

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Interaktion von antimikrobiellen und zellpenetrierenden Peptiden mit Biomembranen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologe Jan Tobias Roll

aus

Filderstadt

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Karlsruher Institut für Technologie in der Zeit vom 1. Juni 2007 bis 31. Mai 2011 unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich von anderen Autoren übernommen wurden, sind entsprechend kenntlich gemacht. Die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurde beachtet.

*Wage deinen Kopf an den Gedanken, den noch niemand dachte,
Wage deinen Schritt auf den Weg, den noch niemand ging,
auf dass der Mensch sich selber schaffe und nicht gemacht werde
von irgendwem und irgendetwas.*

Friedrich Schiller (1759 - 1805)

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich. Sie gab mir an dem unter ihrer Leitung stehenden Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-2) und dem Lehrstuhl Biochemie des Instituts für Organische Chemie des KIT ein wissenschaftliches Zuhause. Ihr verdanke ich ein aktuelles und spannendes Forschungsprojekt und die Möglichkeit, meine Ideen in dieser Arbeit umzusetzen.

Außerdem möchte ich herzlich danken:

Dr. Johannes Reichert, der bei allen Fragen rund um die UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie stets mein erster Ansprechpartner war. Daraus ergab sich eine ausgesprochen gute und erfolgreiche Zusammenarbeit. Seine Geduld und Diskussionsbereitschaft, sein Fachwissen, seine Erfahrung und seine immer konstruktive Kritik waren ein wesentlicher Faktor für das Gelingen meiner Arbeit.

Dr. Parvesh Wadhvani für seine engagierte Unterstützung bei der Peptidsynthese und ganz besonders für manch hilfreichen Denkanstoß, sowie Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck für ihre Hilfe im Peptidsyntheselabor.

Dr. Claudia Muhle-Goll für ihre Hilfe bei der Überexpression und Aufreinigung der mit CRE fusionierten Proteine.

Dr. Sergii Afonin für viele Tipps und besonders für seine oftmals kurzfristige Bereitschaft bei den Messungen mit MALDI-TOF.

Dr. Eric Gottwald vom Institut für biologische Grenzflächen (IBG-1) des KIT für die Bereitstellung seines Zellkulturlabors und seine Hilfe bei der Planung und Durchführung von durchflusszytometrischen Messungen. Anke Dech und David Thiele waren mir bei allen praktischen Arbeiten mit Zellkulturen eine große Unterstützung.

Prof. Dr. Uwe Strähle, Dr. Sepand Rastegar und Dr. Masanari Takamiya vom Institut für Toxikologie und Genetik des KIT für ihre Mithilfe bei den Zebrafisch-Experimenten, wertvolle Tipps und die Möglichkeit der Nutzung ihrer Labore.

Prof. Dr. H. Earl Ruley von der Vanderbilt University in Nashville, TN, USA, für die Bereitstellung der Tex.ioxP.EG-Zellen und Prof. Dr. Steven F. Dowdy von der University of California in San Diego, CA, USA, für das Plasmid pET 28.2 TAT-Cre.

Viele fruchtbare Diskussionen, Tipps und Hinweise und nicht zuletzt die außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre, die ich während meiner Doktorandenzeit in der Arbeitsgruppe Ulrich erlebt habe, sind ein Verdienst der ganzen Gruppe. Jedem einzelnen davon sei dafür herzlich gedankt.

Besonders möchte ich meiner Frau Claudia danken für den starken Rückhalt, den ich stets von ihr erfahren habe.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	V
Danksagung	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
Symbole und Einheiten	XIX
1 Einleitung	1
1.1 Antimikrobielle und zellpenetrierende Peptide	1
1.2 Eigenschaften und Aufbau von Biomembranen	5
1.3 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	9
2 Aufgaben und Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Kits.....	17
3.1.2 Peptide und Aminosäuren.....	17
3.1.3 Lipide	19
3.1.4 Trägerharze	19
3.1.5 Vektoren	19
3.1.6 Oligonukleotidprimer	20
3.1.7 Antikörper	20
3.1.8 Bakterienstämme	20
3.1.9 Zelllinien.....	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	21
3.2.1.1 <i>Sterilisation von Materialien</i>	21
3.2.1.2 <i>Zielgerichtete Mutagenese</i>	21
3.2.1.3 <i>Hitzetransformation</i>	22
3.2.1.4 <i>Herstellung von Agarplatten</i>	22
3.2.1.5 <i>Plasmidisolierung aus E. coli</i>	23
3.2.2 Proteinchemische Methoden.....	24
3.2.2.1 <i>Proteinüberexpression</i>	24
3.2.2.2 <i>Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinen</i>	24
3.2.2.3 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	24
3.2.3 Peptidsynthese	26
3.2.3.1 <i>Automatische Peptidsynthese</i>	28
3.2.3.2 <i>Synthese des CPP-Fluoreszenz-Qencher-Konstrukts</i>	28

3.2.3.3	<i>Oxidation der Disulfidbrücke</i>	32
3.2.4	Synthese von Glutathion-Dextran.....	32
3.2.5	Spektroskopische Methoden	33
3.2.5.1	<i>Durchflusszytometrie</i>	33
3.2.5.2	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	34
3.2.5.3	<i>UV/Vis-Spektroskopie</i>	36
3.2.6	Massenspektrometrie	36
3.2.7	Chromatographie	37
3.2.7.1	<i>Proteinaufreinigung über Nickel-NTA-Chromatographie</i>	37
3.2.7.2	<i>Größenausschlusschromatographie</i>	38
3.2.7.3	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>	39
3.2.8	Lipidextrusion.....	40
3.2.9	Zellbiologie.....	41
3.2.9.1	<i>Aufrechterhaltung der Zellkulturen</i>	41
3.2.9.2	<i>Zellzählung</i>	41
3.2.9.3	<i>Vitalitätstest</i>	41
4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Demonstrationsversuche mit enzymmarkiertem zellpenetrierendem Peptid	43
4.1.1	Ergebnisse	44
4.1.2	Diskussion.....	48
4.2	Aufbau eines quantifizierbaren Assays	51
4.2.1	Ergebnisse	52
4.2.2	Diskussion.....	63
4.3	Leakage-Experimente mit membranaktiven Peptiden	65
4.3.1	Ergebnisse	65
4.3.2	Diskussion.....	72
4.4	Exkurs: Synergie von PGLa und Magainin 2	81
4.4.1	Ergebnisse	82
4.4.2	Diskussion.....	86
4.5	Fluoreszenzmessungen zur Peptidtranslokation an Liposomen	89
4.5.1	Ergebnisse	89
4.5.2	Diskussion.....	102
4.6	Fluoreszenzmessungen zur Peptidtranslokation in Zellen	105
4.6.1	Ergebnisse	105
4.6.2	Diskussion.....	107
4.7	Ausblick	109
5	Zusammenfassung	111
6	Literatur	113

7 Anhang	123
7.1 Anhang A: Ergänzendes Material	123
7.1.1 Geräte.....	123
7.1.2 Verbrauchsmaterialien	125
7.1.3 Chemikalien	126
7.1.4 Chemikalien für die Zellkultur	128
7.1.5 Puffer und Lösungen.....	129
7.1.6 Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	133
7.2 Anhang B: Leakage-Daten	135
7.3 Anhang C: Berechnungen	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Shai-Matsuzaki-Huang-Modell der Porenbildung.....	2
Abbildung 1-2:	Markierung von CPPs zur Durchführung quantitativer Translokationsstudien.....	4
Abbildung 1-3:	Schematischer Aufbau von Phospholipiden.....	9
Abbildung 1-4:	Jablonski-Diagramm.....	10
Abbildung 1-5:	Fluoreszenzlöschung / Quenchen	12
Abbildung 1-6:	FRET.....	13
Abbildung 3-1:	Vereinfachte Darstellung einer Festphasenpeptidsynthese	27
Abbildung 3-2:	Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sowie der Quencher DPX und n-Tyr	35
Abbildung 4-1:	Schematisch dargestellte Funktionsweise des verwendeten Reportersystems CRE/loxP	44
Abbildung 4-2:	Schematische Darstellung der verwendeten Proteine.....	45
Abbildung 4-3:	Auswertung der durchflusszytometrischen Messung	47
Abbildung 4-4:	TAT-Cre- vs. Cre-Translokation.....	48
Abbildung 4-5:	Funktionsprinzip des CPP-Fluoreszenz-Quencher-Versuchs	51
Abbildung 4-6:	Absorptions- und Fluoreszenzspektren des FRET-Paares 2- Aminobenzamid (Abz) und 3-Nitrotyrosin (n-Tyr) [21]	53
Abbildung 4-7:	Strukturformel des verwendeten Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts	53
Abbildung 4-8:	Gequencht und entquencht TAT-FQC im Vergleich	54
Abbildung 4-9:	Fluoreszenzspektrum von Abz.....	55
Abbildung 4-10:	0.5 ml Spin Column	56
Abbildung 4-11:	Eluationsprofile von Sephacryl 100-HR (links) und Sephacryl 500-HR (rechts).....	57
Abbildung 4-12:	Nachweis freier Thiolgruppen über DTNB.....	58
Abbildung 4-13:	DTNB-Spektrum von vor und nach Zugabe von GSH.....	59
Abbildung 4-14:	GSH-Konzentration in den Vesikeln im zeitlichen Verlauf	60
Abbildung 4-15:	Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitätszunahme nach der Zugabe von TAT-FQC zu PC/Chol-Vesikeln.....	61
Abbildung 4-16:	GSH-Leakage bei POPC/Chol- und POPE/POPG-Vesikeln	62
Abbildung 4-17:	Fluoreszenzspektrum von ANTS gequencht mit DPX und entquencht.....	67
Abbildung 4-18:	Zeitlicher Verlauf des durch MSI-103 verursachten Leakage.....	68
Abbildung 4-19:	Peptidinduziertes Leakage bei POPE/POPG 70/30-Vesikeln	69
Abbildung 4-20:	Peptidinduziertes Leakage bei LM _{wbc} -Vesikeln	70
Abbildung 4-21:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC-Vesikeln	70
Abbildung 4-22:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC/Chol 90/10 Vesikeln	71
Abbildung 4-23:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln	71
Abbildung 4-24:	Zeitlicher Verlauf des Leakage mit PGLa und Magainin 2.....	83
Abbildung 4-25:	Synergiefaktoren in Abhängigkeit des POPG- und Cholesteringehalts	86
Abbildung 4-26:	Thiolgruppen-Gehalt der GSH-Dextran-Lösung im Verlauf der Dialyse	90
Abbildung 4-27:	Zeitverlauf der TAT-FQC-Spaltung	91
Abbildung 4-28:	Prinzip Leakage-Assay von Fluoresceindextran mittels Antikörper	92
Abbildung 4-29:	TAT-verursachtes Leakage von FD70	93

Abbildung 4-30:	Leakage von CF und FD70 bei PGLa, Magainin 2 und deren Mischung ...	94
Abbildung 4-31:	Messbeispiel zur Erstellung einer Kalibrierkurve	96
Abbildung 4-32:	Kalibrierkurve.....	97
Abbildung 4-33:	Membranpotenzial nach Zugabe von TAT	98
Abbildung 4-34:	Signalverlauf der TAT-FQC-Reduktion bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln.....	100
Abbildung 4-35:	TAT-FQC-Reduktion in KG-1a-Zellen	106
Abbildung 4-36:	Temperatureffekte der TAT-FQC-Reduktion in KG-1a-Zellen	107
Abbildung 4-37:	Mikroskopaufnahmen eines mit TAT-FQC behandelten und eines unbehandelten Zebrafisch-Embryos	110
Abbildung 7-1:	Peptidinduziertes Leakage bei POPE/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/100)	135
Abbildung 7-2:	Peptidinduziertes Leakage bei LM _{wbc} -Vesikeln (P/L 1/100)	135
Abbildung 7-3:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC-Vesikeln (P/L 1/100)	136
Abbildung 7-4:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC/Chol 90/10 Vesikeln (P/L 1/100) ..	136
Abbildung 7-5:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/100)	137
Abbildung 7-6:	Peptidinduziertes Leakage bei POPE/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/25) .	137
Abbildung 7-7:	Peptidinduziertes Leakage bei LM _{wbc} -Vesikeln (P/L 1/25)	138
Abbildung 7-8:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC-Vesikeln (P/L 1/25)	138
Abbildung 7-9:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC/Chol 90/10 Vesikeln (P/L 1/25)	139
Abbildung 7-10:	Peptidinduziertes Leakage bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/25) .	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Einstellung des Thermocyclers für die zielgerichtete Mutagenese des pET 28.2 TAT-Cre	22
Tabelle 3-2:	Zusammensetzung des Trenngels.....	25
Tabelle 3-3:	Zusammensetzung des Sammelgels	25
Tabelle 3-4:	Eingesetzte Fluorophore mit den in dieser Arbeit verwendeten spektralen Parametern	35
Tabelle 4-1:	Synergiefaktoren in Abhängigkeit der verwendeten Lipidmischungen.....	84
Tabelle 4-2:	Übersicht der TAT-FQC Experimente an Vesikeln.....	101

Abkürzungsverzeichnis

A_0, A_1	Energiezustände des Akzeptors
A_{Lipid}	Lipidfläche
A_{Vesikel}	Vesikelfläche
Abz	2-Aminobenzamid
Ac	Acetyl
Aib	2-Aminoisobuttersäure
AMP	antimikrobielles Peptid
AN	Acetonitril
ANTS	8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATCC	American type culture collection
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
c_a	Außenkonzentration
c_i	Innenkonzentration
c_K	Kaliumkonzentration
c_K^a	Kaliumkonzentration außerhalb der Vesikel
c_K^i	Kaliumkonzentration innerhalb der Vesikel
c_{ANTS}^a	ANTS-Konzentration außerhalb der Vesikel
c_{ANTS}^i	ANTS-Konzentration innerhalb der Vesikel
c_{ANTS}^K	ANTS-Gesamtkonzentration in der Küvette
c_{Na}	Natriumkonzentration
$c_{\text{TAT-FQC}}$	TAT-FQC-Konzentration
$c_{\text{Valinomycin}}$	Valinomycinkonzentration
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
CL	Cardiolipin
CPP	zellpenetrierendes Peptid
CSF	engl.: colony-stimulating factor (Kolonie-stimulierende Faktoren)
d	Schichtdicke der Küvette
D_0, D_1	Energiezustände des Donors
d. h.	das heißt
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
$\text{DiIC}_1(5)$	1,1',3,3,3',3'-hexamethylindo-dicarbocyanin Iodid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPX	p-Xylen-bis-pyridiniumbromid

DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E</i>	Energietransfereffizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein
engl.	englisch
Eq	Equivalent
et al.	lat.: et alii (und andere)
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
F	Faraday-Konstante
F_0	Fluoreszenzintensität bei Potenzial Null
<i>F</i>	Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers
F_0	Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Quenchers
[<i>F</i>]	Fluorophor
[<i>F</i> [*]]	Fluorophor im angeregten Zustand
ΔF	Erhöhung der Fluoreszenz abhängig vom jeweiligen Kaliumkonzentrationsgradienten
FD70	Fluorescein isothiocyanat-dextran, Molmasse 70 kDa
[<i>FQ</i>]	nicht fluoreszierender Komplex im Grundzustand
[<i>FQ</i> [*]]	nicht fluoreszierender Komplex im angeregten Zustand
FQC	engl.: fluorescence-quencher-construct (Fluoreszenz-Quencher-Konstrukt)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	Vorwärtsstreulicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GSH	Glutathion
<i>h</i>	Plancksches Wirkungsquantum
H ₂ O bidest.	bidestilliertes Wasser
HBTU	O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
I	Lichtintensität nach Probenaustritt
I_0	Lichtintensität vor Probeneintritt
IC	interne Konversion
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
I-state	α -helikales Peptid orientiert mit seiner Längsachse parallel zur Membrannormalen (I steht hier für engl.: inserted).
K_D	Stern-Volmer-Quenchingkonstante bei dynamischem Quenchen
k_{Fl}	Emissionsrate des Fluorophors

KIT	Karlsruher Institut für Technologie
$\sum k_{nr}$	repräsentiert die Summe der strahlungslosen Wege in den Grundzustand
KOH	Kaliumhydroxid
k_q	bimolekulare Quenchingkonstante
K_S	Stern-Volmer-Quenchingkonstante bei statischem Quenchen
K_2SO_4	Kaliumsulfat
L_α	flüssigkristalline Phase
L_β	Gelphase
LB	Luria Bertani
LC/MS	engl.: liquid chromatography mass-spectrometry (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
loxP	engl.: locus of crossing over
LR	Lösungsmittelrelaxation
LUV	engl.: large unilamellar vesicles (Große unilamellare Vesikel)
m	Masse
MALDI	engl.: matrix-assisted laser desorption ionisation (matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisierung)
MeOH	Methanol
MESAB	3-Aminobenzoessäureethylester Methansulfonat
Mio	Millionen
MW	Molmasse (engl. molecular weight)
$n_{Lipid/Vesikel}$	Lipidmoleküle pro Vesikel
$NaBH_4$	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na_2SO_4	Natriumsulfat
NLS	engl.: nuclear localization signal (Kernlokalisationssequenz)
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NTA	Nitrilotriessigsäure
n-Tyr	3-Nitrotyrosin = Tyr(3-NO ₂)
OCD	engl.: oriented circular dichroismus (Orientierter Circulardichroismus)
OD ₆₀₀	Optischen Dichte bei 600 nm
otBu	t-Butylester
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS +/-	phosphatgepufferte Salzlösung mit Ca ⁺ und Mg ⁺
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PhI	Phenylalaninol
P/L	Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
Pr	Promotor
PS	Phosphatidylserin
[Q]	Quencher(konzentration)

<i>r</i>	Radius
<i>r</i>	Distanz zwischen Donor und Akzeptor
<i>R</i>	Gaskonstante
<i>R₀</i>	Förster-Abstand
RP-HPLC	engl.: reversed phase high performance liquid chromatography (Umkehr-Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>S₀, S₁, S₂</i>	Energiezustände
SDS	engl.: Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SM	Sphingomyelin
sog.	sogenannte/r
SPPS	engl.: solid phase peptide synthesis, (Festphasenpeptidsynthese)
SSC	Seitwärtsstreulicht
S-state	α -helikales Peptid orientiert mit seiner Längsachse senkrecht zur Membrannormalen, es liegt daher auf der Membran auf (S steht hier für engl.: surface).
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Temperatur
<i>T_K</i>	Absolute Temperatur
<i>TAT_i / TAT_a</i>	Anreicherungsfaktor von TAT
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Tetrafluorethylen
TOF	engl.: time of flight (Flugzeitanalysator)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Triphenylmethyl
T-state	α -helikales Peptid in die Membran gekippt (T steht hier für engl.: tilted).
<i>U</i>	elektrische Spannung
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
<i>V_G</i>	Gesamtvolumen
<i>V_{Probe}</i>	Probenvolumen
<i>V_{Vesikel}</i>	Vesikelvolumen
VIS	engl.: visible
vs.	lat.: versus (gegenüber gestellt)
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den im wissenschaftlichen Sprachgebrauch üblichen Regeln der JCBN und NC- IUBMB abgekürzt. Die Abkürzungen der in dieser Arbeit verwendeten Lipide finden sich in Kapitel 3.1.3.

Symbole und Einheiten

α	Alpha
Å	Ångström
β	Beta
γ	Gamma
Da	Dalton
Δ	Delta
ε	molarer Extinktionskoeffizient
h	Stunde
l	Liter
λ	Wellenlänge
$\lambda_{\text{Excitation}}$	Excitationswellenlänge
$\lambda_{\text{Emission}}$	Emissionswellenlänge
M	Molar
min	Minute
#	Nummer
ν	Frequenz
Osmol	Osmolarität
‰	Promille
%	Prozent
π	3,142...
rpm	engl.: revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
σ	Dichte
s	Sekunde
Σ	Summe
τ_0	Fluoreszenzlebensdauer
\approx	ungefähr
Φ	Quantenausbeute
Ψ	Membranpotenzial
Ψ_e	elektrisches Potenzial extern
Ψ_i	elektrisches Potenzial intern

Darüber hinaus werden die Einheiten und Präfixe des Système International d'Unit s (SI) verwendet.

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle und zellpenetrierende Peptide

Sowohl antimikrobielle Peptide (AMPs) als auch zellpenetrierende Peptide (CPPs) besitzen die Fähigkeit, mit Biomembranen zu interagieren. Daher können beide Gruppen als membranaktive Peptide bezeichnet werden. Viele dieser Peptide sind in der Lage, Biomembranen zu überwinden, ohne dabei deren Integrität zu zerstören, insbesondere die CPPs. Andere membranaktive Peptide wirken dagegen stark lytisch und bewirken die Zerstörung der Zelle, hier insbesondere die AMPs. Aufgrund dieser Eigenschaften sind AMPs und CPPs vielversprechende Werkzeuge, um zur Bekämpfung multiresistenter Bakterienstämme oder als Transporter für Medikamente zu dienen. Viele der AMPs haben ihren Ursprung als Bestandteile der angeborenen Immunabwehr; bei CPPs handelt es sich dagegen oftmals um Peptidsequenzen aus viralen Proteinen (z. B. bei TAT) oder um künstlich hergestellte Sequenzen. AMPs und CPPs sind meist recht kleine amphipathische Peptide (unter 30 Aminosäuren (As)), die durch kationische Aminosäuren positive Nettoladung tragen. Sie sind in der Lage, elektrostatisch mit Lipidmembranen zu interagieren und an Membranbestandteile mit negativer Nettoladung zu binden wie z. B. an negativ geladene Lipidkopfgruppen oder Proteoglykanen. Viele der Peptide gehen beim Kontakt mit der Membran von einem in wässriger Phase vorliegenden ungeordneten Zustand in ein geordnetes Sekundärstrukturmotiv (oft eine α -Helix) über. Im weiteren Verlauf kommt es zu Peptid-verursachten Membranstörungen, welche oft einhergehen mit Peptidtranslokation (besonders bei CPPs) bzw. mit dem Zusammenbruch des Membranpotenzials durch Bildung von Poren und dem Ausfluss vitaler Komponenten (besonders bei AMPs) [1]. Auch werden verschiedene membranschonende, endozytotische Aufnahmewege diskutiert [2]. Sowohl endozytotische als auch direkte Wege scheinen bisweilen parallel ablaufen zu können und dabei – je nach Versuchsbedingung – unterschiedlich gewichtet zu sein [3]. Auch bei zunächst endozytotisch ablaufenden Aufnahmewegen muss die Membran letztendlich von den Peptiden überwunden werden, wobei die Ansäuerung und bestimmte, bevorzugt in späten Endosomen vorkommende Lipide wie Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) eventuell unterstützend wirken [4].

Unterschiedliche mechanistische Modelle bieten Erklärungsansätze für die Membrantranslokation von Peptiden. Für amphipathische α -helikale Peptide wurde die Störung der Membran beispielsweise durch das Teppichmodell (engl.: carpet-model) beschrieben; dies würde einer Lyse entsprechen. Die Bildung von membranüberspannenden

Poren wurde durch das Fasstdaubenmodell (engl.: barrel-stave-model) oder durch das Toroidalmodell beschrieben [5, 6, 7, 8].

Michael Zasloff [9] brachte diese Modelle in einen konzentrationsabhängigen Zusammenhang und vereinte sie im Shai-Matsuzaki-Huang-Modell [5, 6, 7, 9] (siehe Abbildung 1-1).

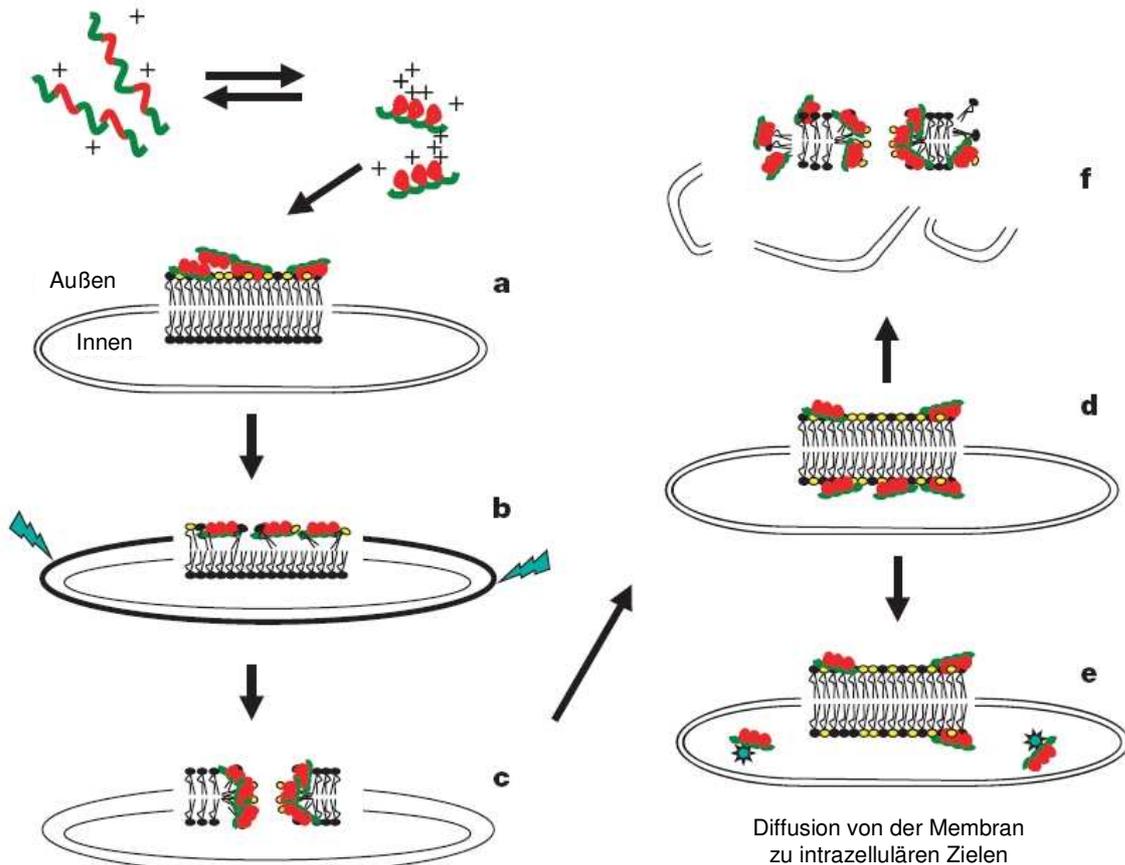


Abbildung 1-1: Shai-Matsuzaki-Huang-Modell der Porenbildung

Die Peptide liegen im wässrigen Außenmilieu meist ohne Sekundärstruktur vor oder nehmen im Gleichgewicht eine Struktur ein, die amphipathischen Charakter hat. (a) Elektrostatikale Interaktion α -helikaler Peptide mit der Lipidmembran. (b) Integration der Peptide in die äußere Schicht der Membran bewirkt Spannungen zwischen innerer und äußerer Schicht der Membran (durch blaue Pfeile symbolisiert). (c) Bildung transienter Poren durch „Aufbrechen“ der Lipiddoppelschicht. (d) Peptidtranslokation verbunden mit (e) oder (f). (e) Diffusion von der Membran ins Zellinnere. (f) Zusammenbruch der Membranstabilität. Lipide mit gelben Kopfgruppen tragen eine negative Nettoladung, Lipide mit schwarzen Kopfgruppen sind neutral. Grüne As sind hydrophob, rote As sind positiv geladen. Abbildung aus [9].

Durch elektrostatisch vermittelte Anlagerung und Integration der Peptide an der äußeren Membranseite baut sich dort Spannung auf. Dies führt zum Aufbrechen der Lipiddoppelschicht und zur Bildung transienter Poren, was entweder zum Übertritt der Peptide, also zur Peptidtranslokation führt, oder den Zusammenbruch der Membranstabilität und gegebenenfalls eine komplette Lyse der Membran zur Folge hat [9]. Über derartigen Störungen und Poren kann es zum Ausfluss von Inhaltsstoffen aus dem Zell- oder Vesikellumen kommen, dem Leakage.

Als weiteres Translokationsmodell wird für manche zellpenetrierenden Peptide, wie z. B. Penetratin, das Modell einer invertierten Mizelle beschrieben [10]. In diesem Modell wird das Peptid nach erstem Kontakt mit den Phospholipiden der Membran im hydrophilen Lumen einer invertierten Mizelle eingeschlossen, durch die Membran geschleust und auf der gegenüberliegenden Seite wieder aus der Mizelle entlassen. Dieser Translokationsprozess verläuft – ähnlich endozytotischen Prozessen – ohne das Auftreten von Poren, ist aber – ebenso wie die Mechanismen, die zur Porenbildung führen – energieunabhängig. Gerade die vielfältigen und variierenden Interaktionsmöglichkeiten von Peptiden mit biologischen Membranen machen eine strikte Einteilung in AMPs und CPPs oft fraglich; in der Praxis erfolgt sie in der Regel anwendungsorientiert. So werden AMPs als mögliche Substanzen zur Bekämpfung bakterieller Infektionen betrachtet und teilweise auch schon verwendet [11, 12], während man CPPs eher als Transportmoleküle für diverse Cargos über Biomembranen ohne nennenswerte Schädigung der Zielzelle sieht [13].

Der quantitative Nachweis des Membrandurchtritts von CPPs kann über unterschiedliche Methoden erfolgen, welche im Folgenden kurz diskutiert werden und in Abbildung 1-2 zusammenfassend dargestellt sind. Hierbei muss stets gewährleistet sein, dass intrazellulär lokalisierte Peptide von möglicherweise membrangebundenen, aber dennoch extrazellulär befindlichen Peptiden sicher unterschieden werden können. Dies bedingt oftmals einen entsprechenden Waschschrift, wodurch ein Verfolgen der Translokation in Echtzeit nicht mehr möglich ist. Der Nachweis translozierter CPPs erfolgt üblicherweise indirekt über die Detektion einer Reportergruppe und nicht direkt über die Detektion des CPP. Eine Ausnahme hiervon stellt ein direkter Antikörpernachweis dar; dieser wurde bisher zur Quantifizierung der Aufnahme eines TAT-Peptids verwendet [14]. Die Immunodetektion erfolgte hier durch einen monoclonalen Antikörper mit anschließender Quantifizierung über ein durchflusszytometrisches Verfahren.

Erfolgt der Nachweis über eine Reportergruppe, so muss diese vor dem Versuch an die Aminosäuresequenz des membranaktiven Peptids angefügt werden. Dies geschieht entweder über eine Disulfidbrücke, über die direkte Synthese des Reporters an das Peptid

durch Festphasenpeptidsynthese oder in Form rekombinant exprimierter Fusionsproteine.

