist definiert als:

$$\delta_{\text{iso}} = (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33})/3.$$

$\delta_{\text{iso}}$  = isotroper Wert,  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$  und  $\delta_{33}$  = Tensorkomponenten.

In einer orientierten Probe hingegen nehmen die Moleküle nur bestimmte Orientierungen an.

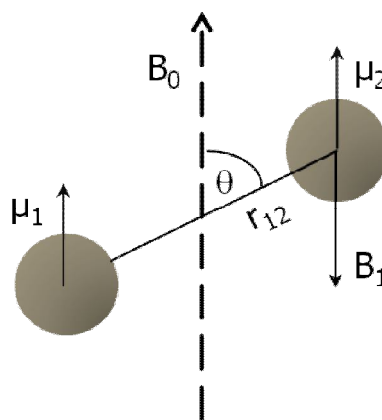
In der folgenden Abbildung sind für unorientierte Proben charakteristische Festkörper-NMR-Spektren, sogenannte Pulverspektren, dargestellt.



**Abb. 3.3:** Charakteristische Pulverspektren einer unorientierten Probe A) ohne Bewegungsausmittelung (nicht-axialsymmetrischer CSA-Tensor) und B) mit Bewegungsausmittelung (axialsymmetrischer CSA-Tensor).  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$ ,  $\delta_{33}$ ,  $\delta_{||}$  und  $\delta_{\perp}$  = Tensorkomponenten,  $\delta_{iso}$  = isotroper Wert (nach Maisch, 2007).

### Die dipolare Kopplung

Das magnetische Moment eines Atomkerns beeinflusst das externe Magnetfeld am Ort eines zweiten, sich in direkter Nachbarschaft befindlichen Atomkerns. In der folgenden Abbildung ist die sogenannte dipolare Kopplung grafisch dargestellt.



**Abb. 3.4:** Dipolare Kopplung zwischen den Atomkernen 1 und 2.  $B_0$  = externes Magnetfeld,  $B_1$  = von Atomkern 1 verursachtes lokales Magnetfeld,  $\mu_1$  = magnetisches Moment des Atomkerns 1,  $\mu_2$  = magnetisches Moment des Atomkerns 2,  $r_{12}$  = Abstand zwischen den Atomkernen 1 und 2,  $\theta$  = Winkel zwischen der Verbindungsachse von Atomkern 1 und 2 sowie dem externen Magnetfeld.



Die dipolare Kopplung ist unabhängig von der Stärke des Magnetfeldes. Sie ist abhängig von dem Abstand der entsprechenden Atomkerne sowie dem Winkel zwischen ihrer Verbindungsachse und dem externen Magnetfeld ( Abbildung 3.4). Die Stärke der dipolaren Kopplung wird durch die Dipolkopplungskonstante beschrieben und ist definiert als:

$$\nu_{D0} = [\gamma_1 \gamma_2 \hbar \mu_0] / [4 \pi (r_{12})^3]$$

$\nu_{D0}$  = Dipolkopplungskonstante,  $\gamma_1$  = gyromagnetisches Verhältnis des Atomkerns 1,  $\gamma_2$  = gyromagnetisches Verhältnis des Atomkerns 2,  $\hbar$  = Plancksche Konstante,  $\mu_0$  = Permeabilitätskonstante des Vakuums,  $r_{12}$  = Abstand zwischen den Atomkernen 1 und 2.

An der Proportionalität zu  $r^3$  wird die geringe Reichweite der dipolaren Wechselwirkung deutlich.

### *Die quadrupolare Kopplung*

Ein Atomkern mit dem Kernspin  $I > 1/2$  besitzt neben dem magnetischen Moment ein zusätzliches-, sogenanntes Quadrupolmoment. Dieses wechselwirkt mit dem elektrischen Feldgradienten, der durch die den Atomkern umgebenden Elektronen erzeugt wird. Diese Wechselwirkung wird als quadrupolare Kopplung bezeichnet. Die Stärke der quadrupolaren Kopplung wird durch die Quadrupolkopplungskonstante beschrieben und ist definiert als:

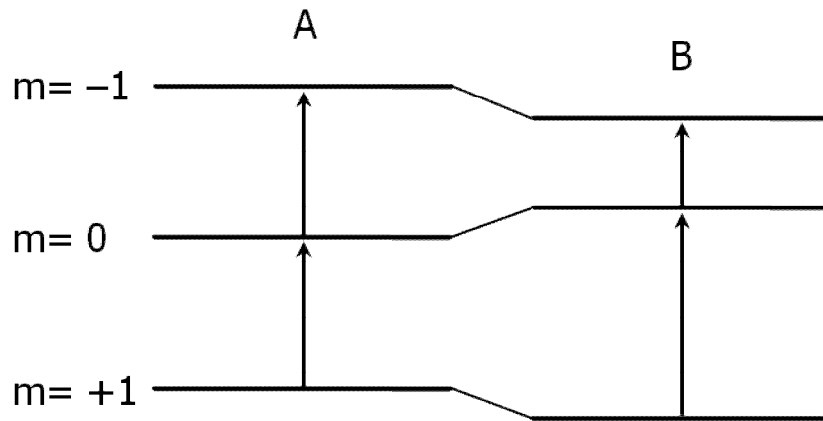
$$\chi_Q = [eq eQ] / h$$

$\chi_Q$  = Quadrupolkopplungskonstante,  $eq$  = elektrischer Feldgradient,  $eQ$  = elektrisches Quadrupolmoment,  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum.

Die quadrupolare Kopplung liegt auch bei Abwesenheit eines externen Magnetfeldes vor. Das Anlegen eines externen Magnetfeldes führt zu Elektronenübergängen. Da Atomkerne mit dem Kernspin  $I=1$  drei Energieniveaus besitzen, finden zwei Einquantenübergänge statt (Abbildung 3.5). Diese sind verglichen mit der Zeeman-Wechselwirkung energetisch entartet. Durch die quadrupolare Kopplung verschieben sich die Energieniveaus, so dass die Entartung der Einquantenübergänge aufgehoben wird (Abbildung 3.5) und in einem Festkörper-NMR-Spektrum zwei Resonanzlinien unterschiedlicher Resonanzfrequenzen resultieren. Über den Abstand dieser Resonanzfrequenzen kann die Quadrupolkopplungskonstante und somit die Stärke der quadrupolaren Kopplung bestimmt werden. Sie ist definiert als:

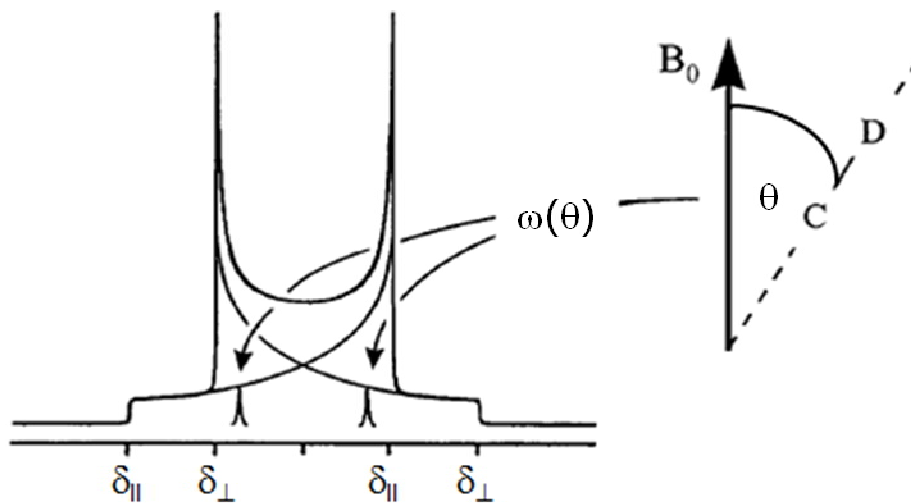
$$\chi_Q = 2 \Delta\nu_Q$$

$\chi_Q$  = Quadrupolkopplungskonstante,  $\Delta\nu_Q$  = Resonanzfrequenzabstand.



**Abb. 3.5:** A) Zeeman-Aufspaltung und B) Quadrupolare Aufspaltung eines Atomkerns mit dem Kernspin  $I=1$ .  $m$ = magnetische Quantenzahl.

In einer unorientierten Probe nimmt der Tensor des elektrischen Feldgradienten alle im Raum möglichen Orientierungen bezüglich des externen Magnetfeldes an. Die orientierungsabhängigen Resonanzfrequenzen liefern ein charakteristisches Pulverspektrum (Abbildung 3.6).

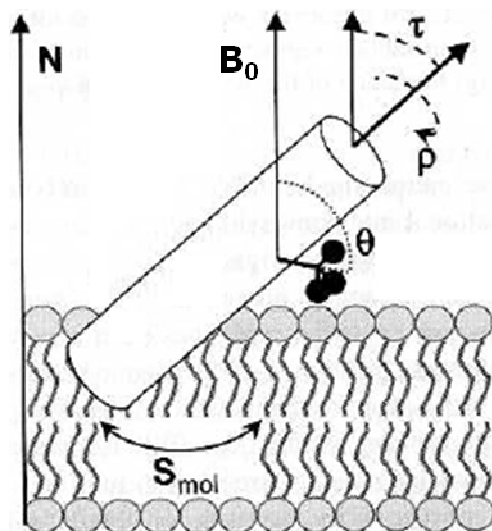


**Abb. 3.6:** Charakteristisches Pulverspektrum einer unorientierten Probe mit einer winkelabhängigen Resonanzfrequenzverteilung (nach Komoroski, 1986).  $B_0$ = externes Magnetfeld,  $\theta$ = Winkel zwischen der Verbindungsachse der entsprechenden Atomkerne und dem externen Magnetfeld,  $\omega(\theta)$ = Resonanzfrequenz als eine Funktion von  $\theta$ ,  $\delta_{||}$  und  $\delta_{\perp}$ = Tensorkomponenten.

In einer orientierten Probe hingegen resultiert ein Festkörper-NMR-Spektrum mit zwei Resonanzlinien und orientierungsabhängiger Aufspaltung.

### 3.2.6.2. Strukturaufklärung antimikrobieller Peptide

Für die Strukturaufklärung antimikrobieller Peptide mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie werden diese an geeigneten Stellen in der Aminosäuresequenz selektiv markiert. Die verwendeten Markierungen sind üblicherweise Isotope (z.B.  $^2\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$ ) und sollten weder die Struktur noch die Funktion des zu untersuchenden Peptides beeinflussen. Die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen liefern lokale Strukturparameter, die das untersuchte Peptid in einer Modellmembran beschreiben. Diese Strukturparameter basieren auf der bereits beschriebenen Abstands- und Orientierungsabhängigkeit der Kernspinwechselwirkungen im Festkörper. Die Anordnung und Dynamik eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides in einer Membran kann bereits durch wenige Strukturparameter beschrieben werden (Strandberg, 2004; Ulrich, 2005). In der folgenden Abbildung sind die Strukturparameter eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides schematisch dargestellt.

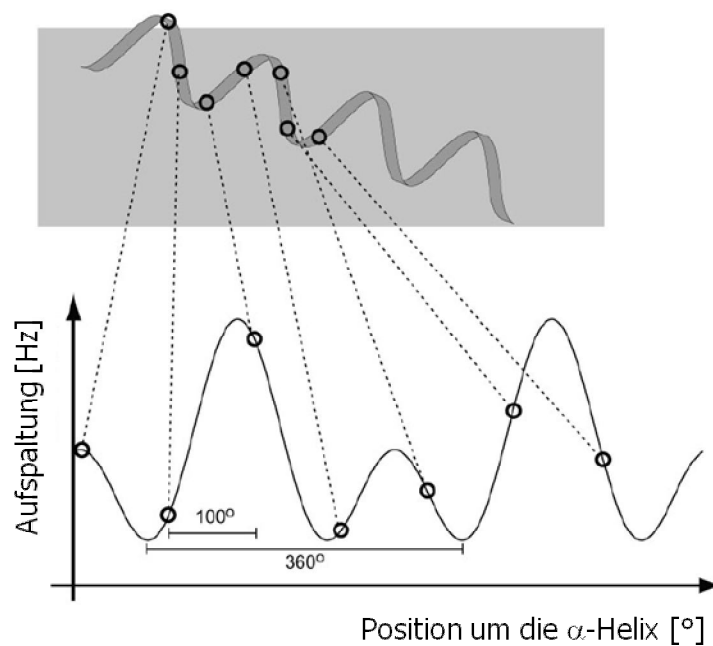


**Abb. 3.7:** Strukturparameter eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides (nach Ulrich, 2004). Das Peptid ist als Zylinder, seine Markierung als dreigeteilte Gabel mit einer Kugel an jedem Zacken dargestellt.  $B_0$ = externes Magnetfeld,  $N$ = Membrannormale,  $\theta$ = Winkel der Peptidmarkierung bezüglich des externen Magnetfeldes,  $\tau$ = Neigungswinkel,  $\rho$ = Rotationswinkel,  $S_{mol}$ = molekularer Ordnungsparameter.

Zu den drei wichtigen Strukturparametern eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides zählen der Neigungswinkel zwischen der Helixachse und der Membrannormale ( $\tau$ ), der Rotationswinkel um die Helixachse ( $\rho$ ) und der molekulare Ordnungsparameter ( $S_{mol}$ ), der die isotrope Ausmittelung durch die Bewegung beschreibt (Abbildung 3.7) (Afonin, 2004; Glaser, 2004; Strandberg, 2006).

Die Struktur eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides spiegelt sich insofern in dem erhaltenen Festkörper-NMR-Spektrum wieder, als die anhand dessen ermittelte dipolare (z.B.  $^{19}\text{F}$ -Markierung) bzw. quadrupolare (z.B.  $^2\text{H}$ -Markierung) Aufspaltung des gemessenen Atomkerns vom Winkel der jeweiligen Peptidmarkierung bezüglich des externen Magnetfeldes abhängt und dieser wiederum von  $\tau$ ,  $\rho$  und der jeweiligen markierten Position um die  $\alpha$ -Helix (Strandberg, 2004).

Die für mehrere markierte Mutanten eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides ermittelten dipolaren bzw. quadrupolaren Aufspaltungen werden als eine Funktion der markierten Position um die  $\alpha$ -Helix grafisch dargestellt. Der erstellte Graph ist eine Wellenkurve mit einer Periodizität von 3,6 Aminosäuren (Abbildung 3.8). Anhand dieser Wellenkurve werden mit Hilfe mathematischer Algorithmen die drei wichtigen Strukturparameter  $\tau$ ,  $\rho$  und  $S_{\text{mol}}$  ermittelt. Weiterhin wird ein Plot erstellt, in dem die mittlere quadratische Abweichung als eine Funktion von  $\rho$  und  $\tau$  dargestellt ist.



**Abb. 3.8:** Grafische Darstellung der für mehrere markierte Mutanten eines  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptides ermittelten dipolaren bzw. quadrupolaren Aufspaltungen als eine Funktion der markierten Position um die  $\alpha$ -Helix (nach Strandberg, 2004).

### **3.2.6.1. Orientierte Proben**

Das zu untersuchende Peptid sowie das gewünschte Lipid bzw. Lipidgemisch wurden im gewünschten Peptid/Lipid-Verhältnis abgewogen und in 400 µl einer Mischung aus Chloroform und MeOH (1:1) gelöst. Anschließend wurde die Peptid/Lipid-Suspension zu jeweils 20 µl auf 19 geeignete Glasplättchen pipettiert und unter Vakuum 24 h getrocknet. Danach wurden die Glasplättchen gestapelt, mit einem zusätzlichen Glasplättchen bedeckt und bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur des verwendeten Lipides bzw. Lipidgemisches und einer Luftfeuchtigkeit von 96% 48 h hydratisiert. Anschließend wurde die Probe in Parafilm und Klarsichtfolie gewickelt.

### **3.2.6.2. Multilamellare Lipidvesikel-Proben**

Das zu untersuchende Peptid sowie das gewünschte Lipid bzw. Lipidgemisch wurden im gewünschten Peptid/Lipid-Verhältnis abgewogen und in 200 µl einer Mischung aus Chloroform und MeOH (1:1) gelöst. Anschließend wurde die Peptid/Lipid-Suspension mit Stickstoff eingeeengt, der erhaltene Peptid/Lipid-Film unter Vakuum 24 h getrocknet und danach zu einer Endkonzentration von 1 mg/µl in Wasser aufgenommen – bei der Probenvorbereitung für die <sup>2</sup>H-Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde deuteriumarmes Wasser verwendet. Danach wurde die Peptid/Lipid-Suspension in flüssigem Stickstoff gefroren, in heißem Wasser wieder aufgetaut und anschließend gut durchmischt. Diese Schritte des Einfrierens, des Auftauens und des Durchmischens wurden siebenmal wiederholt. Die erhaltene homogene Peptid/Lipid-Suspension wurde anschließend doppelt in Einschweißfolie geschweißt.

## 4. Funktionelle Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides MSI-103 und weiterer kationischer, $\alpha$ -helikaler Peptide

Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse wurden veröffentlicht in:

Strandberg, E., Tiltak, D., Ieronimo, M., Kanithasen, N., Wadhvani, P. und Ulrich, A. S. (2007). Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic  $\alpha$ -helical peptides. *Pure Appl. Chem.* 79(4), 717-728.

Der Einfluss einer C-terminalen Amidierung auf die antimikrobielle und hämolytische Aktivität des MSI-103 sowie auf weitere kationische,  $\alpha$ -helikale Peptide wurde untersucht. Hierzu wurden Mutanten mit freiem COOH-Ende der antimikrobiellen Peptide PGLa, MSI-103 und MAP hergestellt und funktionell untersucht.

### 4.1. Ergebnisse

#### 4.1.1. Festphasenpeptidsynthese

Das antimikrobielle Peptid MSI-103 und seine C-terminale Mutante wurden größtenteils von Nathalie Kanithasen im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Kanithasen, 2005) synthetisiert. Die antimikrobiellen Peptide PGLa und MAP sowie ihre C-terminalen Mutanten wurden in der Gruppe von Dr. Parvesh Wadhvani synthetisiert.

In der folgenden Tabelle sind alle synthetisierten Peptide aufgeführt.

**Tab. 4.1:** Synthetisierte Peptide und ihre Aminosäuresequenz.

Synthetisiertes Peptid	Aminosäuresequenz
MSI-103	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>
MSI-103-COOH	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
PGLa-COOH	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL
MAP	KLALKLALKALKAALKLA-NH <sub>2</sub>
MAP-COOH	KLALKLALKALKAALKLA

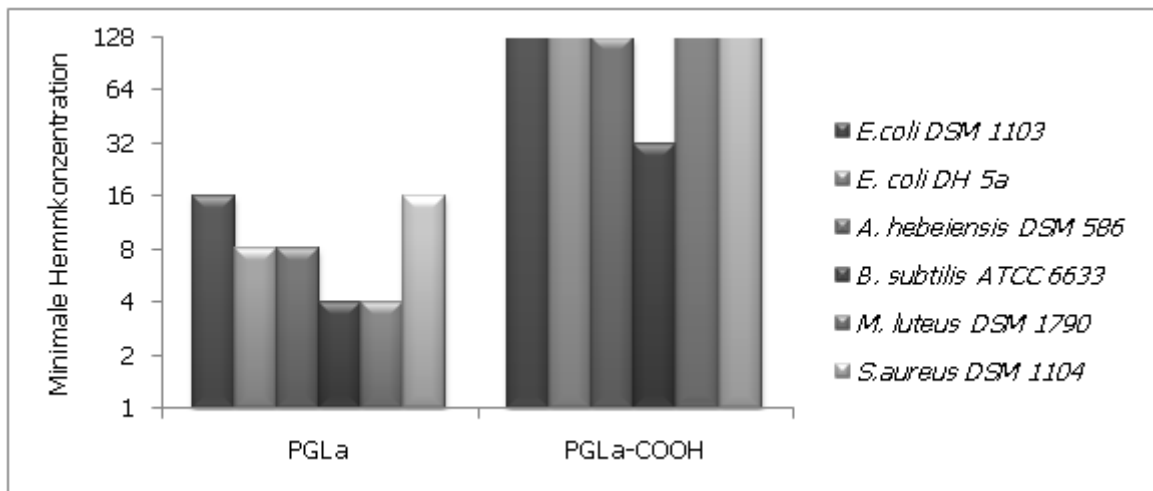
#### 4.1.2. Antimikrobieller Test

Die antimikrobielle Aktivität des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten wurde gegen drei gramnegative und vier grampositive Bakterienstämme getestet. Der antimikrobielle Test wurde mit einer Zweifach-Verdünnungsreihe des zu testenden Peptides durchgeführt, daher ist es nicht möglich genaue MHK-Werte anzugeben. Bereits geringe Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität zweier Peptide können zu um den Faktor zwei unterschiedlichen MHK-Werten führen. Für einen bedeutenden Unterschied müssen sich daher die MHK-Werte mindestens um den Faktor vier unterscheiden. Die maximale verwendete Peptidkonzentration beträgt 128 µg/ml. Wenn diese nicht antimikrobiell wirkt, wird das getestete Peptid als inaktiv gegen den getesteten Bakterienstamm betrachtet. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Tests sind im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 4.2:** Minimale Hemmkonzentrationen des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten.

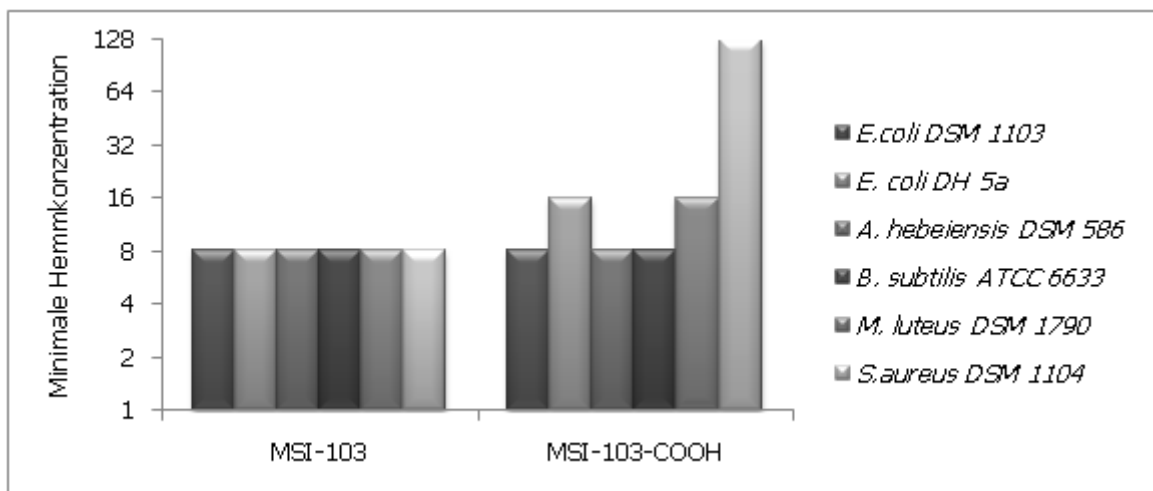
	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml]					
	PGLa	PGLa-COOH	MSI-103	MSI-103-COOH	MAP	MAP-COOH
<b>Gramnegativ</b>						
<i>E.coli</i> DSM 1103	16	>128	8	8	128	>128
<i>E. coli</i> DH 5α	8	>128	8	16	8	>128
<i>A. hebeiensis</i> DSM 586	8	128	8	8	16	>128
<b>Grampositiv</b>						
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	4	32	8	8	4	>128
<i>M. luteus</i> DSM 1790	4	>128	8	16	2	>128
<i>S.aureus</i> DSM 1104	16	>128	8	128	32	>128
<i>K. rhizophila</i> DSM 348	>128	>128	64	>128	>128	>128

Aus Tabelle 4.2 geht hervor, dass die minimalen Hemmkonzentrationen der C-terminalen Mutanten – mit Ausnahme von MSI-103-COOH – deutlich höher sind als die des jeweiligen Wildtyps. Die Ergebnisse des antimikrobiellen Tests gegen *K. rhizophila* DSM 348 wurden in den folgenden Abbildungen nicht berücksichtigt, da außer MSI-103 alle getesteten Peptide inaktiv dagegen sind.



**Abb. 4.1:** Minimale Hemmkonzentrationen des PGLa und PGLa-COOH.

In Abbildung 4.1 ist erkennbar, dass die C-terminale Mutante des PGLa – im Gegensatz zum Wildtyp – gegen vier der sechs aufgeführten Bakterienstämme inaktiv ist. Gegen den gramnegativen Bakterienstamm *A. hebeiensis* DSM 586 ist sie nahezu inaktiv. Sie weist lediglich gegen den grampositiven Bakterienstamm *B. subtilis* ATCC 6633 nennenswerte antimikrobielle Aktivität auf – allerdings eine geringere als der Wildtyp.

