

# Strukturuntersuchungen antimikrobieller Peptide an biologischen und artifiziellen Membranen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) - Universitätsbereich  
vorgelegte

**DISSERTATION**

von

**Diplom-Biologin Katja Koch**

**aus Gera**

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2007 bis Mai 2010 am Institut für organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie, am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich - unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die bereits angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch nicht als Prüfungsschrift eingereicht, weder an dieser noch an einer anderen Hochschule.

Katja Koch

Karlsruhe, den 01.06.2010

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Anne S. Ulrich, für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas sowie ihre fortwährende Unterstützung.

Prof. Dr. Burkhard Luy möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Dr. Sergii Afonin, meinem Betreuer, danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die interessanten Diskussionen und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Dr. Parvesh Wadhvani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck aus dem PepSy Lab spreche ich meinen herzlichen Dank für die Synthesen der für meine Arbeit benötigten Peptide aus.

Dem CD-Labor-Team, Dr. Jochen Bürck und Siegmund Roth, danke ich für die Unterstützung bei den Messungen, für wertvolle Tips und Tricks und hilfreiche Anregungen.

Für die Hilfe bei allen mikrobiologischen Arbeiten und Problemen möchte ich Dr. Marina Berditsch danken.

Dr. Stephan Grage und Ronald Lochte danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Relaxationsmessungen.

Dr. Marco Ieronimo spreche ich meinen Dank für die vielen Hilfestellungen zu Beginn meiner Promotion aus.

Dr. Christian Mink, Mareike Hartmann, Silke Hoffman und Susi Fanghänel möchte ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Dem gesamten Arbeitskreis Ulrich danke ich für eine sehr freundliche, immer hilfsbereite und tolle Arbeitsatmosphäre im Labor an der Uni sowie am Forschungszentrum.

Meiner Familie und besonders meinem Mann Markus möchte ich für ihre fortwährende Unterstützung und ihre Liebe danken.

## **Inhaltsverzeichnis**

---

<b>Erklärung</b> .....	<b>i</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>ii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>iii</b>
<b>1 Motivation</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Hintergrund</b> .....	<b>3</b>
2.1 Lipidmembranen.....	3
2.1.1 Membranmodelle.....	5
2.1.2 Prokaryotische Membranen.....	8
2.1.2.1 <i>Micrococcus luteus</i> .....	13
2.1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
2.1.3 Eukaryotische Membranen .....	16
2.1.3.1 Erythrozyten.....	18
2.1.4 Präparationsmethoden nativer Biomembranen .....	19
2.2 Membran-aktive Peptide – antimikrobielle Peptide (AMPs).....	21
2.2.1 Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid (PGLa).....	22
2.2.2 Gramicidin S.....	24
2.3 Wechselwirkungen zwischen AMPs und Lipidmembranen .....	26
2.4 Untersuchungsmethoden für Peptid/Lipidmembran-Wechselwirkungen .....	29
2.4.1 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie.....	29
2.4.2 Festkörper-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie).....	31
2.4.3 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	40
<b>3 Aufgabenstellung</b> .....	<b>42</b>
<b>4 Materialien und Methoden</b> .....	<b>44</b>
4.1 Materialien.....	44
4.1.1 Geräte.....	44
4.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	45
4.1.3 Chemikalien.....	46

4.1.4 Enzyme.....	48
4.1.5 Erythrozyten.....	48
4.1.6 Bakterienstämme .....	49
4.1.7 Peptide.....	49
4.2 Methoden.....	50
4.2.1 Bakterienanzucht .....	50
4.2.2 Präparation von Erythrozytenmembranen.....	51
4.2.3 Präparation von <i>Micrococcus luteus</i> Membranvesikeln.....	51
4.2.4 Präparation von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Membranvesikeln .....	52
4.2.5 Lipid-Extraktion.....	53
4.2.6 Phosphat-Bestimmung.....	53
4.2.7 Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	54
4.2.8 Herstellung von Modellmembranproben für die Festkörper-NMR.....	54
4.2.9 Herstellung unorientierter Biomembranen für die Festkörper-NMR.....	56
4.2.10 Herstellung orientierter Biomembranen für die Festkörper-NMR.....	56
4.2.11 Lipopolysaccharid-Extraktion .....	57
4.2.12 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (KDO)-Bestimmung.....	60
4.2.13 DSC-Spektroskopie .....	60
4.2.14 CD-Spektroskopie .....	61
4.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
4.2.16 Coomassie- und Silberfärbung.....	63
4.2.17 Agarosegel-Elektrophorese.....	64
4.2.18 DNA-Bestimmung mittels NanoDrop™.....	64
4.2.19 Massenspektrometrie.....	65
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
5.1 Membranvesikel-Aufreinigung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	66
5.2 Charakterisierung von Lipopolysaccharid (LPS)-haltigen Membranmodellen (kommerzielles LPS).....	70
5.3 Extraktion von LPS aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	75
5.3.1 Charakterisierung der extrahierten LPS-Moleküle .....	76
5.4 Peptid/Membran-Wechselwirkungen an LPS-haltigen Membranmodellen.....	79
5.4.1 Festkörper- <sup>31</sup> P-NMR-Spektroskopie.....	80

---

5.4.2 CD-Spektroskopie.....	83
5.4.3 DSC-Messungen.....	90
5.5 Festkörper- <sup>19</sup> F-NMR-Spektroskopie von <sup>19</sup> F-markiertem Gramicidin S in natürlichen Membranen.....	94
5.6 Festkörper- <sup>19</sup> F-NMR-Spektroskopie von <sup>19</sup> F-markiertem PGLa in natürlichen Membranen.....	102
5.7 Relaxationsmessungen von <sup>19</sup> F-markiertem PGLa in Membranmodellen.....	105
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>109</b>
6.1 Die Evaluierung der Membranvesikel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Membranmodelle.....	109
6.2 Die Evaluierung von Mischungen aus Lipiden und Lipopolysacchariden als Membranmodelle.....	110
6.3 Orientierung und Verhalten von PGLa und Gramicidin S in Membranmodellen und Biomembranen.....	117
6.4 Ausblick.....	124
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>126</b>
<b>8 Literatur.....</b>	<b>129</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>140</b>
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	140
9.2 Auswertungsprogramm für Relaxationszeiten.....	144
<b>Publikationen.....</b>	<b>146</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>147</b>

# 1 Motivation

---

1929 entdeckte Sir Alexander Fleming das Antibiotikum Penicillin. Weitere Antibiotika wie Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Erythromycin kamen hinzu, die alle ihren Weg in die klinische Anwendung als Arzneistoff fanden. Sehr zeitnah nach Einführung der Antibiotika als Medikamente traten die ersten resistenten Bakterienstämme auf, welche die Suche nach Alternativen nötig machten [1]. Antimikrobielle Peptide (AMPs), die Teil des innate Immunsystems aller Metazoa sind, aber auch in Protozoen und Prokaryoten vorkommen, erwiesen sich als potentielle Kandidaten zur Bekämpfung von Bakterien. Es handelt sich hierbei um kurze, kationische, amphipathische Peptide, die in der Lage sind, mit der negativ geladenen bakteriellen Membran zu interagieren, diese dadurch zu zerstören und Zellyse hervorzurufen. Aufgrund der nicht stereospezifischen Wirkungsweise von AMPs sind Bakterien nicht in der Lage, die gleichen Mechanismen zur Ausbildung der Resistenz wie gegen konventionelle Antibiotika zu nutzen [2].

Für die rationale Anwendung von AMPs als Alternative zu existierenden Antibiotika benötigt man Kenntnis über den zugrunde liegenden Wirkmechanismus der Zellyse, sowie deren molekulares Aussehen zur spezifischen Unterscheidung zwischen Pathogenen und Wirtszellen [3].

Bisherige Untersuchungen mit AMPs wurden weitestgehendst in Membranmodellen durchgeführt, die aus synthetischen Phospholipiden bestehen. Durch verschiedene Methoden wie die Festkörper-NMR-Spektroskopie konnten deren Wechselwirkungen mit verschiedenen AMPs gezeigt werden [3]. Als Beispiele seien hier zum einen das  $\alpha$ -helikale Peptid PGLa genannt, was in den Membranmodellen abhängig von seiner Konzentration, der Phase der Lipiddoppelschicht und der Anwesenheit weiterer AMPs unterschiedliche Orientierungen annimmt [4-7]. Zum anderen konnte für Gramacidin S, ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, ebenfalls eine konzentrations- und temperaturabhängige Orientierung nachgewiesen werden [8, 9].

Im Gegensatz zu Membranmodellen sind natürliche Membranen hochkomplexe Gebilde. Sie enthalten Proteine und Kohlenhydrate und zeigen eine viel höhere Heterogenität in Bezug auf die Phospholipidzusammensetzung. Wenn man in der Lage ist, diese Biomembranen anstatt der

einfachen Membranmodellen für Untersuchungen einzusetzen, ist es möglich, verschiedene wichtige Fragen zu beantworten.

Sind die in Membranmodellen beobachteten Orientierungszustände der oben erwähnten AMPs PGLa und Gramicidin S ebenfalls in Membranen bakterieller und eukaryotischer Herkunft zu identifizieren? Welchen Einfluss hat die Komplexität der Membranen, welche dadurch ein anderes Phasenverhalten als Membranmodellen zeigen, auf die Orientierung der Peptide? Welchen Einfluß übt das Molekül Lipopolysaccharid, eines der Hauptbestandteile der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, auf den Bindungs- und Wirkmechanismus von AMPs aus? Die Beantwortung dieser und weiterer Fragen liegt der vorliegenden Arbeit zugrunde.

## 2 Hintergrund

---

### 2.1 Lipidmembranen

Zellen, gleich ob prokaryotischer, tierischer oder pflanzlicher Herkunft, sind gegen ihre Umwelt durch eine Membran abgegrenzt. Bei diesen Membranen handelt es sich um einen hochorganisierten Aufbau aus Lipiden und Proteinen mit geringen Kohlenhydrat-Anteilen. Die Aufgabe der Membran ist es, Zellinneres von Zelläußerem zu trennen, Homöostase aufrecht zu erhalten oder bei Eukaryoten das Zellinnere in verschiedene Kompartimente zu unterteilen. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften bildet die Membran eine widerstandsfähige, aber flexible und hochselektive Barriere. An ihr laufen viele biochemische Prozesse wie z.B. Elektronentransfer und oxidative Phosphorylierung ab. Die Membran sorgt für die Kommunikation von Zellen untereinander, kontrolliert den Transport von Nährstoffen, sowie die Erkennung von Hormonen und weiterer Stoffe. Durch Membranrezeptoren besitzt sie außerdem eine regulatorische Funktion und schützt das Zellinnere gegenüber der äußeren Umgebung.

Obwohl ihre Zusammensetzung zwischen verschiedenen Spezies und Zell- bzw. Membrantypen variiert, liegt doch ein einheitlicher, universeller Bauplan zu Grunde: die Lipiddoppelschicht. Die „Bausteine“ dieser Schicht sind die Lipide (griech.: *lipos* = *Fett*). Hierbei handelt es sich um amphiphile Moleküle, die jeweils eine hydrophile (polare) Kopfgruppe und einen hydrophoben (unpolaren) Schwanz besitzen. Aufgrund dieses amphipathischen Aufbaus ordnen sich Lipide in Wasser dergestalt an, dass sie mit ihrem hydrophoben Teil in das Innere der Doppelschicht weisen und ihre hydrophilen Köpfe dem Äußeren, z.B. Cytoplasma, extrazellulärer Raum oder dem Inneren eines Zellkompartiments, zugewandt sind [10-12]. Abbildung 2.1 zeigt einige Lipide sowie das Sterin Cholesterin, welche typischerweise in Biomembranen vorkommen.

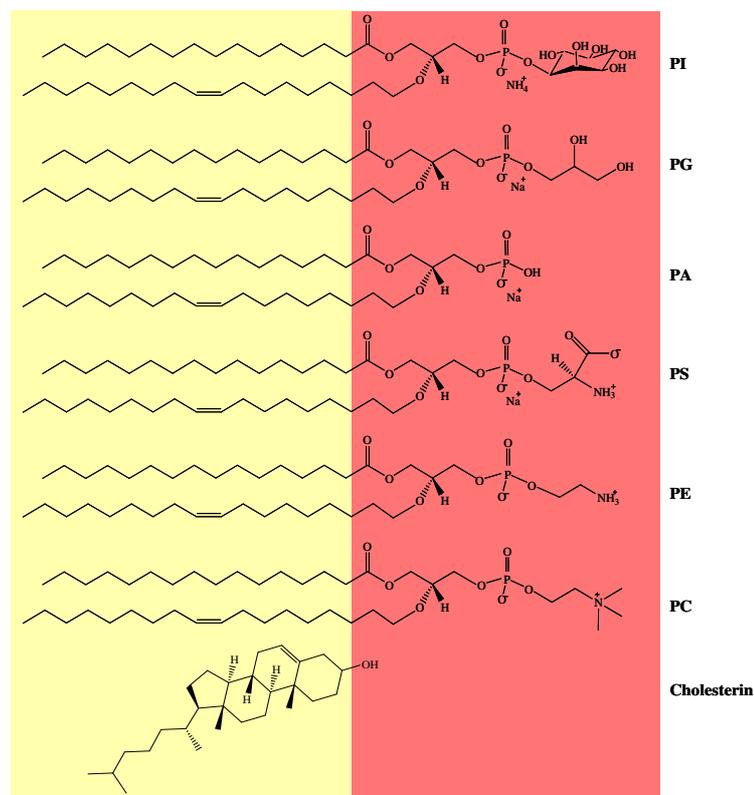


Abb. 2.1: Beispiele von typischen Lipiden, welche in Biomembranen vorkommen. Dargestellt sind sie hier jeweils mit einer Palmitoyl- (gesättigte) und einer Oleoyl- (einfach ungesättigte) Fettsäurekette. Die hydrophilen Kopfgruppen sind mit einem roten Balken unterlegt, die hydrophoben Schwänze mit einem gelben Balken. PE = Phosphatidylethanolamin. PS = Phosphatidylserin. PC = Phosphatidylcholin. PG = Phosphatidylglycerin. PA = Phosphatidylsäure. PI = Phosphatidylinositol.

Das von S. J. Singer und G. L. Nicholson im Jahr 1972 aufgestellte „Fluid mosaic“ Modell stellt eine bis heute gültige Grundidee des Membranaufbaus dar. Es beschreibt die Membran als durchgehende fluide Lipiddoppelschicht mit einer Stärke von 5-8 nm, worin sowohl integrale als auch periphere Proteine bzw. Glykoproteine mosaikartig eingebettet sind. Dieses komplexe Gebilde ist keineswegs starr, vielmehr handelt es sich um eine lateral bewegliche, flüssig-kristalline Matrix (Abb. 2.2) [11, 13]. In den letzten Jahren hat sich der Blickwinkel auf das Bild der Membran allerdings gewandelt. Sie wird heutzutage mehr und mehr als „Mosaik“ denn als „Flüssig“ bezeichnet, da verschiedene laterale Membrandomänen, z.B. Lipid rafts oder annulare Lipide (Schicht der Lipide, welche ein integrales Membranprotein umgeben) in der Membran zu finden sind [14-16].

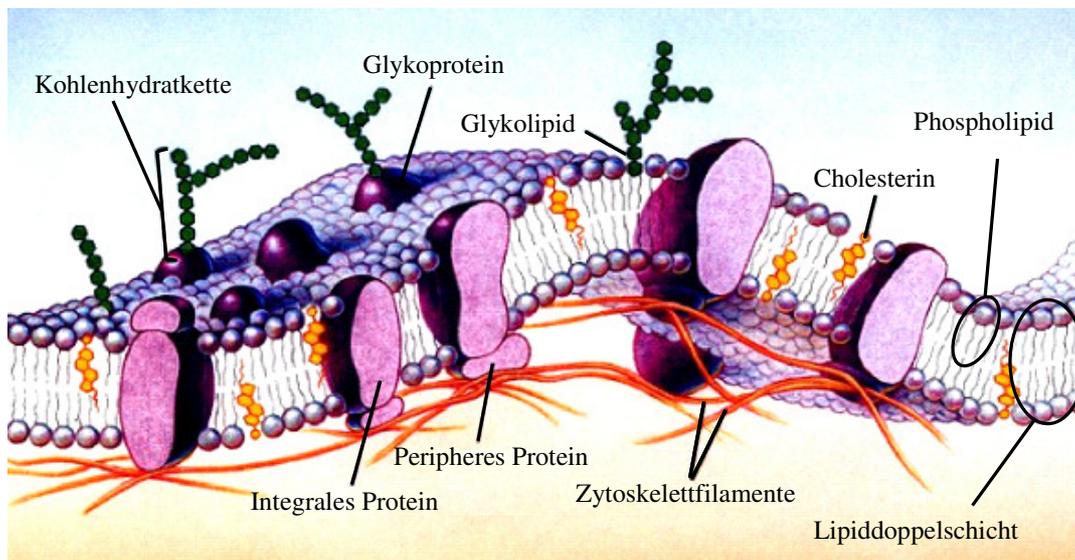


Abb. 2.2: „Fluid mosaic“ Modell einer eukaryotischen Zelle nach Singer und Nicholson. Modifiziert übernommen von <http://www.cbu.edu/~seisen/Membranes.htm>.

### 2.1.1 Membranmodelle

Für die strukturelle Aufklärung von Proteinen stehen viele Methoden zur Verfügung, wie z.B. die Röntgenkristallographie, Neutronenstreuung oder Elektronenmikroskopie [17, 18]. Hierfür müssen die Proteine meist kristallisiert vorliegen. Durch ihre hydrophoben Eigenschaften ist es aber schwierig, Membranproteine zu kristallisieren. Sie bilden ihre korrekte Struktur nur in komplexen, amphiphatischen Umgebungen aus, was bei den genannten Methoden zu Störungen führen würde. Aber auch kleine und schnell bewegliche Peptide lassen sich schwer in ihrer relevanten Konformation kristallisieren. Für die Untersuchung solcher Proteine eignet sich die Methode der Flüssig-NMR-Spektroskopie, welche auch die Untersuchung von Membranproteinen möglich macht. Hierfür muss eine membranähnliche Umgebung gegeben sein, welche synthetisch hergestellt werden kann.

Als erstes sollen Lösungsmittel wie z.B. 2,2,2-Trifluorethanol (TFE), Dimethylsulfoxid (DMSO), Methanol (MeOH), Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) oder Hexan genannt werden. Durch ihre niedrigen Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$  im Vergleich zu Wasser sind sie in der Lage, eine Umgebung zu imitieren, die dem hydrophoben Inneren der Lipiddoppelschicht entspricht.

Allerdings können mit verschiedenen Detergens-Mizellen bessere Bedingungen für Polypeptide geschaffen werden, da durch den amphipatischen Charakter der Moleküle eine heterogene Umgebung bereitgestellt werden kann. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird verwendet, um eine oberflächlich negativ geladene Membranumgebung zu erzeugen. Hingegen wird Dodecylphosphocholin (DPC), ebenfalls ein Detergens, als Surrogat für die Herstellung einer oberflächlich zwitterionisch geladenen Membranumgebung genutzt. Bei dem Letzteren handelt es sich außerdem um ein gut charakterisiertes Modellsystem für die Untersuchung von Peptiden, welche an Lipide binden [19-22]. Solche Detergens-Mizellen zeigen allerdings eine stark gekrümmte Oberfläche, weshalb sich Bizellen besser eignen. Hierbei handelt es sich um eine Mizellenart, welche mehr als eine Komponente enthält. Bizellen können z.B. aus einer Mischung von langkettigen Dimyristoylphosphocholin-Molekülen (DMPC) und kurzkettigen Diheptanoylphosphocholin-Molekülen (DHPC) bestehen, welche sich erst bei einer bestimmten Temperatur und im Magnetfeld orientieren. Sie eignen sich daher noch besser als membranähnliche Umgebungen für die Untersuchung von Polypeptid/Lipid-Interaktionen mittels spektroskopischen Methoden (Abb. 2.3) [3, 23].

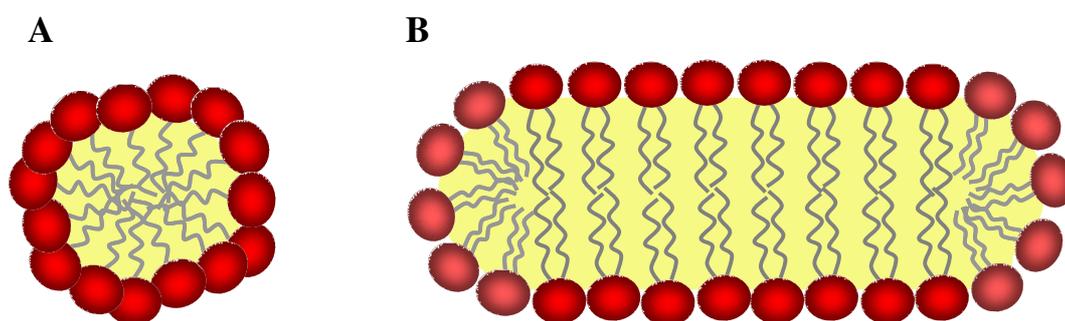


Abb. 2.3: Häufig verwendete, membranähnliche Systeme für die Untersuchung von Membranproteinen. Mit Gelb dargestellt das hydrophobe Innere der Strukturen. A) Detergens-Mizelle. Verwendet für die Flüssig-NMR-Spektroskopie und die CD-Spektroskopie. B) Bizelle. Scheibenförmige Struktur, die sich unter bestimmten Bedingungen mit ihrer Normalen orthogonal zum Magnetfeld ausrichtet. In der Mitte sind langkettige Moleküle, z.B. Dimyristoylphosphocholin (DMPC) (dunkles Rot), an den Enden jeweils kurzkettige Moleküle, z.B. Diheptanoylphosphocholin (DHPC) (helles Rot). Bizellen werden für die Orientierung von löslichen Proteinen in der Flüssig-NMR-Spektroskopie und von Membranproteinen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie angewandt (modifiziert nach [24]).

Allerdings weisen Bizellen an ihren Enden ebenfalls eine starke Krümmung auf. Daher sind Membranvesikel wie kleine, große und sehr große unilamellare oder multilamellare Vesikel (SUV, LUV, GU und MLV) noch besser geeignet, da sie „echte“ Doppelschichten ausbilden

und eine noch geringere Oberflächenkrümmung aufweisen [25, 26]. Monoschichten an Grenzflächen, „black lipid membranes“ oder Doppelschichten auf festem Untergrund, jeweils bestehend aus Lipiden, besitzen keine gekrümmten Oberflächen mehr und sind daher am besten für die Untersuchung von Membranproteinen geeignet [27, 28].

Die Ausbildung amphipathischer, membranähnlicher, selbst-assemblierender Strukturen hängt darüber hinaus auch mit der Geometrie der verwendeten Lipidmoleküle ab. Konusförmige Moleküle mit einer hydrophoben Kette, z.B. lyso-Phospholipide, neigen zu Mizellenbildung, wohingegen zylinderförmige Moleküle mit zwei hydrophoben Ketten, z.B. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerin (PG), die Ausbildung von Lipiddoppelschichten bevorzugen. Invertierte Mizellen entstehen bei invertiert konusförmigen Molekülen, welche ebenfalls zwei hydrophobe Ketten besitzen, z.B. Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylsäure (PA) (Abb. 2.4) [11].

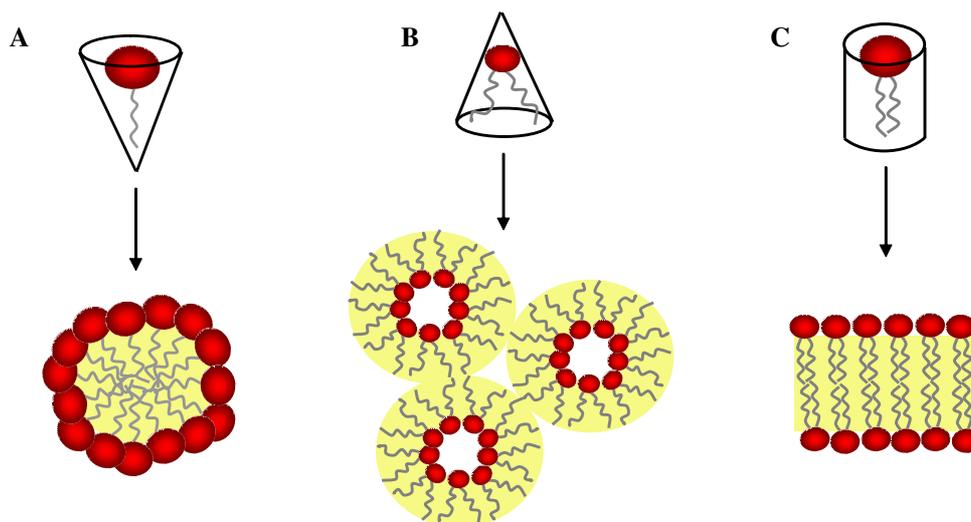


Abb. 2.4: Membranpolymorphismus, abhängig von dem Querprofil der Lipide. Mit Gelb dargestellt der jeweils hydrophobe Teil der Strukturen. A) Eine konusförmige Molekülgeometrie führt zur Mizellenausbildung, z.B. bei Lysolipiden oder SDS. B) Invertierte Mizellen entstehen bei invertiert konusförmigen Molekülen, z.B. bei Phosphatidylethanolaminen (PE). C) Die Lipiddoppelschicht bildet sich bei einer zylinderförmigen Molekülgeometrie, z.B. bei Phosphatidylcholinen (PC). Modifiziert nach [11].

Die Grenzen der Flüssig-NMR-Spektroskopie werden erreicht, wenn die zu untersuchenden Polypeptide zusammen mit der membranimitierenden Umgebung eine ungefähre Größe von 30.000 Da überschreiten. Die aufgenommenen Spektren zeigen eine Linienverbreiterung, da es aufgrund der Größe der Moleküle bzw. der Komplexe zu einer reduzierten Beweglichkeit

kommt. Als Alternative bietet sich hier die Festkörper-NMR-Spektroskopie an [19]. Für die Untersuchung von Polypeptid/Lipid-Interaktionen eignen sich Phospholipiddoppelschichten auf Festkörperoberflächen, welche sich idealerweise makroskopisch orientieren. Sie können aus verschiedenen Lipidmolekülen mit unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt werden (z.B. PC, PG, PE etc.) und so entweder prokaryotische oder eukaryotische Membranen, letztere kann auch Cholesterin enthalten, imitieren (Abb. 2.5). [3, 9, 19, 24].

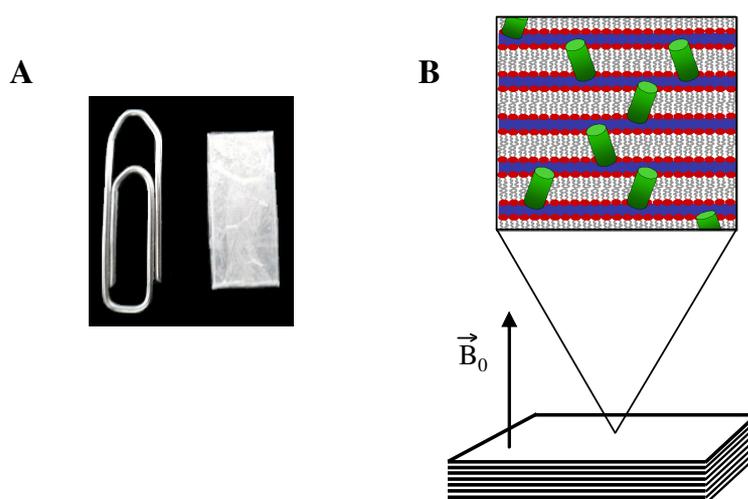


Abb. 2.5: A) Phospholipiddoppelschichten auf festem Untergrund (Glasplättchen) orientiert (typischerweise 15 Stück), im Größenvergleich zu einer handelsüblichen Büroklammer. Es wird 1 mg Material pro Plättchen verwendet, was zur Ausbildung von etwa  $10^3$  Multischichten führt. B) Proteinhaltige Phospholipiddoppelschichten, welche auf Glasplättchen orientiert sind und so für die Festkörper-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden können. Die Lipiddoppelschichten befinden sich in einem hydratisierten Zustand (Wasser blau dargestellt). Modifiziert nach [29, 30]

## 2.1.2 Prokaryotische Membranen

Prokaryoten (griech.: *pro* = *bevor* und *karyon* = *Kern*) sind Zellen, die keinen Zellkern besitzen. Hierzu gehört, neben der Domäne der Archaeen, die Domäne der Bakterien, welche einen einfachen Aufbau besitzen und einzellig vorkommen. Sie sind im Schnitt 1-10  $\mu\text{m}$  groß und wurden 1683 von Antoni van Leeuwenhook in drei Grundformen unterteilt: Kokken, Stäbchen und Spiralen [10].

Die bakterielle Plasmamembran besteht im Wesentlichen aus den negativ geladenen Lipiden PG, Cardiolipin (CL) und dem zwitterionischen Lipid PE, wobei deren Verteilung asymmetrisch

zwischen der äußeren und der inneren Schicht der Membran erfolgt. Sterole wie Cholesterin und Ergosterin sind selten bis gar nicht in prokaryotischen Membranen enthalten. Durch den hohen Anteil an PG und CL besitzt die bakterielle Membran einen eher negativen Charakter. Neben den Lipiden finden sich in der Membran aber auch Proteine. In den Tabellen 2.1 und 2.2 ist die charakteristische Verteilung von Phospholipiden in bakteriellen Membranen sowie deren Verhältnis zu den enthaltenen Proteinen dargestellt [31-33].

Tab. 2.1: Tabellarisch dargestellt sind die in bakteriellen Membranen vorkommenden Phospholipidklassen [31-34].

Gattung	Phospholipide [% Gesamt- Phospholipidanteil]		
	PE	PG	CL
<i>Micrococcus</i> (Gram-positiv)	40-50	30-50	4-20
<i>Bacillus</i> (Gram-positiv)	20-45	25-45	10-50
<i>Escherichia</i> (Gram-negativ)	80	15	5

Tab. 2.2: Tabellarisch dargestellt ist das Verhältnis von Lipid zu Protein in der Membran [31-33].

Gattung	Lipid- und Proteingehalt [% M <sub>T</sub> *]	
	Lipid	Protein
<i>Micrococcus</i> (Gram-positiv)	29,4	70,6
<i>Bacillus</i> (Gram-positiv)	26,3	73,7
<i>Escherichia</i> (Gram-negativ)	29,4	70,6
Äußere Membran Gram-negativer Bakterien	31,3	68,7

\* M<sub>T</sub> = Trockengewicht

Die weitere Unterteilung der Bakterien erfolgt in zwei Gruppen: Gram-positiv (z.B. *Micrococcus luteus*, *Aneurinibacillus migulanus* und *Staphylococcus aureus*) und Gram-negativ (z.B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium*). Diese Einteilung geschieht aufgrund der Gram-Färbung, welche auf den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Zellwand beruht [35]. Die Zellwand ist eine aus komplexen Proteoglykanen aufgebaute Struktur, die sowohl der Stabilität dient, als auch eine Schutzfunktion besitzt. Sie

kann bei Gram-positiven Zellen viele Schichten dick sein (ca. 25 nm), bei Gram-negativen Zellen hingegen besteht sie nur aus wenigen (ca. 3 nm). Dafür sind Gram-negative Zellen zusätzlich von einer äußeren Lipiddoppelschicht umgeben, wobei deren äußere Lage überwiegend Lipopolysaccharide anstatt Phospholipide enthält. Die innere bzw. cytoplasmatische Membran kontrolliert das Ein- und Ausströmen von gelösten Stoffen und enthält Enzyme für den Elektronentransport (Abb. 2.6) [31, 36].

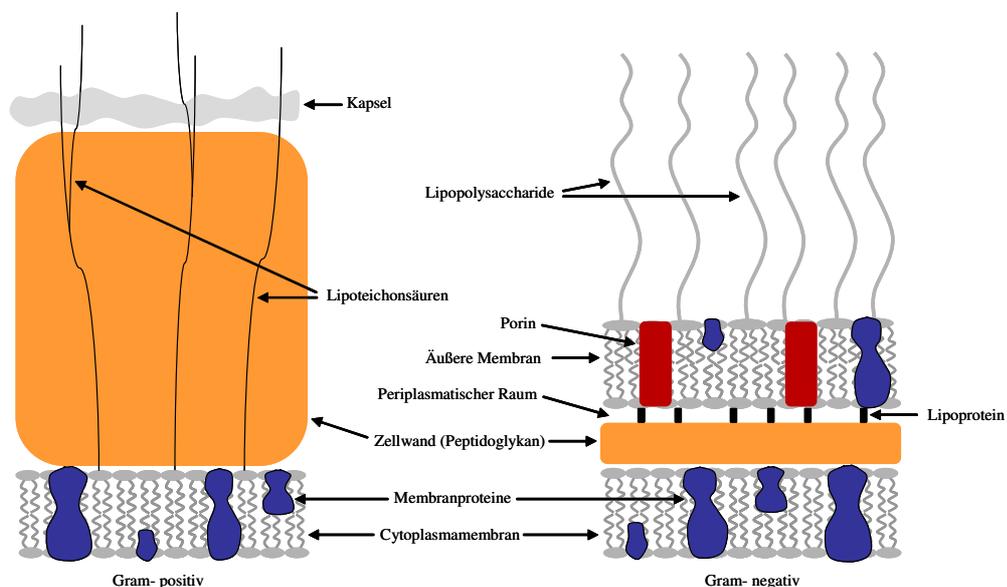


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau der Zellhüllen von Gram-positiven (links) und Gram-negativen (rechts) Bakterien.

Lipopolysaccharide (LPS) sind die Hauptkomponenten der äußeren Schicht der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Es handelt sich hierbei um Glykolipide. Sie bestehen aus einer membranständigen, hydrophoben Lipid A Region mit verknüpften Fettsäureketten, welche das Molekül in der Membran verankern, und einer kovalent daran gebundenen hydrophilen Polysaccharid-Region. Diese lässt sich unterteilen in das Kern-Oligosaccharid, das weiter in einen inneren und äußeren Kern unterteilt werden kann, und einem O-Antigen bzw. O-Polysaccharid, das aus sich wiederholenden Untereinheiten besteht. Aufbau und Anzahl dieser Untereinheiten und somit die Gesamtlänge des Moleküls variiert je nach Bakterienstamm, was die Möglichkeit bietet, unterschiedliche Typen anhand ihrer O-Antigene serologisch zu

unterscheiden. Durch die enthaltenen Phosphatgruppen und Zucker wie 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (KDO) besitzen LPS-Moleküle eine negative Ladung (Abb. 2.7) [37].

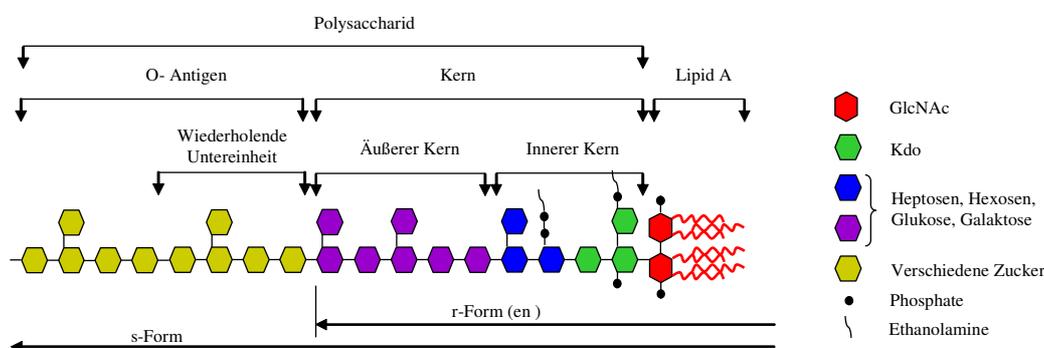


Abb. 2.7: Die allgemeine Struktur eines LPS-Moleküls mit seinen einzelnen Abschnitten. GlcNAc: *N*-Acetyl-D-Glucosamin; Kdo: 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (modifiziert nach [38]).

Bakterienstämme mit vollständigen LPS-Molekülen bilden auf Agarplatten Kolonien, welche ein rundes, glattes und glänzendes Erscheinungsbild besitzen (*s* = engl.: *smooth*). Sie werden auch als Wildtyp bezeichnet. Das glatte Aussehen wird durch die sich ausbildende Wasserhülle aufgrund der stark hydratisierten LPS-Moleküle verursacht. Hingegen führen Mutationen in den beteiligten Genen zu veränderten oder verkürzten LPS-Molekülen. Der Verlust des O-Antigens hat keinen Einfluss auf das Wachstum unter Laborbedingungen, allerdings sind diese Bakterien in ihrem natürlichen Lebensraum außerhalb des Labors nicht mehr überlebensfähig. Liegt das Kern-Oligosaccharid ebenfalls stark verkürzt vor, ist auch das Wachstum im Labor nur noch eingeschränkt möglich. Diese mutierten Bakterien bilden Kolonien mit einer rau aussehenden Oberfläche und gezackten Rändern (*r* = engl.: *rough*) (Abb. 2.8). Da die Verkürzung des Kern-Oligosaccharids in Abstufungen stattfindet, je nachdem, wie viele Enzym kodierende Gene parallel mutiert oder ausgeschaltet sind, treten unterschiedliche r-Formen auf (Ra, Rb, Re,...bis zur so genannten *deep rough* Mutante Rd) [39, 40].

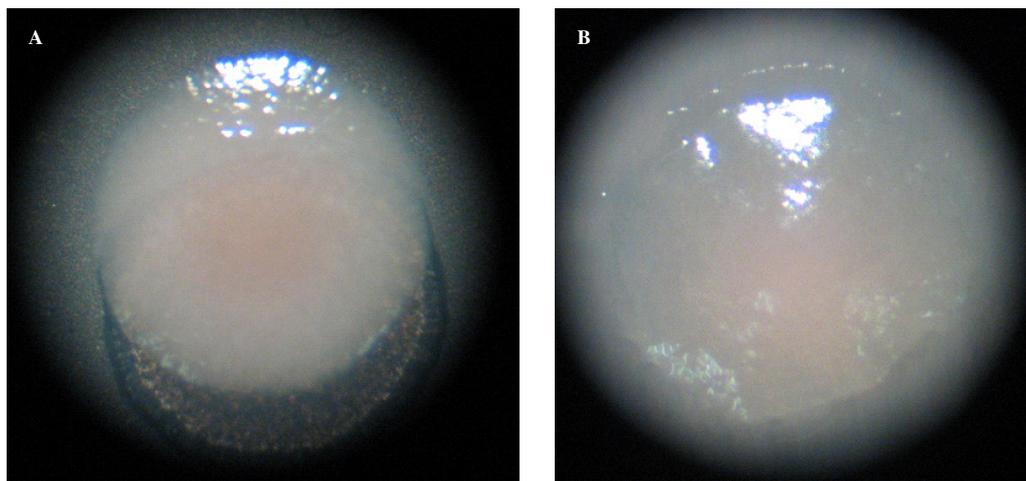


Abb. 2.8: Kolonien von A) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (s-Form) und B) *Pseudomonas aeruginosa* rmlC (r-Form). Zu erkennen sind die unterschiedlichen Oberflächen und die gezackten Ränder der Mutante (B) im Gegensatz zum Wildtyp (A).

Die bei der Autolyse von Bakterien freigesetzten LPS-Moleküle, sowohl s-LPS als auch r-LPS, wirken als Pathogenitätsfaktor. Sie werden als Endotoxin bezeichnet und können unter anderem zu Fieber und zum septischen Schock beim Menschen führen [41]. Dabei ist das Lipid A der toxische Bestandteil des Moleküls. Dessen zytolytischer Effekt ist abhängig von der Anzahl der verknüpften Fettsäureketten (variiert zwischen vier und sieben), da hierdurch die molekulare Form bestimmt wird [42]. Die O-Antigen Region hingegen ist mit Immunogenität assoziiert. Allerdings sind Rauformen der LPS-Moleküle weniger bis nicht pathogen, im Gegensatz zu den s-Formen [43].

Die innere Schicht der äußeren Membran besteht aus Phospholipiden, die äußere Schicht vornehmlich aus LPS-Molekülen. Daher können sie eine dichte Matrix auf der Zelloberfläche ausbilden, welche durch Phosphat- und Aminogruppen am Ende des Lipid A Disaccharids und im Kern-Oligosaccharid sowie assoziierten  $Mg^{2+}$ -Ionen stabilisiert ist [40]. Hierdurch werden die Bakterien gegen eine Vielzahl von hydrophilen und hydrophoben Stoffen geschützt [44].

Die Pathogenität von LPS erweckt großes Interesse an der Erforschung von wirksamen Stoffen, die entweder die Bakterien direkt bekämpfen und somit die Freisetzung von LPS verhindern oder bereits im Körper freigesetztes Endotoxin neutralisieren können. Zum Beispiel konnte beobachtet werden, dass antimikrobielle Peptide (AMPs) wie Polymyxin B, Gramicidin S, Magainin 2 und Temporin A, B und L Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien zeigen sowie mit LPS-haltigen Membranmodellen direkt interagieren können [44-48]. Hierbei spielt die Länge und

Ladung der LPS-Moleküle eine wichtige Rolle, ob und wie gut die AMPs ihre Wirkung entfalten können. Wird die negative Ladung durch die Anwesenheit vom  $Mg^{2+}$  reduziert, führt dies zu einer verminderten Interaktion mit den kationisch geladenen AMPs [45]. Deren antimikrobielle Wirkung gegen beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* konnte durch MIC-Bestimmungen gezeigt werden [46].

### 2.1.2.1 *Micrococcus luteus*

Bei dem aeroben Bakterium *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) handelt es sich um einen Vertreter der Gram-positiven Bakterien. Es wächst unter Laborbedingungen sowohl auf Agarplatten als auch im Flüssigmedium und besitzt eine gelbliche Farbe (lat.: *lutea* = *gelb*). Die einzelne Zelle ist kugelförmig und es kommt während des Wachstums zur Ausbildung von zusammenhängenden Zellen, so genannten Tetraden (Abb. 2.9) [49].



Abb. 2.9: *Micrococcus luteus*, ein Gram-positives Bakterium. Mikroskopische Aufnahme der Tetrade, einer Erscheinungsform während des planktonischen Wachstums. Die Bakterien wurden in Basalmedium kultiviert und in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

Zu finden ist *M. luteus* hauptsächlich als natürlicher Bestandteil der menschlichen Hautflora und auf Schleimhäuten, aber auch auf verdorbenem Fleisch und in der Umwelt. Es gilt als opportunistischer Krankheitserreger, da es bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem Infektionen hervorrufen kann. *M. luteus* ist aber auch an den Krankheitsbildern wie z.B. Endokarditis, septischem Schock und Meningitis beteiligt [50].

Die Zellwand Gram-positiver Bakterien besteht aus Makromolekülen wie Peptidoglykan und phosphathaltigen, polyanionischen Teichonsäuren. Letztere können weiter unterteilt werden: Wand-Teichonsäuren (WTA, sie sind im Peptidoglykan verankert) und Lipo-Teichonsäuren (LTA, sie sind über ihr Glykolipid in der Membran verankert) [51]. In *M. luteus* konnte

allerdings als erstes gezeigt werden, dass nicht alle Gram-positiven Bakterien zwingend Teichonsäuren besitzen. Hier finden sich anderem polyanionische Makromoleküle, die ähnliche Eigenschaften aufweisen. In der Zellwand von *M. luteus* ist Lipomannan vorhanden (Abb. 2.10), ein Polymer aus Mannosylresten, welches mit  $Mg^{2+}$ -bindenden Succinylgruppen verestert ist. Durch seinen Fettsäureanteil ist das Polymer in der cytoplasmatischen Membran verankert [52-55].

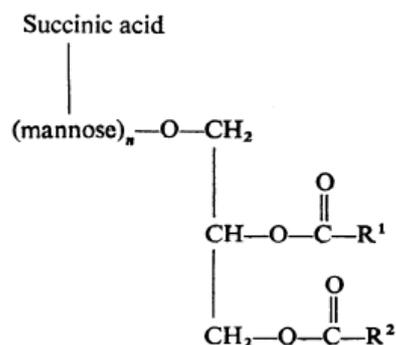


Abb. 2.10: Die Struktur von Lipomannan aus *M. luteus*. Die Mannosylreste sind zu etwa 25% mit Succinylgruppen verestert [53].

Die zwei häufigsten Lipide in der Zellmembran von *M. luteus*, welche 70% des Trockengewichtes ausmachen (Tab. 2.1), sind PG und Dimannosyldiacylglycerol (DMDG). Sie befinden sich sowohl in der äußeren als auch in der inneren Schicht, wobei DMDG auf beiden Seiten gleich verteilt ist, PG aber in der äußeren Monoschicht mit einem erhöhten Anteil vorliegt. Die heterogene Verteilung wird durch die Wachstumsphase, in der sich *M. luteus* befindet, beeinflusst. Während des Zellwachstums ist sie am geringsten, ihr Maximum erreicht sie während der Teilungsphase [56, 57].

### 2.1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ist ein Vertreter der Gram-negativen Bakterien. Es wächst unter aeroben Bedingungen und hat die Form von geraden oder gekrümmten Stäbchen. Neben einem wasserlöslichen, gelbgrün fluoreszierenden Pigment, dem Pyocyanin (lat.: *aerugo* = *Grünspan*), produziert es darüber hinaus die Pigmente Chloraphin, Pyomelanin und Pyorubin.

*P. aeruginosa* kommt in feuchten Milieus wie Erdboden, Duschen und Toiletten vor, ist ein weit verbreiteter Boden- und Wasserkeim und zur Ausbildung von Biofilmen fähig. Es ist opportunistisch pathogen und oft mit Infektionen der Harn- und Atemwege beim Menschen assoziiert. Auch bei schweren Verbrennungen, anderen traumatischen Hautschäden und Patienten mit zystischer Fibrose treten Infektionen mit *P. aeruginosa* sehr häufig auf. Eine wichtige Rolle spielt es auch als nosokomialer Keim („Krankenhauskeim“), da es Resistenz gegen eine Vielzahl der heute gängigen Antibiotika aufweist [43, 49, 58-60].

LPS ist einer der Faktoren, welcher für die Pathogenität von *P. aeruginosa* verantwortlich ist. Aufgrund dessen handelt es sich dabei um ein gut charakterisiertes Molekül. Die Mehrzahl der *P. aeruginosa* Stämme synthetisieren zwei verschiedene Typen, welche sich durch das O-Antigen unterscheiden. Einmal das Serotyp-spezifische B-Band LPS und zum anderen das als klassisches Antigen wirkende A-Band LPS. Das A-Band LPS enthält ungeladene Zucker, hingegen liegt das B-Band LPS negativ geladen vor [43, 61]. Beide LPS-Molekültypen finden sich auf dem Wildtyp-Stamm PAO1 wieder, der dadurch s-LPS enthält. Der aus dem Wildtyp abgeleitete Mutantenstamm rmlC dagegen produziert ein verkürztes Kern-Oligosaccharid, wodurch die Verknüpfung weder mit dem A-Band noch mit dem B-Band O-Antigen möglich ist. Hier ist deshalb das r-LPS zu finden [62]. Durch die unterschiedlichen LPS-Moleküle zeigen beide Stämme ein unterschiedliches Aussehen (Abb. 2.11) [61, 63].

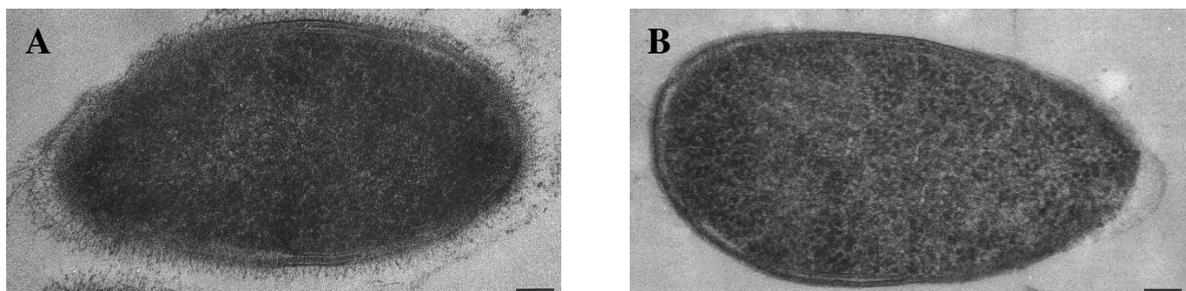


Abb. 2.11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten. A) *P. aeruginosa* PAO1. Gut zu erkennen ist das die Zelle umgebende fadenförmige Gebilde, welches die LPS-Schicht darstellt. B) Im Gegensatz dazu fehlt diese Schicht bei der rauen Mutante, welche nur das Kern-Oligosaccharid trägt [61]. Balken 100 nm.

*P. aeruginosa* ist, wie viele andere Biofilm produzierende Gram-negative Bakterien, in der Lage, alleinständige Membranvesikel (MVs) in die umgebende Matrix abzugeben. Diese MVs bilden sich durch Abschnürung der äußeren Membran, haben einen Durchmesser von etwa 50 bis 150 nm und enthalten unter anderem Membranproteine, periplasmatisches Material, DNA,

Phospholipase C und LPS-Moleküle (Abb. 2.12). Zusammen mit der Matrix des Biofilms dienen sie der Kommunikation zwischen Zellen, Vermittlung von Toxizität zum Wirt und zur Abwehr schädlicher Stoffe. Auf natürlich entstandenen MVs finden sich nicht beide LPS-Typen wieder, sondern nur das negativ geladene B-Band LPS [64-66].