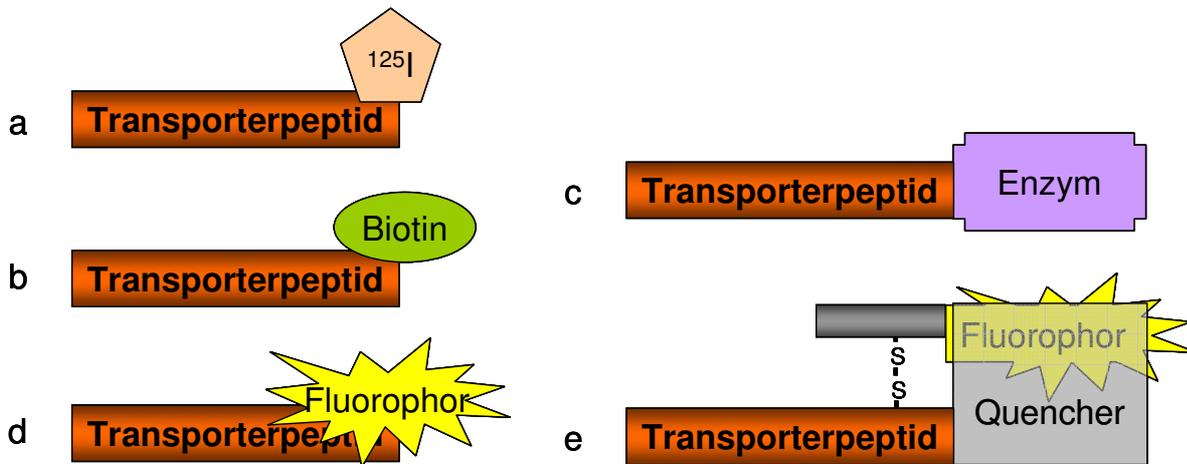


Abbildung 1-2: Markierung von CPPs zur Durchführung quantitativer Translokationsstudien

(a) Radioaktive Markierung zur Detektion durch γ -Zähler. (b) Nachweis von biotinyliertem Peptid über Streptavidin. (c) Nachweis über enzymatische Aktivität. (d) Detektion der Fluoreszenzintensität z. B. über Fluoreszenzspektroskopie, Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie. (e) Nachweis über ein reduktionssensitives Fluoreszenz-Quencher-Konstrukt. Die Abbildung ist in leicht veränderter Form aus [15] entnommen.

Als Reportergruppe eignet sich beispielsweise ^3H oder ^{125}I . Durch Markierung mit derartigen radioaktiven Isotopen (siehe Abbildung 1-2 (a)) kann eine Quantifizierung der intrazellulären Peptidfraktion über einen γ -Zähler erfolgen. Durchgeführt wurde diese Methode beispielsweise an dem CPP Transportan an Melanomzellen [16].

Biotin ist eine weitere Reportergruppe, die bei Untersuchungen der Translokation von CPPs verwendet wird (siehe Abbildung 1-2 (b)). Biotin wird indirekt durch Streptavidin detektiert, das an dieses nichtkovalent bindet. Die Quantifizierung kann dann über einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest erfolgen [17].

Peptidtranslokation kann auch über die Enzymaktivität des Reporters gemessen werden (siehe Abbildung 1-2 (c)). Als solcher eignen sich beispielsweise RNase A, β -Galactosidase, Meerrettichperoxidase, *Pseudomonas* Exotoxin A oder CRE (engl.: cyclization recombination). Diese Methode wurde bisher besonders zur Untersuchung von TAT-Peptiden angewandt [18, 19, 20]. Die Quantifizierung erfolgt stets durch Nachweis eines entstehenden Substrats, das mittels der internalisierten Enzyme produziert wurde. In Kapitel 4.1 wird die Translokation eines enzymgekoppelten CPP untersucht.

Die wohl am häufigsten praktizierte Methode zur Quantifizierung einer internalisierten Peptidfraktion ist die Markierung der CPPs mit einem Fluorophor (siehe Abbildung 1-2 (d))

und die anschließende Detektion über Fluoreszenzmikroskopie, -spektroskopie oder Durchflusszytometrie. Bei der Auswahl geeigneter Fluorophore müssen deren charakteristische Eigenschaften beachtet werden. Hierzu gehören beispielsweise die Anfälligkeit gegenüber Photobleaching, die Hydrophobizität und die Größe. Das in dieser Arbeit verwendete 2-Aminobenzamid (Abz) [21, 22] bietet sich hier in besonderem Maße an: Es ist deutlich kleiner als beispielsweise Fluorescein, es ist photoresistent und es verändert die Hydrophobizität von Peptiden nicht. Aufgrund seiner Emission bei 420 nm ist es für mikroskopische Fluoreszenzdetektion allerdings nur bedingt geeignet. Die Detektion über ein Fluoreszenzspektrometer ist jedoch ohne weiteres möglich [15].

Die Markierung eines membranaktiven Peptids kann auch mit einem reduktionssensitiven Fluoreszenz-Quencher-Konstrukt erfolgen [23, 24]. Dies ermöglicht die Quantifizierung der Peptidtranslokation in Echtzeit, da sich die Entfernung der membrangebundenen und nicht internalisierten Peptidfraktion erübrigt. Eine derartige Methode (siehe Abbildung 1-2 (e)) wird in der vorliegenden Arbeit sowohl an künstlichen Lipidvesikeln wie auch an lebenden Zellen angewandt. Das ihr zugrunde liegende Funktionsprinzip wird in Kapitel 4.2 eingehend erläutert.

1.2 Eigenschaften und Aufbau von Biomembranen

Biomembranen sind natürlicher Bestandteil aller lebenden Zellen und grenzen diese von ihrer Außenwelt ab (Plasmamembran) oder bilden abgegrenzte Reaktionsräume, sogenannte Kompartimente innerhalb eukaryotischer Zellen (z. B. Mitochondrien, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum oder Lysosomen). Ihre Grundstruktur besteht aus einer kontinuierlich zweilagigen Anordnung von Phospholipidmolekülen zu einer Lipiddoppelschicht, deren durchschnittliche Dicke 5 nm beträgt. Da Membranlipide amphiphile Moleküle sind, ordnen sich deren hydrophobe Bereiche im Membraninnern an, während die hydrophilen Bereiche dem Innen- und Außenlumen der Zelle zugewandt sind. Dadurch stellen Biomembranen wirkungsvolle Diffusionsbarrieren für Ionen und größere polare Moleküle wie As oder Glukose dar. Für hydrophobe Moleküle, Gase oder kleine polare Moleküle wie z. B. Wasser oder Harnstoff ist die Membran dagegen permeabel. Durch die Möglichkeit der lateralen und in einem weit geringeren Maß auch transversalen Diffusion der Lipide innerhalb der Doppelschicht erhält die Membran eine dynamische Struktur, die in ihrem Verhalten mit einer zweidimensionalen Flüssigkeit verglichen werden kann. Durch die individuelle Charakteristik unterschiedlicher Membranlipide kann die Fluidität der Membran stark schwanken. Auch Cholesterin, das zwischen den Lipiden in die Membran eingelagert werden kann, setzt die Fluidität der Membran deutlich herab und führt so zu einer wesentlich starreren Membran. Außer strukturellen Aufgaben, die beispielsweise bei der Fusion von

Kompartimenten der Migration oder der Zellteilung bewerkstelligt werden müssen, nehmen Biomembranen auch eine ganze Reihe funktioneller Aufgaben wahr. Dazu gehören beispielsweise der Aufbau elektrochemischer Gradienten, die Informationsaufnahme und Weiterleitung sowie viele biochemische Prozesse wie z. B. Zellatmung oder Fotosynthese [25]. Diese werden durch eine Vielzahl von in die Lipiddoppelschicht ein- (integrale) oder angelagerten (periphere) Membranproteinen bewerkstelligt. Insgesamt scheinen etwa 30 % der proteincodierenden Gene für Membranproteine zu codieren [26]. Da sie die Adressaten vieler Medikamente sind, ihre Struktur aber oftmals noch unbekannt ist, sind sie Gegenstand intensiver Forschung. Desweiteren sind Proteoglycane wie z. B. Heparansulfat und Glycoproteine häufige Bestandteile von Biomembranen.

Der heterogene Aufbau einer Biomembran aus verschiedenen Lipiden und diversen Proteinen könnte den Eindruck erwecken, es handele sich dabei um ein chaotisches Gemisch. Diese Vermutung ist jedoch nicht richtig; es handelt sich vielmehr um ein sehr komplexes Gebilde, dessen Funktion als Ganzes sich aus bestimmten Anordnungen von Einzelkomponenten ergibt. Membranlipide sind nicht gleichmäßig in der Membran verteilt, sondern gruppieren sich bisweilen zu Lipidinseln [27], die aufgrund der höheren Fluidität der sie umgebenden Lipide in der Membran zu „schwimmen“ scheinen. Da Lipidinseln als Protein-Ankerstellen dienen, stellen sie lokale funktionale Ordnungsstrukturen dar. Auch Proteine bewegen sich auf oder in diesem „Lipidsee“ durch überwiegend laterale Diffusion. So ergibt sich eine Art flüssiges Mosaik. Ein Modell dafür wurde 1972 von Singer und Nicolson [28] beschrieben.

Die Entstehung neuer Biomembranen erfolgt stets durch die Erweiterung einer bereits bestehenden Lipidmatrix durch die Eingliederung neu synthetisierter Lipide. Diese Aufgabe übernimmt hauptsächlich das glatte endoplasmatische Retikulum; von diesem aus gelangen neu entstandene Membranteile über den Golgi-Apparat, der ebenfalls einen wichtigen Lipidsyntheseort darstellt, in vesikulärer Form zum Zielort. Neue Lipide werden stets auf der cytosolischen Seite des glatten endoplasmatischen Retikulums integriert. Ein Wechsel auf die luminale Seite kann dann durch Translokationsproteine katalysiert werden. Im Golgi-Apparat können dann weitere Syntheseschritte und Modifikationen erfolgen. Aufgrund von Effizienzunterschieden in der transversalen Diffusion unterschiedlicher Lipide ergibt sich in natürlich synthetisierten Membranen eine Lipid-Asymmetrie [29], die beim Einbau in die Zielmembran erhalten bleibt.

Lipidvesikel als Biomembranmodell

Biomembranen können in Form unterschiedlicher, künstlicher Membransysteme simuliert werden. In dieser Arbeit geschah dies in Form von Vesikeln bzw. Liposomen – beide Begriffe werden in dieser Arbeit synonym verwendet –, die eine dreidimensionale kugelförmige Gestalt haben und deshalb besonders geeignete Modelle für zelluläre und subzelluläre Strukturen darstellen [25]. Dabei wurden sogenannte „Große unilamellare Vesikel“ (engl.: large unilamellar vesicles, LUV) mit einem Durchmesser von etwa 100 nm durch mehrfaches Extrudieren einer homogenisierten Lipidsuspension durch eine Polycarbonatmembran präpariert. Unterschiede zu einer zellulären Plasmamembran betreffen den Aufbau dahingehend, dass in vesikulären Systemen keine Lipid-Asymmetrie hergestellt werden kann, und die Membrankomplexität. Im Versuch kann dies durchaus einen Vorteil bedeuten, da alle Bestandteile der Membran definiert sind, und beobachtete Effekte einer bestimmten, z. B. bewusst veränderten Membrankomponente zugeschrieben werden können.

Aufbau und Eigenschaften der Membranlipide

Grundbaustein der Biomembranen sind Membranlipide. Sie können grob in Phospholipide, Glycolipide und Cholesterin eingeteilt werden und haben amphiphilen Charakter. Aufgrund dieser Eigenschaft bilden sie in polaren Lösungsmitteln wie Wasser spontan nach einem entropischen Mechanismus Lipiddoppelschichten oder Mizellen aus, wobei die hydrophile Seite dem polaren Lösungsmittel zugewandt wird. Phospholipide können wiederum in Phosphoglyceride und Sphingomyeline unterteilt werden, wobei die Sphingomyeline mit den Glykolipiden auch als Sphingolipide gruppiert werden können [30].

Phosphoglyceride sind die vorherrschenden strukturellen Lipide in Biomembranen. Sie bestehen aus Glycerin-3-phosphat, das am C₁- und C₂-Atom mit hydrophoben Acylgruppen verestert ist. Die Acylgruppen können unterschiedliche Längen haben und liegen meist gesättigt oder ungesättigt in *cis*-Konfiguration vor. Die polare Phosphatgruppe ist oft noch mit einem Aminoalkohol oder einem Kohlenhydratrest verestert. Hierzu gehören beispielsweise die Phosphatidylcholine (POPC). Diese stellen in den meisten eukaryotischen Membranen über 50 % der Phospholipide dar. In prokaryotischen Membranen kommen sie hingegen nicht vor. POPC haben annähernd zylindrische Gestalt, was die spontane Selbstorganisation zu planaren Doppelschichten begünstigt. Phosphatidylethanolamine (POPE) hingegen kommen sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Membranen vor, sind in eukaryotischen Plasmamembranen aber überwiegend auf der cytosolischen Seite angeordnet. Aufgrund ihrer relativ kleinen Kopfgruppe haben POPE eher konische Gestalt

[30, 31]. Sie setzen Membranen daher unter Biegespannungen, die beispielsweise bei Knospung, Zellteilung oder Fusion eine wichtige Rolle spielen. Weitere Phosphoglyceride sind Phosphatidylglycerine (POPG) und Phosphatidylserine (POPS). Sie führen Kopfgruppen mit negativer Nettoladung und finden sich in der eukaryotischen Plasmamembran auf der cytosolischen Seite. Auf der extrazellulären Seite ergibt sich bei eukaryotischen Plasmamembranen hingegen eine neutrale Ladungsverteilung. Das in dieser Arbeit nur im *Escherichia coli* (*E. coli*)-Extrakt enthaltene Cardiolipin (CL) gehört ebenfalls zu den Phospholipiden. Es handelt sich dabei um ein Diphosphatidylglycerin, das nur in bakteriellen und mitochondrialen Membranen vorkommt. CL enthält eine zweifach negativ geladene Kopfgruppe [30].

Sphingolipide besitzen als hydrophobes Grundgerüst das Ceramin. Im Fall der Sphingomyeline (SM) bindet dieses am C₁-Atom über einen Phosphodiester an Ethanolamin oder Cholin. Die Glycolipide enthalten Mono-, Di- oder Oligosaccharide und basieren auf Glucosylceramid oder – in selteneren Fällen – auf Galactosylceramid [32]. In dieser Arbeit findet von den Sphingolipiden nur das Phospholipid SM Anwendung. Es handelt sich dabei um das vorherrschende Sphingolipid in Säugerzellen. Die Kopfgruppe von SM ist neutral. Die hydrophoben Alkyl- und Acylgruppen liegen meist gesättigt oder ungesättigt in *trans*-Konfiguration vor. Somit hat SM eine zylindrische Form, die jedoch etwas schmaler ist als die von PC [30]. SM kommt in dieser Arbeit nur in Lipidmischungen vor, mit denen Membranen von Blutzellen simuliert werden.

Cholesterin gehört zu den Sterinen [30]. Es erhöht die Stabilität der Plasmamembran eukaryotischer Zellen und ist dort sowohl auf der extrazellulären als auch auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. In prokaryotischen Membranen kommt es hingegen nicht vor. In Abbildung 1-3 werden die Strukturen einiger Membranlipide exemplarisch gezeigt.

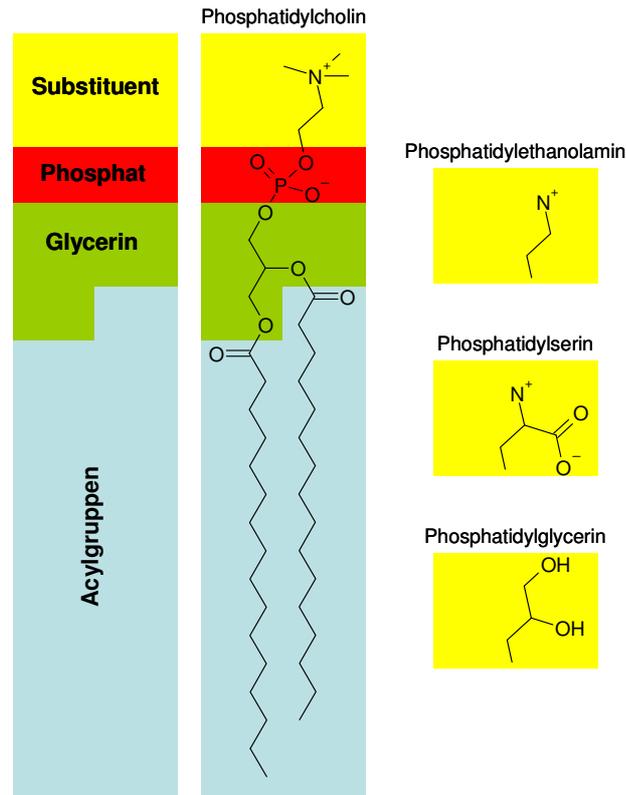


Abbildung 1-3: Schematischer Aufbau von Phospholipiden

Links sind die Bestandteile von Phospholipiden schematisch dargestellt. In der Mitte ist eine entsprechende Strukturformel gezeigt. Beispielhaft sind rechts einige unterschiedliche Substituenten angeführt. Von diesen tragen Phosphatidylserine (PS) und Phosphatidylglycerine (PG) eine negative Nettoladung. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind dagegen neutral.

Lipiddoppelschichten können temperaturabhängig in verschiedenen Phasen vorliegen. Unter physiologischen Bedingungen sind dabei lamellare Stadien relevant. Diese können jedoch weiter differenziert werden. In den meisten Fällen liegen die Lipide in der flüssigkristallinen Phase (L_α) vor [30]. Sphingomyelinreiche Regionen, wie sie beispielsweise in sog. Lipid Rafts auftreten können, zeigen jedoch unter physiologischen Bedingungen die Tendenz, in der Gelphase (L_β) vorzuliegen [30]. Um das Vorliegen der Lipide in einer physiologisch relevanten Phase zu gewährleisten, wurden sämtliche Versuche mit Vesikeln sowie deren Präparation bei 37 °C durchgeführt.

1.3 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz bezeichnet einen Relaxationsprozess, bei dem ein Molekül durch Photonenemission von einem energetisch angeregten Zustand, der zuvor nach Photonenabsorption eingenommen wurde, in seinen Grundzustand (S_0) zurückkehrt. Die Photonenabsorption, also die Anhebung in den angeregten Zustand, findet dabei in einem

Zeitraum von 10^{-15} s statt. Die unterschiedlich besetzten angeregten Energieniveaus relaxieren über interne Konversion (IC) thermisch innerhalb von 10^{-12} s auf den untersten Vibrationszustand (S_1). Die weitere Relaxation in den Grundzustand findet dann über Fluoreszenzemission im Zeitbereich von 10^{-9} s bis 10^{-8} s statt. Die möglichen Übergänge von Valenzelektronen in unterschiedliche Energieniveaus sowie Relaxationswege in den Grundzustand können mit dem Jablonski-Diagramm [33] dargestellt werden (siehe Abbildung 1-4). Da über interne Konversion, welche thermische Relaxation und Vibrationsrelaxation beinhaltet, Energieverluste einhergehen, ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts stets langwelliger als das eingestrahle Licht (Stokesverschiebung). Die Verschiebung der Wellenlänge des Fluoreszenzlichts kann auch in erheblichem Maße vom verwendeten Lösungsmittel abhängen. Generell führen polare Lösungsmittelmoleküle zu einer Absenkung des Energieniveaus. Die damit verbundene Rot-Verschiebung ist unter dem Begriff Lösungsmittelrelaxation (LR) bekannt.

Die Quantenausbeute (Φ) ist ein Maß für die Effizienz der Fluoreszenz. Sie entspricht dem Verhältnis aus emittierten Photonen relativ zu den absorbierten Photonen. Fast immer sind beim Übergang des Fluorophors aus seinem angeregten Zustand in den Grundzustand außer der Photonenemission auch strahlungslose Prozesse beteiligt.

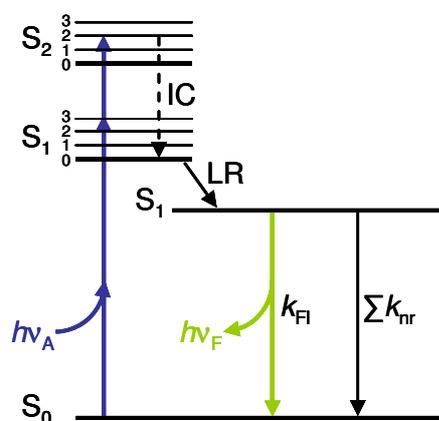


Abbildung 1-4: Jablonski-Diagramm

Durch Absorption eines Photons wird der Fluorophor aus dem Grundzustand S_0 in angeregte Zustände gehoben (S_1 oder S_2). Nach interner Konversion (IC) und ggf. Lösungsmittelrelaxation (LR) erfolgt die Relaxation in den Grundzustand unter Emission eines Photons (k_{FI}). Relaxiert das Molekül auch über strahlungslose Prozesse (Σk_{nr}), so vermindert dies die Quantenausbeute.

Die Emission des Fluorophors beschleunigt sich daher mit den Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Zerfallsprozesse (Σk_{nr}). Dabei vermindert sich die Quantenausbeute Φ .

Quantenausbeute

$$\Phi = k_{FI} / (k_{FI} + \Sigma k_{nr})$$

Φ = Quantenausbeute, k_{FI} = Emissionsrate des Fluorophors, Σk_{nr} = Summe der Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Relaxationsprozesse

Fluoreszenzlöschung (engl.: quenching)

Die Fluoreszenzintensität eines Fluorophors kann abgeschwächt werden, ohne dass dabei der Fluorophor selbst verändert wird. Dieser Vorgang, der über unterschiedliche Mechanismen erfolgen kann, wird als Fluoreszenzlöschung oder Quenchen bezeichnet. Man unterscheidet zwei Mechanismen, das dynamische Quenchen und das statische Quenchen.

Bei einer dynamischen Fluoreszenzlöschung erfolgt die Abschwächung der Fluoreszenzintensität durch den Zusammenstoß des angeregten Fluorophors während seiner Lebensdauer τ_0 mit einem anderen in Lösung befindlichen Molekül, dem sogenannten Quencher. Bei diesem kurzen Stoßkontakt beider Moleküle wird die Energie des Fluorophors auf das Quenchemolekül übertragen. Dabei geht der Fluorophor in seinen Grundzustand über, während die auf den Quencher übertragene Energie in Form von Wärme frei wird. Die Intensitätsabnahme bei dieser sogenannten Stoßlöschung wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben [34].

Stern-Volmer-Gleichung Dynamisches Quenchen

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

F_0 = Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Quenchers, F = Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers, k_q = bimolekulare Quenchingkonstante, τ_0 = Lebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit des Quenchers, $[Q]$ = Quencherkonzentration, K_D = Stern-Volmer-Quenchingkonstante bei dynamischem Quenchen

Statische Fluoreszenzlöschung tritt auf, wenn Fluorophor und Quencher einen nichtfluoreszierenden Komplex bilden. Dabei ist der Zusammenhang der Fluoreszenzintensität und der Quencherkonzentration aus der Bindungskonstante der Komplexbildung (K_S) ersichtlich. Diese entspricht der Stern-Volmer-Quenchingkonstante bei statischem Quenchen [34].

Stern-Volmer-Gleichung Statisches Quenchen

$$F_0/F = 1 + K_S[Q]$$

F_0 = Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Quenchers, F = Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers, $[Q]$ = Quencherkonzentration, K_S = Stern-Volmer-Quenchingkonstante bei statischem Quenchen

Ein Beispiel für statische Fluoreszenzlöschung stellt der in dieser Arbeit verwendete Quencher p-Xylen-bis-pyridiniumbromid (DPX), der den Fluorophor 8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) effizient quencht.

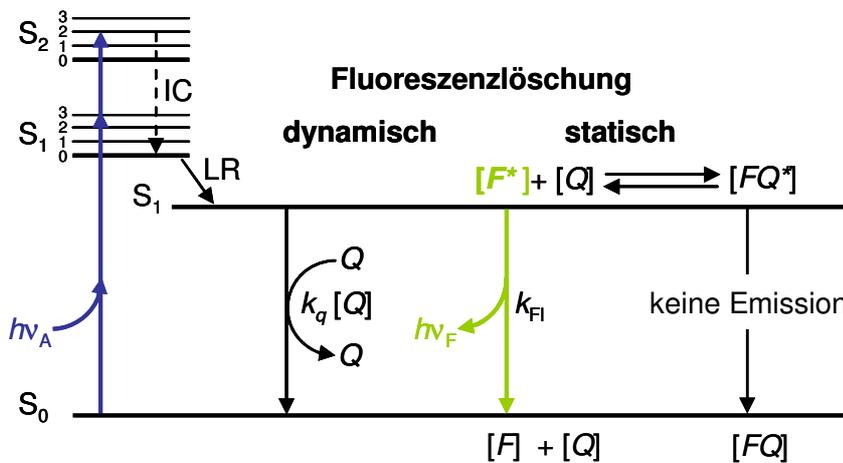


Abbildung 1-5: Fluoreszenzlöschung / Quenchen

Quenchen der Fluoreszenz kann dynamisch oder statisch erfolgen, durch Stöße mit Quencher-molekülen oder durch Bildung eines nicht fluoreszierenden Komplexes im angeregten $[FQ^*]$ oder nicht angeregten $[FQ]$ Zustand. $[F]$ = Fluorophorkonzentration, $[F^*]$ = Fluorophor im angeregten Zustand.

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wird die Energie des angeregten Fluorophors, welcher nachfolgend Donor genannt wird, auf einen anderen Chromophor, den sogenannten Akzeptor übertragen. Dies geschieht strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkung und führt zur Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors. Bedingung für das Auftreten eines FRET ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und die räumliche Nähe von Donor und Akzeptor im Bereich weniger Nanometer. Eine charakteristische Größe eines Donor-Akzeptor-Paares ist der sogenannte Förster-Abstand R_0 . Dieser liegt im Bereich von 20 Å bis 90 Å. Die Effizienz E eines FRET erfolgt mit der sechsten Potenz des Abstandes zwischen Donor und

Akzeptor, wobei die Skalierung durch den Förster-Abstand R_0 gegeben ist. Dies ist der Abstand, bei dem der Energieübertrag halbmaximal ist [34].

Förster-Beziehung

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

E = Energietransfereffizienz, R_0 = Förster-Abstand, r = Distanz zwischen Donor und Akzeptor

Der Akzeptor muss nicht notwendigerweise ein Fluoreszenzfarbstoff sein, auch reine Absorptionsfarbstoffe können die Energie des Donors aufnehmen und ohne Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehren. Bedingung für den Energieübertrag ist wie beim „klassischen“ FRET – mit fluoreszierendem Akzeptor – die räumliche Nähe und die Überlappung der Spektren. Da in diesem Fall die Fluoreszenz des Donors gerade durch den Energieübertrag vermindert wird, erscheint insgesamt die Fluoreszenz gequencht zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde auf dieses Prinzip zurückgegriffen, indem ein Fluorophor-Quencher-Paar – bestehend aus 2-Aminobenzamid (Abz) und 3-Nitrotyrosin (n-Tyr) – verwendet wurde. Dieses war über ein Cystin verbunden und somit effektiv gequencht. Nach Reduktion des Cystins dissoziieren Fluorophor und Quencher, die Fluoreszenz von Abz wird somit entquencht, und das Ansteigen der Fluoreszenz stellt ein quantitatives Maß der erfolgten Reduktion dar.

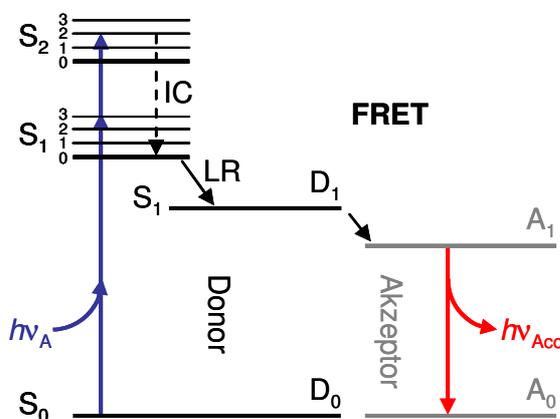


Abbildung 1-6: FRET

Bei Anwesenheit eines im Emissionsbereich des Fluorophors, jetzt Donor genannt, absorbierenden sog. Akzeptors kann die Energie des Donors strahlungslos auf den Akzeptor übertragen werden, sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). A_0 , A_1 = Energiezustände des Akzeptors, D_0 , D_1 = Energiezustände des Donors

2 Aufgaben und Zielsetzung

Für membranaktive Peptide wie antimikrobielle und zellpenetrierende Peptide stellen Lipidmembranen keine unüberwindbaren Barrieren dar. Stattdessen interagieren sie mit diesen, was einerseits zur Translokation der Peptide ohne nachhaltige Membranschädigung, andererseits aber auch zur Zerstörung der Membran führen kann. Die Grenzen zwischen diesen beiden Extremen sind oft fließend und von noch nicht identifizierten Faktoren beeinflusst. Um das Verhalten der Peptide an Membranen realistisch einschätzen zu können, wäre die Kenntnis der bestimmenden Parameter von konkretem praktischem Nutzen, denn die Verwendung membranaktiver Peptide repräsentiert im therapeutischen Bereich ein innovatives Konzept zur Bekämpfung multiresistenter Bakterienstämme als auch im Bereich der Grundlagenforschung zum gezielten Transport membranimpermeabler Substanzen.

Zur Ermittlung von Faktoren, welche die Wirkung membranaktiver Peptide beeinflussen, werden Versuchssysteme benötigt, die einige wenige Parameter fokussieren und deren gezieltes Variieren ermöglichen. Hier bietet sich der Einsatz von Lipidvesikeln an, da diese ein fast ideales Modellsystem zur Untersuchung von Peptid-Lipid-Interaktionen darstellen. Ergänzend wäre eine Adaption der Untersuchungen von Peptidinteraktionen an lebenden Organismen wünschenswert, um die Auswirkungen an realen biologischen Systemen evaluieren zu können.

Zunächst sollte auf der Basis eines enzymatischen Reportersystems (CRE) an T-Lymphozyten eine erfolgreiche Translokation des zellpenetrierenden Peptids TAT demonstriert werden, denn dieses Peptid stellt ein etabliertes CPP dar, dessen Translokationseigenschaften nachfolgend sowohl an künstlichen wie an realen Membranen untersucht werden sollten.