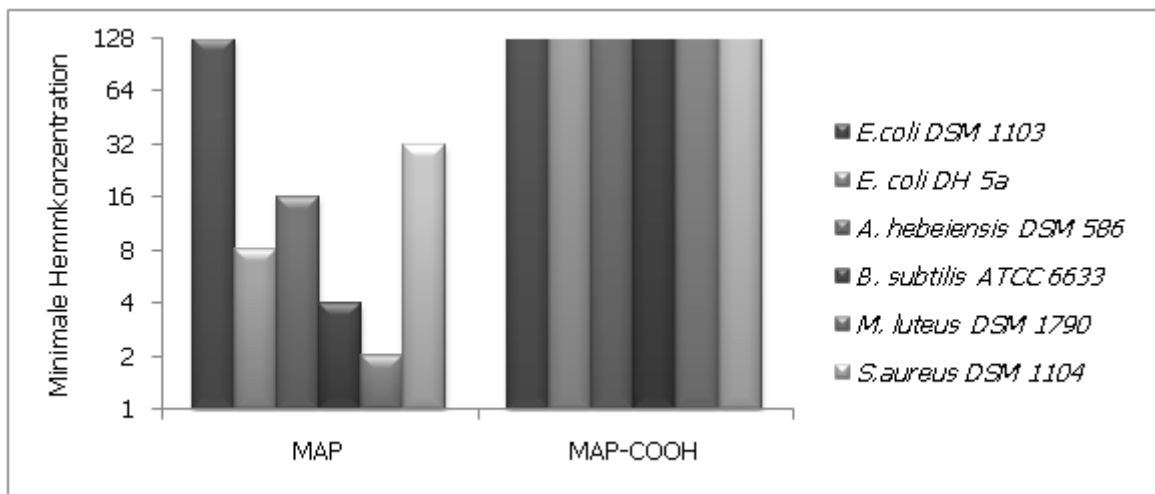


**Abb. 4.2:** Minimale Hemmkonzentrationen des MSI-103 und MSI-103-COOH.

Aus Abbildung 4.2 wird deutlich, dass die C-terminale Mutante des MSI-103 – ebenso wie der Wildtyp – gegen alle sechs aufgeführten Bakterienstämme aktiv ist. Die minimalen Hemmkonzentrationen der C-terminalen Mutante entsprechen bei drei der sechs aufgeführten Bakterienstämme denen des Wildtyps. Gegen den gramnegativen Bakterienstamm *E. coli* DH 5α und den grampositiven Bakterienstamm *M. luteus* DSM 1790



weist sie eine geringere antimikrobielle Aktivität auf. Gegen den grampositiven Bakterienstamm *S.aureus* DSM 1104 ist sie nahezu inaktiv.



**Abb. 4.3:** Minimale Hemmkonzentrationen des MAP und MAP-COOH.

In Abbildung 4.3 ist ersichtlich, dass die C-terminale Mutante des MAP – im Gegensatz zum Wildtyp – gegen alle sechs aufgeführten Bakterienstämme inaktiv ist.

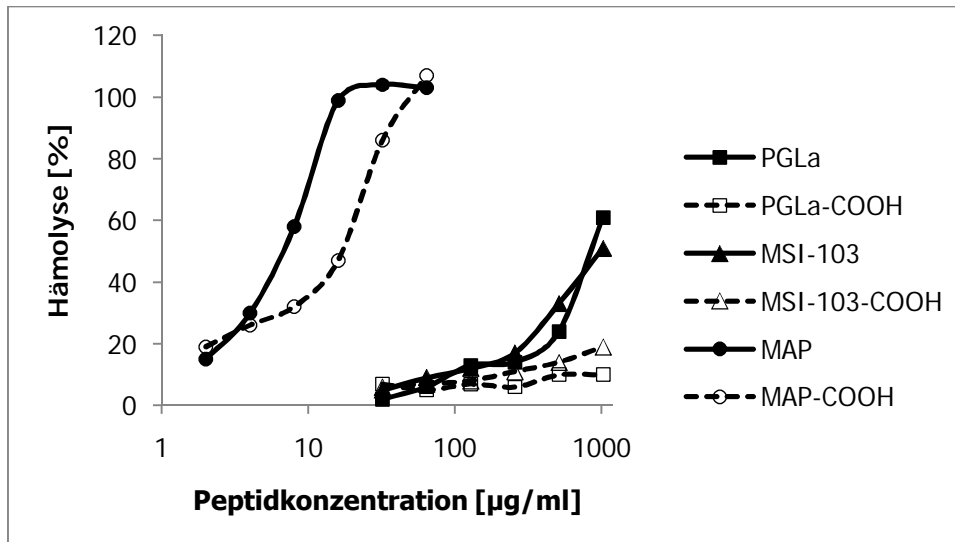
#### 4.1.3. Hämolysetest

Die Hämolysetests des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten wurden von Dr. Marco Ieronimo im Rahmen einer gemeinsamen Veröffentlichung (Strandberg, 2007) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Hämolysetests sind im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 4.3:** Hämolytische Aktivität des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten.

AMP	Hämolyse [%]					
	32 µg/ml	64 µg/ml	128 µg/ml	256 µg/ml	512 µg/ml	1024 µg/ml
PGLa	2	6	13	14	24	61
PGLa-COOH	7	5	7	6	10	10
MSI-103	5	9	12	17	33	51
MSI-103-COOH	6	7	8	11	14	19
	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml
MAP	15	30	58	99	104	103
MAP-COOH	19	26	32	47	86	107



**Abb. 4.4:** Hämolytische Aktivität des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten.

Aus Tabelle 4.3 und Abbildung 4.4 geht hervor, dass bei allen drei Peptiden die C-terminale Mutante geringer hämolytisch aktiv ist als der jeweilige Wildtyp. PGLa und MSI-103 sowie PGLa-COOH und MSI-103-COOH weisen jeweils eine vergleichbare hämolytische Aktivität auf. MAP und MAP-COOH weisen eine deutlich höhere hämolytische Aktivität auf als die übrigen getesteten Peptide. MAP löst bei Peptidkonzentrationen im Bereich der gegen die meisten getesteten Bakterienstämme erhaltenen MHK-Werte 100% Hämolyse aus.

## 4.2. Diskussion

Die antimikrobiellen Tests des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten haben ergeben, dass die Mutanten – mit Ausnahme von MSI-103-COOH, das gegen fünf der sieben getesteten Bakterienstämme vergleichbare MHK-Werte wie der Wildtyp aufweist – ihre antimikrobielle Aktivität bezüglich des jeweiligen Wildtyps vollständig verlieren. Ein carboxylierter C-Terminus scheint somit einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der Peptide zu haben. Dieser Einfluss ist durch Faktoren wie die Ladung der Peptide bedingt. Mit zunehmender positiver Ladung der Peptide nimmt auch ihre antimikrobielle Aktivität zu, mit abnehmender positiver Ladung der Peptide nimmt auch ihre antimikrobielle Aktivität ab (Dathe, 2001; Giangaspero, 2001; Zelezetsky, 2006). In der folgenden Tabelle sind die Ladungen der getesteten antimikrobiellen Peptide aufgeführt.

**Tab. 4.4:** Ladungen der getesteten antimikrobiellen Peptide.

AMP	Ladung
MSI-103	+7
MSI-103-COOH	+6
PGLa	+5
PGLa-COOH	+4
MAP	+6
MAP-COOH	+5

Die getesteten antimikrobiellen Peptide mit amidierem C-Terminus besitzen eine höhere positive Ladung als die mit carboxyliertem C-Terminus. Dies erklärt die höhere antimikrobielle Aktivität des jeweiligen Wildtyps gegenüber seiner C-terminalen Mutante. Die höhere positive Ladung von MSI-103-COOH gegenüber PGLa-COOH und MAP-COOH erklärt ebenso seine höhere antimikrobielle Aktivität. Allerdings besitzt PGLa dieselbe positive Ladung wie MAP-COOH, ist aber stärker antimikrobiell aktiv. Weiterhin sind PGLa und MSI-103 vergleichbar antimikrobiell aktiv, sind aber unterschiedlich positiv geladen. Zudem ist der Ladungsunterschied zwischen dem jeweiligen Wildtyp und seiner C-terminalen Mutante gleich groß, aber der Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität ist bei MSI-103 viel geringer als bei PGLa und MAP. Somit ist die Ladung von Peptiden ein Faktor, der ihre antimikrobielle Aktivität beeinflussen kann – allerdings spielen dabei offensichtlich noch weitere Faktoren eine Rolle.

Die Hämolysetests des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten haben ergeben, dass die Mutanten geringere prozentuale Hämolysewerte als der jeweilige Wildtyp aufweisen. Ein carboxylierter C-Terminus scheint somit auch einen Einfluss auf die hämolytische Aktivität der Peptide zu haben. Dieser Einfluss ist *zum Einen* bedingt durch die Veränderung der Hydrophobizität der Peptide durch die Modifizierung ihres C-Terminus. Mit zunehmender Hydrophobizität der Peptide nimmt auch ihre hämolytische Aktivität zu, mit abnehmender Hydrophobizität der Peptide nimmt auch ihre hämolytische Aktivität ab (Chen, 2005; Dathe, 1997; Kondejewski, 1999). Die Mutanten mit carboxyliertem C-Terminus besitzen eine geringere Hydrophobizität als der jeweilige Wildtyp mit amidierem C-Terminus und sind daher auch weniger hämolytisch aktiv. MAP bzw. MAP-COOH ist viel hydrophober als PGLa und MSI-103 bzw. PGLa-COOH und MSI-103-COOH und weist daher auch eine viel höhere hämolytische Aktivität auf. *Zum Anderen* ist der Einfluss des carboxylierten C-Terminus auf die hämolytische Aktivität der Peptide bedingt durch die Stabilität ihrer  $\alpha$ -Helices. Mit zunehmender Stabilität der  $\alpha$ -Helices nimmt auch die hämolytische Aktivität der Peptide zu, mit abnehmender Stabilität der  $\alpha$ -Helices nimmt auch die hämolytische Aktivität

der Peptide ab. Die Stabilität der  $\alpha$ -Helices wiederum ist bedingt durch die Anzahl der Glycine in der Aminosäuresequenz der Peptide. Mit zunehmender Anzahl an Glycinen in der Aminosäuresequenz nimmt die Stabilität der  $\alpha$ -Helices ab, mit abnehmender Anzahl an Glycinen in der Aminosäuresequenz nimmt die Stabilität der  $\alpha$ -Helices zu (Giangaspero, 2001; Oren, 2002; Zelezetsky, 2006). MAP bzw. MAP-COOH enthält kein Glycin in seiner Aminosäuresequenz (Tabelle 4.1) und ist daher viel stabiler als PGLa und MSI-103 bzw. PGLa-COOH und MSI-103-COOH. Daher weist MAP bzw. MAP-COOH auch eine viel höhere hämolytische Aktivität als PGLa und MSI-103 bzw. PGLa-COOH und MSI-103-COOH auf. Allerdings weist der jeweilige Wildtyp gegenüber seiner C-terminalen Mutante – wenn auch einen geringen – Unterschied in der hämolytischen Aktivität auf, obwohl beide dieselbe Anzahl an Glycinen in ihrer Aminosäuresequenz enthalten (Tabelle 4.1) und ihre  $\alpha$ -Helices daher gleich stabil sind.

Um ein Maß für die Sicherheit der untersuchten antimikrobiellen Peptide als potenzielle Antibiotika zu erhalten, wurde ihr therapeutischer Index gegen sechs der getesteten Bakterienstämme berechnet. Der therapeutische Index gibt das Verhältnis der therapeutischen zu der toxischen Dosis eines Arzneimittels an und ist der Quotient aus der Peptidkonzentration, die 10% Hämolyse auslöst und dem gegen den entsprechenden Bakterienstamm erhaltenen MHK-Wert. In der folgenden Tabelle sind die therapeutischen Indices für die untersuchten antimikrobiellen Peptide gegen sechs der getesteten Bakterienstämme aufgeführt.

**Tab. 4.5:** Therapeutische Indices für die untersuchten antimikrobiellen Peptide.

	Therapeutischer Index					
	PGLa	PGLa-COOH	MSI-103	MSI-103-COOH	MAP	MAP-COOH
<b>Gramnegativ</b>						
<i>E. coli</i> DSM 1103	6,2	2	11	<b>27</b>	0,01	0,004
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$	12	2	11	<b>13</b>	0,17	0,004
<i>A. hebeiensis</i> DSM 586	12	4	11	<b>27</b>	0,083	0,004
<b>Grampositiv</b>						
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24	16	11	<b>27</b>	0,33	0,004
<i>M. luteus</i> DSM 1790	24	2	11	<b>13</b>	0,67	0,004
<i>S. aureus</i> DSM 1104	6,2	2	<b>11</b>	1,7	0,042	0,004

In Tabelle 4.5 ist erkennbar, dass MSI-103-COOH gegen nahezu alle aufgeführten Bakterienstämme den größten therapeutischen Index aufweist. Es bekämpft somit die entsprechenden Infektionserreger am effektivsten und greift dabei am wenigsten die wirtseigenen Zellen an. Lediglich gegen den grampositiven Bakterienstamm *S.aureus* DSM 1104 weist MSI-103 den größten therapeutischen Index auf.

Die funktionellen Untersuchungen des PGLa, MSI-103 und MAP sowie ihrer C-terminalen Mutanten haben ergeben, dass a) PGLa, MSI-103 und MAP eine nennenswerte antimikrobielle Aktivität gegen die meisten getesteten Bakterienstämme aufweisen aber auch hämolytisch sehr aktiv sind – MAP löst sogar bei Peptidkonzentrationen im Bereich der gegen die meisten getesteten Bakterienstämme erhaltenen MHK-Werte 100% Hämolyse aus, b) PGLa-COOH eine geringe hämolytische Aktivität aufweist aber gegen die meisten getesteten Bakterienstämme nahezu inaktiv ist, c) MAP-COOH gegen alle getesteten Bakterienstämme inaktiv ist und zudem eine hohe hämolytische Aktivität aufweist und d) MSI-103-COOH nahezu dieselbe antimikrobielle Aktivität gegen alle getesteten Bakterienstämme wie der Wildtyp aufweist aber im Gegensatz zum Wildtyp geringfügig hämolytisch aktiv ist. Zusammenfassend bedeutet dies, dass MSI-103-COOH im Gegensatz zu MSI-103, PGLa, PGLa-COOH, MAP und MAP-COOH ein potenzielles neues Antibiotikum darstellt, das effektiv gegen Infektionserreger wirkt und dabei wenig Nebenwirkungen aufweist.

## 5. Strukturelle Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides MSI-103

*Ein Teil der in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse wurden veröffentlicht in:*

*Strandberg, E., Kanithasen, N., Tiltak, D., Bürck, J., Wadhvani, P., Zwernemann, O. und Ulrich, A. S. (2008). Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its parent peptide PGLa in lipid bilayers. Biochemistry 47(8), 2601-2616.*

Der Wirkmechanismus des antimikrobiellen Peptides MSI-103 beruht vermutlich auf der Bildung transmembraner Poren (Toke, 2004 b). Um Aussagen über den strukturellen Aufbau dieser Poren und somit über die genauere Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptides treffen zu können, wurde es OCD- und Festkörper-NMR-spektroskopisch untersucht. Für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden verschiedene Seitenkettenmutanten des MSI-103 hergestellt, in denen jeweils eine in Frage kommende Aminosäure durch eine deuterierte bzw. fluorierte Aminosäure substituiert wurde. Um zu gewährleisten, dass die durch Einführung einer Deuterium- bzw. Fluormarkierung modifizierten Peptide ihre Struktur und Funktion im Vergleich zur natürlichen Form beibehalten, wurden funktionelle Untersuchungen (antimikrobieller Test und Hämolysetest) sowie qualitative Strukturanalysen (CD-Spektroskopie) durchgeführt. Anschließend wurden die MSI-103-Mutanten in Modellmembranen unter verschiedenen Bedingungen (Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses, der Temperatur) mittels  $^2\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR untersucht.

## 5.1. Ergebnisse

### 5.1.1. Festphasenpeptidsynthese

Das antimikrobielle Peptid MSI-103 sowie seine  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten wurden größtenteils von Nathalie Kanithasen im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Kanithasen, 2005) synthetisiert.

In der folgenden Tabelle sind alle synthetisierten Peptide aufgeführt.

**Tab. 5.1:** Synthetisierte Peptide, ihre Aminosäuresequenz und die jeweils substituierte Aminosäure.

Synthetisiertes Peptid	Aminosäuresequenz	Substituierte Aminosäure
MSI-103	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	-
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 7	KIAGKI- <b>CF<sub>3</sub>-Phg</b> -KIAGKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ala 7
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 9	KIAGKIAK- <b>CF<sub>3</sub>-Phg</b> -AGKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ile 9
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 10	KIAGKIAKI- <b>CF<sub>3</sub>-Phg</b> -GKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ala 10
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 11	KIAGKIAKIA- <b>CF<sub>3</sub>-Phg</b> -KIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Gly 11
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 13	KIAGKIAKIAGK- <b>CF<sub>3</sub>-Phg</b> -AKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ile 13
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 7	KIAGKI- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -KIAGKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ala 7
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 9	KIAGKIAK- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -AGKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ile 9
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 10	KIAGKIAKI- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -GKIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ala 10
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 11	KIAGKIAKIA- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -KIAKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Gly 11
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 13	KIAGKIAKIAGK- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -AKIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ile 13
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 14	KIAGKIAKIAGKI- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -KIAGKIA-NH <sub>2</sub>	Ala 14
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 17	KIAGKIAKIAGKIAKI- <b>Ala-d<sub>3</sub></b> -GKIA-NH <sub>2</sub>	Ala 17

### 5.1.2. Antimikrobieller Test

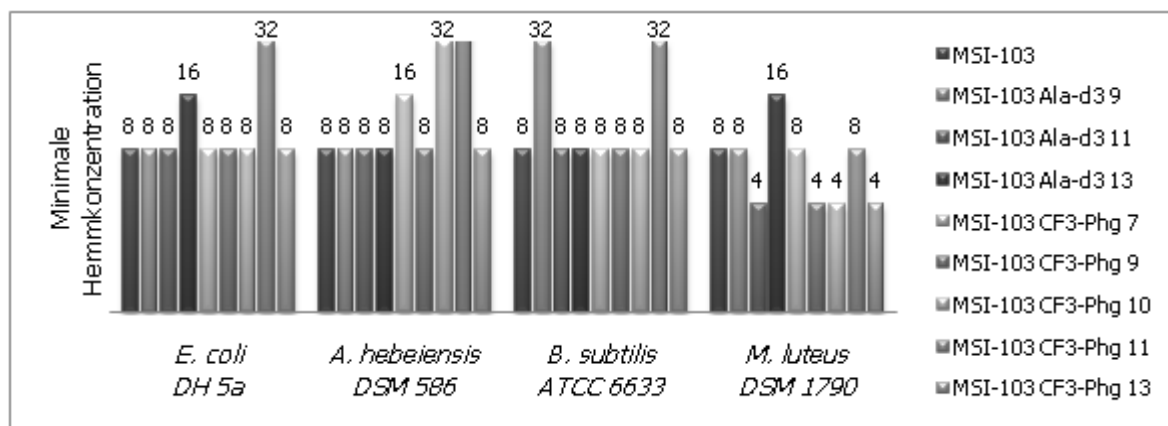
Die antimikrobiellen Tests des MSI-103 sowie seiner  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten wurden größtenteils von Nathalie Kanithasen im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Kanithasen, 2005) durchgeführt.

Die antimikrobielle Aktivität des MSI-103 sowie seiner  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten wurde gegen zwei gramnegative und zwei grampositive Bakterienstämme getestet. Die  $^2\text{H}$ -Mutanten, bei denen ein Alanin aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon Ala-d<sub>3</sub> substituiert wurde, wurden aufgrund der unveränderten Sequenz nicht getestet. Der antimikrobielle Test wurde mit einer Zweifach-Verdünnungsreihe des zu testenden Peptides durchgeführt, daher ist es nicht möglich genaue MHK-Werte anzugeben. Bereits geringe Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität zweier Peptide können zu um den Faktor zwei unterschiedlichen MHK-Werten führen. Für einen bedeutenden Unterschied

müssen sich daher die MHK-Werte mindestens um den Faktor vier unterscheiden. Die maximale verwendete Peptidkonzentration beträgt 128 µg/ml. Wenn diese nicht antimikrobiell wirkt, wird das getestete Peptid als inaktiv gegen den getesteten Bakterienstamm betrachtet. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Tests sind im Folgenden aufgeführt.

**Tab. 5.2:** Minimale Hemmkonzentrationen des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten.

	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml]									
	MSI-103	MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 9	MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 11	MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 13	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 7	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 9	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 10	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 11	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 13	
<b>Gramnegativ</b>										
<i>E. coli</i> DH 5α	8	8	8	16	8	8	8	32	8	
<i>A. hebeiensis</i> DSM 586	8	8	8	8	16	8	32	128	8	
<b>Grampositiv</b>										
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8	32	8	8	8	8	8	32	8	
<i>M. luteus</i> DSM 1790	8	8	4	16	8	4	4	8	4	



**Abb. 5.1:** Minimale Hemmkonzentrationen des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten.

Aus Tabelle 5.2 und Abbildung 5.1 wird deutlich, dass die minimalen Hemmkonzentrationen der getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 11 – bei mindestens zwei der vier getesteten Bakterienstämme denen des Wildtyps entsprechen. Die Mutante MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 9 weist eine geringere Aktivität gegen den grampositiven Bakterienstamm *B. subtilis* ATCC 6633 auf. Die Mutanten MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 11, MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 9 und MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 13 sind gegen den grampositiven Bakterienstamm *M. luteus* DSM 1790 geringfügig höher aktiv. Die Mutante MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 13 besitzt eine leicht höhere Aktivität gegen den gramnegativen Bakterienstamm *E. coli* DH 5α und den grampositiven Bakterienstamm *M. luteus* DSM 1790. Die Mutante MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 7 ist etwas geringer aktiv gegen den gramnegativen Bakterienstamm *A. hebeiensis* DSM 586. Die Mutante MSI-



103 CF<sub>3</sub>-Phg 10 weist eine geringere Aktivität gegen den gramnegativen Bakterienstamm *A. hebeiensis* DSM 586 und eine geringfügig höhere Aktivität gegen den grampositiven Bakterienstamm *M. luteus* DSM 1790 auf. Die Mutante MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 11 weist lediglich gegen den grampositiven Bakterienstamm *M. luteus* DSM 1790 dieselbe antimikrobielle Aktivität wie der Wildtyp auf.

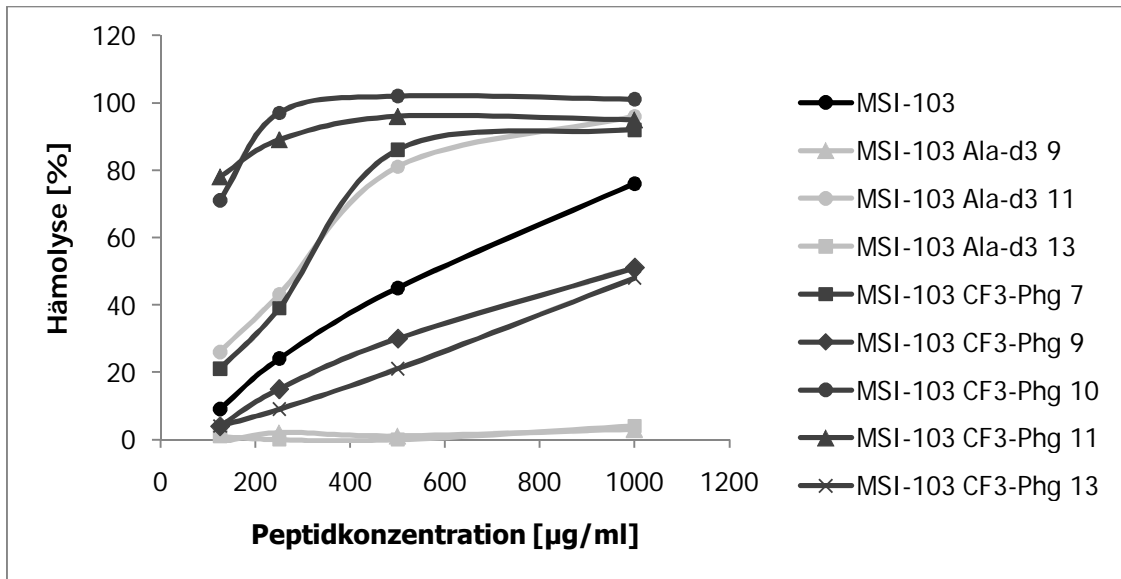
### 5.1.3. Hämolysetest

Die Hämolysetests des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten wurden größtenteils von Nathalie Kanithasen im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Kanithasen, 2005) durchgeführt.

Die hämolytische Aktivität des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten wurde getestet. Die <sup>2</sup>H-Mutanten, bei denen ein Alanin aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon Ala-d<sub>3</sub> substituiert wurde, wurden aufgrund der geringfügigen Veränderung nicht getestet. Die Ergebnisse der Hämolysetests sind im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 5.3:** Hämolytische Aktivität des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten.

AMP	Hämolyse [%]			
	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
MSI-103	9	24	45	76
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 9	-1	2	1	3
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 11	26	43	81	96
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 13	1	0	0	4
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 7	21	39	86	92
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 9	4	15	30	51
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 10	71	97	102	101
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 11	78	89	96	95
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 13	4	9	21	48



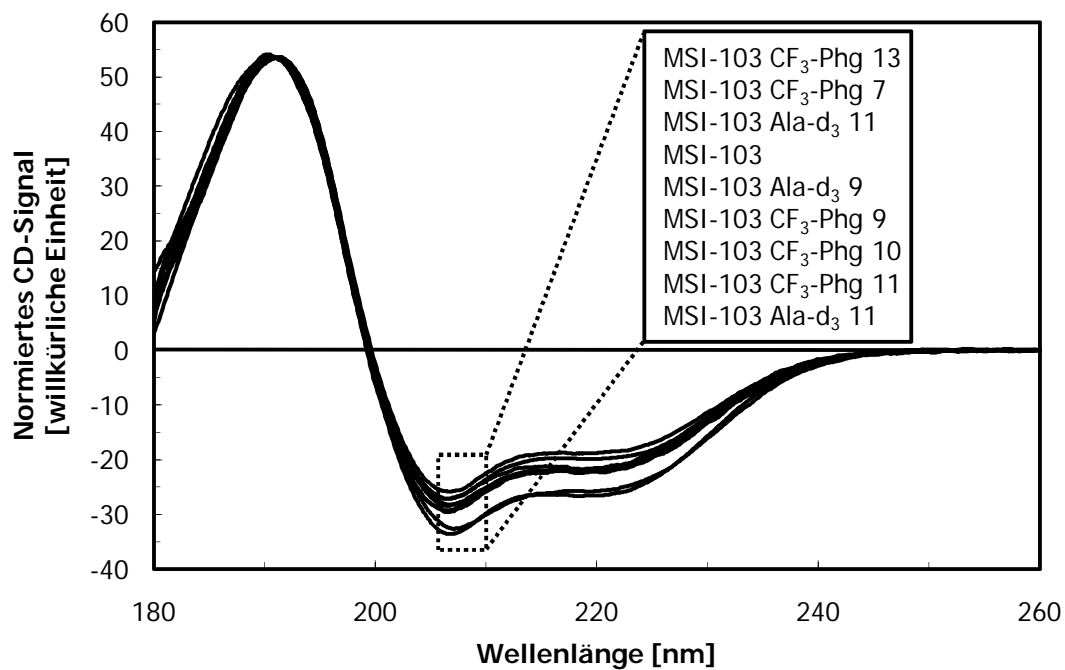
**Abb. 5.2:** Hämolytische Aktivität des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten.