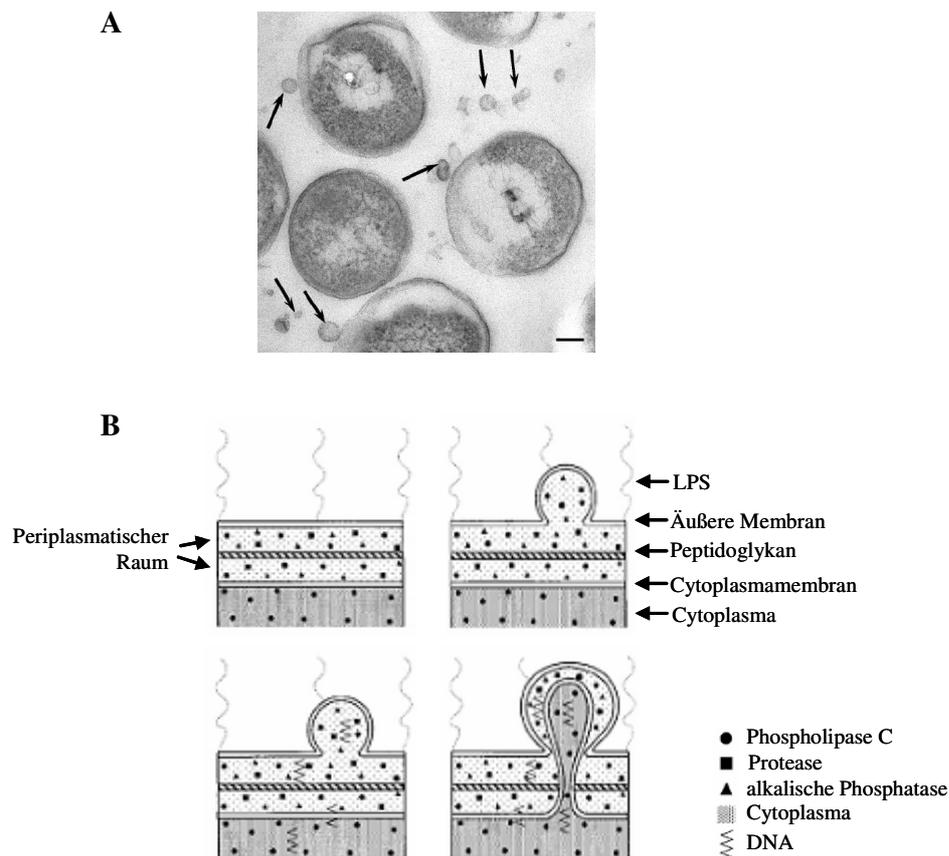


Abb. 2.12: A) Abgeschnürte Membranvesikel (MVs) (Pfeil) im Biofilm von *P. aeruginosa*. Der Biofilm wurde auf Agarplatten kultiviert und elektronenmikroskopisch aufgenommen. Balken 100 nm. B) Schematisches Modell zur Sekretion von Enzymen und DNA während der Bildung von MVs [64, 65].

### 2.1.3 Eukaryotische Membranen

Eukaryotische Zellen (griech.: *eu* = gut, wahr und *karyon* = Kern) sind, im Gegensatz zu Prokaryoten, komplexer aufgebaut. Sie besitzen einen Zellkern, in dem die chromosomale DNA lokalisiert ist und verschiedene membranumschlossene Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Peroxisomen, endoplasmatisches Reticulum, Chloroplasten uvm. Ihr Durchmesser liegt

üblicherweise bei 10-100  $\mu\text{m}$  und sie weisen somit ein tausend- bis millionenfach größeres Volumen als Prokaryoten auf.

Pflanzen, Pilze und Algen besitzen komplexe Zellwände, deren Hauptbestandteil das faserige Polysaccharid Cellulose darstellt. Tierische Zellen dagegen besitzen zwar ein unterstützendes Netzwerk aus Bindegewebe, speziell ausgebildete Wandstrukturen sind aber nicht vorhanden.

Wie Prokaryoten auch, sind alle eukaryotischen Zellen von einer Plasmamembran umgeben. Diese ist ebenfalls im Inneren von Zellen zu finden, hier umschließt sie die einzelnen Organellen [10, 31, 67].

Die wichtigsten Lipide der tierischen Zelle sind PC, Sphingomyelin (SM) und PE. Daneben kommen kleinere Mengen an Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und PG vor. Der wohl bedeutendste Unterschied in der Membranzusammensetzung zu Prokaryoten ist das Vorkommen von Sterinen, z.B. Cholesterin (Chol.), in der Eukaryotenmembran. Seine Funktion besteht in der Membranstabilisierung.

Von Zelltyp zu Zelltyp kann die prozentuale Zusammensetzung der Lipide variieren. Betrachtet man die Organellen innerhalb einer Zelle, sind ebenfalls Unterschiede in der prozentualen Zusammensetzung zu finden. Ebenso wie in der prokaryotischen Membran sind auch in der eukaryotischen Membran Proteine vorhanden. Alle diese plasmamembranständigen Proteine sind stark glykosyliert. Dadurch bildet sich auf der Zelloberfläche eine bis zu 140 nm dicke Kohlenhydrathülle aus, die so genannte Glykokalyx. Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der interzellulären Kommunikation, aber auch Blutgruppenantigene bestehen aus Glykoproteinen.

Tabelle 2.3 und 2.4 stellen die charakteristische Verteilung der Lipide sowie deren Verhältnis zu den enthaltenen Proteinen in verschiedenen tierischen Membranen dar [11, 12, 31, 67].

Tab. 2.3: Tabellarisch dargestellt sind die in verschiedenen tierischen eukaryotischen Membranen vorkommenden Lipide [11, 12, 31, 32].

Zytoplasmamembranen	Lipidzusammensetzung von Membranen [% Lipidmasse]							
	Chol.	PC	SM	PE	PI	PS	PG	Glykolipid
- Erythrozyten	24	31	9	15	2	7		5-10
- Nervenzellen	22	11	6	14		7		15-25
- Endoplasmatisches Reticulum (Leber)	5-10	55	3-12	16-21	8		2	<5
- Hepatozyten	30	18	14	11	4	9		2-4

Tab. 2.4: Tabellarisch dargestellt ist das Verhältnis von Lipid zu Protein in der Membran von Säugern [11, 12, 31, 32].

<b>Zytoplasmamembranen</b>	<b>Verhältnis von Lipid zu Protein in der Membran [%]</b>	
	<b>Lipid</b>	<b>Protein</b>
- Erythrozyten	43	57
- Nervenzellen	79	21
- Endoplasmatisches Reticulum (Leber)	41	59
Mitochondrien (Leber)		
-innere Membran	26	74
-äußere Membran	47	53
- Hepatozyten	55	45

### 2.1.3.1 Erythrozyten

Erythrozyten, bei Säugetieren hoch differenzierte, kern- und organellenlose Zellen, stellen mit 4-6 Millionen pro Mikroliter Blut den mengenmäßig bedeutendsten Anteil der corpusculären Bestandteile dar. Ihre Hauptfunktion ist der Sauerstofftransport von der Lunge zu den Geweben sowie der Rücktransport von Kohlenstoffdioxid von den Geweben zur Lunge. Zur Erfüllung dieser Aufgabe enthalten sie in hoher Konzentration das spezifische Transportprotein Hämoglobin [12].

Da diese Zellen leicht und in großer Zahl gewonnen werden können und ausgereift keine Organellen mehr enthalten, sind sie ein beliebtes und gut charakterisiertes Modell für eukaryotische Membranen. Die Plasmamembran kann recht schnell und einfach isoliert werden und ist frei von Kontaminationen durch andere Zellen oder Organellen. Sie ist auf der einen Seite komplex genug, um interessante Fragestellungen beantworten zu können, auf der anderen Seite aber auch einfach genug, um als Ganzes untersucht werden zu können [67-69].

Auch die intakten Zellen an sich stellen ein gutes Untersuchungsobjekt dar. Beispielsweise können mit hämolytischen Tests die zytolytischen Wirkungen verschiedener Stoffe bzw. Moleküle wie AMPs auf Erythrozyten als Beispiel eukaryotischer Zellen untersucht werden [70-72].

Die Erythrozytenmembran besteht zu etwa 40-43% aus Lipiden, 52-56% aus Proteinen und etwa 1-8% aus Kohlehydraten. Hierbei sind die Lipide asymmetrisch über die Membran verteilt, wobei das zwitterionische Lipid PE und das negativ geladene PS hauptsächlich in der inneren Lage und die neutral geladenen Lipide SM und PC hauptsächlich in der äußeren Lage der Doppelschicht zu finden sind. Glykolipide sind ebenfalls auf der äußeren Seite zu finden (Tab. 2.5). Daneben enthalten die Membranen eine Vielzahl an Proteinen, welche auch mit dem Zytoskelett verbunden sind. Dieses Erythrozytenmembranskelett besteht zu etwa 75% aus dem Protein Spektrin [31, 67]. Das Zellinnere ist fast vollständig mit Hämoglobin ausgefüllt, es trägt zu etwa 90% der Trockenmasse bei [69, 73].

Tab. 2.5: Tabellarisch dargestellt ist die asymmetrische Verteilung der Lipide in der menschlichen Erythrozytenmembran. Angegeben in % für jedes Phospholipid auf der jeweiligen Seite [31, 67].

<b>Lipid</b>	<b>cytosolische Seite</b>	<b>extrazelluläre Seite</b>
Sphingomyeline	17	83
Phosphatidylcholine	26	74
Phosphatidylethanolamine	77	23
Phosphatidylserine	95	<5
Glykolipide	<5	95

#### **2.1.4 Präparationsmethoden nativer Biomembranen**

Betrachtet man nun die beschriebenen Unterschiede der Membranen, so stellt sich die Frage, ob die in Membranmodellen gewonnenen Erkenntnisse auf die weitaus komplexeren natürlichen, biologischen Membranen übertragbar sind. Besonders interessant sind hierbei der Einfluss der in den Membranen enthaltenen Proteine sowie das gleichzeitige Vorkommen mehrerer verschiedener Lipide und deren Phasenverhalten.

Um diese Frage zu beantworten sowie die weiter oben beschriebenen Membranen für Untersuchungen nutzbar machen zu können, bedient man sich verschiedener Methoden, welche es ermöglichen, pro- und eukaryotische Membranen zu isolieren. Die generelle Gewinnung solcher Biomembranen geschieht entweder durch intensives Waschen, wobei Zellinhalte entfernt

werden, oder sezernierte Membranvesikel werden durch Ultrazentrifugation gewonnen. Im Folgenden sollen die drei verwendeten Methoden vorgestellt werden.

Durch Behandlung des Bakteriums *M. luteus* mit dem Enzym Lysozym kann die dicke Zellwand abgebaut werden. Dies geschieht durch Hydrolyse der  $\beta(1-4)$ -Verknüpfung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und dem N-Acetylglukosaminrest im Peptidoglykan. Für die Empfindlichkeit von *M. luteus* auf Lysozym ist das Wachstum unter entsprechenden Bedingungen unabdingbar [74-76]. Die dadurch entstandenen Protoplasten werden mit hypotonem Medium weiter behandelt. Dies verursacht ein Anschwellen der Membran, was den Austritt zytoplasmatischer Bestandteile zur Folge hat [68, 77].

*P. aeruginosa* (Wildtyp PAO1 und Mutante rmlC) geben, wie viele andere Gram-negative Bakterien auch, Membranvesikel durch Abschnürung der äußeren Membran in den sie umgebenden Biofilm bzw. in das sie umgebende Medium ab (Abb. 2.12). Dieser natürlich stattfindende Vorgang, sowie die Menge der sezernierten Vesikel, sind abhängig von den Wachstumsbedingungen. Nach Beendigung des Wachstums können diese Membranvesikel aus dem zellfreien Medium mittels Ultrazentrifugation gewonnen und für weitere Untersuchungen eingesetzt werden [64-66].

Die Präparation von Erythrozytenmembranen kann durch direkte Behandlung mit hypotonem Medium geschehen, da diese Zellen keine zu verdauende Zellwand besitzen. Ab einer NaCl-Konzentration von 0,5 Gewichtsprozent schwellen die Zellen an, und die Erhöhung der Konzentration führt zu einem Platzen der Zellen und Ausströmen des Zytoplasma [73, 78, 79]. Die korrekte Osmolarität der verwendeten Puffer, der pH-Wert sowie die Temperatur sind Faktoren, die bei der Präparation der Erythrozytenmembranen eine wichtige Rolle spielen und aufgrund dessen systematisch untersucht wurden [77].

## 2.2 Membran-aktive Peptide – antimikrobielle Peptide (AMPs)

Nahezu alle lebenden Organismen - vom Prokaryoten bis zum Menschen - produzieren antimikrobielle Peptide (AMPs). Es handelt sich hierbei um ein altes System zur Abwehr von Mikroorganismen bzw. konkurrierender Mikroorganismen untereinander [33, 80-82].

Bis heute konnten über tausend AMPs charakterisiert werden. Eine Aufstellung ist in folgender Datenbank zu finden: <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>. Beispiele sind Magainine, Alamethicin, Bombinin, Melittin und Defensine, welche ribosomal synthetisiert werden. Gramacidine, Polymyxine, Vancomycin und Teicoplanin sind Beispiele nicht-ribosomal synthetisierter Peptide [83, 84].

AMPs bestehen typischerweise aus 10-50 Aminosäuren und tragen aufgrund des hohen Gehalts an Lys, Arg und His eine positive Nettoladung (von +1 bis +9). Diese positive Ladung trägt zur erhöhten Anziehungskraft an die negativ geladene Lipidmembran von Bakterien bei und stellt somit einen Selektionsfaktor dar. Durch die anschließende Bindung kommt es zur Ausbildung der Sekundärstruktur, wodurch die Peptide ihren amphipathischen Charakter erhalten [81, 82, 85-87]. In Tabelle 2.6 sind einige AMPs mit Sequenz, Herkunft und durch Untersuchungen an Membranmodellen ermittelten Sekundärstrukturen aufgelistet.

Tab. 2.6: Beispiele bekannter antimikrobieller Peptide: Primärsequenz, Herkunft, Sekundärstruktur [2, 82, 85, 88-92].

Peptid	Primärsequenz	Herkunft	Sekundärstruktur
Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQ ATQIAK-NH <sub>2</sub>	<i>Hyalophora cecropia</i>	$\alpha$ -Helix
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	<i>Xenopus laevis</i>	$\alpha$ - Helix
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>	<i>Xenopus laevis</i>	$\alpha$ - Helix
Temporin A	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>	<i>Rana temporaria</i>	$\alpha$ - Helix
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFK RIVQRIKDFLRNLVPRTES-NH <sub>2</sub>	<i>Homo sapiens</i>	$\alpha$ - Helix
Bactenecin	RLCRIVVIRVCR	<i>Bos primigenius taurus</i>	Typ I $\beta$ -Schleife
Gramicidin S	cyclo-(VOL <sup>d</sup> FP) <sub>2</sub>	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	$\beta$ - Faltblatt
Tachyplesin I	KWCFRVCYRGICYRRCR-NH <sub>2</sub>	<i>Tachypleus tridentatu haemocyte</i>	$\beta$ - Faltblatt

<sup>d</sup>: D- Enantiomer

### 2.2.1 Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid (PGLa)

Während der Doktorarbeit wurde mit zwei verschiedenen AMPs gearbeitet. Von diesen zwei soll als erstes das antimikrobielle Peptid Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid, kurz PGLa, vorgestellt werden. Es konnte sowohl aus dem Hautsekret als auch dem gastrointestinalen System des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* isoliert werden, gehört zur Familie der Magainine, besteht aus 21 Aminosäuren und besitzt ein amidiertes Carboxyende (GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH<sub>2</sub>). PGLa ist basisch, trägt durch die vier Lysine und das Amid des C-Terminus fünf positive Ladungen und besitzt viele hydrophobe Reste. Für die Reste 6-21 konnte die Ausbildung einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix nach Bindung an die Membran gezeigt werden. In wässriger Lösung liegt PGLa, wie viele andere lineare AMPs auch, unstrukturiert vor [93-95]. Abb. 2.13 stellt die *helical wheel* Projektion von PGLa dar.

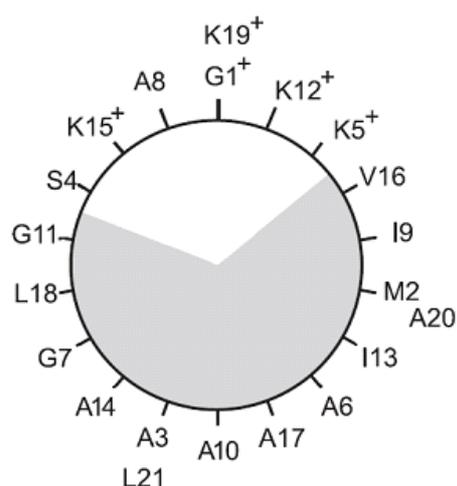


Abb. 2.13: Die *helical wheel* Projektion des amphipathischen Peptides PGLa. Die geladenen Reste sind mit einem + markiert und die hydrophobe Seite ist grau unterlegt [96].

PGLa besitzt, im Gegensatz zu anderen verwandten AMPs, keine signifikante hämolytische Aktivität. Dafür wirkt es gegen eine Vielzahl von Organismen wie Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze und Protozoen. Es wird angenommen, dass PGLa eine transmembrane toroidale Pore bildet, welche zur Permeabilisierung der Membran und somit zu deren Zerstörung führt. Zusammen mit Magainin 2, einem AMP aus der gleichen Familie, welches nicht am Carboxyende amidiert vorliegt, konnte Synergismus in Hinblick auf die bakterielle Aktivität nachgewiesen werden [93, 97-99].

Mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie konnte die Orientierung der  $\alpha$ -Helix von PGLa in Membranmodellen gezeigt werden. In einer synthetischen Membran, bestehend aus den Lipiden DMPC und DMPG in einem molaren Verhältnis von 3 zu 1 und einer Temperatur, bei welcher die Membran in der flüssigkristallinen Phase vorliegt, nimmt PGLa zwei Orientierung an. Bei einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1/200 orientiert es sich im so genannten Surface (S)-State; hier liegt es oberflächlich, entsprechend seinem amphiphilen Charakter, auf der Membran. Erhöht sich die Peptidkonzentration auf ein Verhältnis  $>1/80$ , zeigt PGLa eine gekippte Orientierung (Tilted (T)-State) (Abb. 2.14). Dabei wird der C-Terminus in die Membran insertiert und es kommt vermutlich zur Ausbildung von Dimeren. Faktoren wie Hydratationsgrad und Ladung der Kopfgruppen der Lipide können den Prozess der Umorientierung ebenfalls beeinflussen [4-7].

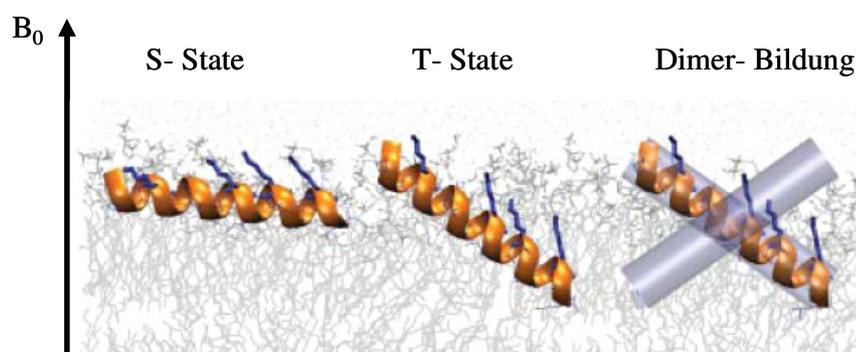


Abb. 2.14: Dargestellt sind die beobachtbaren Orientierungen von PGLa in DMPC- Membranmodellen. Bei niedriger Konzentration liegt das Peptid auf der Membran auf (S-State). Erhöht sich die Konzentration, führt dies zu einer Umorientierung in den gekippten Zustand (T-State) sowie zu einer vermutlichen Dimer-Bildung antiparalleler Helices [5].

Der Inserted (I)-State, bei dem sich das Peptid senkrecht in die Membran orientiert und welcher für das Ausbilden einer postulierten Pore benötigt wird, konnte für PGLa allein nur bei einer Temperatur unterhalb des Phasenübergangs für die erwähnte Mischung der Lipide DMPC und DMPG gezeigt werden. Hier befinden sich diese in der Gel Phase. Bei erhöhter Temperatur liegt die synthetische Membran oberhalb des Phasenübergangs in der flüssig-kristallinen Phase vor und selbst bei einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1/20 kann hier kein I-State mehr, sondern nur der T-State, beobachtet werden. Weitere Temperaturerhöhung führt zur nochmaligen Umorientierung in den S-State. Liegt PGLa allerdings zusammen mit Magainin 2 in einem molaren Verhältnis von 1/1 in der Membran vor, orientiert sich PGLa unabhängig der

Temperatur und somit unabhängig dem Phasenverhalten von DMPC in den I-State. Hier kommt es zur Ausbildung einer transmembranen Pore, bestehend aus Heterodimeren [96, 100, 101].

## 2.2.2 Gramicidin S

Das antimikrobielle Peptid Gramicidin (Gramicidin S) ist ein cyclisches Decapeptid aus den proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren  $[\text{Val-Orn-Leu-}^D\text{Phe-Pro}]_2$  [102]. Durch die untypischen Aminosäuren Ornithin und dem *D*-Enantiomer von Phenylalanin sowie seiner zyklischen Form ist es stabil gegenüber pflanzlichen und tierischen Peptidasen. Erstmals isoliert werden konnte es 1944 aus *Bacillus brevis* (reklassifiziert zu *Aneurinibacillus migulanus*) und gehört zu einer Reihe von nicht-ribosomal synthetisierten AMPs [89, 103]. Sein Wirkungsspektrum reicht von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien über einige pathogene Pilze. Leider besitzt es auch eine erhöhte hämolytische Aktivität, was einen limitierenden Faktor für den medizinischen Einsatz darstellt [104, 105].

Die Struktur von Gramicidin S wird oft als ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, bestehend aus den Aminosäuren Val-Orn-Leu, mit zwei  $\beta$ -Wendungen Typ II' aus den *D*-Phenylalaninen und Prolinen, dargestellt (Abb. 2.15). Vier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidprotonen und den Carbonylgruppen der Leucine und Valine stabilisieren die starre Struktur. Durch die Ornithine besitzt das Molekül eine Nettoladung von +2. Da diese Aminosäuren auf der einen Seite und Valin und Leucin auf der anderen Seite des  $\beta$ -Faltblattes lokalisiert sind, besitzt das Molekül sowohl eine hydrophile als auch eine breite hydrophobe Seite. Dadurch bildet sich für Gramicidin S ein amphipathischer Charakter aus [104, 106, 107].

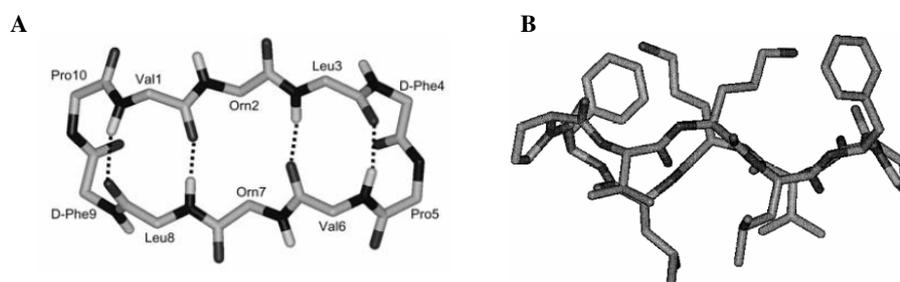


Abb. 2.15: Die Struktur des antimikrobiellen Peptids Gramicidin S. A) Aufsicht auf das Peptidrückgrat mit den intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes. B) Seitenansicht auf die Ringstruktur mit den hydrophilen Resten des Ornithins (oberhalb der Ringebene) und den hydrophoben Resten Val und Leu (unterhalb der Ringebene) [9, 104].

Mittels der  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie konnte die Orientierung von Gramicidin S in Membranmodellen ermittelt werden. Bei einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von kleiner als 1/100 in DMPC liegt das Molekül gemäß seines amphiphilen Charakters flach auf der Membran auf (S-State) (Abb.2.16). In der Gel Phase von DMPC ist es dabei immobilisiert, wird die Temperatur aber bis zur flüssig-kristallinen Phase erhöht, zeigt sich eine erhöhte Mobilität von Gramicidin S [9]. Es konnte gezeigt werden, dass in dem Bereich von  $20^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$ , hier befindet sich die Phasenübergangstemperatur von DMPC, und bei einer Peptid-zu-Lipid-Konzentration von 1/80 und größer der I-State beobachtet werden kann. Hierbei sind die Peptide in die Membran insertiert und es kommt vermutlich zum Zusammenschluss der Moleküle und dadurch zur Ausbildung einer  $\beta$ -Fass-Pore. Diese wird durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die Umorientierung ist daher abhängig von der Lipidphase [8].

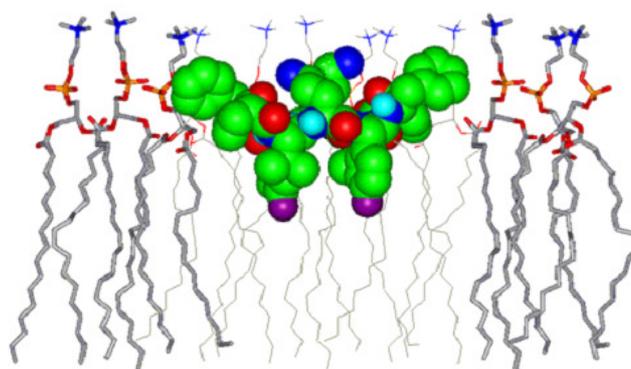


Abb. 2.16: Seitenansicht des gemäß seinem amphipathischen Charakter flach auf der Membran liegende Gramicidin S (S-State). Diese Orientierung liegt bei einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1/80 und kleiner vor. Verändert aus [8, 9].

Durch die Erhöhung der Peptid-zu-Lipid-Konzentration auf 1/40 orientieren sich noch mehr Gramicidin S Moleküle in den I-State um. Die komplette Umorientierung in den I-State findet ab einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1/20 statt. Weiteren Einfluss auf die Umorientierung von Gramicidin S in der Membran haben der Hydratationszustand und der pH-Wert der Lipide. Ebenso spielt ihre Komposition und Kettenlänge eine entscheidende Rolle. In kurzkettigen gesättigten Lipiden wird die Umorientierung in den I-State mit gleichzeitiger Ausbildung einer Pore favorisiert, wohingegen diese Porenbildung durch langkettige und ungesättigte Lipide verhindert wird [8, 108].

## 2.3 Wechselwirkungen zwischen AMPs und Lipidmembranen

In der Wirkung und Selektivität von AMPs zeigen sich Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Die Wirkung wird durch *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC-) Werte ausgedrückt. Sie geben die Konzentrationen antibakterieller Substanzen wieder, bei denen kein bakterielles Wachstum mehr stattfindet. Als Beispiel sind in Tabelle 2.7 vier verschiedene AMPs mit ihren MIC-Werten angegeben (ermittelt in unserer Arbeitsgruppe), jeweils für einen Gram-negativen (*Escherichia coli*) und einen Gram-positiven (*Bacillus subtilis*) Bakterienstamm.

Tab. 2.7: MIC-Werte von verschiedenen AMPs für *Escherichia coli* (Gram-negativ) und *Bacillus subtilis* (Gram-positiv) [109, 110].

Peptid	MIC-Werte [ $\mu\text{M}$ ]	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidin S	11	0,7
Magainin 2	25	>100
PGLa	75	>50
MSI-103	12,5	>50

Die verschiedenen Mechanismen der AMPs, welche zur Zerstörung der Zellmembran und somit zur Zelllyse führen, werden ausführlich in der Literatur diskutiert [111, 112]. Das Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) Modell (Abb. 2.17) kann aber für die meisten AMPs als Wirkmechanismus angenommen werden [2, 85-87]. Wird es auf  $\alpha$ -helikale Peptide angewandt, kann es als ein Drei-Stufen-Prozess beschrieben werden: a) das in wässriger Umgebung unstrukturierte Peptid bindet an die Membran und bildet seine Sekundärstruktur aus; b) weitere Proteine kommen hinzu, binden ebenfalls an die Membran und können miteinander auf verschiedene Arten assoziieren (Fassdaube, Wurmloch, etc.); c) durch Erreichen einer kritischen Konzentration kommt es schließlich zur lethalen Zerstörung der Membran.

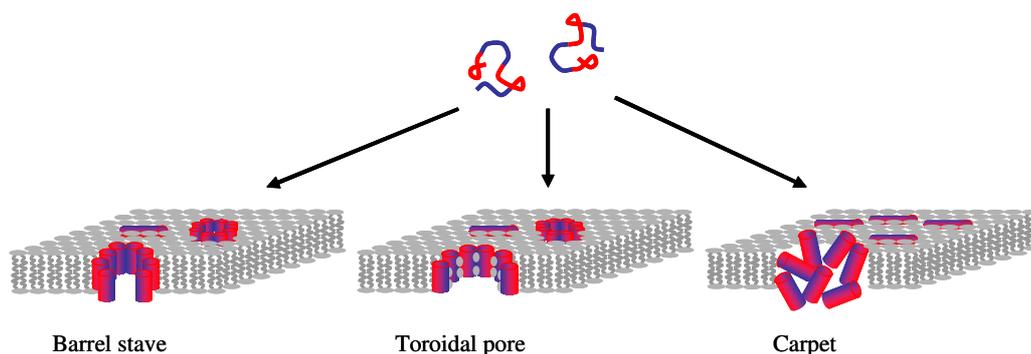


Abb. 2.17: Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) Modell. Das Peptid ist unstrukturiert in wässriger Umgebung und bildet nach Bindung an die Membran seine sekundäre Struktur aus. Die Zerstörung der Membran geschieht anschließend durch drei Hauptmechanismen. Weitere Erklärungen siehe Text. Modifiziert nach [2, 85-87].

Der *barrel stave* (Fassdauben) Mechanismus beschreibt die Bindung der AMPs als Monomere an die Membran. An der anschließenden Porenbildung sind nur die Peptide beteiligt, weshalb sich deren Größe nach der Anzahl der Monomere richtet. Die hydrophilen Reste der individuellen Peptide finden sich im Inneren der Pore wieder; die hydrophoben Seiten der amphipathischen Moleküle sind in Richtung der hydrophoben Umgebung, gegeben durch die Fettsäureketten der Lipide, ausgerichtet. Durch die Porenbildung, deren Größe nicht selektiv ist, kommt es zur Zerstörung der Membranintegrität und dadurch zum Zusammenbruch der Homöostase der Zelle. Dieser Mechanismus wurde erstmals für das Peptaibol Alamethicin beschrieben [20, 87, 113, 114].

Dem *wormhole* (Wormloch) oder *toroidal pore* Mechanismus liegt ein ähnlicher Prozess wie im Fall des *barrel stave* zugrunde. Allerdings findet hier eine Interkalation der Peptide mit den Lipiden in einem transmembranen Kanal statt. Aufgrund dessen ist die Porengröße nicht konstant, da sowohl Peptide als auch Lipide an deren Ausbildung beteiligt sind. Es handelt sich um einen supramolekularen Komplex, dessen Insertion zum Verlust der Membranintegrität und zum Zusammenbruch der Homöostase der Zelle führt. Durch das Induzieren eines schnellen Flip-Flops der Lipide konnte diese Art der Porenbildung erstmals für das antimikrobielle Peptid Magainin 2 beschrieben werden [84, 113, 115].

Der *carpet* (Teppich) Mechanismus beschreibt eine unspezifische Zerstörung der Membran. Durch eine hohe Konzentration an antimikrobiellen Peptiden kommt es zur Akkumulation und anschließend zum Eindringen in die Membran. Dies führt zum Integritätsverlust und damit zur Zerstörung der Membran. Im Gegensatz zum *barrel stave* oder *wormhole* Modell kommt es hier

allerdings nicht zur Ausbildung einer wirklichen Pore. Die Permeabilität der Membran erhöht sich, und es kommt schließlich zur Mizellisierung der Lipide [20, 33, 87].

Das vorgestellte SMH-Modell beschreibt die direkte Interaktion von AMPs mit der Plasmamembran. Gram-negative Bakterien enthalten aber in der äußeren Schicht der äußeren Membran LPS-Moleküle. Diese sind als erste Barriere gegenüber Fremdstoffen anzusehen und können als eine Art molekularer Schwamm beschrieben werden, welcher z.B. AMPs bindet, das Durchdringen bis zur Plasmamembran verhindert und selbige somit vor Zerstörung schützt [116, 117]. Somit sind die Wechselwirkungen als komplexere Prozesse anzusehen.

Wie schon in Abschnitt 2.1.2 erwähnt, können viele AMPs mit LPS-haltigen Membranmodellen interagieren. Peptide wie Melittin, Magainin und Protegrin sind in der Lage, in die LPS-Monolayer einzudringen oder an LPS-haltige Membranmodellen zu binden und diese zu permeabilisieren. Hierbei hängt die Orientierung der AMPs in den Membranen von deren Konzentration sowie der Konzentration der enthaltenen Lipide ab. Membranen, welche r-LPS enthalten, sind sensitiver gegenüber AMPs als Membranen mit s-LPS. Auch ist deren Wirkung maßgeblich von der Ladung der LPS-Moleküle, ihrer Konzentration und der Temperatur abhängig [45, 47, 116-118]. Als weitere Beispiele sind die Peptide Polymyxin B und E1 sowie Gramicidin S zu nennen. Sie sind in der Lage, die äußere Membran von *P. aeruginosa* PAO1 Stamm H103 zu permeabilisieren, wobei die Depolarisation der Plasmamembran durch diese Peptide nicht automatisch mit dem Zelltod korreliert [46].

Es konnte gezeigt werden, dass durch native AMPs aus der Froschgattung *Rana temporaria* die Stabilität von Gram-negativen Bakterien, vermittelt durch die LPS-Schicht, überwunden werden kann. Bei den aus dem Hautsekret isolierten Temporinen handelt es sich um synergistisch wirkende AMPs. Temporin A, B und L sind alleine nur schwach wirksam gegen Gram-negative Bakterien. In der Kombination A und L oder B und L allerdings erhöht sich die antimikrobielle Wirkung um ein Vielfaches. Die synergistische Wirkung von Temporin L zeigt sich durch das Verhindern der Aggregation der Temporine A und B an der LPS-Schicht. Dadurch sind diese AMPs in der Lage, die äußere Membran zu überwinden, zur Plasmamembran zu gelangen und das Zellwachstum zu inhibieren. Als weitere Fähigkeit der Temporine ist die Bindung bereits freigesetzter LPS-Moleküle anzusehen, bzw. dadurch LPS-aktivierte Makrophagen zu neutralisieren [48, 119].

## 2.4 Untersuchungsmethoden für Peptid/Lipidmembran-Wechselwirkungen

Für Untersuchungen von Peptid/Lipidmembran-Wechselwirkungen stehen unter anderem eine Reihe von strukturebiologischen Methoden zur Verfügung. Sie liefern den experimentellen Hintergrund zum Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sowie zur Identifizierung der Membranzerstörung nach dem SMH-Modell.

Dies sind, um nur einige zu nennen, Neutronenstreuung und Röntgenkristallographie [17, 18], Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) [120, 121], (orientierte) Zirkulardichroismus-Spektroskopie (OCD und CD) [121-123], Flüssig- und Festkörper-Kernspinresonanzspektroskopie (fl und ssNMR-Spektroskopie) [3, 124], Elektronenmikroskopie [125], Fluoreszenz-Spektroskopie [126] und dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) [127, 128].

In den folgenden Kapiteln sollen drei dieser Methoden genauer vorgestellt werden (CD-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie und DSC), da sie während der Doktorarbeit verwendet wurden.

### 2.4.1 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine optische Messmethode, die sich sehr gut für die globale Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden in Flüssigkeiten eignet. Diese Flüssigkeiten können dabei z.B. organische Lösungsmittel sein, Detergentien oder Lipide enthalten und somit eine membranimitierende Umgebung für das Peptid schaffen.

Das experimentelle Prinzip der Messung beruht darauf, dass durch die Überlagerung zweier linear polarisierter Lichtwellen mit gleicher Frequenz und senkrecht aufeinander stehender Schwingungsebenen zirkular polarisiertes Licht entsteht. Trifft dieses auf ein chirales Molekül, führt das zu unterschiedlichen Absorptionen des links bzw. rechts zirkular polarisierten Lichtes und es entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Die Peptidbindung wirkt als CO-Chromophor, und die benachbarten  $\alpha$ -C-Atome als Chiralitätszentren (gilt für alle Aminosäuren außer Glycin). Diese ermöglichen das Messen der differenzierten Absorption des zirkular polarisierten Lichts in Polypeptiden. Absorbiert das Chromophor das links polarisierte Licht stärker, ergibt sich eine positive CD-Bande, eine negative CD-Bande hingegen erhält man bei stärkerer Absorption des

rechts polarisierten Lichts. Somit resultiert die Messgröße der CD-Spektroskopie, was die Elliptizität ist, durch die Absorptionsdifferenz aus links und rechts polarisierten Lichtwellen.

Der interessierende Messbereich der CD-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von Proteinen liegt zwischen 160-300 nm. Jedes Sekundärstrukturelement eines Proteins hat ein charakteristisches Spektrum mit charakteristischen Absorptionsbanden. Zwischen 180-260 nm, dem so genannten Fern-UV-Bereich, führt die Anregung der Bindungselektronen der Peptidbindungen zu  $n-\pi^*$  bzw.  $\pi-\pi^*$ -Übergängen, wodurch die charakteristischen Spektren entstehen (Abb. 2.18). Für z.B. eine  $\alpha$ -helikale Struktur ist eine intensive Bande im positiven Bereich bei 192 nm und eine im negativen Bereich bei 222 nm erkennbar, was durch Anregung nicht-bindender  $\pi$ -Elektronen der Peptidbindung und ungepaarter Elektronen des Sauerstoffs in jeweils anti-bindenden  $\pi$ -Orbitalen ( $\pi^*$ ) verursacht wird.

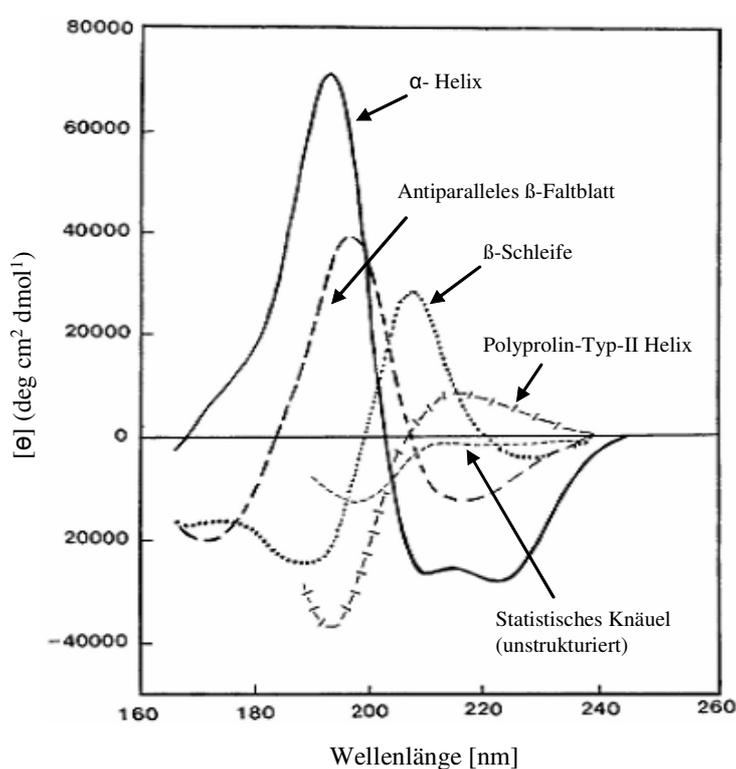


Abb. 2.18: Charakteristische CD-Spektren für verschiedene ideale Sekundärstrukturen von Proteinen. Modifiziert aus [129]

Zusätzliche Informationen über Tertiärstrukturen können in bestimmten Fällen im Nah-UV-Bereich (zwischen 260-320 nm) gewonnen werden, da hier aromatische Aminosäuren absorbieren und ein CD-aktives, chirales Zentrum bilden können [129].

Die Strukturaufklärung der gemessenen Proteine erfolgt anhand vergleichbarer Referenzspektren bekannter Strukturen sowie verschiedener Dekonvolutionsalgorithmen [130]. Mittels der Einzelwellenlängen-Auswertung kann aber schon eine erste Abschätzung des  $\alpha$ -helikalen Anteils anhand der Absorption bei 220 nm einer CD-Probe gemacht werden [131]. Hierbei wird folgende Formel verwendet:

$$[\theta]_{220}/([\theta_{H\infty}]_{220}*(1-3/N)) = f_H$$

$[\theta]_{220}$  = molare Elliptizität der Probe bei 220 nm

$[\theta_{H\infty}]_{220}$  = molare Elliptizität einer  $\alpha$ -Helix mit maximaler Helizität bei 220 nm

N = Anzahl der Aminosäuren im Peptid

$f_H$  = fraktionaler Anteil an  $\alpha$ -Helix in der Probe

Diese Formel basiert auf der Annahme, dass die CD-Probe eines Peptids mit 100% Helixanteil einen molaren Elliptizitätswert von  $-37000$  [ $\text{deg} * \text{cm}^2 * \text{dmol}^{-1}$ ] bei 220 nm aufweist. Somit kann eine grobe prozentuale Abschätzung des  $\alpha$ -helikalen Anteils eines Peptids erfolgen [131].

Für die genannte Methode werden keine Markierungen der Proteine benötigt und es ist möglich, geringe Konzentrationen einzusetzen. Sie führt allerdings nicht zur Aufklärung der Struktur einzelner Bereiche im Protein, sondern lässt lediglich globale Aussagen über die vorhandenen Sekundärstrukturanteile in der Probe zu [129, 131-133].

## 2.4.2 Festkörper-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

### 2.4.2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die NMR ist eine vielseitig anwendbare spektroskopische Messmethode zur atomaren Aufklärung von Strukturen. Sie kann auch zur Untersuchung und Strukturanalyse von Interaktionen zwischen AMPs und Lipidmembranen verwendet werden. Das grundlegende

Prinzip ist die Wechselwirkung eines nuklearen Spins mit einem äußeren, statischen Magnetfeld. Hierbei nutzt man dessen quantenmechanische Eigenschaft, einen magnetischen Kernspin bzw. Eigendrehimpuls  $I$  zu besitzen. Dieser Kernspin ist proportional zum magnetischen Moment  $\mu$ , den nur Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl an Protonen oder Neutronen besitzen, sowie einer Proportionalitätskonstante  $\gamma$  verknüpft. Die Proportionalitätskonstante  $\gamma$  ist für jeden Kern charakteristisch und heißt gyromagnetisches Verhältnis. In Tabelle 2.8 sind die für biologische Untersuchungen geeigneten Kerne mit den wichtigsten NMR-relevanten Parametern aufgeführt.

Tabelle 2.8: Verschiedene biologisch relevante Kerne und ihre Eigenschaften, übernommen aus [124, 134].

Kern	Kernspin $I$	Gyromagnetisches Verhältnis $\gamma/2\pi$ [MHz/T]	Natürliche Häufigkeit [%]	Relative Empfindlichkeit [%]
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$	42,58	99,985	100
$^2\text{H}$	1	6,53	0,0115	0,96
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$	10,70	1,07	1,59
$^{14}\text{N}$	1	3,08	99,6	0,1
$^{15}\text{N}$	$\frac{1}{2}$	-4,31	0,368	0,1
$^{19}\text{F}$	$\frac{1}{2}$	40,03	100	83,3
$^{31}\text{P}$	$\frac{1}{2}$	17,23	100	6,63

Ohne ein äußeres, statisches Magnetfeld  $B_0$  liegen die magnetischen Momente der Atomkerne ungeordnet vor. Nach Anlegen eines solchen Magnetfelds präzedieren die Kernspins mit ihrer Larmorfrequenz  $\omega_0 = \gamma^* B_0$  in Abhängigkeit der Magnetfeldstärke  $B_0$  und ihrem gyromagnetischem Verhältnis  $\gamma$  um selbiges, und die Kerne nehmen diskrete Energieniveaus an. Diese sind proportional zu ihrem magnetischen Moment sowie dem angelegten magnetischen Feld. Der Kernspin  $I$  kann dabei allerdings nicht jede beliebige Orientierung zum äußeren Magnetfeld annehmen, sondern nur wenige diskrete Niveaus, die so genannten Zeeman-Energieniveaus. Die Anzahl der möglichen Energieniveaus ist hierbei abhängig von der Spinquantenzahl  $I$ . Für die in dieser Arbeit verwendeten Kerne  $^{19}\text{F}$  und  $^{31}\text{P}$  mit dem Kernspin  $I = \frac{1}{2}$  existieren genau zwei Energieniveaus. Der parallel zum Magnetfeld ausgerichtete  $\alpha$ -Spin ( $N_\alpha$ ) ist dabei energieärmer als der antiparallel ausgerichtete  $\beta$ -Spin ( $N_\beta$ ) (Abb. 2.19). Da  $N_\alpha > N_\beta$ ,

resultiert daraus eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$ . Dieser Besetzungsunterschied kann durch die Boltzmann-Verteilung beschrieben werden:

$$N_\beta/N_\alpha = e^{-\Delta E/k_B T}$$

Hierbei ist  $N$  die Anzahl der Spins im  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Zustand,  $k$  die Boltzmann Konstante,  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin (K) und  $B$  das Magnetfeld.

Je größer also die Energiedifferenz zwischen den beiden Niveaus ist, umso mehr Kerne befinden sich nach der Boltzmann-Verteilung im energieärmeren Zustand und können durch die Einstrahlung der Resonanzfrequenz angeregt werden. Diese Übergänge können schließlich als NMR-Signal, auch *free induction decay* (FID) genannt, detektiert werden.

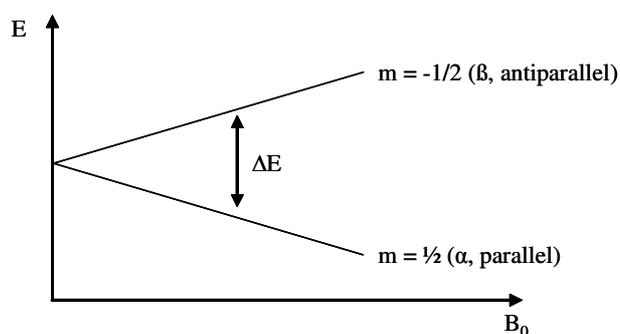


Abb. 2.19: Die Aufspaltung der Energieniveaus für Kerne mit dem Spin  $I = 1/2$ . Diese steht in Abhängigkeit des äußeren angelegten Magnetfelds  $B_0$ .

#### 2.4.2.2 Wechselwirkungen des Atomkerns

Es gibt vier verschiedene proben-spezifische Wechselwirkungen, die neben der Stärke des magnetischen Felds  $B_0$  zur Resonanzfrequenz eines Spins beitragen. Diese treten gleichermaßen in der Flüssig- als auch der Festkörper-NMR-Spektroskopie auf. Es handelt sich hierbei um a) die *J-Kopplung*, welche die kleinste Wechselwirkung darstellt, b) die *chemische Verschiebung*, welche durch die direkte elektronische Umgebung zustande kommt und viel größer als die *J-Kopplung* ist, c) die *dipolare Wechselwirkung*, welche in etwa gleich groß zur *chemischen Verschiebung* ist und durch die Wechselwirkung der magnetischen Momente zweier Spins durch den Raum induziert wird, sowie d) die *quadrupolare Wechselwirkung*, die nur für Kerne mit Spinquantenzahl  $I$  größer als  $1/2$  Gültigkeit hat.

Da sich jedoch Moleküle in Flüssigkeiten schnell bewegen können, im Festkörper hingegen langsamere Bewegungen vorhanden sind, ist die Gewichtung der Wechselwirkungen verschieden. In der Flüssig-NMR-Spektroskopie sind vor allem die *J-Kopplung*, die *dipolaren Wechselwirkungen* und die *chemische isotrope Verschiebung* wichtig. Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie sind dies die *chemische anisotrope Verschiebung*, die *dipolaren Wechselwirkungen* und für Kerne mit einer Spinquantenzahl  $I > 1/2$  die *quadrupolare Wechselwirkung*.

### 2.4.2.3 Die chemische Verschiebungsanisotropie

Neben dem angelegten äußeren Magnetfeld wird durch die Elektronen, welche den Atomkern umgeben und mit dem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung treten, ein lokales Magnetfeld induziert. Dadurch verschiebt sich die Resonanzfrequenz des Kerns leicht, ein Effekt, der als *chemische Verschiebung* bezeichnet wird. Diese wird in *parts per million* (ppm) angegeben, da sie zwar wesentlich kleiner als die Messfrequenz ist, aber trotzdem stark genug, um die chemische Umgebung zu identifizieren. Das beruht darauf, dass jede „Gruppe“ einen spezifischen Wert für die *chemische Verschiebung* hat. Weiterhin hängt die *chemische Verschiebung* von der Orientierung des Moleküls ab. Dieser anisotrope Effekt wird als *chemical shift anisotropy* (CSA) bezeichnet. In Lösung allerdings wird diese Orientierungsabhängigkeit durch die freie Beweglichkeit der Moleküle gemittelt und verschwindet. Daher tritt die CSA nur bei hinreichend „festen“ Körpern auf.