Für die Translokationsexperimente sollte anschließend ein spezielles Konstrukt eingesetzt werden, welches aus demselben zellpenetrierenden Peptid TAT bestand, das nun an einen Fluorophor gekoppelt über eine Disulfidbrücke an einen Quencher gebunden war. Unter reduzierenden Bedingungen, wie sie üblicherweise in lebenden Zellen vorherrschen, sollte die erfolgte Translokation in das Cytoplasma über eine verstärkte Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Um dieses TAT-Konstrukt zunächst biophysikalisch zu charakterisieren, sollte seine Translokation in Lipidvesikel hinein untersucht werden. Bei diesen Experimenten war sicher zu stellen, dass ein in Vesikel eingeschlossenes Reduktionsmittel quantitativ über die

Versuchsdauer hinweg in den Vesikeln verbleibt, selbst im Falle einer ggf. durch das Peptid erfolgten Membranpermeabilisierung. Dazu musste ein geeignetes Reduktionsmittel an einen hochmolekularen polymeren Träger gekoppelt werden. Um generell destabilisierende Einflüsse von Peptiden auf die Membranintegrität vergleichend bewerten zu können, waren breit angelegte Untersuchungen auszuführen. Zum einen sollten hierdurch für den Translokationstest geeignete Peptide für die vorliegende wie auch für nachfolgende Arbeiten identifiziert werden. Im Hinblick auf stark membranschädigende Peptide sollten zum anderen – am Beispiel von zwei synergistisch verstärkend wirkenden antimikrobiellen Peptiden – fördernde und hemmende Einflussparameter auf die Porenbildung festgestellt werden.

Nach Synthese des TAT-Fluorophor-Quencher-Konstrukts – im Folgenden TAT-FQC genannt – war dessen Translokation in Lipidvesikel zu überprüfen, deren Zusammensetzungen u. a. die Membranen von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen simulieren, und mit der Translokation in reale Zellen zu vergleichen.

3 Material und Methoden

Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien mit ihrem jeweiligen Hersteller bzw. der Bezugsquelle. Anschließend folgt ein Überblick über das angewandte Methodenspektrum.

3.1 Material

Eine Liste der verwendeten Geräte, Pufferlösungen, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien findet sich in Anhang A.

3.1.1 Kits

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
Qiafilter Plasmid Midi	Qiagen, Hilden
QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis	Stratagene Europe, Amsterdam, NL

3.1.2 Peptide und Aminosäuren

Peptid	Sequenz	MW / g/mol	Hersteller / Bezugsquelle
Alamethicin von <i>Trichoderma viride</i>	Ac-Aib-P-Aib-A-Aib-A-Q-Aib-V-Aib-G-L-Aib-P-V-Aib-Aib-E-Q-Phol	1964	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
BP100	KKLFFKKILKYL-NH ₂	1421	Peptid-syntheselabor Dr. Parvesh Wadhvani, KIT
FP23	AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-NH ₂	2124	
Gramicidin S	[F _D PVOLF _D PVOL] _{zyklisch}	1141	KIT
KI3	KIGAKIKIGAKIKIGAKI-NH ₂	1850	
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	2467	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
MAP	KLALKLALKALKALKLA-NH ₂	1877	
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	2846	

Peptid	Sequenz	MW / g/mol	Hersteller / Bezugsquelle
MSI-103	(KIAGKIA) ₃ -NH ₂	2064	Peptid-syntheselabor Dr. Parvesh Wadhvani, KIT
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	2246	
Pep1	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	2848	
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂	1969	
PKA	KKAAAVLLPVLLAAP	1475	
R8	RRRRRRRR	1266	
SAP	VRLPPPVRLLLLPP	1998	
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	1719	
Temporin A	FLPLIGRVLSGIL-NH ₂	1397	
Temporin B	LLPIVGNLLKSLN-NH ₂	1392	
Temporin L	FVQWFSKFLGRIL-NH ₂	1640	
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2183	
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	2840	

Der Index _D an einer Aminosäure bezeichnet deren D-Enantiomer.

Aminosäuren und Derivate	Hersteller / Bezugsquelle
2-Aminobenzamid	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
3-Nitro-L-tyrosine	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Boc-2-Abz-OH	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Novabiochem [®] , Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Fmoc-Cys-(Trt)-OH	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Novabiochem [®] , Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Fmoc-Gly-OH	Novabiochem [®] , Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Fmoc-L-Tyr(3-NO ₂)-OH	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Novabiochem [®] , Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Fmoc-Pro-OH	Novabiochem [®] , Teil von Merck KGaA, Darmstadt

3.1.3 Lipide

Lipid	Abkürzung	Hersteller / Bezugsquelle
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (Natriumsalz)	DMPG	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	DMPC	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(lissamine rhodamin B sulfonyl)	Rh-PE	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (Natriumsalz)	POPG	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	POPC	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	POPE	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (Natriumsalz)	POPS	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Cholesterin	Chol	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
<i>E. coli</i> -Extrakt polar		Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
N-(octadecanoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholin	SM	Avanti [®] Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA

3.1.4 Trägerharze

Harz	gebundene Aminosäure	Beladung	Hersteller / Bezugsquelle
Fmoc-Rink-Amide MBHA Harz	keine	0,74 mmol/g	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
Wang-Harz	Fmoc-Gln (Trt)	0,4 bis 1,0 mmol/g	Novabiochem [®] , Teil von Merck KGaA, Darmstadt

3.1.5 Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pET 28.2 TAT-Cre	pET 28b (+) mit einkloniertem CPP TAT ₄₈₋₅₇ und CRE-Enzym	Prof. S. F. Dowdy, University of California, San Diego, CA, USA

3.1.6 Oligonukleotidprimer

Primer	Beschreibung	Hersteller / Bezugsquelle
Vorwärtsprimer	5' TTA AGA AGG AGA TAT ACC ATG GGC CAT ATG GCT AGC ATG ACT G 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Rückwärtsprimer	5' C AGT CAT GCT AGC CAT ATG GCC CAT GGT ATA TCT CCT TCT TAA 3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

3.1.7 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller / Bezugsquelle
Anti-Fluorescein/Oregon Green Antibody	polyklonaler Kaninchen Immunglobulin G (IgG)	Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA

3.1.8 Bakterienstämme

Zellstamm	Verwendung	Hersteller / Bezugsquelle
Kompetente BL21 (De3) pLysS	Überexpression	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
XL1-Blue Supercompetent cells	Klonierung	Stratagene Europe, Amsterdam, NL

3.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Literaturstelle oder ATCC Nummer	Bezugsquelle
KG-1a	CCL-246.1	American Type Culture Collection (ATCC)
Tex.loxP.EG	[35]	Prof. E. Ruley, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Sterilisation von Materialien

Beim Kultivieren lebender Bakterien- und Zellkulturen muss stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden, um Kontaminationen durch andere Mikroorganismen zu vermeiden. Diese Arbeiten wurden deshalb an einer Sterilbank durchgeführt. Platinösen wurden vor der Benutzung durch Ausglühen sterilisiert, bei anderen hitzebeständige Materialien geschah dies durch Abflammen kurz vor Gebrauch. Zellkulturmedien, Puffer und sonstige Lösungen sowie Kunststoffgeräte wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen waren entweder in steriler Form erhältlich oder wurden nach 20-minütigem Autoklavieren bei 121 °C und 1 bar Überdruck verwendet. Glaswaren wurden mit Alufolie abgedeckt für 3 h bei 180 °C heißluftsterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen sowie alle Puffer, die bei spektrometrischen Messungen benutzt wurden, wurden über Filtermembranen mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilfiltriert.

3.2.1.2 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Herstellung einer Negativkontrolle war die Entfernung der TAT-Sequenz aus dem von Prof. S. F. Dowdy (University of California, San Diego, CA, USA) zur Verfügung gestellten Plasmids pET 28.2 TAT-Cre notwendig. Dies geschah durch zielgerichtete Mutagenese nach dem Protokoll des Kit „QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis“ von Stratagene.

Dabei wurden zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer benutzt, welche zu gegenüberliegenden Seiten der beiden DNA-Mutterstränge komplementär waren. Somit enthielten beide Primer die gewünschte Mutation, wodurch sowohl Punktmutationen als auch das Einfügen oder Entfernen einzelner oder mehrerer Basentriplets bei doppelsträngiger DNA möglich waren. Die Verlängerung der Primer durch die DNA-Polymerase führte während der sich wiederholenden Zyklen in einem Thermocycler zu sich linear vermehrenden gebrochenen DNA-Strängen, die erst nach einem Restriktionsverdau der elterlichen unmutierten DNA und der anschließenden Transformation in *E. coli*-Bakterien repariert wurden. Die benötigten Oligonukleotidprimer wurden unter Berücksichtigung der Richtlinien entworfen, welche ebenfalls im Protokoll des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit beschrieben sind. Als DNA-Polymerase wurde 1 µl der „PfuTurbo DNA Polymerase“ (2,5 U/µl) von Stratagene verwendet, die in einem Heißstartverfahren zur Reaktionslösung zugegeben wurde. Diese bestand aus 50 µl Reaktionspuffer mit 50 ng pET

28.2 TAT-Cre, jeweils 125 ng der beiden Oligonukleotidprimern und 2 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix und wurde auf Eis zusammenpipettiert. Die für die jeweiligen Zyklen eingestellten Parameter am Thermocycler sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 3-1: Einstellung des Thermocyclers für die zielgerichtete Mutagenese des pET 28.2 TAT-Cre

Block	Zyklen	Temperatur / °C	Dauer / s	Beschreibung
1	1	95	30	Initiation
		95	30	Denaturierung
2	18	52	1	Primerhybridisierung
		68	372	Verlängerung
3	1	4	-	

Nach den Temperaturzyklen wurde die ursprüngliche DNA durch Zugabe von 1 µl Dpn1 (10 U/µl), einer für methylierte DNA spezifischen Endonuklease, innerhalb 1 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde 1 µl der mutierten DNA in XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert.

3.2.1.3 Hitzetransformation

Zur Transformation von DNA in XL1-Blue superkompetente Zellen oder kompetente BL21 (De3) pLysS-Zellen wurde das Protokoll des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene in leicht modifizierter Form verwendet: Zunächst wurde 1 µl der DNA zu 50 µl auf Eis aufgetauter Zellsuspension gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen im Wasserbad für 45 s auf 42 °C erwärmt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 0,5 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Zur Selektion transformierter Zellen wurde die Suspension auf kanamycinhaltige LB-Agarplatten ausplattiert.

3.2.1.4 Herstellung von Agarplatten

1,5 % (w/v) Agar wurde unter Erwärmung in LB-Medium pH 7,4 gelöst. Nach anschließender Sterilisation durch Autoklavieren wurde die Lösung im Wasserbad auf 60 °C inkubiert. Unter sterilen Bedingungen wurden vor dem Einfüllen in Petrischalen 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Nach Erstarren des Agars konnten die Platten verwendet werden.

3.2.1.5 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Bakterien wurden 50 ml kanamycinhaltige (50 µg/ml) LB-Lösung mit einer auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Zur Plasmidisolierung wurde diese Bakteriensuspension nach dem Handbuch „Qiafilter Plasmid Purification“ von Qiagen gemäß dem Protokoll für Low-Copy-Plasmide verwendet. Die dafür notwendigen Puffer sowie das übrige Material wie QIAfilter-Cartridge und QIAGEN-tip wurden dem Qiafilter Plasmid Midi Kit entnommen.

Die Bakteriensuspension wurde zunächst zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Resuspensionspuffer aufgenommen. Zur Degradation von RNA enthielt der Puffer RNase A. Für eine möglichst effektive Plasmidausbeute wurde dem Puffer LyseBlue-Reagenz zugegeben. Über diesen Farbindikator konnte die gleichmäßige Verteilung der in den nächsten Schritten zugegebenen Puffer überprüft werden. Der anschließend zugegebene Lysepuffer enthielt das Detergenz Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium-Dodecyl-Sulfat, SDS) und Natriumhydroxid (NaOH), wodurch die Zellen alkalisch lysiert [36] wurden. SDS bewirkt die Lyse der Zellmembran, wodurch der Zellinhalt frei wird. Durch NaOH verschiebt sich der pH-Wert ins Alkalische, was zur Denaturierung der sowohl genomischen als auch der Plasmid-DNA führt.

Die anschließende Zugabe von 3 M Kaliumacetat pH 5,5 führte zur Neutralisation, wodurch die ringförmige Plasmid-DNA renaturieren konnte. Genomische DNA, Proteine, Lipide und Zellwandbestandteile fielen nun, zusammen mit dem im Lyse-Puffer enthaltenen SDS, als Präzipitate aus und konnten abfiltriert werden. Nun folgt die Phasentrennung durch Filtration mit der QIAfilter-Cartridge in eine zuvor equilibrierte QIAGEN-tip. Über Anionenaustauschchromatographie wurden die Plasmide von anderen in Lösung verbliebenen Stoffen getrennt, gewaschen und schließlich eluiert. Nach einer Isopropanolfällung wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Dann wurde sie in 50 µl bidestilliertem Wasser (H₂O bidest.) aufgenommen.

Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop® 1000 Spektrophotometer bestimmt. 50-100 ng/µl Plasmid-DNA in einem Mindestvolumen von 15 µl wurden dann von der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde die Basensequenz mit dem Programm ExPASy (ExPASy Proteomic-Server, Swiss Institute of Bioinformatics) [37] ausgewertet. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Proteinüberexpression

Zur Anzucht einer kontrolliert wachsenden Zellkultur von BL21 (De3) pLysS-Zellen wurden 500 µl LB-Medium (34 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin) mit 10 ml einer im gleichen Medium über Nacht angezogenen Vorkultur mit OD_{600} von 2 inokuliert. Nach Erreichen einer Optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,6-0,8 wurde die Überexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Anschließend wurde über 4 h bis zu einer OD_{600} von 2 inkubiert (bei 37 °C im Schüttler mit 220 rpm). Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets wurden abgewogen. Die Proteinaufreinigung erfolgte anschließend über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Nickel-NTA)-Chromatographie (siehe Kapitel 3.2.7.1).

3.2.2.2 Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinen

Die Umpufferung in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit 0,45 M Natriumchlorid (NaCl) erfolgte über die mit Sephadex G-25 gefüllte Entsalzungssäule PD-10 von Amersham nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Anschließend wurde das Protein durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Hierfür wurde ein Amicon Ultrafiltereinsatz mit Zellulosemembran verwendet, der in ein 50 ml Reaktionsgefäß eingesetzt wurde. Die Membran hatte einen Größenausschluss von MWCO 10000. Zentrifugiert wurde so lange bei 4 °C mit 4000 x g für jeweils 1 min, bis das gewünschte Volumen erreicht war.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Aufgereinigte Proteine wurden qualitativ und halbquantitativ über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Dabei erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe. Die Gelmatrix besteht aus einem Polyacrylamidnetzwerk, das als flache Gelscheibe zwischen zwei Glasplatten polymerisiert. Um eine saubere Auftrennung zu erreichen, besteht das Gel aus zwei Phasen, die sich im Wesentlichen in ihrer Maschenweite unterscheiden und unterschiedliche Aufgaben haben. Das obere Sammelgel (siehe Tabelle 3-3) enthält die Probenaschen zur Aufnahme der Proteinlösung; in ihm werden die Proteine vorfraktioniert und aufkonzentriert, damit sie von einem gemeinsamen Startpunkt aus aufgetrennt werden können. Im unteren Trenngel (siehe Tabelle 3-2) findet dann die eigentliche Auftrennung nach ihrer Proteingröße statt, welche proportional zur Molekülmasse ist. Es handelte sich hier um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, bei der das Tris-Tricin-Puffersystem von H. Schägger [38] verwendet wurde.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese in SDS-haltigem SDS-PAGE Probenpuffer für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert und anschließend kurz zentrifugiert. Eventuell vorhandene Disulfidbrücken wurden über ein ebenfalls im Probenpuffer enthaltenes Reduktionsmittel gespalten. Es bilden sich Protein-SDS-Komplexe, bei denen die Eigenladung der Proteine durch die mit hoher Affinität an sie bindenden SDS-Moleküle maskiert wird. Auf diese Weise erhalten letztendlich alle Proteine ein konstantes Ladungs-zu-Masse-Verhältnis.

Um vorzeitiges Polymerisieren der Gele zu verhindern, wurde der Reaktionsstarter Ammoniumpersulfat (APS) und der Katalysator Tetramethyldiamin (TEMED) erst kurz vor dem eigentlichen Gießen des jeweiligen Gels zugegeben. Für einen klaren Übergang zwischen Sammel- und Trenngel wurde das Trenngel bei der Polymerisation mit H₂O bidest. überschichtet. Nach Abschütten des Wassers wurde das Sammelgel gegossen. Dieses nahm etwa das obere Drittel des gesamten Gels ein und erhielt während der Polymerisation durch Abdeckung mit einem Kunststoffkamm die Probentaschen. Das fertige, sich zwischen den Glasplatten befindliche Gel wurde dann in eine Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt, und die Elektrophoresepuffer wurden eingefüllt.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel	
30 % Acrylamid	5,2 ml
Tris-Cl-Puffer pH 8,45	3,3 ml
50 % Glycerin	2,1 ml
10 % APS	35 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 3-3: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel	
30 % Acrylamid	680 µl
4 x Tris-HCl-Puffer pH 6,8	1,29 ml
H ₂ O bidest.	3,2 ml
10 % APS	35 µl
TEMED	5 µl

Je 15 µl der hitzedenaturierten Proteinlösung wurden in die Probenaschen des Gels gefüllt. Zur Abschätzung der Proteinmasse wurde zudem eine Mischung aus Referenzproteinen, ein sogenannter Marker verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei einer konstanten Stromstärke von etwa 35 mA und einer Anfangsspannung von 100 V statt. Über das im SDS-PAGE Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau konnte der Fortschritt der Elektrophorese verfolgt werden. Kurz bevor die blaue Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet. Anschließend wurde das Proteingel für ca. 1 h in Fixierlösung fixiert. Nach kurzem Waschen in Wasser wurde es dann für 30 min mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Über eine Entfärber-Lösung kann das Gel, nicht aber die Proteine wieder entfärbt werden.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde am NanoDrop[®]-Gerät bei 280 nm durchgeführt. Dabei wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $49180 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für CRE verwendet [37].

3.2.3 Peptidsynthese

Die Synthese des CPP-Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts erfolgte über das 1963 von Robert Bruce Merrifield vorgestellte Verfahren der Festphasenpeptidsynthese (engl.: solid phase peptide synthesis, SPPS) [39]. Dieses besteht aus sich wiederholenden Zyklen, während derer jeweils eine weitere Aminosäure an das entstehende Peptid angefügt wird. Dabei wird das Peptid vom C-Terminus zum N-Terminus, also entgegen der biosynthetischen Richtung synthetisiert. Während des gesamten Vorganges bleibt das Peptid dabei kovalent an die Ankergruppierung eines polymeren Trägers (Harz) gebunden. Die freie Carboxygruppe jeder neu hinzukommenden Aminosäure muss erst aktiviert werden, da sie sonst zu reaktionsträge ist, um über eine Kondensreaktion mit einer sich bereits am Harz befindlichen Aminosäure ein Säureamid zu bilden. Dies geschieht über Aktivierungsreagenzien wie O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) und Aktivester wie N-Hydroxybenzotriazol (HOBT). Die Bildung der aktiven Aminosäure verläuft basenkatalysiert mit N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA). Während dieses Vorganges muss die Aminogruppe der neu hinzukommenden Aminosäure mit einer reversibel spaltbaren Schutzgruppe versehen sein, um einen gerichteten Ablauf der Kondensreaktion zu garantieren. Im Wesentlichen werden dazu drei Schutzgruppen verwendet: Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) und *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) und *t*-Butylester (OtBu), die nach Entfernung der Reaktionslösung und der Durchführung eines Waschschrilles abgespalten werden, um nach einem weiteren Waschschrille die Aktivierung und Kupplung der nächsten, ebenfalls mit einer Schutzgruppe versehenen Aminosäure zu ermöglichen. Im Folgenden werden diese Schritte in der Reihenfolge Schutzgruppenentfernung vom Harz oder Harzgebundenen Peptid, Aktivieren, Kuppeln, Waschen solange wiederholt, bis das Peptid in der gewünschten

Sequenz vorliegt (siehe Abbildung 3-1). Anschließend wird es vom Harz abgespalten; dabei entsteht je nach verwendeter Ankergruppierung das Peptid als Säure oder als Amid.

Während der gesamten Synthese müssen die funktionellen Seitengruppen der Aminosäuren (Lys, Arg, His, Glu, Asp, Ser, Thr, Tyr, Cys) geschützt werden. Hierzu standen verschiedene Schutzgruppen zur Verfügung, die so gewählt wurden, dass sie während der einzelnen Syntheseschritte erhalten blieben und möglichst erst bei der Abspaltung des Peptids vom Harz entfernt wurden.

Der Vorteil einer SPPS besteht darin, überschüssige Reagenzien mit nicht gebundenen Nebenprodukten über eine einfache Filtration von dem an das Trägerharz gebundenen Peptid zu trennen. Weiterhin werden hohe Ausbeuten erzielt, und aufwendige Rekrystallisationsschritte entfallen. Zudem ist für mehrstufige Synthesen ein Automatisieren des Verfahrens mit einem Syntheseroboter möglich. Am Ende der Synthese wird das neu entstandene Peptid vom Harz abgespalten, über HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert.

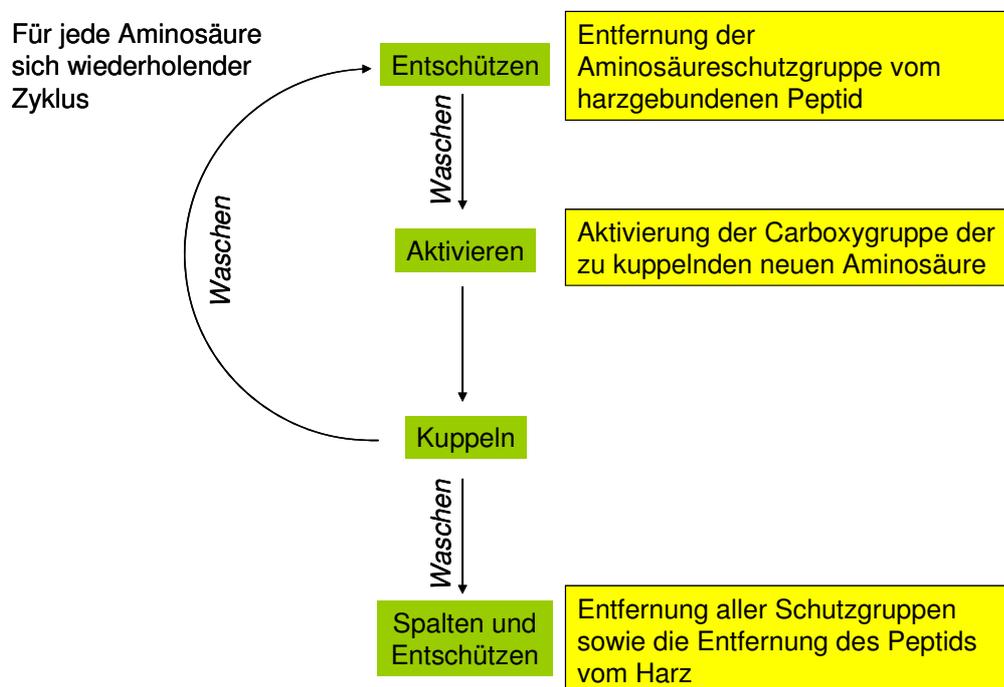


Abbildung 3-1: Vereinfachte Darstellung einer Festphasenpeptidsynthese

3.2.3.1 Automatische Peptidsynthese

Die in Kapitel 4.3 und 4.4 verwendeten membranaktiven Peptide wurden – mit Ausnahme von Alamethicin und Melittin, welche kommerziell erworben wurden – im Peptidsyntheselabor der Arbeitsgruppe von Dr. Parvesh Wadhvani am KIT mit technischer Unterstützung von Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck unter Verwendung des automatisierten Peptidsynthesizers 433A von Applied Biosystems hergestellt. Dabei wurde nach dem oben vorgestellten Fmoc-Festphasensyntheseprotokoll vorgegangen. Zunächst wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren an geeignete Harze gebunden. Zur Fmoc-Entschützung wurde Piperidin (25 % (v/v)) verwendet. Die Kupplungsreaktionen wurden für 2 h mit HOBt/HBTU und der Base DIPEA durchgeführt. Am Ende der Synthese wurden die Peptide mit Trifluoressigsäure (TFA)-haltigen Spaltungsreagenzien vom Harz getrennt. Die Rohpeptide wurden über RP-HPLC mit einer C18-Säule unter Verwendung eines H₂O bidest.-Acetonitril (AN)-Gradienten aufgereinigt. Die Kontrolle der Peptidreinheiten erfolgte über eine analytische Flüssigchromatographie, gekoppelt mit Elektronenspray-Massenspektrometrie-Einheit (LC/MS).

3.2.3.2 Synthese des CPP-Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts

Synthese des CPP TAT

Das CPP TAT besteht aus den Aminosäuren 48 bis 60 (GRKKRRQRRRPPQ) des HIV-Tat-Proteins. Im Folgenden wird das CPP TAT vom Protein Tat durch die Schreibweise in Großbuchstaben unterschieden. Die Synthese des CPP erfolgte am Peptidsynthesizer 433A von Applied Biosystems im Maßstab 0,1 mmol nach dem Merrifield-Verfahren (siehe Kapitel 3.2.3), ausgehend von Fmoc-Gln(Trt) an Wang-Harz. Nach der Abspaltung des Peptids vom Harz durch LC/MS erfolgte die Charakterisierung. Die anschließende Weitersynthese des CPP zum sogenannten Quencher-Konstrukt geschah durch die manuelle Kupplung von Fmoc-L-Tyr(3-NO₂)-OH und Fmoc-Cys(Trt)-OH. Dies wird im Folgenden detailliert beschrieben.

Synthese des Quencher-Konstrukts: Cys-(Trt)-Tyr(3-NO₂)-TAT-Harz (Wang)

Ausgehend von dem am Peptidsynthesizer hergestellten CPP TAT wurden die weiteren Syntheseschritte bis zum fertigen Quencher-Konstrukt manuell durchgeführt. Der N-Terminus von TAT lag kovalent an Wang-Harz gebunden im 100 µmol-Maßstab geschützt vor und befand sich in einem Syntheseröhrchen mit Fritte, durch dessen Verwendung überstehende Lösungen einfach abgefiltert werden konnten. Nach gründlichem Waschen mit

N,N-Dimethylformamid (DMF) erfolgte die Kupplung von Fmoc-L-Tyr(3-NO₂)-OH an 1 Equivalent (Eq) TAT nach dem üblichen Fmoc-Syntheseprotokoll durch Zugabe folgender Reaktionslösung:

Kupplung von Fmoc-L-Tyr(3-NO₂)-OH
Maßstab: 100 µmol

Eq	Reagenz	MW / g/mol	σ / g/cm ³
1	TAT an Wang-Harz		
2,1	Fmoc-L-Tyr(3-NO ₂)-OH	448,4	
2,1	HOBt	135,1	
2	HBTU	379,3	
4,2	DIPEA	129,3	0,74

in 1,7 ml DMF für 2 h bei Raumtemperatur (*RT*) auf dem Schüttler.

Nach dem Abfiltrieren der Reaktionslösung wurde das Harz mit dem synthetisierten Peptid gründlich mit DMF gewaschen. Der Syntheseschritt wurde anschließend durch LC/MS überprüft.

Da Fmoc-L-Tyr(3-NO₂)-OH eine reaktive Hydroxylgruppe hat, musste diese vor der Kupplung der nächsten Aminosäure mit einer Trityl-Schutzgruppe versehen werden.

Anbringen einer Schutzgruppe an Tyr(3-NO₂)
Maßstab: 100 µmol

Eq	Reagenz	MW / g/mol	σ / g/cm ³
1	Peptid an Harz in 1 ml DMF		
16	Pyridine für 30 bis 45 min	79,1	0,98
10	2-Chlorotriethylchlorid gelöst in 3 ml DMF zupipettieren	313,2	

Schutzgruppe bei *RT* über Nacht kuppeln lassen.

Um mit der Synthese fortfahren zu können, musste die Anbringung der Schutzgruppe überprüft werden. Dazu wurde zunächst nur bei einem Zehntel des Peptids mit der Synthese fortgefahren, und das am Ende der Synthese erhaltene Produkt massenspektrometrisch charakterisiert. Kann hier nur das gewünschte Produkt gefunden werden, so war die Kupplung der Triphenylmethyl (Trt)-Schutzgruppe an das Harzgebundene Tyr(3-NO₂) erfolgreich. Zeigen sich jedoch zwei Produkte, von denen eines eine um Cys und Fmoc höhere Masse als das andere hat, so muss die Kupplung der Schutzgruppe mit den verbleibenden 9 Teilen (dann bei 40 °C) wiederholt werden, um dann erneut bei einem Zehntel der Peptide die Kupplung zu überprüfen.

Da die Kupplung erfolgreich verlaufen war, konnte auch bei den restlichen 9 Teilen mit der Kupplung von Fmoc-Cys-(Trt)-OH fortgefahren werden. Dabei erfolgte zunächst die Entschützung der Fmoc-Aminogruppe während 20 min durch Zugabe von 20 % Piperidin in DMF. Anschließend wurde gründlich mit DMF gewaschen und danach Fmoc-Cys-(Trt)-OH gekuppelt. Dazu wurde das N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC)/HOBt-Protokoll verwendet.

Kupplung von Fmoc-Cys-(Trt)-OH			Maßstab: 5 µmol und 95 µmol
Eq	Reagenz	MW / g/mol	σ / g/cm ³
1	Peptid an Harz		
4	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	585,7	
4	HOBt	135,1	
10	DIC	126,2	0,81

HOBt und Fmoc-Cys-(Trt)-OH wurden zusammen in 100 µl DMF gelöst. Dann erst wurde DIC zugegeben und 1 min geschüttelt.

Nach der Kupplung wurde die Reaktionslösung abfiltriert und verworfen; das Harz wurde mit DMF gewaschen. Nach der Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe durch die 20-minütige Zugabe von 20 oder 25 % (v/v) Piperidin wurde das Harz ausgiebig zunächst mit DMF, danach mehrere Male mit Methanol (MeOH) gewaschen. Nach dem Trocknen und dem anschließenden Abspalten vom Harz wurde das Produkt schließlich in einer Lösung aus 9:1 AN/H₂O bidest. mit 1 ml/l TFA aufgenommen, bei -80 °C tiefgefroren und lyophilisiert. Die Charakterisierung des nun erhaltenen Quencher-Konstrukts geschah durch LC/MS. Gelagert wurde das fertige Peptid unter N₂-Gas bei -20 °C. Im Folgenden wird 3-Nitrotyrosin (Tyr(3-NO₂)) als n-Tyr bezeichnet.