In Tabelle 5.3 und Abbildung 5.2 ist ersichtlich, dass alle getesteten Seitenkettenmutanten – ebenso wie der Wildtyp – mit steigender Peptidkonzentration eine höhere prozentuale Hämolyse hervorrufen. Die Mutanten MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 11, MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 7, MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 10 sowie MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 11 sind höher hämolytisch aktiv als der Wildtyp und rufen bereits bei einer Peptidkonzentration von 500 µg/ml eine nahezu maximale prozentuale Hämolyse hervor. Die Mutanten MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 9, MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 13, MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 9 sowie MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 13 sind geringer hämolytisch aktiv als der Wildtyp. Die Mutanten MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 9 und MSI-103 Ala-d<sub>3</sub> 13 rufen auch bei einer Peptidkonzentration von 1000 µg/ml nahezu keine Hämolyse hervor.

#### 5.1.4. CD-Spektroskopie

Die CD-spektroskopischen Messungen des antimikrobiellen Peptides MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten wurden von Dr. Jochen Bürck im Rahmen einer gemeinsamen Veröffentlichung (Strandberg, 2008) durchgeführt.

Die Sekundärstruktur des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten wurde in einer Membran-imitierenden Umgebung aus TFE bestimmt. Die <sup>2</sup>H-Mutanten, bei denen ein Alanin aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon Ala-d<sub>3</sub> substituiert wurde, wurden aufgrund der unveränderten Sequenz nicht CD-spektroskopisch untersucht. In der folgenden Abbildung sind die erhaltenen CD-Spektren aufgeführt.

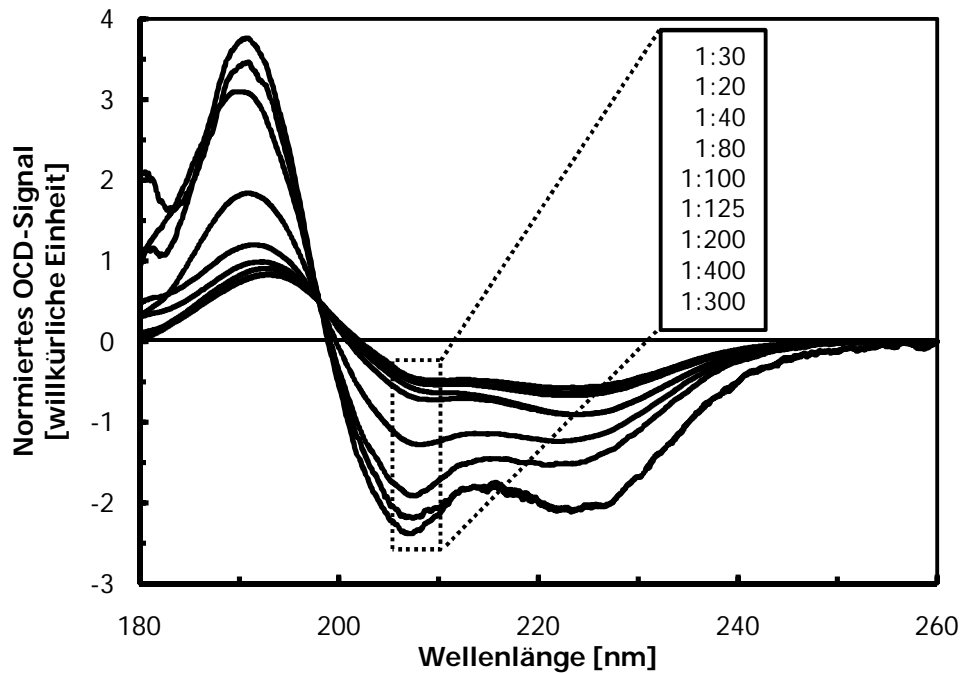


**Abb. 5.3:** CD-Spektren des MSI-103 sowie seiner <sup>19</sup>F- und <sup>2</sup>H-Mutanten in TFE/Phosphatpuffer (1:1). Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 191 nm auf einen einheitlichen Wert normiert. In dem vergrößerten Ausschnitt ist die Reihenfolge der Spektren wiedergegeben.

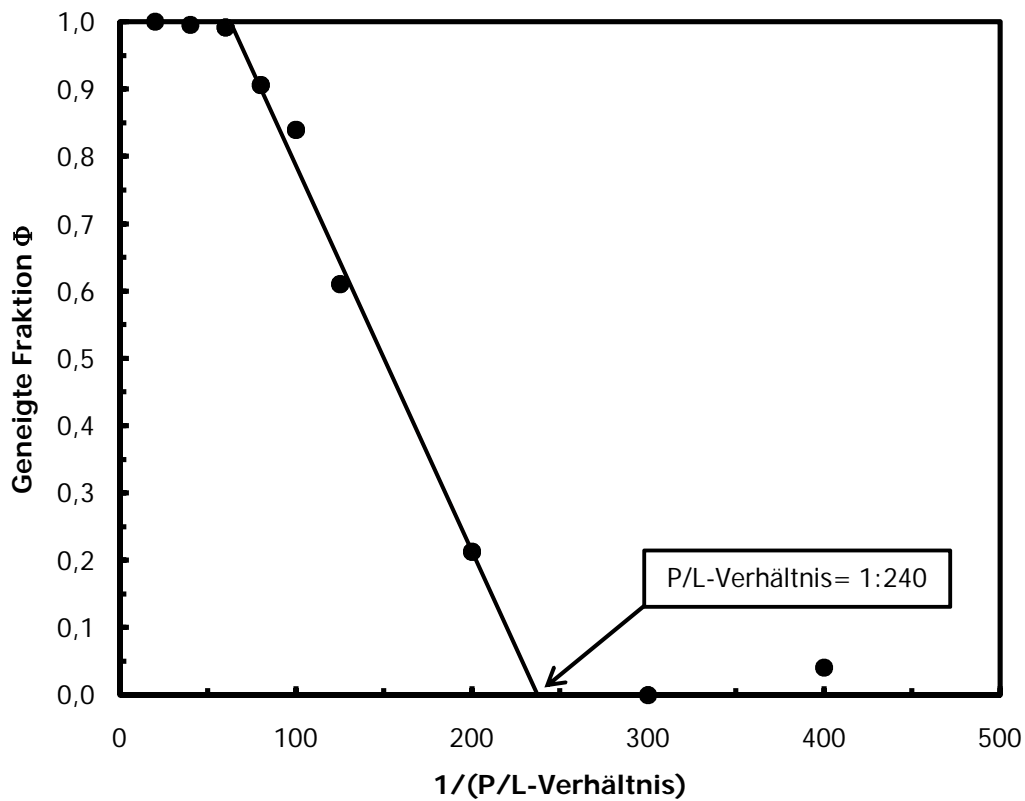
Aus Abbildung 5.3 geht hervor, dass alle getesteten Seitenkettenmutanten eine vergleichbare Linienform im CD-Spektrum wie der Wildtyp aufweisen. Diese ist charakteristisch für einen Hauptanteil an  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelementen.

### 5.1.5. OCD-Spektroskopie

Die Orientierung des MSI-103 wurde in Modellmembranen bestehend aus DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, bestimmt. Die Ergebnisse der OCD-Spektroskopie sind im Folgenden aufgeführt.



**Abb. 5.4:** OCD-Spektren des MSI-103 in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 198 nm auf einen einheitlichen Wert normiert. In dem vergrößerten Ausschnitt ist die Reihenfolge der Spektren wiedergegeben.



**Abb. 5.5:** Grafische Darstellung der geneigten Fraktion des MSI-103 in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, als eine Funktion der Peptidkonzentration.

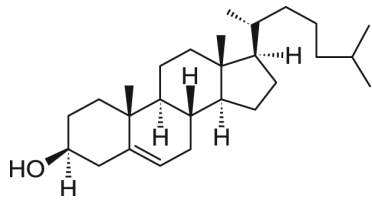
In den Abbildungen 5.4 und 5.5 ist erkennbar, dass MSI-103 bei geringen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im S-Zustand charakteristische Linienform im OCD-Spektrum aufweist und bei hohen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im T-Zustand charakteristische Linienform. Bei dazwischenliegenden Peptidkonzentrationen liegt das antimikrobielle Peptid in verschiedenen Mischungen aus S- und T-Zustand vor. Aus Abbildung 5.5 wird deutlich, dass der Übergang des MSI-103 aus dem S- in den T-Zustand bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:240 beginnt.

### 5.1.6. Festkörper-NMR-Spektroskopie

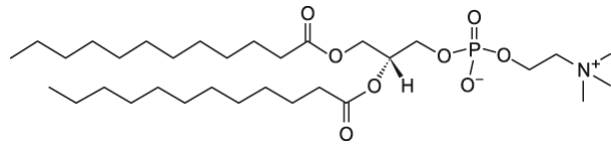
Die genauere Orientierung des MSI-103 anhand der Bestimmung der Strukturparameter  $\tau$ ,  $\rho$  und  $S_{\text{mol}}$  erfolgte in verschiedenen Modellmembranen, unter Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses sowie der Temperatur. Die verwendeten Lipide sind im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 5.4:** Verwendete Lipide, ihre Acylketten und Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase. Zahlen mit vorangestelltem c beschreiben das C-Atom, welches mit dem darauf folgenden eine C=C-Doppelbindung ausbildet.  $T_{\text{Ü}}$  = Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase.

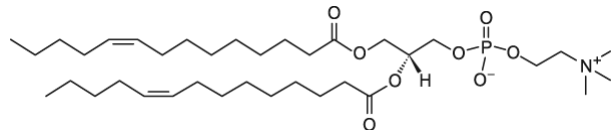
Lipid	C-Ketten	$T_{\text{Ü}}$ [°C]
CHOL (= Cholesterin)	-	-
DLPC (= 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin)	Di-12:0-PC	-1
DMoPC (= 1,2-Dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin)	Di-14:1c9-PC	< -20
DMPC (= 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin)	Di-14:0-PC	24
DMPG (= 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin)	Di-14:0-PG	23
DOPC (= 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin)	Di-18:1c9-PC	-20
POPC (= 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin)	16:0-18:1c9-PC	-2
POPE (= 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin)	16:0-18:1c9-PE	25
POPG (= 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerin)	16:0-18:1c9-PG	-2



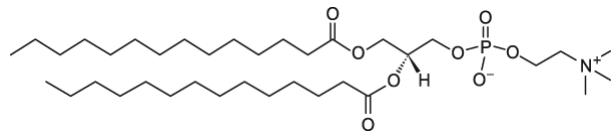
CHOL



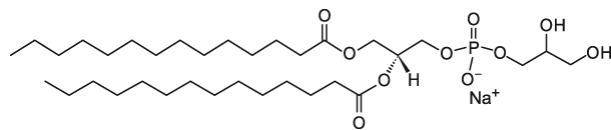
DLPC



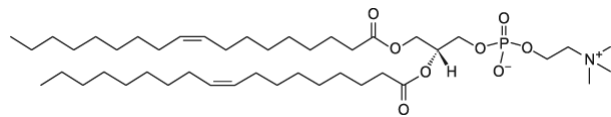
DMoPC



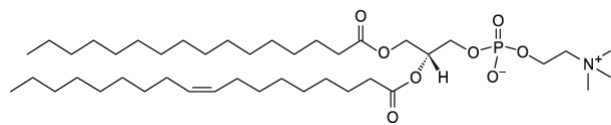
DMPC



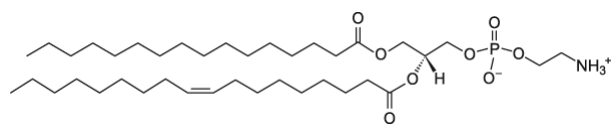
DMPG



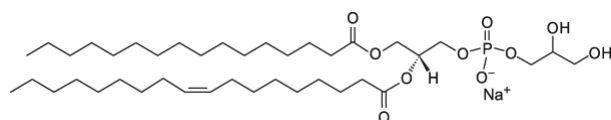
DOPC



POPC



POPE



POPG

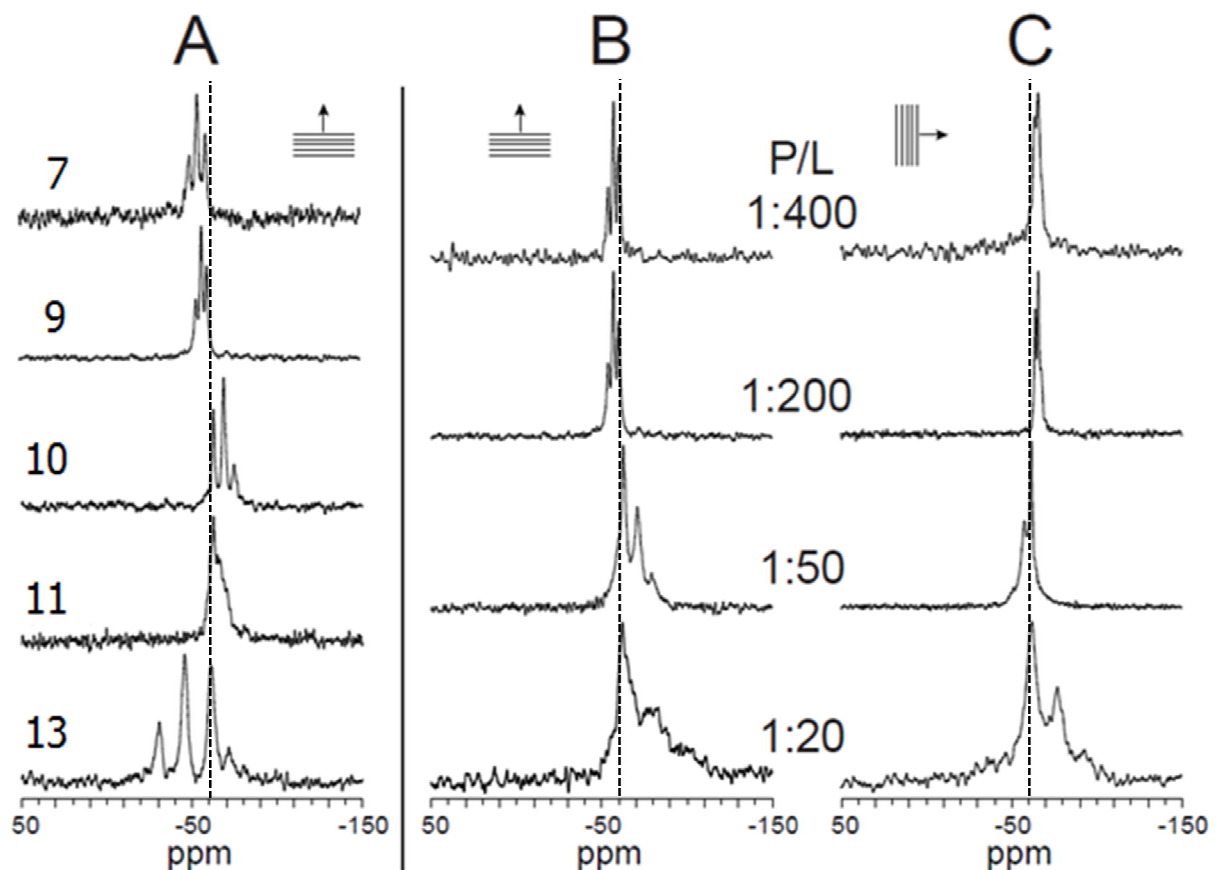
**Abb. 5.6:** Struktur der verwendeten Lipide (Avanti Polar Lipids, 2009).

### 5.1.6.1. MSI-103 in DMPC

Die Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen der  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten des antimikrobiellen Peptides MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC wurden größtenteils von Nathalie Kanithasen im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Kanithasen, 2005) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 308 K.

#### $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie des MSI-103 in DMPC sind im Folgenden aufgeführt:



**Abb. 5.7:** Repräsentative  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 in DMPC. A) Spektren aller  $^{19}\text{F}$ -Mutanten in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, gemessen mit parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale. B) Spektren des MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 9 in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, gemessen mit parallel und C) senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale. Die gestrichelte Linie deutet den isotropen Wert an. Von der Position der Aufspaltung relativ zum isotropen Wert kann das Vorzeichen der Aufspaltung bestimmt werden (Glaser, 2004).



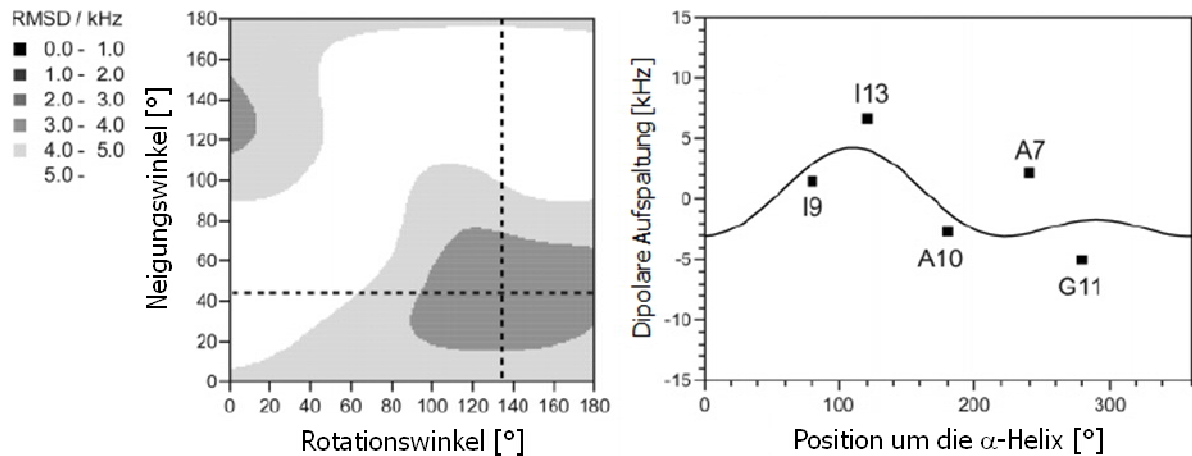
**Tab. 5.5:** Dipolare Aufspaltungen der  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des MSI-103 in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen. OP= orientierte Probe.

$^{19}\text{F}$ -Mutante	Dipolare Aufspaltung [kHz]			
	1:400 (OP) 0°/90°	1:200 (OP) 0°/90°	1:50 (OP) 0°/90°	1:20 (OP) 0°/90°
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 7	+2,2/-1,0	+2,3/-1,1	-3,6/+1,7	+4,0/-1,9
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 9	+1,5/-1,0	+1,5/-0,75	-3,9/+1,9	-8,0/-7,4
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 10	-2,7/+1,3	-2,8/+1,4	-3,4/+1,7	-6,1/-7,1
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 11	-5,1/+2,5	-1,8/+1	-2,4/+1,2	-6,7/-7,0
MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 13	+6,7/-3,4	+7,1/-3,45	+6,7/-3,3	-7,8/-6,1

In Abbildung 5.7 und Tabelle 5.5 ist ersichtlich, dass – mit Ausnahme der Messungen in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 – die dipolaren Aufspaltungen der Messungen mit parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale um ungefähr den Faktor  $-\frac{1}{2}$  größer sind als die entsprechenden dipolaren Aufspaltungen der Messungen mit senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale. Dies ist gleichbedeutend damit, dass MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und kleiner um die Membrannormale rotiert. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 hingegen liegen die dipolaren Aufspaltungen der Messungen mit parallel und senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale – mit Ausnahme der Mutante MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 7 – in einem vergleichbaren Bereich. Dies ist gleichbedeutend damit, dass MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 nicht um die Membrannormale rotiert. Desweiteren liegen in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 die dipolaren Aufspaltungen – mit Ausnahme der Mutante MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 7 – in einem vergleichbaren Bereich. Dies ist gleichbedeutend damit, dass MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 aggregiert vorliegt. Die Orientierung des antimikrobiellen Peptides kann in diesem Fall nicht bestimmt werden.

**Tab. 5.6:** Strukturparameter für MSI-103 in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, ermittelt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten. OP= orientierte Probe.

P/L-Verhältnis	Neigungswinkel, $\tau$ [°]	Rotationswinkel, $\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
1:400 (OP)	43	135	0,39	3,1
1:200 (OP)	60	137	0,32	2,6
1:50 (OP)	32	115	0,52	3,1

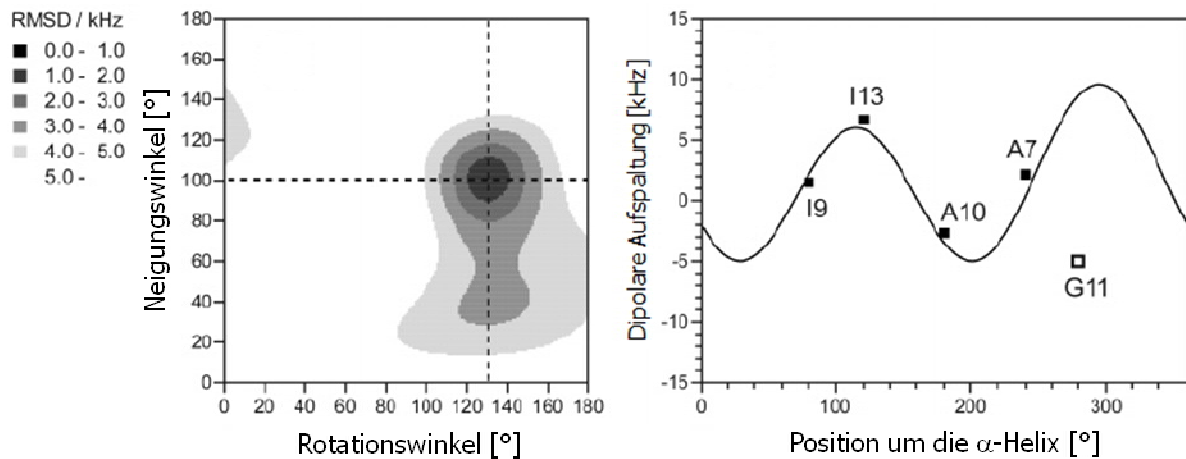


**Abb. 5.8:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:400, erstellt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

Aus Tabelle 5.6 geht hervor, dass die Orientierung des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC, unter Verwendung der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten nicht bestimmt werden kann. Die für den molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  ermittelten Werte sind verhältnismäßig gering, die für die mittlere quadratische Abweichung RMSD (aus dem Englischen: RMSD= Root mean square deviation) ermittelten Werte verhältnismäßig hoch. Weiterhin ist die am Beispiel des MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:400 erstellte Wellenkurve nicht gut an die Datenpunkte angepasst und dementsprechend liefert der erstellte  $(\rho, \tau)$ -Plot unerwartete Ergebnisse (Abbildung 5.8).

**Tab. 5.7:** Strukturparameter für MSI-103 in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, ermittelt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten der Mutanten MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 7, MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 9, MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 10 und MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 13. Die Daten der antimikrobiell gering aktiven Mutante MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 11 wurden nicht berücksichtigt. OP= orientierte Probe.

P/L-Verhältnis	Neigungswinkel, $\tau$ [°]	Rotationswinkel, $\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
1:400 (OP)	101	130	0,63	1,1
1:200 (OP)	102	129	0,69	1,2
1:50 (OP)	109	113	1,00	0,7

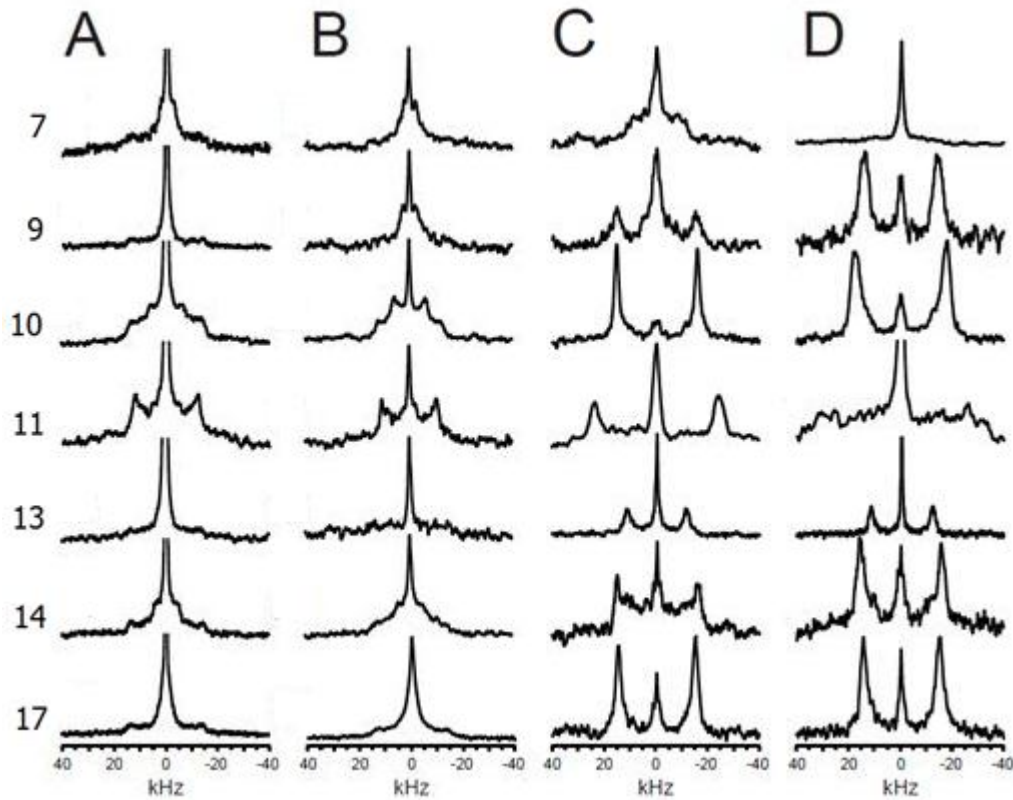


**Abb. 5.9:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:400, erstellt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten der Mutanten MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 7, MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 9, MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 10 und MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 13. Die Daten der antimikrobiell gering aktiven Mutante MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 11 wurden nicht berücksichtigt.