Die Orientierungsabhängigkeit lässt sich durch einen CSA-Tensor, einer 3\*3-Matrix, mathematisch wiedergeben. In dieser Matrix, welche durch ein Koordinatensystem beschrieben werden kann, sind alle Tensorelemente gleich null, außer den drei Diagonalelementen. Veranschaulicht werden kann diese Matrix durch ein asymmetrisches Ellipsoid (Abb. 2.20 A), dessen drei Hauptachsen, die Tensorkomponenten  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  und  $\sigma_{33}$ , durch Diagonalisierung des Koordinatensystems ermittelt werden können. Hierbei stellt  $\sigma_{33}$  das am meisten abgeschirmte Element dar, welches die niedrigste Resonanzfrequenz und die kleinste Verschiebung besitzt.  $\sigma_{11}$  dagegen stellt das am wenigsten abgeschirmte Element mit der höchsten Resonanzfrequenz und der größten chemischen Verschiebung dar, wobei folgendes gilt:  $\sigma_{11} \geq \sigma_{22} \geq \sigma_{33}$ .

Ein Molekül, das in seiner Bewegung eingeschränkt ist und nicht orientiert vorliegt, zeigt ein so genanntes Pulverspektrum (Abb. 2.20 B). Dieses ist für jede chemische Umgebung charakteristisch und entsteht durch die Überlagerung der Signale aller im Raum möglichen Orientierungen. Diese reflektieren die Tensorelemente  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  und  $\sigma_{33}$  (Abb. 2.20 B)), welche abgelesen und bestimmt werden können, z.B. für ein Phospholipidpulver. Ist die Rotation um eine Achse mit einer Frequenz  $\gg$  CSA möglich, wird dadurch diese Raumrichtung ausgemittelt und es entsteht ein axialsymmetrischer CSA-Tensor mit zwei Hauptachsenwerten  $\sigma_{\parallel}$  und  $\sigma_{\perp}$  (Abb. 2.20 C)). Das ist z.B. bei unorientierten Phospholipidvesikeln der Fall, in denen die Phospholipide in der Lage sind, sich schnell um eine Achse zu drehen. Bei schnellen Bewegungen eines Moleküls entlang aller drei Achsen, z.B. Phospholipide in Chloroform, ist der CSA-Tensor zu einer Linie am isotropen Wert ausgemittelt  $\sigma_{\text{iso}} = (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})/3$ . Genau das passiert in der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie.

Für das Spektrum orientierter Proben erwartet man eine Lorentz-Linie, da nur bestimmte Orientierungen vorhanden sind. Aufgrund dessen kann die Orientierung von Lipidmolekülen auf Festkörperoberflächen bestimmt werden. Mit  $0^\circ$  oder  $90^\circ$  Neigungswinkel der Probe orientieren diese sich parallel oder senkrecht zu  $B_0$  an, und man erhält eine für jedes Lipid charakteristische Linienform im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum (Abb. 2.20 D) und E)). Die Breite der Linien sowie die charakteristische Linienform entstehen durch geringe Abweichungen von der Orientierung und werden als „mosaic spread“ bezeichnet.

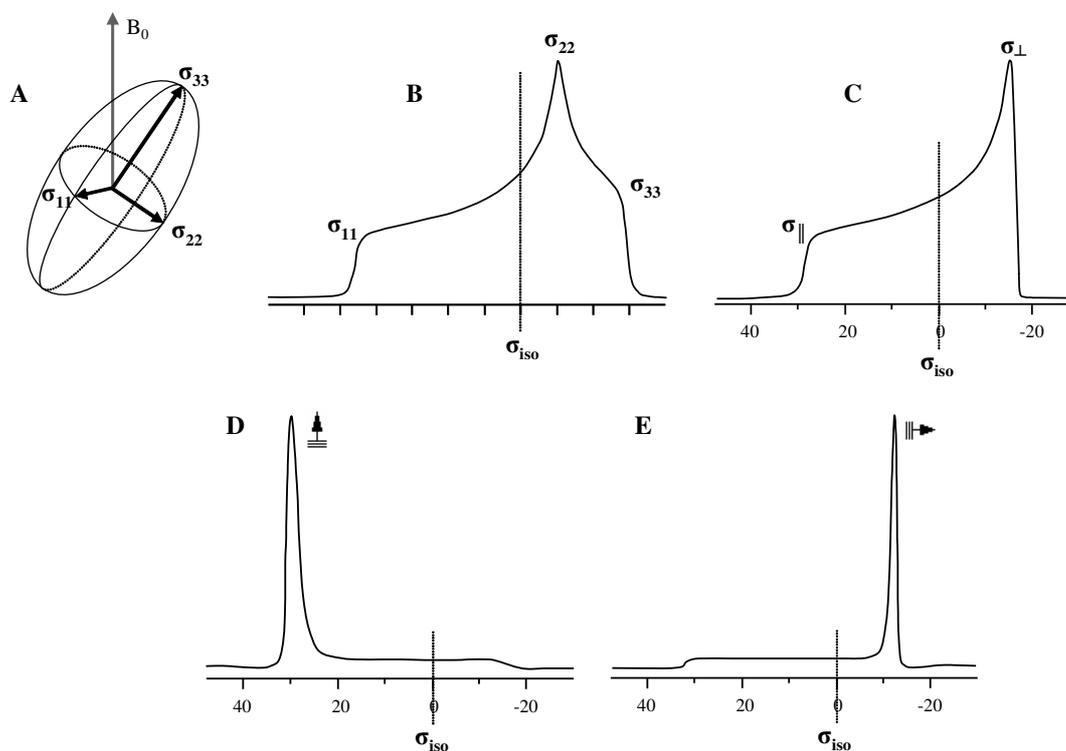


Abb. 2.20: A) Der CSA-Tensor mit den Hauptkomponenten  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  und  $\sigma_{33}$ . B) Simuliertes typisches statisches Pulverspektrum einer immobilen Substanz, welches die Summe der Signale aller im Raum möglichen Orientierungen darstellt und von welchem die Tensorelemente abgelesen werden können. C) Das simulierte  $^{31}\text{P}$ -Pulverspektrum mit den zwei Hauptachsenwerten  $\sigma_{\parallel}$  und  $\sigma_{\perp}$  zeigt einen axialsymmetrischen CSA-Tensor. D)  $^{31}\text{P}$ -Signal (bei ca. 30 ppm) für makroskopisch orientierte DMPC Multilayer mit  $0^\circ$  Neigungswinkel. E)  $^{31}\text{P}$ -Signal (bei ca. -15 ppm) für orientierte DMPC Multilayer mit  $90^\circ$  Neigungswinkel. Hier ist das Signal an der isotropen Position um den Wert  $-\frac{1}{2}$  gespiegelt. Modifiziert nach [3, 30, 101, 124].

#### 2.4.2.4 Die dipolare Kopplung

Jeder NMR-aktive Kern besitzt ein magnetisches Dipolmoment, über den er mit dem magnetischen Dipolmoment eines zweiten Kerns über den Raum hinweg wechselwirken kann. Für Kerne mit einem Spin von  $\frac{1}{2}$  ist die dipolare Interaktion die dominierende Wechselwirkung im Festkörper und führt zu einer Aufspaltung des NMR-Signals. Hierbei gibt es zum einen die homonukleare dipolare Kopplung, welche auf der Wechselwirkung zwischen den Magnetfeldern, die von der gleichen Sorte benachbarter Kernspins erzeugt wird, beruht. Zum anderen kennt man die heteronukleare dipolare Kopplung, welche auf der Wechselwirkung zwischen den Magnetfeldern zweier Kernspins unterschiedlicher Sorte beruht. Die Größe der dipolaren Aufspaltung ist abhängig vom Abstand  $r$  der beiden Kerne sowie dem Winkel  $\theta$  zwischen der

Verbindungsachse der Kerne mit dem äußeren Magnetfeld (Abb. 2.21). Für die dipolare Kopplung (in Hertz angegeben) gilt die Gleichung  $\Delta_{AB}(\theta) = \Delta_{AB}^0(3\cos^2\theta - 1)/2$ . Hierbei ist die Kopplungskonstante  $\Delta_{AB}^0$  proportional zu  $1/r^3$  und dem magnetischen Moment der Kerne. In echten Flüssigkeiten ist die dipolare Kopplung normalerweise nicht sichtbar, da sie durch isotrope Bewegungen zu Null ausgemittelt wird. Durch Rotation von Proben in der Festkörper-NMR-Spektroskopie um den magischen Winkel  $\theta_M = 54,7^\circ$  mit einer Frequenz, die größer ist als die *dipolare Wechselwirkung*, können hier anisotrope Wechselwirkungen ausgemittelt werden. Diese Messung wird als magic angle spinning (MAS) bezeichnet.

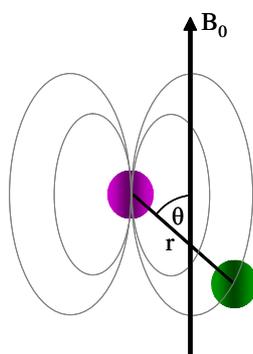


Abb. 2.21: Dipolare Kopplung zwischen zwei Kernen, abhängig vom Abstand  $r$  und dem Winkel  $\theta$  in Bezug zum äußeren Magnetfeld. Durch das vom linken Kern verursachte Magnetfeld wird das effektive Magnetfeld am rechten Kern verändert. Modifiziert nach [30, 101].

#### 2.4.2.5 Fluor-19 Markierung von AMPs

Für die Strukturaufklärung biologischer Moleküle, z.B. von Proteinen, werden häufig die Kerne  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  verwendet. Da aber  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  eine sehr geringe Empfindlichkeit aufweisen, müssen sie meist entweder angereichert oder selektiv eingefügt werden. Außerdem kommen  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  natürlicherweise in Biomolekülen vor und zeigen daher störende Hintergrundsignale in der NMR-Spektroskopie. Im Falle von  $^1\text{H}$  ist dieser Hintergrund sehr stark, seine schmale *chemische Verschiebung*, die durch Überlappungen schlecht erkannt werden kann, macht es jedoch noch weniger attraktiv. Für die Untersuchung der Struktur und Orientierung von Peptiden in Membranen bedient man sich daher der Fluormarkierung derer an definierten Stellen in der Sequenz.  $^{19}\text{F}$  weist ähnlich wie  $^1\text{H}$  eine hohe Empfindlichkeit auf, hat aber eine deutlich größere *chemische Verschiebung*. Zudem ist es in natürlichen Peptiden nicht vorhanden und zeigt somit keinen natürlichen Hintergrund. Die hohe Empfindlichkeit erlaubt es, Peptide in geringen

Konzentrationen zu messen [3]. Daher ist die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie eine sehr gute NMR-Spektroskopie-Methode zur Strukturaufklärung von Peptiden.

Wie erwähnt, eignet sich Fluor sehr gut zur Strukturaufklärung von Peptiden. Die Markierung wird aber nicht mittels einer einzelnen kleinen fluorhaltigen Gruppe eingebracht. Diese wäre zu frei beweglich und würde somit nicht die Orientierung des Peptides widerspiegeln. Hierfür ist es nötig, eine Markierung zu finden, die als  $^{19}\text{F}$  Reportergruppe, z.B. eine CF- oder  $\text{CF}_3$ -Gruppe, mit dem Peptidrückgrad verbunden ist, einen definierten Abstand hat und deren Orientierung von der Orientierung des Peptids abhängt. Solche Markierungen sind Aminosäuren wie 4-Fluorphenylglycin (4-F-Phg) und 4-Trifluormethyl-Phenylglycin (4- $\text{CF}_3$ -Phg) (Abb.2.22). Sie werden während der Synthese manuell in das Peptid eingebaut. Die Parameter für die Bestimmung der Orientierung der so markierten Peptide gegen das magnetische  $B_0$ -Feld sind für die  $\text{CF}_3$ -Gruppe seine dipolare Aufspaltung, und für die F-Gruppe die chemische Verschiebung. In der vorliegenden Dissertation wurde mit den AMPs PGLa und Gramicidin S gearbeitet. Diese Peptide sind mit 4- $\text{CF}_3$ -Phg (PGLa) bzw. mit 4-F-Phg (Gramicidin S) markiert. Von PGLa wurden elf verschiedene Peptide verwendet, die jeweils an unterschiedlicher Stelle die markierte Aminosäure tragen. Das sind die Positionen 3, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18 und 20. Bei Gramicidin S sind es zwei unterschiedliche Peptide, hier wurden entweder die Positionen 1 und 1 (1/1'GS) oder die Positionen 3 und 3 (3/3'GS) durch die markierten Aminosäuren substituiert [4, 135].

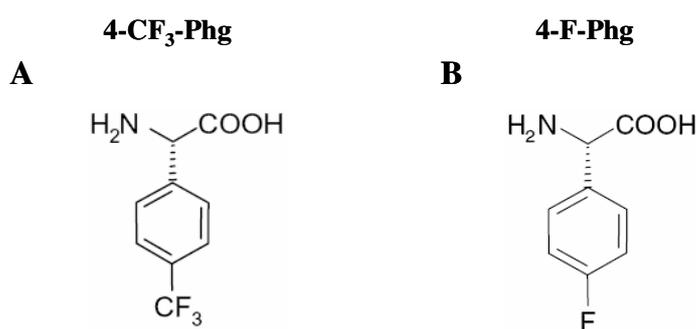


Abb. 2.22: Die Konformation der rigiden Aminosäuren, welche als  $^{19}\text{F}$  Reporter für die Peptidstudien in der  $^{19}\text{F}$ -NMR verwendet wurden. A) 4- $\text{CF}_3$ -Phenylglycin, welche einen trifluormethylierten Substituenten trägt. B) 4-Fluorphenylglycin, welche ein Fluoratom direkt am aromatischen Ring trägt. Nach [136, 137].

### 2.4.2.6 Relaxationsmessungen

Informationen über Strukturverhalten, Orientierung und Beweglichkeit von Peptiden in Membranen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie sind meist globaler Natur. Um lokale Informationen der Beweglichkeit zu erhalten, kann man Relaxationsmessungen nutzen.

Durch das Einstrahlen der Resonanzfrequenz wird das thermische Gleichgewicht des Spinsystems gestört und dadurch der Magnetisierungsvektor  $M_0$  aus der Gleichgewichtslage ausgelenkt. Ist die Störung beendet, relaxiert das System bis zur Wiederherstellung des Gleichgewichts, indem  $M_0$  wie die Einzelspins mit der Larmorfrequenz um die z-Achse präzediert, wobei seine Orientierung durch das ortsfeste Koordinatensystem festgelegt ist [134, 138]. Hierdurch können für Proteine, Peptide oder Phospholipide die  $T_1$ -,  $T_2$ - und/oder  $T_{1\rho}$ -Zeiten ermittelt werden. Bei der  $T_1$ -Relaxationszeit handelt es sich um die longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit. Sie ist dominiert von schneller Dynamik, und kann sich im Bereich von Mikrosekunden bis Sekunden bewegen. Die  $T_2$ -Relaxationszeit hingegen ist die transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit und von langsamer Dynamik dominiert. Sie ist immer kleiner oder gleich  $T_1$ , aber nie größer [134, 138]. Die dritte erwähnte Zeit  $T_{1\rho}$  wird bei einer anderen Feldstärke gemessen, welche mittels des Spin-lock-Verfahrens unabhängig vom äußeren Magnetfeld ist und nur in der Spule vorherrscht. Daher liegt dieser Relaxationszeit eine andere Zeitskala zugrunde, welche sich zwischen  $T_1$  und  $T_2$  befindet.

Durch Relaxationsmessungen ist es möglich, den Mechanismus der Interaktion zwischen AMPs und der Phospholipiddoppelschicht zu untersuchen. Es konnte durch Messungen von  $^{31}\text{P}$   $T_1$ -Zeit gezeigt werden, dass das künstliche Peptid KIGAKI die Interaktion mit Membranmodellen, welche Palmitoyl-oleoylphosphoglycerol (POPG) enthält, der Interaktion mit Membranmodellen aus Palmitoyl-oleoylphosphocholin (POPC) bevorzugt. Mittels  $T_2$  konnte anschließend auf Seiten der Phospholipidschicht, bestehend aus purem POPC oder einer Mischung aus POPG/POPC (3/1), eine signifikante Änderung der Dynamik nach Bindung des AMPs festgestellt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass durch das Peptid die Membran nach dem *carpet* Modell zerstört wird [139]. Durch  $T_{1\rho}$  war es möglich, den Einfluß des Inhibitors Amantadine auf die globale Beweglichkeit des Influenza A M2 Transmembranpeptids (M2TMP) zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass nach Bindung an den Inhibitor M2TMP eine höhere Beweglichkeit hatte. Dieses Ergebnis stützt die Theorie, dass durch die Bindung mit Amantadine

M2TMP eine besser gepackte Struktur enger zusammenstehender helikaler Transmembrandomänen ausbildet [140]. Die Dynamik einzelner Aminosäuren kann ebenfalls durch Relaxationsmessungen ermittelt werden. Das kationische  $\beta$ -*hairpin* AMP Protegrin-1 (PG-1) enthält an verschiedenen Stellen die Aminosäure Arginin. Durch die Ermittlung der Änderungen von  $T_2$  und  $T_{1\rho}$  des  $^{13}\text{C}$ -Kerns konnte gezeigt werden, dass im  $\beta$ -*turn* die Beweglichkeit der Argininseitenkette größer ist als in der  $\beta$ -*strand* Region. Das kann dadurch erklärt werden, dass sich der  $\beta$ -*turn* auf der Membranoberfläche befindet, wohingegen der  $\beta$ -*strand* in das hydrophobe Innere der Membran eindringt. Dieses Ergebnis unterstützt die vorgeschlagene Oligomerisierung der AMPs zu einem toroidalen  $\beta$ -Fass in gebundenem Zustand [141].

### 2.4.3 Dynamische Differenzkalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry – DSC)

Bei der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) handelt es sich um eine Methode der thermischen Analyse. Für biologische Systeme stellt sie eine einfache und relativ schnelle Messmethode dar, um z.B. den thermotropischen Polymorphismus von Lipiden in Membranmodellen, abhängig von z.B. deren Zusammensetzung oder den Eigenschaften der Umgebung, zu untersuchen. Lipide, die zur Ausbildung lamellarer Phasen befähigt sind, befinden sich unterhalb des Hauptphasenübergangs  $T_C$  in der Gel Phase  $L_\beta$ . Hier weisen alle Fettsäureketten eine *all-trans* Konformation auf, sie liegen quasi im „Zick Zack“ vor. Bei Erhöhung der Temperatur zeigen die Lipide mehr und mehr laterale Beweglichkeit aufgrund aufkommender *gauche* Konformationen in den Fettsäureketten. Oft tritt vor dem eigentlichen Phasenübergang  $T_C$  ein Vorübergang  $T_{C'}$  auf, hier kann die Übergangs-Phase  $P_\beta$  beobachtet werden. Nach dem Überschreiten von  $T_C$  liegen alle Lipide in der flüssig-kristallinen Phase  $L_\alpha$  vor [128, 142]

Diese Prozesse können z.B. die thermodynamischen Eigenschaften der Phasenübergänge der Lipide darstellen, und die Differenz der Energie bzw. der Wärmekapazität ( $\Delta C_p$ ) kann als Funktion der Temperatur aufgetragen werden [128]. Abbildung 2.23 zeigt ein DSC Thermogramm im Bereich von 30°C bis 50°C für eine MLV Probe, bestehend aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC). Die temperaturabhängigen Phasenübergänge vom

Gelzustand hin zur flüssig-kristallinen Phase finden in zwei Stufen statt. Bei 36°C ist ein Vorübergang ( $T_{C'}$ ) zu erkennen, der Hauptübergang ( $T_C$ ) befindet sich bei 41,5°C [143].

Durch die DSC ist es möglich, den Einfluss von Peptiden, verschiedenen Ionenkonzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten auf den thermotropen Polymorphismus der Membranmodellen zu untersuchen und somit Wechselwirkungen zu zeigen und zu bestätigen.

LPS kann ebenfalls mittels DSC kalorimetrisch untersucht werden. Hierbei zeigt sich, dass es für s-LPS aus verschiedenen Bakterienstämmen zwei thermale Übergänge gibt: einer liegt zwischen -13 und -36°C, der andere zwischen 129 und 200°C [144]. Ra-LPS aus *Salmonella minnesota* R60 zeigt einen recht breiten Phasenübergang zwischen 20-40°C, wobei das Maximum bei 36°C liegt [143].

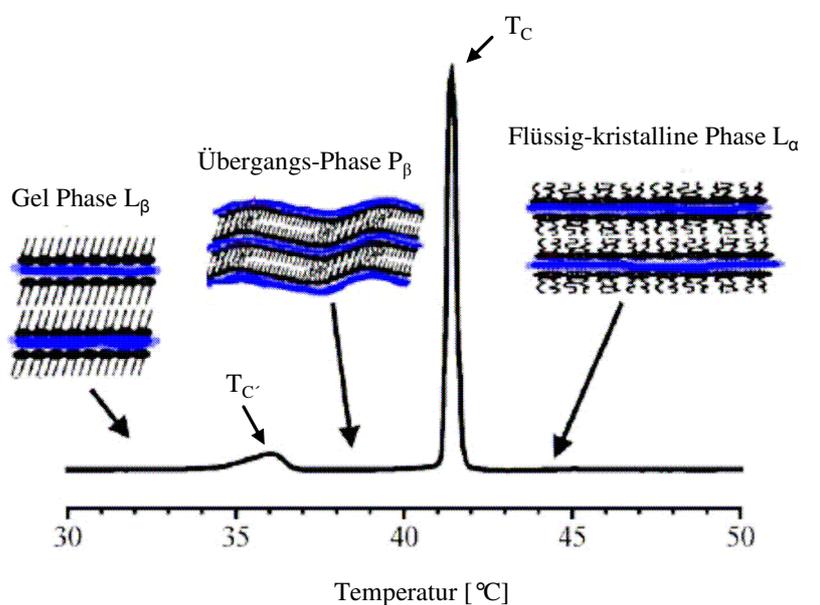


Abb. 2.23: Schematische Darstellung eines DSC Thermogramms für eine MLV Probe, bestehend aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC). Deutlich erkennbar der Vorübergang ( $T_{C'}$ ) bei 36°C von der Gel Phase  $L_{\beta}$ , hier weisen die Fettsäureketten eine *all-trans* Konformation auf, in die Übergangsphase  $P_{\beta}$ , hier liegen einige Fettsäureketten in der *gauche* Konformation vor. Der Hauptübergang ( $T_C$ ) bei 41°C findet von der Übergangsphase  $P_{\beta}$  in die flüssig-kristalline Phase  $L_{\alpha}$ , hier befinden sich alle Fettsäureketten in der *gauche* Konformation, statt. Modifiziert aus [143].

### **3 Aufgabenstellung**

Antimikrobielle Peptide (AMPs) stellen vielversprechende Alternativen zu konventionellen Antibiotika dar, da durch ihre unmittelbare mechanische Wirkung an der Zellmembran eine Resistenzbildung der Bakterien erschwert wird. Grundlegend für ein besseres Verständnis ihrer Funktionsweise ist das Wissen über ihr strukturelles Verhalten an Membranen. Anhand von Modellsystemen aus AMP und synthetischen Phospholipiden konnte mittels Festkörper-NMR bereits viel darüber gelernt werden. Ziel dieser Doktorarbeit war es, diese Art von Untersuchungen auf native Biomembranen von Gram-positiven und -negativen Bakterien, sowie von Eukaryoten zu übertragen, unterstützt durch Zirkulardichroismus und Kalorimetrie.

Mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR ist es möglich, das Phasenverhalten von Phospholipiden zu untersuchen und die Qualität ihrer lamellaren Anordnung in orientierten Proben zu ermitteln. Mit dieser Methode sollten drei Typen natürlicher Biomembranen charakterisiert und verglichen werden: äussere Membranvesikel des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, Protoplasten des Gram-positiven Bakteriums *Micrococcus luteus*, sowie Membranen von Erythrozyten. Ebenfalls sollten Mischungen von synthetischen Phospholipiden und Lipopolysaccharid betrachtet werden, die die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien als Modell repräsentierten.

Neben den Lipidkomponenten sollten auch die antimikrobiellen Peptide selbst mittels Festkörper-NMR untersucht werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von  $^{19}\text{F}$ -NMR und der Abwesenheit von Fluor in Biomolekülen eignet sich dieser Kern sehr gut zur selektiven Markierung. Durch Peptidsynthese werden  $^{19}\text{F}$ -haltige Aminosäuren in die AMPs eingebracht, um ihr strukturelles Verhalten in der Membran mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR zu ermitteln. Ziel in dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich die beiden antimikrobiellen Peptide PGLa und Gramicidin S auch in den oben erwähnten Biomembranen so verhalten, wie es zuvor in Membranmodellen beschrieben worden war. Welche Konformation und Orientierung nehmen sie dort ein? Können Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischen Membranen detektiert werden? Welcher Art sind diese Unterschiede und welche Mechanismen liegen ihnen zugrunde?

Kommt es zur Ausbildung einer Pore, die in Membranmodellen für PGLa und Gramicidin S postuliert wird und zur Zerstörung der Bakterien führt?

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Autoklav Systec 2540 EL Systec	Wetterberg, Deutschland
Autoklav Systec VX-95 Systec	Wetterberg, Deutschland
Brutschrank Incucell MMM Medcenter	Königswinter, Deutschland
CD-Messküvetten Hellma Optik	Müllheim, Deutschland
CD-Spektropolarimeter J-810, Jasco Industries	Gross-Umstadt, Deutschland
Differential Scanning Calorimeter VP-DSC MicroCal	Freiburg, Deutschland
Heizblock, HB-2, Wealtec Corp.	Sparks, USA
Inkubationsschüttler Innova 44 New Brunswick Scientific	Edison, USA
Photokamera PowerShot G5 Canon	Japan
Laminar flow box Hera safe Heraeus Instruments	Stuttgart, Deutschland
Mikroskop Axioskop 40 Zeiss	Jena, Deutschland
NMR Spektrometer Avance 500 Bruker Biospin	Karlsruhe, Deutschland
Pipetus, Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland

Pipetten Referenze

(0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl) Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Probenkopf für <sup>31</sup> P H/FX Bruker Biospin	Karlsruhe, Deutschland
Probenkopf für <sup>19</sup> F Doty Scientific	Columbia, USA

Schüttler Biometra

Schüttler KS250 basic IKA Labortechnik	Goettingen, Deutschland
Sonifier 250 Branson Heinemann	Staufen, Deutschland
Spektrophotometer Smart Spec Plus Bio-Rad	Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Spektrophotometer Cary 1E Varian	Hercules, USA
	Palo Alto, USA

Tube sealer Beckman

Palo Alto, USA

UV-Vis Spektrophotometer Thermo Fisher Scientific

Wilmington, USA

Vortex mixer Genie K-550-GE Bender & Hobein

Zürich, Schweiz

Waage PB 3001 Mettler Toledo

Greifensee, Schweiz

Waage (analytisch) Sartorius Mettler Toledo

Greifensee, Schweiz

Waage M2P Sartorius Mettler Toledo

Greifensee, Schweiz

Wasserbad GFL Migge Laborbedarf

Heidelberg, Deutschland

Zentrifuge 3-18K Sigma

Osterode am Harz, Deutschland

Zentrifuge Avanti J-25 Beckman Coulter

Fullerton, USA

Zentrifuge Biofuge Pico Heraeus

Hanau, Deutschland

Zentrifuge L8-60M Ultrazentrifuge Beckman Coulter

Palo Alto, USA

Zentrifuge RC 5B Plus Sorvall

Bad Homburg, Deutschland

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen Nunc

Roskilde, Dänemark

Deckgläschen Roth	Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen Marienfeld Laboratory Glassware	Lauda-Königshofen, Deutschland
Filter MN	Düren, Deutschland
Glaskolben Schott Duran	Mainz, Deutschland
Glasröhrchen Schott Duran	Mainz, Deutschland
Küvetten Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Objektträger Roth	Karlsruhe, Deutschland
Parafilm American National Can	Chicago, USA
Petrischalen (steril) Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reagenzröhrchen Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reagenzröhrchen Quick-seal Polyallomer Beckman	Palo Alto, USA
Reaktionsgefäße Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zelluloseazetat-Membran Sartorius Stedim	Aubagne Cedex, Frankreich

#### 4.1.3 Chemikalien

Agarose, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
AgNO <sub>3</sub> , Roth	Karlsruhe, Deutschland
APS, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ascorbinsäure, Merck	Darmstadt, Deutschland
Bacto Pepton (Trypton), Roth	Karlsruhe, Deutschland

CHCl <sub>3</sub> , Merck	Darmstadt, Deutschland
Coomassie Blue R250, Roth	Karlsruhe, Deutschland
DLPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
DMPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
DMPG, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
DMSO, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
DPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
DPPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
DSPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
<i>E. coli</i> TLE, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
EDTA, AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd, Riedel-de-Haen	Seelze, Deutschland
Glycerin, Roth	Karlsruhe, Deutschland
HCl, Roth	Karlsruhe, Deutschland
HEPES, Roth	Karlsruhe, Deutschland
H <sub>5</sub> IO <sub>6</sub> , Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Merck	Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Roth	Karlsruhe, Deutschland
KDO, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid <i>E. coli</i> O55:B5 (sLPS), Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid <i>S. typhimurium</i> SL1181 (rLPS), Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
lysoMPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
lysoPPC, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
Methanol, Fischer Scientific	Leicestershire, UK
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
milliQ H <sub>2</sub> O, Millipore	Billerica, USA
NaAsO <sub>2</sub> , Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland

NaCl, Fischer Scientific	Leicestershire, UK
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Roth	Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , AppliChem	Darmstadt, Deutschland
NaN <sub>3</sub> , Roth	Karlsruhe, Deutschland
NaOH, Merck	Darmstadt, Deutschland
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , Roth	Karlsruhe, Deutschland
Petrolether, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Phenol, Roth	Karlsruhe, Deutschland
POPE, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
SDS, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Silica gel, Merck	Darmstadt, Deutschland
TBA, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Temed, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tris, Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trypticase Soja BouillonBecton, Dickinson & Co.	Sparks, USA

#### 4.1.4 Enzyme

Pronase, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Lysozym, Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
DNase I, AppliChem	Darmstadt, Deutschland
RNase A, AppliChem	Darmstadt, Deutschland

#### 4.1.5 Humane Erythrozyten

Humane Erythrozyten wurden von der Blutbank des städtischen Klinikums in Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um Zitrat-Phosphat-Dextrose-stabilisierte (CPD) Blutkonserven, welche die Erythrozyten-Suspension enthielten.

Die Blutkonserven wurden innerhalb der Verfallszeit verwendet und geöffnete Beutel am gleichen Tag verarbeitet.

#### 4.1.6 Bakterienstämme

Für die Arbeiten wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet. Zum einen *Micrococcus luteus* ATCC 4698, zum anderen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Wildtyp-Stamm) und rmlC (Mutanten-Stamm) von Dr. Terry Beveridge an der Universität Guelph, Kanada.

Alle Bakterienstämme wurden und als 30%ige Glycerolstocks bei -20°C gelagert.

#### 4.1.7 Peptide

Die spektroskopischen Untersuchungen wurden mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Peptiden durchgeführt. Die Peptide werden synthetisch in der Arbeitsgruppe Ulrich im PepSyLab unter der Leitung von Dr. Parvesh Wadhvani hergestellt [110, 145] hergestellt. Alle Peptide hatten einen Reinheitsgrad von > 95% (RP-HPLC) und wurden als lyophilisiertes Pulver gelagert.

Tab. 4.1: Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide. Zum Vergleich sind die unmarkierten Peptide ebenfalls dargestellt.

Peptid	Markierte Position	Sequenz
PGLa	--	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
3CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-3	GM- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -SKAGAIAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
6CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-6	GMASK- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -GAIAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
8CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-8	GMASKAG- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -IAGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
9CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ile-9	GMASKAGA- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -AGKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
10CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-10	GMASKAGAI- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -GKIAKVALKAL-NH <sub>2</sub>
13CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ile-13	GMASKAGAIAGK- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -AKVALKAL-NH <sub>2</sub>
14CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-14	GMASKAGAIAGKI- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -KVALKAL-NH <sub>2</sub>
16CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Val-16	GMASKAGAIAGKIAK- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -ALKAL-NH <sub>2</sub>

17CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-17	GMASKAGAIAGKIAKV- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -LKAL-NH <sub>2</sub>
18CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Leu-18	GMASKAGAIAGKIAKVA- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -KAL-NH <sub>2</sub>
20CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	Ala-20	GMASKAGAIAGKIAKVALK- <b>4CF<sub>3</sub>-Phg</b> -L-NH <sub>2</sub>
Gramicidin S	--	<i>cyclo</i> [Val-Orn-Leu- <sup>D</sup> Phe-Pro-Val-Orn-Leu- <sup>D</sup> Phe-Pro]
1/1' Gramicidin S	Val1/Val1'	<i>cyclo</i> [( <b>4-F-Phg</b> )-Orn-Leu- <sup>D</sup> Phe-Pro-( <b>4-F-Phg</b> )-Orn-Leu- <sup>D</sup> Phe-Pro]
3/3' Gramicidin S	Leu3/Leu3'	<i>cyclo</i> [Val-Orn-( <b>4-F-Phg</b> )- <sup>D</sup> Phe-Pro-Val-Orn-( <b>4-F-Phg</b> )- <sup>D</sup> Phe-Pro]

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Bakterienanzucht

Die Inkubation der Bakterien geschah bei 37°C und 220 rpm.

*Micrococcus luteus* wurde in Basalmedium (10 g Bacto Pepton (Trypton) und 5 g NaCl in 1 L doppelt-destilliertem Wasser, pH 7,5) angezogen. Eine Vorkultur (75 µl eines 30%igen Glycerolstocks inokkultiert in 10 ml) wurde nach ca. 12 Stunden Wachstum in 800 ml Basalmedium in 2 L Kolben umgeipft (OD<sub>550</sub> = 0,01). Nach 20-24 Stunden Wachstum wurden die Zellen geerntet (6000xg, 15 min, 4°C). Sie befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der späten exponentiellen Phase (OD<sub>550</sub> = 3-4). Anschließend wurden die Bakterien zweimal in 0,9% NaCl (0°C, ca. 600 ml) gewaschen und ein weiteres Mal in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5), welcher 10 mM EDTA und 30 mM MgCl<sub>2</sub> (=Verdaupuffer) enthielt. Anschließend wurde die Nassmasse der gewaschenen Bakterien ermittelt und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

*Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 und rmlC) wurden in Trypticase Soja Bouillon (TSB) angezogen. Zunächst wurde mit einer Impföse ein Verdünnungsstrich auf einer TSB-Agarplatte ausgestrichen und für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dieser Wachstumszeit wurden 12 ml TSB-Medium mit OD<sub>600</sub> = 0,2 angeimpft. Das Überimpfen in 500 ml TSB-Medium in 2 L Kolben erfolgte nach 5 Stunden (OD<sub>600</sub> = 0,02). Die Inkubation der Bakterien geschah jeweils bei 37°C und 220 rpm. Nach etwa 22 Stunden Wachstum wurden die Zellen geerntet (6000xg, 15 min, 4°C). Sie befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der späten

exponentiellen Phase ( $OD_{600} = 3-4$ ). Je nach Weiterverarbeitung wurde das zellfreie Medium gesammelt (für die Präparation der Membranvesikel), oder die Zellen entweder nacheinander mit doppelt-distilliertem Wasser, Ethanol und Aceton gewaschen (9000xg, 20 min, 4°C, für die LPS-Extraktionsmethoden 1) und 2) bzw. zweimal mit 0,9% NaCl (9000xg, 20 min, 4°C) und ein weiteres Mal mit doppelt-distilliertem Wasser (für die LPS-Extraktionsmethode 3). In beiden Fällen wurden die Zellen anschließend lyophilisiert.

#### 4.2.2 Präparation von Erythrozytenmembranen

Die Präparation der Erythrozytengerste wurde nach einem von M. Ieronimo modifizierten Protokoll [101] durchgeführt.

35 ml einer CPD-stabilisierten Erythrozyten-Suspension wurden zweimal in 10-fachem Überschuss eisgekühltem 172 mM Tris-Puffer (pH 7,6) gewaschen (600xg, 10 min, 4°C). Um anschließend die Zellen dichter zu packen, wurden sie ein weiteres Mal in 2-fachem Puffer-Überschuss in einem 50 ml Reagenzröhrchen gewaschen. Die Lyse der Erythrozyten geschah durch Aufnahme der gepackten Zellen (5 ml) in 30-fachem Überschuss an eisgekühltem 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6) (=Lysepuffer) mit anschließendem Schwenken (ca. 5 min auf Eis). Nach dem Lyseschritt wurden die Membranen viermal mit Lysepuffer gewaschen (20000xg, 70 min, 4°C) und anschließend die Ansätze vereinigt. Der vereinigte Ansatz wurde in Lysepuffer, welcher 0,01%  $NaN_3$  für die Sterilisation enthielt, aufgenommen. Der letzte Waschschrift wurde in einem 50 ml Reagenzröhrchen durchgeführt, um das Membranpellet zu verdichten. Es wurde in ca. 6 ml Lysepuffer + 0,01%  $NaN_3$  aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### 4.2.3 Präparation von *Micrococcus luteus* Membranvesikeln

Die Präparation der *Micrococcus luteus* ATCC 4698 Membranvesikel wurde nach einem von M. Ieronimo modifizierten Protokoll [101] durchgeführt.

Nach Ermittlung der Bakterien-Nassmasse wurde pro 200 mg Zellmasse 1 ml Verdauopuffer zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Lysozym (1 mg/ml), DNase I und RNase A (jeweils

10 µg/ml) wurden hinzugefügt und die Bakteriensuspension für 12-16 Stunden bei Raumtemperatur (RT) und konstantem, vorsichtigem Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Suspension in 19-fachem eisgekühltem 9 mM Tris-Puffer aufgenommen, vorsichtig geschwenkt (ca. 5 min auf Eis) und zentrifugiert (700xg, 30 min, 4°C), um nicht-lysierte Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment nochmals in eisgekühltem 9 mM Tris-Puffer aufgenommen, geschwenkt und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde nun verworfen und die vereinigten Überstände zentrifugiert (26000xg, 150 min, 4°C), um die darin enthaltenen Membranvesikel zu pelletieren. Anschließend wurden die Membranvesikel in einem Ansatz vereinigt, einmal in 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6) gewaschen und dann in 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6), welcher 0,01% NaN<sub>3</sub> enthielt, aufgenommen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe, und die sedimentierten Membranvesikel wurden mit ca. 6 ml 9 mM Tris-Puffer + 0,01% NaN<sub>3</sub> vorsichtig resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### **4.2.4 Präparation von *Pseudomonas aeruginosa* Membranvesikeln**

Die Präparation der *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und rmlC Membranvesikel (MVs) geschah mittels Ultrazentrifugation [64-66].

Nach dem Abzentrifugieren der Zellen und Sammeln des zellfreien Überstandes wurde dieser nacheinander zweimal durch eine 0,45µm und anschließend durch eine 0,22 µm große Zelluloseazetat-Membran filtriert, um alle restlichen Zellen zu entfernen. Die Membranvesikel wurden durch Ultrazentrifugation aus dem Überstand gewonnen (150.000xg, 90 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten MVs wurden nach Vereinigung zweimal mit eisgekühltem 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8) gewaschen (150.000xg, 90 min, 4°C). Anschließend wurde die Nassmasse bestimmt, und pro 200 mg MVs 1 ml Verdaufer (siehe Kapitel 4.2.3) DNase I und RNase A (jeweils 10 µg/ml) zugegeben und über Nacht bei RT und konstantem Schütteln inkubiert. Die verdauten MVs wurden dann dreimal in 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6) gewaschen (150.000xg, 90 min, 4°C), in 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6), welcher 0,01% NaN<sub>3</sub> enthielt, aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### 4.2.5 Lipid-Extraktion

Die Lipid-Extraktion wurde mittels Chloroform/Methanol durchgeführt [101, 146, 147].

100µl der zu extrahierenden Membransuspension (aus Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) wurde in 20-fachem Volumen  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2/1, v/v) aufgenommen. Das Homogenisieren geschah durch Homogenisieren (Vortexen und Sonifizieren). Um die Lipide weiter in die organische Phase zu drängen, wurden 400 µl 0,9% NaCl zugegeben und nochmals wiederholt homogenisiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT konnten die Phasen durch Zentrifugation getrennt werden (9000xg, 10 min, 4°C). Die untere organische Phase (meist 1100 µl–1200 µl), welche dem reinen Lipid-Extrakt entspricht, wurde für die Phosphat-Bestimmung weiterverwendet.

#### 4.2.6 Phosphat-Bestimmung

Die Bestimmung der Phospholipidmenge geschah durch quantitative Phosphatanalyse [101, 148, 149].

Aus dem Lipid-Extrakt wurden Aliquote entnommen (50 µl, 100 µl und 200 µl) und in Duran Glasröhrchen überführt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels unter  $\text{N}_2$ -Strom wurde zu jeder Probe 50 µl 10%  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  in EtOH zugeben und über der Flamme verascht. Durch diese Prozedur wurde anorganisches Phosphat freigesetzt. Pyrophosphat, welches sich durch die Veraschung ebenfalls gebildet hat, konnte durch Zugabe von 300 µl 1 M HCl und 20 Minuten im Wasserbad bei 95°C hydrolysiert werden. Die Glasröhrchen waren während der Inkubation im Wasserbad jeweils mit einer Glasmurmelt verschlossen. 700 µl einer frisch hergestellten Lösung aus Ascorbat (10%) und Ammoniummolybdat (0,42% in 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (im Verhältnis 1/6) wurde zu den abgekühlten Proben gegeben und für weitere 30 Minuten bei 40-45°C im Wasserbad inkubiert. Hierbei bildete sich ein blauer Farbkomplex, dessen Absorption bei 820 nm gegen Wasser gemessen werden konnte. Als Standard bediente man sich einer Verdünnungsreihe von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Wasser, die ebenfalls mit 700µl einer frisch hergestellten Lösung aus Ascorbat (10%) und Ammoniummolybdat (0,42% in 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (im Verhältnis 1/6) für 30 Minuten bei 40-45°C im Wasserbad inkubiert wurde.

#### 4.2.7 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Messungen wurden auf einem Bruker Avance NMR-Spektrometer bei einer Transmitter Frequenz von 470,6 MHz für  $^{19}\text{F}$  und 202,5 MHz für  $^{31}\text{P}$  durchgeführt.

Für die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen wurde ein H/FX Flachspulen Probenkopf mit Goniometer für verschiedene Ausrichtungen der Proben verwendet. Die Messungen der orientierten Proben erfolgten mit der Membrannormalen entweder parallel oder senkrecht zu  $B_0$ .  $^{31}\text{P}$ -Spektren wurden üblicherweise bei 35°C mit einer  $^1\text{H}$  entkoppelten Hahn-Echo Pulssequenz mit einer 90° Pulslänge von 6  $\mu\text{s}$ , einer Relaxationszeit von 2 s und einer Echoverzögerung von 30  $\mu\text{s}$  aufgenommen. Orientierte Proben wurden mit 512 scans bzw. 1024 scans gemessen. MLVs wurden jeweils mit 2048 scans gemessen. Die Referenzierung erfolgte extern mit 85%iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Lösung, die bei 35°C gemessen und auf 0 ppm gesetzt wurde.

Für die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messungen wurde ein  $^{19}\text{F}/^1\text{H}$  Flachspulen Probenkopf, ausgestattet mit Goniometer für die horizontale und vertikale Ausrichtung der Proben, verwendet. Die Messungen der orientierten Proben erfolgten mit der Membrannormalen entweder parallel oder senkrecht zu  $B_0$ . Einzel-Puls  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren mit  $^1\text{H}$ -Entkopplung wurden üblicherweise mit 3000 bis 18000 scans, je nach Peptidmengen in den Proben, aufgenommen.

Für die Relaxationsmessungen wurden  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren mit einem inversion recovery Pulsprogramm und unterschiedlichen Verzögerungszeiten (delay-times) im Bereich von 0,1 Millisekunden bis 10 Sekunden zur Ermittlung der  $T_1$ -Relaxationszeiten aufgenommen. Zur Ermittlung der  $T_2$ -Relaxationszeiten wurden Verzögerungszeiten im Bereich von 2 Mikrosekunden bis 10 Millisekunden aufgenommen. Die Messungen erfolgten entweder mit der Membrannormalen parallel zum Magnetfeld oder mit einem Neigungswinkel von etwa 54,7°, hierbei ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung, und mit jeweils 1000 scans.

Die Referenzierung erfolgte extern mit einer wässrigen 100 mM NaF-Lösung, die bei 35°C gemessen und auf -119,5 ppm gesetzt wurde [150].

#### 4.2.8 Herstellung von Modellmembranproben für die Festkörper-NMR

Multilamellare Vesikel aus synthetischen Phospholipiden wurden modifiziert nach [101] hergestellt. Die benötigten Mengen an Lipid und Peptid wurden in 500  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1/2

(v/v)) aufgenommen, unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und über Nacht ins Vakuum gestellt. Doppeltdestilliertes Wasser wurde zugegeben, um 60% Wasserinhalt (v/w) zu erhalten. Nach vortexen und 10 Einfrier- und Auftauzyklen wurde die Suspension in Polyethylenfolie eingeschweißt. Die Lagerung bis zur Messung erfolgte bei -20°C.

Makroskopisch orientierte Doppelschichten aus synthetischen Phospholipiden wurden ebenfalls modifiziert nach [101] hergestellt. Die benötigten Mengen an Lipid und Peptid wurden in 400-700 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1/2 (v/v)) aufgenommen, und zu je etwa 1 mg Ausgangsmaterial auf Glasplättchen aufgetropft. Diese trockneten ca. 1 Stunde an der Luft und über Nacht im Vakuum. Anschließend wurden die Glasplättchen gestapelt, mit einem weiteren, leeren Glasplättchen bedeckt und für 24 Stunden bei 96% relativer Luftfeuchte (übersättigte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung) und 48°C hydratisiert. Um den Verlust von Feuchtigkeit nach dem Hydratisierungsvorgang zu vermeiden, wurden die gestapelten Glasplättchen mit Parafilm und einer Polyethylenfolie umwickelt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung multilamellarer Vesikel (MLVs) mit gekauftem s-LPS wurde die entsprechende Menge pures s-LPS oder mit Detergens/Lipid in doppeltdestilliertem Wasser aufgenommen (5 mg/ml), homogenisiert und in Polyethylenfolie eingeschweißt.

Pures s-LPS oder mit entsprechender Menge an Lipiden wurde für die Herstellung orientierter Proben in MeOH aufgenommen, gevortext und über Nacht bei 50°C inkubiert. Orientierte Proben mit entsprechender Menge Peptid wurden ebenfalls in MeOH gelöst, gevortext und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sonifiziert und auf Glasplättchen aufgetropft (18 mm x 7,5 mm x 0,08 mm).

Die Herstellung von MLVs mit gekauftem r-LPS sowie die extrahierten LPS-Moleküle aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und rmlC geschah nach [151]. Synthetische Phospholipide und LPS wurden in einem molaren Verhältnis von 10/1 in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2 (v/v)) aufgenommen (5 mg/ml), zuerst unter N<sub>2</sub>-Strom und dann über Nacht im Vakuum getrocknet. Der entstandene Lipidfilm wurde am nächsten Tag mit doppeltdestilliertem Wasser bis zu einer Endkonzentration von 50 mM der Lipide hydratisiert und gevortext. Nach 10 Einfrier- und Auftauzyklen wurde die Suspension in Polyethylenfolie eingeschweißt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung orientierter Proben mit gekauftem r-LPS oder den extrahierten LPS-Molekülen aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und rmlC und Lipiden wurden diese in entsprechender Menge in doppelt-destilliertem Wasser gelöst, homogenisiert und zu 1 mg Ausgangsmaterial auf Glasplättchen verteilt (18 mm x 7,5 mm x 0,08 mm).

#### **4.2.9 Herstellung unorientierter Biomembranen für die Festkörper-NMR**

Für die Herstellung von Membransuspensionsproben aus Erythrozytenmembranen oder *M. luteus* Membranvesikeln wurde die entsprechende Menge an Peptid (ca. 0,3 mg) in 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6), welcher 0,01% NaN<sub>3</sub> enthielt (1-2 ml), aufgenommen. Die Peptid-Lösung wurde gut homogenisiert und zusammen mit der entsprechenden Menge an Membransuspension (aus Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) (ca. 2-4 ml) für 14-16 Stunden bei RT unter moderatem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in ein Polyallomer-Zentrifugationsröhrchen überführt, mit 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6) + 0,01% NaN<sub>3</sub> aufgefüllt, hitzeversiegelt und zentrifugiert (36.000xg, 19-21 h, 4°C). Mit einem Spatel wurde das Membranpellet in ein kleines Plastiktütchen aus Polyethylen überführt und dieses verschweißt, welches anschließend in ein zweites Plastiktütchen eingeschweißt wurde. Die Lagerung bis zur Messung erfolgte bei -20°C. Die Herstellung der Membransuspensionsproben von *P. aeruginosa* geschah nach dem gleichen Prinzip, nur ohne Peptidinkubation.