Synthese des Fluorophor-Konstrukts: Boc-2-Abz-Cys-(Trt)-CONH₂

Die Synthese des Fluorophor-Konstrukts Boc-2-Abz-Cys-(Trt)-CONH₂ wurde im 300 µmol-Maßstab an Fmoc-Rink-Amide MBHA Harz (Beladung: 0,74 mmol/g) durchgeführt. Nach 30-minütigem Aufquellen des Harzes in DMF erfolgte die Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe durch die 20-minütige Zugabe von 25 % (v/v) Piperidin. Das Harz wurde anschließend ausgiebig mit DMF gewaschen. An dem nun entschützten Harz erfolgte die Kupplung von Fmoc-Cys-(Trt)-OH nach dem hier angeführten Protokoll:

Kupplung von Fmoc-Cys-(Trt)-OH**Maßstab: 300 µmol**

Eq	Reagenz	MW / g/mol	σ / g/cm ³
1	Entschütztes Harz		
4	Fmoc-Cys-(Trt)-OH	585,7	
4	HOBt	135,1	
3,9	HBTU	379,3	
8	DIPEA	129,3	0,74

in 3 ml DMF für 2 h bei *RT* auf dem Schüttler.

Nach erneutem gründlichem Waschen mit DMF erfolgte die Kupplung von Boc-2-Abz-OH nach folgendem Protokoll:

Kupplung von Boc-2-Abz-OH**Maßstab: 300 µmol**

Eq	Reagenz	MW / g/mol	σ / g/cm ³
1	Peptid an Harz		
4	Boc-2-Abz-OH	237,3	
4	HOBt	135,1	
3,9	HBTU	379,3	
8	DIPEA	129,3	0,74

in 3 ml DMF für 2 h bei *RT* auf dem Schüttler.

Nach einem erneuten Waschen mit DMF (1 x 5 ml) folgten drei Waschschrirte mit 5 ml MeOH und anschließendes Trocken des noch am Harz gebundenen Peptids. Anschließend erfolgte ein Waschschrirte mit DMF und drei Waschschrirte mit 5 ml MeOH. Nach der massenspektrometrischen Charakterisierung des Produkts wurde das synthetisierte Peptid vom Harz abgespalten. Dabei wurde zudem die Trt-Schutzgruppe vom Cystein und die Boc-Schutzgruppe von Abz abgespalten. Die Verwendung der Boc-Schutzgruppe bei der letzten Aminosäure hat somit den Vorteil, dass kein weiterer Piperidinschrirte notwendig ist.

Das getrocknete Produkt wurde in 1:1 AN/H₂O bidest. aufgenommen, bei -80 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Die Charakterisierung des Konstrukts geschah massenspektrometrisch durch matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisierung (engl.: matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI) in Verbindung mit einem Flugzeitanalysator (engl.: time of flight, TOF). Gelagert wurde das fertige Fluorophor-Konstrukt unter N₂-Gas bei -80 °C.

3.2.3.3 Oxidation der Disulfidbrücke

Die Oxidation der Thiolgruppen aller einzeln synthetisierten Konstrukte fand nach dem von Eichler und Houghten [40] beschriebenen Verfahren statt und führte zur Bildung von Dimeren. Oxidiert wurde an der Luft in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer. Hierzu wurde folgendermaßen vorgegangen:

5,2 mg Quencher-Konstrukt und 3,8 mg Fluorophor-Konstrukt wurden in 10 ml 0,1 M NH_4HCO_3 -Puffer (pH 8) an der Luft in einem 25 ml Becherglas bei *RT* für 48 h gerührt. Die Lösung wurde mit 300 μl Eisessig auf pH 6 gebracht, und dadurch wurde die Oxidation gestoppt. Anschließend wurde die Probe lyophilisiert.

Das so erhaltene TAT-Fluoreszenz-Quencher-Konstrukt wurde über RP-HPLC mit einer analytischen C18-Säule unter Verwendung eines H_2O bidest.-AN-Gradienten aufgereinigt. Die Kontrolle der Peptidreinheit erfolgte durch eine analytische Chromatographie, gekoppelt mit Elektronenspray-Massenspektrometrie (LC/MS).

3.2.4 Synthese von Glutathion-Dextran

Die Synthese von dextrangebundenem Glutathion erfolgte modifiziert nach der europäischen Patentschrift mit der Nummer EP 0 574 638 A1 [41]. Es beschreibt die Bildung von Dextran-Glutathionkomplexen im Größenbereich von 14 bis 40 kDa und wurde hier an 70 kDa Dextranen angewandt. Angesetzt wurden 10 ml einer 50 mg/ml 70 kDa Dextranlösung. Diese wurde mit 400 μmol Natriummetaperiodat (NaIO_3) (61,1 mg/ml) per mol Dextran versetzt und 1 h im Dunkeln auf dem Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Danach wurde die Lösung in Dialyseschläuche gefüllt und 18 h gegen 4 l H_2O bidest. dialysiert.

Zu je 10 ml der nun oxidierten Dextranlösung wurde je 1 ml eines 0,1 M Natriumphosphatpuffers pH 7,4 und 1 g Glutathion (GSH) gegeben. Außerdem wurde der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 8 bis 8,5 eingestellt, und 0,1 g Natriumborhydrid (NaBH_4) zur chemischen Reduktion zugegeben. Nach 16 h bei Raumtemperatur wurden weitere 40 mg NaBH_4 zugegeben, und die Mischung wurde für weitere 4 h inkubiert. Unkonjugiertes GSH wurde anschließend durch intensives Dialysieren über 7 Tage gegen 4 l H_2O bidest. entfernt, wobei das Wasser täglich gewechselt wurde. Das Dextran GSH-Konjugat wurde schließlich gefriergetrocknet und unter N_2 -Gas bei 4 °C gelagert.

3.2.5 Spektroskopische Methoden

3.2.5.1 Durchflusszytometrie

Die Translokation von CRE-Fusionsproteinen initiiert die Expression des Proteins eGFP in Tex. loxP. EG-Zellen. Mit einem Durchflusszytometer konnte über diesen Fluorophor die Menge der Zellen bestimmt werden, in welche CRE-Fusionsproteine eingedrungen waren. Die Durchflusszytometrie ist eine geeignete Methode zur quantitativen Analyse verschiedener Parameter wie beispielsweise Größe, Granularität und Fluoreszenz von Einzelzellen einer Zellsuspension. Sämtliche Zellen passieren mit hoher Geschwindigkeit nacheinander einzeln eine Messeinrichtung, welche die optisch ermittelten Daten jeder Zelle aufzeichnet. Eine der wesentlichen Baugruppen eines Durchflusszytometers ist demnach die Durchflusszelle. Diese ist eine sehr feine Kapillare, in welcher die Zellen nach hydrodynamischer Fokussierung nacheinander den Strahl einer Lichtquelle (Laser, Argon- oder Xenonlampe) passieren, der anschließend durch Filter auf verschiedene Detektoren aufgetrennt wird. Bei den Detektoren handelt es sich zumeist um Photomultiplier, welche die eingehenden Signale verstärken und an einen Messrechner weiterleiten; dort können sie mit geeigneter Software dargestellt werden [42, 43, 44].

Die Häufigkeitsverteilung der eGFP-Fluoreszenzintensität einzelner Zellen wird graphisch in Form eines Einparameter-Histogramms dargestellt. Dabei wird die Intensität auf der Abszisse aufgetragen, während die Ordinate die relative Häufigkeitsdichte des jeweiligen Intensitätswerts angibt. Über die Festlegung von Intensitätsgrenzen, das sogenannte „Gaten“, kann eine interessierende Population selektiert werden [19, 35].

Zusätzlich zur eGFP-Fluoreszenz wird das durch die Zellen verursachte Streulicht gemessen. Dies geschieht über zwei Detektoren, die in verschiedenen Winkeln zum Strahlengang angeordnet sind und dadurch unterschiedliche Informationen liefern. Einer der Detektoren wird annähernd im Strahlengang eingerichtet; er misst das von den Zellen in Vorwärtsrichtung gestreute Licht (FSC). Dieses Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zellgröße. Der zweite Detektor wird annähernd im 90°-Winkel zum Strahlengang eingerichtet; er misst das von der Zelle diffus in den Raum gestreute Licht. Dieses Seitwärtsstreulicht (SSC) ist wesentlich von Strukturen im Zellinneren, von der Größe des Zellkerns, von der Vesikelmenge und von der Granularität der Zelle abhängig. Die von den Detektoren gewonnenen relativen Intensitäten des gestreuten Lichts werden als Zweiparameter-Histogramm in Form eines Dotplots dargestellt. Jeder Punkt in diesem Diagramm entspricht einer Zelle. Seine Position im Koordinatensystem gibt Aufschluss über beide Parameter (Zellgröße und Granularität). Zelltrümmer und Artefakte können so erkannt werden. Auch in diesem Diagramm kann mit einer Definition bestimmter Bereiche durch

Setzen eines polygonalen Fensters eine Zellpopulation mit signifikanten Merkmalen isoliert betrachtet werden [42, 43, 44]. Durch das „Gaten“, die Ausgrenzung von Merkmalen bei der Bildung von Schnittmengen verschiedener signifikanter Bereiche, kann der Prozentsatz fluoreszierender Zellen aus der interessierenden Zellpopulation ermittelt werden [44].

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am IBG-1 des KIT im Zellkulturlabor von Dr. Eric Gottwald an einem Partec PAS III Durchflusszytometer durchgeführt. Dazu wurden 5 Mio der vorbehandelten Zellen in 3 ml phosphatgepufferter Salzlösung mit Ca^+ und Mg^+ (PBS +/+) überführt. Nach einer weiteren Verdünnung um Faktor 5 wurden je 30.000 Zellen gemessen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

3.2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden an dem Spektrofluorimetersystem FluoroMax-2[®] der Firma Horiba durchgeführt. Das Gerät enthält als Lichtquelle eine 150 W Xe-Lampe und kann im Wellenlängenbereich von 200 bis 750 nm betrieben werden. Die Wellenlängen der Excitation und der Emission werden mit zwei Monochromatoren selektiert, und über die geräteeigene Software wird die Aufnahme von Emissionsspektren, Excitations- sowie Zeit-Scans bei festen Wellenlängenpaaren gesteuert.

Das Messvolumen im Fluoreszenzspektrometer waren immer 1,5 ml. Wurden während der Messungen Reagenzien zugefügt, so wurde die Lösung stets gerührt, wobei die Mischdauer etwa 3 s betrug. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Messungen bei 37 °C durchgeführt.

In Abbildung 3-2 werden die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sowie der Quencher DPX und n-Tyr gezeigt. Spektrale Parameter sind in Tabelle 3-4 wiedergegeben.

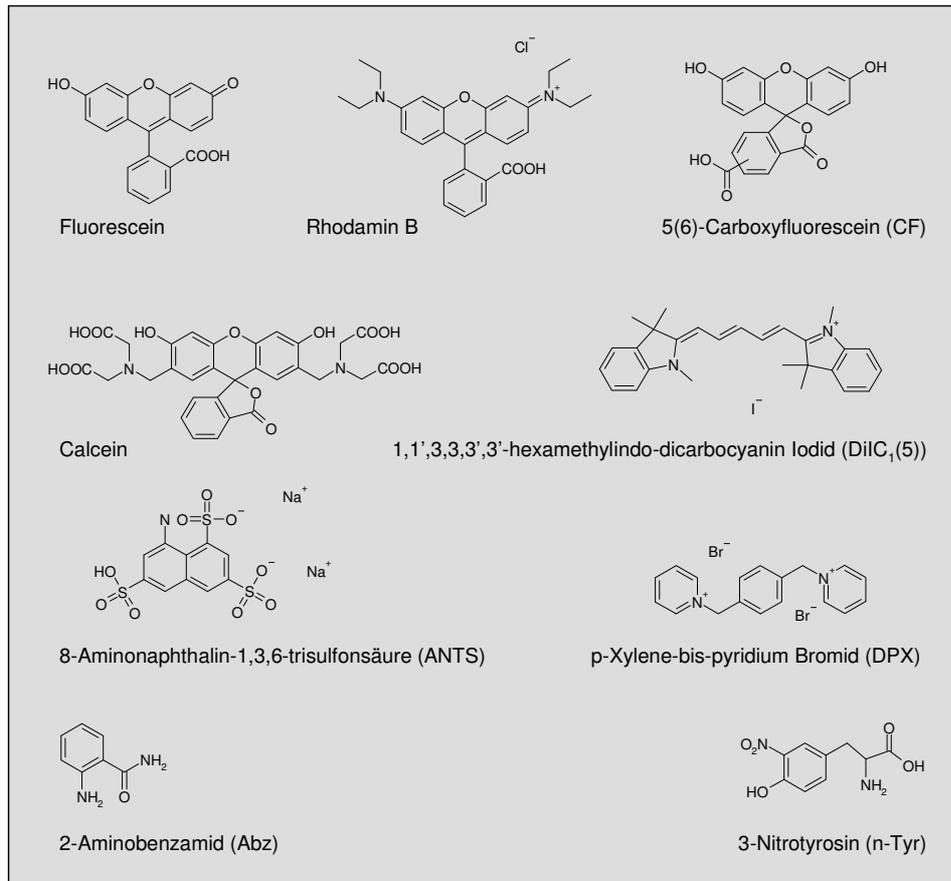


Abbildung 3-2: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sowie der Quencher DPX und n-Tyr

Tabelle 3-4: Eingesetzte Fluorophore mit den in dieser Arbeit verwendeten spektralen Parametern

Fluorophor	$\lambda_{\text{Excitation}}$	$\lambda_{\text{Emission}}$	Optischer Filter vor Detektor
Fluoresceindextran	470 ± 1,6 nm	515 ± 1,6 nm	GG 495
5(6)-Carboxyfluorescein	470 ± 1,6 nm	515 ± 1,6 nm	GG 495
Calcein	470 ± 1,6 nm	515 ± 1,6 nm	GG 495
Abz	322 ± 3 nm	425 ± 3 nm	GG 395
ANTS	363 ± 3 nm	515 ± 3 nm	GG 495
Rhodamin B	550 ± 3 nm	584 ± 3 nm	GG 495
DiIC ₁ (5)	620 ± 3 nm	680 ± 15 nm	GG 495
eGFP	488 nm (Ar-Laser)	509 ± 5 nm	---

3.2.5.3 UV/Vis-Spektroskopie

Am UV/Vis-Spektrometer UV-2100 der Firma Shimadzu wurden über die Absorption von TNB²⁻ bei 412 nm freie Thiolgruppen bestimmt. Das Gerät besitzt eine Halogen- und eine Deuteriumlampe; beide zusammen decken den Wellenlängenbereich von 190 nm bis 900 nm ab. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die Gerätesoftware UV-x101PC.

Eine Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes durchgeführt. Für TNB wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 13600 mol⁻¹cm⁻¹ verwendet.

Extinktion (E)

$$E = -\lg(I/I_0) = \epsilon \times c \times d$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient in l mol⁻¹cm⁻¹, c = Konzentration (hier: in mol/l), d = Schichtdicke der Küvette in cm, I_0 = Lichtintensität vor Probeneintritt, I = Lichtintensität nach Probenaustritt

Die Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge ergibt eine für den gemessenen Stoff charakteristische Absorptionskurve. Die Absorptionseigenschaften des Lösungsmittels sowie Fehler durch Reflexionsverluste wurden durch das Messen einer Lösungsmittelprobe ermittelt und entsprechend berücksichtigt.

3.2.6 Massenspektrometrie

Die Massenanalyse synthetisierter und rekombinant hergestellter Peptide und Proteine erfolgte über matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisierung (engl.: matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI) in Verbindung mit einem Flugzeitanalysator (engl.: time of flight, TOF) oder über eine analytische Flüssigchromatographie, gekoppelt mit Elektronenspray-Massenspektrometrie-Einheit (LC/MS).

Speziell mit MALDI-TOF wurden das Fluoreszenz-Konstrukt sowie die CRE-Fusionsproteine charakterisiert. Mit Unterstützung von Dr. Sergii Afonin wurden diese Messungen an einem MALDI-TOF Autoflex[®] III von Bruker Daltonics durchgeführt. Bei dieser Methode werden Moleküle in eine organische Matrix wie Dihydroxybenzoesäure auf einem Probenhalter eingebettet und durch einen Laserpuls ionisiert. Über eine dem Probenhalter gegenüberliegende Elektrode findet abhängig vom Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Ionen eine Beschleunigung statt, wobei – abhängig von der Polarität der Elektrode – selektiv Anionen oder Kationen beschleunigt werden können. So beschleunigt durchfliegen die Ionen

eine feldfreie Strecke des Flugzeitanalysators, in welcher sie sich geschwindigkeitsabhängig auftrennen. Am Ende dieser Strecke befindet sich ein Detektor, mit dem die Flugzeit der Moleküle ermittelt wird. Da die Flugzeit proportional zur Wurzel aus Masse-zu-Ladungszahl ist, lässt sich aus einem Vergleich mit Referenzproteinen bekannter Masse die exakte Molekülmasse bestimmen. Zur Vorbereitung einer Probe für die Massenbestimmung mit MALDI-TOF wird eine Probenlösung im Verhältnis 1:3 zu einer gesättigten Matrixlösung (Matrixpulver in 2:1 AN:H₂O bidest. mit 0,1 % TFA) gegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 2000 x *g* lässt man etwa 1 µl des Überstandes auf einem Probenteller kristallisieren.

Auch bei der LC/MS bedient man sich eines Flugzeitanalysators, wobei in diesem Fall eine flüssigchromatographische Probenauftrennung vorgeschaltet ist. Zur Messung wurde die Probe in Methanol überführt; die Ionisation erfolgte mittels Elektrospray (ESI). Mit der LC/MS wurde die Reinheit des Quencher-Konstrukts im Verlauf seiner Syntheseschritte überwacht. Außerdem erfolgte hiermit die Charakterisierung des Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts sowie der in dieser Arbeit verwendeten membranaktiven Peptide.

3.2.7 Chromatographie

3.2.7.1 Proteinaufreinigung über Nickel-NTA-Chromatographie

Zum Aufschluss der für die Proteinüberexpression verwendeten BL21 (De3) pLysS-Zellen wurden diese in einem Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Zur verbesserten Lyse und zur Vermeidung des Proteinabbaus sowie zum Abbau jeglicher Nukleinsäuren wurden dem Lysepuffer (10 ml pro g abzentrifugierter Zellen (Nassgewicht)) entsprechende Enzyme und Proteaseinhibitoren zugegeben. Die Ultraschallbehandlung fand für 3 x 3 min bei 80%iger Leistung des Branson Sonifier[®] 250 (200 Watt) unter intensiver Kühlung statt. Anschließend wurden Zelltrümmer und Präzipitate durch eine Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 14.000 x *g* abgetrennt. Die Isolierung der überexprimierten Proteine fand über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie [45] statt. Dazu besitzen die Proteine am C-Terminus ein Sequenzmotiv aus sechs Histidinen (sog. His-Tag). Mit diesem binden sie an Metallchelate, die ihrerseits kovalent gebunden an einer Matrix immobilisiert sind. Die Chelate bestehen aus einem zweifach positiv geladenen Nickelion, komplexiert durch Nitrilotriessigsäure (NTA). Die Nickelionen können nun im Austausch gegen Wasser je zwei Histidinreste binden und somit das gewünschte Protein auf der Säule halten, während sämtliche anderen zellulären Proteine, die keinen His-Tag haben, ausgewaschen werden können. Da Imidazol eine höhere Affinität zu Nickel hat als Histidin, fand die anschließende Elution des nativen Proteins von der Säule durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration

im Puffer statt. Nach dem Befüllen der Econo-Säule mit einem Säulenvolumen von 2 ml Nickel-NTA-Superflow von Qiagen wurde die Säule zunächst 2 x mit 10 ml H₂O bidest. (10- bis 20-faches Säulenvolumen) gewaschen und dann mit 20 ml Lysepuffer (10 bis 20-faches Säulenvolumen) equilibriert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Proteinlösung (etwa 20 ml aus dem vorhergehenden Arbeitsschritt), die zur Steigerung der Bindung 2 x auf die Säule geladen wurde. Nach wiederholtem Waschen (20 ml Lysepuffer (10-faches Säulenvolumen), 20 ml Waschpuffer, 20 ml Lysepuffer) wurde das überexprimierte Protein durch 10 ml Elutionspuffer (5-faches Säulenvolumen) eluiert. Alle Puffer wurden vor der Verwendung sterilfiltriert.

3.2.7.2 Größenausschlusschromatographie

Um niedermolekulare Stoffe in Vesikel einzuschließen, wurden diese vor der Extrusion dem Puffer zugefügt, in dem die Lipide aufgenommen wurden. Nach der Extrusion mussten dann außerhalb der Vesikel verbliebene Moleküle wieder entfernt werden. Dies geschah über Größenausschlusschromatographie mit sogenannten Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Die Grundlage des Verfahrens liegt in der unterschiedlichen Permeation der Moleküle in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße. Für das Trennverhalten der Probenmoleküle ist deren hydrodynamisches Volumen verantwortlich. Überschreiten die Moleküle eine bestimmte Größe, so können sie nicht mehr in die Poren der stationären Phase eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront. Moleküle, welche unterhalb der kritischen Größe bleiben, können hingegen in die Poren des Trägermaterials eindringen, wodurch sie eine Verzögerung erfahren. Als Trägermaterial befand sich das Gelmaterial Sephacryl (Sigma-Aldrich, Steinheim) in den Spin Columns. Dabei handelt es sich um Copolymere aus vernetztem Allyl-Dextran und N,N'-methylenbisacrylamide mit einer Partikelgröße zwischen 25 und 75 µm. Sephacryl 100-HR ist zur Trennung von Proteinen mit Molmassen zwischen 1 kDa und 100 kDa geeignet, und wurde hier zur Trennung von niedermolekularen Stoffen wie ANTS, DPX oder Calcein von Vesikeln verwendet, die einen Durchmesser im Bereich von 100 nm bis 120 nm aufweisen. Die mit Sephacryl gefüllten Spin Columns wurden in ein passendes Reaktionsgefäß eingesetzt und in einer Zentrifuge mit Ausschwing-Rotor zentrifugiert (2 min, 1500 x g). Im Falle von Sephacryl 100 (Trennbereich zwischen 1 kDa und 100 kDa) dringen die Vesikel nicht in die Poren des Gels ein und können im ersten Eluat wiedergefunden werden. Da das hydrodynamische Volumen eines globulären Proteins mit einem Durchmesser von 100 nm einer Molmasse von ca. 30000 kDa entsprechen würde, ist dies zu erwarten. Zur Trennung von Dextran und Vesikeln wurde als weiteres Trägermaterial Sephacryl 500-HR (Trennbereich zwischen 40 kDa und 20000 kDa) eingesetzt.

Der Vorteil des Verfahrens liegt in seiner raschen Durchführung, denn die Vesikel sind innerhalb weniger Minuten (2 bis 3 min) gewaschen und stehen zur weiteren Verwendung bereit. Vor der Verwendung wurden die mit Sephacryl gefüllten Spin Columns 3 x mit dem 5-fachen Probenvolumen an Puffer (mit gleicher Osmolariät) gewaschen und 3 x mit dem später aufgetragenen Probenvolumen des Puffers equilibriert. Durch dieses Verfahren konnte ein kompletter Pufferaustausch (Entfernung von niedermolekularen Stoffen/Farbstoffen $\geq 99,99\%$, Entfernung von Dextran $\geq 99,9\%$) bei tolerierbarem Vesikelverlust (typischerweise ca. 15 % bei Sephacryl 100-HR und ca. 70 % bei Sephacryl 500-HR) erreicht werden.

3.2.7.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Aufreinigung des fertigen Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts erfolgte über eine Umkehr-Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Anlage (engl.: reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC). Bei diesem Verfahren werden in Lösung befindliche Substanzen nach ihrer Polarität aufgetrennt. Dazu wird die Probenlösung auf eine Trennsäule gegeben. Die Probenbestandteile binden dort zunächst an eine unpolare stationäre Phase (z. B. mit einer Alkanschicht überzogene Kieselgelpartikel). Anschließend wird über entsprechende Pumpen ein Laufmittel durch die Trennsäule gepumpt. Bei diesem handelt es sich um ein entgastes Gemisch aus H₂O bidest. und AN. Durch unterschiedliche Mischverhältnisse können die Polarität und somit die Lösungsbedingungen dieser flüssigen, mobilen Phase variiert werden; und so haben die verschiedenen Probenbestandteile auch unterschiedliche Retentionszeiten auf dem Gel, bis sie wieder eluieren und mit dem Laufmittel aus der Säule ausgeschwemmt werden. Die Detektion der nacheinander ausgeschwemmten Fraktionen erfolgt über einen UV-Detektor; dieser misst Peptidbindungen, die bei 220 nm absorbieren, bzw. aromatische Aminosäuren, die zwischen 260 und 280 nm absorbieren.

Über eine entsprechende Probenschleife wurden manuell maximal 30 µl Probenlösung auf die Säule gegeben. Die so aufgereinigten Fraktionen wurden gesammelt, lyophilisiert und massenspektrometrisch über LC/MS oder MALDI-TOF charakterisiert. Die Lagerung bis zur Verwendung fand bei 4 °C unter N₂-Gas statt.

3.2.8 Lipidextrusion

Vorbereitung der Lipide

Die Lipide wurden gemäß der gewünschten molaren Verhältnisse eingewogen und in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Chloroform gelöst. Um den Lipidverlust verfolgen zu können, der bei der Vesikelpräparation (ca. 10 %) und dem Pufferaustausch bei der Größenausschlusschromatographie (ca. 15 %) entsteht, wurde bei allen Lipidmischungen Rhodamin-PE in einem molaren Verhältnis von 10^{-4} zugesetzt. Nachdem Chloroform mit N_2 -Gas abgedampft wurde, trocknete das Lipidgemisch über Nacht in einem Exsikkator bei 5 mbar. Durch die Zugabe von wässrigem Puffer wurde danach eine Lipidsuspension hergestellt. Diese wurde anschließend gründlich gevortext (10 x 1 min) und durch 8-maliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Danach konnte die Lipidsuspension bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Vesikelpräparation

Die Herstellung großer unilamellarer Vesikel (engl.: large unilamellar vesicles, LUV) geschah unter Verwendung eines Extruders (Avanti Polar Lipids). Die Extrusion erfolgte durch eine Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße, die über Stützfilter auf beiden Seiten entlastet wurde, und in einer Metallkapsel eingespannt war. Auf beiden Seiten der Kapsel wurde eine Hamilton-Spritze aufgesteckt. Der gesamte Aufbau wurde nun in einem Metallblock fixiert. Die Lipidmischung, die sich zunächst nur in einer der Spritzen befand, wurde nun durch die Polycarbonatmembran mit 100 nm Porendurchmesser im Extrusionsraum der Kapsel in die gegenüberliegende Spritze gepresst. Dieser Schritt wurde insgesamt in einer ungeraden Anzahl durchgeführt, so dass die Vesikelsuspension schließlich in der anfänglich leeren Spritze abgenommen werden konnte. Die gesamte Extrusionseinheit wurde dabei durch eine Heizplatte auf ca. 40 °C erwärmt. Zur Vermeidung zu großer Lipidverluste wurden Spritzen und Extrusionsraum vor der eigentlichen Extrusion der Lipidmischung mit entsprechenden Puffern gespült. Nach dem Extrudieren der Vesikel wurde die gesamte Apparatur mit einer Chloroform-Methanol-1:1-Mischung gereinigt.

3.2.9 Zellbiologie

3.2.9.1 Aufrechterhaltung der Zellkulturen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Anzucht und Aufrechterhaltung der Tex.ioxP.EG- und KG-1a-Zellkulturen wurden mit Unterstützung von Anke Dech und David Thiele im Zellkulturlabor von Dr. Eric Gottwald im IBG-1 des KIT durchgeführt. Dafür benötigte Medien sind im Materialteil unter Punkt 7.1.6 angegeben. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche gesplittet, wobei sie gezählt und auf eine Zellkonzentration von etwa 2×10^6 Zellen/ml reduziert wurden.

3.2.9.2 Zellzählung

Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert, und daraufhin der Überstand weitestgehend entfernt. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung in 500 μ l. Diese Zellsuspension wurde in zwei Schritten insgesamt 200-fach verdünnt und anschließend ausgezählt. Für die Zellzählung stand ein Zellzähler CASY[®] TT zur Verfügung.

3.2.9.3 Vitalitätstest

Für Vitalitätstests wurden KG-1a-Zellen mit Trypanblau angefärbt. Dazu wurden 20 μ l Zellsuspension mit einer Zellzahl von etwa 2×10^5 Zellen mit 80 μ l einer 0,5 % Trypanblaulösung gemischt. Die angefärbte Suspension wurde in die Zählkammer Neubauer-improved gefüllt und nach einer etwa 2-minütigen Wartezeit unter dem Mikroskop ausgewertet. Tote Zellen erscheinen dabei blau gefärbt, vitale Zellen bleiben dagegen ungefärbt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Demonstrationsversuche mit enzymmarkiertem zellpenetrierendem Peptid

Erste Versuche zum Translokationsverhalten membranaktiver Peptide an Biomembranen wurden mit einem CRE-markierten TAT-Peptid an murinen T-Zellen durchgeführt. CRE (engl.: cyclization recombination) ist eine ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammende Rekombinase, welche zur Integration desselben in das Wirtsgenom beiträgt [46, 47]. Dabei katalysiert es das Schneiden und das zielgerichtete Rekombinieren von DNA an definierten Sequenzen aus je 34 Basenpaaren, die im Englischen locus of crossing over (loxP) genannt werden [48]. Bei dem als CRE/loxP bekannten Reportersystem macht man sich diese Eigenschaft zunutze, indem man zwischen die beiden loxP-Sequenzen ein Stopcodon setzt, bei dem die Transkription abgebrochen wird. Findet an den loxP-Sequenzen jedoch CRE-katalysiertes Schneiden und Rekombinieren statt, so wird dadurch die zwischen den loxP-Stellen befindliche Sequenz „ausgeschnitten“, und die DNA wird an den Schnittstellen zu einer einzigen loxP-Stelle rekombiniert. So kann die Transkription – ausgehend von einem konstitutiven Promotor – über die verbleibende loxP-Stelle hinweg bis einschließlich zum folgenden grün fluoreszierenden Protein (eGFP für engl.: enhanced green fluorescent protein) erfolgen. Das auf diese Weise exprimierte Protein kann dann fluoreszenzspektrometrisch detektiert werden [35, 19, 49] (siehe Abbildung 4-1). Der Vorteil dieses Konzeptes wäre, dass CRE ausschließlich mit Hilfe eines CPP in die Zelle transportiert werden würde, und somit nur bei tatsächlich erfolgtem Membrandurchtritt Fluorophore in der Zelle nachgewiesen werden könnten. CPPs, die sich nur scheinbar innerhalb einer Zelle befinden, jedoch tatsächlich in Vesikeln eingeschlossen bleiben, werden nicht detektiert; zudem kann ein gegebenenfalls erfolgter retrograder Transport ebenfalls ausgeschlossen werden.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurden murine T-Zellen verwendet. Der praktische Vorteil von Zellen des hämatopoetischen Systems liegt darin, dass es sich um Suspensionszellen handelt, die nicht an den Kultur- oder Messgefäßen adhären. Bei den verwendeten T-Zellen handelt es sich um die Linie Tex.loxP.EG [35]. Diese wurde ausgehend von Tex-Zellen hergestellt. Tex-Zellen sind Thymom-Zellen, die aus einer p53-Mangel-Maus isoliert wurden. Die Tex.loxP.EG-Zellen [35] wurden gewonnen, indem Tex-Zellen mit einem pBABE.lox.stp.EGFP-Retrovirus infiziert wurden. Der im Virus befindliche pBABE.lox.stp.EGFP-Vektor enthielt die Stop-Kassette (eine multiple Polyadenylierungsstelle) eines pBS302-Vektors [50]. Diese wurde stromaufwärts vom eGFP-

Gen (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) in den pBABE Vektor kloniert [51, 35]. Damit wurden dann ecotropische retrovirale Stocks in BOSC 23-Zellen präpariert [52], die Tex-Zellen infiziert, und anschließend stabil transfizierte Zellen selektiert. Die Tex.loxP.EG-Zellen wurden von Prof. E. Ruley (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) zur Verfügung gestellt.