In Tabelle 5.7 ist erkennbar, dass unter Ausschließen der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten der antimikrobiell gering aktiven Mutante MSI-103  $\text{CF}_3$ -Phg 11 die Orientierung des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC eindeutig bestimmt werden kann. Die für den molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  und die mittlere quadratische Abweichung RMSD ermittelten Werte liegen – mit Ausnahme der Messungen in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 – in einem charakteristischen Bereich. Desweiteren ist die am Beispiel des MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:400 erstellte Wellenkurve gut an die Datenpunkte angepasst und der erstellte  $(\rho, \tau)$ -Plot liefert erwartete Ergebnisse (Abbildung 5.9). Der Neigungswinkel von  $101^\circ$  bzw.  $102^\circ$  entspricht einer nahezu flach an die Membranoberfläche gebundenen  $\alpha$ -Helix. Der Rotationswinkel von  $130^\circ$  bzw.  $129^\circ$  entspricht einer  $\alpha$ -Helix, deren geladene Lysinreste in die, die Membran umgebende wässrige Lösung ragen.

## <sup>2</sup>H-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse der <sup>2</sup>H-Festkörper-NMR-Spektroskopie des MSI-103 in DMPC bzw. DMPC/DMPG (3:1) sind im Folgenden aufgeführt.



**Abb. 5.10:** <sup>2</sup>H-Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 A) in DMPC in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, B) in DMPC/DMPG (3:1) in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, C) in DMPC in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und D) 1:20.

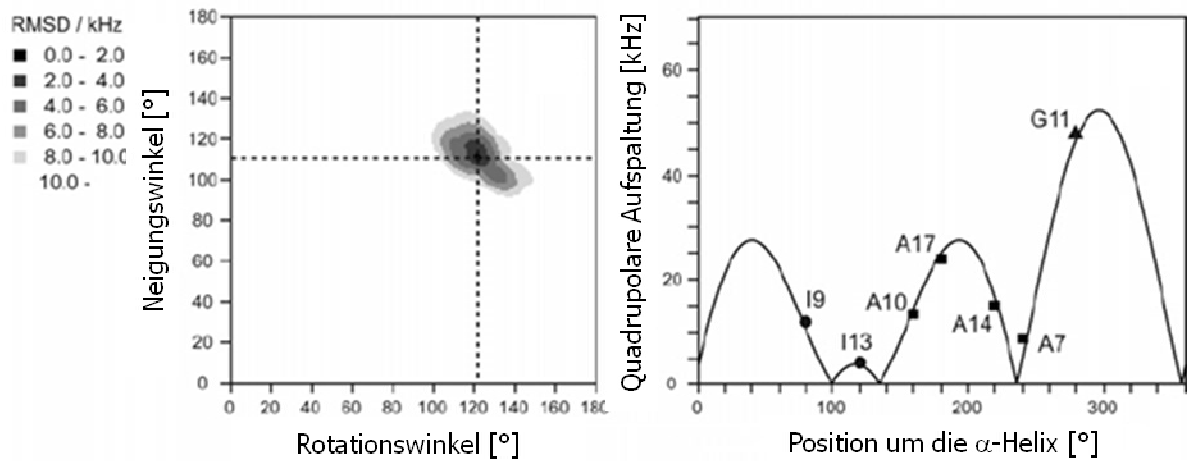
**Tab. 5.8:** Quadrupolare Aufspaltungen der  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in DMPC bzw. DMPC/DMPG (3:1), in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen. Die für die multilamellaren Lipidvesikel-Proben erhaltenen quadrupolaren Aufspaltungen wurden, zum Vergleich mit bei parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale gemessenen Proben, verdoppelt. MLV= multilamellare Lipidvesikel-Probe, OP= orientierte Probe.

$^2\text{H}$ -Mutante	Quadrupolare Aufspaltung [kHz]			
	DMPC 1:200 (MLV) 0°	DMPC/DMPG 1:150:50 (MLV) 0°	DMPC 1:50 (OP) 0°	DMPC 1:20 (OP) 0°
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 7	8,6	8,8	17,0	2,0
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 9	12,0	9,4	30,4	28,5
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 10	24,1	24,2	31,2	35,2
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 11	48,2	42,0	47,5	≈ 60
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 13	4,0	4,2	22,8	23,9
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 14	14,8	15,4	31,0	31,5
MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 17	13,4	16,2	29,7	29,5

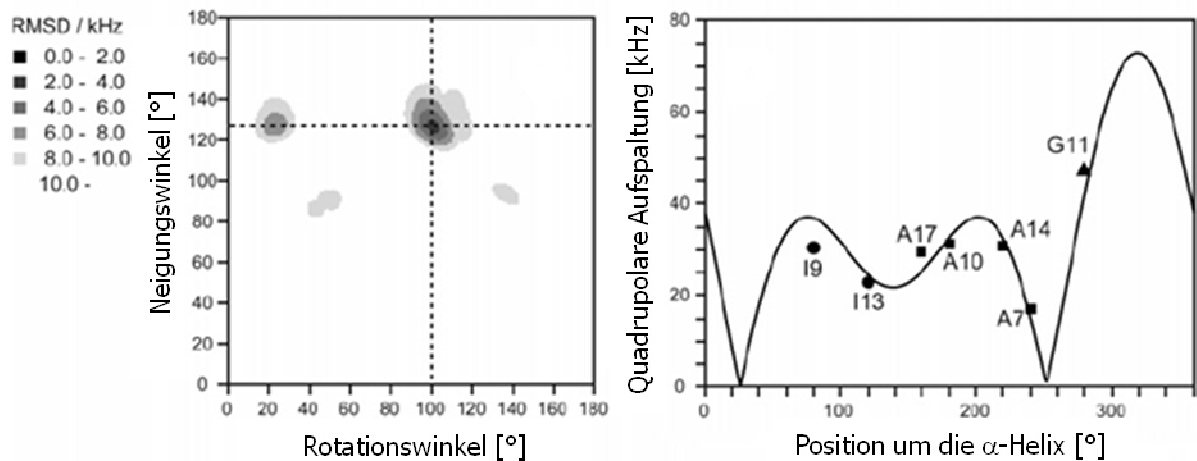
Aus Abbildung 5.10 und Tabelle 5.8 wird deutlich, dass die  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren der orientierten Proben intensiver und die quadrupolaren Aufspaltungen klarer definiert sind als die der multilamellaren Lipidvesikel-Proben. Weiterhin weisen die  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 in den negativ geladenen Modellmembranen bestehend aus DMPC/DMPG (3:1) einen kleineren isotropen Peak auf als in den ungeladenen Modellmembranen bestehend aus DMPC – bei nahezu identischen quadrupolaren Aufspaltungen. Dies ist gleichbedeutend damit, dass der hohe isotrope Peak die quadrupolare Aufspaltung jeweils nicht überlagert. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und 1:20 lieferten die Messungen mit senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale Pulverspektren (nicht gezeigt). Dies ist gleichbedeutend damit, dass MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und 1:20 nicht um die Membrannormale rotiert.

**Tab. 5.9:** Strukturparameter für MSI-103 in DMPC bzw. DMPC/DMPG (3:1), in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, ermittelt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten. MLV= multilamellare Lipidvesikel-Probe, OP= orientierte Probe.

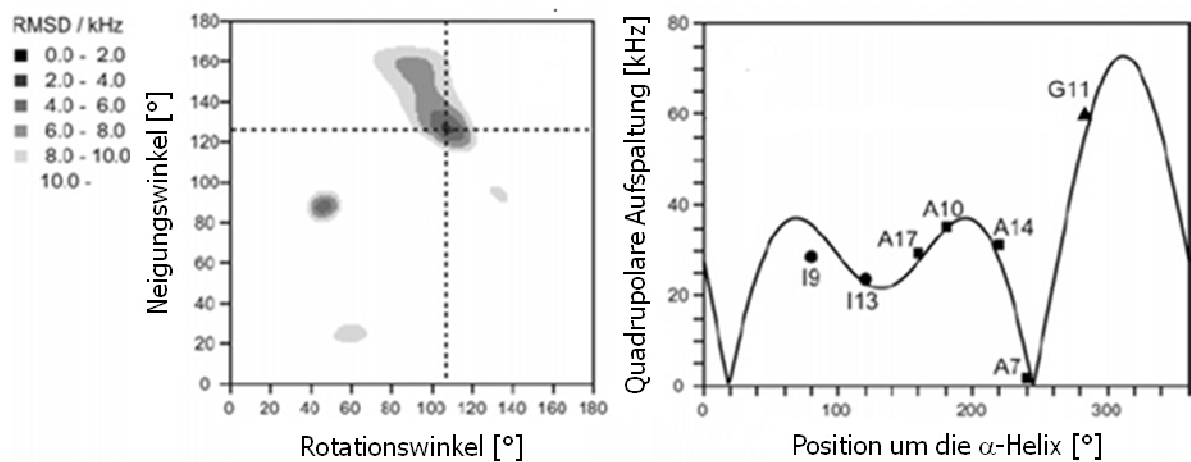
P/L-Verhältnis	Neigungswinkel, $\tau$ [°]	Rotationswinkel, $\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
<b>DMPC</b>				
1:200 (MLV)	111	122	0,65	1,6
1:50 (OP)	128	105	0,83	3,1
1:20 (OP)	125	109	0,92	3,5
<b>DMPC/DMPG (3:1)</b>				
1:200 (MLV)	111	122	0,60	1,7



**Abb. 5.11:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.



**Abb. 5.12:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.



**Abb. 5.13:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

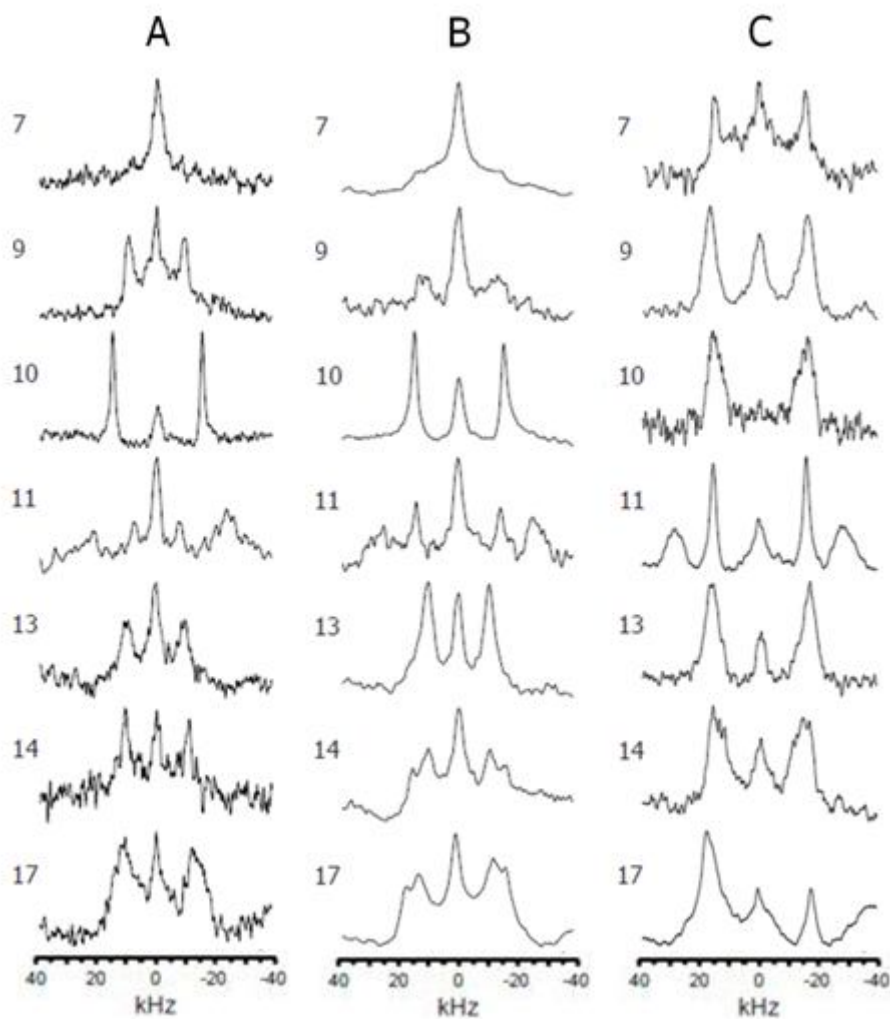
In Tabelle 5.9 sowie den Abbildungen 5.11, 5.12 und 5.13 ist ersichtlich, dass die Orientierung des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC, unter Verwendung der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten eindeutig bestimmt werden kann. Die für den molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  und die mittlere quadratische Abweichung RMSD ermittelten Werte liegen in einem charakteristischen Bereich. Weiterhin sind die erstellten Wellenkurven gut an die Datenpunkte angepasst und die erstellten  $(\rho, \tau)$ -Plots liefern erwartete Ergebnisse. Die für MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, in DMPC sowie DMPC/DMPG (3:1) erhaltenen Strukturparameter sind nahezu identisch. Der Neigungswinkel von  $111^\circ$  und der Rotationswinkel von  $122^\circ$  entsprechen einer  $\alpha$ -Helix, deren C-Terminus leicht in die Membran insertiert ist und deren geladene Lysinreste in die, die Membran umgebende wässrige Lösung ragen. Der Neigungswinkel von  $128^\circ$  bzw.  $125^\circ$  entspricht einer mit dem C-Terminus in die Membran insertierten  $\alpha$ -Helix.

### 5.1.6.2. MSI-103 in weiteren Lipidsystemen

#### $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie

##### DLPC

DLPC weist kürzere Kohlenstoffketten als DMPC auf (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6). Die Ergebnisse der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie des MSI-103 in DLPC sind im Folgenden aufgeführt:



**Abb. 5.14:**  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 in DLPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von A) 1:50, B) 1:20 (303 K) und C) 1:20 (278 K). Die jeweils für die Mutante  $\text{CF}_3\text{-Phg 11}$  erhaltene zusätzliche Aufspaltung deutet auf eine teilweise Aggregation des Peptides in der Probe hin.



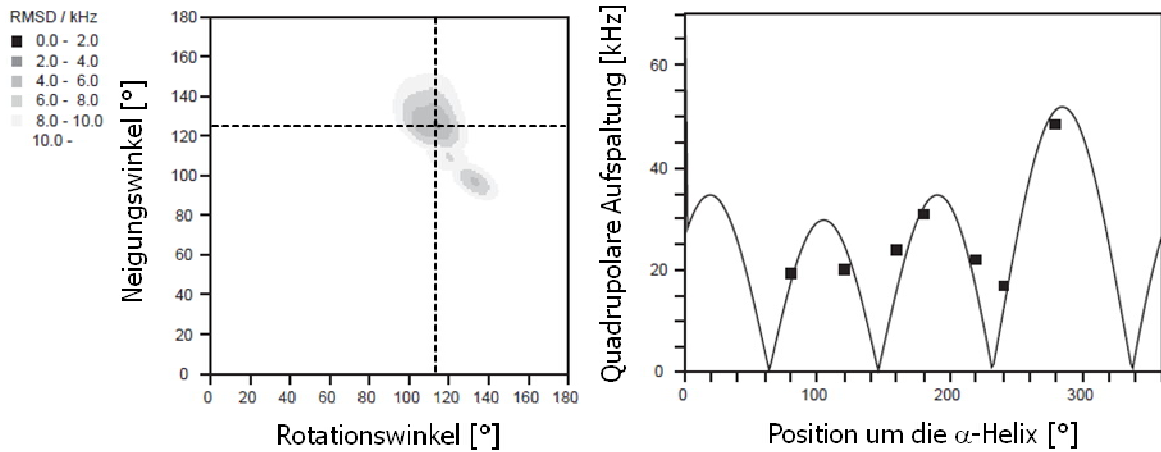
**Tab. 5.10:** Quadrupolare Aufspaltungen der  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in DLPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen und bei unterschiedlicher Temperatur. Die für die multilamellaren Lipidvesikel-Proben erhaltenen quadrupolaren Aufspaltungen wurden, zum Vergleich mit bei parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale gemessenen Proben, verdoppelt. MLV= multilamellare Lipidvesikel-Probe, OP= orientierte Probe.

Lipidsystem	P/L-Verhältnis	Temperatur [K]	Quadrupolare Aufspaltung [kHz]						
			MSI-103 Ala-d <sub>3</sub>						
			7	9	10	11	13	14	17
DLPC	1:200 (MLV)	303	-	-	-	-	-	-	-
DLPC	1:50 (OP)	303	7,0	19,3	30,9	48,5	20,2	21,9	24,1
DLPC	1:20 (OP)	303	2,0	26,9	30,8	29,0	21,1	21,3	26,0
DLPC	1:20 (OP)	278	31,4	33,3	32,0	31,7	27,0	33,0	35,7

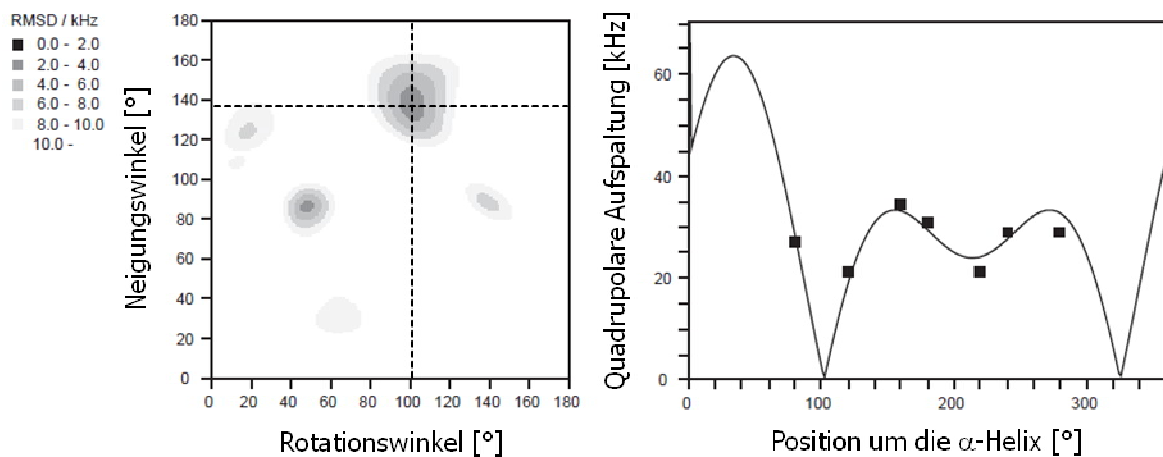
Die Rekonstitutionsversuche des MSI-103 in Modellmembranen aus DLPC in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 scheiterten. Die erhaltenen  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren lieferten keine Aufspaltungen bei 303 K. An den Messungen des MSI-103 bei einer niedrigeren Temperatur von 278 K ist erkennbar, dass die erhaltenen quadrupolaren Aufspaltungen in einem vergleichbaren Bereich liegen und somit das antimikrobielle Peptid in Modellmembranen aus DLPC in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 aggregiert vorliegt (Tabelle 5.10). Die Orientierung des antimikrobiellen Peptides kann in diesem Fall nicht bestimmt werden.

**Tab. 5.11:** Strukturparameter für MSI-103 in DLPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen und bei unterschiedlicher Temperatur, ermittelt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten. MLV= multilamellare Lipidvesikel-Probe, OP= orientierte Probe.

Lipidsystem	P/L-Verhältnis	Temperatur [K]	$\tau$ [°]	$\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
DLPC	1:50 (OP)	303	126	114	0,71	3,8
DLPC	1:20 (OP)	303	137	101	0,64	2,7



**Abb. 5.15:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DLPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

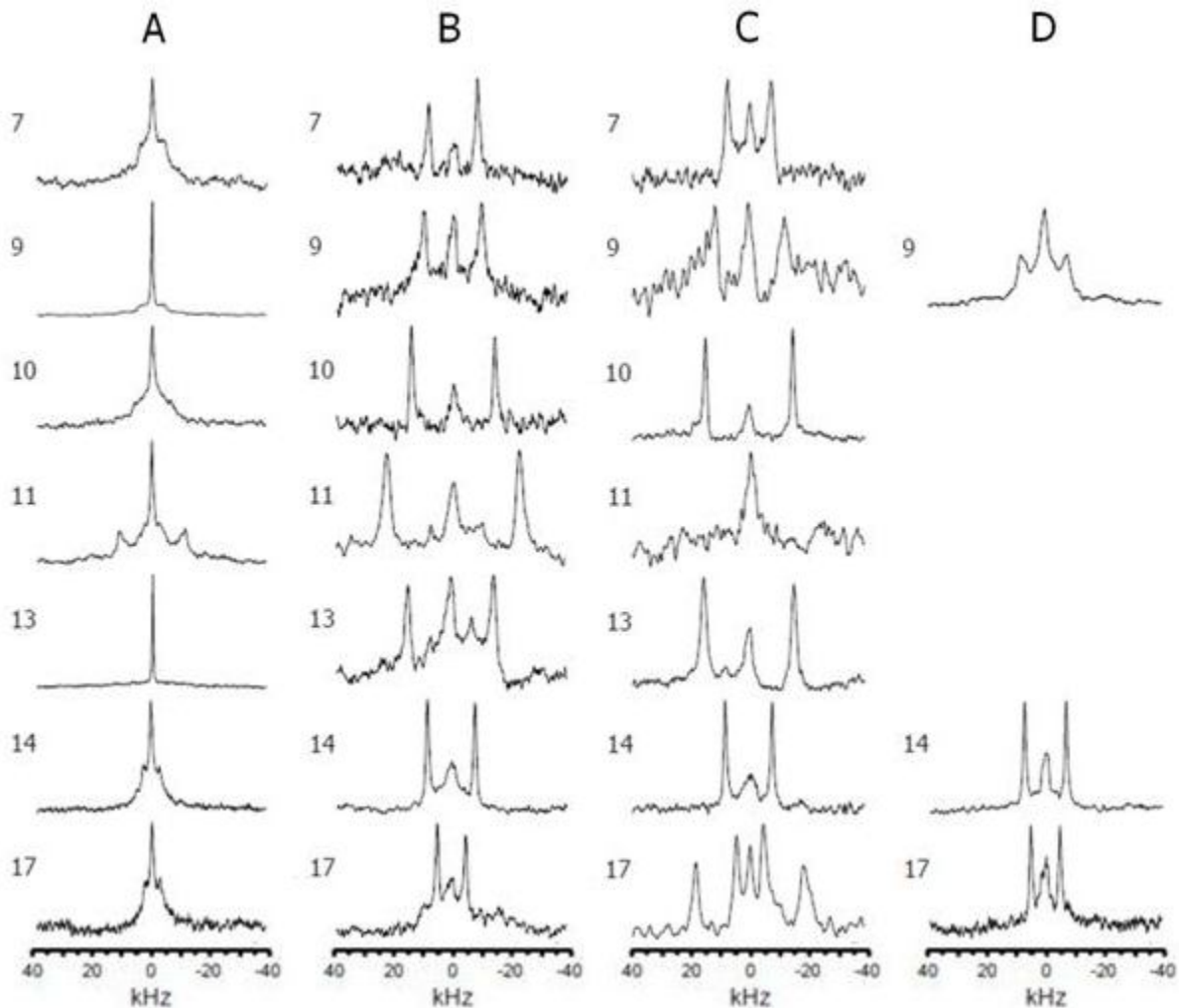


**Abb. 5.16:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DLPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 (303 K), erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

Aus den  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DLPC geht hervor, dass das antimikrobielle Peptid bei hohen Peptidkonzentrationen im T-Zustand vorliegt (Tabelle 5.11, Abbildungen 5.15 und 5.16). Ein Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand konnte nicht nachgewiesen werden.

*DOPC, DMOPC*

DOPC weist längere Kohlenstoffketten als DMPC auf, DMOPC gleichlange. Die Kohlenstoffketten beider Lipide sind im Gegensatz zu den Kohlenstoffketten des DMPC einfach ungesättigt. Die Ergebnisse der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie des MSI-103 in DOPC und DMOPC sind im Folgenden aufgeführt:



**Abb. 5.17:**  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 A) in DOPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, B) 1:50 (303 K) und C) 1:20 sowie D) in DMOPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50. Die für die Mutante  $\text{CF}_3\text{-Phg}$  17 in DOPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 erhaltene zusätzliche Aufspaltung deutet auf eine teilweise Aggregation des Peptides in der Probe hin.