#### **4.2.10 Herstellung orientierter Biomembranen für die Festkörper-NMR**

Für die Herstellung von orientierten Proben aus Erythrozytenmembranen oder *M. luteus* Membranvesikeln wurde die Membransuspension (aus Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) zunächst mit 10-fachem Überschuss an doppelt-destilliertem Wasser, welches 0,005% NaN<sub>3</sub> enthielt, gewaschen (18.000xg, 90 min, 4°C). Dies geschah, um Salze, die den anschließenden Trocknungsvorgang verzögern würden, zu entfernen. Die entsprechende Menge an Peptid (ca. 0,3 mg) wurde in ca. 40 µl doppelt-destilliertem Wasser aufgenommen, homogenisiert und zusammen mit der entsprechenden Menge an Membransuspension (ca. 2-4 ml) für 14-16 Stunden bei RT unter moderatem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Aliquote (jeweils ca. 150 µl) auf maximal

17 dünne Glasplättchen verteilt (18 mm x 7,5 mm x 0,08 mm), welche vorher in Methanol gewaschen und für zwei Stunden unter Vakuum getrocknet worden sind. Nach 2-4-tägigem Trocknungsvorgang über Silica Gel wurden die Glasplättchen gestapelt, mit einem weiteren, leeren Glasplättchen bedeckt und für 36-40 Stunden bei 96% relativer Luftfeuchte (übersättigte K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung) und 48°C hydratisiert. Um den Verlust von Feuchtigkeit nach dem Hydratisierungsvorgang zu vermeiden, wurden die gestapelten Glasplättchen mit Parafilm und einer Polyethylenfolie umwickelt und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

#### 4.2.11 Lipopolysaccharid-Extraktion

Die Lipopolysaccharid (LPS)-Extraktion geschah aus den Bakterienzellen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Wildtyp, *smooth* (s) LPS) und rmlC (Mutante, *rough* (r) LPS). Während der Anfertigung der Doktorarbeit wurden verschiedene Methoden der Isolierung getestet, die im Ergebnis- sowie Diskussionsteil besprochen werden.

Modifizierte Extraktionsmethode 1 nach [152-154]. Diese Methode verwendet Phenol.

Alle Mengenangaben beziehen sich auf das Gewicht der lyophilisierten Bakterienzellen (IB). Diese wurden gewogen und mit 20 ml/g IB in doppelt-destilliertem Wasser, welches auf 65-68°C erwärmt war, resuspendiert. Unter Rühren wurden 20 ml/g IB 90% Phenol, welches ebenfalls auf 65-68°C erwärmt war, zugegeben. Diese Mischung wurde für weitere 30 Minuten bei 65°C gerührt und nach Abkühlen im Eis zentrifugiert (2000xg, 45 min, 4°C). Die obere, s-LPS enthaltene Wasserphase wurde abgenommen, nochmals 20 ml/g IB doppelt-destilliertes Wasser, welches auf 65-68°C erwärmt war, zugegeben und für weitere 10 Minuten gerührt. Es erfolgten die Abkühlung im Eis, ein zweiter Zentrifugationsschritt und die Vereinigung der beiden oberen Wasserphasen. Diese wurden für 3-5 Tage gegen doppelt-destilliertes Wasser dialysiert (Dialyseschlauch mit einem cut-off von 1000 Da, um Phenol zu entfernen), und das Dialysat, eine leicht opaleszente aussehende Flüssigkeit, wurde auf etwa 6 ml/g IB mit reduziertem Druck bei 35-40°C eingengt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (2000xg, 15 min, 4°C) diente der Entfernung unlöslicher Bestandteile. Der Überstand wurde lyophilisiert und das Pulver in doppelt-destilliertem Wasser aufgenommen, so dass eine 3%ige Suspension entstand. Die Suspension wurde zentrifugiert (80.000xg, 8 h, 4°C), das Pellet (s-LPS) in doppelt-destilliertem

Wasser aufgenommen und nochmals gewaschen (105.000xg, 3 h, 4°C). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde s-LPS in doppelt-destilliertem Wasser resuspendiert und lyophilisiert.

Modifizierte Extraktionsmethode 2 nach [155-157]. Die Extraktionslösung besteht aus wässrigem Phenol, Chloroform und Petrolether (2/5/8).

Alle Mengenangaben beziehen sich auf das Gewicht der lyophilisierten Bakterienzellen (IB). Die IB wurden gewogen und mit 4 ml/g IB in Extraktionslösung resuspendiert. Die Suspension wurde mit Hilfe von Ultraschall (2x2 min, 60% Leistung) und permanenter Kühlung auf Eis homogenisiert. War die Zellsuspension gut homogenisiert, wurde sie noch für einige Minuten gerührt, wobei die Kühlung nicht unterbrochen wurde. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 15 min, 4°C), der Zelltrümmer abtrennte. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nochmals in der gleichen Menge an Extraktionslösung aufgenommen. Die Prozedur von Ultraschall, Rühren und Zentrifugieren wurde wiederholt, die beiden Überstände vereinigt und durch ein Filterpapier in einen Rundkolben gefiltert. Der in dem leicht gelblich/bräunlich aussehenden Überstand enthaltene Petrolether sowie das Chloroform wurden durch einen Rotationsevaporator bei 30-40°C entfernt. Kam es hierbei zum Auskristallisieren von Phenol, wurde etwas Wasser zugegeben. Nach Entfernen von Petrolether und Chloroform wurde die Lösung in ein Zentrifugationsgefäß überführt und tropfenweise doppelt-destilliertes Wasser zugegeben. Hierbei kam es zum Präzipitieren von r-LPS, und die Wasserzugabe wurde gestoppt, wenn nach 1-2 Minuten stehen lassen r-LPS anfang zu sedimentieren. Die vollständige Sedimentation wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt erreicht (3000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurde das Präzipitat viermal mit 80% Phenol und anschließend, um das Phenol wieder zu entfernen, weitere viermal mit Diethylether gewaschen (3000xg, 10 min, 4°C). Das gewaschene Pellet wurde lyophilisiert und in 1 ml/mg IB doppelt-destilliertes Wasser aufgenommen, auf etwa 45°C erwärmt und zur Entgasung vorsichtig Vakuum angelegt. Nach der Entgasung wurde die Suspension gevortext, und eventuell auftretende Viskosität homogenisiert. Es folgte noch ein weiterer Zentrifugationsschritt (100.000xg, 4 h, 4°C), und sedimentiertes r-LPS in doppelt-destilliertem Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Modifizierte Extraktionsmethode 3 nach [158].

Alle Mengenangaben beziehen sich auf das Gewicht der lyophilisierten Bakterienzellen (IB). Die IB wurden gewogen und mit 0,03 ml/mg IB in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/ml pankreatische DNase I und 25 µg/ml pankreatische RNase A resuspendiert. Das Zellysate wurde mit Hilfe von Ultraschall (mehrmals 2x 3sec, 75% Leistung) aufgeschlossen. Dabei erfolgte eine permanente Kühlung mit Eis, um die beim Ultraschall entstehende Wärme abzuleiten. Der Zellaufschluss wurde durch mikroskopieren überprüft. Die klare Lösung wurde nach weiterer Zugabe von DNase I (bis zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml) und RNase A (bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml) für zwei Stunden bei 37°C und moderatem Schütteln inkubiert, um einen effizienten Nukleinsäure-Verdau zu gewährleisten. Nach der Inkubationszeit wurden 0,01 ml/mg IB 0,5 M EDTA gelöst in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0), dann 5 µl/mg IB 20% SDS gelöst in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0), und dann 5 µl/mg IB 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) zugegeben. Das Endvolumen der Lösung lag hier bei 0,05 ml/mg IB und enthielt 0,1 M EDTA, 2% SDS und 10 mM Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 9,5. Um sicherzustellen, dass sich alle Komponenten gelöst haben, wurde die Lösung sorgfältig gevortext und anschließend zentrifugiert (50.000xg, 30 min, 20°C). Hierdurch wurden Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, mit Pronase bis zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml versetzt und über Nacht bei 37°C und moderatem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung nochmals zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, RT), um mögliche Präzipitate zu entfernen, der klare Überstand abgenommen und mit zwei Volumen an 0,375 M MgCl<sub>2</sub> in 95% EtOH versetzt. Die Mischung wurde auf 0°C abgekühlt, und nach Erreichen der Temperatur (meist nach ~ 30min) zentrifugiert (12.000xg, 15 min, 4°C). Das Pellet, welches durchgehend auf Eis gelagert wurde, wurde in 0,05 ml/mg IB 2% SDS, 0,1 M EDTA gelöst in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und einer Ultraschallbehandlung (6x30sec, 75% Leistung, auf Eis) unterzogen. Der pH-Wert der klaren Lösung wurde, wenn nötig, auf 9,5 mit Hilfe von 2 M NaOH eingestellt. Nach der Ultraschallbehandlung wurde die Suspension für 30 min bei 85°C inkubiert, anschließend nochmals Pronase mit einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben und bei 37°C und moderatem Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Lipopolysaccharide durch die Zugabe von zwei Volumen 0,375 M MgCl<sub>2</sub> in 95% EtOH bei 0°C präzipitiert. Wenn der Überstand noch Trübung zeigte, wurde ein weiteres Volumen 0,375 M MgCl<sub>2</sub> in 95% EtOH zugegeben und anschließend zentrifugiert (12.000xg, 15 min, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde in 0,03 ml/mg IB 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgenommen, einer

weiteren Ultraschallbehandlung (6x30sec, 75% Leistung, auf Eis) unterzogen und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), um eventuell auftretende unlösliche  $Mg^{2+}$ -EDTA Komplexe zu entfernen. Bei der Extraktion aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kann weiter gearbeitet werden, für rmlC wird das Pellet nochmals in 0,03 ml/mg IB 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich nun die LPS-Moleküle befanden, wurde in Anwesenheit von 25 mM  $MgCl_2$  zentrifugiert (200.000xg, 2h, RT). Das nun pelletierte LPS wurden in doppelt-distilliertem Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

#### **4.2.12 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (KDO)- Bestimmung**

Die Bestimmung von *2-Keto-3-Desoxy-Octonat* (KDO) geschah modifiziert nach [159, 160]. Die zu untersuchende Substanz muss pulverartig vorliegen.

Zu 2 mg LPS-haltigen Materials wurden 1 ml 0,2 N  $H_2SO_4$  gegeben, für 40 Minuten bei 100°C erhitzt und nach abkühlen zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, RT). 0,5 ml des klaren Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,25 ml 0,04 M  $H_5IO_6$  in 0,125 N  $H_2SO_4$  versetzt. Nach vortexen und 20-minütiger Inkubation bei RT wurden 0,25 ml 2,6%  $NaAsO_2$  in 0,5 N HCl (w/v) zugegeben und erneut gevortext. 0,5 ml frisch hergestellte 0,6%ige TBA-Lösung (w/v) wurde nach Verschwinden der aufgetretenen Braunfärbung hinzu gegeben, die Probe nochmals gevortext und für 15 Minuten bei 100°C erhitzt. Zu der noch heißen Probe wurde nun 1 ml DMSO gegeben, auf RT abkühlen gelassen und bei  $OD_{548}$  gegen eine LPS-freie Probe (= Kontrolle) gemessen. Als Standard bediente man sich einer Verdünnungsreihe von reinem KDO in 0,2 N  $H_2SO_4$ .

#### **4.2.13 DSC-Spektroskopie**

Für die Probenvorbereitung der in Kapitel 2.4.3 vorgestellten Methode der DSC-Spektroskopie wurde für die aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und rmlC extrahierten LPS-Moleküle das gleiche Protokoll wie zur Herstellung von LPS-haltigen Membranmodellen für die Festkörper-NMR verwendet, um Ergebnisse zu erlangen, denen die gleiche Probenvorbereitung zu Grunde

lag [151]. Die Proben enthielten LPS-Moleküle entweder pur, mit Lipid oder mit Peptid gemischt.

Die Messungen erfolgten gegen entgastetes Wasser als Referenz und in einem Temperaturbereich von 5 bis 80°C. Hierbei wurden die Proben jeweils viermal aufgeheizt und viermal abgekühlt. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde jeweils 30 Minuten gewartet, um ein korrektes Einstellen der jeweiligen Ausgangstemperatur zu gewährleisten. Das Messen geschah mit konstantem Druck und einer Temperaturänderungsrate von 20°C/Stunde.

#### 4.2.14 CD-Spektroskopie

Für die Probenvorbereitung der in Kapitel 2.4.1 vorgestellten Methode der CD-Spektroskopie wurden die kommerziellen sLPS-Moleküle pur und mit Lipiden in entsprechender Menge in doppelt-destilliertem Wasser aufgenommen und homogenisiert.

Die Probenherstellung mit den aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und rmlC extrahierten LPS-Molekülen geschah mit dem gleichen Protokoll wie zur Herstellung von LPS-haltigen Membranmodellen für die Festkörper-NMR, um Ergebnisse zu erlangen, denen die gleiche Probenvorbereitung zu Grunde lag [151].

Die Peptide wurden ebenfalls in doppelt-destilliertem Wasser aufgenommen und die Lipid- bzw. LPS/Lipidmischung vor jeder Messung frisch mit entsprechendem Peptid gemischt. Für die Messungen wurden die Proben jeweils soweit mit H<sub>2</sub>O verdünnt, dass die Absorption der Referenzspektren gering war.

Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer, wofür ca. 200 µl Probe in eine 1 mm Quarzglas-Küvette gegeben wurde. Das CD-Spektrum wurde zwischen 180-260 nm aufgenommen, wobei ein Referenzspektrum ohne Protein zuvor gemessen und anschließend vom Probenspektrum abgezogen wurde. Folgende Parameter wurden verwendet:

Empfindlichkeit: Standardmessbereich 0–100 mdeg; Wellenlängen-Messbereich: 180–260 nm; Messgeschwindigkeit: 10 nm/min; kontinuierlicher Mess-Modus; Response-Zeit Detektor: 8 bzw. 4 sec.; Abstand Datenpunkte: 0,1 nm; Spektrale Bandbreite: 1 nm und 3 Spektren-Mittelung. Die Messungen erfolgten bei 25°C, die Messungen mit extrahiertem LPS aus *P. aeruginosa* wurden bei 37°C durchgeführt. Nach erfolgter Messung wurde eine Basislinien-

Korrektur der Spektren durchgeführt, so dass sich bei 260 nm ein Elliptizitätswert von Null ergab.

#### 4.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

Zur Darstellung der LPS-Moleküle sowie zur Überprüfung des Proteingehalts der isolierten Membranvesikel bzw. der extrahierten LPS-Moleküle, jeweils aus *P. aeruginosa*-Stämmen, wurde ein 15%iges Polyacrylamidgel hergestellt (Tab.4.2)

Tab. 4.2: Tabellarische Zusammensetzung eines 15%igen Polyacrylamidgels.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Glycerol 50%	1,9 ml	--
Doppelt-destilliertes Wasser	--	1,2 ml
Puffer A	0,63 ml	
Puffer B	--	0,5 ml
30% Acrylamid	2,5 ml	0,33 ml
SDS 20%	32 $\mu$ l	--
TEMED	3 $\mu$ l	2 $\mu$ l
APS 20%	32 $\mu$ l	16 $\mu$ l

Möglichst rasch nach Zugabe von TEMED und APS wurde das Trenngel zur Herstellung des Gels zwischen zwei Glasplatten in einer Gießvorrichtung gegossen und mit doppelt-destilliertem Wasser überschichtet. Dies geschah, um eine Störung der Polymerisation durch Luftsauerstoff zu vermeiden. Nach ca. 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert, das Wasser konnte entfernt und das Sammelgel mit eingesetztem Kamm als Platzhalter für die Probestaschen gegossen werden. Zwischenzeitlich wurden die Proben mit Probenpuffer (62 mM Tris-HCl (pH 6,9), 10% (w/v) SDS, 1% DTT, 20% (v/v) Glycerin und 0,01% Bromphenolblau [161] 1/1 (v/v)) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde mittels einer Minigel-Elektrophoreseapparatur durchgeführt, deren Kammern mit einfachem Glycin-Laufpuffer (0,313% Tris-Base, 1,44% Glycin (v/v), 0,1% SDS (w/v)) befüllt wurden. Das Gel lief bei einer konstanten Stromstärke von ca. 16 mA, was einer Anfangsspannung von ca. 200 V entsprach. Nach etwa 1-1,5 Stunden erreichte die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels und die Auftrennung wurde gestoppt.

Puffer A (1,5 M, pH 8,8):	90,85 g Tris auf 500 ml mit doppelt-destilliertem Wasser auffüllen und mit HCl pH-Wert einstellen
Puffer B (1 M, pH 6,8):	60,57 g Tris auf 500ml mit doppelt-destilliertem Wasser auffüllen und mit HCl pH-Wert einstellen
30% Acrylamid:	4K-Lösung, Mix 37,5:1
SDS (20%):	20 mg auf 100 ml mit doppelt-destilliertem Wasser auffüllen
Ammoniumpersulfat-Lösung (20%):	200 mg Ammoniumpersulfat auf 1 ml mit doppelt-destilliertem Wasser auffüllen

#### 4.2.16 Coomassie- und Silberfärbung

Die Proteinmenge wurde mittels Coomassie-Blau detektiert, die Methode der Silberfärbung eignet sich auch für die Detektion von LPS-Molekülen [161, 162].

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel zuerst für 10 Minuten bei RT in Fixierlösung inkubiert (50% Ethanol, 10% Essigsäure), anschließend für etwa 30 Minuten bei RT in Coomassie-Färbelösung angefärbt (0,1% Coomassie R250, 45% Ethanol, 10% Essigsäure) und mit Entfärbelösung so lange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren (25% Ethanol, 5% Essigsäure).

Für die anschließende Silberfärbung nach [163] wurde das über Nacht entfärbte Gel zunächst für ca. 2 Stunden in 50% Ethanol inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einer Mischung aus 35 ml Lösung A (25g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 500 ml doppelt-destilliertem Wasser) und 65 ml Lösung B (1,0 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1,0 g AgNO<sub>3</sub>, 5,0 g Wolframatokieselsäure, 7,0 ml Formaldehyd-Lösung (37%) in

500 ml in doppelt-destilliertem Wasser) inkubiert. Diese Mischung wurde jedes Mal frisch angesetzt und die Suspension rasch über das zu inkubierende Gel gegeben. Unter Schwenken setzte nach etwa 5-10 Minuten die Färbung ein und wurde durch Entfernen der Silberfärbelösung und Hinzugabe von Essigsäure (1%) gestoppt.

Zur anschließenden Dokumentation wurde das Gel entweder fotografiert oder eingescannt und das Bild digital gespeichert.

#### **4.2.17 Agarosegel-Elektrophorese**

1 g Agarose wurden in 100 ml 1x TAE-Puffer (50x TAE-Puffer: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung in 1 L doppelt-destilliertem Wasser) in einer Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung aufgeköcht. Nach kurzer Abkühlungszeit wurden 5 µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg Ethidiumbromid in 1 ml doppelt-destilliertem Wasser) hinzu gegeben und die Lösung in einen Gießstand mit entsprechend eingerichteten Probenkamm gegossen. Nachdem das Gel vollständig erstarrt war, wurden die mit Probenpuffer versehenen Proben in die durch den Kamm entstandenen Vertiefungen pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Detektion der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht auf das Ethidiumbromidsignal.

Zur anschließenden Dokumentation wurde das Gel entweder fotografiert oder eingescannt und das Bild digital gespeichert.

#### **4.2.18 DNA-Bestimmung mittels NanoDrop™**

Die Messungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die zu messende Probe wurde das Spektrophotometer zunächst mit dem Lösungsmittel (Wasser, Puffer etc.) ohne Substanz kalibriert. Nach Auftropfen der zu untersuchenden Probe auf das Piedestal (etwa 0,5 µl) wurde der Arm nach unten geklappt. Dabei entstand eine Flüssigkeitssäule, die auf etwa 0,05-1 mm Länge zusammengestaucht wurde, und die Messung konnte erfolgen. Anschließend wurde die Probe abgewischt und das Piedestal mit etwas Wasser gereinigt [<http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>].



Abb. 4.1: Abgebildet ist der NanoDrop 2000 von Thermo Fischer Scientific. [<http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>].

#### 4.2.19 Massenspektrometrie

Die Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) wird in einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (2/1, v/v) und 0,1% TFA (v/v) aufgelöst, wobei durch Überschuss der Matrix eine gesättigte Lösung entstand. Der Überstand wurde zu den lyophilisierten LPS-Molekülen gegeben, gemischt und bei 5000 rpm kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Für die Messungen wurden 0,7  $\mu$ l auf einen Metallträger aufgetropft, auskristallisieren gelassen und mit einem MALDI-TOF-Gerät von Bruker Daltonics gemessen. Der Messbereich lag zwischen 0,7-10 kDa und die Detektion erfolgte im linearen und reflektierten Modus.

Die massenspektroskopischen Untersuchungen der verwendeten LPS- Moleküle wurden freundlicherweise von Dr. Sergiy Afonin durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

---

### 5.1 Membranvesikel-Präparation von *Pseudomonas aeruginosa*

Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien besteht zu etwa 40% aus LPS. Bei diesem Molekül handelt es sich um den ersten Angriffspunkt für verschiedene Fremdstoffe inklusive AMPs, deren Interaktionen miteinander sind aber in den meisten Fällen noch wenig verstanden. Für deren direkte Aufklärung gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten. Zum einen Untersuchungen an LPS-haltigen Membranmodellen, zum anderen natürliche Biomembranen. Hier soll eine dieser Möglichkeiten, die Präparation von Biomembranen als Membranvesikel, vorgestellt werden. Sie sind recht einfach zu gewinnen und können somit zur strukturellen Untersuchung von antimikrobiellen Peptiden mittels biophysikalischer Methoden, z.B. Festkörper-NMR-Spektroskopie, eingesetzt werden [37, 44-48].

Wie in Kapitel 2.1.2.2 beschrieben, handelt es sich bei Membranvesikeln um natürliche Produkte von Gram-negativen Bakterien und werden von diesen in die sie umgebende Matrix abgegeben [64-66]. Für die Gewinnung solcher Vesikel wurden in dieser Arbeit der Stamm *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) PAO1 (Wildtyp, besitzt s-LPS) und rmlC (Mutante, besitzt r-LPS) verwendet. Die Wahl fiel auf diese Bakterien, da somit verschiedene Membranvesikel gewonnen werden konnten, welche entsprechend entweder s-LPS oder r-LPS enthalten. Außerdem handelt es sich um einen klinisch relevanten Keim [58, 59]. Abbildung. 5.1 zeigt mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zellen, deren Anzucht sowie die Gewinnung der Membranvesikel unter 4.2.1 und 4.2.4 beschrieben sind. Die Bakterien wurden in Trypticase Soja Bouillon (TSB) kultiviert, und in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

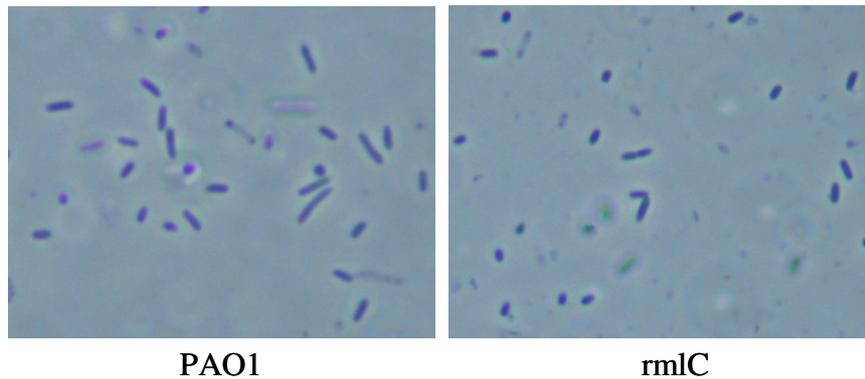


Abb. 5.1: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zellen *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Lichtmikroskop der mit TSB-Medium 10-fach verdünnten Zellsuspension vor der Zellernte.

Die Präparation der Membranvesikel erfolgte von planktonisch kultivierten Bakterien. Als erster Schritt wurden die Vesikel entsprechend [64] mittels Ultrazentrifugation aus dem zellfreien Überstand als Pellet gewonnen. Das Aussehen der gewonnenen Membranvesikeln von *P. aeruginosa* PAO1 war durchsichtig gelartig, was durch die sich ausbildende Wasserhülle der stark hydrophilen LPS-Moleküle bewirkt wird. Für *P. aeruginosa* rmlC konnte ein schwarzes, mehr „krümeliges“ Pellet beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass die Membranvesikel unter anderem Nukleinsäuren (NA) enthalten [66]. Daher wurden die extrahierten Vesikel mit DNase I und RNase A behandelt, wodurch die NA abgebaut und durch weitere Zentrifugationsschritte entfernt werden sollten. Die negativ geladenen NA stellen einen störenden Faktor dar, da sie sowohl mit den kationischen AMPs interferieren können als auch nicht erwünschte Hintergrundsignale bei der  $^{31}\text{P}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie zeigen.

Anschließend erfolgte eine Charakterisierung der Membranvesikel in Hinblick auf noch enthaltene NA nach dem Verdau, Proteine und LPS. Abbildung 5.2 zeigt eine elektrophoretische Analyse der Membranvesikel von *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC. Wie zu erkennen ist, konnten sowohl vor als auch nach dem Verdau NA in den Membranvesikeln detektiert werden.

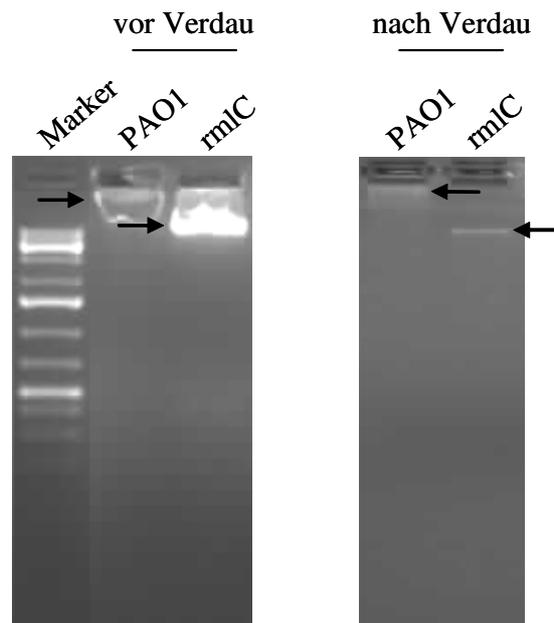


Abb. 5.2: Repräsentatives Agarosegel der Membranvesikel-Präparation von *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC. Vorhandene NA, sowohl vor als auch nach dem Verdau, sind durch Pfeile angezeigt.

Anschließend wurden die Membranvesikel-Präparate qualitativ auf ihren Protein- und LPS-Gehalt untersucht. Hierfür wurde ein Gel für die SDS-PAGE gegossen und das jeweilige Pellet in Probenpuffer (Vorbereitung siehe Kapitel 4.2.15) darauf aufgetragen. Abbildung 5.3 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE. Dieses wurde zuerst mit Coomassie angefärbt, wodurch es möglich war, die in den Membranvesikeln vorhandenen Proteine nachzuweisen. Mittels der anschließenden Silberfärbung konnten die enthaltenen LPS-Moleküle detektiert werden. Käuflich erworbene s-LPS und r-LPS Moleküle wurden ebenfalls angefärbt und dienten als Referenz.

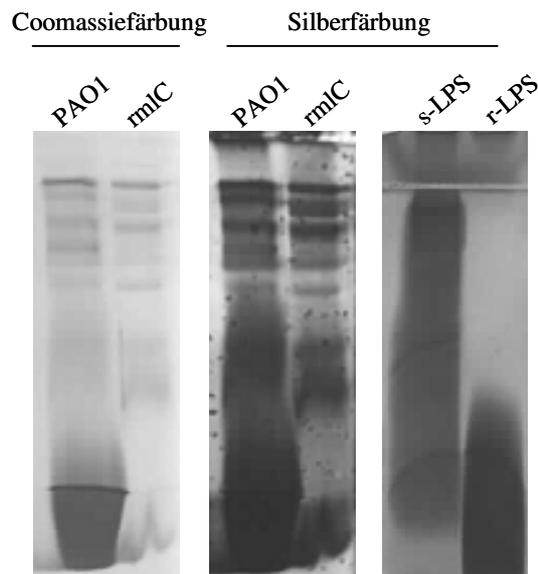


Abb. 5.3: Repräsentatives SDS-PAGE Gel der Membranvesikel-Präparate aus *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC. Das jeweilige Pellet wurde in Probenpuffer aufgenommen, auf das Gel aufgetragen und anschließend unterschiedlich eingefärbt. Nachweis auf Proteine (links), enthaltene LPS-Moleküle (Mitte) und käuflich erworbenes s-LPS und r-LPS als Vergleich (rechts).

Als nächstes wurden Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR spektroskopische Untersuchungen durchgeführt, um den Phosphatgehalt der Membranvesikel zu charakterisieren. Für die Messung unorientierter Membransuspensionen wurden die extrahierten Membranvesikel für 17 Stunden bei 55000 rpm zentrifugiert, und das Pellet in Polyethylen eingeschweißt (siehe Kapitel 5.2.8). Abbildung 5.4 zeigt die für PAO1 und rmlC aufgenommenen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren bei 35°C. Breite Signale über einen Bereich von 200 ppm zeigen, dass Phosphatgruppen vorhanden sind, deren Gehalt aber in den Membranvesikeln von PAO1 höher ist als bei rmlC. Die erkennbare Linienform zeigt keine lamellaren Doppelschichten und ist dominiert von einem isotropen Signal, welches die Anwesenheit von hoch mobilen Phosphatmolekülen anzeigt.

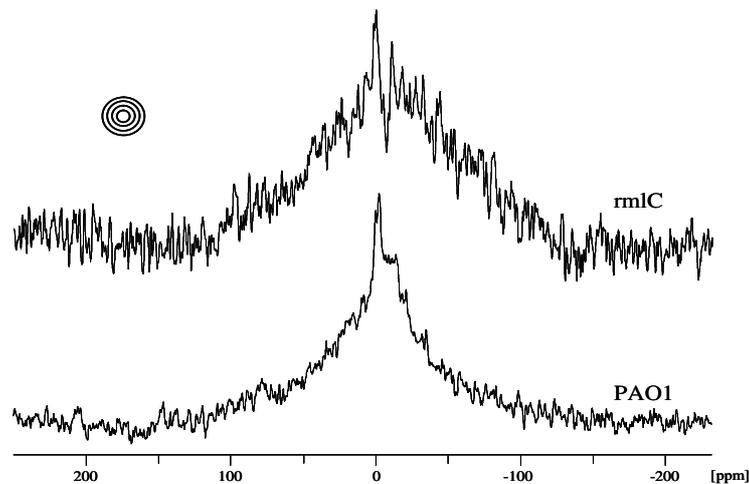


Abb. 5.4: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der Membranvesikel-Präparation von *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC.

## 5.2 Charakterisierung von Lipopolysaccharid (LPS)-haltigen Membranmodellen (kommerzielles LPS)

Parallel zur Präparation der LPS-haltigen Membranvesikel aus *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC für die Festkörper-NMR-Spektroskopie wurden LPS-haltige Membranmodellen mit käuflich erworbenen LPS-Molekülen hergestellt. Hierbei handelte es sich um s-LPS aus *Escherichia coli* O55:B5 und r-LPS aus *Salmonella typhimurium* SL1181. Zuerst sollte die molekulare Masse der LPS-Moleküle mittels MALDI-TOF-Spektroskopie bestimmt werden. Da es sich hierbei um sehr heterogene Stoffgemische handelt, konnte die molekulare Masse nicht eindeutig definiert werden (Abb. 5.5). Für s-LPS wurde die ungefähre Masse von 5,5 kDa und für r-LPS die ungefähre Masse von 3,0 kDa ermittelt. Bei der Herstellung der Proben wurde daher aufgrund dieser Ungenauigkeiten für die  $^{31}\text{P}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Untersuchungen statt der üblichen Konzentration zum Teil die tatsächliche Einwaage angegeben.

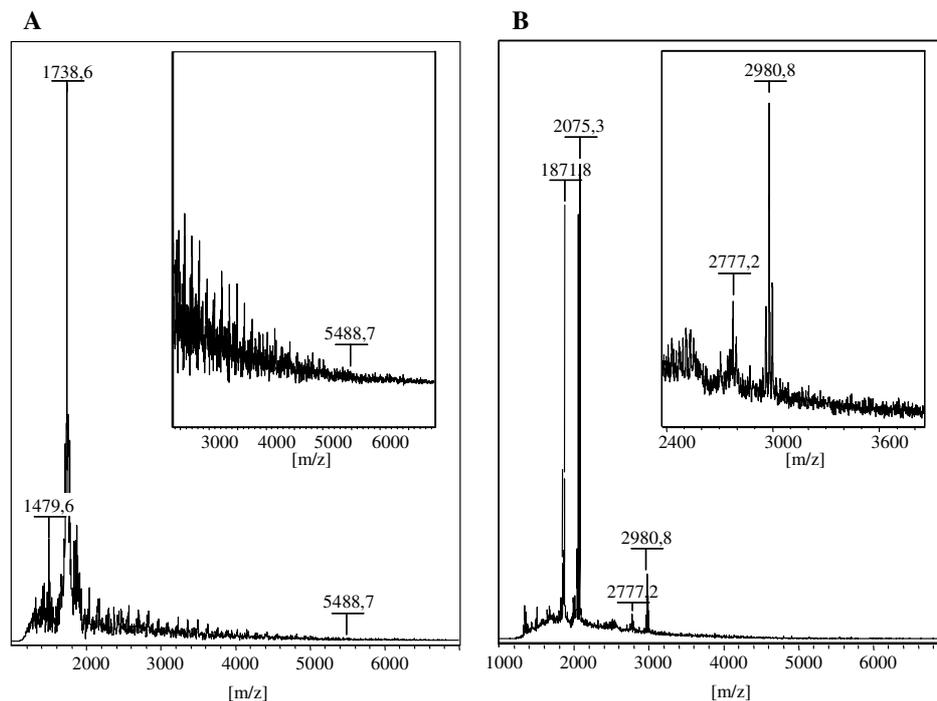


Abb. 5.5: Massenspektren der käuflich erworbenen LPS-Moleküle. A) s-LPS von *Escherichia coli* O55:B5. B) r-LPS von *Salmonella typhimurium* SL1181. Die jeweils eingeschobenen Ausschnitte sind Vergrößerungen der Signale mit den größten detektierten  $[m/z]$ -Werten. Aufgrund der Heterogenität der beiden Stoffgemische lässt sich die Detektion mehrerer Signale erklären.

Als nächstes wurden die gekauften LPS-Moleküle auf ihren NA-, Protein- und LPS-Gehalt getestet (Abb. 5.6). Die gekauften s-LPS-Moleküle enthalten viel NA, dies konnte zusätzlich mittels NanoDrop™ bestätigt werden (siehe Kapitel 4.2.18). Der Wert lag hier bei 265,8  $\mu\text{g}/\text{mg}$  eingesetztem Material. R-LPS dagegen enthält nur wenig NA, der Wert lag bei 15,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  eingesetztem Material. Proteine konnten nicht nachgewiesen werden, und für s-LPS und r-LPS zeigte sich jeweils eine charakteristische Spur bei der Silberfärbung. Hierbei handelt es sich mehr um einen „Schmier“, was daher rührt, dass die Moleküle sehr heterogen in ihrer Größe sind und daher keine definierte Bande zeigen.

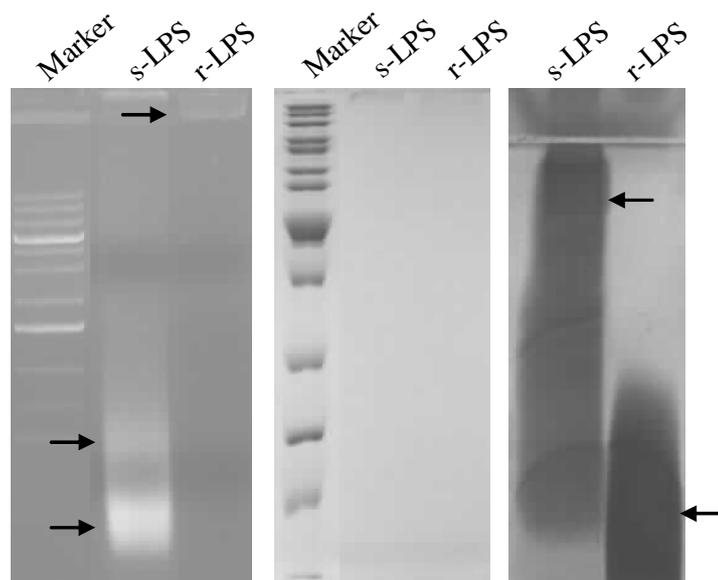


Abb. 5.6: Charakterisierung der käuflich erworbenen s-LPS und r-LPS Moleküle mittels Agarosegelelektrophorese (links) und SDS-PAGE (Mitte (Coomassiefärbung) und rechts (Silberfärbung)). Der NA- und LPS-Gehalt sind durch Pfeile angezeigt.

Zu Beginn der NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde reines s-LPS, im Gewichtsverhältnis 1/1 mit dem Detergens SDS und im Gewichtsverhältnis 1/10 mit dem Lipid DMPC untersucht. Suspensionen wurden in Polyethylen eingeschweißt und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren bei einer Temperatur oberhalb des  $T_C$  von DMPC aufgenommen (Abb. 5.7 A). Die Suspensionen zeigen jeweils ein isotropes Signal, sowie für die Mischung mit DMPC keine erkennbare lamellare Phase. Vermutlich kommt es hier jeweils zur Ausbildung von mizellaren Lipidanordnungen.

Für die Herstellung von Membranmodellen auf Festkörperoberflächen wurde s-LPS gemischt mit Lipiden gemessen. Zuerst wurde eine Messreihe mit unterschiedlichen Mengen des Lipids DMPC durchgeführt. Hierfür wurde s-LPS mit DMPC im Gewichtsverhältnis 1/0, 1/1, 1/10 und 1/100 versetzt. Ebenfalls wurden Mischungen von s-LPS mit den unterschiedlichen Lipiden DSPC, DPPC, DMPC und DLPC, jeweils im Gewichtsverhältnis 1/1, sowie mit Lecithin (eine Mischung aus L- $\alpha$ -Phosphatidylcholinen aus dem Extrakt des Eidotters) im Gewichtsverhältnis 1/10 hergestellt. Die Messungen der  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren erfolgten für alle Membranmodellen auf der Festkörperoberfläche parallel zu  $B_0$  und bei  $60^\circ\text{C}$  (diese Temperatur liegt für alle verwendeten Lipide oberhalb von  $T_C$ ) (Abb. 5.7 B und C).

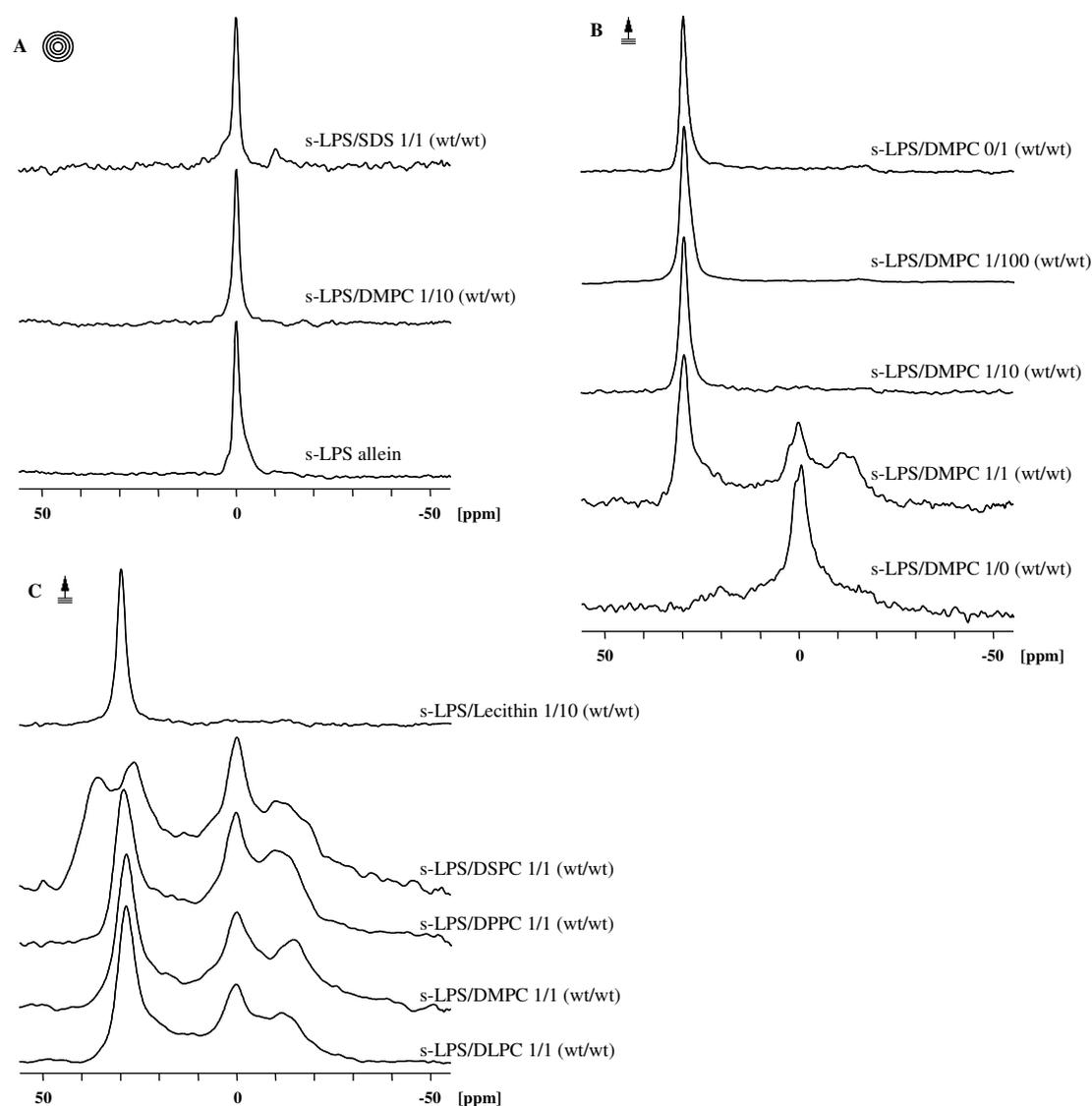


Abb. 5.7: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von käuflich erworbenem s-LPS in Mischungen mit chemisch reinen Substanzen. A) Suspensionen von reinem s-LPS, im Gewichtsverhältnis 1/1 mit dem Detergens SDS und im Gewichtsverhältnis 1/10 mit dem Lipid DMPC. Membranmodelle auf Festkörperoberflächen, bestehend aus: B) s-LPS und steigender Menge (in Gewicht) des Lipids DMPC, C) s-LPS zusammen mit verschiedenen Lipiden, jeweils im Gewichtsverhältnis 1/1, und Lecithin im Gewichtsverhältnis 1/10.

Reines s-LPS zeigt als orientierte Probe parallel zum Magnetfeld ein isotropes Signal. Zusätzlich ist über einen Bereich von  $\sim 50$  ppm ein breites Signal zu erkennen, welches aber deutlich schmäler ist als das der Membranvesikelpräparation (Kapitel 5.1).

Zusammen mit verschiedenen Lipiden sind neben den jeweiligen isotropen Signalen anisotrope Signale mit einer Breite von  $\sim 45$  ppm zu erkennen, welche gewöhnlich für orientierte

Phospholipide zu beobachten sind. Einzig die Probe mit DSPC zeigt zwei Signale für das orientierte Phospholipid. Der Übergang von  $L_{\beta}$  zu  $L_{\alpha}$  liegt für DSPC bei  $55^{\circ}\text{C}$ . Die Spektren wurden mit einer nominellen Temperatur von  $60^{\circ}\text{C}$  gemessen, was bedeutet, dass die tatsächliche Temperatur in den Proben etwas geringer war. Dadurch ist zu vermuten, dass die Doppelschichten von DSPC zum Teil noch in der  $L_{\beta}$ -Phase, und zum Teil schon in der  $L_{\alpha}$ -Phase vorlagen. Korreliert mit dem vorhandenen Verhältnis von DMPC und s-LPS sind die Änderungen der relativen Intensitäten der Signale bei  $-45$  ppm und  $0$  ppm. Je höher der Gewichtsanteil des Lipids, desto besser ist deren Orientierung, und das isotrope Signal geht stark zurück.

Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden ebenfalls mit käuflich erworbenem r-LPS aufgenommen. Suspensionen von reinem r-LPS sowie Mischungen mit den Lipiden Palmitoyl-oleoylphosphoethanolamin (POPE) und *Escherichia coli* total lipid extract (*E. coli* TLE) wurden in Polyethylen eingeschweißt und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren bei  $30^{\circ}\text{C}$  aufgenommen (Abb. 5.8 A). Proben auf Festkörperoberflächen wurden mit den Lipiden DMPC und DMPG hergestellt (Abb. 5.8 B), da gezeigt werden konnte, dass sie in Mischungen mit Re-LPS (der kürzesten Rauform) lamellare Phasen ausbilden können [151]. Das molare r-LPS/Lipid-Verhältnis lag jeweils bei  $1/10$ . Die Messungen erfolgten für die Suspensionen bei  $30^{\circ}\text{C}$ , und für die Proben auf fester Oberfläche bei  $0^{\circ}$  Neigungswinkel sowie einer Temperatur oberhalb des  $T_{\text{C}}$  der Lipide,  $35^{\circ}\text{C}$ .

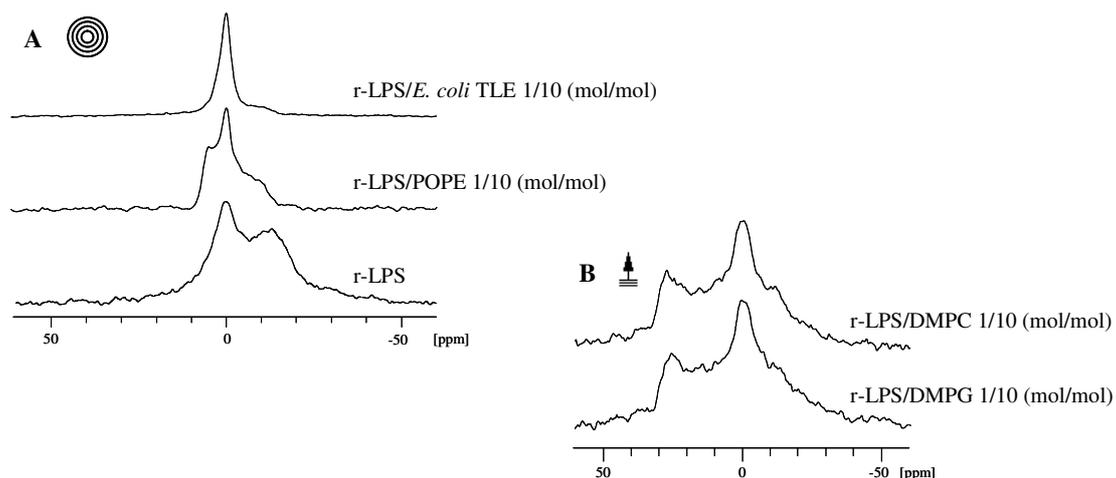


Abb. 5.8: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren von käuflich erworbenem r-LPS und Gemischen mit Phospholipiden. A) Suspensionen von reinem r-LPS und im molaren Verhältnis von  $1/10$  mit den Lipiden Palmitoyl-oleoylphosphoethanolamin (POPE) und *Escherichia coli* total lipid extract (*E. coli* TLE). B) Membranmodelle auf Festkörperoberflächen, bestehend aus r-LPS und DMPC bzw. DMPG, jeweils im molaren Verhältnis von  $1/10$ .

Das  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum der r-LPS Suspension zeigt neben einem isotropen Signal auch ein anisotropes, axial symmetrisches  $^{31}\text{P}$ -Signal, welches auf das Vorhandensein einer lamellaren Phase schließen lässt. In der Mischung mit POPE ist die lamellare Phase nur noch schwach ausgeprägt, ein dominantes Signal um die isotrope Position ist zu erkennen. *E. coli* TLE zeigt ebenfalls ein dominantes Signal um die isotrope Position, lamellare Phasen sind nicht mehr zu beobachten. Es ist bekannt, dass POPE und *E. coli* TLE hexagonale und kubische Phasen ausbilden können [164]. Diese können kinetisch festgehalten werden, und, abhängig von der thermalen Geschichte der Proben, neben lamellaren Phasen detektiert werden. Ebenso ist es möglich, die Bildung der Phasen durch Zusätze wie r-LPS zu begünstigen. Eine Unterscheidung kann allerdings nicht in Bezug auf die  $^{31}\text{P}$ -Spektren getroffen werden. Zudem decken sich die Ergebnisse nicht mit den in [151] gewonnenen Erkenntnissen.

Dagegen zeigen orientierte Proben mit den Lipiden DMPC oder DMPG neben dem isotropen Signal eine Orientierung der Doppelschicht parallel zum Magnetfeld, was sowohl den beobachteten Ergebnissen aus [151] als auch in etwa den s-LPS/DMPC-Spektren (Abb. 5.7 B) entspricht. Bemerkenswert ist, dass mit r-LPS ein größerer mosaic spread gesehen werden kann.

### 5.3 Extraktion von LPS aus *Pseudomonas aeruginosa*

Die Anwesenheit von NA in den LPS-Molekülen ist ein störender Faktor, da sie zum einen mit den kationischen AMPs interferieren und zum anderen nicht erwünschte Hintergrundsignale bei der  $^{31}\text{P}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie zeigen können. Daher ist deren Reinheit wichtig, was durch die kommerziell erworbenen Moleküle nicht gewährleistet werden konnte. Auch sind die käuflich zu erwerbenden LPS-Moleküle relativ teuer, da pro Probe 3-6 Milligramm benötigt werden, und die Kosten für ein Milligramm bei ~20 Euro liegen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die gekauften LPS-Moleküle aus verschiedenen Bakterien stammen. Aufgrund dessen sollte eigenes, NA-freies LPS aus *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC extrahiert werden. Die Extraktion ist kostengünstiger, und da die extrahierten LPS-Moleküle aus der gleichen Bakteriengattung stammen, können sie miteinander verglichen werden. Diese Extraktionen liefen parallel zu den Membranvesikel-Präparationen.