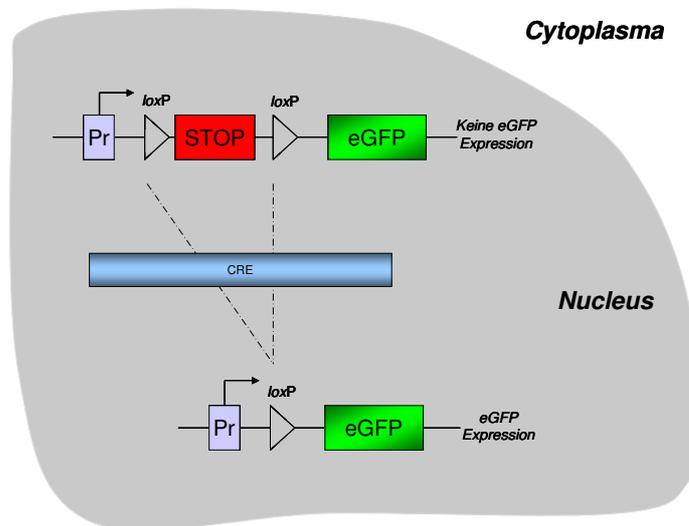


Abbildung 4-1: Schematisch dargestellte Funktionsweise des verwendeten Reportersystems CRE/loxP

CRE-katalysiert wird eine Stop-Sequenz aus der DNA entfernt. Dadurch kann die Expression von eGFP erfolgen. Pr = Promotor. Die Darstellung ist in veränderter Form aus [19] entnommen.

4.1.1 Ergebnisse

Klonierung, Überexpression und Aufreinigung

Ausgehend von einem pET 28-Plasmid mit bereits einklonierter Sequenz für das Protein TAT-Cre (siehe Abbildung 4-1), welches Prof. S.F. Dowdy (University of California, San Diego, CA, USA) zur Verfügung gestellt hat [19], wurde ein Vergleichsprotein ohne TAT-Sequenz kloniert. Dies erfolgte mit dem QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach der in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Methode. Abbildung 4-1 zeigt eine schematische Darstellung beider Proteine. Das Enzym CRE wird in dieser Arbeit in Großbuchstaben dargestellt, die rekombinant hergestellten Proteine werden als „Cre“ und „TAT-Cre“ bezeichnet.

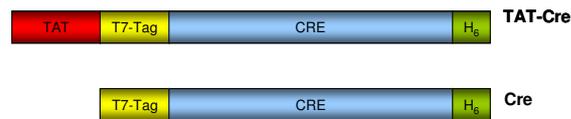


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der verwendeten Proteine

Anschließend erfolgte die Hitzetransformation der klonierten DNA in XL1-Blue superkompetente Zellen nach dem in Kapitel 3.2.1.3 beschriebenen Verfahren des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene. Ausplattiert auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank bei 37 °C positiv transformierte Zellen selektiert.

Zur Isolierung des Plasmids aus den XL1-Blue *E. coli*-Bakterien wurde eine Nährlösung mit der selektierten Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte dann nach dem Qiafilter Plasmid Purification-Handbuch von Qiagen gemäß dem Protokoll für sogenannte Low-Copy-Plasmide nach dem Prinzip einer alkalischen Lyse (siehe Kapitel 3.2.1.5). Nach Isopropanolfällung, dem Waschen der DNA mit 70 % Ethanol und anschließendem Trocknen wurde die isolierte Plasmid-DNA in H₂O bidest. aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde die Basensequenz (vor und nach der Klonierung) von der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert und das Ergebnis mit der Translations-Anwendung auf dem ExPASy Proteomic-Server des Swiss Institute of Bioinformatics [37] ausgewertet.

Die Überexpression der CRE-Fusionsproteine erfolgte nach Transformation der Plasmide in BL21 (De3) pLysS-Zellen durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Nährmedium nach dem in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Verfahren. Nach der Zellernte wurden die Proteine über Nickel-NTA-Chromatographie aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.7.1). Nach dem Aufkonzentrieren der Proteine über Amicon Ultrafiltrationseinheiten und der Umpufferung über eine Entsalzungssäule PD-10 lagen die Proteine wie bei Lin et al. [20] beschrieben in einer PBS-Lösung mit 0,45M NaCl in einer Konzentration von etwa 1,5 mg/ml vor.

Nach jedem Aufreinigungsschritt wurden die Proteine mit SDS-Page überprüft, und die aufgereinigten Proteine wurden durch MALDI-TOF charakterisiert (siehe Kapitel 3.2.6). Konzentrationsmessungen der klonierten Plasmide und der aufgereinigten Proteine erfolgten ebenfalls spektrophotometrisch. Dabei wurde die Proteinkonzentrationsbestimmung bei 280 nm durchgeführt und ein molarer Extinktionskoeffizient von 49180 M⁻¹cm⁻¹ für CRE verwendet [37].

Durchflusszytometrische Messungen

Die Translokationsversuche der CRE-Fusionsproteine mit und ohne TAT wurden im Zellkulturlabor von Dr. Eric Gottwald am IBG-1 des KIT mit technischer Unterstützung von Anke Dech und David Thiele durchgeführt. Hier wurden die Tex.loxP.EG-Zellen (Prof. E. Ruley, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) in Kultur gehalten. Zunächst wurden 5×10^7 Zellen in serumfreiem Medium aufgenommen. Anschließend wurde das Protein in einer Endkonzentration von $2 \mu\text{M}$ zugegeben und im Inkubationsschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über eine Zeitdauer von 10 min bis 8 h inkubiert; anschließend wurden die Zellen gewaschen. Für die darauf folgende Postinkubationszeit wurde serumhaltiges Medium verwendet. Die Postinkubationszeit wurde so gewählt, dass sich eine Gesamtinkubationszeit von 24 h ergab.

Wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben erfolgte die Detektion der eGFP-exprimierenden Zellen mit einem Durchflusszytometer. Dabei wurde das Protein bei einer Wellenlänge von 488 nm optisch angeregt (Argonlaser) und dessen Emission bei 509 nm gemessen. Die Häufigkeitsverteilung der eGFP-fluoreszierenden Zellen ist graphisch in Abbildung 4-3 in Form eines Einparameter-Histogramms dargestellt. Dabei wird die Intensität logarithmisch verstärkt auf der Abszisse aufgetragen, während die Ordinate die relative Häufigkeitsdichte des jeweiligen Intensitätswertes angibt. Durch die Festlegung von Intensitätsgrenzen wird der Fluoreszenzbereich mit der höchsten Häufigkeitsdichte selektiert und zur Auswertung aller Messungen unverändert beibehalten.

Die durch das FSC und SSC generierten Signale werden linear verstärkt dargestellt; die relative Intensität des von den Zellen gestreuten Lichts des Argonlasers ist in Form eines Dotplots dargestellt. Da jeder Punkt in diesem Diagramm einer Zelle entspricht, gibt ihre Position im Koordinatensystem Aufschluss über beide Parameter (vereinfacht: Zellgröße und Granularität). Zelltrümmer und Artefakte können so erkannt und durch das Setzen eines polygonalen Fensters zum überwiegenden Teil ausgegrenzt werden. Der so definierte Bereich wurde ebenfalls während der Auswertung aller Messungen nicht mehr verändert.

Gesucht werden die Zellen im definierten Fluoreszenzbereich, die innerhalb des polygonalen Fensters liegen, relativ zu allen Zellen im polygonalen Fenster (graphische Darstellung in Abbildung 4-3). Diese sind in Abbildung 4-4 als „% eGFP exprimierende Zellen“ in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer mit dem jeweiligen Protein gezeigt. Bei diesen Versuchen wurden jeweils ca. 30.000 Zellen gemessen. Die Rohdaten wurden als FCS-Dateien gespeichert und mit dem Programm WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) ausgewertet.

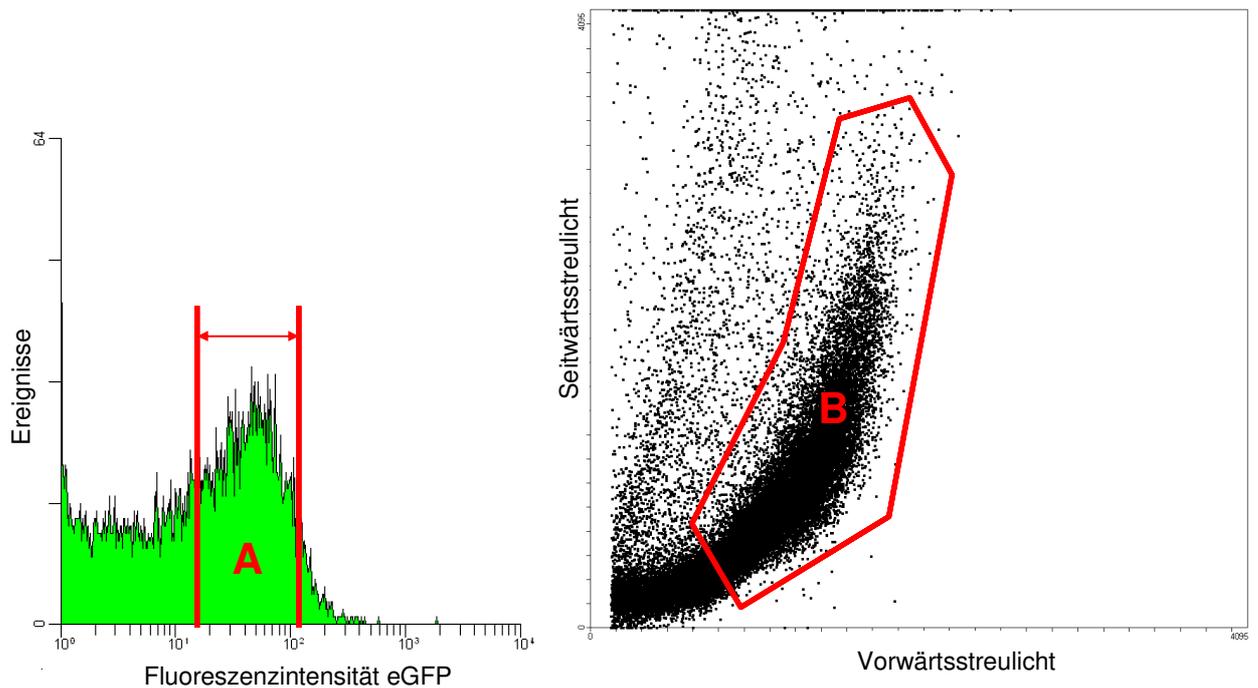


Abbildung 4-3: Auswertung der durchflusszytometrischen Messung

Die Abbildung zeigt links ein Einparameter-Histogramm und rechts einen 2D-Dotplot einer durchflusszytometrischen Messung. Im Einparameter-Histogramm werden Zellen ausgewählt, die in einem definierten Fluoreszenzintensitätsbereich liegen (A). Um Artefakte, wie beispielsweise Zelltrümmer, weitestgehend zu vermeiden, werden diese aus der Messung ausgegrenzt. Dies geschieht durch Setzen eines Polygons im 2D-Dotplot, in dem der überwiegende Anteil der interessierenden Population vorliegt (B). Gesucht werden also die in A befindlichen Zellen aus B relativ zu allen in B befindlichen Zellen. Um über mehrere Messungen vergleichbare Werte zu erhalten, müssen die Bereiche A und B unverändert bleiben.

Aus Abbildung 4-4 ist ersichtlich, dass schon eine Inkubationszeit von 10 min eine TAT-Cre-Protein-Translokation zur Folge hat, was sich in etwa 35 % der interessierenden Population über eGFP-Fluoreszenz zeigt. Nach bereits etwa 1 h fluoreszieren fast 50 % der Zellen; das ist ein Wert, der mit Inkubationszeiten bis 8 h etwa dem erreichten Maximalwert entspricht.

Allerdings zeigen auch die Versuche mit dem Cre-Protein eine merkliche Erhöhung der Fluoreszenz, die jedoch erst nach 2 bis 3 h einen relativ konstanten Endwert erreicht. Dieser liegt bei ca. 50 % des Wertes der TAT-Cre-Serie. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Proteinen zeigt sich jedoch bei kurzen Inkubationszeiten; so unterscheiden sich die beiden durchschnittlichen Fluoreszenzwerte bei einer Inkubationszeit von 10 min etwa um den Faktor 10.

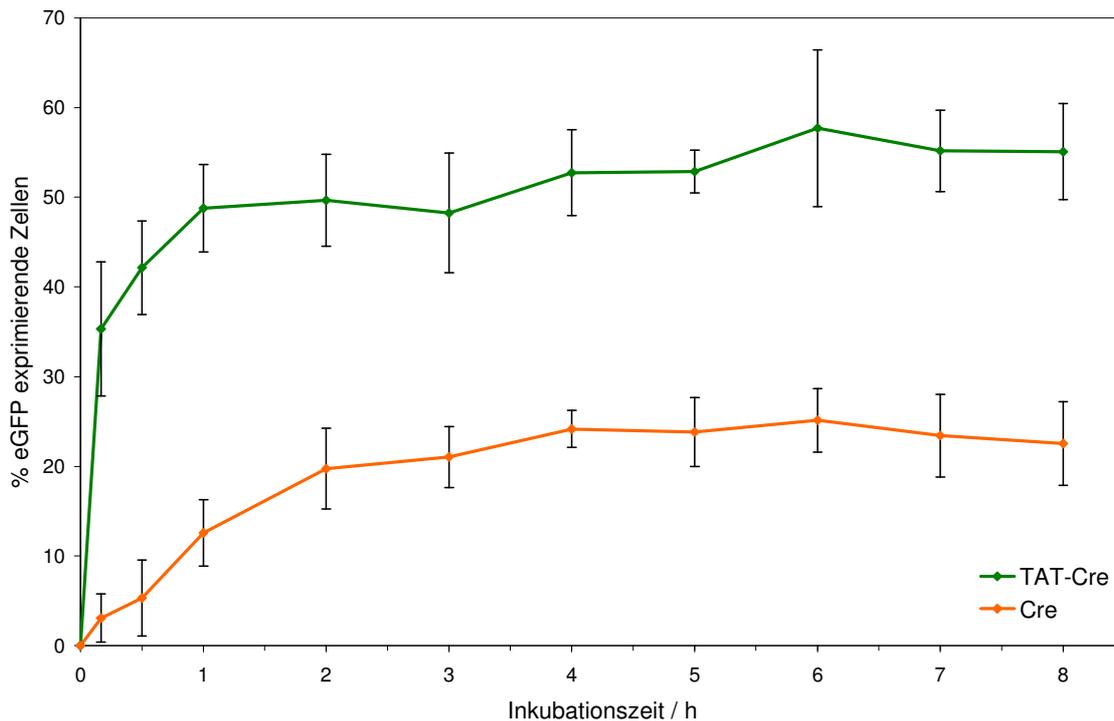


Abbildung 4-4: TAT-Cre- vs. Cre-Translokation

Die eGFP-exprimierenden Zellen eines definierten Bereichs (siehe Abbildung 4-3) sind in Abhängigkeit zur Inkubationszeit (10 min bis 8 h) mit TAT-Cre bzw. Cre dargestellt. Mittelwert \pm Konfidenzintervall. Die Messwerte sind Durchschnittswerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen. Als Messfehler ist das Konfidenzintervall angegeben. Weitere Parameter: $\lambda_{\text{Excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 509 \pm 5 \text{ nm}$.

4.1.2 Diskussion

Da das fluoreszierende Protein eGFP nur nach CRE-vermittelter Rekombination exprimiert wird, kann mit den durchgeführten Versuchen eine erfolgte Proteintranslokation zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Zellassoziierte Proteine, retrograder Proteintransport oder CPPs, die sich innerhalb von Vesikeln befinden, verfälschen die Messergebnisse daher nicht. Abbildung 4-4 zeigt die eGFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Inkubationszeit von beiden verwendeten CRE-Fusionsproteinen. Dabei ist die Translokation des mit TAT fusionierten CRE wesentlich deutlicher ausgeprägt als die des CPP-freien CRE.

So konnte bereits nach einer 10-minütigen Inkubationszeit mit dem TAT-Cre-Protein eine in Folge dessen deutlich erhöhte eGFP-Fluoreszenz in den Zellen gemessen werden. Dabei wurden Werte erreicht, die bereits bei über 50 % des ab einer etwa einstündigen Inkubationszeit erreichten Endniveaus lagen. Die Translokation des Cre-Proteins ohne CPP

verläuft hingegen deutlich langsamer und erreicht erst nach etwa 1 h einen halbmaximalen Wert.

Das maximal erreichte Fluoreszenzniveau wird beim TAT-Cre-Protein bereits nach einstündiger Inkubationszeit erreicht. Beim Cre-Protein wird dieses Niveau erst nach einer Inkubationszeit von etwa 2 h erreicht.

Somit scheint das Cre-Protein, welches keine Translokationssequenz in Form eines CPP besitzt, dennoch in die Zellen eingedrungen zu sein, und zwar in einem etwa um den Faktor 2 geringeren Ausmaß. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der zur Aufreinigung benötigte His-Tag ebenfalls translokationsfördernd wirkt [20]. Zudem scheint das Enzym CRE selbst eine zumindest geringe Translokationseigenschaft zu besitzen [20, 53], die möglicherweise durch seine kationische Ladung [54] oder durch eine dem Protein eigene Translokationsdomäne zustande kommt [55]. Beide würden dem Protein Eigenschaften verleihen, die translokationsfördernd wirken. Der Translokationsmechanismus von CRE bleibt jedoch zu einem gewissen Grad spekulativ, da er im Detail bisher ungeklärt ist.

CRE/loxP-Systeme sind als Werkzeuge zum Nachweis von translokationsfördernden Eigenschaften membranaktiver Peptide wie TAT zwar prinzipiell geeignet, gegebenenfalls können jedoch quantitative Messungen mit Fehlern behaftet sein, da Interaktionen von CPPs mit dem etwa 40 kDa großen Enzym CRE nicht immer auszuschließen sind. Hinweise darauf könnten beispielsweise durch Längenvariation einer zwischen das CPP und CRE geschalteten Sequenz gefunden werden.

Um die Rekombination der DNA zu katalysieren, muss das mit CRE fusionierte Peptid nicht nur ins Cytosol der Zelle, sondern auch in ihren Kern gelangen. Dies geschieht meist über Kernlokalisationssequenzen (engl.: nuclear localization signal, NLS). Das sind bestimmte Aminosäuresequenzen, die durch ihre positive Nettoladung den CPPs stark ähneln und wie im Beispiel der ersten fünf Aminosäuren bei TAT (GRKKR) [14] auch Bestandteil der CPPs sein können. Lin et al. [20] berichten von einer verstärkten Translokation des Enzyms CRE, sofern es mit der NLS des SV40 large T-Antigen fusioniert wurde. Obwohl das CRE mit etwa 40 kDa durchaus in der Lage wäre, durch passive Diffusion die Kernporen zu passieren, beinhaltet es bestimmte Strukturbereiche, welche die Funktion einer NLS haben und den Eintritt in den Kern begünstigen [55]. Allerdings sollte bei der Interpretation der hier durchgeführten Versuche berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Kernlokalisationszeiten sich nicht in unterschiedlichen Expressionsstärken von eGFP widerspiegeln, denn eine Verzögerung des nuklearen Imports im Bereich weniger Minuten dürfte die erst nach 24 h gemessene Expression nicht beeinflussen. Vergegenwärtigt man sich zudem, dass auf die primäre Inkubationszeit von 10 min bis zu einigen Stunden eine

weitere, zur Expression notwendige Postinkubation mit 24 h erfolgte, wird ersichtlich, dass mit diesen Versuchen kein direkter Hinweis auf den eigentlichen Translokationsmechanismus gewonnen werden kann. So könnte eine Translokation über 24 h beispielsweise auch über einen endozytotischen Weg erfolgt sein.

Da zur Durchführung der Experimente das Reportersystem stabil in die DNA des Versuchsorganismus transfiziert sein muss, ist dessen Anwendbarkeit begrenzt. Gerade beim Vergleich verschiedener CPPs wäre jedoch ein universelles und vielseitiger angelegtes Konzept von Vorteil. Da die Aktivität membranaktiver Peptide in erheblichem Maße von Parametern wie z. B. der Zelllinie, der Temperatur (T) oder der Lipidzusammensetzung der Biomembran abhängen wird, sollten die Untersuchungen idealerweise an Zellen durchgeführt werden, die in späteren Anwendungen auch von den CPPs adressiert werden sollen. Gerade das ist jedoch mit dem bisher beschriebenen Assay nicht möglich. Obwohl die Verwendung lebender Versuchssysteme durchaus sinnvoll und vorteilhaft sein kann – beispielsweise bei der Untersuchung der möglichen Beteiligung endozytotischer Wege beim Translokationsvorgang –, wird die Aufklärung der wesentlichen translokationsfördernden Parameter sich oft als schwierig erweisen. Unter diesen Gesichtspunkten könnten künstliche Systeme vorteilhaft sein, da z. B. bei Lipidvesikeln die Lipidzusammensetzung variiert werden kann. Denn wenn sich sehr aktive und dabei membranschonende CPP-Sequenzen bereits an Vesikelsystemen untersuchen ließen, wäre deren weitere und oft aufwändige Optimierung an praxisnäheren Systemen effizienter durchführbar.

4.2 Aufbau eines quantifizierbaren Assays

Um die Translokationseigenschaften membranaktiver Peptide an unterschiedlichen Versuchssystemen wie künstlichen Vesikeln, Zellkulturen und mehrzelligen Organismen vergleichen und bewerten zu können, bedarf es eines breit einsetzbaren Reportersystems. So könnte man bereits durch Vergleiche Aussagen darüber erhalten, inwieweit der Membrandurchtritt der Peptide durch spezifische Eigenschaften des bzw. der Versuchssysteme begünstigt oder eventuell auch erschwert wird. Zudem können bei Verwendung künstlicher Membransysteme wie Vesikel die wesentlich am Translokationsprozess beteiligten Faktoren festgestellt und konkretisiert werden; dies wären z. B. bestimmte Lipide, Einflüsse der Temperatur oder auch Membranpotenziale.

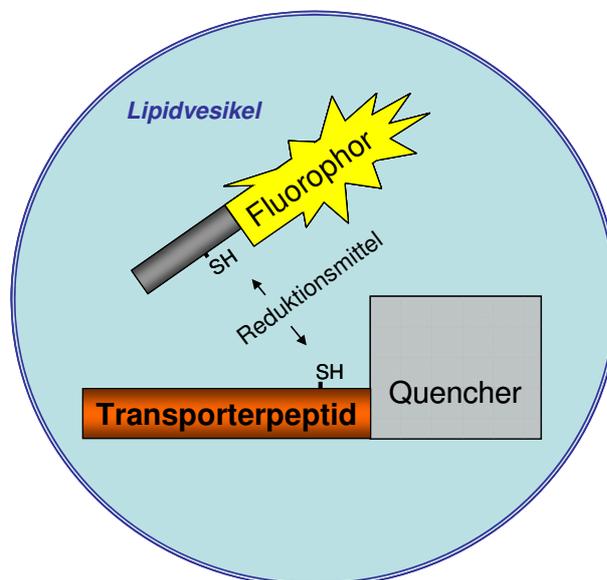


Abbildung 4-5: Funktionsprinzip des CPP-Fluoreszenz-Quencher-Versuchs

Durch reduzierende Bedingungen wird die Disulfidbrücke des über ein Transporterpeptid ins Vesikel geschleusten Konstrukts gespalten. Dies führt zu einem Entquenchen des Fluorophors und somit zu einer erhöhten Fluoreszenz.

Das Konzept des im Folgenden beschriebenen Assays basiert auf einem FRET-Paar 2-Aminobenzamid (Abz) und 3-Nitrotyrosin (n-Tyr), das sich über eine Disulfidbrücke verknüpft in räumlicher Nähe zueinander befindet. Wird die Brücke über ein im Innern des Vesikels befindliches Reduktionsmittel gespalten, dissoziiert das FRET-Paar, welches durch Erhöhung der Donorfluoreszenz beobachtet werden kann. Aus diesem Fluoreszenzsignal kann somit direkt und unmittelbar (Ausmaß, Geschwindigkeit) eine erfolgte Translokation beobachtet und deren Ausmaß und zeitliches Verhalten quantitativ erfasst werden.

Weiterhin kann dieses Konzept außer an künstlichen Membransystemen wie Vesikeln auch an lebenden Zellen eingesetzt werden [23], da im Cytosol lebender Zellen bereits reduzierende Bedingungen vorliegen. Diese kommen durch GSH zustande, das in eukaryotischen Zellen mit einer Konzentration von etwa 5 mM vorliegt [23]. Dabei handelt es sich um ein Pseudotripeptid aus den drei Aminosäuren Gluthaminsäure, Cystein und Glycin. Bei Experimenten mit Vesikeln muss zunächst geklärt werden, inwieweit das Reduktionsmittels GSH verwendet werden kann. Beispielsweise wird die Frage, ob in Vesikel eingeschlossenes GSH darin verbleibt, im folgenden Kapitel geklärt. Außerdem werden weitere Voraussetzungen für die Durchführbarkeit der Versuche ausgearbeitet. Hierzu gehört zunächst die nähere Untersuchung des Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts (engl.: fluorescence-quencher-construct, FQC) mit dem letztlich die Peptidtranslokation verfolgt wird, sowie die Optimierung von Verfahrensprotokollen.

4.2.1 Ergebnisse

Eigenschaften des TAT-Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts

Zum Nachweis der CPP-Translokation wurde ein Fluoreszenz-Quencher-Konstrukt (FQC) verwendet, dessen Synthese nach dem in Kapitel 3.2.3.2 beschriebenen Verfahren erfolgte. Dabei wurden zwei Chromophore verwendet, bei denen es zu einem signifikanten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [56] kommt. Es handelt sich hierbei um einen strahlungslosen Energietransfer von einem fluoreszenten Donor (hier: Abz) auf einen Akzeptor (hier: n-Tyr), wodurch die Fluoreszenz des Donors gelöscht (gequencht) wird. Ein FRET kann erfolgen, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt (siehe Abbildung 4-6), und der Abstand von Donor und Akzeptor im Bereich weniger nm liegt. Die Effizienz eines FRET erfolgt mit der sechsten Potenz des Abstandes von Donor und Akzeptor, wobei die Skalierung durch den Förster-Abstand R_0 gegeben ist. Dies ist der Abstand, bei dem der Energieübertrag halbmaximal ist, d. h. 50 % beträgt.

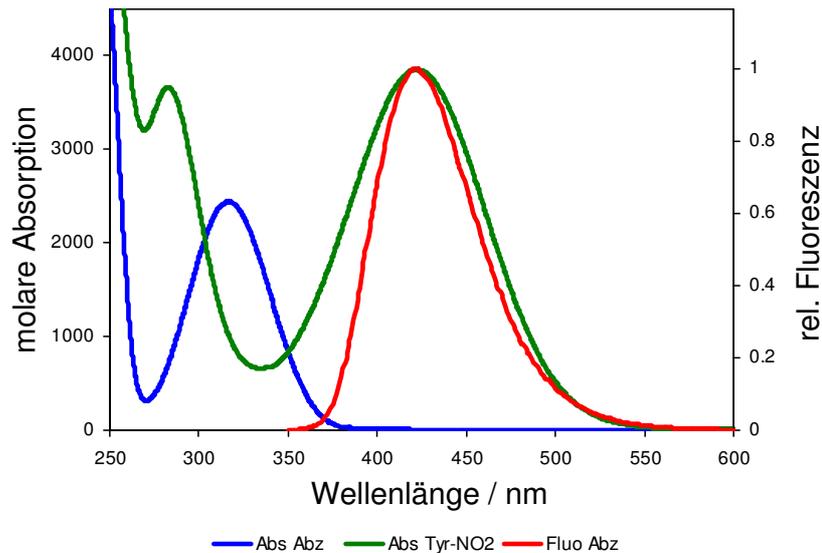


Abbildung 4-6: Absorptions- und Fluoreszenzspektren des FRET-Paares 2-Aminobenzamid (Abz) und 3-Nitrotyrosin (n-Tyr) [21]

Die Abbildung zeigt das Fluoreszenzspektrum von Abz (rot), das molare Absorptionsspektrum von Abz (blau) und das Absorptionsspektrum von n-Tyr (grün). Das Fluoreszenzspektrum des Donors Abz ist nahezu ideal vom Absorptionsspektrum des Akzeptors (Tyr-NO₂) überlagert. Gemessen wurde in 10 mM HEPES pH 8.

Das hier verwendete FRET-Paar mit Abz als Donor und n-Tyr als Akzeptor wurde 1991 von Morten Meldal und Klaus Breddam eingeführt und dessen Förster-Abstand zu 31 Å bestimmt [21]. Im verwendeten Fluorophor-Quencher-Konstrukt sind Abz und n-Tyr über ein Cystin miteinander verbunden. C-terminal von n-Tyr befindet sich TAT als zellpenetrierendes Peptid (siehe Abbildung 4-7).