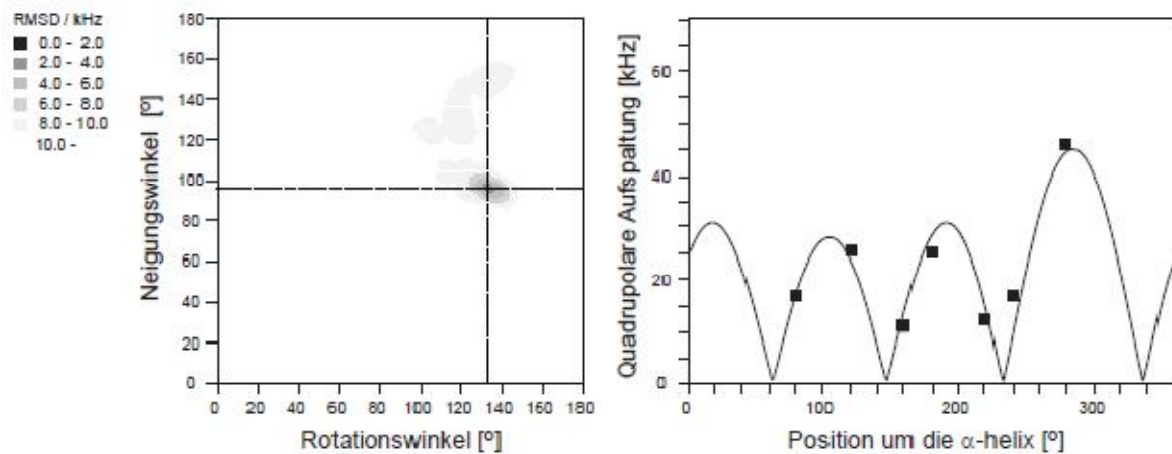
**Tab. 5.12:** Quadrupolare Aufspaltungen der  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in DOPC und DMOPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen und bei unterschiedlicher Temperatur. Die für die multilamellaren Lipidvesikel-Proben erhaltenen quadrupolaren Aufspaltungen wurden, zum Vergleich mit bei parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale gemessenen Proben, verdoppelt. MLV= multilamellare Lipidvesikel-Probe, OP= orientierte Probe.

Lipidsystem	P/L-Verhältnis	Temperatur [K]	Quadrupolare Aufspaltung [kHz]						
			MSI-103 Ala-d <sub>3</sub>						
			7	9	10	11	13	14	17
DOPC	1:200 (MLV)	303	16,8	17,0	25,0	46,0	25,6	12,2	11,0
DOPC	1:50 (OP)	303	17,0	20,1	29,1	46,3	29,3	16,6	9,9
DOPC	1:50 (OP)	283	17,3	20,6	31,7	47,9	30,5	16,9	10,4
DOPC	1:20 (OP)	303	15,2	23,9	30,0	45,0	31,1	16,3	9,2
DMoPC	1:50 (OP)	303	-	16,0	-	-	-	14,3	10,0

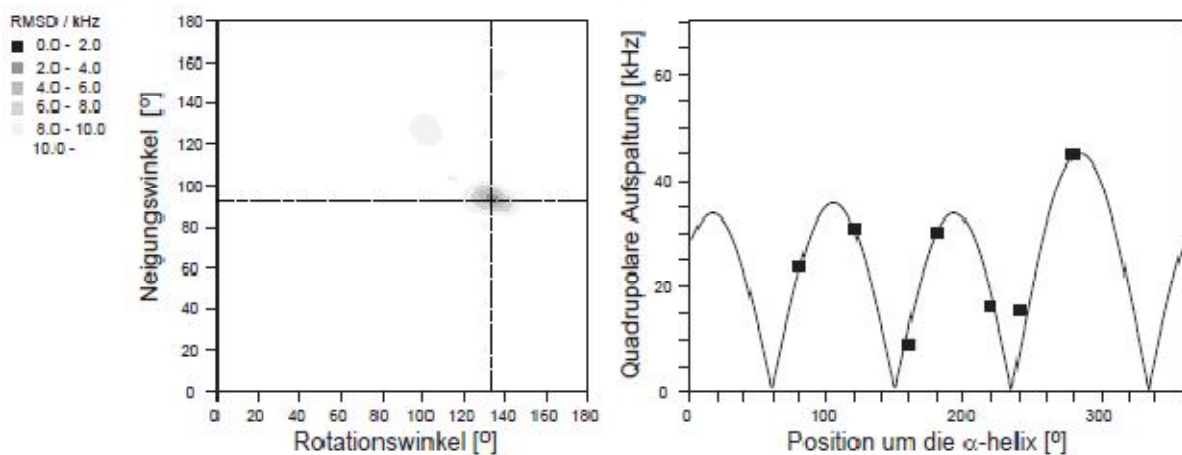
Aus den Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen dreier  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in Modellmembranen aus DMOPC in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 geht hervor, dass die erhaltenen quadrupolaren Aufspaltungen vergleichbar sind mit den quadrupolaren Aufspaltungen, die für die entsprechenden Messungen des MSI-103 in DOPC erhalten wurden (Tabelle 5.12). Somit weist das antimikrobielle Peptid in Modellmembranen bestehend aus DMOPC dieselbe Orientierung wie in Modellmembranen aus DOPC in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 auf.

**Tab. 5.13:** Strukturparameter für MSI-103 in DOPC und DMOPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen und bei unterschiedlicher Temperatur, ermittelt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten. MLV= multilamellare Lipidvesikel-Probe, OP= orientierte Probe.

Lipidsystem	P/L-Verhältnis	Temperatur [K]	$\tau$ [°]	$\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
DOPC	1:200 (MLV)	303	96	134	0,73	3,3
DOPC	1:50 (OP)	303	95	133	0,79	3,4
DOPC	1:50 (OP)	283	95	133	0,83	3,4
DOPC	1:20 (OP)	303	93	134	0,80	3,0



**Abb. 5.18:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DOPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

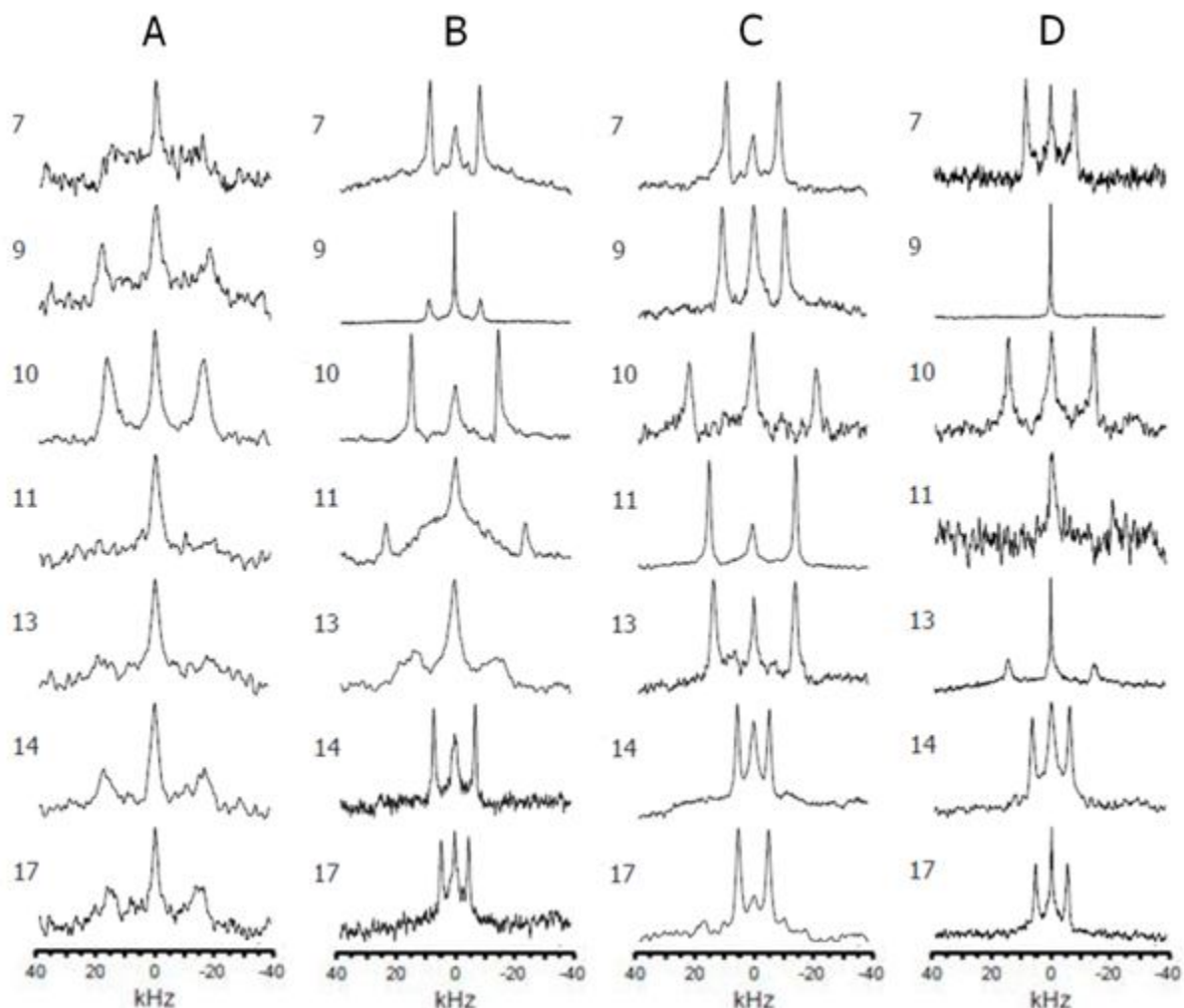


**Abb. 5.19:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in DOPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

Aus den  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DOPC wird deutlich, dass das antimikrobielle Peptid sowohl bei geringen als auch bei hohen Peptidkonzentrationen flach an die Membranoberfläche gebunden ist und somit im S-Zustand vorliegt (Tabelle 5.13, Abbildungen 5.18 und 5.19). Dabei ragen die geladenen Lysinreste der  $\alpha$ -Helix in die, die Membran umgebende wässrige Lösung (Tabelle 5.13). Ein Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand sowie ein T-Zustand des MSI-103 konnte nicht nachgewiesen werden. An den Messungen des MSI-103 bei einer geringeren Temperatur von 283 K ist ersichtlich, dass das antimikrobielle Peptid in Modellmembranen bestehend aus DOPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 im S-Zustand vorliegt (Tabelle 5.13).

*DMPC/CHOL, POPC/POPE, POPE/POPG*

Cholesterin (CHOL) ist ein polyzyklischer Alkohol und gehört zur Gruppe der Steroide. POPC, POPE und POPG weisen ungleichmäßig lange Kohlenstoffketten auf. Bei allen drei Lipiden ist im Gegensatz zu DMPC eine der Kohlenstoffketten einfach ungesättigt. Der Unterschied zwischen POPC und POPE liegt in der unterschiedlichen Größe/Volumen der Kopfgruppe. Der Unterschied zwischen POPE und POPG liegt darin, dass POPE im Gegensatz zu POPG eine ungeladene Kopfgruppe besitzt. Die Ergebnisse der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie des MSI-103 in DMPC/CHOL, POPC/POPE und POPE/POPG sind im Folgenden aufgeführt:



**Abb. 5.20:**  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, A) in DMPC/CHOL (4:1), B) in POPC/POPE (1:1) (303 K), C) in POPE/POPG (1:1) und D) in POPE/POPG (3:1). Neben der quadrupolaren Aufspaltung erhaltene zusätzliche Aufspaltungen deuten auf eine teilweise Aggregation des Peptides in der Probe hin.

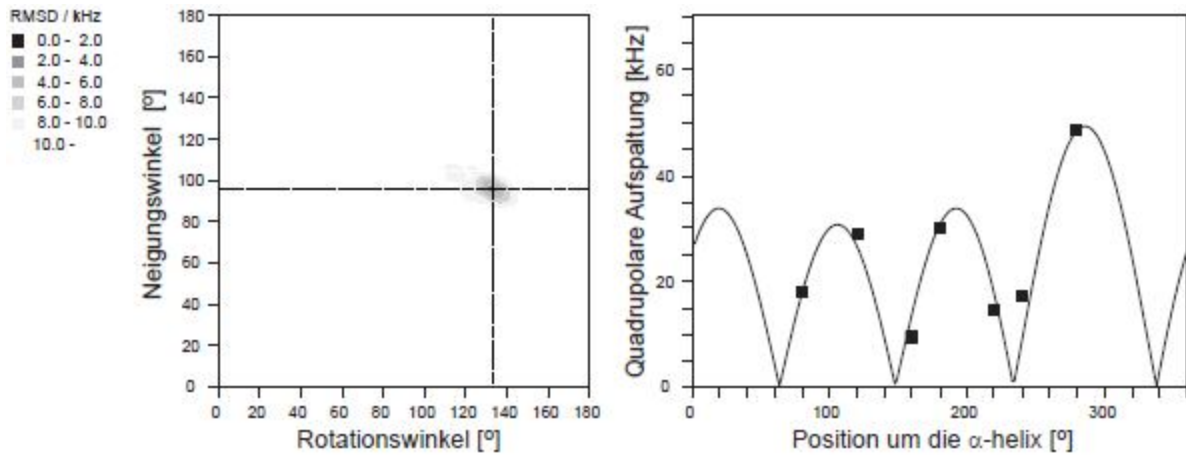
**Tab. 5.14:** Quadrupolare Aufspaltungen der  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in DMPC/CHOL, POPC/POPE und POPE/POPG, in verschiedenen Peptid/Lipid- sowie Lipid/Lipid-Verhältnissen und bei unterschiedlicher Temperatur. OP= orientierte Probe.

Lipidsystem	P/L-Verhältnis	Temperatur [K]	Quadrupolare Aufspaltung [kHz]						
			MSI-103 Ala-d <sub>3</sub>						
			7	9	10	11	13	14	17
DMPC/CHOL (4:1)	1:50 (OP)	303	31,0	37,4	33,0	36,0	37,3	35,0	34,0
POPC/POPE (1:1)	1:50 (OP)	303	17,2	17,9	30,3	48,6	29,0	14,4	9,6
POPC/POPE (1:1)	1:50 (OP)	278	24,6	23,0	33,3	51,0	27,0	27,7	29,0
POPE/POPG (1:1)	1:50 (OP)	303	18,4	21,9	30,2	44,6	28,5	11,2	10,5
POPE/POPG (3:1)	1:50 (OP)	303	16,9	20,9	29,8	39,0	29,9	12,9	11,1

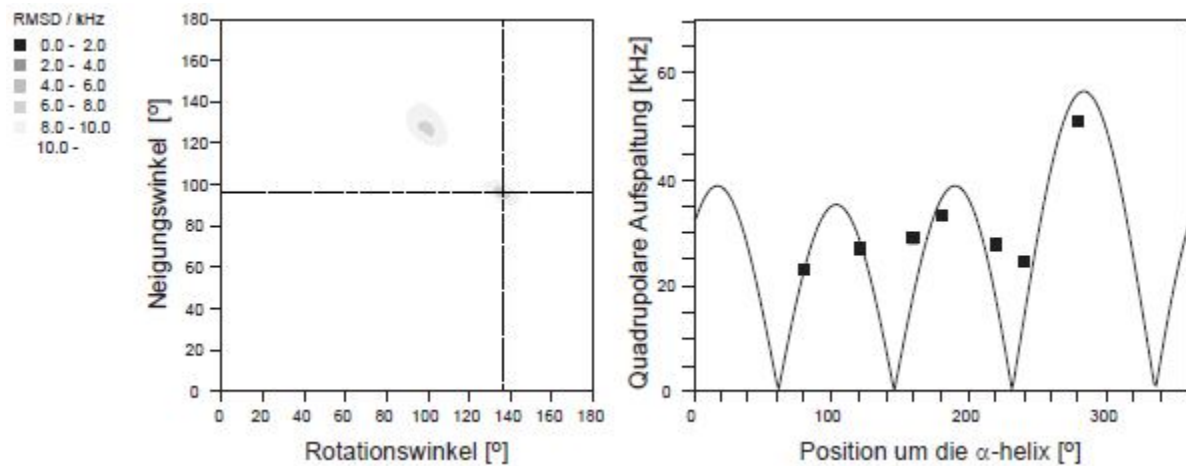
An den  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC/CHOL (4:1), in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 ist ersichtlich, dass die erhaltenen quadrupolaren Aufspaltungen in einem vergleichbaren Bereich liegen und somit das antimikrobielle Peptid aggregiert vorliegt (Tabelle 5.14). Die Orientierung des antimikrobiellen Peptides kann in diesem Fall nicht bestimmt werden.

**Tab. 5.15:** Strukturparameter für MSI-103 in DMPC/CHOL, POPC/POPE und POPE/POPG, in verschiedenen Peptid/Lipid- sowie Lipid/Lipid-Verhältnissen und bei unterschiedlicher Temperatur, ermittelt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten. OP= orientierte Probe.

Lipidsystem	P/L-Verhältnis	Temperatur [K]	$\tau$ [°]	$\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
DMPC/CHOL (4:1)	1:50 (OP)	303	-	-	-	-
POPC/POPE (1:1)	1:50 (OP)	303	96	133	0,80	3,6
POPC/POPE (1:1)	1:50 (OP)	278	96	135	0,92	7,1
POPE/POPG (1:1)	1:50 (OP)	303	94	136	0,76	3,5
POPE/POPG (3:1)	1:50 (OP)	303	93	135	0,73	3,5



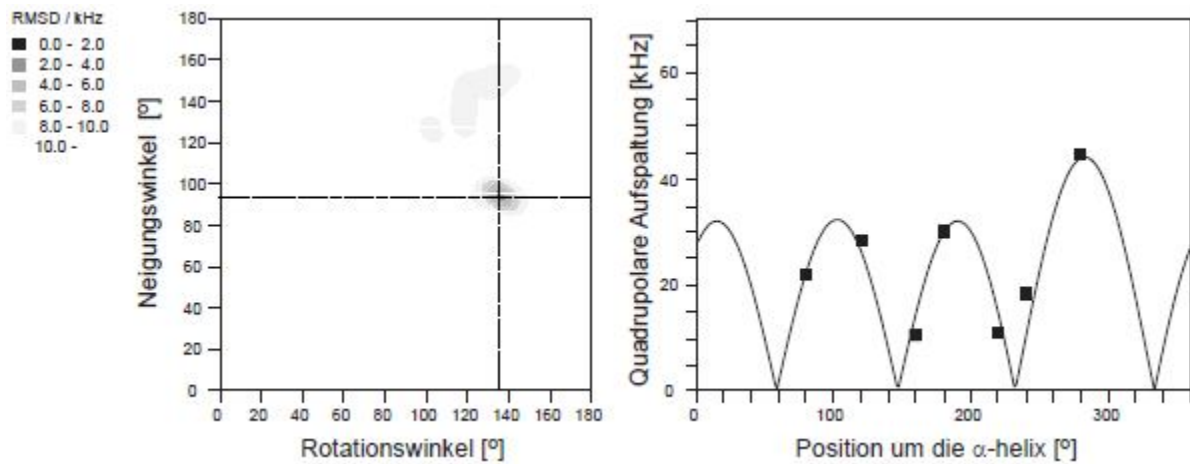
**Abb. 5.21:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in POPC/POPE (1:1) (303 K), in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.



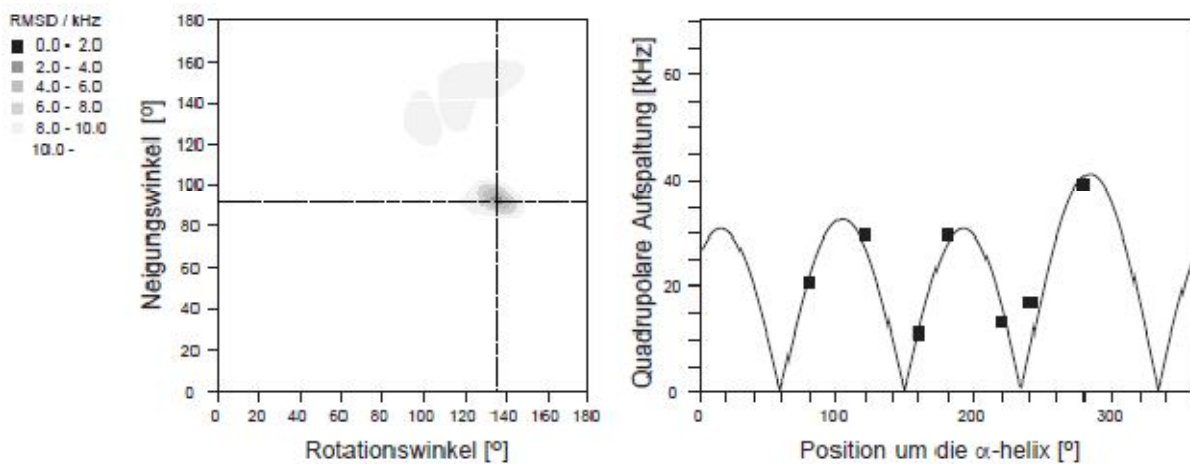
**Abb. 5.22:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in POPC/POPE (1:1) (278 K), in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

Aus den Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen der  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus POPC/POPE (1:1) wird deutlich, dass das antimikrobielle Peptid in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 sowohl bei 303 K als auch bei einer geringeren Temperatur von 278 K im S-Zustand vorliegt (Tabelle 5.15, Abbildungen 5.21 und 5.22). Allerdings ist im letzteren Fall der für die mittlere quadratische Abweichung RMSD ermittelte Wert verhältnismäßig hoch.





**Abb. 5.23:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in POPE/POPG (1:1), in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.



**Abb. 5.24:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für MSI-103 in POPE/POPG (3:1), in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

An den  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus POPE/POPG (1:1) sowie POPE/POPG (3:1), in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 ist erkennbar, dass das antimikrobielle Peptid in beiden Fällen im S-Zustand vorliegt (Tabelle 5.15, Abbildungen 5.23 und 5.24).

## 5.2. Diskussion

### *Funktionelle Untersuchungen und qualitative Strukturanalysen*

Die antimikrobiellen Tests des MSI-103 sowie seiner  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten haben ergeben, dass die getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 11 – vergleichbare MHK-Werte wie der Wildtyp aufweisen. Die Substitution einer natürlichen Aminosäure aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon CF<sub>3</sub>-Phg bzw. Ala-d<sub>3</sub> scheint somit keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des Peptides zu haben. Eine Ausnahme bildet hierbei die Mutante MSI-103 CF<sub>3</sub>-Phg 11. Sie weist gegen drei der vier getesteten Bakterienstämme eine geringere antimikrobielle Aktivität als der Wildtyp auf. Die Substitution der kleinsten und einfachsten Aminosäure Glycin-11 aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides MSI-103 durch das größere und komplexere Aminosäureanalogon CF<sub>3</sub>-Phg scheint somit die antimikrobielle Aktivität des Peptides zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu den antimikrobiellen Tests haben die Hämolysetests des MSI-103 sowie seiner  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten gezeigt, dass nur zwei der acht getesteten Seitenkettenmutanten vergleichbare prozentuale Hämolysewerte wie der Wildtyp aufzeigen. Die Substitution einer natürlichen Aminosäure aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon CF<sub>3</sub>-Phg bzw. Ala-d<sub>3</sub> scheint somit einen Einfluss auf die hämolytische Aktivität des Peptides zu haben. Dieser Einfluss ist bedingt durch die Veränderung der Hydrophobizität des Peptides durch die Modifizierung ihrer Seitenketten. Mit zunehmender Hydrophobizität des Peptides nimmt auch seine hämolytische Aktivität zu, mit abnehmender Hydrophobizität des Peptides nimmt auch seine hämolytische Aktivität ab (Chen, 2005; Dathe, 1997; Kondejewski, 1999). In der folgenden Tabelle sind die getesteten Seitenkettenmutanten hinsichtlich ihrer veränderten Hydrophobizität und hämolytischen Aktivität bezüglich des Wildtyps aufgeführt.

**Tab. 5.16:** Getestete Seitenkettenmutanten, die jeweils eingeführte Substitution sowie die dadurch bedingte Veränderung der Hydrophobizität und hämolytischen Aktivität bezüglich des Wildtyps.

Seitenkettenmutante	MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 9	MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 11	MSI-103 Ala-d <sub>3</sub> 13	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 7	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 9	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 10	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 11	MSI-103 CF <sub>3</sub> -Phg 13
Substitution	Ile→Ala-d <sub>3</sub>	Gly→Ala-d <sub>3</sub>	Ile→Ala-d <sub>3</sub>	Ala→CF <sub>3</sub> -Phg	Ile→CF <sub>3</sub> -Phg	Ala→CF <sub>3</sub> -Phg	Gly→CF <sub>3</sub> -Phg	Ile→CF <sub>3</sub> -Phg
Hydrophobizität	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓
Hämolytische Aktivität	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓

Die CD-spektroskopischen Messungen des MSI-103 sowie seiner  $^{19}\text{F}$ - und drei seiner  $^2\text{H}$ -Mutanten in TFE haben gezeigt, dass die getesteten Seitenkettenmutanten eine vergleichbare Linienform im CD-Spektrum wie der Wildtyp aufweisen. Diese ist charakteristisch für einen Hauptanteil an  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelementen. Die Substitution einer natürlichen Aminosäure aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon  $\text{CF}_3\text{-Phg}$  bzw.  $\text{Ala-d}_3$  scheint somit keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptides zu haben.

Die funktionellen Untersuchungen und qualitativen Strukturanalysen des MSI-103 sowie seiner  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten haben ergeben, dass a) die antimikrobielle Aktivität der getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von MSI-103  $\text{CF}_3\text{-Phg}$  11 – vergleichbar mit der des Wildtyps ist, b) der Unterschied in der hämolytischen Aktivität zwischen den getesteten Seitenkettenmutanten und dem Wildtyp durch den Unterschied in der Hydrophobizität der Peptide bedingt ist und c) die Sekundärstruktur der getesteten Seitenkettenmutanten sich bezüglich des Wildtyps nicht ändert. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Festkörper-NMR-spektroskopischen Ergebnisse, die für die  $^{19}\text{F}$ - und  $^2\text{H}$ -Mutanten des antimikrobiellen Peptides MSI-103 erhalten werden, auch auf den Wildtyp übertragbar sind, wobei die Mutante MSI-103  $\text{CF}_3\text{-Phg}$  11 eventuell unerwartete Ergebnisse liefert.

### *OCD-Spektroskopie*

Die OCD-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC haben ergeben, dass das antimikrobielle Peptid bei geringen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im S-Zustand charakteristische Linienform im OCD-Spektrum aufweist und bei hohen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im T-Zustand charakteristische Linienform. Der Übergang des MSI-103 aus dem S- in den T-Zustand beginnt bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:240.