Hierfür wurden verschiedene Protokolle aus der Literatur getestet. Die Extraktion von s-LPS aus *P. aeruginosa* PAO1 geschah mit der unter 4.2.10 beschriebenen Extraktionsmethode 1, r-LPS

aus *P. aeruginosa* rmlC wurde mit der unter 4.2.10 beschriebenen Methode 2 extrahiert. Aus Gründen, die im nächsten Abschnitt besprochen werden, wurde für beide LPS-Moleküle zusätzlich die Extraktionsmethode 3 getestet, und für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

### 5.3.1 Charakterisierung der extrahierten LPS-Moleküle

Die Extraktionsmethode 1 nach [152-154] ist als optimal für Bakterien mit s-LPS beschrieben, die Methode 2 ist bekannt für Bakterien mit r-LPS [155-157]. Methode 3 wird sowohl für s- als auch für r-LPS als sehr gut anwendbar genannt [148]. Im Folgenden werden die Extrakte der Methoden 1 und 2 entsprechend als s-LPS-I und r-LPS-I bezeichnet, die der Methode 3 als s-LPS-II und r-LPS-II.

Nach erfolgten Extraktionen wurden die lyophilisierten Materialien jeweils auf die Anwesenheit von LPS, NA, Proteinen sowie den Zucker 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (KDO) hin untersucht.

Der Zucker KDO ist in jedem LPS-Molekül vorhanden. Er ist Bestandteil des Kern-Oligosaccharids und kann kolorimetrisch nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die so genannte Warren-Reaktion, bei der durch die Perjodsäure die Kohlenstoffketten des KDO abgespaltet werden und ein  $\beta$ -Formylpyruvat entsteht. Dieses reagiert anschließend mit Thiobarbitursäure zu einem pinken Farbstoff (Abb. 5.9), welcher sein Absorptionsmaximum bei 548 nm besitzt [159, 160].



Abb. 5.9: Der Nachweis des Zuckers 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (KDO) geschieht kolorimetrisch durch die Bildung eines pinken Farbstoffes.

Mit diesem Nachweis ist es möglich, die vorhandenen Mengen an KDO in den lyophilisierten LPS Extrakten zu bestimmen und mit käuflich erworbenem LPS zu vergleichen. Wie in Tabelle 5.1 dargestellt, wurden die s-LPS-I, s-LPS-II und r-LPS-II Extrakte positiv, der r-LPS-I Extrakt hingegen negativ auf die Bildung des pinken Farbstoffes getestet. Die ermittelten Mengen an KDO sind jeweils geringer als die der käuflichen LPS-Moleküle. Das könnte an den vorhandenen NA in den käuflichen LPS-Molekülen liegen.

Tabelle 5.1: Enthaltene Menge an KDO in den LPS Molekülen, nachgewiesen durch die Bildung eines Farbstoffes. Die angegebene Menge bezieht sich auf 1 mg eingesetztes Material.

<b>Molekül</b>	<b>KDO [<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> eingesetztes Material]</b>
Extrahiertes s-LPS-I	18
Extrahiertes s-LPS-II	20
Käuflich erworbenes s-LPS	30
Extrahiertes r-LPS-I	0
Extrahiertes r-LPS-II	22
Käuflich erworbenes r-LPS	35

Abbildung 5.10 zeigt die für den Nachweis von NA angefertigten Agarosegele sowie die für den Nachweis von Proteinen und LPS angefertigten SDS-PAGE Gele der extrahierten s-LPS und r-LPS Moleküle. In dem s-LPS-I Extrakt können sowohl NA als auch Proteine detektiert werden. Der Nachweis auf LPS ist ebenfalls positiv. Hingegen sind für den r-LPS-I Extrakt zwar keine NA und keine Proteine zu beobachten, der Nachweis auf LPS ist allerdings auch negativ. Das wiederum stimmt mit den Ergebnissen der KDO-Bestimmung überein. Die Extrakte s-LPS-II und r-LPS-II sind nahezu frei von NA, dies konnte ebenfalls mittels NanoDrop™ bestätigt werden. Die Werte lagen hier für s-LPS-II bei 19  $\mu\text{g}/\text{mg}$  eingesetztem Material und für r-LPS-II bei 21  $\mu\text{g}/\text{mg}$  eingesetztem Material. Proteine sind in beiden Extrakten nicht detektierbar, und die Silberfärbung ist positiv.

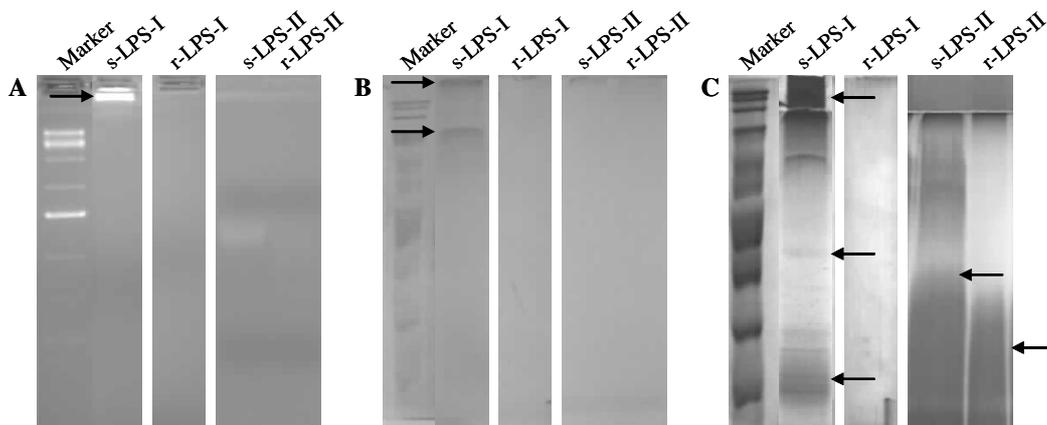


Abb. 5.10: A) Agarosegele der extrahierten s-LPS und r-LPS Moleküle. Hochmolekulare NA kann in dem s-LPS-I Extrakt detektiert werden (Pfeil). B) PA Gel, welches Proteine in dem s-LPS-I Extrakt zeigt (Pfeil). C) Der Nachweis auf LPS ist positiv für die s-LPS-I, s-LPS-II und r-LPS-II Extrakte (Pfeile).

Durch die enthaltenen NA sowie den Proteinen im s-LPS-I Extrakt und den negativen Nachweisen auf KDO und LPS im r-LPS-I Material wurden diese Methoden verworfen.

Die Ausbeute der Extraktionsmethode 3 lag für beide Stämme jeweils bei etwa 50 mg LPS pro 1 g eingesetztes, lyophilisiertes Zellmaterial. Daher wurden die anschließenden spektroskopischen und kalorimetrischen Untersuchungen mit diesen Molekülen durchgeführt. Hierfür war es nötig, die Masse der LPS-Moleküle zu bestimmen. Dies geschah mittels Massenspektrometrie (Abb.5.11). Bei den extrahierten LPS-Molekülen ist die gleiche Heterogenität zu beobachten wie bei den gekauften. Die große Anzahl verschiedener Massen im Spektrum lässt auf zerstörte Moleküle schließen, hier können die Zuckerketten zum Teil fragmentiert sein.

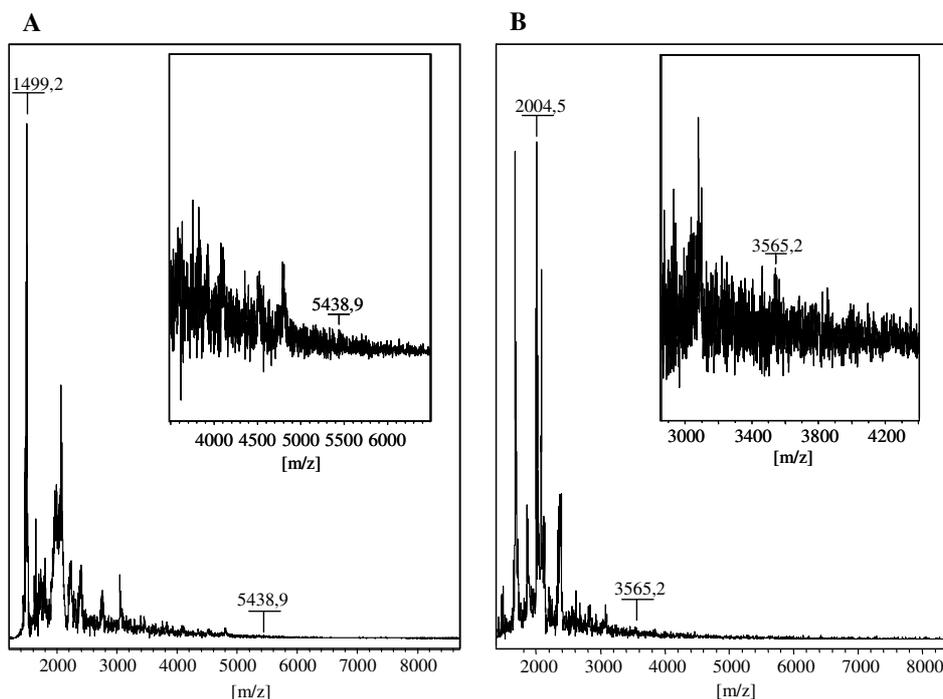


Abb. 5.11: Massenspektren der extrahierten LPS-Präparate. A) s-LPS, extrahiert aus *P.aeruginosa* PAO1. B) r-LPS, extrahiert aus *P.aeruginosa* rmlC. Die jeweils eingeschobenen Ausschnitte sind Vergrößerungen der Signale mit den größten detektierten [m/z]-Werten. Mittels Heterogenität der beiden Stoffgemische lässt sich die Detektion mehrerer Signale erklären.

Aufgrund der Heterogenität der Moleküle sowie der Instabilität der O-Polysaccharid Ketten konnten nur ungefähre Werte ermittelt werden. Diese lagen für r-LPS bei etwa 3,5 kDa und für s-LPS bei etwa 5,5 kDa. Mit diesen Massen wurde für alle weiteren Untersuchungen gerechnet.

#### 5.4 Peptid/Membran-Wechselwirkungen an LPS-haltigen Membranmodellen

Die aus *P. aeruginosa* PAO1 und rmlC extrahierten LPS-Moleküle wurden für spektroskopische und kalorimetrische Untersuchungen eingesetzt. Zusammen mit den Lipiden DMPC, DMPC/DMPG (3/1, mol/mol), *E. coli* TLE und POPE wurden Membranmodelle im molaren Verhältnis LPS/Lipid 1/10 hergestellt, welche für die Festkörper-NMR, die CD-Spektroskopie und DSC-Messungen verwendet wurden. Wechselwirkungen mit AMPs, am Beispiel von PGLa, wurden in diesen LPS-haltigen Membranmodellen untersucht.

### 5.4.1 Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

Zu Beginn der Untersuchungen wurden  $^{31}\text{P}$ -Spektren der Membranmodelle aufgenommen, um deren Orientierungen und somit den weiteren Einsatz für die  $^{19}\text{F}$ -NMR ermitteln zu können. Hierfür wurden diese zuerst als Suspensionen und anschließend als orientierte Membranen gemessen (Abb. 5.12). Die Messungen erfolgten bei  $35^\circ\text{C}$  sowie  $0^\circ$  Neigungswinkel für die orientierten Proben.

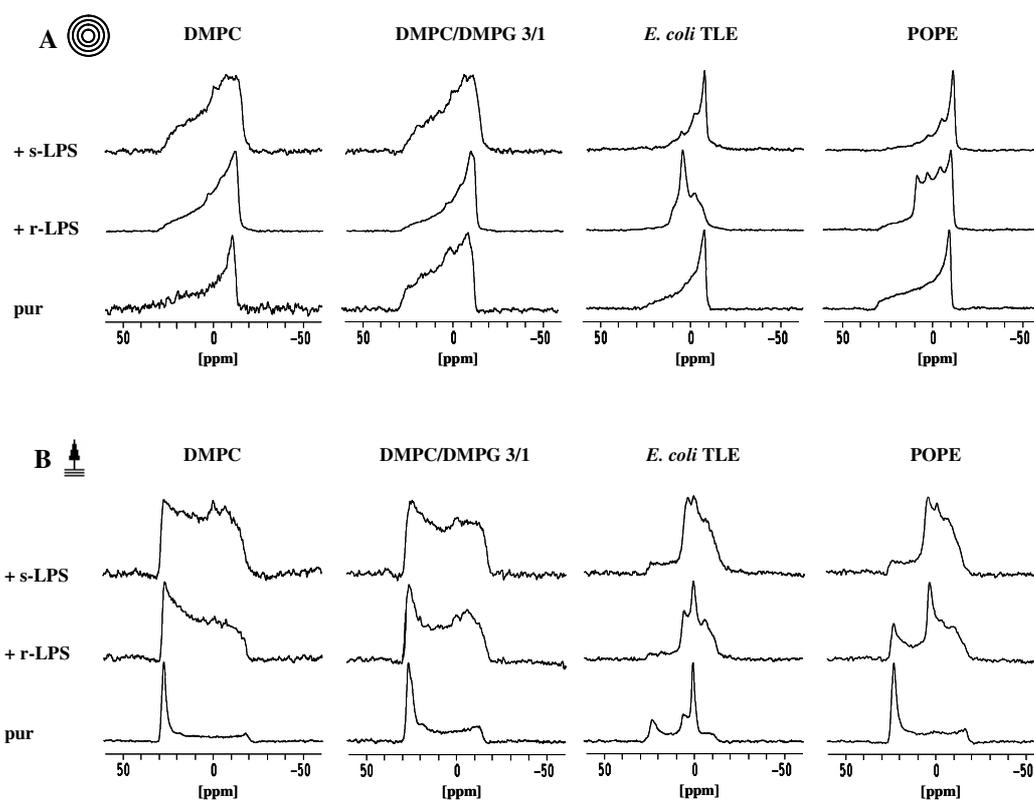


Abb. 5:12: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren der LPS-haltigen Membranmodelle, jeweils das reine Lipid (untere Reihen) sowie zusammen mit s- und r-LPS (obere und mittlere Reihen). A) Suspensionen. B) Orientierte Membranen bei  $0^\circ$  Neigungswinkel.

Die Membranmodelle, welche jeweils die beiden LPS-Arten sowie die Lipide DMPC und DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) enthalten, zeigen jetzt fast ausschließlich lamellare Phasen für die Suspensionen sowie partielle Orientierungen für die auf festem Trägermaterial befindlichen Membranen. Die partielle Orientierung ist vergleichbar mit Abbildung 5.7 B) und C), wo kommerzielles s-LPS in Mischung mit verschiedenen Phospholipiden untersucht wurde. Durch

den erhöhten mosaic spread der orientierten Proben kann von einer tatsächlichen Vermischung der Lipidmoleküle ausgegangen werden. Zusammen mit den Lipiden *E. coli* TLE und POPE ist die Bildung von nicht lamellaren Phasen zu beobachten. Interessanterweise zeigt *E. coli* TLE in Suspension die Ausbildung von MLVs, Proben auf Glasplättchen hingegen sind nicht lamellar. Anschließend wurden Temperaturserien zwischen 5°C bis 65°C für die orientierten Membranen s-LPS/DMPC und r-LPS/DMPC aufgenommen (Abb.5.13). Somit ist der Temperaturbereich der Gel Phase bis hin zur flüssig-kristallinen Phase von DMPC abgedeckt.

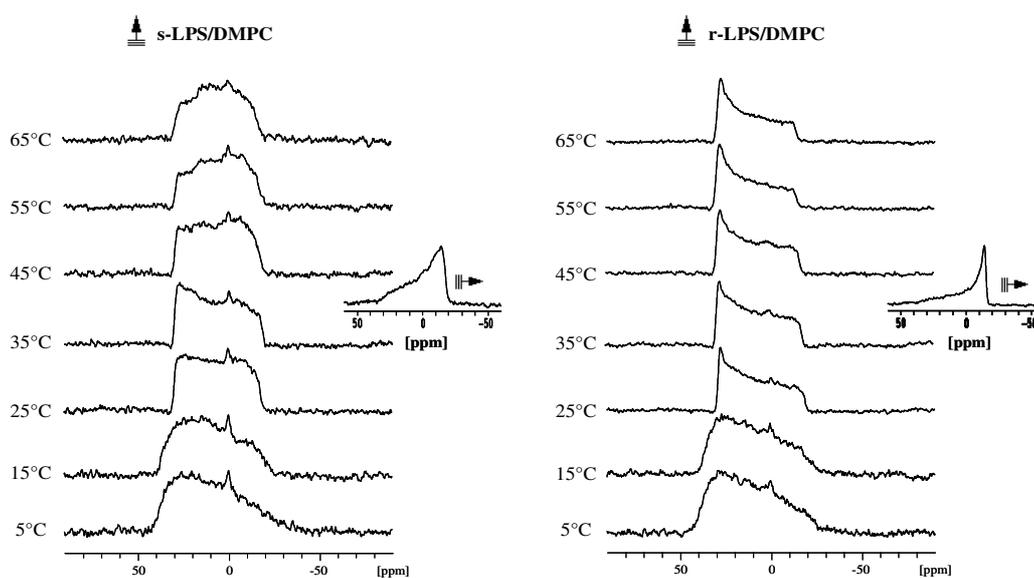


Abb. 5.13: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren der Membranmodelle s-LPS/DMPC (1/10, mol/mol) (links) bzw. r-LPS/DMPC (1/10, mol/mol) (rechts) mit 0° Neigungswinkel. Jeweils als kleines Spektrum ist eine Aufnahme bei 90° Neigungswinkel und 35°C dargestellt.

Hierbei ist zu sehen, dass die Modellmembran, bestehend aus s-LPS/DMPC, unterhalb vom Phasenübergang von DMPC ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) ein breiteres Signal von etwa 55 ppm zeigt, oberhalb ist es schmaler und liegt bei etwa 47 ppm. Dies kann ebenfalls für die Modellmembran, bestehend aus r-LPS/DMPC, beobachtet werden. Es ist bekannt, dass der  $^{31}\text{P}$  CSA für MLVs aus DMPC zwischen -45 ppm und -47 ppm liegt [165, 166]. Trotz des erhöhten mosaic spreads ist deutlich eine Orientierung der beiden Membranen zu erkennen. Das kann zusätzlich durch die Messungen bei 90° Neigungswinkel bestätigt werden (kleine Spektren). Ebenfalls zu beobachten ist das Fehlen des ausgeprägten isotropen Signals, wie es in Membranmodellen mit kommerziell erworbenen LPS-Molekülen detektiert werden konnte (Kapitel 5.2). Da die Spektren über den gemessenen Temperaturbereich keine starke Veränderung der Orientierung erfahren, es also

nicht zur Ausbildung nicht lamellarer Phasen kommt, wurde  $^{13}\text{CF}_3\text{-Phg PGLa}$  in diesen Membranmodellen rekonstituiert. Ausgehend von den molekularen Massen 5,5 kDa für s-LPS sowie 3,5 kDa für r-LPS lagen die Peptid/Lipid-Verhältnisse bei 1/40 (mol/mol). Die  $^{19}\text{F}$ -NMR spektroskopischen Messungen wurden im Temperaturbereich von  $5^\circ\text{C}$  bis  $55^\circ\text{C}$  und bei  $0^\circ$  Neigungswinkel durchgeführt. Jeweils die höchste und niedrigste Temperatur wurden zusätzlich mit  $90^\circ$  Neigungswinkel gemessen. Hiermit sollte überprüft werden, ob das Peptid rotationssymmetrisch ist (Abb. 5.14).

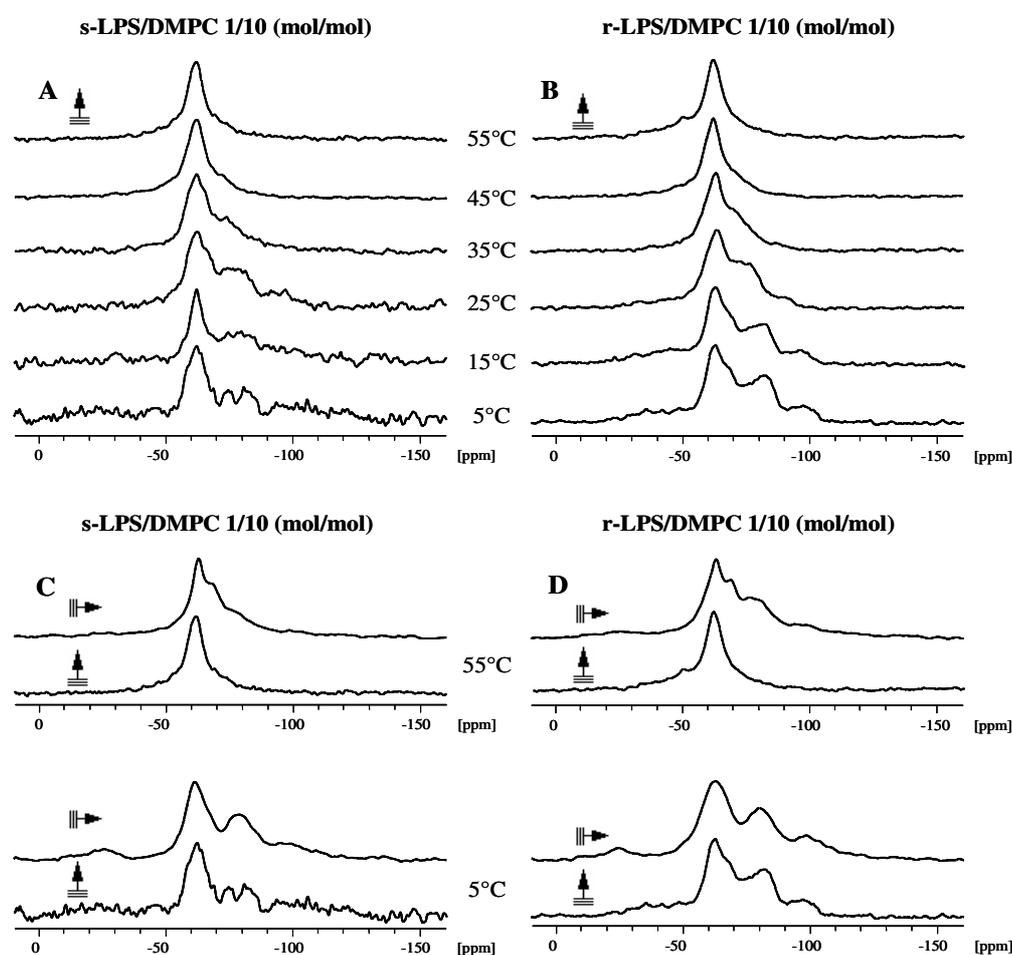


Abb.5.14: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren von  $^{13}\text{CF}_3\text{-Phg PGLa}$ , rekonstituiert in LPS-haltigen Membranmodellen auf Festkörperoberflächen. Das Peptid/(LPS/DMPC)-Verhältnis liegt bei 1/40. Temperaturserien bei  $0^\circ$  Neigungswinkel wurden für die Probe mit s-LPS/DMPC (A) sowie für die Probe mit r-LPS/DMPC (B) aufgenommen. Für die Temperaturen  $5^\circ\text{C}$  und  $55^\circ\text{C}$  wurden die Proben zusätzlich mit  $90^\circ$  Neigungswinkel gemessen (C) und D)).

In Anwesenheit von Fluor-markiertem PGLa ändern sich die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der Membranmodelle s-LPS/DMPC und r-LPS/DMPC nicht (Daten nicht gezeigt).

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren zeigen in beiden Membransystemen breite Signale unterhalb von  $35^\circ\text{C}$ , im Temperaturbereich darüber werden sie schmaler. Zusätzlich kann mit erhöhter Temperatur ein deutliches isotropes Signal detektiert werden. Dieses Signal ist zum einen breiter als für ungebundenes und frei rotierendes Peptid üblich, zum anderen wird es bei Erhöhung der Temperatur schmaler. Daher sind weiterhin einige nicht isotrope Intensitäten zu beobachten. Aufgrund der niedrigen Spektrenauflösung, welche vermutlich durch die hohe Heterogenität der LPS-Moleküle und dem breitem mosaic spread (siehe Festkörper- $^{31}\text{P}$ -Spektren, Abb. 5.13) verursacht wird, ist es schwierig, die dipolaren Aufspaltungen zu bestimmen. Für s-LPS/DMPC liegen sie unterhalb von  $35^\circ\text{C}$  bei etwa  $-8$  kHz, oberhalb werden sie schmaler und liegen bei etwa  $-5,5$  kHz. Ähnliches ist für r-LPS/DMPC zu beobachten. Hier ist die Aufspaltung unterhalb von  $35^\circ\text{C}$  deutlich breiter, sie liegt bei etwa  $-8,5$  kHz. Oberhalb dieser Temperatur ist sie ebenfalls schmaler und die Ausbildung einer Schulter ist zu beobachten. Das Spektrum bei  $25^\circ\text{C}$  könnte eine Überlagerung der Spektren bei  $15^\circ\text{C}$  und  $35^\circ\text{C}$  darstellen. Für  $55^\circ\text{C}$  ist eine positive dipolare Aufspaltung von etwa  $+5,5$  kHz zu beobachten, was dem S-state entsprechen würde. Die Amplitude liegt bei etwa 10-15% in Relation zum isotropen Wert. Das bei der Messung mit  $90^\circ$  Neigungswinkel um den Wert  $-\frac{1}{2}$  an der isotropen Position gespiegelte Signal bestätigt den S-state.

#### 5.4.2 CD-Spektroskopie

Um die bevorzugte Sekundärstruktur von AMPs in LPS-haltigen Membranmodellen ermitteln zu können, eignet sich die CD-Spektroskopie. Hier wurde zum einen das AMP PGLa untersucht, welches ebenso für die Festkörper-NMR-Spektroskopie und die DSC-Messungen verwendet wurde. Zum anderen Gramacidin S, welches eine gänzlich unterschiedliche Struktur aufweist, und in dieser Hinsicht als eine Art „strukturelle“ Kontrolle fungierte.

Zuerst wurden CD-Spektren in Wasser, dem Lösungsmittel TFE (50%) sowie in den Mizellen bildenden Lysophospholipiden lysoMPC und lysoPPG und dem Detergens DPC, jeweils in Wasser, aufgenommen. Das Peptid/Lipid-Verhältnis lag bei 1/25 und die Messungen erfolgten bei  $25^\circ\text{C}$  (Abb. 5.15).

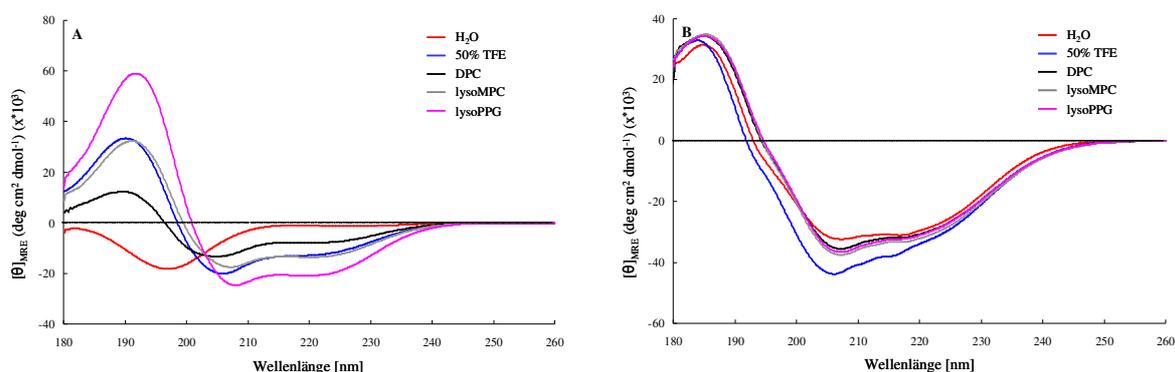


Abb. 5.15: CD-Spektren von PGLa (A) und Gramicidin S (B) in Wasser, 50% TFE, den Lysophospholipiden lysoMPC und lysoPPG sowie dem Detergens DPC.

PGLa liegt in Wasser unstrukturiert vor, das Spektrum zeigt ein statistisches Knäuel (random coil). Das Spektrum ist charakterisiert durch negative MRE-Werte und einem Maximum bei 212 nm sowie einem Minimum bei 198 nm [129]. Alle anderen Membransysteme fördern die Strukturierung von PGLa hin zu einer  $\alpha$ -Helix. Es kann für die verschiedenen Modellsysteme der  $f_H$ -Wert (siehe Kapitel 2.4.1) von PGLa angegeben werden (Tab. 5.2). Hierdurch ist zu erkennen, dass in der lysoPPG-haltigen Umgebung der höchste  $\alpha$ -helikale Anteil detektiert werden kann. LysoPPG ist hier das einzige negativ geladene Mizellensystem.

Tab. 5.2: Der helikale Anteil ( $f_H$ - Wert) für PGLa in verschiedenen Modellsystemen.

Modellsystem	$f_H$ -Wert [%]
DPC	25,5
50% TFE	40,7
LysoMPC	43,1
LysoPPG	66,3

Die gemessenen Linienformen von Gramicidin S stimmen mit bekannten Spektren, gemessen ebenfalls in 50% TFE, überein [110]. Das Peptid kann aufgrund seiner Struktur als ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit zwei  $\beta$ -Wendungen Typ II' aufgefasst werden. Durch das Vorhandensein von  $^d$ Phe, was einem Anteil von 20% *D*-Aminosäuren entspricht, zeigt es keines

der klassischen Peptid-CD-Spektren. Es ist dennoch möglich, gemessene Spektren miteinander zu vergleichen.

Als nächstes wurden CD-Spektren der beiden AMPs in den Lipidsystemen DMPC, gekauftes s-LPS/DMPC (1/10 molar) und gekauftes s-LPS allein, jeweils in Wasser, aufgenommen. Die Peptid/Lipid-Verhältnisse lagen bei 1/25, und die Messungen wurden ebenfalls bei 25°C durchgeführt (Abb. 5.16).

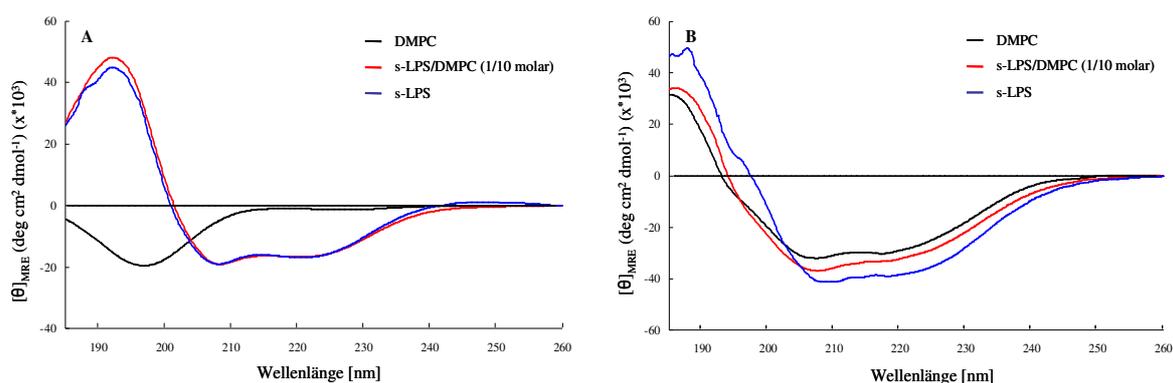


Abb. 5.16: CD-Spektren von PGLa (A) und Gramicidin S (B) in DMPC, gekauftes s-LPS/DMPC (1/10 molar) und gekauftes s-LPS.

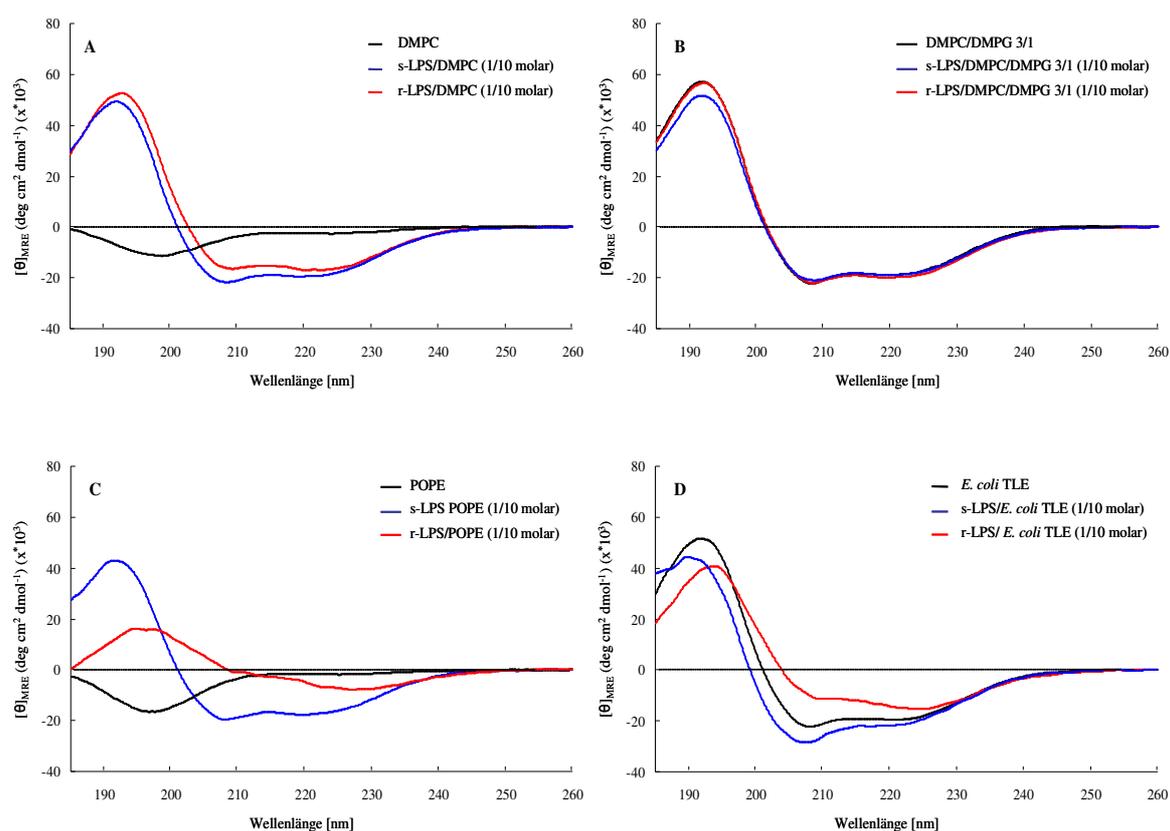
Das kationische AMP PGLa bindet unter den vorliegenden Bedingungen für die CD-Spektroskopie nicht an das zwitterionische Lipid DMPC und liegt unstrukturiert wie in Wasser vor. DMPC bildet Vesikeln aus, welche eine geringere Krümmung der Oberfläche aufweisen, im Gegensatz zu DPC oder lysoPPC Mizellen. Die zusätzliche Anwesenheit des negativ geladenen Moleküls s-LPS führt zur erhöhten elektrostatischen Anziehung von PGLa, was zur Bindung und somit zur Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur führt. Dies kann ebenfalls für reines s-LPS beobachtet werden. Tabelle 5.3 gibt die  $f_H$ -Werte von PGLa als grobe Annäherung des  $\alpha$ -helikalen Anteils in den Membranmodellen wieder.

Tab. 5.3: Der helikale Anteil ( $f_H$ - Wert) für PGLa in verschiedenen Modellsystemen.

Modellsystem	$f_H$ -Wert [%]
s-LPS	52,8
s-LPS/DMPC	52,4

Für Gramicidin S sind erneut Spektren zu sehen, die im Prinzip einer starren sekundären Struktur entsprechen, da sie in Wasser, negativen und neutralen Modellsystemen immer die gleiche Linienform zeigen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Gramicidin S sowohl in gebundener als auch ungebundener Form die gleiche Struktur besitzt.

Da das gekaufte s-LPS nicht frei war in Bezug auf vorhandene DNA (Kapitel 5.2), wurden die weiteren Untersuchungen mit den selbst extrahierten, „sauberen“ LPS-Präparationen durchgeführt. Für die Aufnahmen der CD-Spektren wurden die gleichen Membranmodelle wie für die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendet (Kapitel 5.4.1). Die Messungen wurden bei einer Temperatur oberhalb von  $T_C$  der Lipide und einem Peptid/Modellmembran-Verhältnis von 1/40 durchgeführt. Abbildung 5.17 zeigt die CD-Spektren für PGLa.



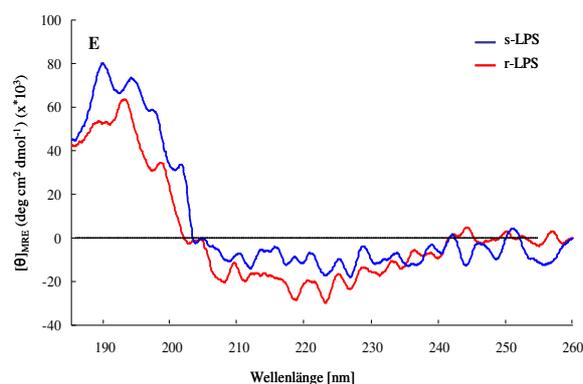


Abb. 5.17: PGLa wurde in verschiedenen Lipidsystemen untersucht. A) DMPC. B) DMPC/DMPG (3/1, mol/mol). C) POPE. D) *E. coli* TLE. Es wurde jeweils das reine Lipid gemessen oder gemischt mit extrahiertem s-LPS bzw. r-LPS. E) Reine LPS-Moleküle. Das molare Verhältnis von LPS zu Lipid lag jeweils bei 1/10 und das Peptid/Modellmembran-Verhältnis bei 1/40.

Für diese Messungen können ebenfalls die  $f_H$ -Werte von PGLa in den Membranmodellen angegeben werden (Tab. 5.4).

Tab. 5.4: Der helikale Anteil ( $f_H$ -Wert) für PGLa in verschiedenen Modellsystemen.

Modellsystem	$f_H$ -Wert [%]
DMPC	7,7
DMPC/DMPG (3/1, mol/mol)	58,9
POPE	5,1
<i>E. coli</i> TLE	61,3
s-LPS/DMPC	61,2
s-LPS/DMPC/DMPG (3/1, mol/mol)	59,5
s-LPS/POPE	55,9
s-LPS/ <i>E. coli</i> TLE	68,5
r-LPS/DMPC	53,5
r-LPS/DMPC/DMPG (3/1, mol/mol)	62,8
r-LPS/POPE	15,4
r-LPS/ <i>E. coli</i> TLE	44,9

In der Anwesenheit zwitterionisch geladener Lipide liegt PGLa unstrukturiert vor (DMPC und POPE), und bei negativ geladenen Lipiden (DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) und *E. coli* TLE)  $\alpha$ -helikal. Durch den Einfluss der negativ geladenen LPS-Moleküle kommt es sowohl bei s-LPS/DMPC als auch bei r-LPS/DMPC zur Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur aufgrund erhöhter elektrostatischer Anziehung mit anschließender Bindung von PGLa. POPE gemischt mit s-LPS führt ebenfalls zur Strukturierung. Wie bereits erwähnt ist bekannt, dass POPE und *E. coli* TLE nicht lamellare Phasen ausbilden können. Das führt vermutlich zur Konformationsänderung und Aggregation von PGLa in dem Lipidsystem r-LPS/POPE. Das kann durch die Linienform der CD-Spektren beobachtet werden. Dadurch entstehende spektrale Veränderungen haben Streueffekte zur Folge, die zu Absorption flattening führen können [167]. Ähnliches kann, allerdings nicht so stark ausgeprägt, für die Membranmodelle s-LPS/*E. coli* TLE und r-LPS/*E. coli* TLE beobachtet werden. Es ist also zu vermuten, dass PGLa unter den Messbedingungen in Membranen, die nicht lamellare Phasen ausbilden, zum Teil aggregiert vorliegt. Somit zeigt sich ebenfalls, dass der errechnete  $f_H$ -Wert nur als Näherung angesehen werden kann und für die Ermittlung der tatsächlichen Struktur weitere Berechnungen nötig sind. Wird PGLa mit reinem s-LPS oder r-LPS inkubiert, sind die Spektren sehr verrauscht. Dieses Rauschen kann bei Wiederholungsmessungen ebenfalls detektiert werden. Da in den verwendeten LPS-Molekülen, im Gegensatz zu dem gekauften s-LPS, nahezu keine NA vorhanden ist, könnten daran die Unterschiede der Spektren liegen. Durch das Auftreten von Trübungen in der Probe kann hier ebenfalls von Aggregation der Peptide bzw. Peptid/LPS-Komplexen ausgegangen werden.

Für die Messungen mit Gramicidin S wurden dieselben Membranmodelle verwendet. Den Messungen lagen die gleichen molaren Verhältnisse sowie die Messtemperatur zugrunde. Abbildung 5.18 zeigt die für Gramicidin S aufgenommenen CD-Spektren.

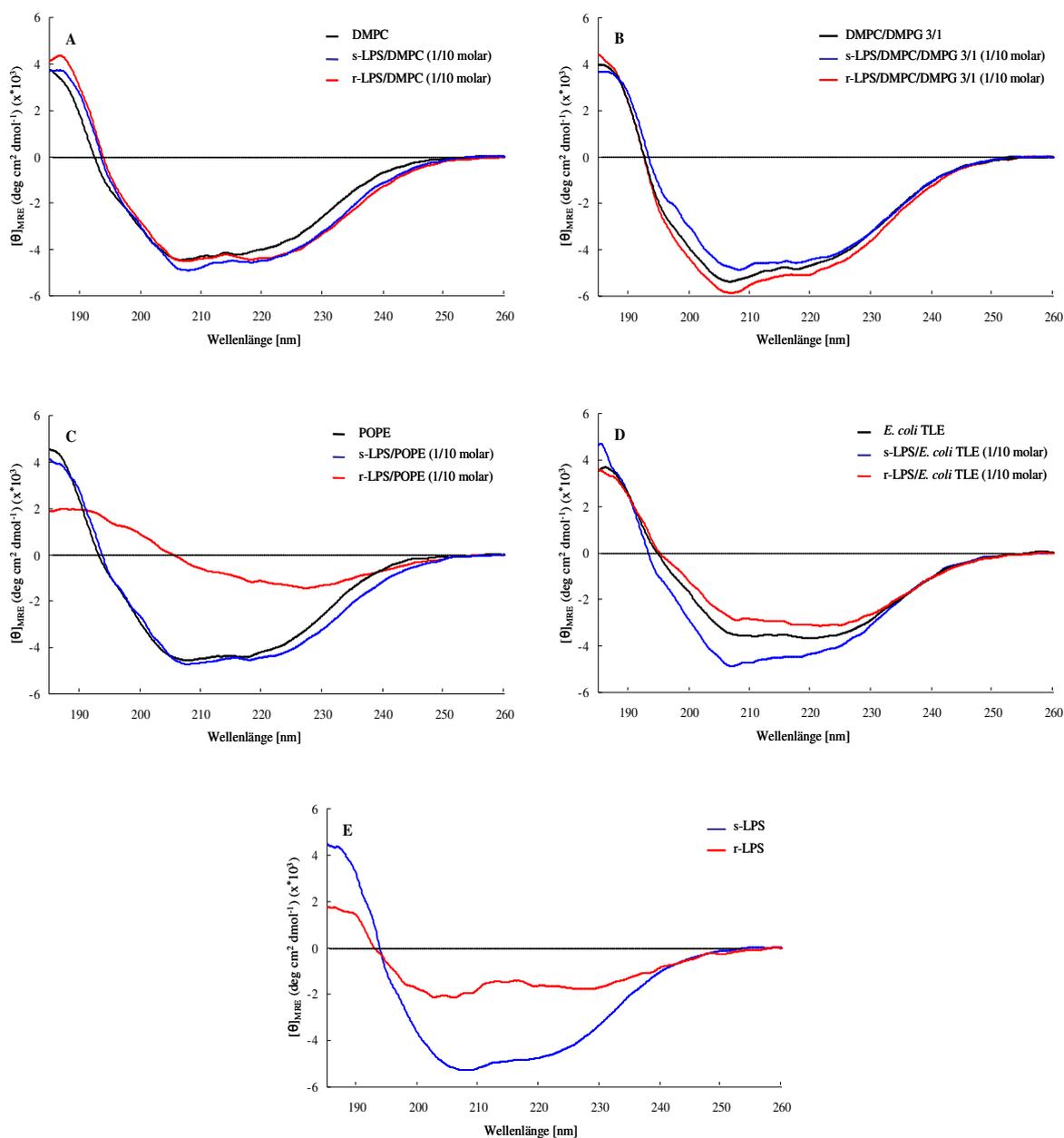


Abb. 5.18: Gamicidin S wurde in verschiedenen Lipidsystemen untersucht. A) DMPC. B) DMPC/DMPG (3/1, mol/mol). C) POPE. D) *E. coli* TLE. Es wurde jeweils das reine Lipid gemessen oder gemischt mit extrahiertem s-LPS bzw. r-LPS. E) Reine LPS-Moleküle. Das molare Verhältnis von LPS zu Lipid lag jeweils bei 1/10 und das Peptid/Modellmembran-Verhältnis bei 1/40.

Für die Lipidsysteme DMPC und DMPC/DMPG (3/1, mol/mol), jeweils rein und zusammen mit den LPS-Molekülen, POPE allein und gemischt mit s-LPS sowie zum Teil für reines *E. coli* TLE und in Kombination mit den LPS-Molekülen ist für Gamicidin S eine Linienform zu erkennen,

die einer starren sekundären Struktur entspricht. Einzig für die Modellmembran r-LPS/POPE ist ein Spektrum zu sehen, welches wie bei PGLa Aggregation vermuten lässt. Die Messungen von Gramicidin S mit reinem s-LPS oder r-LPS zeigt Spektren, die im Falle von s-LPS der starren sekundären Struktur entspricht, sowie bei r-LPS erneut Aggregation vermuten lässt.

### **5.4.3 DSC-Messungen**

Zur Charakterisierung sowie dem Verständnis von Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Lipiden ist die Methode der DSC-Messung gut geeignet. Durch die Änderung des polymorphen Verhaltens der Lipide können praktischerweise Wechselwirkungen mit den verschiedensten Stoffen untersucht werden. Ebenso ist es möglich, den Einfluss von LPS auf die Lipide zu detektieren [128, 168]. Für die Messungen wurden die gleichen Membranmodelle wie für die CD-Spektroskopie und die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendet. Miteinander verglichen werden können allerdings am ehesten die CD- und DSC-Messungen, da sie ähnlich sind in Bezug auf die „MLV“ ähnlichen Anordnungen der Lipide und den Wassergehalt

Bei konstantem Druck wurden die Proben mehreren Temperaturzyklen (Aufheizen und Abkühlen in dem Bereich von 5°C bis 80°C, siehe Kapitel 2.4.13) ausgesetzt. Abbildung 5.19 zeigt jeweils repräsentative DSC-Thermogramme der Lipide und Lipidmischungen.

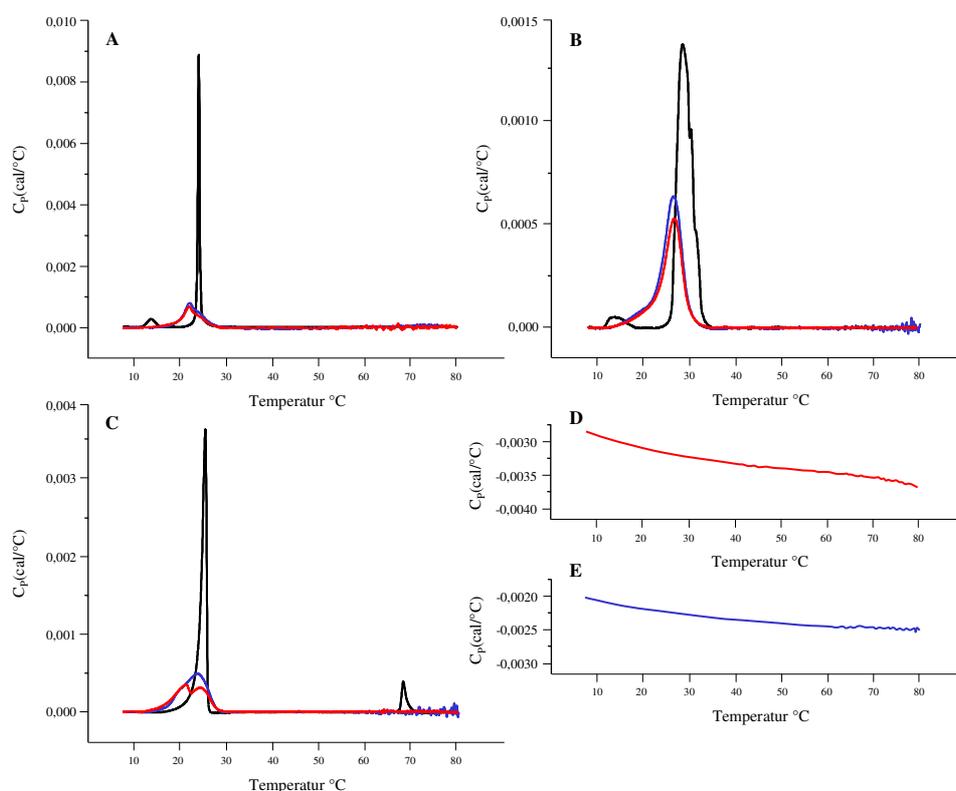


Abb. 5.19: Repräsentative DSC-Thermogramme (schwarze Linie) der Lipide DMPC (A), DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) (B) und POPE (C). Die roten Spektren zeigen die Thermogramme der jeweiligen Lipide zusammen mit s-LPS, und die blauen Spektren zeigen die Lipide zusammen mit r-LPS. D) Thermogramm von reinem s-LPS. E) Thermogramm von reinem r-LPS. Die Thermogramme wurden in Wasser gemessen und zeigen jeweils den zweiten Aufheizzyklus.