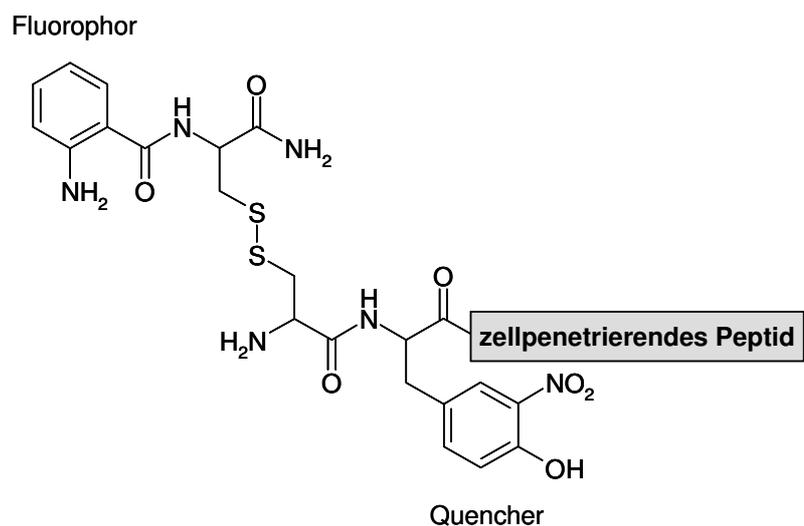


Abbildung 4-7: Strukturformel des verwendeten Fluoreszenz-Quencher-Konstrukts

Das am N-Terminus des zellpenetrierenden Peptids befindliche n-Tyr löscht die Fluoreszenz von Abz. Abz ist mit n-Tyr über die Disulfidbrücke eines Cystins verbunden. Die Abbildung ist in veränderter Form aus [23] entnommen.

Wenn die Disulfidbrücke des Cystins reduziert wird, und Abz und n-Tyr infolgedessen dissoziieren und sich räumlich voneinander entfernen, wird ein FRET-Effekt nicht mehr erfolgen. Die ursprünglich gequenchte Fluoreszenz des Donors Abz wird entquencht und steigt somit an (siehe Abbildung 4-8).

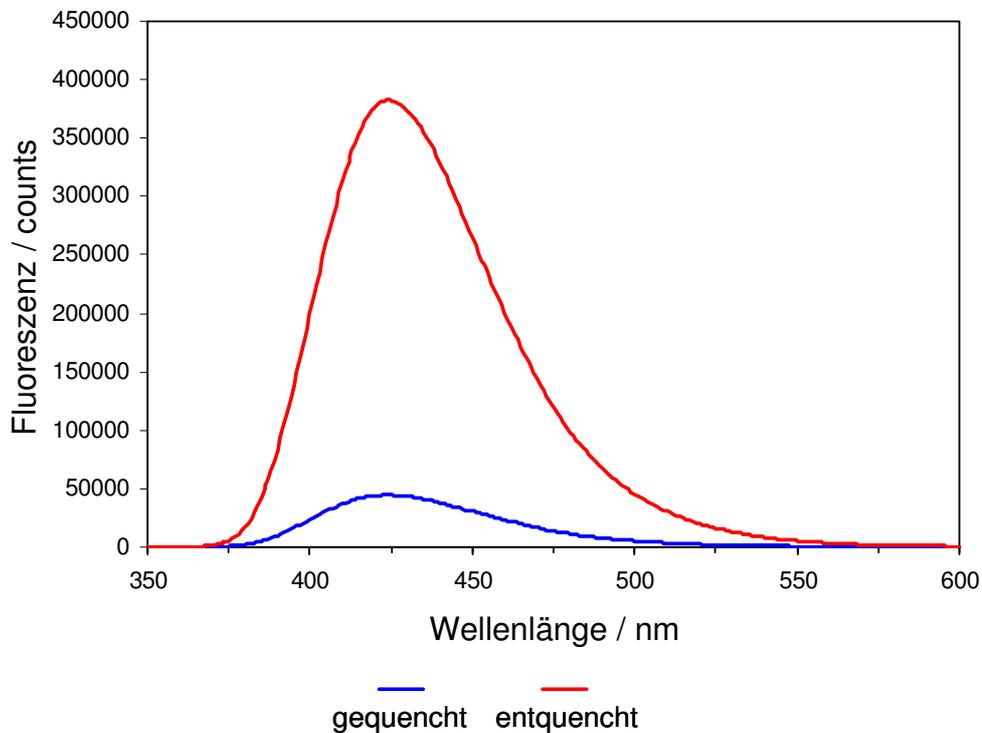


Abbildung 4-8: Gequenhtes und entquenhtes TAT-FQC im Vergleich

Fluoreszenzspektren von gequenhtem und entquenhtem TAT-FQC unterscheiden sich etwa um Faktor 8. Weitere Parameter: $c_{\text{TAT-FQC}} = 5 \mu\text{M}$, 10 mM HEPES pH 7,5, $\lambda_{\text{Excitation}} = 320 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} > 350 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$.

Das Detektionslimit der fluorimetrischen Abz-Bestimmung kann wie folgt abgeschätzt werden: Wie weiter unten in diesem Kapitel ausgeführt, beträgt das gesamte innere Volumen der Vesikel ca. 1 bis 2 μl . Angenommen, das CPP-FQC equilibriert über die Membran, so wäre $c_i = c_a$. Ein Küvettenvolumen von 1500 μl entspricht etwa dem 1000-fachen inneren Volumen; setzt man 10 μM TAT-FQC außen zu, ergäbe dies einen umgesetzten Anteil von 1‰ und entspräche somit einer gemittelten Konzentration von 10 nM. Abbildung 4-9 zeigt, dass Abz selbst in Konzentrationen unter 1 nM noch zuverlässig quantifiziert werden kann – ein Bereich, der deutlich unterhalb jenes Wertes liegt, der nach Spaltung der Disulfidbrücke und Entquenchen des Fluorophors Abz erwartet wird.

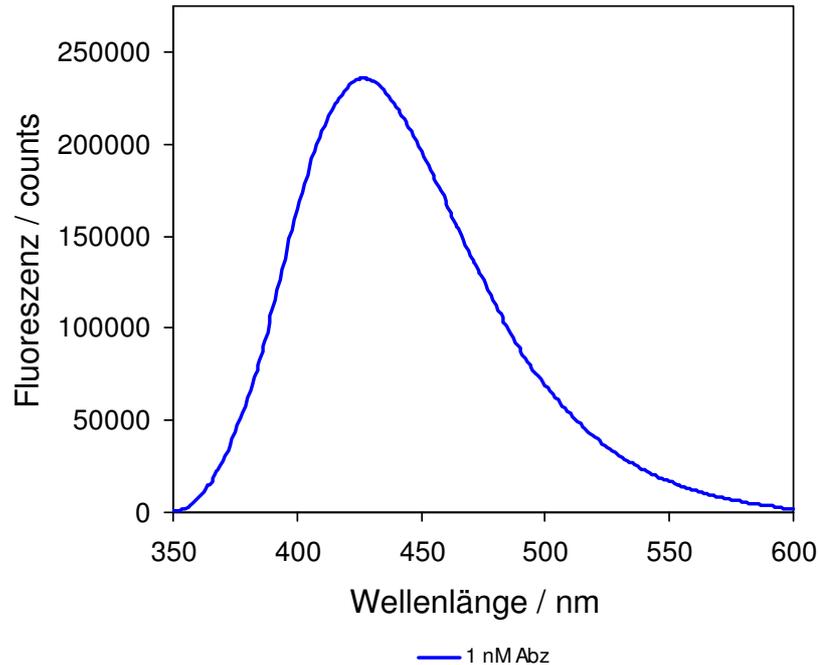


Abbildung 4-9: Fluoreszenzspektrum von Abz

Fluoreszenzspektrum einer 1 nM-Abz-Lösung kann noch zuverlässig quantifiziert werden. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4, $\lambda_{\text{Excitation}} = 322 \pm 10\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 425 \pm 10\text{ nm}$.

Eigenschaften der Lipidvesikel

Der Durchmesser von annähernd kugelförmigen, großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) ergibt sich hauptsächlich aus der bei der Extrusion verwendeten Membran, die eine Porengröße von 100 nm aufweist. Mittels dynamischer Lichtstreuung wurden hydrodynamische Durchmesser von 100 nm bis 120 nm bestimmt; dies sind Werte, wie sie üblicherweise bei diesem Präparationsverfahren erhalten werden. Im Anhang C-A, C-B und C-C sind für die Vesikel einige geometrischen Kenngrößen dargestellt sowie sich daraus ergebende Konzentrationsverhältnisse.

Optimierung der Protokolle zum Pufferaustausch

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente mussten zunächst die chromatographischen Eigenschaften der verwendeten Sephacryle ermittelt werden, um eine möglichst effektive Trennung der Farbstoffe bzw. des GSH oder dextrangebundenen GSH von den Vesikeln zu erhalten. Dies beinhaltete erreichbare Trenneffizienzen (Farbstoffe vs. Vesikel) sowie die Minimierung von Lipidverlusten auf der Säule. Neben der Wahl eines geeigneten Sephacryls, welches sich nach der Molmasse der abzutrennenden Substanz richtet, und dem Volumen der Spin Column (siehe Abbildung 4-10), das sich aus der benötigten

Vesikelmenge ergibt, waren die Zentrifugationsparameter Geschwindigkeit und Dauer zu ermitteln. Sie wurden so gewählt, dass der Vesikelverlust möglichst gering ausfiel.



Abbildung 4-10: 0.5 ml Spin Column

Oben: Zu erkennen ist das weiß erscheinende Gel (oben, Höhe ca. 14 mm, Durchmesser 6 mm). Als Auffanggefäß wird ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß verwendet (unten).

Durch die Beimischung von Rhodamin-PE in einem molaren Verhältnis von 10^{-4} kann über dessen Fluoreszenz die relative Lipidkonzentration durchgängig verfolgt werden.

Eine Mess-Serie mit dem Säulenmaterial Sephacryl 100-HR wurde bei unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Zeiten durchgeführt. Es ergab sich die beste Wiederfindung der Vesikel im ersten Eluat bei $1500 \times g$ und einer Zentrifugationsdauer von 2 min. Diese Geräteeinstellung wurde bei der weiteren Charakterisierung der Sephacryle beibehalten. Weiterhin wurde ein möglicher Einfluss der Lipidkonzentration auf die Wiederfindung untersucht, und es ergab sich im Bereich von 1 mg/ml bis 10 mg/ml kein erkennbarer Zusammenhang.

Während über Rh-PE die Lipidfraktion verfolgt werden kann, so kann durch Beobachten eines niedermolekularen membranimpermeablen Fluorophors wie Calcein die Trenneffizienz der Sephacryle mitverfolgt werden. Die erhaltenen Trenncharakteristika der beiden Sephacryle ist in Abbildung 4-11 dargestellt. Die roten Kurven stehen für die gewonnene Lipidfraktion, die blaue bzw. schwarze Kurve für die abzutrennenden Substanzen Calcein und Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD70). In allen Fraktionen wurden jeweils beide Parameter gemessen. Der Großteil der Vesikel wurde wie erwartet im Eluat des ersten Zentrifugationsschrittes gefunden. Bei den folgenden Zentrifugationsschritten nahm die gefundene Vesikelmenge ab. Calcein oder FD70 war in der ersten Fraktion hingegen fast vollständig abgetrennt. Durch weitere Zentrifugationsschritte wurden diese Substanzen nach und nach ausgewaschen. Bei Sephacryl 100-HR wurden im ersten Eluat die Vesikel zu etwa 85 % wiedergefunden. Hingegen befanden sich in diesem Eluat nur noch 10^{-4} des ursprünglich eingesetzten Calceins. Bei Sephacryl 500-HR wurden im ersten Eluat die

Vesikel zu etwa 33 % wiedergefunden; in diesem Eluat befanden sich noch 10^{-3} der ursprünglichen FD70-Konzentration.

Alle Parameter zusammen ergeben die für die Spin Columns erforderlichen Kenngrößen, um die Vesikel möglichst effizient zu waschen d. h. in einen farbstoff- oder GSH-freien Puffer überzuführen.

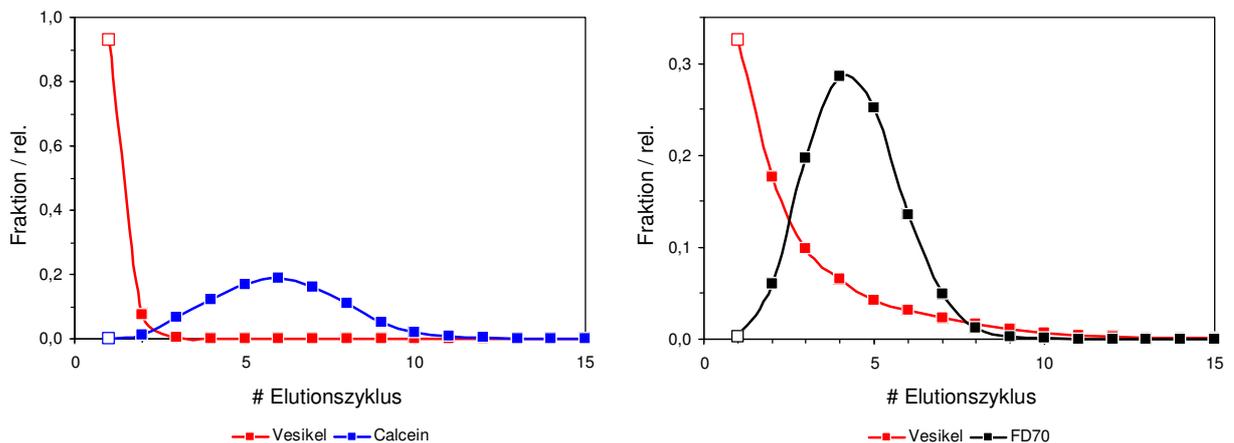


Abbildung 4-11: Elutionsprofile von Sephacryl 100-HR (links) und Sephacryl 500-HR (rechts)

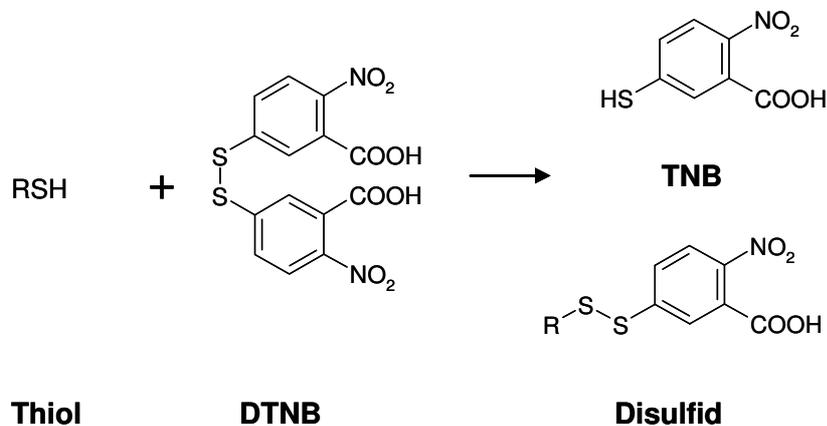
Die rote Kurve zeigt je die erhaltene Vesikelfraktion. Zu sehen ist, dass ein Großteil der Vesikel schon in der ersten Elution gewonnen wird; links zeigt die blaue Kurve den abzutrennenden Farbstoff an, der exemplarisch für niedermolekulare Substanzen steht. Es ist deutlich zu sehen, dass ebenfalls in der ersten Elution am wenigsten Farbstoff enthalten ist. Mit zunehmenden Elutionsschritten (x-Achse) wird er wieder aus der Säule ausgewaschen. Dasselbe gilt für FD70, welches rechts die schwarze Kurve darstellt.

Inneres Volumen

Das innere Vesikelvolumen wurde über die Quantifizierung eines in die Vesikel eingeschlossenen Farbstoffs bestimmt. Das wurde entweder mit den Farbstoffen Calcein, 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) oder mit ANTS als impermeabler Marker durchgeführt. Hierzu wurde die bei den gewaschenen Vesikeln erhaltene Fluoreszenzintensität mit der Fluoreszenzintensität einer Farbstofflösung gleicher Konzentration und definiertem Volumen verglichen. Es ergab sich bei einer Lipidkonzentrationen in der Küvette (Volumen 1,5 ml) im Bereich um $600 \mu\text{M}$ üblicherweise ein inneres Volumen von etwa 1 bis $2 \mu\text{l}$; also sind ca. 1% des gesamten Küvettenvolumens in die Vesikel eingeschlossen.

Dichtigkeit der Vesikel bezüglich des Reduktionsmittels GSH

Um die Translokation eines FQCs verfolgen zu können, muss das Reduktionsmittel in den Vesikeln eingeschlossen bleiben. Das in dieser Arbeit verwendete Reduktionsmittel GSH hat ein Redoxpotenzial von -240 mV [57] und stellt das universelle Reduktionsmittel im Cytosol lebender Zellen dar. Bei der Oxidation geht es von seiner monomeren Form GSH in ein Dimer GSSG über. Die freien Thiolgruppen reduzierter Glutathione können mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) quantifiziert werden. Bei der Reaktion eines DTNB-Moleküls mit einer freien Thiolgruppe wird ein 2-Nitro-5-Thiobenzonat frei (TNB). Dieses ionisiert zu gelbem TNB^{2-} , welches bei 412 nm absorbiert. DTNB absorbiert im Gegensatz dazu bei 324 nm. Die Reaktion verläuft im Bereich einer Minute und im stöchiometrischen Verhältnis 1:1. Über den molaren Extinktionskoeffizienten von TNB ($= 13600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann die Konzentration freier Thiolgruppen bestimmt werden.

**Abbildung 4-12: Nachweis freier Thiolgruppen über DTNB**

Bei der Reaktion eines DTNB-Moleküls mit einer freien Thiolgruppe wird ein 2-Nitro-5-Thiobenzonat frei (TNB). Dieses ionisiert zu gelbem TNB^{2-} , welches bei 412 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ absorbiert.

Zur exakten Bestimmung der Absorption von TNB bei 412 nm muss ein Differenzspektrum mit DTNB bei 412 nm erstellt werden (siehe Abbildung 4-13). Es ergibt sich ein isosbestischer Punkt bei 356 nm, welcher, um Verdünnungs- und Pipettierfehler auszuschließen, unter Verwendung einer Tandemküvette (2 x 0,4375 cm Schichtdicke, Hellma, Faktor zu 1 cm = 1,1429) bestimmt wurde.

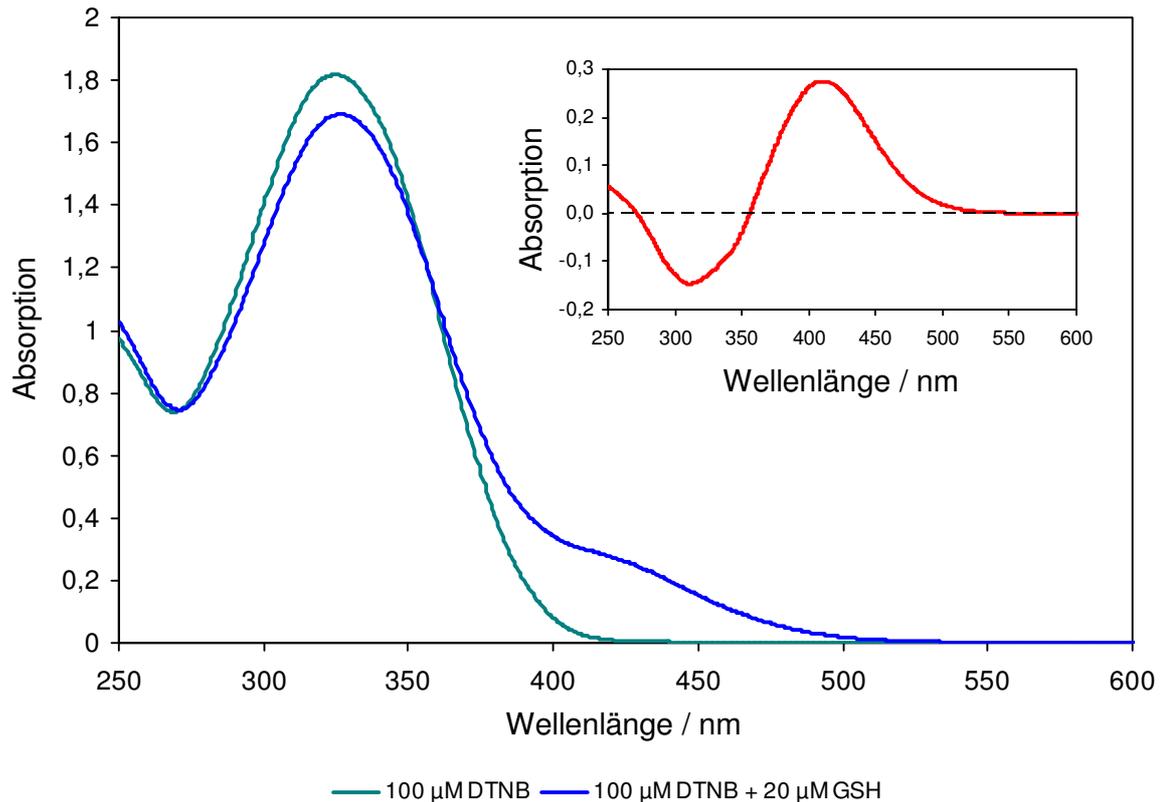


Abbildung 4-13: DTNB-Spektrum von vor und nach Zugabe von GSH

Die freien Thiolgruppen von GSH bilden sich in einer Absorptionzunahme bei 412 nm ab. Zur exakten SH-Konzentrationsbestimmung muss der Nullpunkt des Differenzspektrums bekannt sein. Dieser liegt bei 356 nm und wurde mit einer Tandemküvette bestimmt. Weitere Parameter: 100 μM DTNB, 20 μM GSH, T = 37 °C, 20 mM Phosphatpuffer pH 7.

Um abzuklären, ob das Reduktionsmittel GSH in ausreichendem Maße in den Vesikeln eingeschlossen bleibt, wurde untersucht, ob über einen Zeitraum von 4 h ein merklicher Austrag des Reduktionsmittels erfolgt. Hierzu wurden POPE/POPG- und POPC/Chol-Vesikel nach dem Kapitel 3.2.8 beschriebenen Verfahren hergestellt, die 10 mM GSH enthielten. Um die jeweils in den Vesikeln vorhandene GSH-Konzentration ermitteln zu können, enthielten diese Vesikel 10 μM Calcein zur Bestimmung des inneren Volumens.

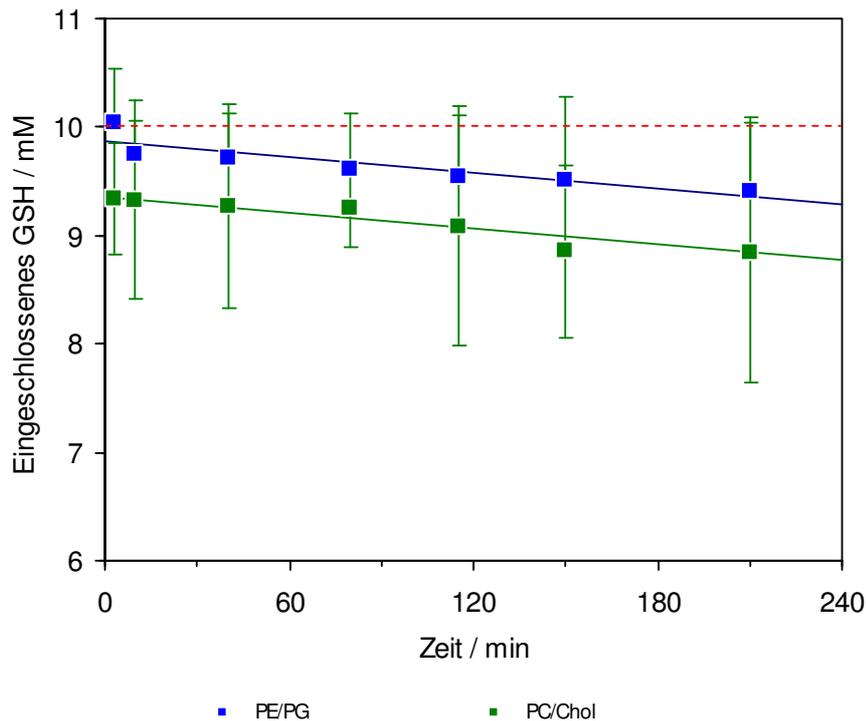


Abbildung 4-14: GSH-Konzentration in den Vesikeln im zeitlichen Verlauf

GSH bleibt hinreichend lange in POPE/POPG 70/30- und in POPC/Chol 70/30-Vesikeln eingeschlossen. GSH enthaltende Vesikel werden gewaschen; unmittelbar danach sowie wiederholt im Verlauf bis 3 h wird, nach erneutem Waschen, das bis dahin in den Vesikeln verbliebene GSH detektiert. Nach 3 h befinden sich noch über 90 % der anfänglichen GSH-Konzentration in den Vesikeln. Weitere Parameter: T = 37 °C, physiologischer Phosphatpuffer pH 7, Als Fehler ist die Standardabweichung von je 2 Serien angegeben.

Wie aus Abbildung 4-14 ersichtlich wird, sind selbst nach 3 h noch 90 bis 95 % des GSH in den Vesikeln enthalten. Dies bedeutet, dass GSH während der geplanten Versuche in ausreichendem Maße in den Vesikeln eingeschlossen bleiben sollte.

Erste Versuche mit dem TAT-FQC und GSH-gefüllten Vesikeln wurden mit POPC/Chol 70/30- und POPE/POPG 70/30-Lipidmischungen bei einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis (P/L) von 1/100 durchgeführt und zeigten über einen Zeitraum von 2 h ein Ansteigen der Fluoreszenzintensität von 1 bis 2 %. Diese Werte wurden und werden auch in den folgenden Messungen immer bezogen auf die jeweilige Fluoreszenzintensität, welche nach der Zugabe von 5 mM GSH erhalten wurde und den maximal möglichen Wert nach kompletter TAT-FQC-Reduktion darstellt.

Ob die beobachtete Erhöhung der Fluoreszenzintensität tatsächlich auf transloziertes TAT-FQC zurückzuführen ist oder durch zum Teil ausfließendes GSH verursacht wird, konnte durch die folgende Versuchsreihe ermittelt werden: Vesikel wurden mit unterschiedlich hohen GSH-Konzentrationen beladen. Nun müsste bei gleicher Vesikelmenge und gleicher

TAT-FQC-Zugabe – sofern TAT-FQC transloziert – stets die gleiche Änderung der Fluoreszenzintensität auftreten. Fließt jedoch im Verlauf des Versuches GSH aus den Vesikeln aus und verursacht außerhalb der Vesikel eine partielle Reduktion des TAT-FQC, so müssten – je nach vorgelegter GSH-Konzentration innerhalb der Vesikel – unterschiedlich ausgeprägte Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten erfolgen.

Es wurden POPC/Chol- und POPE/POPG-Vesikel mit unterschiedlichen GSH-Konzentrationen (1, 5, 10 und 50 mM) beladen. Die Vesikel wurden in einer Lipidkonzentration von 500 μM vorgelegt, und die Änderung der Fluoreszenz wurde bei 37 °C nach Zugabe von 5 μM TAT-FQC (= P/L 1/100) über einen Zeitraum von 2 h verfolgt.

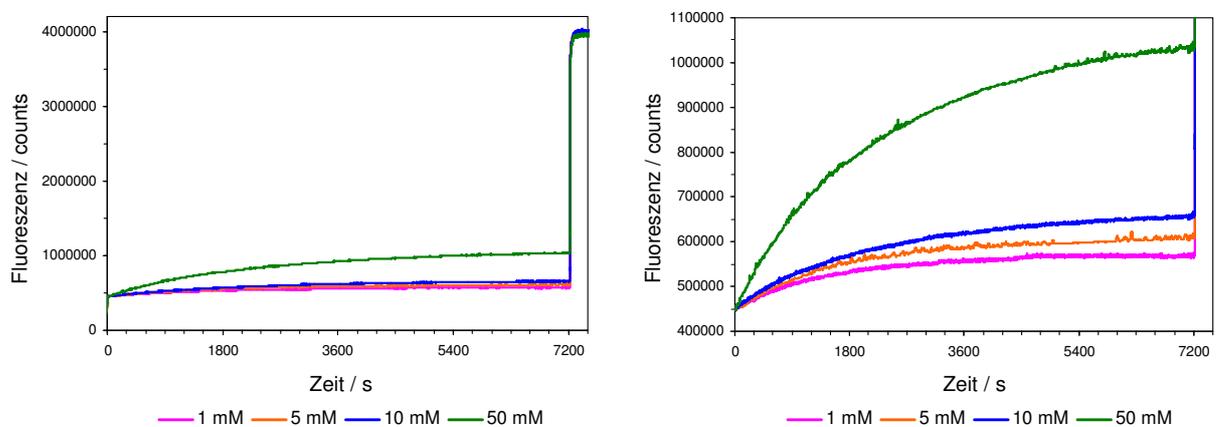


Abbildung 4-15: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitätszunahme nach der Zugabe von TAT-FQC zu PC/Chol-Vesikeln

Verschiedene GSH-Konzentrationen in PC/Chol-Vesikeln (1 bis 50 mM) führen nach der Zugabe von TAT-FQC (P/L 1/100) zu unterschiedlich starker Zunahme des Fluoreszenzsignals. Dies ist im linken und rechten Diagramm mit unterschiedlicher Skalierung der Ordinate dargestellt. Die insgesamt erreichbare Fluoreszenzintensität wurde nach 2 h durch die Zugabe von 5 mM GSH erhalten (links), welches das gesamte TAT-FQC innerhalb einiger Sekunden reduziert. Weitere Parameter: T = 37 °C, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

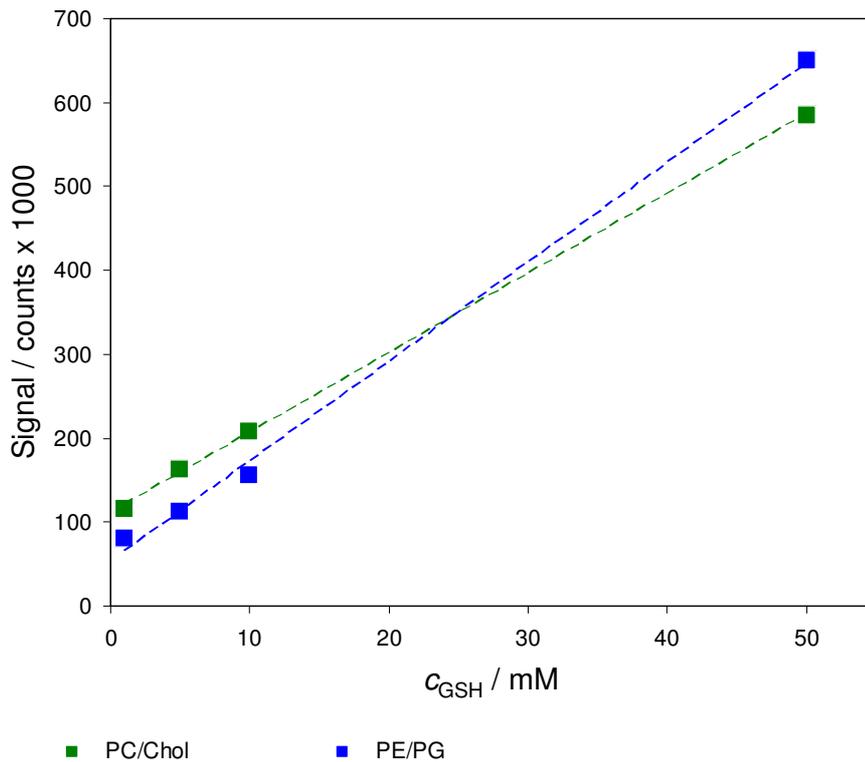


Abbildung 4-16: GSH-Leakage bei POPC/Chol- und POPE/POPG-Vesikeln

Nach 2 h erfolgter Anstieg der Fluoreszenz der mit unterschiedlichen Konzentrationen an GSH gefüllten Vesikel nach Zugabe von $5 \mu\text{M}$ TAT-FQC.