## *Festkörper-NMR-Spektroskopie*

### *MSI-103 in DMPC*

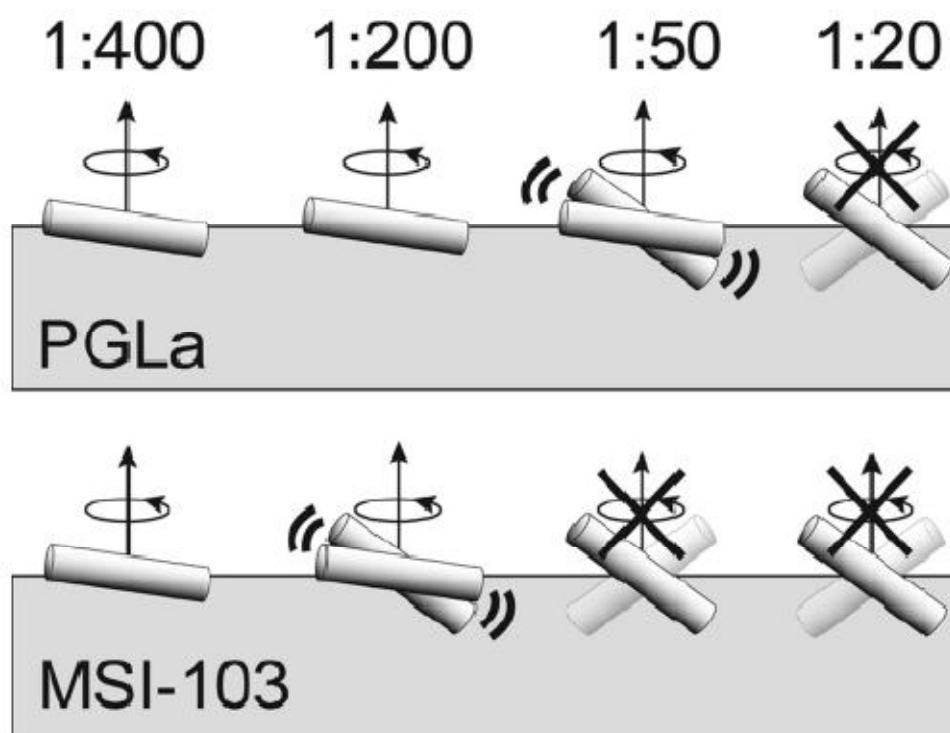
Die  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC haben gezeigt, dass das antimikrobielle Peptid bei geringen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:400 und 1:200) im S-Zustand vorliegt und um die Membrannormale rotiert. Dabei ragen die Lysinreste der  $\alpha$ -Helix in die, die Membran umgebende wässrige Lösung. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) deuten die dipolaren Aufspaltungen, verglichen mit denen bei geringen Peptidkonzentrationen, auf eine Veränderung der Orientierung des MSI-103 hin. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 rotiert MSI-103, laut Vergleich der dipolaren Aufspaltungen der Messungen bei  $0^\circ$  und  $90^\circ$ , um die Membrannormale. Allerdings ist der für den molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  ermittelte Wert verhältnismäßig hoch und deutet auf ein immobilisiertes Peptid hin. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 liegt MSI-103 aggregiert vor. Somit kann anhand der durch die  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen erhaltenen Ergebnisse die Orientierung des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und 1:20 nicht bestimmt werden.

Die  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC haben ergeben, dass das antimikrobielle Peptid bei geringen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:200) in einem Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand vorliegt. Dabei ist der C-Terminus der  $\alpha$ -Helix leicht in die Membran insertiert und die geladenen Lysinreste ragen in die, die Membran umgebende wässrige Lösung. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) befindet sich MSI-103 im T-Zustand und rotiert nicht mehr um die Membrannormale.

Die Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC haben gezeigt, dass das antimikrobielle Peptid bei geringen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:400) im S-Zustand vorliegt und bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) im T-Zustand. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 ist die Orientierung des MSI-103 laut  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie eine andere als laut  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie. Laut  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischer Messungen liegt das antimikrobielle Peptid im S-Zustand vor, laut  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischer Messungen hingegen in einem Übergangszustand

zwischen S- und T-Zustand. Da der anhand der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten ermittelte Wert für den molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  kleiner ist als der anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten vierer Mutanten ermittelte Wert, ist die Orientierung des MSI-103 in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 in den Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand naheliegender. Weiterhin haben die Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMPC ergeben, dass das antimikrobielle Peptid bei geringen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:400 und 1:200) um die Membrannormale rotiert und bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) nicht.

Um Aussagen über die genauere Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptides MSI-103 zu erhalten, wird es mit seinem weniger amphiphilen und antimikrobiell weniger aktiven Vorgängerpeptid verglichen. In der folgenden Abbildung ist das Verhalten des MSI-103 und PGLa in Modellmembranen bestehend aus DMPC aufgeführt.



**Abb. 5.25:** Verhalten des MSI-103 und PGLa in Modellmembranen bestehend aus DMPC. Die Peptide sind als Zylinder dargestellt. Die Pfeile deuten die Rotation des Peptides um die Membrannormale an. Die seitlichen Bewegungslinien deuten den schnellen Wechsel zwischen S- und T-Zustand an.

Das antimikrobielle Peptid PGLa weist ein konzentrationsabhängiges Orientierungsverhalten in Modellmembranen bestehend aus DMPC auf. Der Übergang aus dem S- in den T-Zustand beginnt – laut OCD-Spektroskopie – bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:80 (Bürck, 2008). Bei niedrigen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:400 und 1:200) liegt PGLa im S-Zustand vor und rotiert um die Membrannormale. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) ändert sich die Orientierung des Peptides in der Membran. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 liegt PGLa in multilamellaren Lipidvesikeln in einem Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand vor und rotiert weiterhin um die Membrannormale. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 befindet sich das Peptid im T-Zustand und rotiert nicht mehr um die Membrannormale (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006). Auch das antimikrobielle Peptid MSI-103 weist ein konzentrationsabhängiges Orientierungsverhalten in Modellmembranen bestehend aus DMPC auf. Allerdings beginnt der Übergang aus dem S- in den T-Zustand bereits bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:240. Bei niedrigen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:400) liegt MSI-103 im S-Zustand vor und rotiert um die Membrannormale. Anders als bei PGLa liegt MSI-103 bereits in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 in einem Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand vor und rotiert weiterhin um die Membrannormale. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) befindet sich das Peptid im T-Zustand und rotiert nicht mehr um die Membrannormale. Zusammenfassend bedeutet dies, dass MSI-103 bei einer viel geringeren Peptidkonzentration als PGLa beginnt in die Membran zu insertieren.

PGLa bzw. MSI-103 im S-Zustand wird als lateral bewegliches Monomer interpretiert. In diesen Zustand orientiert es sich bei geringen Peptidkonzentrationen. Bei hohen Peptidkonzentrationen treffen jeweils zwei Monomere aufeinander und schließen sich zusammen. PGLa bzw. MSI-103 im T-Zustand wird als ein solches Dimer interpretiert. Im Übergangszustand liegt PGLa bzw. MSI-103 weder eindeutig im S- noch eindeutig im T-Zustand vor, sondern wird vielmehr als schnell zwischen beiden Zuständen wechselnd interpretiert. In diesem Zustand befindet es sich bei mittleren Peptidkonzentrationen (Glaser, 2004; Glaser, 2005; Strandberg, 2006; Tremouilhac, 2006). Der mit dem Anstieg der Peptidkonzentration erfolgende Wechsel aus dem S- in den T-Zustand ist offensichtlich Teil der Wirkungsweise beider antimikrobieller Peptide. Die höhere antimikrobielle Aktivität des MSI-103 ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass MSI-103 bereits bei viel geringeren Peptidkonzentrationen als PGLa aus dem S- in den T-Zustand übergeht.

### *MSI-103 in weiteren Lipidsystemen*

Die  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DLPC haben ergeben, dass sich das antimikrobielle Peptid vergleichbar wie in Modellmembranen bestehend aus DMPC verhält. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) liegt MSI-103 im T-Zustand vor. Die Messungen bei niedriger Temperatur haben ebenfalls zu diesem Ergebnis geführt. Die Temperatur scheint somit keinen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 in der Membran zu haben, solange die Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase des Membranlipides nicht unterschritten wurde – für PGLa konnte durch Festkörper-NMR-spektroskopische Messungen ober- und unterhalb der Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase des Membranlipides ein temperaturabhängiges Orientierungsverhalten nachgewiesen werden (Afonin, 2008). Die Dicke der Membran scheint ebenso keinen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 zu haben, da die Orientierung des Peptides in DLPC und DMPC, trotz unterschiedlich langer Kohlenstoffketten (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6), vergleichbar ist.

Die Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen der  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DOPC haben gezeigt, dass das antimikrobielle Peptid sowohl bei geringen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:200) als auch bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) im S-Zustand vorliegt. Ein Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand sowie ein T-Zustand des MSI-103 konnte nicht nachgewiesen werden. Die Messungen bei niedriger Temperatur haben ebenfalls zu diesem Ergebnis geführt. Somit scheint die Temperatur erneut keinen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 in der Membran zu haben, wobei auch in diesem Fall die Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase des Membranlipides nicht unterschritten wurde. In Modellmembranen bestehend aus DMPC liegt MSI-103 bei geringen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:200) bereits im Übergangszustand zwischen S- und T-Zustand vor und bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) im T-Zustand. Da die Dicke der Membran keinen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 zu haben scheint, ist die unterschiedliche Orientierung des Peptides in DOPC und DMPC vermutlich auf den Unterschied in der Sättigung der Lipide zurückzuführen. DOPC ist im Gegensatz zu DMPC einfach ungesättigt (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6).

Die Ergebnisse der  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie des MSI-103 in Modellmembranen bestehend aus DMoPC sind vergleichbar mit denen in Modellmembranen bestehend aus DOPC. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50) liegt MSI-103 im S-Zustand vor. In Modellmembranen bestehend aus DMPC hingegen liegt MSI-103 bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis  $\geq$  1:50) im T-Zustand vor. Da DMoPC und DMPC gleichlange Kohlenstoffketten aufweisen (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6), liegt der Unterschied in der Orientierung des MSI-103 in DMoPC und DMPC vermutlich im Unterschied der Sättigung der Lipide begründet. DMoPC ist im Gegensatz zu DMPC einfach ungesättigt (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6). Dass die Sättigung der Lipide einen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 zu haben scheint, wird dadurch bestätigt, dass das Peptid in DMoPC eine vergleichbare Orientierung aufweist wie in DOPC und beide Peptide einfach ungesättigt sind (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6).

Die  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-Spektren des MSI-103 in die Eukaryotenmembran-imitierenden Modellmembranen bestehend aus DMPC/CHOL führten zu dem Ergebnis, dass das antimikrobielle Peptid aggregiert vorliegt und seine Orientierung nicht bestimmt werden kann.

Laut  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischer Messungen verhält sich MSI-103 in die Bakterienmembran-imitierenden Modellmembranen bestehend aus POPC/POPE und POPE/POPG vergleichbar wie in Modellmembranen bestehend aus DOPC und DMoPC. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50) liegt MSI-103 im S-Zustand vor. Die Temperatur scheint erneut keinen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 in der Membran zu haben, da die Messungen bei niedriger Temperatur ebenfalls zu diesem Ergebnis geführt haben. Allerdings ist der für die mittlere quadratische Abweichung RMSD ermittelte Wert auffällig hoch, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass unterhalb der Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase des POPE (Tabelle 5.4) gemessen wurde. In Modellmembranen bestehend aus DMPC liegt MSI-103 bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis  $\geq$  1:50) im T-Zustand vor. Da die Dicke der Membran offensichtlich keinen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 zu haben scheint, ist die unterschiedliche Orientierung des Peptides in POPC/POPE sowie in POPE/POPG und DMPC vermutlich auf den Unterschied in der Sättigung der Lipide zurückzuführen. POPC/POPE sowie POPE/POPG sind im Gegensatz zu DMPC einfach ungesättigt (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6). Dass die Sättigung der Lipide einen Einfluss auf das Orientierungsverhalten des MSI-103 zu haben scheint, wird dadurch bestätigt, dass das Peptid in POPC/POPE sowie



POPE/POPG eine vergleichbare Orientierung aufweist wie in DOPC und DMOPC und alle Lipide einfach ungesättigt sind (Tabelle 5.4, Abbildung 5.6).

Die  $^2\text{H}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen des MSI-103 in verschiedenen Modellmembranen, unter Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses sowie der Temperatur haben ergeben, dass a) die Dicke der Membran vermutlich keinen Einfluss auf die Orientierung des Peptides hat, b) die Sättigung der Membranlipide vermutlich das Orientierungsverhalten des Peptides beeinflusst und c) die Temperatur scheinbar keinen Einfluss auf die Orientierung des Peptides hat, solange die Übergangstemperatur von der Gelphase zur flüssigkristallinen Phase des Membranlipides nicht unterschritten wird. Zusammenfassend bedeutet dies, dass MSI-103 seine Wirkung scheinbar temperaturunabhängig ausübt und nicht zwischen Membranen unterschiedlicher Dicke differenziert, sondern seine Wirkungsspezifität vielmehr in der Beschaffenheit der Membranlipide liegt.

## 6. Strukturelle Untersuchungen des antimikrobiellen Peptides Temporin A

Der Wirkungsmechanismus des antimikrobiellen Peptides Temporin A beruht vermutlich auf der Bildung transmembraner Poren (Mangoni, 2006; Simmaco). Um Aussagen über den strukturellen Aufbau dieser Poren und somit über die genauere Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptides treffen zu können, wurde es OCD- und Festkörper-NMR-spektroskopisch untersucht. Für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden verschiedene Seitenkettenmutanten des Temporin A hergestellt, in denen jeweils eine in Frage kommende Aminosäure durch eine fluorierte Aminosäure substituiert wurde. Um zu gewährleisten, dass die durch Einführung einer Fluormarkierung modifizierten Peptide ihre Struktur und Funktion im Vergleich zur natürlichen Form beibehalten, wurden funktionelle Untersuchungen (antimikrobieller Test und Hämolysetest) sowie qualitative Strukturanalysen (CD-Spektroskopie) durchgeführt. Anschließend wurden die Temporin A-Mutanten in Modellmembranen unter verschiedenen Bedingungen (Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses, der Temperatur) mittels  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR untersucht.

### 6.1. Ergebnisse

#### 6.1.1. Festphasenpeptidsynthese

In der folgenden Tabelle sind alle synthetisierten Peptide aufgeführt.

**Tab. 6.1:** Synthetisierte Peptide, ihre Aminosäuresequenz und die jeweils substituierte Aminosäure.

Synthetisiertes Peptid	Aminosäuresequenz	Substituierte Aminosäure
Temporin A	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	-
Temp A CF <sub>3</sub> -Bpg 4	FLP- <b>CF<sub>3</sub>-Bpg</b> -IGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	Leu 4
Temp A CF <sub>3</sub> -Bpg 5	FLPL- <b>CF<sub>3</sub>-Bpg</b> -GRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	Ile 5
Temp A CF <sub>3</sub> -Bpg 6	FLPLI- <b>CF<sub>3</sub>-Bpg</b> -RVLSGIL-NH <sub>2</sub>	Gly 6
Temp A CF <sub>3</sub> -Bpg 8	FLPLIGR- <b>CF<sub>3</sub>-Bpg</b> -LSGIL-NH <sub>2</sub>	Val 8
Temp A CF <sub>3</sub> -Bpg 9	FLPLIGRV- <b>CF<sub>3</sub>-Bpg</b> -SGIL-NH <sub>2</sub>	Leu 9

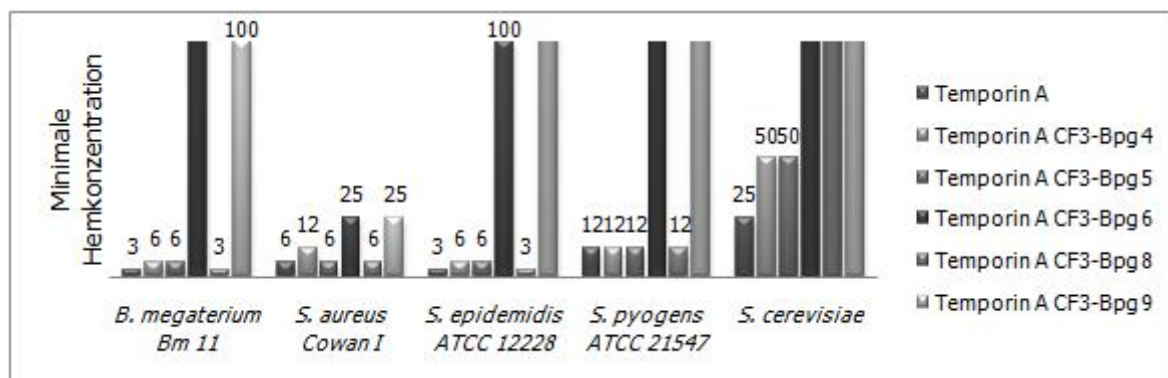
### 6.1.2. Antimikrobieller Test

Die antimikrobiellen Tests des Temporin A sowie seiner <sup>19</sup>F-Mutanten wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Maria-Luisa Mangoni an der Universität in Rom im Rahmen einer Kollaboration durchgeführt.

Die Antimikrobielle Aktivität des Temporin A sowie seiner <sup>19</sup>F-Mutanten wurde gegen vier grampositive Bakterienstämme und die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, getestet. Der antimikrobielle Test wurde mit einer Zweifach-Verdünnungsreihe des zu testenden Peptides durchgeführt, daher ist es nicht möglich genaue MHK-Werte anzugeben. Bereits geringe Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität zweier Peptide können zu um den Faktor zwei unterschiedlichen MHK-Werten führen. Für einen bedeutenden Unterschied müssen sich daher die MHK-Werte mindestens um den Faktor vier unterscheiden. Die maximale verwendete Peptidkonzentration beträgt 100 µmol/ml. Wenn diese nicht antimikrobiell wirkt, wird das getestete Peptid als inaktiv gegen den getesteten Bakterienstamm betrachtet. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Tests sind im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 6.2:** Minimale Hemmkonzentrationen des Temporin A sowie seiner <sup>19</sup>F-Mutanten.

	Minimale Hemmkonzentration [µmol/ml]					
	Temporin A	Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 4	Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 5	Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 6	Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 8	Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 9
<i>B. megaterium</i> Bm11	3	6	6	>100	3	100
<i>S. aureus</i> Cowan I	6	12	6	25	6	25
<i>S. epidemidis</i> ATCC 12228	3	6	6	100	3	>100
<i>S. pyogens</i> ATCC 21547	12	12	12	>100	12	>100
<i>S. cerevisiae</i>	25	50	50	>100	>100	>100



**Abb. 6.1:** Minimale Hemmkonzentrationen des Temporin A sowie seiner <sup>19</sup>F-Mutanten.

Aus Tabelle 6.2 und Abbildung 6.1 geht hervor, dass die minimalen Hemmkonzentrationen der  $^{19}\text{F}$ -Mutanten – mit Ausnahme von Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 und 9 – vergleichbar sind mit denen des Wildtyps. Die Mutanten Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 und 9 sind nahezu gegen alle getesteten Bakterienstämme inaktiv. Sie weisen lediglich gegen den grampositiven Bakterienstamm *S. aureus* Cowan I nennenswerte antimikrobielle Aktivität auf. Die Mutante Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 8 ist – im Gegensatz zum Wildtyp – gegen die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, inaktiv. Ihre antimikrobielle Aktivität gegen die übrigen getesteten Bakterienstämme entsprechen hingegen denen des Wildtyps.

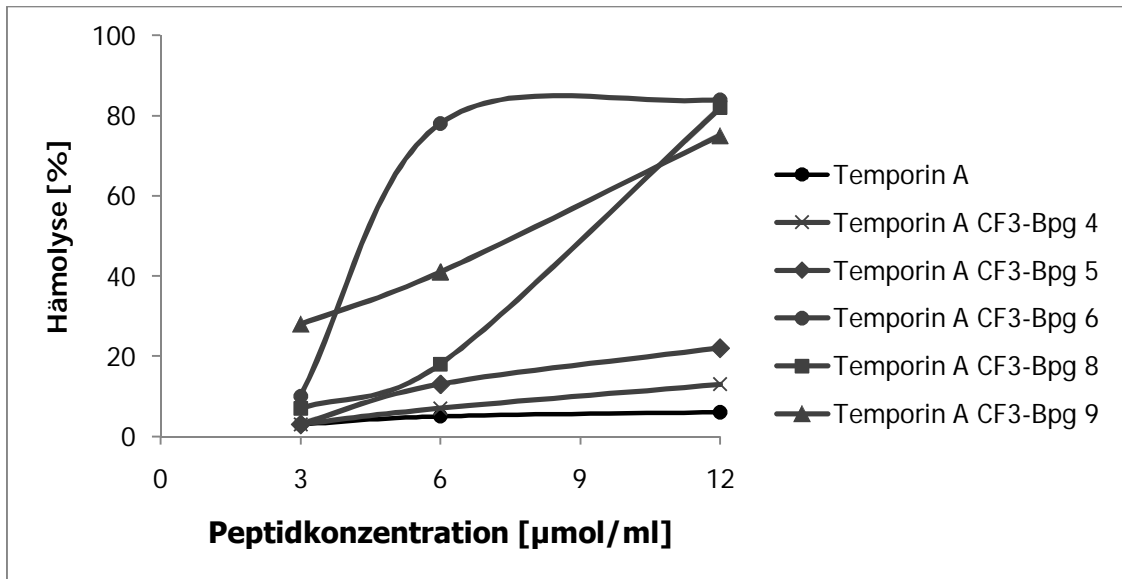
### 6.1.3. Hämolysetest

Die Hämolysetests des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Maria-Luisa Mangoni an der Universität in Rom im Rahmen einer Kollaboration durchgeführt.

Die Ergebnisse der Hämolysetests sind im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 6.3:** Hämolytische Aktivität des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten.

AMP	Hämolyse [%]		
	3 $\mu\text{mol/ml}$	6 $\mu\text{mol/ml}$	12 $\mu\text{mol/ml}$
Temporin A	3	5	6
Temporin A $\text{CF}_3$ -Bpg 4	3	7	13
Temporin A $\text{CF}_3$ -Bpg 5	3	13	22
Temporin A $\text{CF}_3$ -Bpg 6	10	78	84
Temporin A $\text{CF}_3$ -Bpg 8	7	18	82
Temporin A $\text{CF}_3$ -Bpg 9	28	41	75

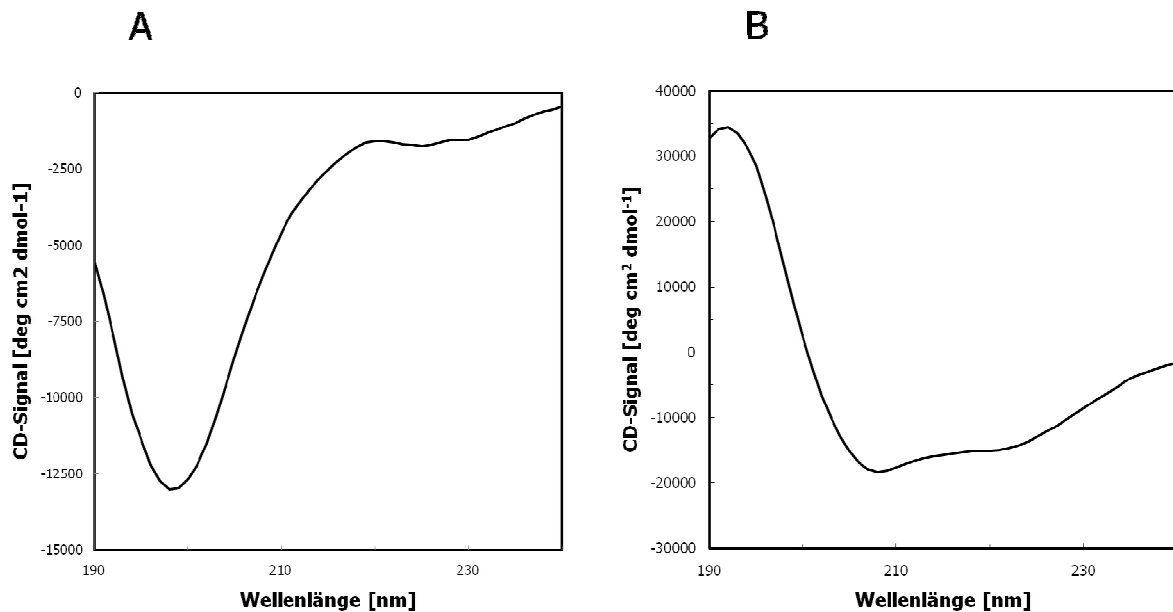


**Abb. 6.2:** Hämolytische Aktivität des Temporin A sowie seiner <sup>19</sup>F-Mutanten.

In Tabelle 6.3 und Abbildung 6.2 ist erkennbar, dass die hämolytische Aktivität der Mutanten Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 4 und 5 leicht höher ist als die des Wildtyps. Die Mutante Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 8 ist – mit Ausnahme bei einer Peptidkonzentration von 12 µmol/ml – ebenfalls leicht höher hämolytisch aktiv als der Wildtyp. Die Mutanten Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 und 9 sind deutlich höher hämolytisch aktiv als der Wildtyp.