Da alle Messungen ein positives Signal für die untersuchten Phasenübergänge aufweisen, handelt es sich hierbei um endotherme Prozesse. Die Phasenübergänge der reinen Lipide sind sehr gut aus der Literatur bekannt, und die hier gemessenen Werte können somit verglichen werden.

Die Phase unterhalb des Hauptübergangs  $T_C$  von Lipiden wird als  $L_B$ , oder auch Gel Phase, bezeichnet. Bei Erhöhung der Temperatur tritt oft ein Vorübergang  $T_C'$  auf, hier kann die Übergangs-Phase  $P_B$  beobachtet werden. Nach dem Überschreiten von  $T_C$  liegt die Lipidmembran in der flüssig-kristallinen Phase  $L_\alpha$  vor. Üblicherweise werden aber nur  $T_C$  und  $T_C'$  für die Übergänge von  $L_B$  zu  $P_B$  und  $P_B$  zu  $L_\alpha$  verwendet.

Für das Lipid DMPC ist ein Vorübergang  $T_C'$  zu erkennen, dieser liegt bei  $13,5^\circ\text{C}$ . Der Hauptübergang  $T_C$  vom Gel Zustand in den flüssig-kristallinen Zustand ist bei  $24^\circ\text{C}$  zu beobachten [169]. In Anwesenheit der LPS-Moleküle kann der Vorübergang nicht mehr

detektiert werden.  $T_C$  bleibt, wird aber deutlich breiter und verliert an Intensität. Er befindet sich nun für beide Mischungen im Bereich zwischen 16,9-28,2°C mit einem jeweiligen Maximum bei 22,1°C.

Das Membranmodell DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) zeigt ebenfalls einen breiten Vorübergang  $T_C$  bei 10,5-17,7°C, und einen verbreiterten Hauptübergang  $T_C$  mit zwei Spitzen bei 28°C und 30°C sowie einer erkennbaren Schulter bei 31°C. Dieses Phasenverhalten ist wohl DMPG zuzuordnen, da es eine Art „Schwamm Phase“ in einer wässrigen Umgebung mit niedrigem Ionengehalt ausbildet [170]. Zusammen mit den LPS-Molekülen ist hier ebenfalls der Vorübergang nicht mehr zu detektieren. Der Hauptübergang wird wiederum breiter, weniger intensiv und ist zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Er liegt nun für beide LPS-haltigen Gemische in einem Bereich von 20-32,2°C, mit einem Maximum von 26,5°C in der Mischung mit s-LPS und 26°C in der Mischung mit r-LPS.

Der Hauptphasenübergang  $T_C$  liegt für reines POPE bei 25,3°C [171]. Bei 68,2°C ist ein zusätzlicher Übergang in die hexagonale Phase  $H_{II}$  zu erkennen [143]. In Anwesenheit der LPS-Moleküle wird der Hauptübergang breiter und verliert ebenfalls an Intensität, und der zweite Übergang zu  $H_{II}$  ist nicht mehr zu beobachten.  $T_C$  befindet sich nun für s-LPS/POPE in einem Bereich von 14,7-29,5°C mit zwei erkennbaren Maxima bei 21,2°C und 24°C, sowie für r-LPS/POPE in einem Bereich von 15,6-28,5°C mit einem Maximum bei 23,4°C. Die Unterschiede zu den Ergebnissen der Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren, wo nicht lamellare Phasenbildung beobachtet werden konnte, liegen vermutlich entweder am erhöhten Wassergehalt oder der Temperaturgeschichte der DSC Proben. Eine weitere Erklärung wäre die geringere Konzentration an POPE.

Die DSC-Messungen der Lipidsysteme mit *E. coli* TLE zeigten in dem gemessenen Temperaturbereich keine Phasenübergänge an (Daten nicht gezeigt).

Für die reinen LPS-Moleküle ist ebenfalls kein Phasenübergang im gemessenen Temperaturbereich zu erkennen, was aufgrund von [144] zu erwarten war.

Anschließend sollte der Einfluss von PGLa auf das Phasenverhalten dieser Membranen untersucht werden. Das Peptid/Lipid-Verhältnis lag für alle DSC-Messungen entsprechend der CD-Spektroskopie bei 1/40. Abbildung 5.20 zeigt die DSC-Thermogramme der verschiedenen Lipidsysteme in Anwesenheit von PGLa.

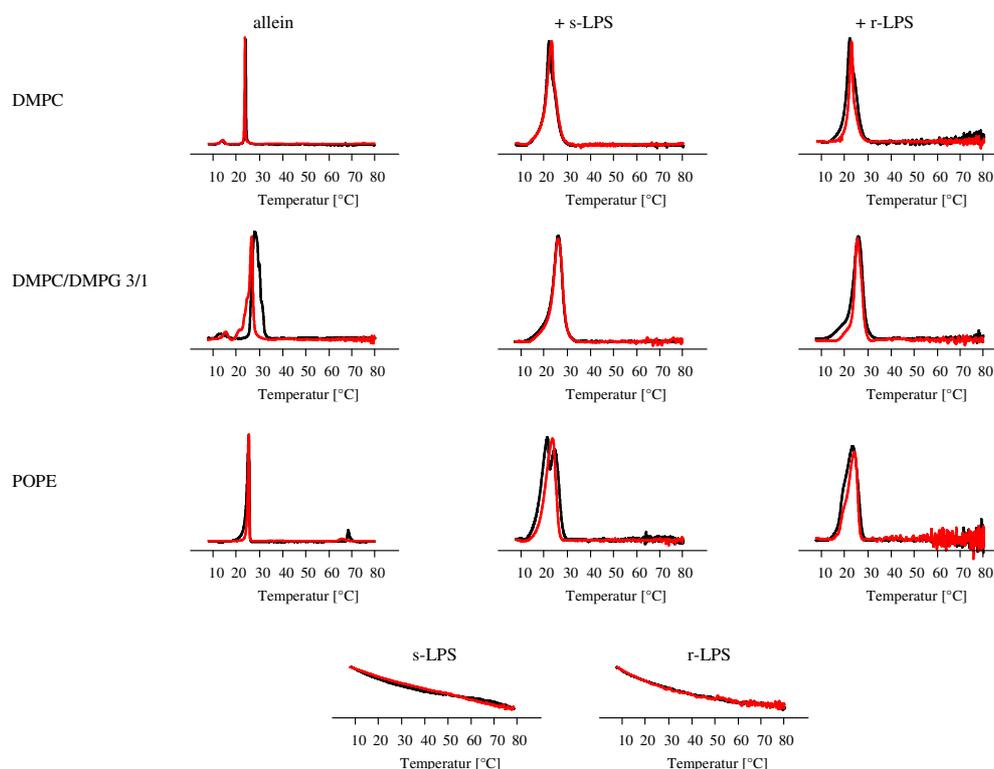


Abb. 5.20: DSC-Thermogramme der verschiedenen Lipidsysteme in Wasser, inkubiert mit PGLa (P/L = 1/40). Die schwarzen Spektren zeigen die Lipide ohne Peptid, die roten Spektren jeweils mit Peptid. Die y-Achsen wurden aufgrund der besseren Übersicht für alle Thermogramme vereinheitlicht und sind daher nicht dargestellt. Die Intensitäten der Thermogramme innerhalb eines Koordinatensystems sind gleich.

In Anwesenheit von PGLa wird das Phasenverhalten von DMPC nicht beeinflusst. Das korreliert mit den CD-Ergebnissen, hier konnte ebenfalls keine Bindung von PGLa an DMPC beobachtet werden. In der Mischung mit s-LPS ist eine leichte Verschiebung von  $T_C$  zu  $23,5^\circ\text{C}$  nach oben und mit r-LPS eine leichte Verschmälerung zu erkennen, trotz der mit CD-Spektroskopie gezeigten „starken“ Bindung.

Der Phasenübergang  $T_C$  von DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) ist deutlich zu  $29^\circ\text{C}$  nach unten verschoben. Allerdings ist kein Einfluss mit s-LPS erkennbar, nur mit r-LPS zeigt sich ebenfalls eine leichte Verschmälerung des Übergangssignals.

Das Thermogramm des Lipids POPE ist in Anwesenheit von PGLa leicht verschmälert. Der Übergang zur hexagonalen Phase  $H_{II}$  ist zu  $66^\circ\text{C}$  verschoben und verliert an Intensität. Dadurch kann eine partielle Bindung, wie sie ebenso in den CD-Spektren zu erkennen war, vermutet werden. Auch ist wohl die hexagonale Phase  $H_{II}$  stabilisiert. Die Phasenübergänge in den

Mischungen mit s-LPS und r-LPS sind jeweils etwas schmaler, und bei s-LPS entsteht ein Doppelpick mit den Maxima bei 21,2°C und 25,1°C. Das erkennbare Rauschen im hohen Temperaturbereich bei allen Lipiden zusammen mit r-LPS sowie reinem r-LPS weist auf Aggregation hin. Das lässt sich sehr gut mit der beobachteten Aggregation in den CD-Spektren vereinbaren.

Der Einfluss von PGLa auf das Phasenverhalten der LPS-Moleküle ist mit der verwendeten Methode nicht feststellbar.

### 5.5 Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie von $^{19}\text{F}$ -markiertem Gramacidin S in natürlichen Membranen

Die Methode der Biomembranpräparation ist in [101] beschrieben. Zur Kontrolle der Präparationsqualität sowie dem Zustand und der Orientierung der Membranen wurden vor den Messungen mit Peptiden  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Abbildung 5.21 zeigt repräsentative  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der unorientierten sowie auf Glasplättchen orientierten Membranen, gemessen bei 35°C.

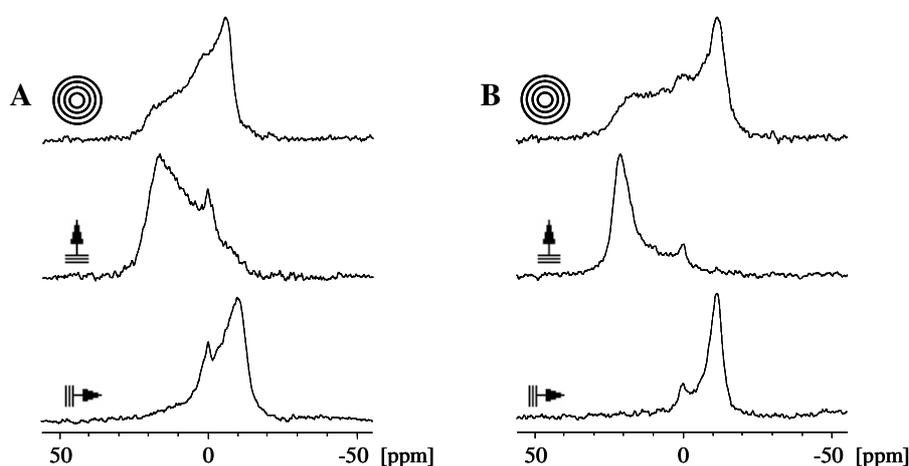


Abb. 5.21:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der verwendeten Biomembranen. A) Protoplasten von *M. luteus*, als Suspension (oben) und auf Glasplättchen orientiert. 0° Neigungswinkel (Mitte) und 90° Neigungswinkel (unten). B) Erythrozytenmembranen, als Suspension (oben) und auf Glasplättchen orientiert. 0° Neigungswinkel (Mitte) und 90° Neigungswinkel (unten).

Ein typisches, axialsymmetrisches Pulverspektrum unorientierter Phospholipidvesikel (siehe Kapitel 2.4.2.3) ist für die Suspensionen von *M. luteus* und der Erythrozyten erkennbar. Obwohl der mosaic spread recht hoch ist, zeigen die orientierten Proben eine sehr gute Orientierung [101], welche sogar besser ist als die der LPS-haltigen Membranmodellen (siehe Abb. 5.12). Daher können sie, obwohl es sich um komplexe Membranen mit vielen verschiedenen Lipidarten handelt, für die  $^{19}\text{F}$ -NMR verwendet werden. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR Kontrollmessungen wurden jeweils vor und nach den  $^{19}\text{F}$ -NMR Messungen durchgeführt. Austrocknung der Proben sowie Veränderungen in der Orientierung der Membranen konnten nicht festgestellt werden, da die Spektren jeweils gleich waren.

Gramicidin S wurde in dieser Arbeit erstmals in solch natürlichen Biomembranen untersucht. Es wurden zwei verschiedene, mit 4-F-Phg markierte Peptide verwendet: zum einen GS-1/1' und zum anderen GS-3/3'. Beide Analoga sind in ihrer Struktur und Funktion unverändert zum Wildtyp, was mittels CD-Spektroskopie und Ermittlung der MIC-Werte gezeigt werden konnte [110].

Zuvor wurden allerdings  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren in synthetischen Membranmodellen (DMPC und DMPC/DMPG (3/1, mol/mol)) aufgenommen. Diese sollten als Vergleichsspektren dienen. Abbildung 5.22 zeigt die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der MLVs sowie der auf Glasplättchen orientierten Phospholipide mit  $0^\circ$  Neigungswinkel. Die Messungen wurden bei  $35^\circ\text{C}$  durchgeführt, was oberhalb vom  $T_C$  der Lipide liegt.

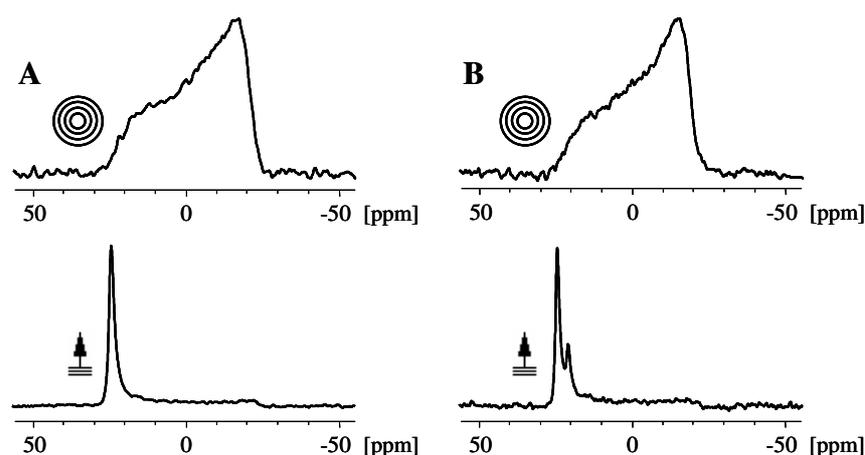


Abb. 5.22: Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der MLVs (obere Reihe) und auf Glasplättchen orientierten (untere Reihe) synthetischen Phospholipidmembranen. A) DMPC. B) DMPC/DMPG (3/1, mol/mol).

Die MLVs zeigen das typische, axialsymmetrische Pulverspektrum von Phospholipidvesikeln. In den orientierten Proben, jeweils gemessen mit der Membrannormalen parallel zum Magnetfeld, ist der größte Teil der Phospholipide orientiert, was durch die chemische Verschiebung erkennbar ist. Das Lipidgemisch DMPC/DMPG zeigt aufgrund der unterschiedlichen anisotropen Tensoren zwei Peaks, wobei der größere bei 25 ppm DMPC und der kleinere bei 21,3 ppm DMPG zuzuordnen ist. Das 3/1-Verhältnis der Intensitäten ist dem molaren Verhältnis der Lipide zueinander entsprechend.

Zu betonen ist, dass die gemessenen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren unabhängig sind von der Anwesenheit des Peptids, sie zeigen immer die gleiche Linienform.

In Abbildung 5.23 wurden GS-1/1' und GS-3/3', jeweils im Peptid/Lipid-Verhältnis von 1/40, in MLVs gemessen. Die Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR Messungen wurden jeweils als Temperaturserien durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Spektren bei Temperaturen, welche sich unter- und oberhalb des  $T_C$  der Lipide bzw. des Lipidgemisches befinden. Dieser liegt für DMPC bei etwa  $24^\circ\text{C}$  und für DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) bei etwa  $30^\circ\text{C}$  (siehe Kapitel 5.4.3).

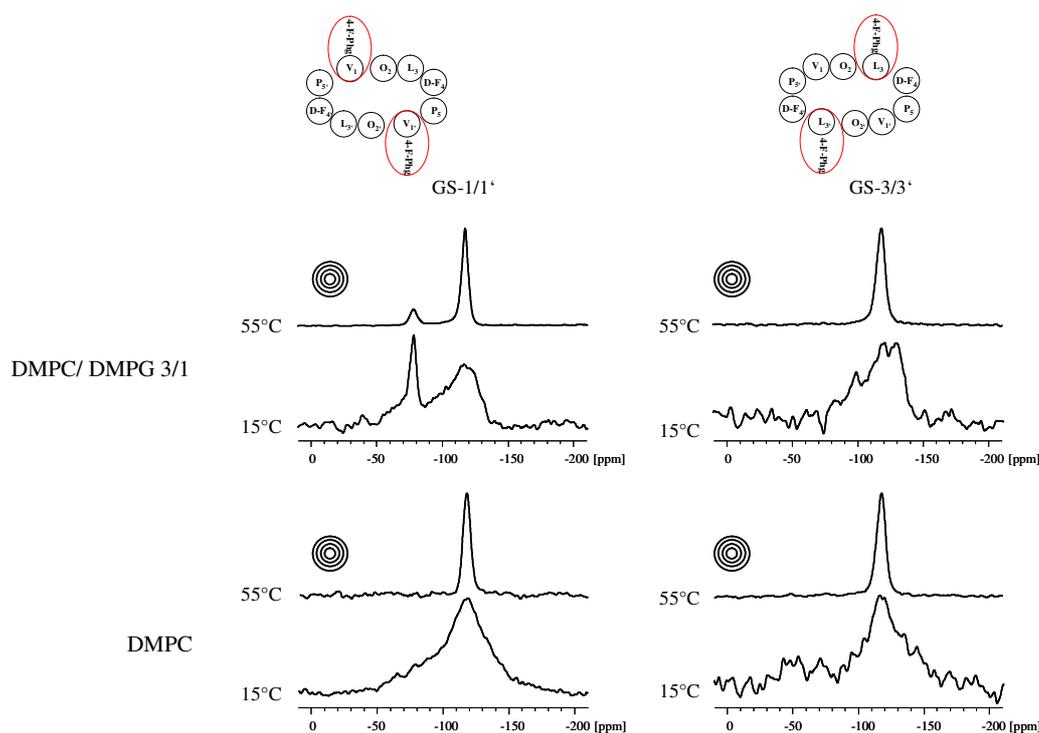


Abb. 5.23: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von GS-1/1' und GS-3/3' in MLVs. Die Messungen wurden bei Temperaturen durchgeführt, welche sich unter- und oberhalb des  $T_C$  der Lipide bzw. des Lipidgemisches befinden. Schematisch abgebildet ist Gramicidin S mit den jeweils markierten Positionen. P/L = 1/40.

Unterhalb von  $T_C$  der Lipide zeigen beide Gramicidin S Analoga für beide Lipidsysteme ein breites Spektrum von etwa 68 ppm, was mit einem axial symmetrischen Pulverspektrum übereinstimmt [8]. Oberhalb des Phasenübergangs, die Lipide befinden sich hier in der flüssig-kristallinen Phase, ist für beide Peptide ein schmales  $^{19}\text{F}$ -Signal bei ca. -117 ppm zu erkennen. Dieses Signal entspricht bekannten Ergebnissen [8] und ist relativ breit (etwa 40 ppm). Es lässt eine oberflächliche Bindung der beiden Gramicidin S Analoga an die MLVs vermuten, da es sich in Abhängigkeit zur Temperatur verändert. Der zusätzliche Peak (-80 ppm) bei DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) und GS-1/1' ist Hintergrundsignal zuzuordnen.

Die Peptide wurden anschließend in makroskopisch orientierten Phospholipiden gemessen. Da in MLVs beobachtet werden konnte, dass beide Gramicidin S Analoga für beide Lipidsysteme gleiche Spektren zeigen und dies ebenso in den orientierten Proben zu erkennen war, sind in Abbildung 5.24 nur die Ergebnisse für das Lipidsystem DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) dargestellt. Bei dieser Lipidmischung handelt es sich zudem um das Modell der bakteriellen Membran, kann also später zum Vergleich der gewonnenen Spektren in Protoplasten herangezogen werden. Die Messungen erfolgen bei  $0^\circ$  Neigungswinkel und den Temperaturen  $15^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$  und  $55^\circ\text{C}$ , welche sich unterhalb, in der Nähe und oberhalb des  $T_C$  befinden. Das P/L lag bei 1/40.

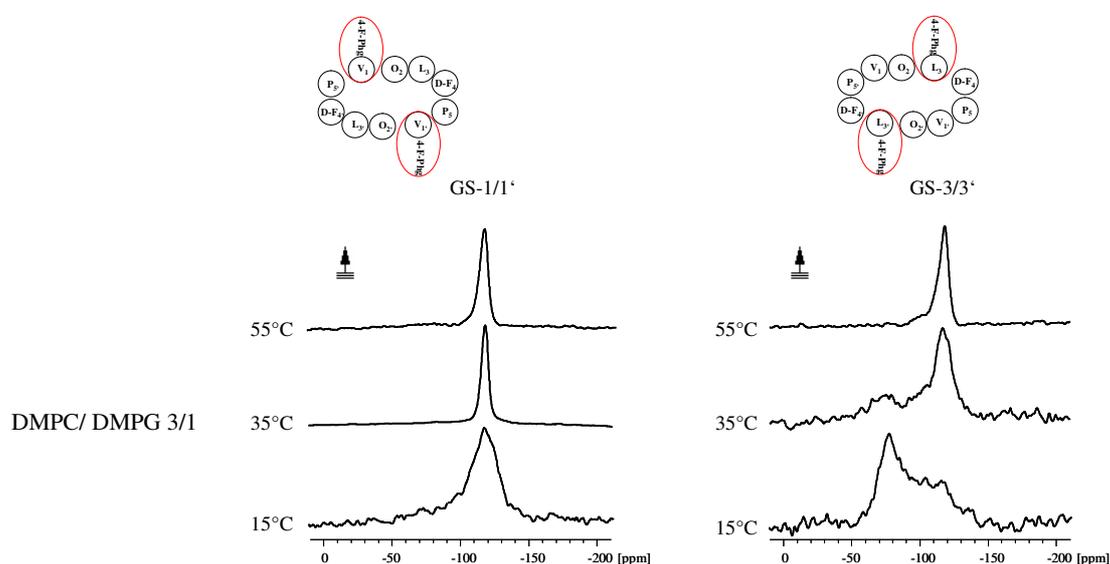


Abb. 5.24: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von GS-1/1' und GS-3/3' in makroskopisch orientierten Phospholipiden aus DMPC/DMPG (3/1, mol/mol). Die Messungen wurden jeweils bei  $0^\circ$  Neigungswinkel und verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Diese lagen unterhalb ( $15^\circ\text{C}$ ), in der Nähe ( $35^\circ\text{C}$ ) und oberhalb ( $55^\circ\text{C}$ ) von  $T_C$ . Schematisch abgebildet ist Gramicidin S mit den jeweils markierten Positionen. P/L = 1/40.

Die Spektren zeigen mit GS-1/1' für die Temperatur unterhalb des Phasenübergangs ein breites Signal bei  $\sim 117$  ppm. Hier sind die Peptide oberflächlich an die Membran gebunden, aber nicht beweglich. Durch die Erhöhung der Temperatur werden die Signale schmaler, was dem S-state entspricht. Sie befinden sich in einer mobilen oberflächlichen Orientierung mit einem molekularen Ordnungsparameter  $S_{\text{mol}} \sim 0,34$ , welcher für  $30^\circ\text{C}$  bestimmt wurde [9].

Der Peak zwischen  $-70$  und  $-80$  ppm entspricht dem I-state [8, 108]. Durch Messungen mit  $90^\circ$  Neigungswinkel zeigte sich, dass GS-3/3' frei in der Membran rotieren kann (Spektren nicht dargestellt). GS-3/3' ist also in der Gel Phase der Lipidmischung in die Membran inseriert. Bei Erhöhung der Temperatur vermindert sich das Signal bei  $-70$  ppm, und bei  $55^\circ\text{C}$  liegt das Peptid nur noch im S-state vor.

Für einen späteren Vergleich der gewonnenen Spektren in Erythrozytenmembranen wurde GS-1/1' in einer orientierten Lipidmischung, bestehend aus DMPC und Cholesterin, gemessen (Abb. 5.25). Hierbei handelte es sich um ein Modell eukaryotischer Membranen. Die Untersuchung von GS-3/3' in Membranmodellen, bestehend aus DMPC und Cholesterin, wurde in einer früheren Arbeit durchgeführt und soll hier nicht mehr dargestellt werden [8]. P/L lag wie in [8] bei  $1/40$  und die Temperatur zwischen  $25^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$ .

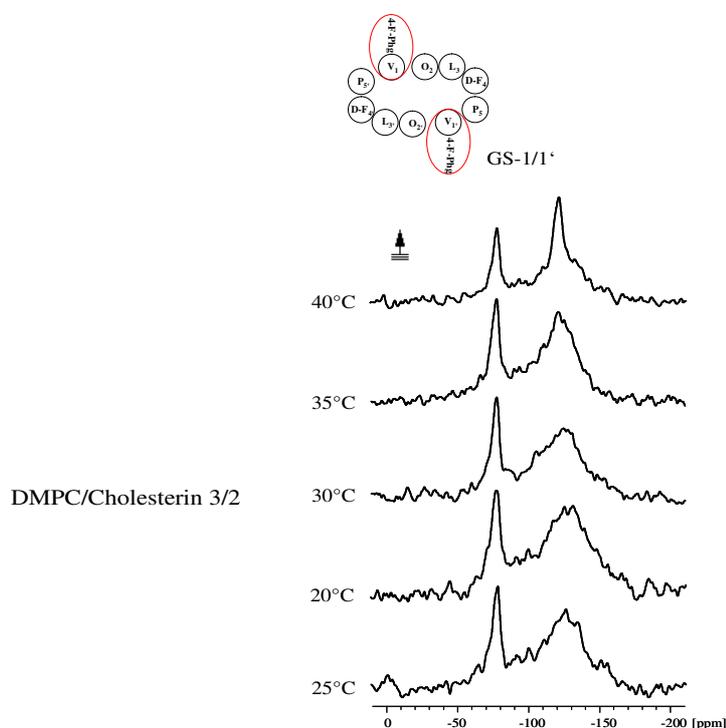


Abb. 5.25: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von GS-1/1' in einer orientierten Modellmembran aus DMPC/Cholesterin (3/2, mol/mol). Die Messung wurde bei  $0^\circ$  Neigungswinkel und verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Das Signal bei etwa  $-76$  ppm ist Hintergrundsignal. Schematisch abgebildet Gramicidin S mit den markierten Positionen. P/L =  $1/40$ .

Für GS-1/1' ist in Anwesenheit von Cholesterin ein Pulverspektrum zu erkennen. Eine oberflächliche Bindung von Gramacidin S an die Modellmembran ist nicht mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen, welche für GS-3/3' gewonnen werden konnten [8]. Bei 40°C zeigt sich ein erhöhtes isotropes Signal. Hier ist es möglich, dass es sich um ungebundenes Peptid handelt.

GS-1/1' und GS-3/3' wurden anschließend in Suspensionen der natürlichen Biomembranen gemessen. Da für diese Membranen der Phosphatgehalt der Phospholipide bestimmt wurde (siehe 4.2.6), ist das Peptid (P) zu Phospholipid (PL) Verhältnis angegeben (P/PL). Das P/PL-Verhältnis lag bei 1/40. In Abbildung 5.26 sind die  $^{19}\text{F}$ -Spektren dargestellt. Die Messungen erfolgten bei den gleichen Temperaturen wie für die synthetischen Membranen, obwohl in diesem Bereich kein Phasenübergang  $T_C$  der Biomembranen mittels DSC zu detektieren war.

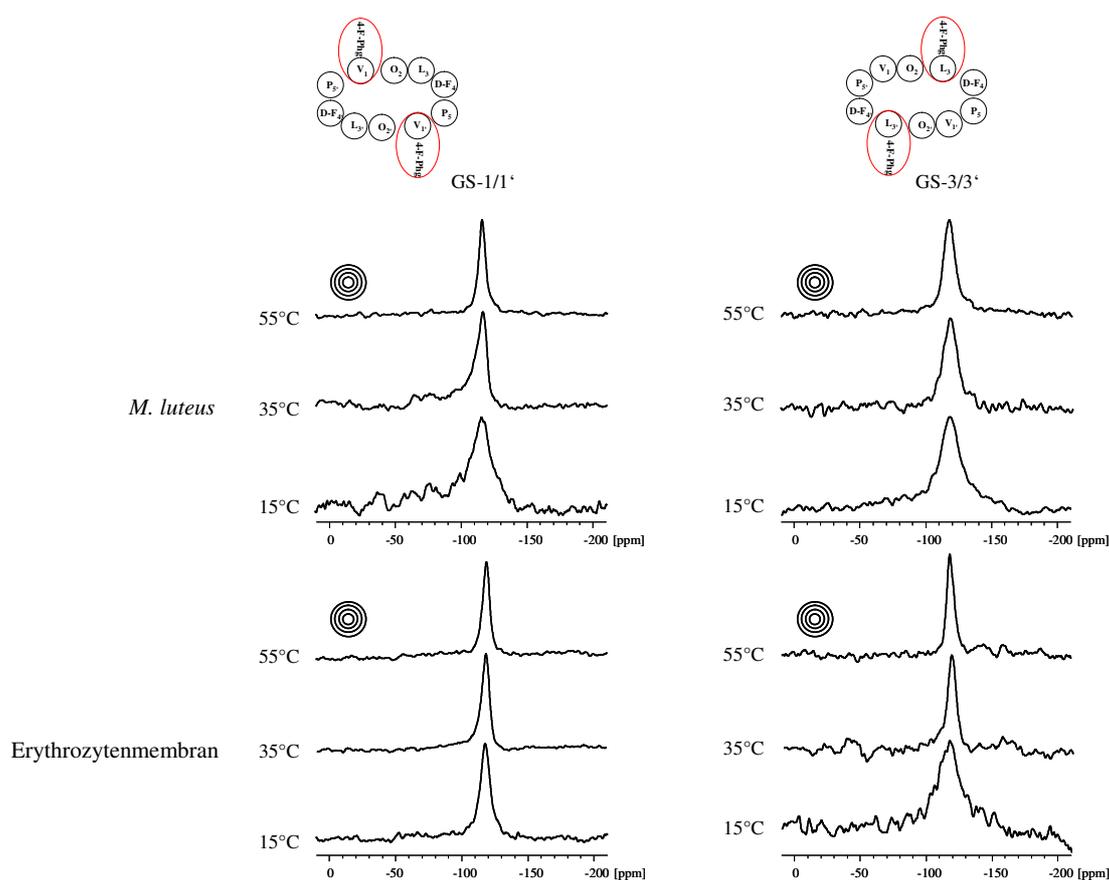


Abb. 5.26: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von GS-1/1' und GS-3/3' in Suspensionen natürlicher Biomembranen. Die Messungen wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, welche ebenfalls für die synthetischen Membranen verwendet wurden. Schematisch abgebildet ist Gramacidin S mit den jeweils markierten Positionen. P/PL = 1/40.

Bei niedriger Temperatur sind für alle Membransysteme (außer die Erythrozytenmembranen mit GS-1/1') breite (etwa 50 ppm) symmetrische Signale bei  $\sim -117$  ppm zu erkennen. Diese werden bei Erhöhung der Temperatur stetig schmaler, allerdings nicht so stark wie bei DMPC/DMPG (3/1, mol/mol). Die Erythrozytenmembranen mit GS-1/1' zeigen ein leicht schmaleres Signal von etwa 36 ppm bei  $15^\circ\text{C}$ , das temperaturabhängige Verhalten in Hinblick auf Verschmälerung ist aber das Gleiche. Die Spektren sind vergleichbar mit den MLVs der synthetischen Phospholipide, welche sich in der flüssig-kristallinen Phase befinden. Da in dem gemessenen Temperaturbereich weder eine plötzliche Veränderung der Linienform noch ein Pulverspektrum zu erkennen sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Biomembranen in der flüssig-kristallinen Phase befinden.

Gramicidin S Analoga wurden als nächstes in makroskopisch orientierten Protoplasten untersucht. Abbildung 5.27 zeigt die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren, gemessen mit den gleichen Temperaturen wie die Suspensionen. Die Spektren wurden bei  $0^\circ$  Neigungswinkel aufgenommen. Das P/PL-Verhältnis lag bei 1/40.

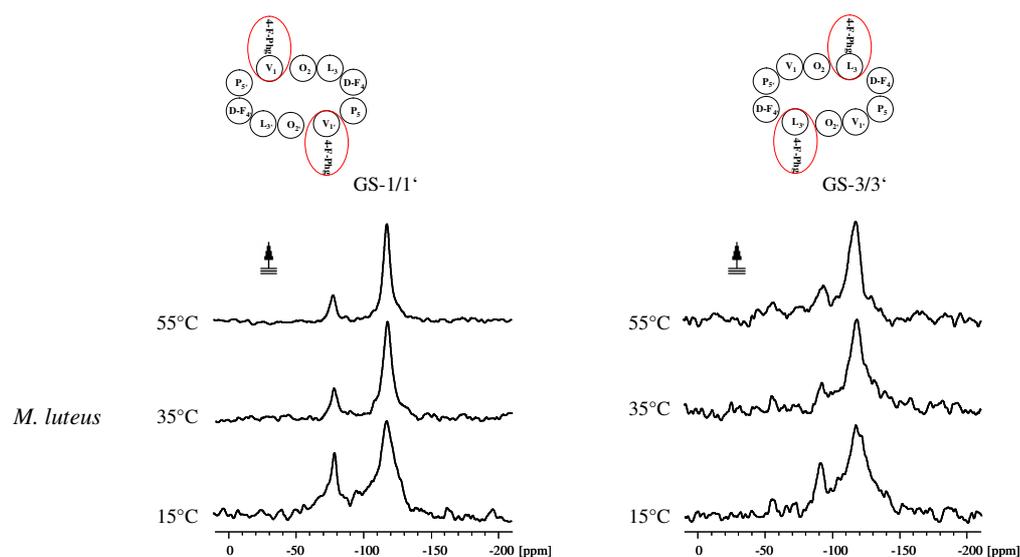


Abb. 5.27: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von GS-1/1' und GS-3/3' in orientierten Protoplasten. Die Messungen wurden bei verschiedenen Temperaturen, welche ebenfalls für die Suspensionen verwendet wurden, und  $0^\circ$  Neigungswinkel durchgeführt. Die jeweils zusätzlichen kleinen Peaks für GS-1/1' bei etwa -80 ppm sind Hintergrundsignalen zuzuordnen. Schematisch abgebildet ist Gramicidin S mit den jeweils markierten Positionen. P/PL = 1/40

Das Signal ist bei  $15^\circ\text{C}$  am breitesten und wird, vergleichbar mit GS-1/1' in DMPC/DMPG, während der Temperaturerhöhung schmaler. Gleiches kann für GS-3/3' beobachtet werden. Der

Peak bei etwa -117 ppm zeigt für GS-1/1' einen Zustand, der als eine an die Oberfläche der Membran gebundene Ausrichtung interpretiert werden kann [8]. Generell können die Ergebnisse der Protoplasten mit den Spektren der synthetischen Phospholipide DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) verglichen werden, da diese als Modell für prokaryotische Membranen anzusehen sind. Abbildung 5.28 zeigt  $^{19}\text{F}$ -Spektren von Proben mit Gramicidin S Analoga in orientierten Erythrozytenmembranen. Die gemessenen Temperaturen waren wie in den Suspensionen, und die Spektren wurden bei  $0^\circ$  Neigungswinkel aufgenommen. Das P/PL-Verhältnis lag bei 1/40.

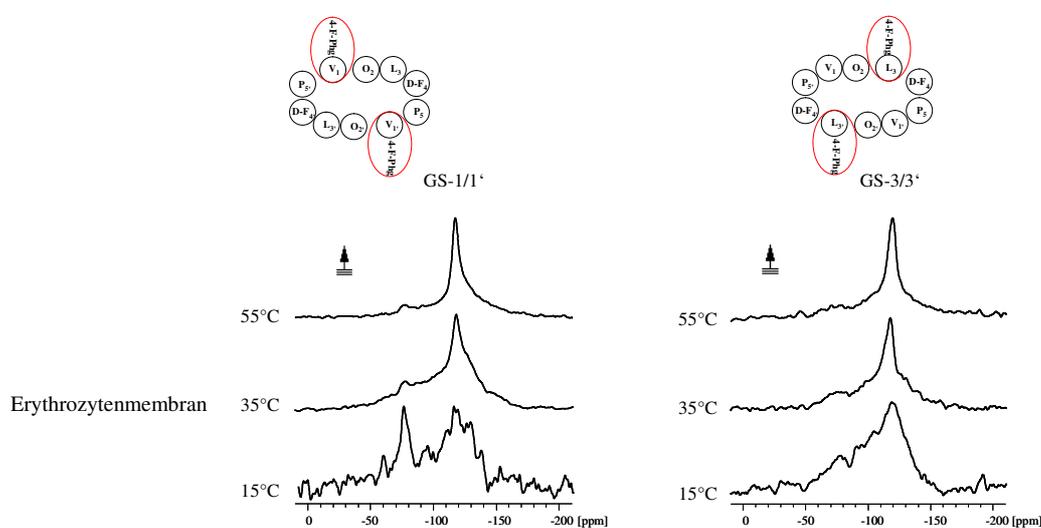


Abb. 5.28: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von GS-1/1' und GS-3/3' in orientierten Erythrozytenmembranen. Die Messungen wurden bei verschiedenen Temperaturen, welche ebenfalls für die Suspensionen verwendet wurden, und  $0^\circ$  Neigungswinkel durchgeführt. Schematisch abgebildet ist Gramicidin S mit den jeweils markierten Positionen. P/PL = 1/40

Für beide Peptide, GS-1/1' und GS-3/3', ist in den Erythrozytenmembranen das Signal bei  $15^\circ\text{C}$  ebenfalls sehr breit und wird durch Temperaturerhöhung schmaler und größer. Eine oberflächengebundene Ausrichtung kann auch hier durch den Peak bei etwa -117 ppm beobachtet werden. Ebenso ist es aber auch möglich, dass es sich um ungebundenes Peptid handelt. Zusätzlich ist ein Pulverspektrum zu erkennen, welches stark bei niedrigen Temperaturen ausgebildet ist, aber auch noch mit hohen Temperaturen detektiert werden kann. Hier können ebenfalls die Ergebnisse mit den Spektren der synthetischen Phospholipide DMPC/Cholesterin verglichen werden, welche als Modell für eukaryotische Membranen dienen.

## 5.6 Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie von $^{19}\text{F}$ -markiertem PGLa in natürlichen Membranen

Für die  $^{19}\text{F}$ -NMR Messungen von PGLa in natürlichen Biomembranen wurden jeweils zur Kontrolle  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Diese zeigten kein Austrocknen der Proben während der Messungen oder Veränderungen der Orientierung.

PGLa wurde zum Teil in einer vorangegangenen Arbeit aus unserer Gruppe in beiden hier verwendeten natürlichen Membranen untersucht. Dies geschah mit Suspensionen, welche ein starkes isotropes Signal sowie eine partielle oberflächliche Bindung an die Membranvesikel für PGLa zeigten. Deshalb sollen hier nur orientierte Membranen dargestellt werden. Auch wurden erste Untersuchungen mit  $^{13}\text{C}$ -Phg PGLa an orientierten Membranen durchgeführt. Trotzdem werden hier, der Vergleichbarkeit halber, die Ergebnisse aller vier Markierungen (9, 10, 13 und 14CF<sub>3</sub>-Phg PGLa) vorgestellt.

Markiertes PGLa wurde in einem P/PL-Verhältnis von 1/40 mit den Protoplasten von *M. luteus* inkubiert und makroskopisch auf Glasplättchen orientiert. Die Messungen erfolgten bei 0° Neigungswinkel und 35°C. Abbildung 5.29 zeigt die gemessenen  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren.

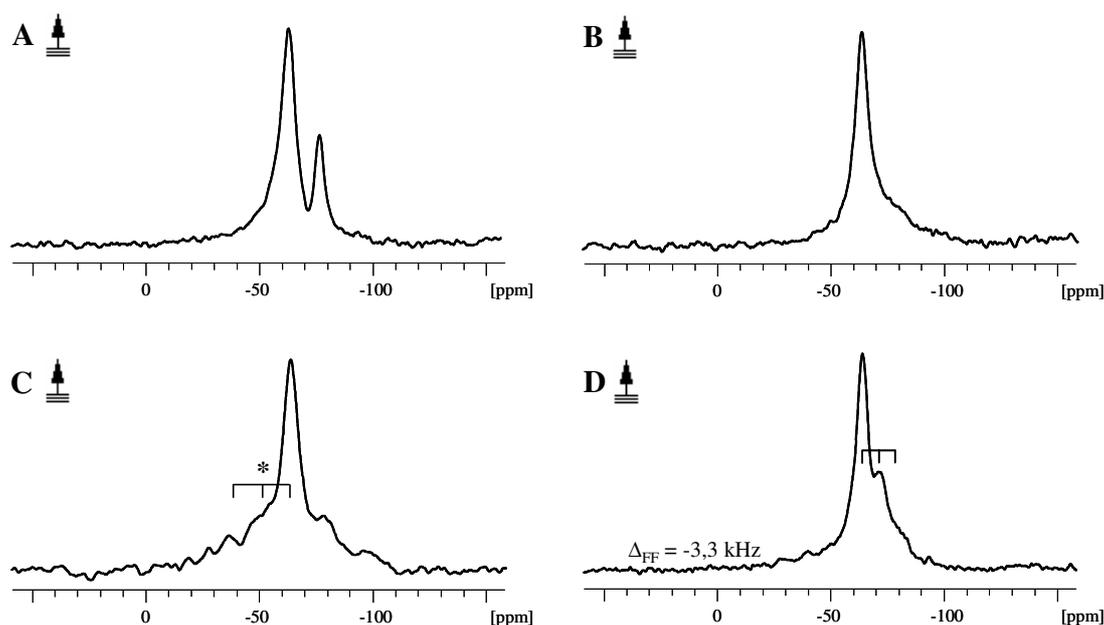


Abb. 5.29: Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von markiertem PGLa in Protoplasten von *M. luteus*, makroskopisch auf Glasplättchen orientiert. A) Inkubiert mit  $9\text{CF}_3$ -Phg PGLa (der zusätzlich kleinere Peak bei etwa  $-77$  ppm ist Hintergrundsignal). B) Inkubiert mit  $10\text{CF}_3$ -Phg PGLa. C) Inkubiert mit  $13\text{CF}_3$ -Phg PGLa. D) Inkubiert mit  $14\text{CF}_3$ -Phg PGLa. Die dipolaren Aufspaltungen für A) und B) liegen bei  $0$  kHz (wie für den vermuteten S-state bekannt), und sind daher nicht angegeben. In C) ist nicht die dipolare Aufspaltung des Signals gezeigt (da nicht eindeutig identifizierbar), sondern der aus Membranmodellen bekannte Wert von  $+6$  kHz, daher mit einem Stern markiert [101]. Für D) ist die dipolare Aufspaltung mit einer Genauigkeit von  $0,5$  kHz ermittelt. Die Messungen erfolgten bei  $35^\circ\text{C}$ , jeweils mit  $0^\circ$  Neigungswinkel. Das P/PL-Verhältnis lag bei  $1/40$ .

Die Spektren zeigen für alle gemessenen Markierungen ein starkes isotropes Signal, welches die Spektren dominiert. Für  $13\text{CF}_3$ -Phg PGLa kann die dipolare Aufspaltung nicht eindeutig identifiziert werden, und ist daher beispielhaft für den in der orientierten Modellmembran DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) bekannten Wert angegeben [101]. Obwohl für die  $^{31}\text{P}$ -Spektren der natürlichen Biomembranen ein hoher mosaic spread zu beobachten ist (siehe Abb. 5.23), sind die  $^{19}\text{F}$ -Spektren generell vereinbar mit einem starken isotropen Signal sowie einigen Molekülen, die sich im S-state befinden. In Tabelle 5.5 sind die in der orientierten Modellmembran DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) bei  $55^\circ\text{C}$  ermittelten dipolaren Aufspaltungen der vier markierten Peptide, welche dem S-state entsprechen, aufgestellt.

Tab. 5.5: Dipolare Aufspaltungen, welche dem S-state der vier markierten PGLa Analoga in der orientierten Modellmembran DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) bei 55°C entsprechen [101].

T [°C]	$\Delta_{FF}$ [kHz]			
	9CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	10CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	13CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	14CF <sub>3</sub> -Phg PGLa
55	0	0	+6	-4,5 kHz

Die markierten PGLa Peptide wurden anschließend in orientierten Erythrozytenmembranen gemessen. Abbildung 5.30 zeigt die <sup>19</sup>F-Spektren, aufgenommen bei 35°C sowie 0° Neigungswinkel. Das P/PL-Verhältnis lag hier ebenfalls bei 1/40.

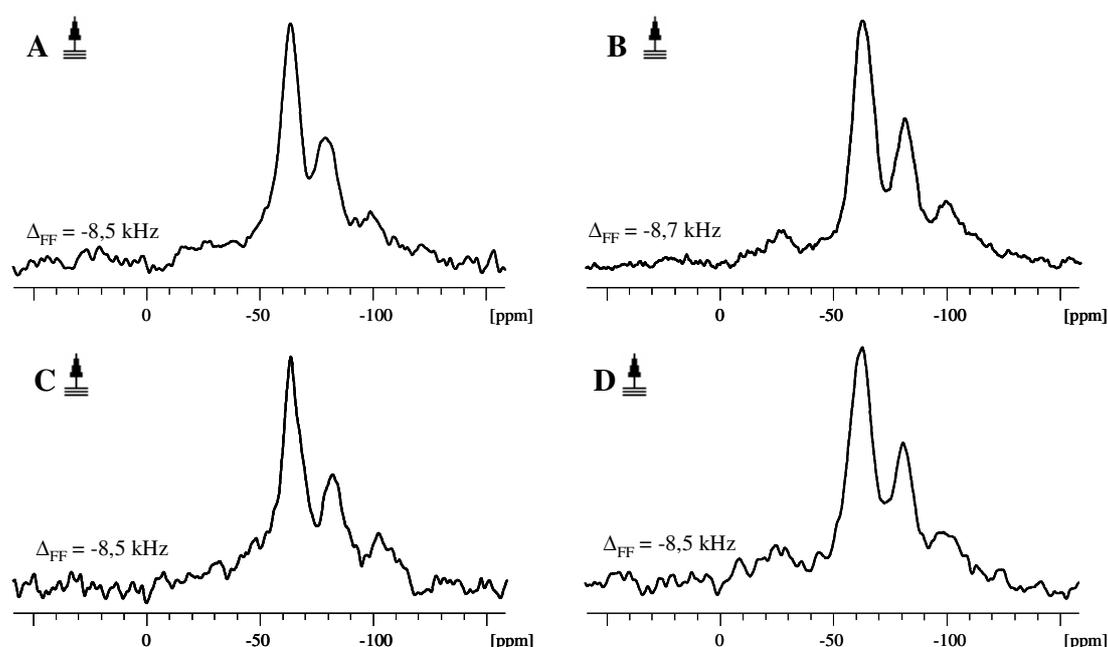


Abb. 5.30: Festkörper-<sup>19</sup>F-NMR-Spektren von markiertem PGLa in Erythrozytenmembranen, makroskopisch auf Glasplättchen orientiert. A) Inkubiert mit 9CF<sub>3</sub>-Phg PGLa. B) Inkubiert mit 10CF<sub>3</sub>-Phg PGLa. C) Inkubiert mit 13CF<sub>3</sub>-Phg PGLa. D) Inkubiert mit 14CF<sub>3</sub>-Phg PGLa. Die Messungen erfolgten bei 35°C, jeweils mit 0° Neigungswinkel. Das P/PL-Verhältnis lag bei 1/40 und die dipolaren Aufspaltungen sind mit einer Genauigkeit von 0,5 kHz ermittelt.

Da die dipolaren Aufspaltungen sehr groß sind (~ -8,5 kHz), und bei Messungen mit 90° Neigungswinkel für alle vier markierten Peptide keine Spiegelung an der isotropen Position um den Wert  $-\frac{1}{2}$  zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt), können für die Erythrozytenmembranen, im

Gegensatz zu den Ergebnissen der Protoplasten, Pulverspektren detektiert werden. Das weist auf unorientiertes und immobiles Peptid hin. Das isotrope Signal ist hingegen nicht so ausgeprägt wie in *M. luteus*.

### 5.7 Relaxationsmessungen von $^{19}\text{F}$ -markiertem PGLa in Membranmodellen

Für die Untersuchung der lokalen Beweglichkeit eines Peptides, welches an die Membran gebunden ist, kann z.B. die Bestimmung von verschiedenen Relaxationszeiten verwendet werden. Die am häufigsten verwendeten Zeiten sind  $T_1$  und  $T_2$ . Hierbei beschreibt die  $T_1$  Zeit die longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxation, welche von schneller Dynamik dominiert ist und in Feldrichtung stattfindet. Die  $T_2$  Zeit hingegen ist definiert als transversale oder Spin-Spin-Relaxation, wird von langsamer Dynamik dominiert und ist senkrecht zur Feldrichtung [134, 138].

Diese Relaxationszeiten sollten hier systematisch für PGLa, markiert mit 4- $\text{CF}_3$ -Phg an den Positionen 3, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18 und 20, gemessen werden, um ein sequenzabhängiges Profil zu erhalten. Erste Messungen für die Ermittlung der  $T_1$ -Werte wurden in orientierten Membranmodellen, bestehend aus DMPC/DMPG (3/1, mol/mol), und einem P/L von 1/50 durchgeführt. Die Temperaturen wurden derart gewählt, dass die jeweiligen Orientierungszustände von PGLa (S-state, T-state und I-state) bekannt waren. Abbildung 5.31 zeigt graphisch dargestellt die ermittelten Werte.