Wie in Abbildung 4-15 deutlich zu erkennen ist, steigt die Fluoreszenz nach TAT-FQC-Zugabe abhängig von der in den Vesikeln befindlichen GSH-Konzentration an. Das nach 2 h jeweils erreichte Plateau ist in Abbildung 4-16 dargestellt.

Der erhaltene lineare Zusammenhang ist ein deutlicher Hinweis auf ein durch TAT verursachtes, zumindest teilweises Ausfließen von GSH aus den Vesikeln. Somit sind für die weiteren Versuche zwei Voraussetzungen zu erfüllen: Zum einen muss der GSH-Verlust deutlich vermindert bzw. idealerweise komplett unterbunden werden, was durch Koppeln von GSH an ein hydrophiles Makromolekül möglich sein sollte. Um die Versuche unter Bedingungen durchführen zu können, bei denen eine Störung oder Schädigung der Membran nicht auftritt oder zumindest teilweise toleriert werden kann, muss zum anderen das Ausmaß der durch TAT erfolgenden Membranstörung und das damit verbundene Ausfließen des Reduktionsmittels quantifiziert werden. Daher wird im folgenden Kapitel der Einfluss von membranaktiven Peptiden auf die Stabilität von Lipidmembranen umfassend untersucht. Dies erfolgt mit sogenannten Leakage-Experimenten, die einen Eindruck vermitteln, ob oder wie ausgeprägt und in welchem Zeitbereich niedermolekulare

Substanzen nach Peptideinwirkung die Membran passieren können. In Kapitel 4.5.1 wird dann die Kopplung des Reduktionsmittels GSH an einen makromolekularen Träger beschrieben und die daran anschließenden Experimente mit TAT-FQC und Vesikeln behandelt.

4.2.2 Diskussion

In diesem Kapitel wurden grundlegende Voraussetzungen erarbeitet, um Translokationsversuche an Lipidvesikeln mit dem geplanten, möglichst vielseitig einsetzbaren Reportersystem (das Fluorophor-Quencher-Konstrukt mit CPP) durchführen zu können. Ausgehend von der Synthese und der Charakterisierung des TAT-FQC, die im Kapitel 3.2.3.2 beschrieben sind, wurden die spektralen Eigenschaften des Moleküls und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten untersucht.

Da das Absorptionsspektrum des Quenchers n-Tyr mit dem Fluoreszenzspektrum des Fluorophors Abz in geradezu idealer Weise überlappt, stellen die zwei Chromophore ein ausgesprochen gutes FRET-Paar dar. Dies zeigt sich an der etwa 8-fachen Zunahme des Fluoreszenzsignals nach erfolgter Reduktion. Ein weiterer Vorteil des synthetisierten Konstrukts liegt in seiner geringen Größe.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze von Abz bei unter 1 nM liegt. Dies sollte mehr als ausreichend sein, da eine Abschätzung der erwarteten Konzentrationen in späteren Versuchen bei einem P/L von 1/50 eine zu detektierende Abz-Konzentration von etwa 10 nM ergibt.

Als weitere Voraussetzung zur Untersuchung des Translokationsverhalten membranaktiver Peptide an Lipidvesikeln wurde ein schnelles und sehr effizientes Verfahren entwickelt, welches es gestattet, innerhalb von 2 min einen Farbstoff oder Reduktionsmittel enthaltenden Präparationspuffer quantitativ gegen den für die Experimente erforderlichen Puffer auszutauschen. Durchgeführt wurde die Abtrennung der Vesikel von Farbstoffen oder vom Reduktionsmittel mit Hilfe eines größenausschlusschromatographischen Verfahrens, das sogenannte Spin Columns verwendet. Diese waren befüllt mit den Säulenmaterialien Sephacryl 100-HR zur Abtrennung niedermolekularer Farbstoffe oder Sephacryl 500-HR zur Abtrennung von Dextran(en) bis zu einer Molmasse von 70 kDa. Die Vesikel befinden sich hauptsächlich immer im ersten Eluat, wobei bei Sephacryl 100-HR ca. 85 % und bei Sephacryl 500-HR ca. 33 % wiedergefunden werden. Niedermolekulare Substanzen werden mit Sephacryl 100-HR auf 10^{-4} angereichert, und 70 kDa Dextrane werden bei Sephacryl 500-HR auf 10^{-3} reduziert.

In ersten Versuchen wurde nach der Präparation GSH-gefüllter und über die Spin Columns umgepufferter Vesikel über einen Zeitraum von 4 h die Konzentration des in den Vesikeln verbliebenen GSH bestimmt, wobei selbst nach 3 h noch 90 bis 95 % des ursprünglich eingesetzten GSH in den Vesikeln gefunden wurden; ein Wert, der für die weiteren Versuche zunächst als ausreichend erachtet wurde. Wie aber weiter festgestellt werden musste, lässt das nach Zugabe von TAT-FQC erhaltene Fluoreszenzsignal auf zumindest partiell ausfließendes GSH schließen. Dieses Signal würde eine ggf. erfolgende Translokation des CPP in die Vesikel nicht unterscheidbar überlagern.

Somit sind weitere Experimente mit Vesikeln an zwei Voraussetzungen gebunden: Zum einen müssen die bei der Interaktion von Peptiden an Lipidmembranen ggf. auftretenden Einflüsse auf die Stabilität der Membran bekannt sein und/oder zumindest in einem tolerierbaren Ausmaß erfolgen. Dies wird durch Leakage-Experimente untersucht und evaluiert, wie sie im folgenden Kapitel umfassend dargestellt sind. Der englische Ausdruck „Leakage“ wird im weiteren Verlauf ausschließlich verwendet, da er prägnant den Verlust oder das Ausfließen von Inhaltsstoffen aus einem abgeschlossenen Kompartiment – hier Lipidvesikel – bezeichnet. Zum anderen besteht die Notwendigkeit, das Reduktionsmittel so in die Vesikel einzuschließen, dass es trotz einer Membranschädigung in moderatem Ausmaß in den Vesikeln verbleibt. Hier bietet sich an, GSH kovalent an ein polares Makromolekül wie Dextran zu koppeln, so dass allein durch dessen Molekülgröße ein Ausfluss deutlich erschwert wenn nicht unterbunden wird. Die Synthese von dextrangebundenem GSH und dessen Charakterisierung wird im Kapitel 4.5 wieder aufgegriffen. Weiterhin sind dort die mit dieser Verbindung durchgeführten Versuche zum stabilen Einschluss in Vesikel und zur Translokation von TAT-FQC beschrieben.

4.3 Leakage-Experimente mit membranaktiven Peptiden

Die Kenntnis, in welchem Ausmaß membranaktive Peptide eine Störung der Membranintegrität bewirken, ist von konkretem praktischem Nutzen. Beispielsweise wird ein in erheblichem Maße Leakage verursachendes Peptid als Transporter nicht geeignet sein, könnte sich aber als ein sehr wirkungsvolles antimikrobielles Peptid erweisen. So werden Leakage-Experimente als Ausgangsbasis zur Beurteilung der Wirkung membranaktiver Peptide hilfreich sein, da mit ihnen Einschätzungen bezüglich der Anwendungsmöglichkeiten eines bestimmten Peptids vorgenommen werden können [58].

Auch bei künstlichen Systemen wie synthetischen Lipidvesikeln werden Leakage-Experimente Informationen liefern, die konkrete Aussagen zur Vesikelintegrität während des Versuchs zulassen und beispielsweise Konzentrationsbereiche aufzeigen, in denen das Peptid sinnvoller Weise eingesetzt werden kann. Ein deutlicher Vorteil bei der Verwendung von Vesikeln ist die Möglichkeit, Lipidkomponenten zu variieren und dadurch verschiedene Membranen, z. B. prokaryotische oder eukaryotische, zu simulieren. Dabei können Peptide vergleichend evaluiert werden, um beispielsweise Hinweise auf Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Auswirkung von Schlüsselmotiven in der Primärstruktur zu erhalten.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte insbesondere die membranstörende bzw. Leakage verursachende Wirkung des CPP TAT geklärt werden, um dessen Verwendung im bereits beschriebenen, auf dem FQC basierenden Translokations-Assay zu evaluieren.

Durchgeführt wurden die Leakage-Experimente außer TAT mit 20 weiteren membranaktiven Peptiden, wobei ein etablierter Fluoreszenz-Assay an Vesikeln mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung eingesetzt wurde.

4.3.1 Ergebnisse

Peptidsynthese

Die Peptide wurden im Peptidsyntheselabor von Dr. Parvesh Wadhvani mit Unterstützung von Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck an einem automatisierten Peptidsynthesizer 433A von Applied Biosystems hergestellt (siehe Kapitel 3.2.3.1). Von den untersuchten 21 Peptiden sind elf der Gruppe der AMPs zuzuordnen. Im Einzelnen sind dies Alamethicin, Melittin, MSI-103, PGLa, Magainin 2, BP100, Temporin A, Temporin L, Temporin B, Gramicidin S und KI3. Neun Peptide gehören zur Gruppe der CPPs (MAP, Transportan, TP10, Penetratin, R8, SAP, TAT, Pep1, PKA), und FP23 wurde als Stellvertreter der fusogenen Peptide verwendet.

Während der Experimente wurden die Peptide in gelöster Form aus einer Stammlösung der Konzentration von 1 mg/ml zupipettiert. Bei allen Peptiden (außer bei Alamethicin) wurde als Lösungsmittel H₂O bidest. verwendet; Alamethicin wurde in Tetrafluorethylen (TFE) gelöst. Um Aggregationsbildung bei SAP und PKA auszuschließen, wurden diese Peptide außer in H₂O bidest. auch in Tetrafluorethylen (TFE) gelöst und zugegeben. Dabei konnte allerdings kein verändertes Leakage beobachtet werden.

Vesikelpräparation für Leakage- und Synergie-Experimente

Nach dem in Kapitel 3.2.8 beschriebenen Verfahren wurden Lipidmischungen mit einer Konzentration von 30 mg/ml in Phosphatpuffer hergestellt. Diese Suspensionen wurden je mit 5 Teilen 1,2 x isotonem Puffer gemischt, der den Fluorophor 8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) und den Quencher p-Xylen-bis-pyridiniumbromid (DPX) enthielt. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen wurde extrudiert. Somit wurden Vesikel mit einer Lipidkonzentration von 5 mg/ml in isotonem ANTS/DPX-haltigem Phosphatpuffer erhalten.

Waschen der Vesikel

Je 65 µl einer 5 mg/ml Vesikelsuspension wurden mittels einer 0,5 ml Spin Column mit Sephacryl 100-HR gewaschen; davon wurden 60 µl gewaschene Vesikel je Versuch verwendet. Diese wurden zu Phosphatpuffer in eine Quarzglasküvette gegeben, deren Gesamtvolumen (Vesikel, Puffer, Peptide) 1,5 ml betrug. Näheres zur Methodik des größenausschlusschromatographischen Entfernens des außerhalb der Vesikel verbliebenen Farbstoffes kann dem Kapitel 3.2.7.2 entnommen werden. Durch die in Kapitel 4.2 experimentell festgestellte Effektivität des Wasch-Schrittes kann bei diesem Verfahren von einem annähernd kompletten Pufferaustausch ($\geq 99,99\%$ Farbstoffentfernung) ausgegangen werden.

Überlegungen zur Verdünnung der Vesikel in der Küvette

Bei einem Probenvolumen von gewaschenen Vesikeln im Puffer (V_{Probe}) von 60 µl und einem Gesamtvolumen (V_{G}) von 1500 µl ergibt sich bei einer ANTS-Konzentration innerhalb der Vesikel ($c_{\text{ANTS}}^{\text{i}}$) von 12,5 mM eine ANTS-Konzentration in der Küvette außerhalb der Vesikel ($c_{\text{ANTS}}^{\text{a}}$) von 50 nM (Anhang C-D). Das Gesamtvolumen der Vesikel ($\sum V_{\text{Vesikel}}$) betrug zwischen 0,4 und 0,6 µl. Somit ergab sich bei einem totalen Austritt des eingeschlossenen ANTS eine Änderung der ANTS-Außenkonzentration auf 4,2 µM (Anhang C-E). Die ursprünglich außerhalb der Vesikel befindliche ANTS-Konzentration ($c_{\text{ANTS}}^{\text{a}}$) trägt damit etwa

nur zu etwa 1 % zu der Konzentration bei, die nach einem totalen Austritt des in den Vesikeln zuvor eingeschlossenen ANTS ($c_{\text{ANTS}}^{\text{K}}$) vorliegt (Anhang C-F).

Durchführung der Messungen

Die Leakage-Experimente wurden wie bei Ellens et al. [59] beschrieben durchgeführt. Dabei wurde das Entquenchen des Fluorophors ANTS verfolgt, das durch den Ausfluss (= Verdünnung ins Außenvolumen) des in die Vesikel eingeschlossenen Fluorophor/Quencher-Paars ANTS/DPX zustande kam (siehe Abbildung 4-17). 60 μl gewaschene Vesikel, die beide Farbstoffe in gequenchter Konzentration enthielten und wie oben beschrieben präpariert waren, wurden in ANTS/DPX-freien iso-osmolaren Puffer gegeben, und die peptidinduzierten Änderungen der Fluoreszenz wurden am Spektrofluorimetersystem (FluoroMax-2[®]) verfolgt. Hierbei lag die Excitationswellenlänge bei 422 nm (6 mm Spaltbreite) und die Emissionswellenlänge bei 515 nm (6 mm Spaltbreite). Um Streu-Artefakte zu vermeiden, wurde dem Emissionsmonochromator ein optisches Kantenfilter (GG495, 2mm Dicke, Schott, Mainz) vorangestellt.

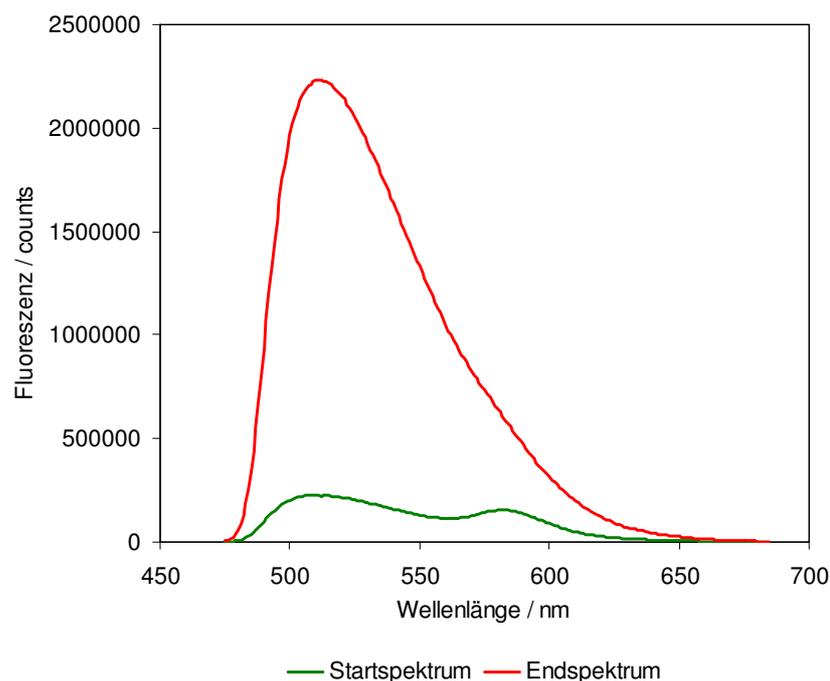


Abbildung 4-17: Fluoreszenzspektrum von ANTS gequencht mit DPX und entquencht

Das ANTS-Fluoreszenzspektrum (rote Kurve) zeigt bei 515 nm ein Emissionsmaximum. Durch den Quencher DPX vermindert sich die ANTS-Fluoreszenz um etwa den Faktor 8 (grüne Kurve). Das in gequenchem Spektrum erkennbare zweite Maximum im Bereich von 580 nm kommt durch das dem Lipid beigemischte Rhodamin-PE zustande. Weitere Parameter: $T = 37^\circ\text{C}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

Die Lipidkonzentration in den Experimenten ist aufgrund von Lipidverlusten bei der Vesikelpräparation und beim Pufferaustausch Schwankungen im Bereich von 20 bis 30 % unterworfen. Um die Peptide im möglichst exakten P/L zugeben zu können, sollte jedoch die in der Messküvette tatsächlich vorliegende Lipidkonzentration bekannt sein. Diese wurde über die Messung der Rhodamin-Fluoreszenz relativ bestimmt, indem die jeweils vorliegende Rhodamin-Fluoreszenz ins Verhältnis zur Fluoreszenz der Ausgangs-Lipidmischung gesetzt wurde. Die relative Konzentration konnte auf diese Weise auf 1 % genau bestimmt werden.

Dem Fluoreszenzemissionspektrum der Vesikel ist ein relatives Maximum bei etwa 515 nm zu entnehmen, das der weitgehend gequenchten Fluoreszenz von ANTS entspricht. Dieser initiale Amplitudenwert wird 0 % Leakage zugeordnet. Damit während der Experimente einheitliche Bedingungen vorliegen, wurde die Lipidkonzentration der gewaschenen Vesikel unter Berücksichtigung der später erfolgenden Peptidzugabe auf 200 μ M eingestellt. Während der Durchführung der Experimente werden die Proben fortlaufend gerührt und die Temperatur durch einen Thermostaten bei 37 °C konstant gehalten. Die Amplitude des 30 min nach Zugabe der Peptide gemessenen Anstiegs der Fluoreszenz wurde als relatives Maß des erfolgten Leakage definiert und wird bezogen auf die Fluoreszenzintensität, die nach Zugabe von 0,5 vol% Triton X-100 (was eine Zerstörung der Vesikel zur Folge hat und damit 100 % Leakage entspricht) erhalten wird (siehe Abbildung 4-18). Die Einflüsse der Triton-Zugabe auf die Fluoreszenzintensität wurden separat bestimmt und bei der Auswertung mit berücksichtigt.

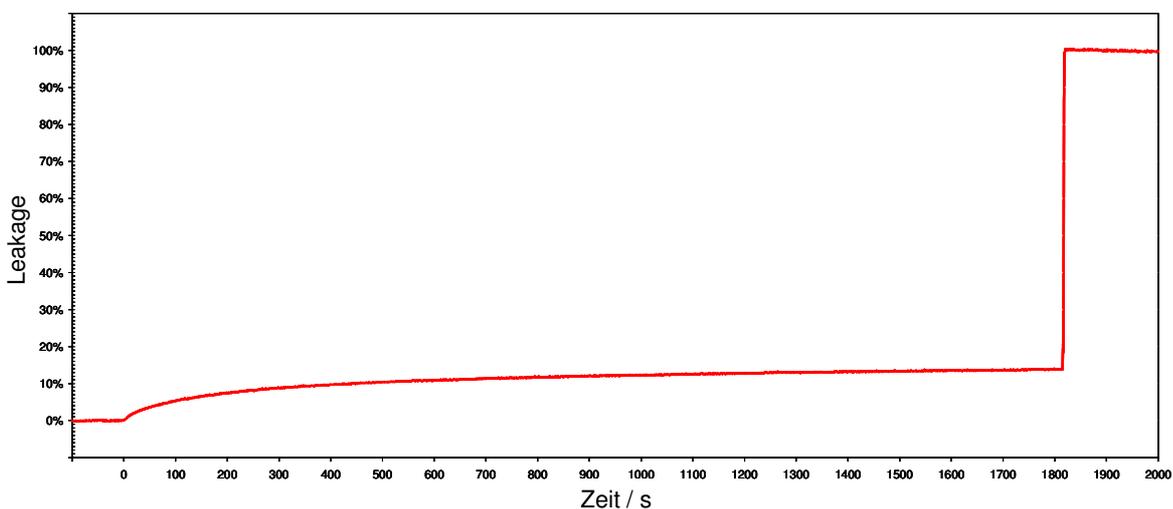


Abbildung 4-18 Zeitlicher Verlauf des durch MSI-103 verursachten Leakage

Beispielhaft für peptidverursachtes Leakage ist der zeitliche Verlauf der ANTS-Fluoreszenz nach Zugabe des AMP MSI 103 gezeigt. Das Signal steigt kontinuierlich an und erreicht nach etwa 30 min einen konstanten Plateauwert. Dieser Wert wird als relatives Maß des aufgetretenen Leakage definiert und wird bezogen auf den nach Zugabe von 0,5 vol% Triton X-100 erhaltenen Wert (= 100 %). Weitere Parameter: POPE/POPG 70/30, T = 37 °C, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4, $\lambda_{\text{Excitation}} = 363 \pm 3$ nm, $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \pm 3$ nm.

Die Abbildungen Abbildung 4-19 bis Abbildung 4-23 zeigen im Überblick die relativen Leakage-Werte an Vesikeln verschiedener Lipidzusammensetzungen. Dabei wurde zur Simulation prokaryotischer Membranen die Lipidmischung POPE/POPG im molaren Verhältnis von 70/30 gewählt. Da POPC und Chol nur in eukaryotischen Membranen vorkommen, werden über die Mischungen POPC und POPC/Chol 90/10 eukaryotische Membranen simuliert. Durch die Lipidmischung LM_{wbc} , welche aus den Lipiden POPC, POPE, POPS, SM und Chol im molaren Verhältnis 30/20/10/10/30 besteht, wird eine Leukozytenmembran simuliert [60]. POPC/POPG 70/30 zeigt im Vergleich mit POPE/POPG 70/30 den Unterschied zwischen POPE und POPC in Anwesenheit negativ geladener Lipide wie POPG an. Als Balkendiagramm dargestellt ist hierbei, wie oben dargelegt, die nach 30 min erreichte Amplitude der ANTS-Fluoreszenz bezogen auf den zugehörigen, nach Triton-Zugabe erhaltenen Maximalwert. Zu diesem Zeitpunkt war üblicherweise ein konstantes Plateau erreicht, und die Fluoreszenzwerte änderten sich nicht mehr wesentlich. Im linken Bereich der Diagramme sind die Werte der AMPs aufgetragen, auf der rechten Seite die der CPPs und ganz rechts die Werte des fusogenen Peptids FP23. Die hier gezeigten Messungen wurden alle mit einem P/L von 1/50 durchgeführt, bei dem in meisten Fällen ein totales Leakage nicht erfolgte. Nur bei Alamethicin, Melittin sowie bei einigen besonders aktiven CPPs war bei diesem P/L ein 100%iges Leakage aufgetreten. Zur Vollständigkeit sowie zur weitergehenden Information sind die bei P/L von 1/100 und 1/25 erhaltenen Leakage-Daten in Kapitel 7.2 (Anhang B) dargestellt.

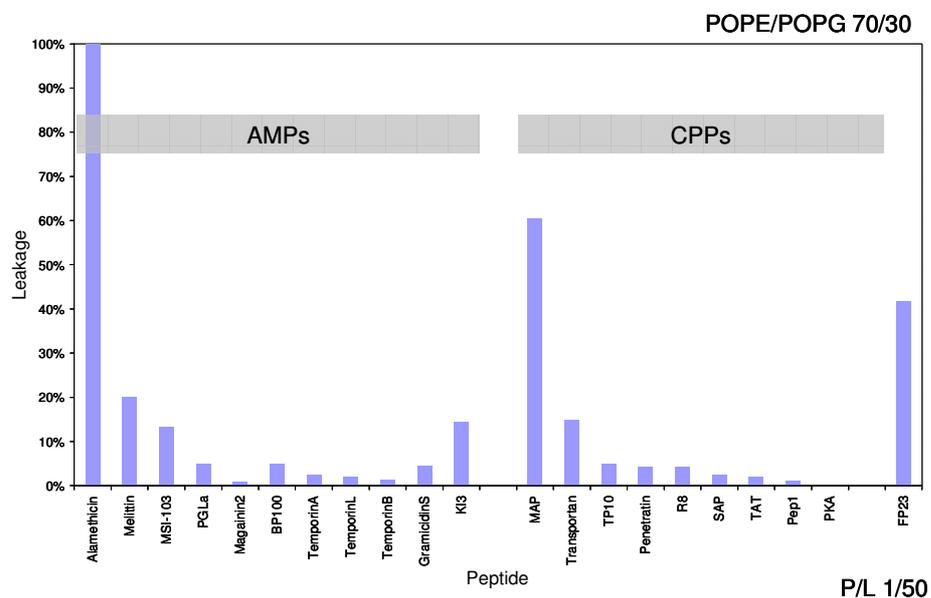


Abbildung 4-19: Peptidinduziertes Leakage bei POPE/POPG 70/30-Vesikeln

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/50. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{Peptid}} = 4\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

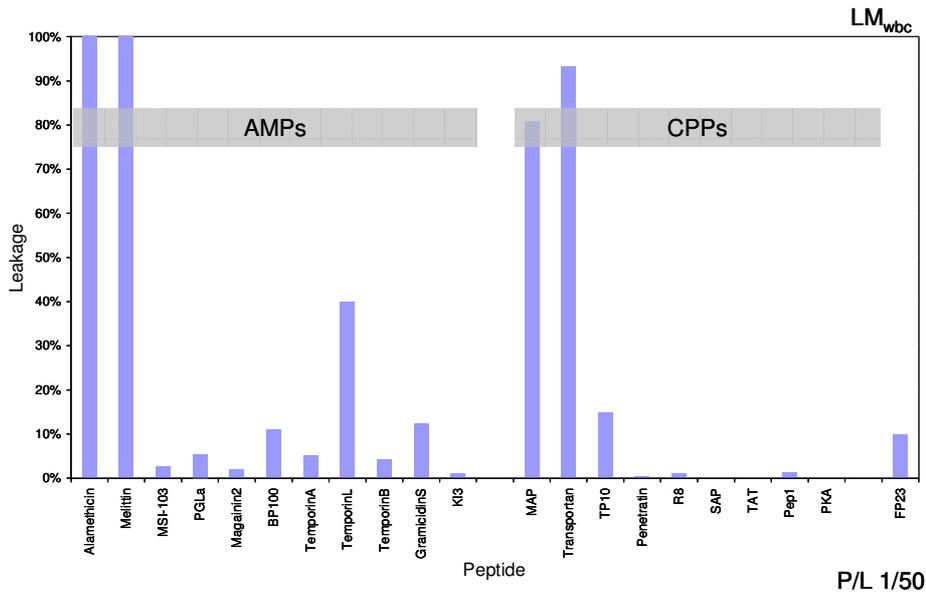


Abbildung 4-20: Peptidinduziertes Leakage bei LM_{wbc}-Vesikeln

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/50. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, c_{Lipid} = 200 µM, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

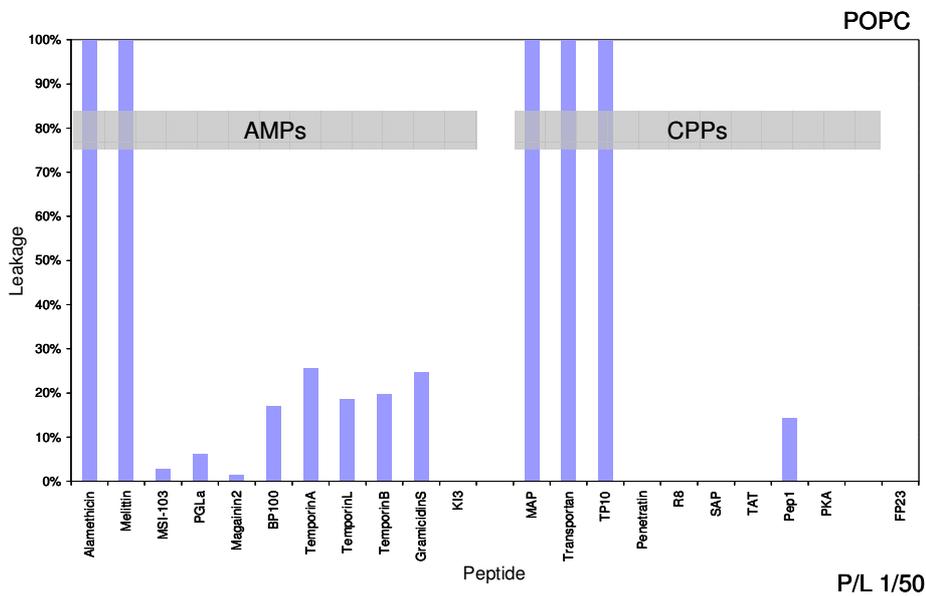


Abbildung 4-21: Peptidinduziertes Leakage bei POPC-Vesikeln

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/50. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, c_{Lipid} = 200 µM, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

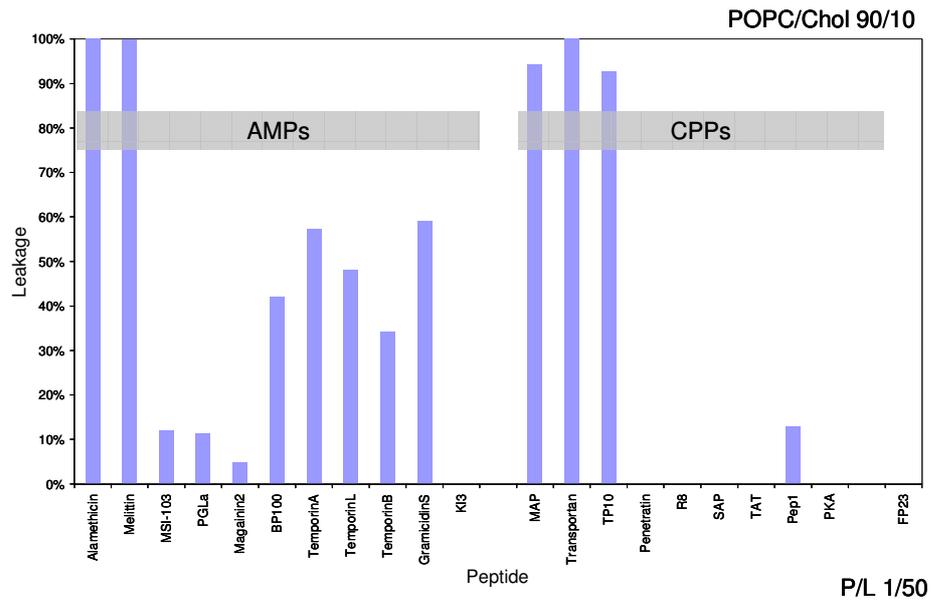


Abbildung 4-22: Peptidinduziertes Leakage bei POPC/Chol 90/10-Vesikeln

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/50. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, $c_{Lipid} = 200 \mu M$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

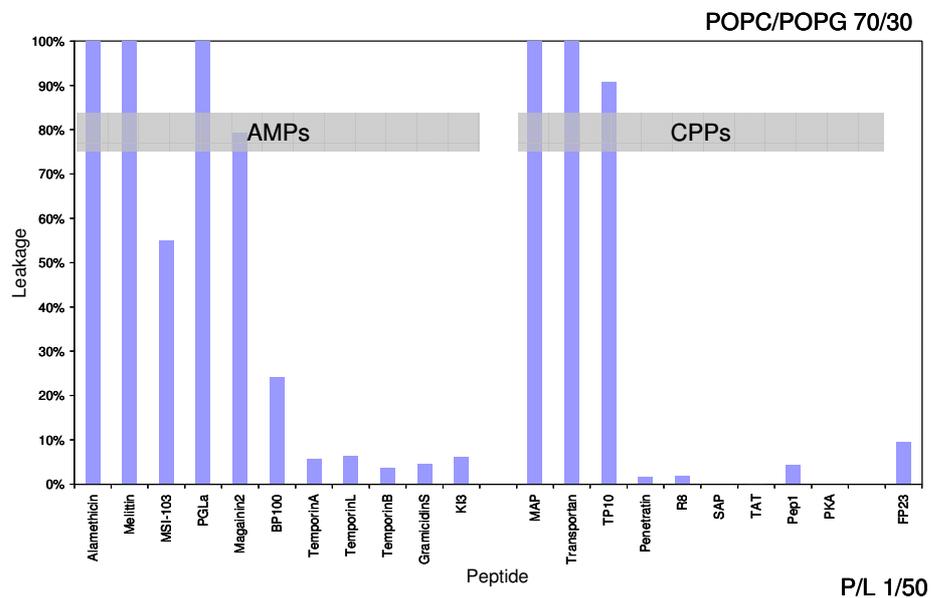


Abbildung 4-23: Peptidinduziertes Leakage bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/50. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, $c_{Lipid} = 200 \mu M$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

4.3.2 Diskussion

Für den Einsatz membranaktiver Peptide als Transportmoleküle oder als alternative Antibiotika ist die Kenntnis der durch sie verursachten Schädigung der Membran eine wichtige Voraussetzung, um auf der einen Seite AMPs mit hoher Effizienz und andererseits möglichst membranschonende CPPs an einem möglichst einfachen und damit sehr variablen Membransystem im Vergleich beurteilen zu können. In der Literatur finden sich bereits eine Vielzahl von Leakage-Experimenten mit membranaktiven Peptiden an Lipidvesikeln, welche jedoch zumeist auf nur ein oder einige wenige Peptide ausgerichtet sind [4, 61, 62, 63, 64, 65]. Daher ist die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung aufgrund der Bandbreite der getesteten Peptide und Lipidmischungen von besonderem Wert. Gerade im Vergleich ist schließlich die Beurteilung der membranstörenden Wirkung der Peptide besonders aussagekräftig, da sich die membranstörende Wirkung der Peptide nicht anhand einer einzigen chemischen oder physikalischen Eigenschaft beurteilen lassen. So kann keine eindeutige Abhängigkeit von der Ladung, der Hydrophobizität oder von der Sekundärstruktur gefunden werden. TAT beispielsweise hat eine positive Ladung von +8 und zeigt deutlich geringere Leakage verursachende Wirkung an negativ geladenen Lipidmembranen als PGLa mit einer positiven Ladung von +5. Hingegen zeigt MAP mit einer Ladung von +6 deutlich stärkeres Leakage bei allen Lipidmembranen als PGLa.