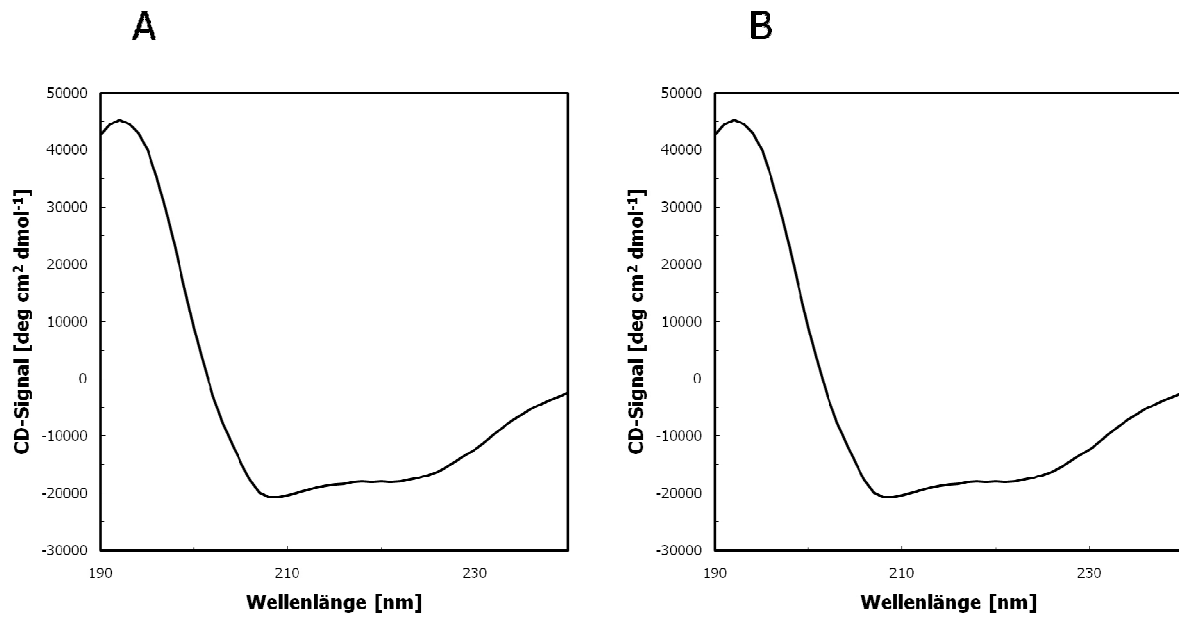
### 6.1.4. CD-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten wurde in Phosphatpuffer, in einer Membran-imitierenden Umgebung aus TFE sowie in DMPC- und DMPC/DMPG-Vesikeln bestimmt. In der folgenden Abbildung sind die erhaltenen CD-Spektren aufgeführt.

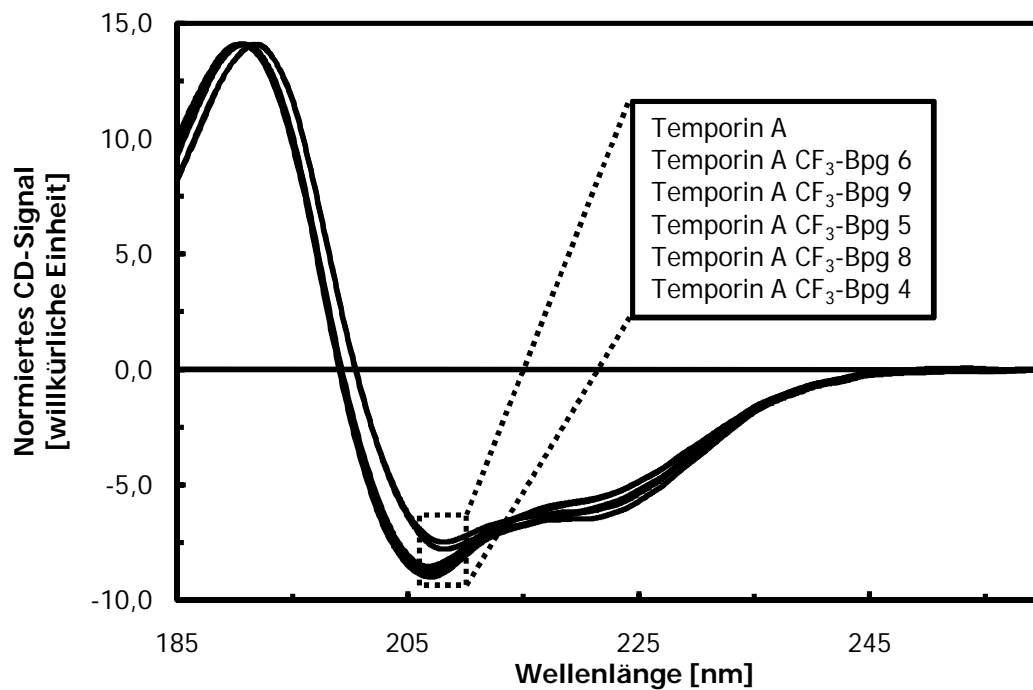


**Abb. 6.3:** A) CD-Spektrum des Temporin A in Phosphatpuffer und B) in TFE/Phosphatpuffer (1:1).

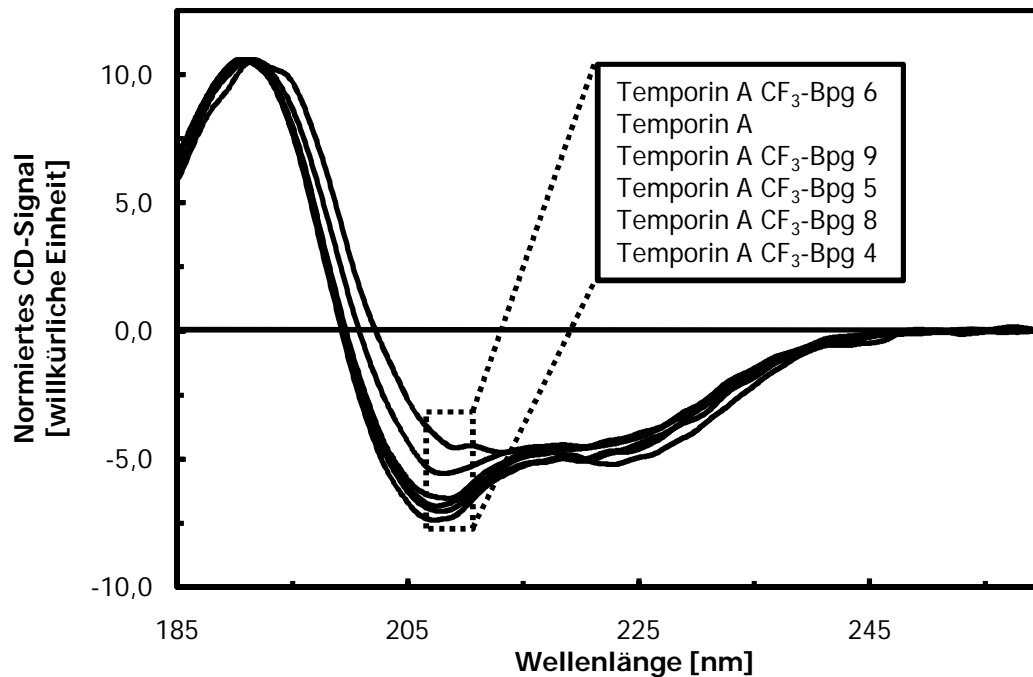
Das CD-Spektrum des Temporin A in Phosphatpuffer weist die charakteristische Linienform einer ungeordneten Knäuelstruktur auf (Abbildung 6.3 A)). Die Linienform, die die CD-Spektren des Temporin A in TFE sowie in DMPC- und DMPC/DMPG-Vesikeln aufweisen, ist charakteristisch für  $\alpha$ -Helices (Abbildungen 6.3 B), 6.4 A) und B)).



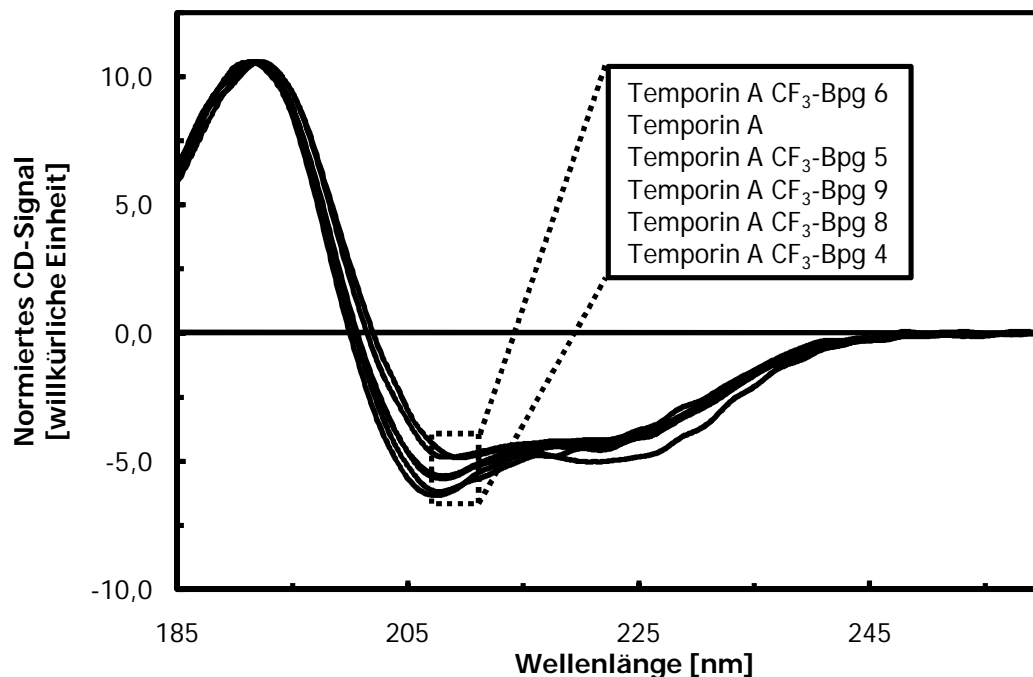
**Abb. 6.4:** A) CD-Spektrum des Temporin A in DMPC- und B) DMPC/DMPG-Vesikeln (3:1).



**Abb. 6.5:** CD-Spektren des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten in TFE/Phosphatpuffer (1:1). Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 192 nm auf einen einheitlichen Wert normiert. In dem vergrößerten Ausschnitt ist die Reihenfolge der Spektren wiedergegeben.



**Abb. 6.6:** CD-Spektren des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten in DMPC-Vesikeln. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 192 nm auf einen einheitlichen Wert normiert. In dem vergrößerten Ausschnitt ist die Reihenfolge der Spektren wiedergegeben.



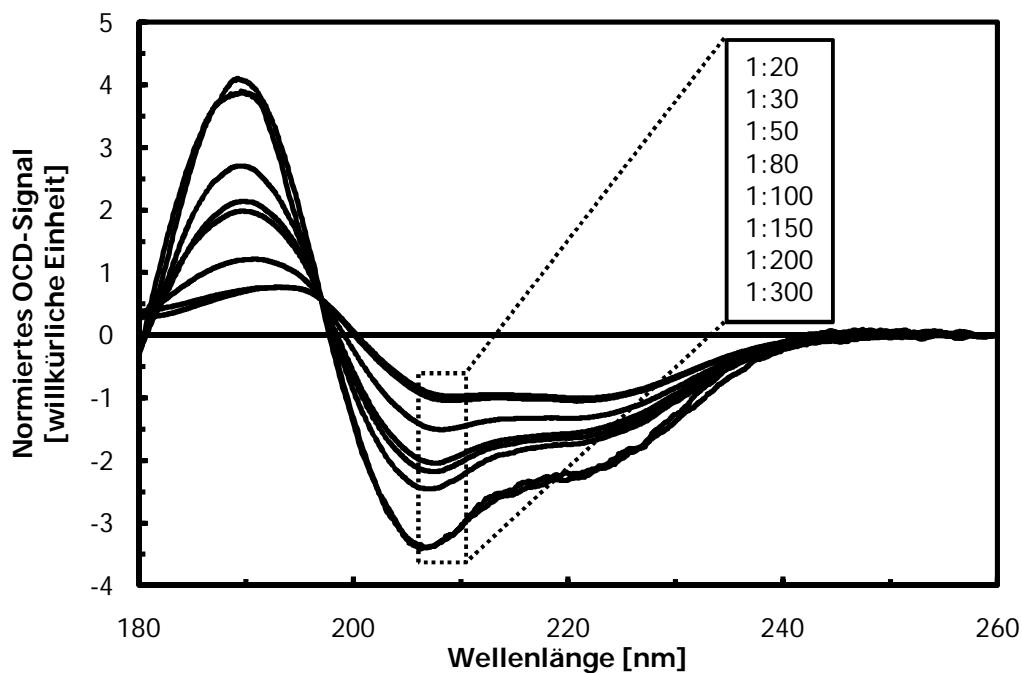
**Abb. 6.7:** CD-Spektren des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten in DMPC/DMPG-Vesikeln (3:1). Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 192 nm auf einen einheitlichen Wert normiert. In dem vergrößerten Ausschnitt ist die Reihenfolge der Spektren wiedergegeben.



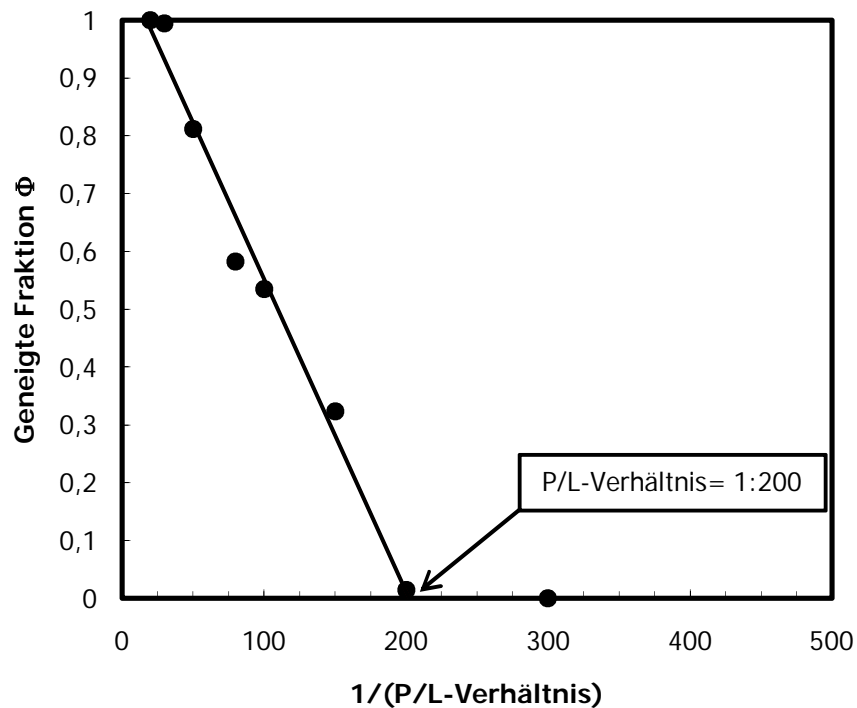
Aus den Abbildungen 6.5, 6.6 und 6.7 wird deutlich, dass die  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des Temporin A – mit Ausnahme von Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 in DMPC – in TFE sowie in DMPC- und DMPC/DMPG-Vesikeln dieselbe Sekundärstruktur aufweisen wie der Wildtyp. Die Mutante Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 weist in DMPC-Vesikeln eine von den übrigen abweichende Linienform auf.

### 6.1.5. OCD-Spektroskopie

Die Orientierung des Temporin A wurde in Modellmembranen bestehend aus DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen bestimmt. Die Ergebnisse der OCD-Spektroskopie sind im Folgenden aufgeführt:



**Abb. 6.8:** OCD-Spektren des Temporin A in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 197 nm auf einen einheitlichen Wert normiert. In dem vergrößerten Ausschnitt ist die Reihenfolge der Spektren wiedergegeben.



**Abb. 6.9:** Grafische Darstellung der geneigten Fraktion des Temporin A in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, als eine Funktion der Peptidkonzentration.

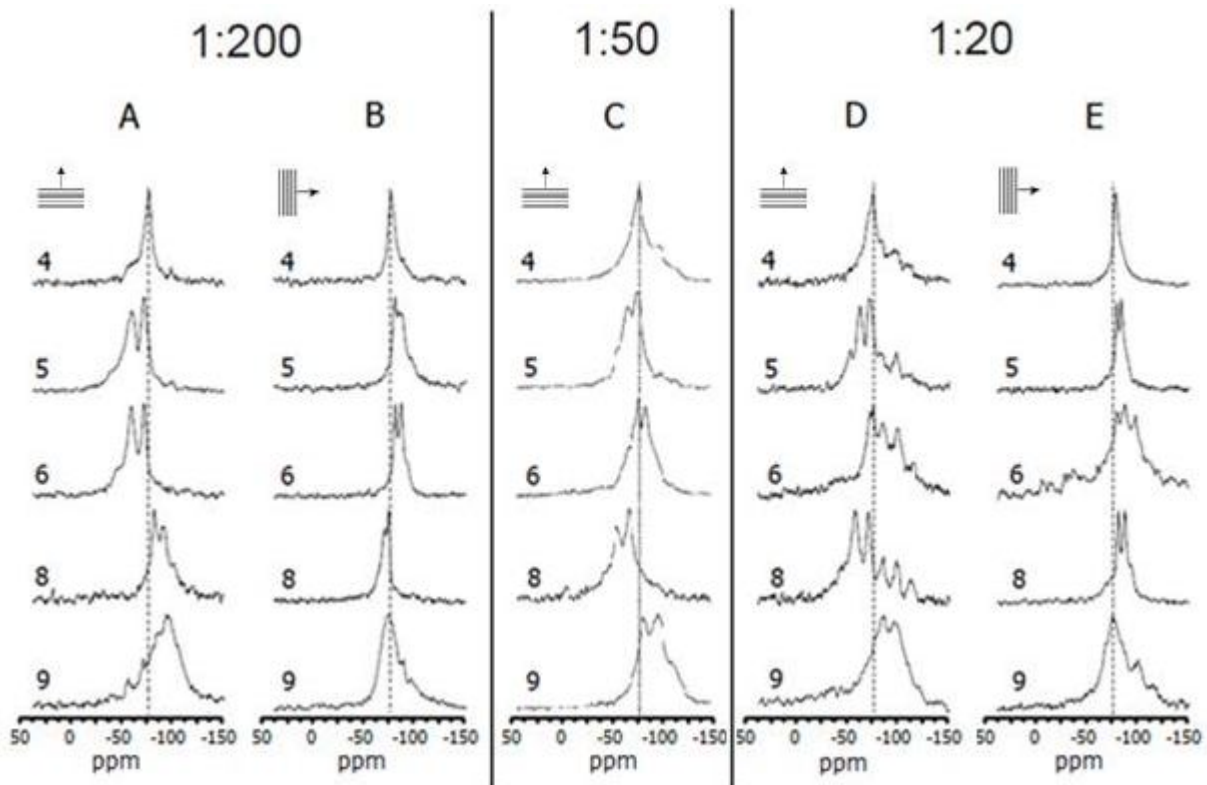
In den Abbildungen 6.8 und 6.9 ist ersichtlich, dass Temporin A bei geringen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im S-Zustand charakteristische Linienform im OCD-Spektrum aufweist und bei hohen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im T-Zustand charakteristische Linienform. Bei dazwischenliegenden Peptidkonzentrationen liegt das antimikrobielle Peptid in verschiedenen Mischungen aus S- und T-Zustand vor. Aus Abbildung 6.9 geht hervor, dass der Übergang des Temporin A aus dem S- in den T-Zustand bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 beginnt.

### 6.1.6. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die genauere Orientierung des Temporin A anhand der Bestimmung der Strukturparameter  $\tau$ ,  $\rho$  und  $S_{\text{mol}}$  erfolgte in Modellmembranen bestehend aus DMPC, unter Variation des Peptid/Lipid-Verhältnisses, bei einer Temperatur von 303 K.

#### $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie des Temporin A in DMPC sind im Folgenden aufgeführt:



**Abb. 6.10:**  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektren des Temporin A in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von A) 1:200, gemessen mit parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale, B) 1:200, gemessen mit senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale, C) 1:50, gemessen mit parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale, D) 1:20 gemessen mit parallel und E) senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale. Die gestrichelte Linie deutet den isotropen Wert an. Von der Position der Aufspaltung relativ zum isotropen Wert kann das Vorzeichen der Aufspaltung bestimmt werden (Glaser, 2004).

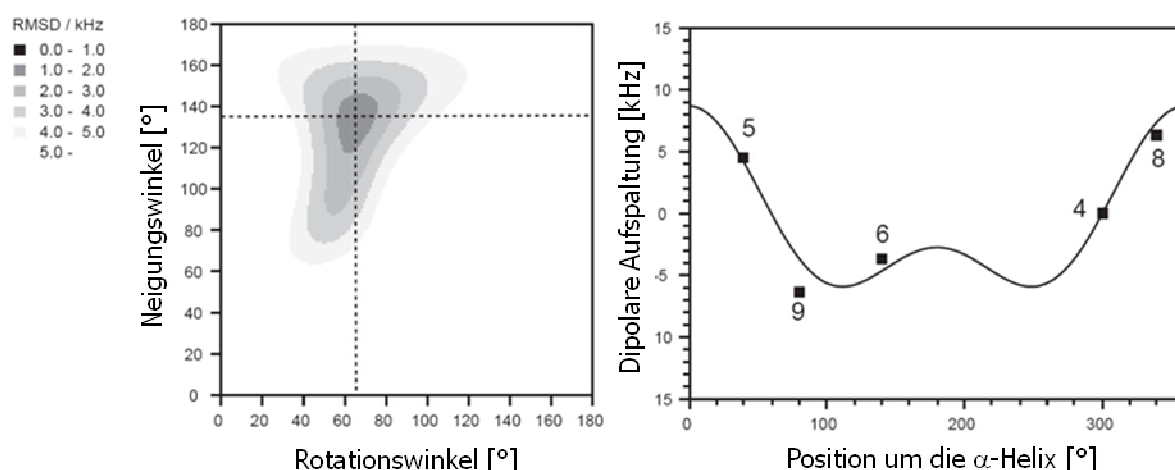
**Tab. 6.4:** Dipolare Aufspaltungen der  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des Temporin A in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen. OP= orientierte Probe.

$^{19}\text{F}$ -Mutante	Dipolare Aufspaltung [kHz]		
	DMPC 1:200 (OP) 0°/90°	DMPC 1:50 (OP) 0°	DMPC 1:20 (OP) 0°/90°
Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 4	+1,0/-1,0	0,0	+1,7/-1,0
Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 5	+6,2/-3,3	+4,6	+4,7/-2,1
Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 6	+6,3/-3,0	-3,7	-3,9/+1,6
Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 8	-4,9/+2,1	+6,4	+6,5/-3,1
Temporin A CF <sub>3</sub> -Bpg 9	+7,5/-3,8	-6,4	-6,2/+3,0

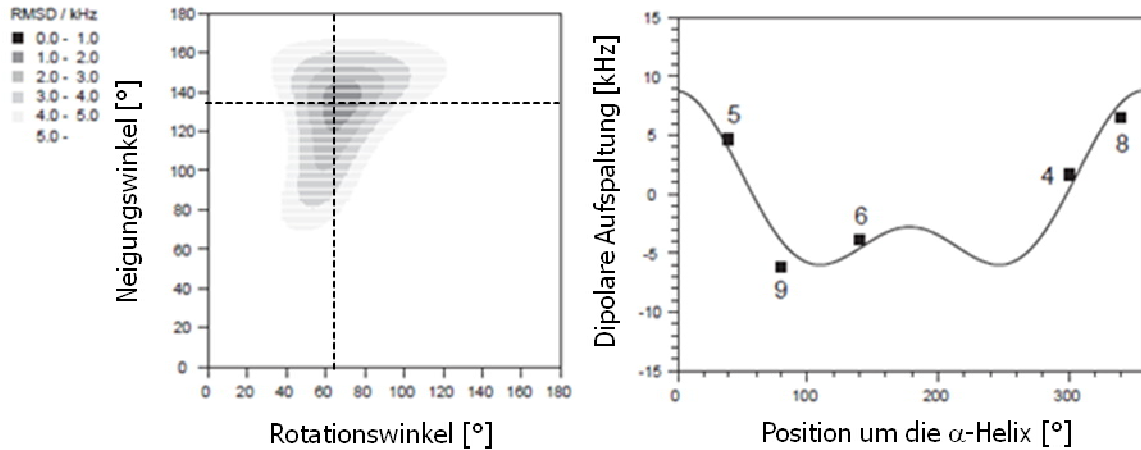
Aus Abbildung 6.10 und Tabelle 6.4 geht hervor, dass die dipolaren Aufspaltungen der Messungen mit parallel zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale um ungefähr den Faktor  $-\frac{1}{2}$  größer sind als die entsprechenden dipolaren Aufspaltungen der Messungen mit senkrecht zum Magnetfeld verlaufender Membrannormale. Dies ist gleichbedeutend damit, dass Temporin A in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20 und kleiner um die Membrannormale rotiert.

**Tab. 6.5:** Strukturparameter für Temporin A in DMPC, in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen, ermittelt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten. OP= orientierte Probe.

P/L-Verhältnis	Neigungswinkel, $\tau$ [°]	Rotationswinkel, $\rho$ [°]	$S_{\text{mol}}$	RMSD [kHz]
1:50 (OP)	135	65	0,75	1,4
1:20 (OP)	135	67	0,76	1,3



**Abb. 6.11:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für Temporin A in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50, erstellt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.



**Abb. 6.12:**  $(\rho, \tau)$ -Plot und Wellenkurve für Temporin A in DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20, erstellt anhand der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten.

In Tabelle 6.5 und den Abbildungen 6.11 und 6.12 ist erkennbar, dass die Orientierung des Temporin A in Modellmembranen bestehend aus DMPC, in einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und 1:20, unter Verwendung der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten aller Mutanten eindeutig bestimmt werden kann. Die für den molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}}$  und die mittlere quadratische Abweichung RMSD ermittelten Werte liegen in einem charakteristischen Bereich. Weiterhin sind die erstellten Wellenkurven gut an die Datenpunkte angepasst und die erstellten  $(\rho, \tau)$ -Plots liefern erwartete Ergebnisse. Der Neigungswinkel von  $135^\circ$  und der Rotationswinkel von  $65^\circ$  entsprechen einer mit dem C-Terminus in die Membran insertierten  $\alpha$ -Helix. In einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200 kann die Orientierung des Temporin A hingegen sowohl unter Verwendung aller Mutanten als auch unter Ausschließen bestimmter  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten nicht eindeutig bestimmt werden. Das Ausschließen der Festkörper-NMR-Daten der antimikrobiell nahezu inaktiven und in DMPC-Vesikeln nicht  $\alpha$ -helikal gefalteten Mutante Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 und/oder der antimikrobiell nahezu inaktiven Mutante Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 9 liefern uncharakteristische Strukturparameter mit verhältnismäßig hoher mittlerer quadratischer Abweichung RMSD. Weiterhin sind die erstellten Wellenkurven nicht gut an die Datenpunkte angepasst und dementsprechend liefern die erstellten  $(\rho, \tau)$ -Plots unerwartete Ergebnisse.