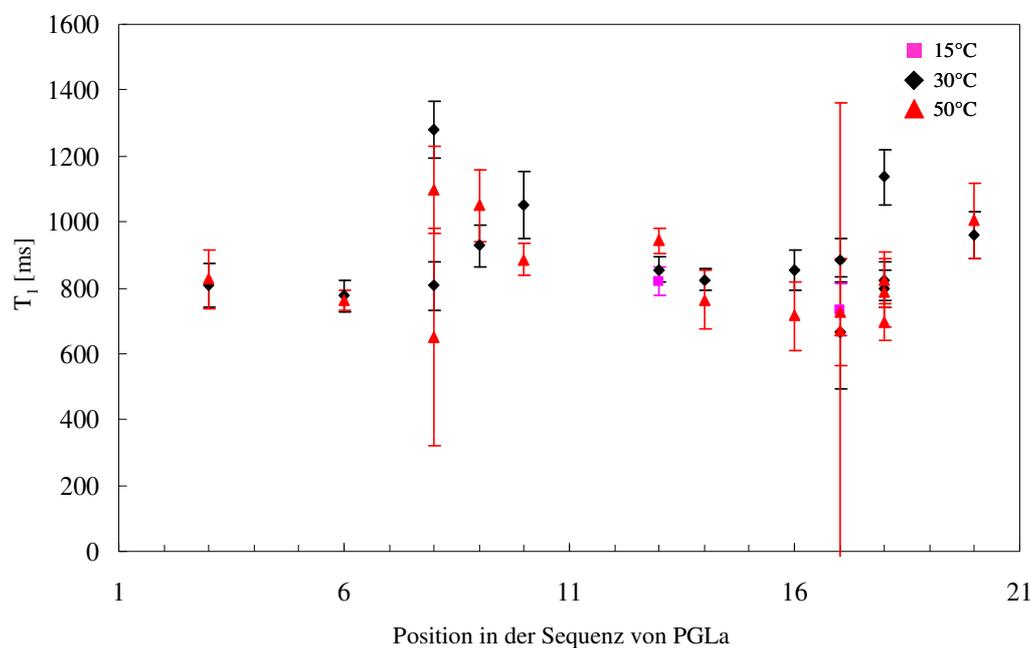


Abb. 5.31: Als Graphik dargestellt die ermittelten  $T_1$ -Werte der verschiedenen Positionen in der PGLa Sequenz. Die Messungen wurden bei 15°C, 30°C und 50°C sowie 0° Neigungswinkel durchgeführt.

Bei einigen Proben war es nicht möglich, durch Wiederholungsmessungen die gleichen Werte zu reproduzieren (Ausreißer, z.B. bei Positionen 8 und 18). Das lag vermutlich an  $^1\text{H}$  Entkopplungen, wodurch zusätzliche intrinsische Wärme in den Proben entsteht. Zusammen mit langen Messzeiten führte das zu Trocknungseffekten der Proben, was mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Als mögliche Lösung wurden vorgeschlagen, die Proben bei 54,7° Neigungswinkel, dem magischen Winkel (MA), zu messen. Da hier die dipolaren Kopplungen durch Phospholipidrotationen ausgemittelt werden, also keine Anisotropie mehr vorhanden ist, entfällt die Notwendigkeit der  $^1\text{H}$  Entkopplung. Dadurch entsteht nur noch wenig intrinsische Wärme und die Messmethode ist schonender für die Probe, da die Gefahr der Austrocknung minimiert wird. Unter diesem Winkel wurden die Messungen für  $T_1$  bei 30°C wiederholt (Abb. 5.32).

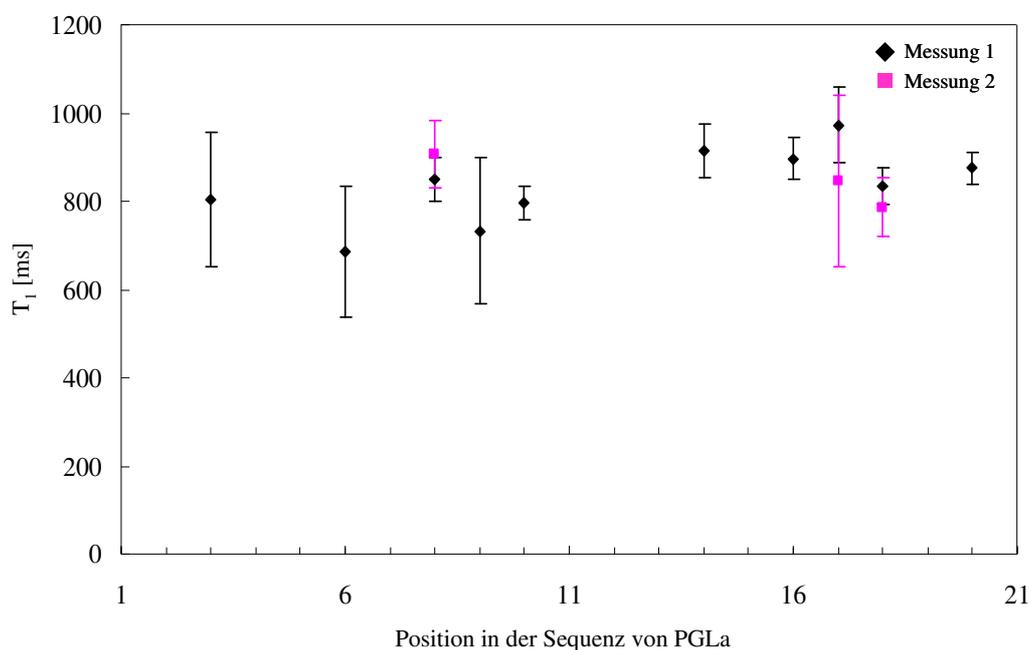


Abb. 5.32: Graphische Darstellung der Messwiederholungen der  $T_1$ -Werte, diesmal mit dem magischen Winkel (MA). Für die Positionen 8, 17 und 18 wurden zwei Messungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des MA zu testen. Hier entfällt die sonst nötige  $^1\text{H}$  Entkopplung, was sich als schonender für die Proben herausgestellt hat.

Bei den Messungen mit MA war das Austrocknen der Proben nicht mehr zu beobachten und die Werte reproduzierbar. Die gemessenen Werte für  $T_1$  sind über die Sequenz von PGLa gleichmäßig verteilt und liegen im Schnitt bei 800 ms. Es können also mit  $T_1$  keine sequenzabhängigen Beweglichkeiten detektiert werden.

Als nächstes sollten die  $T_2$ -Werte ermittelt werden. Die Messungen erfolgten ebenfalls  $^1\text{H}$  entkoppelt mit der Probenposition des MA und bei  $30^\circ\text{C}$  (Abb. 5.33).

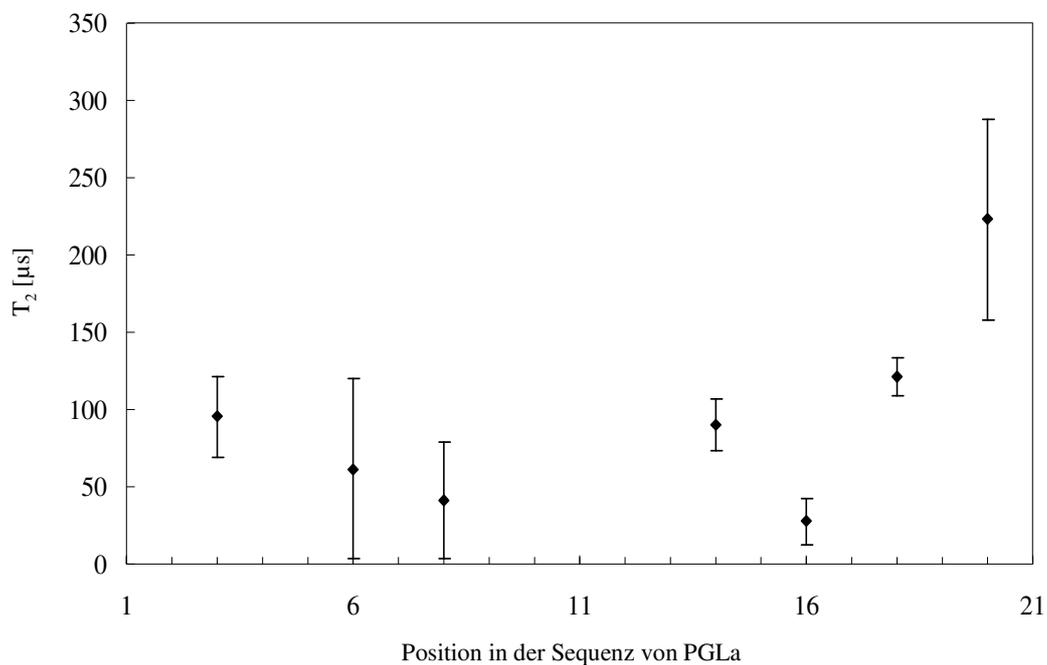


Abb. 5.33: Graphik der gemessenen  $T_2$ -Werte der  $^{19}\text{F}$  markierten Positionen von PGLa. Die Messungen wurden bei  $35^\circ\text{C}$  und dem MA durchgeführt.

Die  $T_2$ -Messwerte sind zumindest für den C-Terminus größer (bis zu  $223 \mu\text{s}$ ) als für die restliche Sequenz. Hier liegen die Werte zwischen  $25$  und  $95 \mu\text{s}$ . Somit kann für die Bewegungen, welche zu  $T_2$  beitragen, eine Sequenzabhängigkeit beobachtet werden. Zur genaueren Bestimmung dieser Sequenzabhängigkeit sind weitere Messungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr angefertigt wurden (siehe Ausblick).

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Evaluierung der Membranvesikel von *Pseudomonas aeruginosa* als Membranmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurde das strukturelle Verhalten und die Orientierung von zwei AMPs, nämlich PGLa und Gramicidin S, an relevanten Membranmodellen untersucht. Diese zeichneten sich durch verschiedene Niveaus der Komplexität aus, bis hin zu natürlichen Biomembranen. Während native eukaryotische und prokaryotische (aus Gram-positiven Bakterien) Plasmamembranmodelle sowohl verfügbar als auch geeignet für die Methoden der Strukturbiologie waren (Erythrozytenmembranen und Protoplasten von *M. luteus*), fehlten entsprechende Modelle für die äußere Membran Gram-negativer Bakterien. Dafür war es nötig zu versuchen, Strukturen zu erhalten, die die äußere Membran widerspiegeln und somit diese Lücke füllen können. Es bestand die Vermutung, dass sich hierfür Membranvesikel eignen, welche natürlicherweise von *P. aeruginosa* während des Wachstums abschnürt und in die umgebende Matrix abgegeben werden [64]. Diese Membranvesikel wurden hier nun evaluiert. Gewonnen werden konnten sie mittels Ultrazentrifugation [64]. Anschließend erfolgte die Untersuchung auf deren Einsatzmöglichkeiten in der Festkörper-NMR-Spektroskopie als Membranen auf Festkörperoberflächen (Glasplättchen) sowie in Form von Suspensionen. Dies sollte ähnlich wie für die schon bekannten Erythrozytenmembranen und Protoplasten erfolgen. Schon durch die Aufnahme von  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der pelletierten Membranvesikel als Suspension (Abb. 5.4) konnte beobachtet werden, dass für die Lipide, welche Doppelschichten ausbilden, kaum ein Signal zu detektieren war. Sie zeigten hauptsächlich zusammen mit einem isotropen Signal ein breites, über 200 ppm großes  $^{31}\text{P}$ -Signal, welches einem statisch axial unsymmetrischen Pulverspektrum für Phospholipide entsprach (z.B. 160 ppm für DMPC). Stammt das beobachtete breite Signal tatsächlich von den Phospholipiden, dann mussten diese rotationssymmetrisch immobilisiert vorliegen. Das isotrope Signal war aber unter anderem höchstwahrscheinlich phosphathaltiger NA zuzuordnen, da diese in die sezernierten Membranvesikel gepackt wurde [65, 66] und nicht mittels Nukleinsäureverdau abbaubar war. Dies konnte mittels elektrophoretischer Analyse nachgewiesen werden (Abb. 5.2). Auch enthielt

die Matrix, aus welcher die Membranvesikel isoliert wurden, weiteres Material wie Flagellen, Pili und Pyocins [64] sowie amyloide proteinogene Fibrillen. Diese proteinogenen Komponenten waren in natürlichen Biofilmen und ebenfalls bei planktonischen Zellen vorhanden, wurden fortwährend während des Wachstums sezerniert und konnten nicht abgetrennt werden [172]. Die Anwesenheit dieser hochmolekularen Anordnungen führte eventuell zu der oben beschriebenen Immobilisierung der Membranlipide. Somit waren in den Präparationen der Membranvesikel eher Protein/Lipid Komplexe als pure Membranen vorhanden. Noch wahrscheinlicher aber war die Ausbildung der breiten  $^{31}\text{P}$ -Signale aufgrund lankettiger und phosphathaltiger NA. Diese beiden Faktoren, NA und Proteine, konnten zudem mit den AMPs und der Membran selber interagieren und in Wechselwirkung treten. Die Interaktionen fanden möglicherweise bis zu einem gewissen Grad auch *in vivo* statt und benötigten daher separate Untersuchungen, die Frage nach Wechselwirkungen zwischen AMPs und den Gram-negativen Membranen konnte aber in deren Anwesenheit nicht beantwortet werden. Somit waren die abgeschnürten, aus der äußeren Membran bestehenden Membranvesikel von *P. aeruginosa* ohne weitere Optimierung der Präparation nicht für den Einsatz als Membranmodelle in der Strukturbiologie, z.B. für die Festkörper-NMR-Spektroskopie, geeignet.

Zudem war die Ausbeute der präparierten Membranvesikel sehr gering und stellte somit einen zeitlich limitierenden Faktor dar.

## 6.2 Die Evaluierung von Mischungen aus Lipiden und Lipopolysacchariden als Membranmodelle

Da sich die Anwendung der Membranvesikel von *P. aeruginosa* für die Festkörper-NMR-Spektroskopie als nicht möglich erwies, wurden alternativ synthetisch einfachere Membranmodelle aus Lipiden hergestellt. Diese sollten das LPS enthalten, welches Phosphate besaß und somit für die  $^{31}\text{P}$ -NMR verwendet werden konnte [37]. Zunächst wurden s-LPS und r-LPS käuflich erworben, deren inhaltliche Zusammensetzung charakterisiert und die molekulare Masse mittels MALDI-TOF-Spektroskopie bestimmt (Abb. 5.5 und 5.6). Hierbei zeigte sich die große Heterogenität dieses Materials, da nicht eine definierte, sondern mehrere Massen parallel detektiert werden konnten. Die jeweils größte gemessene Masse wurde als höchste mögliche molekulare Masse angenommen. Diese lag für s-LPS bei etwa 5,5 kDa und für r-LPS bei etwa

3 kDa. Das entsprach im Grunde den erwarteten Werten, aber es konnten weitere ausgeprägte Signale detektiert werden. Ohne individuelle  $m/z$  Kalibrierung, welche unmöglich für alle detektierten Komponenten durchgeführt werden konnte, war diese Aussage natürlich nicht quantitativ.

Käuflich erworbenes s-LPS zeigte als Suspension bei der  $^{31}\text{P}$ -NMR Messung sowohl rein als auch zusammen mit DMPC keine Ausbildung einer lamellaren Phase, sondern ein isotropes Signal (Abb. 5.7). Entweder kam es bei reinem s-LPS nicht zur Ausbildung von Doppelschichten, sondern nur Mizellen, oder die frei beweglichen, langen Zuckerketten, welche Phosphatmoleküle enthielten und diese sich somit weit entfernt vom Lipid befanden, waren für das isotrope Signal verantwortlich. Die Tatsache, dass in der Mischung mit DMPC auch nur ein isotropes Signal beobachtet werden konnte (Abb. 5.14 A) ließ vermuten, dass es nicht zu einer makroskopischen Trennung von z.B. DMPC Vesikeln und s-LPS Mizellen kam. Das ließ den Schluß zu, dass sich beide Moleküle miteinander vermischten und keine Ausbildung einer gemischten lamellaren Phase stattfand. Daher bestand die Möglichkeit, dass die Bedingungen zur Herstellung orientierter Proben deren Ausbildung auf Glasplättchen zur Folge haben konnten. Es wurde aber beobachtet, dass die Orientierung der phosphathaltigen Moleküle in den Proben in Abhängigkeit zur Menge des verwendeten Lipids stand, und sich die Intensität des isotropen Signals mit Überschuß an Lipid stark verringerte. Das wiederum deutete eher auf eine Separierung der Moleküle hin. Allerdings hätte dies Mizellenbildung von s-LPS bedeutet, was schwierig in orientierten Proben gewesen wäre, da der flüssigkeitsgefüllte Raum zwischen den Lipidschichten zu gering war. Daher bestand die Möglichkeit, dass das isotrope Signal durch die Phosphate der NA verursacht wurde. S-LPS allein zeigte auch hier nur ein isotropes Signal, welches entweder auf nicht vorhandene LPS Orientierung oder ebenfalls auf frei bewegliche, lange Zuckerketten mit den enthaltenen Phosphatgruppen hinwies.

Das käuflich erworbene r-LPS zeigte ebenfalls mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR als Suspension ein isotropes Signal sowie das Fehlen eines 200 ppm breiten Signals (Abb. 5.8 A)). Im Gegensatz zu s-LPS konnte hier deutlich ein etwa 45 ppm breites Signal detektiert werden, was typischerweise in  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren für MLVs von Phospholipiden zu erkennen war. Vorherige Vermutungen, dass das isotrope Signal der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von den Phosphaten der langen Zuckerketten herrührte, waren mit dieser Beobachtung vereinbar. Natürlich wurde für r-LPS eine generelle Abnahme des molekularen Phosphatgehaltes erwartet. Auf der anderen Seite, vereinbar mit der Idee des

molekularen Lipidprofils, besaß r-LPS durch die kleinere Kopfgruppe eher die Fähigkeit, Doppelschichten auszubilden. Dies konnte durch die partielle lamellare Phase, welche z.B. auf die Ausbildung von Vesikeln hinwies, beobachtet werden. In [151] wurde, ebenfalls mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR, gefunden, dass ein beträchtlicher Teil von Re-LPS (eine kürzere, aber ähnliche Rauform) fast vollständig in Mischungen mit DMPC, PE-angereicherten Membranen und *E. coli* TLE inkorporiert wurde. Hingegen war Mizellisierung von Re-LPS in Mischungen mit Lecithin oder Lecithin/POPG zu beobachten. In dieser Arbeit hingegen war für r-LPS, gemischt mit den Lipiden POPE und *E. coli* TLE als Suspension, die Ausbildung nicht lamellarer Phasen zu beobachten (Abb. 5.8 B)). Das widersprach den Ergebnissen aus [151]. Die Diskrepanz zu den in dieser Arbeit gewonnenen Resultaten lag vermutlich an der Verwendung ähnlicher, aber nicht exakt gleicher Rauformen von LPS. Allerdings zeigten Proben auf Festkörperoberflächen von Mischungen mit r-LPS und DMPC oder DMPG eine partielle Orientierung der Phospholipide (Abb. 5.8 B)), was ähnlich zu den in [151] gewonnenen Resultaten sowie s-LPS/DMPC aus dieser Arbeit war (Abb. 5.7 B)). Die partiell orientierten Phospholipid/r-LPS Mischungen ließen aber einen erhöhten mosaic spread, im Gegensatz zu s-LPS/DMPC, erkennen. Es zeigte sich also, dass z.B. die allgemeine Aussage über die Inkorporation von Re-LPS in PE-angereicherten Membranen nicht zutreffend war und die unterschiedlichen PE-Lipide individuell getestet werden mussten.

Somit war der Einsatz von r-LPS für die Herstellung von LPS-haltigen Membranmodellen, besonders für die Festkörper-NMR-Spektroskopie, geeigneter als von s-LPS. Leider war zudem eine große Menge an NA in dem gekauften s-LPS zu detektieren, was mit dem Auftreten von isotropen  $^{31}\text{P}$ -NMR Signalen korreliert werden konnte. Diese waren stark in s-LPS-haltigen Membranmodellen ausgebildet, hingegen schwach in r-LPS-haltigen Membranmodellen. Die Erkenntnis, dass die isotropen Signale der Kontamination mit NA zuzuordnen waren, führte zu der Entscheidung, kommerzielles LPS nicht weiter zu verwenden.

Aufgrund der beschriebenen Verunreinigungen und zur besseren Vergleichbarkeit miteinander wurden s-LPS und r-LPS aus Bakterien isoliert, die der gleichen Gattung angehörten. Diese Extraktionen geschahen parallel zu den Membranvesikel Präparationen. Es wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet, wovon sich eine Methode als am besten geeignet herausstellte. Mit dem Wissen, dass sowohl NA als auch proteinogene Komponenten einen störenden Faktor darstellten, wurden die Extrakte gründlich daraufhin charakterisiert. Ebenso wurde auf die

Anwesenheit von LPS getestet. Hier konnte NA jeweils nur in Spuren nachgewiesen werden, in den Extrakten waren keine Proteine vorhanden, und die Nachweise auf LPS mittels Silberfärbung und auf KDO mittels Farbstoffbildung waren positiv. Anschließend wurden die molekularen Massen der extrahierten Moleküle mittels Massenspektrometrie detektiert. Diese war für s-LPS gleich zum gekauften Material (5,5 kDa), das extrahierte r-LPS hingegen zeigte eine größere Masse von 3,5 kDa. Zusammen mit den unterschiedlichen KDO-Werten für r-LPS konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem extrahierten LPS-Material um eine etwas andere Rauform als dem gekauften handelte [39, 40]. Auch entstammten die beiden r-LPS Moleküle aus verschiedenen Bakterienarten. Somit waren die LPS-Extrakte Mischungen und keine reinen chemischen Moleküle.

Um derselben Strategie, nämlich der Inkorporation von LPS-Molekülen in Mischungen mit Phospholipiden, zu folgen, wurden diese mit den Lipiden DMPC und DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR untersucht. Hierbei war eine stabile und temperaturunabhängige Ausbildung von Doppelschichten sowohl in Suspensionen als auch in orientierten Proben zu erkennen. Ebenso konnte eine partielle Orientierung von etwa 30% der phosphathaltigen Moleküle sowie nahezu kein isotropes Signal in den Proben detektiert werden (Abb. 5.12). Diese Beobachtung war unabhängig der Anwesenheit von s-LPS oder r-LPS. Das, zusammen mit dem Fehlen von NA, unterstützte die getroffenen Aussagen, dass das isotrope Signal von der Kontamination mit NA herrührte. Für die Mischungen mit *E. coli* TLE und POPE dagegen war die Ausbildung nicht lamellarer Phasen zu sehen. Dies bestätigte die vorherigen Ergebnisse, welche mit den kommerziell erworbenen LPS-Molekülen gewonnenen werden konnten. Hierbei erwiesen sich die DMPC/LPS-Mischungen als am besten orientierbar (Abb. 5.13).  $^{31}\text{P}$ -NMR Messungen mit diesen Mischungen mit unterschiedlichen Temperaturen zeigten keine großen Veränderungen der Signale, unterhalb von 25°C waren für s-LPS/DMPC und r-LPS/DMPC jeweils nur eine leichte Verbreiterung zu erkennen. Hier lag etwa der  $T_C$  der beiden Lipidmischungen (siehe 5.4.3), welche sich darunter also in der Gel Phase befanden. Da kein Aufkommen eines isotropen Signals detektiert wurde, konnte die Bildung von Mizellen und hexagonaler oder kubischer Phasen ausgeschlossen werden.

Das selbst extrahierte s-LPS war also besser für die Festkörper-NMR-Spektroskopie geeignet als das gekaufte. Es enthielt kaum NA und bildete gemischte Doppelschichten mit DMPC aus, was zu einer partiellen Orientierung auf Festkörperoberflächen führte. Die Unterschiede des selbst extrahierten r-LPS zum gekauften waren nicht so groß, da in beiden nur sehr wenig NA

nachgewiesen wurde. Somit konnte also ein stabiles Modellsystem, anwendbar für Untersuchungen von Membran-aktiven Peptiden mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie, gefunden und optimiert werden. Es war nur eine Frage der Zeit und zusätzlicher Experimente, um diese Membranmodellen für weitere Peptide zu verwenden. Begonnen wurde hier mit PGLa.

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie von Fluor-markiertem PGLa (Diskussion der Ergebnisse siehe Kapitel 6.3) basierte auf der Annahme, dass dieses  $\alpha$ -helikal vorlag. Erkenntnisse über die Struktur von PGLa in Anwesenheit von LPS-Molekülen sowie mögliche Wechselwirkungen wurden daher zunächst mittels CD-Spektroskopie bestimmt.

Es wurden die strukturellen Präferenzen von PGLa in Hinblick auf die Festkörper-NMR-Spektroskopie, aber auch eines weiteren AMPs, nämlich Gramicidin S, systematisch in verschiedenen komplexen Membranmodellen untersucht (Kapitel 5.4.2).

Wie erwartet zeigte PGLa in Wasser ein klassisches Spektrum für ungefaltete Peptide. Die partielle Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur (40,7%) konnte in TFE beobachtet werden, was mit vorherigen Ergebnissen übereinstimmte [110]. Bemerkenswert war die Tatsache, dass sogar in der Anwesenheit von zwitterionischen Detergentien wie DPC und lysoMPC ebenfalls die partielle Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix zu beobachten war (25,2% bzw. 43,1%). Die Mizellenbildung führte bei diesen Membranmodellen zu einem verminderten lateralen Druck sowie einer positiven Oberflächenkrümmung, was vermutlich die partielle Bindung der Peptide begünstigte. Somit war hier die Anwesenheit negativer Ladung nicht entscheidend, um eine  $\alpha$ -Helix zu induzieren. Das Detergens lysoPPG förderte in Korrelation zur anwesenden negativen Ladung eine erhöhte elektrostatische Anziehung und führte schließlich zur Bindung von PGLa und der Ausbildung von 66,3%  $\alpha$ -helikaler Anteile.

Als nächstes wurde PGLa mit Lipiden und Lipidmischungen gemessen, welche keine Mizellen, sondern Vesikel ausbildeten. Zusammen mit den zwitterionischen Lipiden DMPC und POPE lag PGLa hier meist ungefaltet vor, die Linienformen entsprachen einem statistischen Knäuel. Das ließ vermuten, dass tatsächlich unterschiedliche Oberflächenkrümmungen sowie der laterale Druck an den Lipid/Wasser Grenzflächen von Bedeutung waren. Aufgrund spezifischer Bandenintensitäten war aber für POPE weniger unstrukturiertes PGLa als für DMPC zu beobachten (Abb. 5.17 A) und C)). Allein die zusätzliche Anwesenheit von negativer Ladung in Form von s-LPS oder r-LPS reichte aus, um zu einer erhöhten elektrostatischen Anziehung von PGLa und somit zur Bindung und Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur zu führen.

Allerdings konnte für die Modellmembran r-LPS/POPE eine starke Aggregation von PGLa und Lipid/PGLa Komplexen beobachtet werden. Durch diese Aggregation erhöhte sich die Partikelgröße der Peptid/Lipid Vesikel und es kam zu erhöhter Streuung. Diese führte letztlich zu den beobachteten Spektren (Abb. 5.17 C)) mit veränderter Linienform und dem Auftreten von Absorption flattening [167]. Das korrelierte mit der Ausbildung nicht lamellarer Phasen, was auch mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR beobachtet werden konnte. DSC-Messungen zeigten für dieses Lipidgemisch ebenfalls Aggregation (Abb. 5.20).

Keine Veränderung des strukturellen Verhaltens von PGLa war durch die Anwesenheit von LPS-Molekülen in der negativ geladenen Lipidmischung DMPC/DMPG zu erkennen. Hier lagen die Peptide jeweils  $\alpha$ -helikal vor. Ähnliches war für die negativ geladene Lipidmischung *E. coli* TLE zu erkennen. In Mischungen mit s-LPS und r-LPS konnte allerdings eine partielle Aggregation von PGLa bzw. PGLa/Lipid Komplexen beobachtet werden, ähnlich der Modellmembran r-LPS/POPE. Jedoch war die Ausprägung nicht so stark.

Interessanterweise konnte bei der Verwendung von gekauftem s-LPS allein ein Spektrum beobachtet werden, was auf die Ausbildung eines erhöhten Anteils einer  $\alpha$ -Helix schließen ließ (Abb. 5.16). Im Gegensatz dazu zeigten die Spektren der selbst extrahierten s-LPS-Moleküle hohe Hintergrundabsorption (Abb. 5.17), welche durch Trübung verursacht wurde. Diese Trübung war trotz mehrmaliger Messungen mit verschiedenen Extrakten nicht zu beseitigen. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede der LPS-Moleküle war der unterschiedliche NA-Gehalt.

Gramicidin S zeigte aufgrund seines Anteils von 20% D-Aminosäuren keines der klassischen Peptid-CD-Spektren. Die gemessenen Linienformen stimmten aber mit bekannten Spektren von Gramicidin S überein [110]. Da hier zudem keine strukturellen Veränderungen nach der Bindung an Membranmodellen zu erkennen waren, handelte es sich bei dem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt mit zwei  $\beta$ -Wendungen Typ II' um eine sehr stabile Struktur. Für das Lipidsystem r-LPS/POPE konnte, wie für PGLa beschrieben, Aggregation der Peptide bzw. der Peptid/Lipid Komplexe beobachtet werden. Weniger ausgeprägt war das Aggregationsverhalten bei r-LPS/*E. coli* TLE und reinem r-LPS. Die Spektren der selbst extrahierten LPS-Moleküle allerdings zeigten hier interessanterweise nicht das gleiche hohe Maß an Aggregation. Bedingt durch das Fehlen von Veränderungen in den verschiedenen Membranmodellen war es nicht möglich, eine eindeutige Bindung von Gramicidin S an die Membranen zu detektieren. Diese Bindung konnte aber indirekt gezeigt werden, da in Anwesenheit des Peptids die genannte Aggregation zu beobachten

war. Die globale Struktur veränderte sich also offensichtlich nicht, weder im gebundenen noch im ungebundenen Zustand, unabhängig der Komposition der Membranmodelle.

Eine weitere Methode, die zum Verständnis von Interaktionen und Wechselwirkungen zwischen Lipiden und verschiedenen Molekülen wie AMPs beitrug, war die DSC-Messung. Hierbei betrachtete man aber nicht, wie bei der CD-Spektroskopie, die Veränderungen auf Peptidseite, sondern die der Lipide durch Veränderungen deren polymorphen Verhaltens [128, 168].

Zunächst wurde der Einfluss von LPS auf den Polymorphismus der Lipidsysteme ermittelt. Das Lipidgemisch *E. coli* TLE zeigte aufgrund seiner heterogenen Zusammensetzung (PE, PC, CL u.a.) in dem gemessenen Temperaturbereich keinen Phasenübergang  $T_C$ . Dieser war ebenfalls zusammen mit LPS nicht zu beobachten. Für die Lipide oder Lipidmischungen DMPC und DMPC/DMPG traten keine zusätzlichen Übergänge auf, was auf eine Vermischung der Lipide und LPS miteinander hinwies. Das Lipid POPE hingegen zeigte in Anwesenheit der LPS-Moleküle keinen Übergang  $H_{II}$  mehr in die hexagonale Phase. Zusätzlich traten zusammen mit s-LPS zwei Peaks für  $T_C$  auf (Abb. 5.19 C)). Das deutete auf eine partielle Separierung der Lipide und somit Heterogenität hin. Es konnten aber allgemeine deutliche Einflüsse auf die Phasenübergänge  $T_C$  durch die Zugabe von LPS detektiert werden. Diese verloren in allen Fällen an Intensität und wurden breiter, somit waren kooperativ die Enthalpie und der Übergang erniedrigt. Die Beobachtungen konnten unabhängig der Anwesenheit von s-LPS oder r-LPS gemacht werden.

Die LPS-Moleküle allein zeigten ebenfalls in dem gemessenen Temperaturbereich keine Phasenübergänge. Es konnte gezeigt werden, dass deren thermale Übergänge nicht im gemessenen Bereich lagen. Das war bedingt durch die relativ starken Verknüpfungen der einzelnen Zucker miteinander sowie der dadurch einhergehenden Fähigkeit, intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können. Für Lipid A dagegen waren Phasenübergänge zwischen  $-23^{\circ}\text{C}$  und  $40^{\circ}\text{C}$  zu beobachten [144]. Hingegen konnte in [143] für LPS R60, was der Ra-Form des LPS von *Salmonella minnesota* Stamm R60 entsprach, ein sehr breiter Phasenübergang mit einem Maximum bei etwa  $36^{\circ}\text{C}$  gezeigt werden. Die Diskrepanz zu den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lag vermutlich an den verwendeten Raufornen, welche zwar ähnlich, aber nicht gleich waren. Auch entstammten sie verschiedenen Bakterien und unterschieden sich somit eventuell im Lipid A Anteil.

Obwohl mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden konnte, dass PGLa mit den Membranmodellen, sobald negative Ladungen vorhanden war, interagiert, hatten diese Wechselwirkungen keinen großen Einfluss auf das Phasenverhalten der Lipidgemische mit DMPC und s-LPS/DMPC/DMPG. Somit war die Wirkung von s-LPS und r-LPS auf das Phasenverhalten dieser Lipide größer als durch das AMP PGLa. Hingegen zeigte der Phasenübergang  $T_C$  für DMPC/DMPG eine Verengung sowie Verschiebung zu tieferen Temperaturen. Das sprach für eine Stabilisierung der  $L_\alpha$  Phase bei Anwesenheit von PGLa, dessen Bindung an die Modellmembran mittels CD- und Festkörper-NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte. Vermutlich ähnlich der Erhöhung der Ionenkonzentration [170] konnte hier durch das Peptid ein teilweises Verschwinden der „Schwamm Phase“ von DMPG beobachtet werden.

Der Übergang in die hexagonale Phase  $H_{II}$  von POPE verschob sich durch PGLa zu tieferen Temperaturen. Das sprach für eine mögliche Stabilisierung von  $H_{II}$ . Durch die Anwesenheit von PGLa in der s-LPS/POPE Modellmembran war nur noch ein Peak zu erkennen, die Anwesenheit des Peptids führte zur stärkeren Vermischung der Lipide (Abb. 5.20).

Für alle Membranmodelle konnte in Anwesenheit von r-LPS Membranaggregation beobachtet werden (Abb. 5.20).

### **6.3 Orientierung und Verhalten von PGLa und Gramicidin S in Membranmodellen und Biomembranen**

PGLa zeigte in synthetischen Membranmodellen konzentrations- und temperaturabhängige Orientierungsänderungen (siehe Kapitel 2.2.1) [4-7, 96, 100, 101]. Diese Orientierungszustände wurden als S-state, T-state und I-state bezeichnet. Hierbei nahmen die Peptide entweder eine oberflächengebundene Ausrichtung ein („S“), lagen gekippt in der Membran („T“) oder waren senkrecht inseriert („I“). Tabelle 6.1 zeigt die in der orientierten Modellmembran DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) ermittelten dipolaren Aufspaltungen der vier markierten Peptide, welche den drei Zuständen bei einer charakteristischen Temperatur entsprachen. P/L lag hierbei jeweils bei 1/50.

Tab. 6.1: Dipolare Aufspaltungen, welche den Zuständen S- T- und I-state der vier markierten PGLa Analoga in der orientierten Modellmembran DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) bei einer charakteristischen Temperatur entsprachen. Die Werte wurden bei einem P/L von 1/50 ermittelt [101].

Orientierungs- zustand	T [°C]	$\Delta_{FF}$ [kHz]			
		9CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	10CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	13CF <sub>3</sub> -Phg PGLa	14CF <sub>3</sub> -Phg PGLa
S-state	55	0	0	+6	-4,5
T-state	35	-4,5	-3,4	-2,3	-5,3
I-state	15	-2,6	-5,8	-3,8	-6,5

Neben diesen drei erwähnten Orientierungszuständen waren zwei weitere wichtig: das isotrope Signal, welches frei bewegliches und unorientiertes Peptid anzeigte, sowie das Pulversignal. Für MLVs deutete diese Linienform auf immobiles und gebundenes Peptid, welches alle möglichen Orientierungen annahm, hin. In orientierten Proben bedeutete das Pulverspektrum nicht orientiertes, gebundenes und möglicherweise aggregiertes Peptid.

Diese Ergebnisse konnten nun als „Muster“ zur Identifizierung der Orientierungszustände von PGLa in LPS-haltigen Membranmodellen sowie natürlichen Biomembranen dienen und mit entsprechenden Interpretationen verglichen werden.

Die <sup>19</sup>F-NMR Messungen von PGLa in den Membranmodellen s-LPS/DMPC und r-LPS/DMPC (Abb. 5.14) erlaubten die Beobachtung möglicher bevorzugter Orientierungszustände des Peptids. Hierbei war die Untersuchung eines markierten Peptidanalogen natürlich nicht ausreichend für eine strukturelle Analyse, erste qualitative Unterscheidungen der vorgestellten fünf möglichen Zustände konnten aber getroffen werden.

Die großen dipolaren Aufspaltungen der CF<sub>3</sub>-Gruppe der markierten Peptide in beiden Lipidsystemen unterhalb von 35°C deuteten hier auf Pulverspektren hin [100], darüber wurden die Signale jeweils schmaler. Eventuell orientierten sich die Peptide in den I-state um, wofür die Aufspaltungen von etwa -5,5 kHz sprachen. Der S-state konnte nicht beobachtet werden, einzig für r-LPS/DMPC bei 55°C ließ sich eine positive Aufspaltung von +5,5 kHz erkennen. Durch die Messung mit 90° Neigungswinkel konnte gezeigt werden, dass hier der S-state vorlag. Aufgrund

der niedrigen Spektrenqualität konnte aber für die anderen Spektren dieser Membranmodelle keine eindeutige Aussage über die dipolaren Aufspaltungen oder über etwaige Orientierungen getroffen werden. Generell schien es möglich, dass für die Modellmembran r-LPS/DMPC bei den Messungen oberhalb des  $T_C$  von DMPC unter dem breiten isotropähnlichen Signal einige Intensitäten lagen, welche dem Verhalten von PGLa in Membranmodellen aus DMPC/DMPG (3/1, mol/mol) entsprachen [101]. Ähnliches war für das Lipidsystem mit s-LPS zu detektieren, hier war der Anteil dieses isotropähnlichen Signals sogar noch geringer. Diese Beobachtungen bedeuteten entweder, dass a) ein schnelles Gleichgewicht zwischen dem S- und I-state herrschte oder b) es zu einer partiellen Trennung von Lipid und LPS kam, wobei sich dabei einige Peptidpopulationen in der „DMPC-Fraktion“ befanden und das isotrope Signal nur durch Peptide verursacht wurde, welche zusammen mit LPS vorlagen. Da aber die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der Membranmodelle (Abb. 5.13) kein großes isotropes Signal zeigten, war die unter a) vorgestellte Erklärung wahrscheinlicher.

In vorausgegangenen Arbeiten mit einem markierten PGLa Analogon konnte beobachtet werden, dass PGLa in Protoplasten von *M. luteus* für verschiedene Temperaturen und Konzentrationen jeweils ein starkes isotropes Signal sowie partiell den S-state zeigte [101, 173]. Dieses parallele Vorkommen mehrerer Peptidpopulationen konnte durch die Komplexität der natürlichen Membranen, laterale Phasentrennung und das Auftreten von Membrandomänen und -defekten [14-16] erklärt werden. Auch war die Messung mit einem markierten PGLa nicht ausreichend, um genügend Informationen zu erlangen. Mit Hilfe weiterer markierter PGLa Peptide an verschiedenen Positionen wurden die ermittelten Zustände überprüft. Hier war jeweils bei physiologischer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  ein isotropes Signal zu beobachten. Die Spektren ließen zudem Interpretationen zu, wonach sich Populationen von PGLa im S-state befanden. Somit konnten die Erkenntnisse aus [101] mittels weiterer markierter PGLa Analoga bestätigt werden.

Die Orientierung von  $^{13}\text{CF}_3$ -Phg PGLa wurde ebenfalls in vorausgegangenen Arbeiten in orientierten Erythrozytenmembranen untersucht. Es war ein isotropes Signal und bei sehr hoher Temperatur und hohem P/PL-Verhältnis sogar partiell der S-state zu beobachten [101, 173]. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere markierte PGLa Peptide untersucht. Hierbei konnten zusätzlich Pulverspektren beobachtet werden, die dipolaren Aufspaltungen waren größer als in Protoplasten (Abb. 5.30). Das konnte zum einen auf eventuelle immobile Aggregate von PGLa

hinweisen, zum anderen war es ebenso denkbar, dass PGLa alle Orientierungen zeigte, was einem möglichen carpet Mechanismus entsprach. Ebenfalls konnte durch die anionische Glykokalyx, welche eine ca. 140 nm starke Schicht auf den Erythrozytenmembranen bildete, der Zugang von AMPs zur Plasmamembran erschwert werden. Die unspezifische Bindung kationischer Peptide an die Glykokalyx war gleichfalls denkbar. Auch war bekannt, dass durch das vorhandene Cholesterin die eukaryotische Membran vor AMPs geschützt wurde. Für die Untermauerung der Annahme des möglicherweise vorliegenden carpet Mechanismus sowie den Einfluss von Cholesterin benötigte man weitere Untersuchungen mit cholesterinhaltigen Membranmodellen (siehe Ausblick).

Der I-state, welcher für die Ausbildung einer Pore postuliert war und für PGLa unter bestimmten Bedingungen deutlich in Membranmodellen gezeigt wurde [100, 101], konnte in den vorgestellten Biomembranen nicht detektiert werden. Fand eine Umorientierung und somit eine Porenbildung statt, handelte es sich hierbei um einen schnellen und vorübergehenden Vorgang, der mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie nicht detektiert werden konnte.

Mit Hilfe der  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten wurde ein lokales Bewegungsprofil von PGLa erstellt. Ziel solcher Messungen war es, Aggregationsverhalten, synergistische Effekte mit anderen Peptiden und Einfluß der Lipidphase auf das gebundene Peptid zu verstehen. Auch konnten Aussagen über die Struktur getroffen werden, wie z.B. die Enden einer  $\alpha$ -Helix aussahen.

Es zeigte sich, dass die Messungen mit dem magischen Winkel von  $54,7^\circ$  am geeignetsten waren, da durch die Art der Experimente lange Messzeiten entstanden. Diese wirkten sich bei  $0^\circ$  Neigungswinkel aufgrund der nötigen  $^1\text{H}$ -Entkopplung auf den Hydratationszustand der Proben aus. Durch das Entfallen der  $^1\text{H}$ -Entkopplung beim MA stellte sich dieses Messverfahren als schonender für die Proben heraus.

Die  $T_1$ -Relaxationszeit war durch schnelle Dynamik dominiert. Für diesen Zeitwert konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Helixenden und der mittleren Region detektiert werden. Das lag vermutlich daran, dass die Bestimmungen der  $T_1$ -Zeiten durch die schnellen Bewegungen der  $\text{CF}_3$ -Gruppe beeinflusst wurden. Da sich aber diese Gruppe nicht direkt im Peptidrückgrad befand, sondern mittels eines Linkers im Peptid eingeführt worden war, waren dessen Bewegungen weniger abhängig von den langsameren Bewegungen des Rückgrades. Im Gegenteil dazu konnten diese langsameren Bewegungen durch die  $T_2$ -Relaxationszeit beobachtet

werden, welche für die Detektion von langsamer Dynamik besser geeignet war. Hierdurch konnten für PGLa erhöhte Werte für  $T_2$  und somit dynamische Unterschiede am C-Terminus, verglichen mit der mittleren Region des Peptids, detektiert werden. Das entsprach der Vorstellung, dass PGLa nur in der mittleren Region eine starre  $\alpha$ -Helix ausbildete, welche an den Enden entwunden war und diese dadurch freier beweglich waren.

Für das AMP Gramicidin S wurden vor den Untersuchungen in Biomembranen  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren in Membranmodellen aufgenommen. Diese bestanden zum einen aus DMPC, welches als einfachstes generelles Modell anzusehen war. Zum anderen handelte es sich um die Lipidmischung DMPC/DMPG (3/1, mol/mol), welche eine prokaryotische Modellmembran darstellte. Zusätzlich wurde ein eukaryotisches Membranmodell verwendet, dieses bestand aus DMPC/Cholesterin. Diese Spektren sollten anschließend als „Muster“ zur Identifizierung der Orientierungszustände von Gramicidin S in den Biomembranen dienen. Ähnlich wie für PGLa konnten auch hier verschiedene Zustände möglich sein. Das war der S-state, welcher durch ein schmales isotropes Signal auf mobiles Peptid hinwies. Aber auch immobiles Peptid im S-state konnte vorliegen, hier war das isotrope Signal verbreitert (etwa 40 ppm). Der I-state ließ die Ausbildung einer möglichen Pore postulieren und das Pulverspektrum zeigte alle möglichen Orientierungen eines immobilen Peptids an.

Die Membranvesikel beider Lipidsysteme lagen bei einer Temperatur unterhalb des Phasenübergangs in der Gel Phase vor. Hier konnte sowohl für GS-1/1' als auch für GS-3/3' zumindest eine Bindung an die Membran beobachtet werden, da aber die Peptide in diesem Lipidzustand nicht beweglich waren, konnte ein axial symmetrisches Pulverspektrum detektiert werden (Abb. 5.23). Erfolgte durch Temperaturerhöhung der Übergang der Lipide in die flüssig-kristalline Phase, wurden die Spektren schmaler, was nun auf bewegliche Peptide mit schneller Rotation um die Membrannormale hinwies [9]. Hierbei konnte beobachtet werden, dass für GS-3/3' ein Bereich zwischen 20°C und 30°C existierte, in dem es zur Koexistenz der zwei beschriebenen Zustände kam. Das korrelierte mit [174], wo mittels DSC gezeigt werden konnte, dass bei hohen P/L Verhältnissen von Gramicidin S in DMPC zwei parallel vorkommende Phasenübergänge  $T_C$  des Lipids zu detektieren waren. Der eine spiegelte den originalen  $T_C$  von DMPC wieder, der andere war breiter und der Mischung mit Gramicidin S zuzuordnen. Diese Koexistenz konnte nicht für GS-1/1' beobachtet werden. Eine Erklärung war hinsichtlich der

Molekülstruktur der beiden Analoga möglich. Obgleich sich die CD-Spektren der beiden Moleküle nicht unterschieden [110], besaßen sie doch aufgrund der ersetzten Aminosäuren unterschiedliche molekulare Strukturen. Das beruhte auf der Tatsache, dass 4-F-Phg in etwa gleich groß war wie das zu ersetzende Leucin in GS-3/3', aber größer wie das zu ersetzende Valin in GS-1/1'. Daraus resultierte auch der stabilere I-state von GS-3/3' in Lipiden mit unterschiedlichen Kettenlängen, im Gegensatz zu GS-1/1' [8]. Die beschriebenen Unterschiede waren ebenfalls in den Spektren der orientierten Proben der Membranmodelle zu erkennen. GS-1/1' orientierte sich für beide Lipidsysteme nur im S-state an, wobei es im Gelzustand der Lipide nicht frei um die Membrannormale rotierte, dazu hingegen in der flüssig-kristallinen Phase gefähigt war. Für GS-3/3' hingegen konnte in beiden Lipidsystemen in der Gel Phase der Lipide meistens der I-state detektiert werden, der in der flüssig-kristallinen Phase bei 35°C noch zum kleinen Teil zu beobachten war und erst bei hohen Temperaturen (55°C) verschwand (Abb. 5.24).

Diese Ergebnisse zeigten somit für GS-3/3' ein anderes Verhalten als in [8, 108] beschrieben. Die Umorientierung in den I-state und die damit verbundene postulierte Ausbildung einer  $\beta$ -Fass-Pore für DMPC fand hier in dem Bereich zwischen 20°C und 30°C statt, hier befand sich auch  $T_C$  von DMPC. Das wies darauf hin, dass die Umlagerung der Peptide in den I-state eine Störung der Doppelschicht benötigte, wie sie im Bereich des Phasenübergangs entstand. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse konnten in der Probenvorbereitung liegen. Aber auch die thermale Vorgeschichte war wichtig, z.B. ob die Temperaturserien mit aufsteigenden oder absteigenden Temperaturen gemessen wurden, ob die Proben frisch hergestellt und somit von 48°C kamen oder vor der Messung bei -20°C gelagert wurden.

In unorientierten Protoplasten von *M. luteus* war sowohl für GS-1/1' als auch für GS-3/3' ein gleichmäßiges Signal bei  $\sim$ 117 ppm zu erkennen. Das konnte entweder auf einen oberflächengebundenen Orientierungszustand deuten, aber auch ein isotropes Signal und somit freies Peptid darstellen. Durch die Art der Probenvorbereitung war aber bekannt, dass Gramicidin S an die Membran gebunden sein mußte, da sich keine Moleküle mehr im Überstand befanden. Das entsprach den Spektren der MLVs von DMPC/DMPG (3/1). Das Fehlen einer temperaturabhängigen Signalveränderung korrespondierte mit der Vorstellung, dass sich die natürliche Biomembran in einem flüssig-kristallinen Zustand befand. Für orientierte Protoplasten konnte, ebenfalls entsprechend den orientierten Proben der synthetischen Phospholipide, für

GS-1/1' ein konstantes Signal bei  $\sim 117$  ppm detektiert werden. Auch hier war es erneut schwierig, zwischen einem isotropen Signal und dem S-state zu unterscheiden. Die stete Verengung des Signals war ähnlich wie für PGLa in Protoplasten [101] und Gramicidin S in Erythrozyten (Abb. 5.26). Diese zeigten mit Erhöhung der Temperatur ein größeres und enger werdendes isotropes Signal. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass hier das isotrope Signal und der S-state parallel vorkamen und das Aufkommen des isotropen Signals in Abhängigkeit zur Temperaturerhöhung stand. Das Gleiche galt für GS-3/3', der I-state war, im Gegensatz zu DMPC/DMPG (3/1), nicht zu beobachten. Somit zeigte Gramicidin S in *M. luteus* unter diesen Bedingungen keine Ausbildung einer postulierten  $\beta$ -Fass-Pore.

Die Spektren der Proben von Gramicidin S in unorientierten Erythrozytenmembranen waren grundsätzlich gleich wie für die Protoplasten. Orientierte Membranen hingegen zeigten Unterschiede. Das isotrope Signal war etwas breiter, und es konnten parallel axialsymmetrische Pulverspektren sowohl für GS-1/1' als auch für GS-3/3' beobachtet werden (Abb. 5.28). Die zugehörigen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigten weiterhin orientierte Membranen. Diese Pulverspektren konnten auf der einen Seite in der Anwesenheit der Glykokalyx begründet sein, da eventuell unspezifische Bindung stattfand. Auf der anderen Seite spielte die Lipidkomposition und das Cholesterin ebenfalls eine Rolle. Die Ergebnisse waren ähnlich zu PGLa, diese zeigten ebenfalls Pulverspektren in Erythrozytenmembranen. War die getroffene Aussage in Bezug auf die möglichen Wechselwirkungen korrekt, dann sollte das generell für AMPs gelten. In Membranen, welche neben DMPC 30% und mehr Cholesterin enthielten und somit eukaryotische Modelle ohne Glykokalyx darstellten, konnten ebenfalls sowohl für GS-1/1' und GS-3/3' Pulverspektren gezeigt werden ([8] und Abb. 5.25). Somit spiegelten die Pulverspektren in Erythrozyten möglicherweise die Bindung der Gramicidin S Analoga an die Phospholipid/Cholesterin-haltige Membran wider.

Biomembranen waren also auf der einen Seite gute Untersuchungsobjekte, da sie im Gegensatz zu Membranmodellen die natürliche Komplexität in Bezug auf Lipidkomposition und vorhandene Proteine widerspiegelten. Auf der anderen Seite war die eindeutige Identifizierung einer Orientierung von AMPs schwierig, da diese mehrere Zustände gleichzeitig zeigten. Daher waren Untersuchungen in Membranmodellen ebenso von Bedeutung, da hiermit das ganze Spektrum möglicher Zustände von AMPs in Membranen detektiert und in Hinblick auf das SMH-Modell interpretiert werden konnten. Durch Messungen mit mehreren markierten Peptiden

in Biomembranen konnte dann das tatsächliche Vorkommen sowie die Relevanz der beobachteten Orientierungen gezeigt werden. Somit war es sinnvoll, parallel mit natürlichen und synthetischen Membranen zu arbeiten.

In jüngster Zeit konnte aber auch für Membranmodelle die Koexistenz mehrerer Orientierungen eines AMPs gezeigt werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

## 6.4 Ausblick

Membranvesikel, gewonnen aus dem Biofilm des Gram-negativen Bakteriums *P. aeruginosa*, konnten nicht für die Festkörper-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden. Eines der Hauptprobleme war die geringe Ausbeute. Um dennoch native Membranen benutzen zu können, könnten Bakterienstämme verwendet werden, von denen bekannt ist, dass sie eine größere Menge dieser Vesikel abgeben. Auch sollten diese darin entweder keine NA verpacken oder ein erfolgreiches Protokoll für den Nukleinsäureverdau etabliert werden. Die LPS-haltigen Membranmodelle, bestehend aus gekauftem r-LPS bzw. extrahiertem s-LPS und r-LPS zusammen mit DMPC oder DMPC/DMPG (3/1, mol/mol), konnten erfolgreich für die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie etabliert werden. Strukturelle Untersuchungen von  $^{19}\text{F}$  markierten AMPs mittels  $^{19}\text{F}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie können nun mit diesen Membranmodellen durchgeführt werden.

Parallel kann das Extraktionsprotokoll verbessert sowie die LPS-Extrakte z.B. mittels Chromatographie auf ihre Reinheit kontrolliert werden. Damit lassen sich dann die LPS-haltigen Membranmodellen gut orientieren und sind für weitere Untersuchungen mit AMPs verwendbar. Ebenso kann aus den extrahierten LPS-Molekülen durch saure Hydrolyse Lipid A gewonnen werden [175]. Dessen Einsatz in Membranmodellen wäre daher ebenfalls denkbar. Parallel können andere LPS-Moleküle auf ihre Fähigkeit, lamellare Phasen zu bilden, getestet und verwendet werden.

Die extrahierten LPS-Moleküle sind erfolgreich in Mischungen mit verschiedenen Lipiden für die CD-Spektroskopie einsetzbar. Allein geben sie aber aufgrund der enthaltenen Zucker eine starke Hintergrundabsorption. Dem könnte eventuell durch die Anwendung von Synchrotronstrahlung (SR)CD entgegengewirkt werden [176]. Damit sollte es dann möglich sein,

vergleichbare Konzentrationen wie für die MLVs in der Festkörper-NMR-Spektroskopie oder DSC-Messungen zu verwenden.

Da die Präparation der natürlichen Biomembranen aus *M. luteus* und Erythrozyten etabliert ist und die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren eine gute Orientierung der Membranen zeigen, sind diese für verschiedene bekannte AMPs anwendbar. Somit können die in Membranmodellen detektierten Orientierungen auf ihr Vorhandensein in Biomembranen überprüft werden. Parallel ist es nötig, die AMPs systematisch in cholesterinhaltigen Lipidmischungen zu untersuchen, welche als Modell für eukaryotische Membranen dienen. Ebenso sind weitere Methoden für die strukturelle Untersuchung von AMPs in Biomembranen wie Infrarot (IR)-Spektroskopie, EM oder SRCD denkbar.

Auch können Untersuchungen zur strukturellen Aufklärung von Membran/AMP-Wechselwirkungen in Anwesenheit von nativen, nicht lipidartigen Komponenten durchgeführt werden. Dies können periplasmatisches Material, Kohlenhydrate oder exportierte Proteine sein.

Für die Ermittlung von lokalen Bewegungen in PGLa konnten erste Ergebnisse für die Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  erzielt werden. Diese geben entweder schnelle oder langsame Bewegungen wieder. Als zusätzlicher Wert kann  $T_{1\rho}$  bei einer anderen Feldstärke gemessen werden. Da diese Feldstärke mittels des Spin-lock-Verfahrens unabhängig vom äußeren Magnetfeld ist und nur in der Spule vorherrscht, liegt der Messung eine andere Zeitskala zugrunde, welche sich zwischen  $T_1$  und  $T_2$  befindet. In weiteren Untersuchungen ist es außerdem wichtig zu gewährleisten, dass sich die Probe während der Messung nicht verändert. Auch muß die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse mit frisch hergestellten Proben gegeben sein. Sind diese Faktoren erfüllt, können die Messungen für verschiedene AMPs angewandt werden.

## 7 Zusammenfassung

---

Da häufig bereits kurz nach der Einführung neuer Antibiotika die ersten resistenten Bakterienstämme auftreten, wird die Suche nach Alternativen immer wichtiger. Antimikrobielle Peptide (AMPs) stellen vielversprechende Alternativen dar, da sie die Zellmembranen auf mechanische Weise zu zerstören scheinen. Für ein besseres Verständnis ihrer Wirkungen war das Ziel dieser Arbeit, das strukturelle Verhalten und die Orientierungszustände der beiden repräsentativen Peptide PGLa und Gramicidin S in verschiedenen natürlichen und artifiziellen Membranen mittels NMR und anderer biophysikalischer Methoden zu untersuchen.

Als Erstes mussten geeignete Membranproben aus unterschiedlichen Organismen hergestellt werden. Membranvesikel von *P. aeruginosa* als Beispiel einer Gram-negativen äußeren Membran sollten erstmalig für Festkörper-NMR Messungen eingesetzt werden. Diese sogenannten bakteriellen Exosomen konnten erfolgreich isoliert werden, allerdings ließen sie sich zum Einsatz für die NMR-Spektroskopie nicht optimieren. Die Anwesenheit von Nukleinsäuren und Proteinen stellte hier einen limitierenden Faktor dar, da sie unspezifische Interaktionen mit den AMPs eingehen. Die Präparation von Protoplasten aus dem Gram-positiven Bakterium *M. luteus* sowie von Erythrozytenmembranen war als Verfahren in unserer Gruppe bereits etabliert. Mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR wurde in beiden Systemen eine gute Orientierung der Phospholipide beobachtet, was die Ausbildung von multilamellaren Lipiddoppelschichten anzeigte. Somit waren diese beiden Typen von Biomembranen für Untersuchungen von verschiedenen AMPs und den sich daraus ergebenden Fragestellungen gut geeignet.

Mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR waren für das entsprechend  $^{19}\text{F}$ -markierte Peptid PGLa mehrere strukturelle Zustände in Membranmodellen beschrieben worden, und die dazugehörigen NMR Spektren sind bekannt. So kann das Peptid eine oberflächengebundene Ausrichtung einnehmen (S-state), einen in die Membran gekippten Zustand (T-state), sowie eine senkrecht insertierte Orientierung (I-state). Zudem wiesen isotrope NMR-Signale auf frei bewegliches, ungebundenes Peptid hin, und sogenannte Pulverspektren deuteten auf immobilisiertes, nicht orientiertes und möglicherweise aggregiertes Peptid. In dieser Arbeit wurde in den Protoplasten von *M. luteus* ein ausgeprägtes

isotropes Signal für  $^{19}\text{F}$ -PGLa beobachtet, sowie die Koexistenz verschiedener gebundener Zustände. Die entsprechenden Orientierungen des Peptids befanden sich in einem komplexen dynamischen Gleichgewicht. Das Gleiche galt auch für die Erythrozytenmembranen, wobei hier allerdings andere Zustände wie das immobilisierte Aggregat dominierten. Das konnte zum einen der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung und der Anwesenheit von Cholesterin zugeschrieben werden, zum anderen auch dem Aufbau der juxtamembranären Region. Ähnliche Ergebnisse wurden für  $^{19}\text{F}$ -markiertes Gramicidin S erhalten, welches einen dominanten oberflächengebundenen S-state aufwies. Jedoch wurden ebenfalls der I-state sowie ein Pulverspektrum detektiert. Gramicidin S verhielt sich also sowohl in Protoplasten von *M. luteus* als auch in Erythrozytenmembranen ähnlich komplex wie PGLa.

Um schließlich auch die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien zu imitieren, wurden Mischungen aus dem synthetischen Lipid DMPC und isoliertem Lipopolysaccharid (LPS) hergestellt. Deren Einsatz für die Festkörper-NMR war möglich, und erste partielle Orientierungen konnten mit  $^{31}\text{P}$ -NMR gezeigt werden. Anschließend  $^{19}\text{F}$ -NMR Messungen an PGLa in diesen LPS-haltigen Membranen ergaben, dass die Peptide unterhalb des Phasenübergangs  $T_C$  von DMPC ein Pulverspektrum zeigten bzw. immobilisiert vorlagen. Oberhalb von  $T_C$  war der I-state zu vermuten. In Gegenwart von verkürzten LPS Molekülen (r-LPS) konnte bei hoher Temperatur der S-state detektiert werden. Allgemein war es aufgrund der hohen Heterogenität von LPS und der daraus resultierenden niedrigen Spektrenqualität schwierig, Aussagen über die genaue Orientierung von PGLa zu treffen. Dass das LPS aber einen Einfluss auf sowohl das DMPC als auch auf die Sekundärstruktur von PGLa hatte, konnte mit Hilfe von CD-Spektroskopie und DSC-Messungen gezeigt werden. Die Annahme, dass PGLa als starre  $\alpha$ -Helix mit flexiblen Enden vorliegt, konnte ansatzweise durch die Ermittlung der  $^{19}\text{F}$ -NMR  $T_2$ -Relaxationszeiten bestätigt werden. Hier zeigte sich durch Messungen von langsamer Dynamik, dass der C-Terminus von PGLa mobiler war als die mittlere Region.

Zur Untersuchung von AMPs sind native Biomembranen einerseits optimal, da sie die natürliche Komplexität in Bezug auf Lipidzusammensetzung und vorhandene Proteine widerspiegeln. Gerade deswegen ist es aber auch sehr schwierig, die Orientierungszustände von AMPs eindeutig zu identifizieren, da mehrere Zustände parallel vorliegen. Somit sind Membranmodelle weiterhin unerlässlich, da es hierdurch möglich ist, das gesamte Ensemble möglicher Zustände von AMPs

in Membranen zu detektieren und interpretieren zu können. Gezielte, vergleichende Messungen in natürlichen Biomembranen können dann das tatsächliche Auftreten sowie die Relevanz der beobachteten Orientierungen aufzeigen.

## 8 Literatur

---

1. Mitscher, L.A. (2008). Coevolution: mankind and microbes. *J Nat Prod* *71*, 497-509.
2. Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* *415*, 389-395.
3. Strandberg, E., and Ulrich, A.S. (2004a). NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts in Magnetic Resonance Part A Volume 23A*, 89-120.
4. Glaser, R.W., Sachse, C., Durr, U.H., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2004). Orientation of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes determined from <sup>19</sup>F-NMR dipolar couplings of 4-CF<sub>3</sub>-phenylglycine labels. *J Magn Reson* *168*, 153-163.
5. Glaser, R.W., Sachse, C., Durr, U.H., Wadhvani, P., Afonin, S., Strandberg, E., and Ulrich, A.S. (2005). Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes observed by solid-state <sup>19</sup>F-NMR. *Biophys J* *88*, 3392-3397.
6. Strandberg, E., Wadhvani, P., Tremouilhac, P., Durr, U.H., and Ulrich, A.S. (2006). Solid-state NMR analysis of the PGLa peptide orientation in DMPC bilayers: structural fidelity of <sup>2</sup>H-labels versus high sensitivity of <sup>19</sup>F-NMR. *Biophys J* *90*, 1676-1686.
7. Tremouilhac, P., Strandberg, E., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2006a). Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state <sup>2</sup>H-NMR. *Biochim Biophys Acta* *1758*, 1330-1342.
8. Afonin, S. (2003a). Structural studies on membrane-active peptides in lipid bilayers by solid state <sup>19</sup>F NMR. PhD thesis, Friedrich Schiller Universität Jena.
9. Salgado, J., Grage, S.L., Kondejewski, L.H., Hodges, R.S., McElhaney, R.N., and Ulrich, A.S. (2001). Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial beta-sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state <sup>19</sup>F-NMR. *J Biomol NMR* *21*, 191-208.
10. Voet, D., and Voet, J.G. (1994). *Biochemie*, 1 Edition (Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH).
11. Munk (Hrsg.), K. (2008). *Taschenlehrbuch Biologie; Biochemie, Zellbiologie*, 1 Edition (Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG).
12. Löffler, G. (2005). *Basiswissen Biochemie*, 6 Edition (Heidelberg: Springer Medizin Verlag).
13. Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720-731.
14. Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* *438*, 578-580.
15. Lindner, R., and Naim, H.Y. (2009). Domains in biological membranes. *Exp Cell Res* *315*, 2871-2878.
16. Lingwood, D., and Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* *327*, 46-50.
17. Li, C., and Salditt, T. (2006). Structure of magainin and alamethicin in model membranes studied by x-ray reflectivity. *Biophys J* *91*, 3285-3300.
18. Yang, L., Weiss, T.M., Harroun, T.A., Heller, W.T., and Huang, H.W. (1999). Supramolecular structures of peptide assemblies in membranes by neutron off-plane scattering: method of analysis. *Biophys J* *77*, 2648-2656.

19. Auger, M. (2000). Biological membrane structure by solid-state NMR. *Curr Issues Mol Biol* 2, 119-124.
20. Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1462, 157-183.
21. Kosol, S., and Zangger, K. (2010). Dynamics and orientation of a cationic antimicrobial peptide in two membrane-mimetic systems. *J Struct Biol*.
22. Kallick, D.A., Tessmer, M.R., Watts, C.R., and Li, C.Y. (1995). The use of dodecylphosphocholine micelles in solution NMR. *J Magn Reson B* 109, 60-65.
23. Opella, S.J., and Marassi, F.M. (2004). Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. *Chem Rev* 104, 3587-3606.
24. Arora, A., and Tamm, L.K. (2001). Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Curr Opin Struct Biol* 11, 540-547.
25. Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., and Schwille, P. (2004). Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. *J Struct Biol* 147, 77-89.
26. Pitcher, W.H., 3rd, and Huestis, W.H. (2002). Preparation and analysis of small unilamellar phospholipid vesicles of a uniform size. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1352-1355.
27. Boucher, J., Trudel, E., Methot, M., Desmeules, P., and Salesse, C. (2007). Organization, structure and activity of proteins in monolayers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58, 73-90.
28. Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C. (1963). Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *The journal of physical chemistry* 67, 534-535.
29. Dürr, U.H.N. (2005). Solid-state <sup>19</sup>F-NMR studies on fluorine-labeled model compounds and biomolecules. PhD thesis, Universität Karlsruhe.
30. Müller, S. (2007). Strukturuntersuchungen am bakteriellen Tat-Proteinexportsystem. PhD thesis, Universität Karlsruhe.
31. Graham, J.M., and Higgins, J.A. (1998). *Molekularbiologische Membrananalyse* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
32. Hanke, W., and Hanke, R. (1997). *Methoden der Membranphysiologie* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
33. Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55, 27-55.
34. Russell, N.J. (1974). The lipid composition of the psychrophilic bacterium *Micrococcus cryophilus*. *J Gen Microbiol* 80, 217-225.
35. Gram, H.C. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin* 2, 185-189.
36. Osborn, M.J., and Munson, R. (1974). Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of Gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* 31, 642-653.
37. Helander, I.M., Kilpelainen, I., and Vaara, M. (1997). Phosphate groups in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium* rfaP mutants. *FEBS Lett* 409, 457-460.
38. Rietschel, E.T., Brade, H., Brade, L., Kaca, W., Kawahara, K., Lindner, B., Lüderitz, T., Tomita, T., Schade, U., and Seydel, U. (1985). Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins. *Progress in clinical and biological research* 189, 31-51.

39. Hitchcock, P.J., Leive, L., Makela, P.H., Rietschel, E.T., Strittmatter, W., and Morrison, D.C. (1986). Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol* *166*, 699-705.
40. Schnaitman, C.A. (2001). The genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide. In M. Sussmann (Hrsg.), *Molecular Medical microbiology, Volume 1* (London: Academic Press, Inc., London, England).
41. Fritsch, W. (2002). *Mikrobiologie, Volume 3* (Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin).
42. Schromm, A.B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A.P., Koch, M.H., Rietschel, E.T., and Seydel, U. (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* *267*, 2008-2013.
43. Rocchetta, H.L., Burrows, L.L., and Lam, J.S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* *63*, 523-553.
44. Mangoni, M.L., Epan, R.F., Rosenfeld, Y., Peleg, A., Barra, D., Epan, R.M., and Shai, Y. (2008). Lipopolysaccharide, a key molecule involved in the synergism between temporins in inhibiting bacterial growth and in endotoxin neutralization. *The journal of biological chemistry* *284*, 22907-22917.
45. Matsuzaki, K., Sugishita, K., and Miyajima, K. (1999b). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett* *449*, 221-224.
46. Zhang, L., Dhillon, P., Yan, H., Farmer, S., and Hancock, R.E. (2000). Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* *44*, 3317-3321.
47. Gutschmann, T., Hagge, S.O., David, A., Roes, S., Bohling, A., Hammer, M.U., and Seydel, U. (2005). Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *J Endotoxin Res* *11*, 167-173.
48. Mangoni, M.L., and Shai, Y. (2009). Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochimica et biophysica acta* *1788*, 1610-1619.
49. Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2001). *Brock Mikrobiologie* (Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin).
50. Yang, S., Sugawara, S., Monodane, T., Nishijima, M., Adachi, Y., Akashi, S., Miyake, K., Hase, S., and Takada, H. (2000). *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infection and Immunity* *69*, 2025-2030.
51. Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* *67*, 686-723.
52. Owen, P., and Salton, M.R. (1975). A succinylated mannan in the membrane system of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem Biophys Res Commun* *63*, 875-880.
53. Powell, D.A., Duckworth, M., and Baddiley, J. (1975). A membrane-associated lipomannan in micrococci. *Biochem J* *151*, 387-397.
54. Sutcliffe, I.C., and Shaw, N. (1991). Atypical lipoteichoic acids of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* *173*, 7065-7069.
55. Pakkiri, L.S., Wolucka, B.A., Lubert, E.J., and Waechter, C.J. (2004). Structural and topological studies on the lipid-mediated assembly of a membrane-associated lipomannan in *Micrococcus luteus*. *Glycobiology* *14*, 73-81.

56. de Bony, J., Lopez, A., Gilleron, M., Welby, M., Laneelle, G., Rousseau, B., Beaucourt, J.P., and Tocanne, J.F. (1989). Transverse and lateral distribution of phospholipids and glycolipids in the membrane of the bacterium *Micrococcus luteus*. *Biochemistry* 28, 3728-3737.
57. Welby, M., Poquet, Y., and Tocanne, J.F. (1996). The spatial distribution of phospholipids and glycolipids in the membrane of the bacterium *Micrococcus luteus* varies during the cell cycle. *FEBS Lett* 384, 107-111.
58. Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5, 279-313.
59. Hardalo, C., and Edberg, S.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* 23, 47-75.
60. Ahearn, D.G., Borazjani, R.N., Simmons, R.B., and Gabriel, M.M. (1999). Primary adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to inanimate surfaces including biomaterials. *Methods Enzymol* 310, 551-557.
61. Lam, J.S., Graham, L.L., Lightfoot, J., Dasgupta, T., and Beveridge, T.J. (1992). Ultrastructural examination of the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* strains and their isogenic rough mutants by freeze-substitution. *J Bacteriol* 174, 7159-7167.
62. Rahim, R., Burrows, L.L., Monteiro, M.A., Perry, M.B., and Lam, J.S. (2000). Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146, 2803-2814.
63. Sadovskaya, I., Brisson, J.R., Lam, J.S., Richards, J.C., and Altman, E. (1998). Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur J Biochem* 255, 673-684.
64. Schooling, S.R., and Beveridge, T.J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188, 5945-5957.
65. Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* 177, 3998-4008.
66. Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., and Beveridge, T.J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150, 2161-2169.
67. Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C.W. (2002). *Lehrbuch der Biochemie* (Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
68. Hanahan, D.J., and Ekholm, J.E. (1974). The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods Enzymol* 31, 168-172.
69. Steck, T.L. (1974). The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol* 62, 1-19.
70. Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Wishart, D.S., Kay, C.M., Hancock, R.E., and Hodges, R.S. (1996). Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *J Biol Chem* 271, 25261-25268.
71. Ieronimo, M. (2004). Antimikrobielle und hämolytische Wirkung des Peptidantibiotikums Gramicidin S. Diploma thesis, Universität Karlsruhe.
72. Ruden, S., Hilpert, K., Berditsch, M., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2009). Synergistic Interaction between Silver Nanoparticles and Membrane-Permeabilizing Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3538-3540.

73. Begemann, H., and Rastatter, J.H. (1993). *Klinische Hämatologie 4* (Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag).
74. Banerjee, S.K., Kregar, I., Turk, V., and Rupley, J.A. (1973). Lysozyme-catalyzed reaction of the N-acetylglucosamine hexasaccharide. Dependence of rate on pH. *J Biol Chem* *248*, 4786-4792.
75. Banerjee, S.K., Holler, E., Hess, G.P., and Rupley, J.A. (1975). Reaction of N-acetylglucosamine oligosaccharides with lysozyme. Temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects; equilibrium, steady state, and pre-steady state measurements\*. *J Biol Chem* *250*, 4355-4367.
76. Prasad, A.L., and Litwack, G. (1965). Growth and Biochemical Characteristics of *Micrococcus Lysodeikticus*, Sensitive or Resistant to Lysozyme. *Biochemistry* *4*, 496-501.
77. Dodge, J.T., Mitchell, C., and Hanahan, D.J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* *100*, 119-130.
78. Baake, M., and Gilles, A. (1994). *Hämatologie. Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe*. (Darmstadt: GIT Verlag GmbH).
79. Schwoch, G., and Passow, H. (1973). Preparation and properties of human erythrocyte ghosts. *Mol Cell Biochem* *2*, 197-218.
80. Epand, R.M., and Vogel, H.J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* *1462*, 11-28.
81. Kamysz, W., Okroj, M., and Lukasiak, J. (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol* *50*, 461-469.
82. Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* *19*, 491-511.
83. Hancock, R.E., and Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* *43*, 1317-1323.
84. Bechinger, B., and Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* *1758*, 1529-1539.
85. Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta* *1462*, 1-10.
86. Huang, H.W. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* *39*, 8347-8352.
87. 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*, 55-70.
88. Matsuzaki, K. (2001). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defence? *Biochemical Society Transactions* *29*, 598-601.
89. Berditsch, M., Afonin, S., and Ulrich, A.S. (2007). The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Appl Environ Microbiol* *73*, 6620-6628.
90. Sato, H., and Feix, J.B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* *1758*, 1245-1256.
91. Prenner, E.J., Kiricsi, M., Jelokhani-Niaraki, M., Lewis, R.N., Hodges, R.S., and McElhaney, R.N. (2005). Structure-activity relationships of diastereomeric lysine ring size analogs of the antimicrobial peptide gramicidin S: mechanism of action and

- discrimination between bacterial and animal cell membranes. *J Biol Chem* 280, 2002-2011.
92. Manhong, W.U., and Hancock, R.E. (1999). Improved Derivatives of Bactenecin, a Cyclic Dodecameric Antimicrobial Cationic Peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1274-1276.
  93. Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., and Seelig, J. (2000). Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 39, 442-452.
  94. Bechinger, B., Zasloff, M., and 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, 981-987.
  95. Lohner, K., and Prossnigg, F. (2009). Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1656-1666.
  96. Tremouilhac, P., Strandberg, E., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2006b). Synergistic transmembrane alignment of the antimicrobial heterodimer PGLa/magainin. *J Biol Chem* 281, 32089-32094.
  97. Soravia, E., Martini, G., and Zasloff, M. (1988). Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett* 228, 337-340.
  98. Maloy, W.L., and Kari, U.P. (1995). Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37, 105-122.
  99. Strandberg, E., Tremouilhac, P., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2009). Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1667-1679.
  100. Afonin, S., Grage, S.L., Ieronimo, M., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2008a). Temperature-dependent transmembrane insertion of the amphiphilic peptide PGLa in lipid bilayers observed by solid state <sup>19</sup>F NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 130, 16512-16514.
  101. Ieronimo, M. (2008). Towards the activity of the antimicrobial peptide PGLa in cell membranes - Solid state <sup>19</sup>F-NMR studies of PGLa and magainin 2. PhD Thesis Universität Karlsruhe.
  102. Gause, G.F., and Brazhnikova, M.G. (1944). Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature* 154, 803-804.
  103. Saito, Y., and Otani, S. (1970). Biosynthesis of gramicidin S. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 33, 337-380.
  104. Prenner, E.J., Lewis, R.N., and McElhaney, R.N. (1999). The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1462, 201-221.
  105. Kondejewski, L.H., Farmer, S.W., Wishart, D.S., Hancock, R.E., and Hodges, R.S. (1996). Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *International journal of peptide and protein research* 47, 460-466.
  106. Kato, T., and Izumiya, N. (1977). Conformations of di-N-methylleucine gramicidin S and N-methylleucine gramicidin S compatible with the sidedness hypothesis. *Biochim Biophys Acta* 493, 235-238.
  107. Hull, S.E., Karlsson, R., Main, P., Woolfson, M.M., and Dodson, E.J. (1978). The crystal structure of a hydrated gramicidin S-urea complex. *Nature* 275, 206-207.
  108. Afonin, S., Dürr, U.H.N., Wadhvani, P., Salgado, J., and Ulrich, A.S. (2008b). Solid State NMR Structure Analysis of the Antimicrobial Peptide Gramicidin S in Lipid Membranes: Concentration-Dependent Re-alignment and Self-Assembly as a  $\beta$ -Barrel. In

- Topics in Current Chemistry- Bioactive Conformation II, Volume 273. (Berlin Heidelberg: Springer Verlag).
109. Mink, C. (2009). Zusammenhänge von Struktur und Funktion unterschiedlicher membranaktiver Peptide. PhD Thesis KIT Karlsruhe.
  110. Wadhvani, P., Afonin, S., Ieronimo, M., Buerck, J., and Ulrich, A.S. (2005). Optimized protocol for synthesis of cyclic gramicidin S: starting amino acid is key to high yield. *J Org Chem* *71*, 55-61.
  111. Shai, Y., and Oren, Z. (2001). From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* *22*, 1629-1641.
  112. Zelezetsky, I., and Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim Biophys Acta* *1758*, 1436-1449.
  113. Matsuzaki, K. (1999a). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta* *1462*, 1-10.
  114. Maisch, D., Wadhvani, P., Afonin, S., Bottcher, C., Koksche, B., and Ulrich, A.S. (2009). Chemical labeling strategy with (R)- and (S)-trifluoromethylalanine for solid state <sup>19</sup>F NMR analysis of peptaibols in membranes. *J Am Chem Soc* *131*, 15596-15597.
  115. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* *35*, 11361-11368.
  116. Ding, L., Yang, L., Weiss, T.M., Waring, A.J., Lehrer, R.I., and Huang, H.W. (2003). Interaction of antimicrobial peptides with lipopolysaccharides. *Biochemistry* *42*, 12251-12259.
  117. Rana, F.R., Sultany, C.M., and Blazyk, J. (1989). Interactions between *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide and the antimicrobial peptide, magainin 2 amide. *FEBS Letters* *261*, 646-647.
  118. Snyder, D.S., and McIntosh, T.J. (2000). The lipopolysaccharide barrier: correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. *Biochemistry* *39*, 11777-11787.
  119. Rosenfeld, Y., Barra, D., Simmaco, M., Shai, Y., and Mangoni, M.L. (2006). A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. *J Biol Chem* *281*, 28565-28574.
  120. Radu, I., Schlegel, M., Bolwien, C., and Heberle, J. (2009). Time-resolved methods in biophysics. 10. Time-resolved FT-IR difference spectroscopy and the application to membrane proteins. *Photochem Photobiol Sci* *8*, 1517-1528.
  121. Tatulian, S.A. (2003). Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids. *Biochemistry* *42*, 11898-11907.
  122. Burck, J., Roth, S., Wadhvani, P., Afonin, S., Kanithasen, N., Strandberg, E., and Ulrich, A.S. (2008). Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. *Biophys J* *95*, 3872-3881.
  123. Nolandt, O.V., Walther, T.H., Roth, S., Burck, J., and Ulrich, A.S. (2009). Structure analysis of the membrane protein TatC(d) from the Tat system of *B. subtilis* by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* *1788*, 2238-2244.
  124. Ulrich, A.S. (2005). Solid state <sup>19</sup>F NMR methods for studying biomembranes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* *46*, 1-21.

125. Flegler, S.L., Heckman jr., J.W., and Klomparens, K.L. (1995). *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen.* (Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg).
126. Wiltschi, B., Knoll, W., and Sinner, E.K. (2006). Binding assays with artificial tethered membranes using surface plasmon resonance. *Methods* 39, 134-146.
127. Lewis, R.N., Zhang, Y.P., and McElhaney, R.N. (2005). Calorimetric and spectroscopic studies of the phase behavior and organization of lipid bilayer model membranes composed of binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 1668, 203-214.
128. McElhaney, R.N. (1982). The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and physics of lipids* 30, 229-259.
129. Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta* 1751, 119-139.
130. Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400.
131. Bulheller, B.M., Rodger, A., and Hirst, J.D. (2007). Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* 9, 2020-2035.
132. Windisch, D. (2009). *Struktur und Dimerisierung des membranständigen Onkoproteins E5 aus dem Rinder-Papillomavirus Typ I.* PhD Thesis Universität Karlsruhe.
133. Winter, R., and Noll, F. (1998). *Methoden der Biophysikalischen Chemie.* (Stuttgart: Teubner Verlag).
134. Friebolin, H. (2006). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Volume 4* (Weinheim: WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA).
135. Afonin, S., Glaser, R.W., Berditchevskaia, M., Wadhvani, P., Guhrs, K.H., Mollmann, U., Perner, A., and Ulrich, A.S. (2003b). 4-fluorophenylglycine as a label for <sup>19</sup>F NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *Chembiochem* 4, 1151-1163.
136. Durr, U.H., Grage, S.L., Witter, R., and Ulrich, A.S. (2008a). Solid state <sup>19</sup>F NMR parameters of fluorine-labeled amino acids. Part I: aromatic substituents. *J Magn Reson* 191, 7-15.
137. Grage, S.L., Durr, U.H., Afonin, S., Mikhailiuk, P.K., Komarov, I.V., and Ulrich, A.S. (2008b). Solid state <sup>19</sup>F NMR parameters of fluorine-labeled amino acids. Part II: aliphatic substituents. *J Magn Reson* 191, 16-23.
138. Evans, J.N.S. (1995). *Biomolecular NMR-Spectroscopy* (Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press).
139. Lu, J.X., Damodaran, K., Blazyk, J., and Lorigan, G.A. (2005). Solid-state nuclear magnetic resonance relaxation studies of the interaction mechanism of antimicrobial peptides with phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry* 44, 10208-10217.
140. Cady, S.D., and Hong, M. (2009). Effects of amantadine on the dynamics of membrane-bound influenza A M2 transmembrane peptide studied by NMR relaxation. *J Biomol NMR* 45, 185-196.
141. Tang, M., Waring, A.J., and Hong, M. (2008). Arginine dynamics in a membrane-bound cationic beta-hairpin peptide from solid-state NMR. *Chembiochem* 9, 1487-1492.
142. Heimburg, T. (1998). Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim Biophys Acta* 1415, 147-162.

143. Brandenburg, K., Garidel, P., Howe, J., Andrä, J., Hawkins, L., Koch, M.H.J., and Seydel, U. (2006). What can calorimetry tell us about changes of three-dimensional aggregate structures of phospholipids and glycolipids? *Thermochimica acta* *445*, 133-143.
144. Rodriguez-Torres, A., Ramos-Sanchez, M.C., Orduna-Domingo, A., Martin-Gil, F.J., and Martin-Gil, J. (1993). Differential scanning calorimetry investigations on LPS and free lipids A of the bacterial cell wall. *Res Microbiol* *144*, 729-740.
145. Fields, G.B., and Noble, R.L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* *35*, 161-214.
146. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* *226*, 497-509.
147. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* *37*, 911-917.
148. Ames, B.N., and Dubin, D.T. (1960). The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* *235*, 769-775.
149. Ames, B.N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology* *8*, 115-118.
150. Glaser, R.W., and Ulrich, A.S. (2003). Susceptibility corrections in solid-state NMR experiments with oriented membrane samples. Part I: applications. *J Magn Reson* *164*, 104-114.
151. Nomura, K., Inaba, T., Morigaki, K., Brandenburg, K., Seydel, U., and Kusumoto, S. (2008). Interaction of lipopolysaccharide and phospholipid in mixed membranes: solid-state <sup>31</sup>P-NMR spectroscopic and microscopic investigations. *Biophys J* *95*, 1226-1238.
152. Westphal, O., and Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharides - Extraction with Phenol-Water and further applications of the procedure. *Methods in carbohydrate chemistry* *1*, 83-91.
153. Westphal, O., Lüderitz, O., and Bister, F. (1952). Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung* *7b*, 148-155.
154. Moran, A.P., Lindner, B., and Walsh, E.J. (1997). Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol* *179*, 6453-6463.
155. Galanos, C., Luderitz, O., and Westphal, O. (1969). A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* *9*, 245-249.
156. Schwudke, D., Linscheid, M., Strauch, E., Appel, B., Zahringer, U., Moll, H., Muller, M., Brecker, L., Gronow, S., and Lindner, B. (2003). The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing alpha-D-Mannoses that replace phosphate residues: similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain B. *bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100. *J Biol Chem* *278*, 27502-27512.
157. Moran, A.P., Helander, I.M., and Kosunen, T.U. (1991). Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology* *174*, 1370-1377.
158. Darveau, R.P., and Hancock, R.E. (1983). Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* *155*, 831-838.
159. Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J., and Carlo, D.J. (1977). A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Analytical biochemistry* *85*, 595-601.

160. Cynkin, M.A., and Ashwell, G. (1960). Estimation of 3-deoxy sugars by means of the malonaldehyde-thiobarbituric acid reaction. *Nature* 186, 155-156.
161. Kittelberger, R., and Hilbink, F. (1993). Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 26, 81-86.
162. Tsai, C.M., and Frasch, C.E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 119, 115-119.
163. Krause, I., and Elbertzhagen, H. Süddeutsche Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft. Institut für Chemie und Physik, Technische Universität München-Weihenstephan.
164. Staudegger, E., Prenner, E.J., Kriechbaum, M., Degovics, G., Lewis, R.N., McElhaney, R.N., and Lohner, K. (2000). X-ray studies on the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with microbial lipid extracts: evidence for cubic phase formation. *Biochim Biophys Acta* 1468, 213-230.
165. Afonin, S., Frey, A., Bayerl, S., Fischer, D., Wadhvani, P., Weinkauff, S., and Ulrich, A.S. (2006). The cell-penetrating peptide TAT(48-60) induces a non-lamellar phase in DMPC membranes. *Chemphyschem* 7, 2134-2142.
166. Pukala, T.L., Boland, M.P., Gehman, J.D., Kuhn-Nentwig, L., Separovic, F., and Bowie, J.H. (2007). Solution Structure and Interaction of Cupiennin 1a, a Spider Venom Peptide, with Phospholipid Bilayers. *Biochemistry* 46, 3576-3585.
167. Wallace, B.A., and Teeters, C.L. (1987). Differential absorption flattening optical effects are significant in the circular dichroism spectra of large membrane fragments. *Biochemistry* 26, 65-70.
168. Praktikumsprotokoll : Lehrveranstaltung "Physikalische Methoden der Werkstoffcharakterisierung" Prof. Dr. J. Kreßler und Dr. rer. nat. J. Vogel: Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
169. Bayerl, T.M., Werner, G.D., and Sackmann, E. (1989). Solubilization of DMPC and DPPC vesicles by detergents below their critical micellization concentration: high-sensitivity differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy reveal two interaction sites of detergents in vesicles. *Biochim Biophys Acta* 984, 214-224.
170. Schneider, M.F., Marsh, D., Jahn, W., Kloesgen, B., and Heimburg, T. (1999). Network formation of lipid membranes: triggering structural transitions by chain melting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14312-14317.
171. Picas, L., Montero, M.T., Morros, A., Oncins, G., and Hernandez-Borrell, J. (2008). Phase changes in supported planar bilayers of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine. *J Phys Chem B* 112, 10181-10187.
172. Larsen, P., Nielsen, J.L., Dueholm, M.S., Wetzel, R., Otzen, D., and Nielsen, P.H. (2007). Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environmental Microbiology* 9, 3077-3090.
173. Ieronimo, M., Afonin, S., Koch, K., Berditsch, M., Wadhvani, P., and Ulrich, A.S. (2010). 19F-NMR analysis of the antimicrobial peptide PGLa bound to native cell membranes from bacterial protoplasts and human erythrocytes. *Journal of the American Chemical Society* *submitted*.
174. Prenner, E.J., Lewis, R.N., Kondejewski, L.H., Hodges, R.S., and McElhaney, R.N. (1999). Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1417, 211-223.

175. Brett, P.J., Burtnick, M.N., Snyder, D.S., Shannon, J.G., Azadi, P., and Gherardini, F.C. (2007). *Burkholderia mallei* expresses a unique lipopolysaccharide mixture that is a potent activator of human Toll-like receptor 4 complexes. *Mol Microbiol* 63, 379-390.
176. Miles, A.J., and Wallace, B.A. (2006). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. *Chem Soc Rev* 35, 39-51.

## 9 Anhang

---

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
4-CF <sub>3</sub> -Phg	4-Trifluormethyl-Phenylglycin
4-F-Phg	4-Fluorphenylglycin
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
Ala	Alanin
AMP	antimikrobielles Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>circular dichroism</i> (Zirkulardichroismus)
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
Chol.	Cholesterin
CL	Cardiolipin
cm	Zentimeter
CPD	<i>Citrate-phosphate-dextrose</i> (Zitrat-Phosphat-Dextrose)
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i> (Chemische Verschiebungsanisotropie)
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHPC	Diheptanoylphosphocholin
DLPC	Dilauroylphosphocholin
DMDG	Dimannosyldiacylglycerol
DMPC	Dimyristoylphosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

---

DNase	<i>deoxyribonuclease</i> (Desoxyribonuklease)
DPC	Dodecylphosphocholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> (Dynamische Differenzkalorimetrie)
DSPC	Distearoylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante
<i>E. coli</i> TLE	<i>Escherichia coli total lipid extract</i> (kompletter Lipidextrakt)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
FID	<i>free induction decay</i> (freier Induktionsabfall)
fl	flüssig
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
griech.	griechisch
GUV	<i>giant unilamellare vesicles</i> (riesige unilamellare Vesikel)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
H <sub>5</sub> IO <sub>6</sub>	Perjodsäure
HCl	Salzsäure
His	Histidin
I-state	Insertierter Zustand
Ile	Isoleucin
kDa	Kilodalton
KDO	2-Keto-3-Desoxy-Octonat
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kaliumsulfat
L	Liter
lat.	lateinisch

---

IB	lyophilisierte Bakterien
Leu	Leucin
LPS (r- und s-)	Lipopolysaccharid ( <i>rough</i> (rau) und <i>smooth</i> (glatt))
LTA	<i>lipoteichoic acid</i> (Lipiteichonsäuren)
LUV	<i>large unilamellare vesicles</i> (große unilamellare Vesikel)
Lys	Lysin
M	Molar
M <sub>0</sub>	Magnetisierungsvektor
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MA	<i>magic angle</i> (magischer Winkel)
MAS	<i>magic angle spinning</i> (magische Winkel Rotation)
MeOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Magnesiumnitrat
MHz	Megahertz
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> (Minimale Inhibitionskonzentration)
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	<i>multilamellare vesicles</i> (multilamellare Vesikel)
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
MVs	Membranvesikel
µm	Mikrometer
µs	Mikrosekunde
N	Normalität
N <sub>2</sub>	Stickstoff
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O	Ammoniumheptamolybdat
NA	<i>nucleid acid</i> (Nukleinsäuren)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat

---

NaAsO <sub>2</sub>	Natriumarsenit
NaCl	Kochsalz
NaF	Natriumfluorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ammoniumnitrat
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
OCD	<i>optical circular dichroism</i> (optischer Zirkulardichroismus)
OD	optische Dichte
P/L	Peptid zu Lipid Verhältnis
P/PL	Peptid zu Phospholipid Verhältnis
PA	Phosphatidylsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PGLa	Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
POPC	Palmitoyl-oleoylphosphocholin
POPG <sup>^</sup>	Palmitoyl-oleoylphosphoglycerol
ppm	parts per million
PS	Phosphatidylserin
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S-state	Oberflächenzustand
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SM	Sphingomyelin
SMH	Shai-Matsuzaki-Huang
ss	<i>solid state</i> (Festkörper)

---

SUV	<i>small unilamellare vesicles</i> (kleine unilamellare Vesikel)
T-state	Geneigter Zustand
TBA	Thiobarbitursäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
WTA	<i>wall teichoic acid</i> (Wandteichonsäuren)
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/Gewicht
Val	Valin

## 9.2 Auswertungsprogramm für Relaxationszeiten

Für die Ermittlungen der Relaxationszeiten wurden Inversionserholungsexperimente durchgeführt. Anschließend wurden die FIDs für jedes Intervall aus dem Bruker eigenem Dateiformat zur externen Weiterverarbeitung extrahiert. Die Anpassung (Fitten) der FIDs geschah für die Auswertung von Real- oder Imaginärteil mit der Funktion eines exponentiellen Abfalls mit aufmodulierter Oszillation, hierbei blieben Phaseninformationen erhalten:

$$I(t) = A_0 \exp(-t/\tau) \cos(\omega * t + \Phi)$$

Fitparameter:  $A_0$ ,  $\tau$ ,  $\omega$ ,  $\Phi$

Abbildung 9.1 zeigt exemplarisch für eine gemessene Position in der Sequenz von PGLa die Funktionskurven der angepassten FIDs.

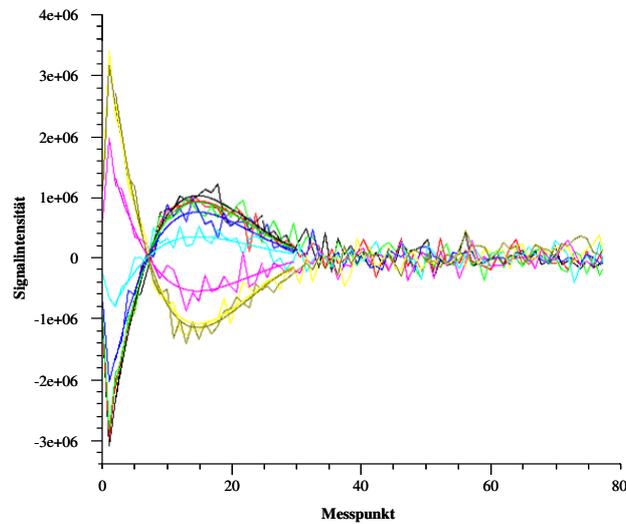


Abb. 9.1: Angepasste FIDs (Funktionskurven) des Realteils der verschiedenen Verzögerungszeiten  $\tau$  einer gemessenen Position in der Sequenz von PGLa.

Die Anfangsamplituden der FIDs wurden anschließend graphisch aufgetragen. Daraus ergab sich eine Relaxationskurve mit exponentiellem Verlauf ins Gleichgewicht und der Errechnung der Relaxationszeiten nach:  $M(t) = M_0 \exp(-t/T_{1/2/1\rho}) + M_{offs}$ . Abbildung 9.2 zeigt exemplarisch die angepasste Relaxationskurve der Anfangsamplituden der FIDs aus Abbildung 9.1.

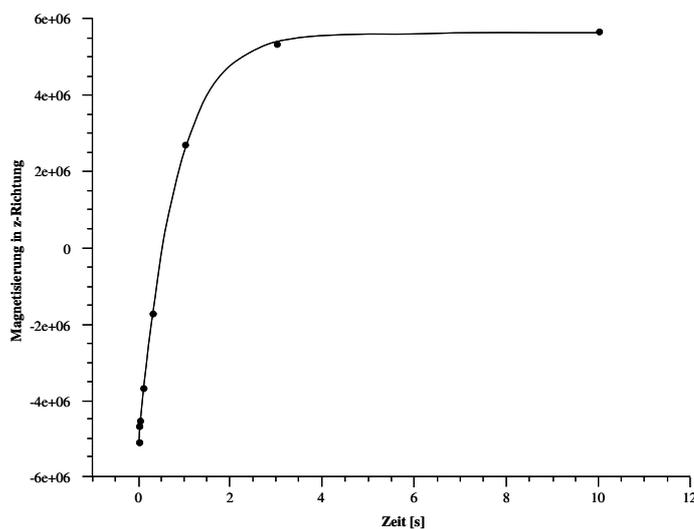


Abb. 9.2: Graphische Darstellung der angepassten Relaxationskurve der Anfangsamplituden der FIDs.

## Publikationen

### Posterbeiträge

Ieronimo, M., Afonin, S., Wadhvani, P., Zimmermann, K., Ulrich, A. S. *Solid state  $^{19}\text{F}$ -NMR investigations of the antimicrobial peptide PGLa in native membranes from bacteria and erythrocytes.* CFN Summer School für Nano-Biologie, Bad Herrenalb, Deutschland, 2007.

Koch, K., Ieronimo, M., Afonin S., Berditsch, M., Wadhvani, P., Ulrich, A. S. *Use of native prokaryote and eukaryote membranes for  $^{19}\text{F}$ -NMR structure analysis of antimicrobial peptides.* 455<sup>th</sup> WE-Heraeus-Seminar: Biophysics of Membrane-Active Peptides, Bad Honnef, Deutschland, 2010.

### Fachartikel

Ieronimo, M., Afonin, S., Koch, K., Berditsch, M., Wadhvani, P. und Ulrich, A.S. (2010).  $^{19}\text{F}$ -NMR analysis of the antimicrobial peptide PGLa bound to native cell membranes from bacterial protoplasts and human erythrocytes. *Journal of the American Chemical Society* *submitted*.

---

## Lebenslauf

### Katja Koch (geb. Zimmermann)

#### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 03.10.1980  
Geburtsort: Gera  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schulbildung

09/1987 -06/1990 Polytechnische Oberschule in Gera  
09/1990 -07/1991 Grundschule in Dobel  
09/1991 -06/2000 Gymnasium Neuenbürg  
06/2000 Abitur

#### Berufliche Praxis

09/2000 -08/2001 Freiwilliges soziales Jahr in der Neurologischen Rehabilitationsklinik  
Bad Krozingen

#### Hochschulausbildung

10/2001- 02/2007 Diplomstudium Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) -  
Universitätsbereich  
09/2005 -11/2005 Zoologisches Praktikum in Zambia  
05/2006 -02/2007 Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg bei Frau Prof.  
Dr. med. Margot Zöller; Thema: „*Der Einfluss des  $\alpha\beta 4$  Integrins auf die  
Tetraspanin induzierte Angiogenese.*“

#### Promotion

04/2007- 07/2010 Promotion am Institut für organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie des  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich, bei Frau Prof. Dr.  
Anne S. Ulrich; Thema: „*Strukturuntersuchungen antimikrobieller Peptide an  
biologischen und artifiziellen Membranen.*“