## 6.2. Diskussion

### *Funktionelle Untersuchungen und qualitative Strukturanalysen*

Die antimikrobiellen Tests des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten haben ergeben, dass die getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 und 9 – vergleichbare MHK-Werte wie der Wildtyp aufweisen. Die Substitution einer natürlichen Aminosäure aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon  $\text{CF}_3$ -Bpg scheint somit keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des Peptides zu haben. Eine Ausnahme bilden hierbei die Mutanten Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 und 9. Sie sind nahezu gegen alle getesteten Bakterienstämme inaktiv. Sie weisen lediglich gegen den grampositiven Bakterienstamm *S. aureus* Cowan I nennenswerte antimikrobielle Aktivität auf. Die Substitution der kleinsten und einfachsten Aminosäure Glycin-6 sowie der Aminosäure Leucin-9 aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides Temporin A durch das große und komplexe Aminosäureanalogon  $\text{CF}_3$ -Bpg scheint somit die antimikrobielle Aktivität des Peptides zu verringern.

Die Hämolysetests des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten haben das Ergebnis der antimikrobiellen Tests bestätigt. Die Seitenkettenmutanten zeigen – mit Ausnahme von Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 und 9 – vergleichbare prozentuale Hämolysewerte wie der Wildtyp auf. Die Substitution der Aminosäuren Glycin-6 und Leucin-9 aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides Temporin A durch das Aminosäureanalogon  $\text{CF}_3$ -Bpg scheint somit die hämolytische Aktivität des Peptides zu verstärken.

Die CD-spektroskopischen Messungen des Temporin A in Phosphatpuffer, in TFE sowie in DMPC- und DMPC/DMPG-Vesikeln haben gezeigt, dass das antimikrobielle Peptid in wässriger Lösung ungefaltet vorliegt und nach der Bindung an Lipidmembranen eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur annimmt. Weiterhin haben die Messungen der  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des Temporin A ergeben, dass die getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 in DMPC – jeweils eine vergleichbare Linienform im CD-Spektrum wie der Wildtyp aufweisen. Die Substitution einer natürlichen Aminosäure aus der Sequenz des antimikrobiellen Peptides durch das Aminosäureanalogon  $\text{CF}_3$ -Bpg scheint somit – mit Ausnahme von Temporin A  $\text{CF}_3$ -Bpg 6 in DMPC – keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptides zu haben.

Die funktionellen Untersuchungen und qualitativen Strukturanalysen des Temporin A sowie seiner  $^{19}\text{F}$ -Mutanten haben ergeben, dass a) sowohl die antimikrobielle Aktivität als auch b) die hämolytische Aktivität der getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 und 9 – vergleichbar mit der des Wildtyps ist und c) die Sekundärstruktur der getesteten Seitenkettenmutanten – mit Ausnahme von Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 in DMPC – sich bezüglich des Wildtyps nicht ändert. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Festkörper-NMR-spektroskopischen Ergebnisse, die für die  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des antimikrobiellen Peptides Temporin A erhalten werden, auch auf den Wildtyp übertragbar sind, wobei die Mutanten Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 und 9 eventuell unerwartete Ergebnisse liefern.

### *OCD-Spektroskopie*

Die OCD-spektroskopischen Messungen des Temporin A in Modellmembranen bestehend aus DMPC haben ergeben, dass das antimikrobielle Peptid bei geringen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im S-Zustand charakteristische Linienform im OCD-Spektrum aufweist und bei hohen Peptidkonzentrationen die für  $\alpha$ -Helices im T-Zustand charakteristische Linienform. Der Übergang des Temporin A aus dem S- in den T-Zustand beginnt bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:200. Somit beginnt Temporin A bei einer höheren Peptidkonzentration als MSI-103 (P/L-Verhältnis= 1:240) und bei einer viel geringeren Peptidkonzentration als PGLa (P/L-verhältnis= 1:80) in die Membran zu insertieren.

### *Festkörper-NMR-Spektroskopie*

Die  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-spektroskopischen Messungen des Temporin A in Modellmembranen bestehend aus DMPC haben gezeigt, dass das antimikrobielle Peptid bei niedrigen Peptidkonzentrationen (Peptid/Lipid-Verhältnis= 1:200) um die Membrannormale rotiert. Allerdings kann die Orientierung des Temporin A in diesem Fall sowohl unter Verwendung aller Mutanten als auch unter Ausschließen bestimmter  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Daten nicht eindeutig bestimmt werden. Das Ausschließen der Festkörper-NMR-Daten der antimikrobiell nahezu inaktiven und in DMPC-Vesikeln nicht  $\alpha$ -helikal gefalteten Mutante Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 6 und/oder der antimikrobiell nahezu inaktiven Mutante Temporin A CF<sub>3</sub>-Bpg 9 liefern uncharakteristische Strukturparameter mit verhältnismäßig hoher mittlerer quadratischer Abweichung RMSD. Weiterhin sind die erstellten Wellenkurven nicht gut an die Datenpunkte angepasst und dementsprechend liefern die erstellten  $(\rho, \tau)$ -Plots unerwartete Ergebnisse. Bei

hohen Peptidkonzentrationen (P/L-Verhältnis= 1:50 und 1:20) liegt Temporin A im T-Zustand vor und rotiert weiterhin um die Membrannormale. Hingegen stoppt MSI-103 die Rotation um die Membrannormale bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:50 und PGLa bei einem Peptid/Lipid-Verhältnis von 1:20. Da die Festkörper-NMR-Messungen der  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des Temporin A nicht grundsätzlich, sondern vielmehr bei niedriger Peptidkonzentration unerwartete Ergebnisse liefern, deutet auch die  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie auf ein konzentrationsabhängiges Orientierungsverhalten des antimikrobiellen Peptides Temporin A hin.



## 7. Zusammenfassung

Antimikrobielle Peptide, die als eine der wichtigsten Komponenten des angeborenen Immunsystems in nahezu jeder Lebensform vorkommen, gewinnen immer mehr an Bedeutung als potenzielle Antibiotika der Zukunft (Hancock, 2006; Kamysz, 2003). Diese neuartigen Antibiotika sind weniger anfällig gegenüber der Entwicklung bakterieller Resistenzen, da ihre Wirkung ohne Bindung an spezifische Rezeptoren zustande kommt (Pazdzierny, 2003). MSI-103 ist ein künstliches antimikrobielles Peptid, das auf der Aminosäuresequenz des natürlichen antimikrobiellen Peptides PGLa aus dem Afrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis*, basiert (Blazyk, 2001; Maloy, 1995). Temporin A ist ein natürliches antimikrobielles Peptid aus dem Grasfrosch, *Rana temporaria* (Simmaco, 1996). Der Wirkmechanismus beider antimikrobieller Peptide beruht vermutlich auf der Bildung transmembraner Poren (Mangoni, 2006; Simmaco, 1996; Toke, 2004 b).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten Untersuchungen mittels Zirkulardichroismus (CD) und Festkörper-NMR Aussagen über den jeweiligen strukturellen Aufbau dieser Poren und somit über die genauere Wirkungsweise beider antimikrobieller Peptide ermöglichen.

Für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden fünf  $^{19}\text{F}$ - und sieben  $^2\text{H}$ -Mutanten des MSI-103 mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese sowie fünf  $^{19}\text{F}$ -Mutanten des Temporin A mittels manueller Festphasenpeptidsynthese hergestellt und mittels HPLC aufgereinigt. Fluormarkierungen wurden durch die jeweilige Substitution der in Frage kommenden Aminosäure durch  $\text{CF}_3$ -Phg (bei MSI-103) bzw.  $\text{CF}_3$ -Bpg (bei Temporin A) und Deuteriummarkierungen durch Substitution der in Frage kommenden Aminosäure durch Ala- $\text{d}_3$  erreicht.

Um zu gewährleisten, dass die durch Einführung einer Deuterium- bzw. Fluormarkierung modifizierten Peptide ihre Struktur und Funktion im Vergleich zur natürlichen Form beibehalten, wurden funktionelle Untersuchungen (antimikrobieller Test und Hämolysetest) sowie qualitative Strukturanalysen (CD-Spektroskopie) durchgeführt. Diese haben für die meisten Analoga keine funktionellen oder strukturellen Störungen bestätigt – mit Ausnahme einer Mutante des MSI-103 und zweier Mutanten des Temporin A.

Mittels orientierter CD (OCD)-Spektroskopie konnte erstmals gezeigt werden, dass beide antimikrobiellen Peptide ein konzentrationsabhängiges Orientierungsverhalten in

Modellmembranen bestehend aus DMPC aufweisen. Dieses konzentrationsabhängige Orientierungsverhalten konnte im Falle des MSI-103 mittels Festkörper-NMR bestätigt werden. Im Falle des Temporin A hingegen erschwerte sich die Bestimmung der Orientierung bei niedrigen Peptidkonzentrationen. Das antimikrobielle Peptid Temporin A bedarf somit weiterer Untersuchungen in verschiedenen Modellmembranen, unter Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses sowie der Temperatur.

Weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen des MSI-103 in Modellmembranen, unter verschiedenen Bedingungen (Variation der Phospholipidkomposition, des Peptid/Lipid-Verhältnisses sowie der Temperatur) haben erstmalig aufgezeigt, dass das antimikrobielle Peptid seine Wirkung scheinbar temperaturunabhängig ausübt und nicht zwischen Membranen unterschiedlicher Dicke differenziert, sondern dass seine Wirkungsspezifität vielmehr in der Beschaffenheit der Membranlipide liegt.

Funktionelle Untersuchungen zur Ermittlung des Einflusses einer C-terminalen Amidierung auf die antimikrobielle und hämolytische Aktivität des MSI-103 sowie auf weitere kationische,  $\alpha$ -helikale Peptide haben erstmals gezeigt, dass MSI-103-COOH im Gegensatz zu MSI-103, PGLa, PGLa-COOH, MAP und MAP-COOH ein verbessertes neues Antibiotikum darstellt, das effektiver gegen Infektionserreger wirkt und dabei weniger Nebenwirkungen aufweist.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhaltenen Ergebnisse liefern die Grundlage für weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur Aufdeckung der genaueren Wirkungsweise antimikrobieller Peptide und somit zur Erforschung neuartiger, leistungsfähigerer Antibiotika.

## 8. Literatur

Aboudy, Y., Mendelson, E., Shalit, I., Bessalle, R. und Fridkin, M. (1994). Activity of two synthetic amphiphilic peptides and magainin-2 against herpes simplex virus types 1 and 2. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43(6), 573-582.

Afonin, S., Dürr, U. H. N., Glaser, R. W. und Ulrich, A. S. (2004). 'Boomerang'-like insertion of a fusogenic peptide in a lipid membrane revealed by solid-state  $^{19}\text{F}$  NMR. *Magn. Reson. Chem.* 42(2), 195-203.

Afonin, S., Glaser, R. W., Berdichevskaja, M., Wadhvani, P., Gührs, K-H., Möllmann, U., Perner, A. und Ulrich, A. S. (2003). 4-fluorophenylglycine as a label for  $^{19}\text{F}$  NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *Chembiochem.* 4(11), 1151-1163.

Afonin, S., Grage, S. L., Ieronimo, M., Wadhvani, P. und Ulrich, A. S. (2008). Temperature-dependent transmembrane insertion of the amphiphilic peptide PGLa in lipid bilayers observed by solid state  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 130(49), 16512–16514.

Afonin, S., Mikhailiuk, P. K., Komarov, I. V. und Ulrich, A. S. (2007). Evaluating the amino acid  $\text{CF}_3$ -bicyclopentylglycine as a new label for solid-state  $^{19}\text{F}$ -NMR structure analysis of membrane-bound peptides. *J. Pept. Sci.* 13(9), 614-623.

Andreu, D., Aschauer, H., Kreil, G. und Merrifield, R. B. (1985). Solid-phase synthesis of PYLa and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4-24)] from skin secretion of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Biochem.* 149(3), 531-535.

Avanti Polar Lipids (2009). Internetseite: [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).

Bechinger, B., Zasloff M. und Opella, S. J. (1998). Structure and dynamics of the antibiotic peptide PGLa in membranes by solution and solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* 74(2), 981-987.

Blazyk, J., Wiegand, R., Klein, J., Hammer, J., Epand, R. M. , Epand, R. F., Maloy, W. L. und Kari, U. P. (2001). A novel linear amphipathic  $\beta$ -sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. *J. Biol. Chem.* 276(30), 27899-27906.

Bulle, J. und Huttermann, A. (2000). Das Basiswissen der Organischen Chemie. Wiley-VCH Verlag.

Bürck, J., Roth S., Wadhvani P., Afonin S., Kanithasen N., Strandberg E. und Ulrich A. S. (2008). Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. *Biophys. J.* 95(8), 3872-3881.

Campbell, N. A., Reece, J. B. und Markl, J. (2006). *Biologie*. Pearson Verlag.

Carotenuto, A., Malfi, S., Rosaria Saviello, M., Campiglia, P., Gomez-Monterrey, I., Mangoni, M. L., Marcellini Hercolani Gaddi, L., Novellino, E. und Grieco, P. (2008). A different molecular mechanism underlying antimicrobial and hemolytic actions of Temporins A and L. *J. Med. Chem.* 51(8), 2354-2362.

Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E., Vasil, M. L. und Hodges, R. S. (2005). Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J. Biol. Chem.* 280(13), 12316-12329.

Daher K. A., Selsted, M. E. und Lehrer, R. I. (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60(3), 1068-1074.

Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. und Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 501(2), 146-150.

Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., Beyermann, M. und Bienert, M. (1997). Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* 403(2), 208-212.

Edgerton, M., Koshlukova, S. E., Araujo, M. W., Patel, R. C., Dong, J. und Bruenn, J. A. (2000). Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44(12), 3310-3316.

- Fields, G. B. und Noble, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35(3), 161-214.
- Gallo, R. L. und Huttner, K. M. (1998). Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* 111(5), 739-743.
- Ganz, T. und Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today* 5(7), 292-297.
- Giangaspero, A., Sandri, L. und Tossi, A. (2001). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides: a systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem.* 268(21), 5589-5600.
- Gibson, B. W., Poulter, L., Williams, D. H. und Maggio, J. E. (1986). Novel peptide fragments originating from PGLa and the caerulein and xenopsin precursors from *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 261(12), 5341-5349.
- Giovannini, M. G., Poulter, L., Gibson, B. W. und Williams, D. H. (1987). Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem. J.* 243(1), 113-120.
- Glaser, R. W., Sachse, C., Dürr, U. H. N., Wadhvani, P., Afonin, S., Strandberg, E. und Ulrich, A. S. (2005). Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes observed by solid state  $^{19}\text{F}$ -NMR. *Biophys. J.* 88(5), 3392-3397.
- Glaser, R. W., Sachse, C., Dürr, U. H. N., Wadhvani, P. und Ulrich, A. S. (2004). Orientation of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes determined from  $^{19}\text{F}$ -NMR dipolar couplings of 4-CF<sub>3</sub>-phenylglycine labels. *J. Magn. Reson.* 168(1), 153-163.
- Hancock, R. E. W. und Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(6), 1317-1323.
- Hancock, R. E. W. und Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24(12), 1551-1557.

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (2006). Broschüre: Krankheitserregern auf der Spur.

Hoffmann, W., Richter, K. und Kreil, G. (1983). A novel peptide designated PYLa and its precursor as predicted from cloned mRNA of *Xenopus laevis* skin. *EMBO J.* 2(5), 711-714.

Huang, H. W. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39(29), 8347-8352.

Huang, H. W., Chen, F. Y. und Lee, M. T. (2004). Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* 92(19), 1983041-1983044.

Kamysz, W., Okroj, M. und Lukasiak, J. (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta. Biochim. Pol.* 50(2), 461-469.

Kanithasen, N. (2005). Diplomarbeit: <sup>2</sup>H- and <sup>19</sup>F-solid-state NMR studies of the antimicrobial peptide (KIAGKIA)<sub>3</sub> in phospholipid bilayers.

Komoroski, R. A. (1986). High resolution NMR spectroscopy of synthetic polymers in bulk. Wiley-VCH Verlag.

Kondejewski, L. H., Jelokhani-Niaraki, M., Farmer, S. W., Lix, B., Kay, C. M., Sykes, B. D., Hancock, R. E. und Hodges, R. S. (1999). Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. *J. Biol. Chem.* 274(19), 13181-13192.

Kranz, B., Bürck, J., Franzreb, M., Köster, R. und Ulrich, A. S. (2007). Circular dichroism analysis of penicillin G acylase covalently immobilized on silica nanoparticles. *J. Coll. Interface Sci.* 316(2), 413-419.

Lobley, A., Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 18(1), 211-212.

Maisch, D. (2007). Dissertation: Synthese und Strukturuntersuchungen des membranaktiven Peptaibols Alamethicin mittels  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR.

Maloy, W. L. und Kari, U. P. (1995). Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37(2), 105-122.

Mangoni, M. L., Maisetta, G., Di Luca, M., Gaddi, L. M. H., Esin, S., Florio, W., Brancatisano, F. L., Barra, D., Campa, M. und Batoni, G. (2008). Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(1), 85-91.

Mangoni, M. L., Rinaldi, A. C., Di Giulio, A., Mignogna, G., Bozzi, A., Barra, D. und Simmaco, M. (2000). Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* 267(5), 1447-1454.

Mangoni, M. L., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M. und Rivas, L. (2005). Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J. Biol. Chem.* 280(2), 984-990.

Mangoni, M. L. (2006). Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(9), 1060-1069.

Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85(14), 2149-2154.

Mikhailiuk, P. K., Afonin, S., Chernega, A. N., Rusanov, E. B., Platonov, M., Dubinina, G., Berditsch, M., Ulrich, A. S., Komarov, I. V. (2006). Conformationally rigid trifluoromethyl-substituted  $\alpha$ -amino acid designed for peptide structure analysis by solid state  $^{19}\text{F}$ -NMR. *Angew. Chem.* 45(34), 5659-5661.

Moore, K. S., Bevins, C. L., Brasseur, M. M., Tomassini, N., Turner, K., Eck, H. und Zasloff, M. (1991). Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 266(29), 19851-19857.

Olah, G. A. und Huang, H. W. (1988). Circular dichroism of oriented  $\alpha$  helices. I. Proof of the exciton theory. *J. Chem. Phys.* 89(4), 2531-2538.

Oren, Z., Ramesh, J., Avrahami, D., Suryaprakash, Y., Shai, Y. und Jelinek, R. (2002). Structures and mode of membrane interaction of a short alpha helical lytic peptide and its diastereomer determined by NMR, FTIR, and fluorescence spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 269(16), 3869-3880.

Oren, Z. und Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47(6), 451-463.

Pazdzierny, G. (2003). Antimikrobielle Peptide: Antibiotika der Zukunft? *Junior RUBIN 2003*, 20-24.

Rinaldi, A. C., Mangoni, M. L., Rufo, A., Luzi, C., Barra, D., Zhao, H., Kinnunen, P. K. J., Bozzi, A., Di Giulio, A. und Simmaco, M. (2002). Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem. J.* 368(1), 91-100.

Rosenfeld, Y., Barra, D., Simmaco, M., Shai, Y. und Mangoni, M. L. (2006). A synergism between Temporins toward gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. *J. Biol. Chem.* 281(39), 28565-28574.

Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2), 55-70.

Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66(4), 236-248.

Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M. L. und Barra, D. (1996). Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* 242(3), 788-792.



Soravia, E., Martini, G. und Zasloff, M. (1988). Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* 228(2), 337-340.

Strandberg, E., Kanithasen, N., Tiltak, D., Bürck, J., Wadhvani, P., Zwernemann, O. und Ulrich, A. S. (2008). Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its parent peptide PGLa in lipid bilayers. *Biochemistry* 47(8), 2601-2616.

Strandberg, E., Tiltak, D., Ieronimo, M., Kanithasen, N., Wadhvani, P. und Ulrich, A. S. (2007). Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic  $\alpha$ -helical peptides. *Pure Appl. Chem.* 79(4), 717-728.

Strandberg, E. und Ulrich, A. S. (2004). NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts Magn. Reson.* 23A(2), 89-120.

Strandberg, E., Wadhvani, P., Tremouilhac, P., Dürr, U. H. N. und Ulrich, A. S. (2006). Solid-state NMR analysis of the PGLa peptide orientation in DMPC bilayers: structural fidelity of  $^2\text{H}$ -labels versus high sensitivity of  $^{19}\text{F}$ -NMR. *Biophys. J.* 90(5), 1676-1686.

Strandberg, E., Wadhvani, P., Tremouilhac, P., Kanithasen, N., Zwernemann, O. und Ulrich, A. S. (2005). Poster: Comparative analysis of antimicrobial peptides.

Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80(6), 717-735.

Toke, O., Maloy, W. L., Kim, S. J., Blazyk, J. und Schaefer, J. (2004 a). Secondary structure and lipid contact of a peptide antibiotic in phospholipid bilayers by REDOR. *Biophys. J.* 87(1), 662-674.

Toke, O., O'Connor, R. D., Weldeghiorghis, T. K., Maloy, W. L., Glaser, R. W., Ulrich, A. S. und Schaefer, J. (2004 b). Structure of (KIAGKIA)<sub>3</sub> aggregates in phospholipid bilayers by solid-state NMR. *Biophys. J.* 87(1), 675-687.

Tremouilhac, P., Strandberg, E., Wadhvani, P. und Ulrich, A. S. (2006). Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state  $^2\text{H}$ -NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1758(9), 1330-1342.

Ulrich, A. S. (2005). Solid state  $^{19}\text{F}$  NMR methods for studying biomembranes. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spec.* 46(1), 1-21.

Ulrich, A. S., Wadhvani, P., Dürr, U. H. N., Afonin, S., Glaser, R. W., Sachse, C., Berditchevskaia, M. und Grage, S. (2004). Solid-state  $^{19}\text{F}$ -nuclear magnetic resonance analysis of membrane-active peptides. Ramamoorthy, A., *NMR spectroscopy of biological solids*, Taylor & Francis Verlag, 215-236.

Viamedica-Stiftung (2008). Broschüre: Informationen zum Problem der Antibiotika-Resistenz und zum richtigen Umgang mit Antibiotika.

Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucl. Acids Res.* 32(Web server issue), W668-W673.

Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89(5), 392-400.

Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M. und Seelig, J. (2000). Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 39(2), 442-452.

Wu, Y., Huang, H. W. und Olah, G. A. (1990). Method of oriented circular dichroism. *Biophys. J.* 57(4), 797-806.

Zelezetsky, I., Pag, U., Sahl, H. G. und Tossi, A. (2005). Tuning the biological properties of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides: rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides* 26(12), 2368-2376.

Zelezetsky, I. und Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides – Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1758(9), 1436-1449.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 29.07.1981  
Geburtsort: Kaiserslautern  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### Berufliche Erfahrung

01/2006-12/2008 Institut für Organische Chemie,  
Lehrstuhl Biochemie der Universität Karlsruhe (TH),  
*Assistentin des Biochemie-Praktikums im Bereich Genetik/Gentechnik*

### Promotion

01/2006-12/2008 Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie,  
Lehrstuhl Biochemie der Universität Karlsruhe (TH) und am Institut für  
Biologische Grenzflächen des Forschungszentrums Karlsruhe  
*Thema: Strukturelle und funktionelle Untersuchungen der  
antimikrobiellen Peptide MSI-103 und Temporin A*

### Studium

16.01.2006 Diplom-Biologin

10/2000-01/2006 Studium der Diplom Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)

05/2005-01/2006 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie,  
Lehrstuhl Biochemie der Universität Karlsruhe (TH)  
*Thema: Expression des  $TatA_d$ -Proteins aus *Bacillus subtilis* in  
*Escherichia coli* für NMR-spektroskopische Untersuchungen*

## Schule

- 14.06.2000            Abitur am Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern
- 09/1992-06/2000    Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern
- 13.07.1998            Auszeichnung als Anerkennung für sehr lobenswerte schulische Leistungen während der Sekundarstufe I und Überspringen der Halbjahre 10/2 und 11/1

## Veröffentlichungen

- in Bearbeitung        Deniz Tiltak, Erik Strandberg, Parvesh Wadhvani und Anne S. Ulrich, *Lipid-dependent orientation of the antimicrobial peptide MSI-103 in phospholipid bilayers studied by solid-state <sup>2</sup>H-NMR*
- 2008                    Erik Strandberg, Nathalie Kanithasen, Deniz Tiltak, Jochen Bürck, Parvesh Wadhvani, Olaf Zwernemann und Anne S. Ulrich, *Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its parent peptide PGLa in lipid bilayers*, *Biochemistry*, 2008, Bd. 47, Nr. 8, S. 2601-2616
- 2007                    Erik Strandberg, Deniz Tiltak, Marco Ieronimo, Nathalie Kanithasen, Parvesh Wadhvani und Anne S. Ulrich, *Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic  $\alpha$ -helical peptides*, *Pure and Applied Chemistry*, 2007, Bd. 79, Nr. 4, S. 717-728

## Tagungsbeiträge

- 2007                    Deniz Tiltak, Erik Strandberg, Marco Ieronimo, Nathalie Kanithasen, Parvesh Wadhvani und Anne S. Ulrich, *Biological activities of designer-made cell penetrating and antimicrobial peptides against eukaryotic and prokaryotic cells*, CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb, Deutschland

2006

Deniz Tiltak, Erik Strandberg, Marco Ieronimo, Nathalie Kanithasen,  
Parvesh Wadhvani und Anne S. Ulrich,

*Biological activities of designer-made antimicrobial peptides against  
bacteria and erythrocytes,*

6<sup>th</sup> Annual Surface and Colloid Symposium Lipid-Peptide Interactions  
and Biological Function, Lund, Schweden