Ähnliches gilt für das hydrophobische Dipolmoment, dessen Werte für PGLa bei 0,411, für MAP bei 0,525 und für MSI-103 bei 0,631 liegen [66]. Auch in diesem Fall behält MAP die stärkste Leakage verursachende Wirkung.

Auch die Sekundärstruktur der Peptide zeigt keinen direkten Zusammenhang mit deren Leakage verursachender Wirkung wie der Vergleich zwischen dem ringförmigen Gramicidin S, dem KI3 mit einer β -Faltblatt-Struktur und dem Peptid PGLa mit einer α -Helix zeigt.

Vielmehr scheint das Ausmaß von Leakage durch unterschiedlich wechselwirkende Faktoren bestimmt und mehr als die Summe der Einzelparameter zu sein. Im Folgenden werden die bei den jeweiligen Peptiden und Lipidmischungen gemachten Beobachtungen diskutiert.

AMPs

Alamethicin [67] ist ein Peptidantibiotikum des Pilzes *Trichoderma Viride*. Es besteht aus zwanzig Aminosäuren, unter denen auch die nichtproteinogenen Aminosäuren 2-Aminoisobuttersäure und Phenylalaninol sind. Durch Ausbildung einer α -Helix erhält das Peptid amphipathischen Charakter. Die Länge eines solchen α -helikalen Alamethicinmonomers liegt bei 3,2 nm, der Durchmesser bei 1,1 nm. Im Kontakt mit

Membranen bildet sich bei ausreichender Alamethicin-Konzentration eine verhältnismäßig langlebige Pore mit einem Außendurchmesser von etwa 2 nm; an ihr sind üblicherweise 8 Alamethicinmonomere beteiligt [68]. Bei niedrigen Alamethicin-Konzentrationen können kurzlebige Poren auftreten, die sich dann aus 5 bis 10 Monomeren zusammensetzen [69, 70]. Über Röntgenbeugungsanalysen konnten deutliche Hinweise auf die Bildung der Alamethicinpore nach dem Fasdaubenmodell gefunden werden [68].

Alamethicin entfaltet seine cytotoxische Wirkung durch die Bildung von Transmembranporen. In den durchgeführten Leakage-Experimenten wurde daher durch die Zugabe von Alamethicin zu den Vesikeln in allen Fällen ein maximales Leakage von 100 % beobachtet. Dies war bei allen getesteten Lipidmischungen, selbst bei einem niedrigen P/L von 1/100 zu beobachten (siehe Anhang B).

Weiteres Differenzieren der membranstörenden Wirkung von Alamethicin in Abhängigkeit der verwendeten Lipidmischung oder dem P/L ist also mit den vorliegenden Messdaten nicht möglich. Stattdessen hat dieses Peptid bei den durchgeführten Messungen die Rolle einer Positivprobe.

Melittin [71] ist mit 50 bis 70 % der Hauptbestandteil im Bienengift und hat stark zelllyisierende Wirkung. Es ist ein kationisches Peptid aus 26 Aminosäuren. Zwar befindet sich vom N-Terminus aus gesehen nur eine polare As unter den ersten 20 As, jedoch sind die 6 As am C-Terminus polar. [72] Somit ergibt sich allein aus der Primärstruktur ein stark amphiphiler Charakter. Im Kontakt zu Membranen nimmt Melittin aufgrund eines Prolins eine leicht abgewinkelte α -helikale Sekundärstruktur an [73]. Über die Anordnung mehrerer derartiger Melittinmonomere bildet sich eine transmembrane Pore, die sich nach dem Toroidalmodell bildet und sich so von der von Alamethicin gebildeten Pore unterscheidet.

Melittin verursachte bei Vesikeln aller getesteten Lipidmischungen deutliche Membranstörungen. Bei einem P/L von 1/100 hob es sich allerdings von der Wirkung von Alamethicin ab. Gerade bei Lipidmischungen, die negative Nettoladungen tragen – POPE/POPG (ca. 10 %) und POPC/POPG (ca. 40 %) – ist die Leakage verursachende Wirkung herabgesetzt. Interessant ist, dass die Lipidmischung POPE/POPG, die als Modell für prokaryotische Membranen gesehen werden kann, die Behandlung mit Melittin im Vergleich zu den anderen getesteten Lipidmischungen mit etwa 10 % relativ unbeschadet übersteht. Dagegen ist bei der Leukozyten simulierenden Mischung LM_{wbc} mit 80 % ein doch recht erhebliches Leakage zu beobachten. Dies ist aus entwicklungsbiologischer Sicht möglicherweise dadurch zu erklären, dass Bienen ihr Gift in erster Linie gegen eukaryotische Organismen einsetzen und die antibakterielle Wirkung dabei vernachlässigt werden kann. Eine verstärkte Wirkung bei negativ geladenen Lipidmischungen ist deshalb nicht zu

erwarten. Bei Vesikeln aus zwitterionischem POPC wurde nach Zugabe von Melittin selbst bei einem P/L von 1/100 ein 100%iges Leakage beobachtet. Durch die Zugabe von 10 mol% Cholesterin zu POPC war bei demselben P/L von 1/100 keine Abschwächung des verursachten Leakage zu erkennen. Auch diese Beobachtung würde für eine verstärkte Wirksamkeit von Melittin gegenüber zwitterionischen eukaryotischen Membranen sprechen.

Magainin 2, PGLa und MSI-103

MSI-103 [74] ist ein PGLa-Analog mit stärkerer antimikrobieller Wirkung als PGLa [74, 65]. Wie PGLa bildet das 21 As lange Peptid bei Kontakt mit Membranen eine α -Helix aus, die durch einseitige Anordnung kationischer Peptidseitenketten amphipathischen Charakter erhält. In wässriger Lösung hat MSI-103 wie z. B. auch PGLa oder MAP dagegen eine ungeordnete Struktur [66]. Bei **PGLa** [75] handelt es sich um ein 21 As langes Peptid. Es erhält seine positive Ladung durch vier Lysine. Am C-Terminus ist es amidiert. Bei Kontakt mit Biomembranen nimmt das amphipathische Peptid eine α -helikale Struktur an. Auf PGLa in Verbindung mit Magainin 2 wird in Kapitel 4.4 noch näher eingegangen.

Um PGLa und MSI-103 bezüglich ihrer Membranorientierung (Struktur und Dynamik als Funktion des Peptid-zu-Lipid-Verhältnisses) zu vergleichen, wurden die Orientierte Circular dichroismus-Spektroskopie (OCD), ^2H - und ^{19}F -Festkörper-Kernspinresonanz-Untersuchungen in DMPC-Doppelschichten mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt [76]. Im Folgenden wird Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance) mit NMR abgekürzt.

Die gegenüber PGLa erhöhte antimikrobielle Aktivität scheint mit der stärkeren Tendenz von MSI-103 zusammenzuhängen, in die Membran „einzutauchen“ und dabei antiparallele Homodimere auszubilden [76].

MSI-103 zeigte bei den getesteten Lipidmischungen – mit Ausnahme von POPC/POPG 70/30 – keine besonders ausgeprägte Leakage verursachende Wirkung. Im Gegensatz zu PGLa zeigte es bei POPC, POPC/Chol 90/10 und LM_{wbc} kaum Peptidkonzentrationsabhängige Wirkung. Nur bei den negativ geladenen Lipidmischungen POPE/POPG 70/30 und POPC/POPG 70/30 stieg das Leakage mit zunehmender Konzentration deutlich an. Verglichen mit PGLa zeigt MSI-103 eine höhere antimikrobielle Aktivität [77], und im Falle des POPE/POPG 70/30 bei P/L von 1/50 war ein höheres Leakage als bei PGLa zu beobachten.

Magainin 2 (Mag2) [78, 79] besteht aus 23 As und enthält vier Lysine und ein Histidin. Es nimmt im Kontakt mit Lipidmembranen α -helikale Struktur an und wird amphipathisch. Nach Matsuzaki [80] verläuft die Porenbildung nach dem Toroidalmodell. Die Leakage

verursachende Wirkung von Magainin 2 liegt bei allen durchgeführten Messungen deutlich unter den für das Peptid PGLa erhaltenen Werten. Beide Peptide wurden im gleichen Organismus, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*, entdeckt und zeigen dort als Synergisten verstärkte Wirkung. Im folgenden Kapitel 4.4 wird auf die Synergie zwischen Magainin 2 und PGLa detailliert eingegangen. Die Verhältnisse der bei PGLa erhaltenen Leakage-Werte zu den entsprechenden Werten bei Magainin 2 ergeben für die verschiedenen Lipidmischungen unterschiedliche Werte. Bei den Mischungen mit negativ geladenen Lipiden POPE/POPG (70/30) liegen diese bei $6,6 \pm 1,1$ bzw. bei POPC/POPG (70/30) bei $5,4 \pm 1,1$. Der Wert bei LM_{wbc} liegt dagegen bei $2,3 \pm 0,5$, bei POPC bei $5,6 \pm 2,9$ und der Wert von POPC/Chol (90/10) liegt bei $3,5 \pm 1,3$. Diese Werte lassen die verstärkte Wirkung von PGLa bei anionischen Lipidmischungen erkennen, wohingegen Magainin 2 weniger stark mit negativ geladenen Lipiden reagiert. Dies ist im Einklang mit einer elektrostatischen Wechselwirkung, da PGLa +5-Ladungen und Magainin 2 +4-Ladungen tragen. Auf Magainin 2 wie auf PGLa wird im folgenden Kapitel 4.4 im Rahmen der Untersuchungen zur Synergie noch weiter eingegangen werden.

Temporin A, Temporin B und Temporin L [81] wurden ursprünglich aus dem Hautsekret des Grasfrosches *Rana temporaria* isoliert. Sie gehören mit 13 As zu den kürzesten antibakteriellen Peptiden, die bislang in der Natur gefunden wurden. Alle Temporine tragen eine Amidgruppe am C-Terminus. Temporine bestehen aus überwiegend hydrophoben As. Im Kontakt mit Lipidmembranen gehen sie von dem in wässriger Phase vorliegenden ungeordneten Zustand in den Zustand einer kurzen, leicht amphiphilen α -Helix über. Über die Porenbildung durch Temporine ist wenig bekannt. Aufgrund ihrer geringen Länge aber wäre eine Porenbildung durch eine Anordnung von N-terminal verbundenen Homodimeren denkbar [81]. Hinsichtlich des Verhaltens an Modellmembranen wird in der Literatur diskutiert, dass Temporine im Unterschied zu vielen anderen AMPs sowohl zwitterionische als auch anionische Phospholipid-Doppelschichten permeieren können [Mangoni 2006 [82]]. Dabei erfolgt die Porenbildung eher nach dem in Kapitel 1.1 beschriebenen Teppich-Modell als durch die Bildung von Mizellen [82].

Die drei getesteten Temporine verhielten sich sehr ähnlich. Lediglich Temporin L verursachte bei LM_{wbc} (P/L 1/50, 1/25) deutlich stärkeres Leakage als Temporin A oder Temporin B. Möglicherweise ist dies ein Hinweis, dass Temporin L einen von Temporin A und B abweichenden Wirkmechanismus aufweist, wie auch von Mangoni [82] diskutiert wird. Bei zwitterionischen Lipidmischungen wurde durchweg ein stärkeres Leakage beobachtet, während bei anionischen Lipidmischungen die getesteten Temporine weniger Wirkung zeigten. Die Beimischung von Cholesterin führt eher zu verstärktem Leakage, was somit der

bekannt erhöhten Anfälligkeit prokaryotischer Membranen gegenüber Temporinen [82] entsprechen würde.

Gramicidin S [83, 84] ist ein von *Bacillus brevis* [85] nichtribosomal produziertes Decapeptid aus zwei zyklisch verbundenen antiparallelen β -Faltblättern, wobei beide Stränge durch zwei Typ II β -Schleifen verbunden sind [86, 87]. Es ist polykationisch und amphipatisch. ^{19}F -NMR- und ^{15}N -NMR-Strukturuntersuchungen zeigten, dass die membrandestabilisierende Wirkung von Gramicidin S unter anderem durch die Bildung einer oligomeren Pore nach dem Fassdaubenmodell zustande kommen kann [88]. Obwohl Gramicidin S als „klassisches“ AMP zu bezeichnen ist, war es erstaunlicherweise bei den meisten getesteten Lipidmischungen nur moderat aktiv. Das verursachte Leakage variierte bei einem P/L von 1/50 zwischen etwa 5 % bei POPE/POPG (70/30)- und POPC/POPG (70/30)-Vesikeln und 60 % bei POPC/Chol (90/10)-Vesikeln.

BP100 [89] ist eine amphiphile kurze, aus elf As bestehende α -Helix. Am C-Terminus trägt BP100 eine Amidgruppe. Es wurde ursprünglich als antimikrobielles Peptid gegen Pflanzenpathogene entwickelt und durch systematische Mutation des zellpenetrierenden Peptids Pep3 (ein Hybridpeptid aus Cecropin-A und Melittin) erhalten. Da die Penetration von BP100 über Latrunculin B effizient blockiert werden kann, scheint die Penetration z. B. in Tobacco BY-2-Zellen zumindest teilweise über einen endozytotischen Mechanismus abzulaufen [90]. Der Grad des durch BP100 verursachten Leakages liegt bei einem P/L von 1/50 bei maximal 42 % (POPC/Chol (90/10)).

K13 [62] ist ein antimikrobielles Peptid aus 18 As. Es bildet im Kontakt zu Lipiden eine β -Faltblatt-Struktur mit starker amphipathischer Eigenschaft aus. K13 besitzt sechs Lysine. Jin et al. [62] verwendeten einen Fluoreszenz-Assay, um K13-induziertes Leakage in LUVs aus POPC, POPG, POPC/POPG 4:1 und POPE/POPG 4:1 miteinander zu vergleichen. Dabei zeigte sich besonders bei Zugabe negativ geladener Lipide wie POPG ein Leakage-Effekt.

Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen überein. So zeigte sich K13 bei neutralen Membranen annähernd wirkungslos und hatte bei Lipidmischungen wie POPE/POPG 70/30, durch die prokaryotische Membranen simuliert wurden, seinen stärksten Effekt mit knapp 40 % Leakage bei einem P/L von 1/25 (siehe Anhang B). Auch bei POPC/POPG 70/30 war ein Effekt von etwa 10 % zu beobachten. Auch Jin et al. berichten von einem stärkeren Effekt bei POPE/POPG gegenüber POPC/POPG sowie von Inaktivität bei POPC.

CPPs

Die getesteten zellpenetrierenden Peptide können nach ihren kationischen Aminosäureresten grob in zwei Gruppen eingeteilt werden, deren Leakage-Verhalten sich deutlich unterscheidet. Eine Gruppe wird durch die argininfreien, aber lysinreichen Peptide MAP, Transportan, TP10 und PKA gebildet, und mit Ausnahme von PKA zeigten die Peptide dieser Gruppe starkes Leakage. Nur mit PKA, das lediglich zwei kationische As enthält, konnte in keinem der Versuche Leakage beobachtet werden. Es eignet sich aus diesem Grund eventuell als Negativkontrolle bei Leakage-Experimenten. Die zweite Gruppe wird durch argininhaltige Primärsequenzen gebildet, wozu die Peptide Penetratin, TAT, R8 und SAP zählen.

Argininfreie CPPs

Die Leakage-Experimente wurden an vier argininfreien CPPs durchgeführt. Diese waren **MAP** (engl.: model amphipathic peptide) [91], **Transportan** [16], **TP10** [92] und **PKA** [93]. **MAP** ist ein α -helikales amphipathisches 18 As langes Peptid, das bei allen getesteten Lipidmischungen stark Leakage verursachende Wirkung zeigte. Bei **Transportan** [16] handelt es sich um ein 27 As langes chimeres Peptid. Die ersten zwölf As entsprechen dem N-terminalen Teil des Neuropeptids Galanin. Daran wurden über ein Lysin weitere 14 As angehängt, die dem Wespengift Mastoparan entsprechen. Somit ergibt sich die Struktur einer leicht abgeknickten Helix [94]. **TP10** [92] besteht aus 21 As und ist ebenfalls vom Wespengiftwirkstoff Mastoparan abgeleitet. Dabei wurde ein 14 As langes Peptid von Wespengift (*Vespula lexisii*) durch ein extra Lysin an eine 6 As-Sequenz des Neuropeptids Galanin verbunden.

Auffällig bei MAP, Transportan und TP10 war die durchweg sehr starke Leakage verursachende Wirkung. Abgeschwächte Wirkung bei zwitterionischen Lipidmischungen wie POPC und POPC/Chol (90/10) konnte nicht beobachtet werden. Für Translokationsversuche an artifiziellen Systemen wie Lipidvesikeln sind diese Peptide absolut nicht geeignet.

Bei **PKA** [93] handelt es sich um die hydrophobe Region der Signalsequenz des Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktors mit vorgesetzter Sequenz KKA. Bei PKA konnte in keinem Fall Leakage beobachtet werden.

Argininhaltige CPPs

Pep-1 [95, 96] ist ein kurzes amphipathisches Peptid aus 21 As, worunter sich fünf Lysine und ein Arginin befinden. Es wurde als effizientes Transporterpeptid für eine Reihe von

membranimpermeablen Molekülen in Zellen entworfen. Pep-1 besteht aus drei Domänen: Die N-terminale hydrophobe tryptophanreiche Domäne sorgt für die Bildung hydrophober Interaktionen mit Peptiden und für den Kontakt mit Membranen. Die C-terminale hydrophile lysinreiche Domäne entspricht der Kernlokalisationssequenz des SV40 large T-Antigen und sorgt für gute Löslichkeit des Peptidvektors sowie für die verbesserte intrazelluläre Aufnahme. Die dritte Domäne hat die Aufgabe eines Abstandhalters zwischen der hydrophoben und hydrophilen Domäne, wodurch Pep-1 schon in der Primärstruktur amphipatisch ist.

Mit etwas über 20 % Leakage (POPC/Chol (90/10), P/L 1/25) zeigte sich Pep-1 besonders bei zwitterionischen Lipidmischungen aktiv. Pep-1 enthält neben fünf Lysinen als sechste kationische As ein Arginin. Möglicherweise aufgrund des einen Arginins verursachte es ein deutlich geringeres Leakage als MAP, Transportan und TP10.

Penetratin [97] ist ein 16 As langes Segment aus der dritten Helix des Antennapedia Homeodomain-Proteins aus *Drosophila*. Es besitzt vier Lysine und drei Arginine. Derossi et al. fanden in E15-Rattenembryos entnommenen Zellen Hinweise auf einen Translokationsmechanismus von Penetratin nach dem Modell einer invertierten Mizelle.

Penetratin zeigte in den beiden Lipidmischungen POPE/POPG (70/30) und POPC/POPG (70/30) ein relativ geringes Leakage, das konzentrationsabhängig etwas anstieg. Im Unterschied zu den beiden Lipidmischungen, die jeweils 30 mol% negatives Lipid enthielten, verursachte Penetratin bei der nur 10 mol% negatives Lipid enthaltenden Mischung LM_{wbc} kaum Leakage. In den aus zwitterionischen Lipiden bestehenden Mischungen POPC und POPC/Chol konnte kein Leakage nachgewiesen werden.

Bei **R8** [98] handelt es sich um ein aus acht Argininen bestehendes, stark kationisches zellpenetrierendes Peptid, das bei Jurkat-Zellen (einer Leukämie-Zelllinie, von menschlichen T-Zellen abstammend) stärkere Zellinternalisierung zeigt als das TAT-Derivat TAT₄₉₋₅₇. Die zellpenetrierenden Eigenschaften scheinen durch das Vorhandensein von Argininen verstärkt zu werden, da Oligomere aus Histidinen, Lysin oder Ornithinen bei der zellulären Aufnahme deutlich inaktiver sind [98]. Offensichtlich trifft dies nicht auf die Eigenschaft zu, bei Vesikeln Leakage zu verursachen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass argininhaltige CPPs im Vergleich zu lysinreichen CPPs und AMPs eine schonendere Membrantranslokation ermöglichen. Denkbare Mechanismen wären dabei etwa energieabhängige endozytotische Mechanismen oder die Membrantranslokation über invertierte Mizellen, wie es im Falle von Penetratin diskutiert wurde [10].

SAP [99] nimmt aufgrund seiner prolinreichen Primärstruktur die Form einer Polyprolin II Helix ein und erhält durch einseitige Anordnung der polaren Argininseitenreste sekundär amphipatischen Charakter [100]. Seinen Namen verdankt SAP (engl.: sweet arrow peptide) seiner guten Diffusionsfähigkeit durch Zellmembranen und seiner nicht-zytotoxischen Wirkung bei HeLa-Zellen. SAP hat eine starke Tendenz zur Bildung von Oligomeren in Form von Fibrillen. Mehrere Fibrillen können sich dann zu zylindrischen Mizellen anordnen, was möglicherweise für die Zellpenetration von Bedeutung ist [100].

SAP zeigte bei den durchgeführten Leakage-Experimenten nur bei der Lipidmischung PE/PG (70/30) eine leichte und deutlich unter 10 % liegende Leakage verursachende Wirkung. Bei allen anderen getesteten Lipidmischungen war SAP wirkungslos. SAP scheint über einen endozytotischen Weg in die Zelle zu gelangen [101]. Die hier gemachten Beobachtungen stimmen mit einem derartigen Aufnahmeweg überein.

TAT [102] entstammt ursprünglich dem HIV-Tat-Protein (aus dem Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)). Das 13 As lange Peptid besteht mit seinen zwei Lysinen und sechs Argininen überwiegend aus basischen As und bildet dadurch im Kontakt mit Membranen keine α -Helix aus. Die polare Sequenz hat außerdem keinen amphiphilen Charakter. N-terminal beinhaltet TAT eine aus den ersten fünf As bestehende Kernlokalisierungssequenz.

TAT ist ein viel erforschtes CPP [103, 104] und wurde für diese Arbeit deshalb als Transportsequenz im verwendeten FQC-Assay eingesetzt. In den Leakage-Experimenten zeigte es lediglich bei den negativ geladenen Lipidmischungen leichte Effekte, die bei einem P/L von 1/50 maximal 2 % betrug. Bei ungeladenen Lipidmischungen war selbst bei einem P/L Verhältnis von 1/25 kein Leakage zu beobachten. Somit reihte sich TAT mit seiner Wirkung in die Reihe der durchweg kaum Leakage verursachenden argininreichen CPPs ein und stellte sich aufgrund seiner milden Eigenschaften als geeignetes Peptid für weitere Translokationsversuche in Lipidvesikeln dar.

Fusogenes Peptid FP23

Bei fusogenen Peptiden wie **FP23** [105] handelt es sich um eine Gruppe membranaktiver Peptide, die weder den AMPs noch zu den CPPs zugeordnet werden. Stattdessen sind es Sequenzen viraler Proteine, die zur effektiven Infektion von Wirtszellen durch membranumhüllte Viren beitragen, indem sie die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran auslösen und so dem Nukleokapsid den Eintritt in die Wirtszelle ermöglichen. Durch Einfügen sterisch gehinderter D- und L-Formen von CF₃-Phg an verschiedenen Positionen von FP23 konnte mit Fusionsversuchen an LUVs gezeigt werden, dass die

Initiation des Fusionsvorganges weniger von einer bestimmten Sekundärstruktur des Peptids (α -Helix oder β -Faltblatt [106, 107]) als vielmehr von dessen Primärstruktur abhängt [108].

FP23 verursachte bei der negativ geladenen Lipidmischung POPE/POPG (70/30) signifikantes Leakage im Bereich von 15 % (bei P/L 1/100) bis 60 % (bei P/L 1/25). Auch bei POPC/POPG (70/30) zeigte es Aktivität mit etwa 20 % (bei P/L 1/25). Interessant ist, dass es deutliche Wirkung bei der Lipidmischung LM_{wbc} zeigte (50 % bei P/L 1/25), obwohl es bei den bei Eukaryoten vorkommenden Lipiden POPC und Cholesterin keine oder kaum Leakage verursachende Wirkung hatte. Dies spiegelt die Anfälligkeit von Leukozyten als Wirtszellen des im HIV-Virus vorkommenden Proteins gp41 wider, welches die FP23-Sequenz enthält.

Noch anzumerken ist, dass die formale Trennung membranaktiver Peptide in AMPs, CPPs oder fusogene Peptide nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen nicht unbedingt schlüssig erscheint. So würde man z. B. Peptide, die ein ausgeprägtes Leakage verursachen, eher der Klasse der AMPs zuordnen, und dies stünde im Widerspruch zum Leakageverhalten der CPPs MAP, Transportan oder TP10. Die Sichtweise, dass sich Funktionen von Peptiden überlappen können, ist auch in Übereinstimmung mit weiteren Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Prof. Anne S. Ulrich. Beispielsweise konnte für eine Reihe von CPPs und AMPs fusogene Eigenschaften gefunden werden [109]. Auch die hier gemachte Beobachtung des Auftretens von Leakage bei einem fusogenen Peptid sollte unter dem Gesichtspunkt überlappender Funktionen betrachtet und bewertet werden.

4.4 Exkurs: Synergie von PGLa und Magainin 2

Im vorigen Kapitel wurde Peptid-verursachtes Leakage an verschiedenen Lipidvesikeln quantifiziert. Unter den elf getesteten antimikrobiellen Peptiden befanden sich auch PGLa [75, 110] und Magainin 2 [78]. Beide sind in der Haut des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* vorzufinden. Sie weisen neben der bakteriellen Abwehr auch antivirale [111], antifugale [112] und antitumorale Wirkung [113] auf. Dabei verstärken sich PGLa und Magainin 2 gegenseitig, sie wirken synergistisch. Dies konnte bereits 1993 von Vaz Gomes et al. [114] an Liposomen und 1995 von Westerhoff et al. [113] durch Versuche an *E. coli*-Bakterien, Tumorzellen und Liposomen gezeigt werden.

Zur Entschlüsselung der exakten Struktur und Dynamik membranaktiver Peptide in natürlicher Lipidumgebung eignen sich in besonderem Maße die OCD und die Festkörper-NMR. So konnte über OCD-Messungen festgestellt werden, dass PGLa durch elektrostatische Bindung an die Membran ausgehend von einem ungeordneten Zustand (engl.: random coil) die Struktur einer amphipathischen α -Helix annimmt [115]. Durch ^{19}F -NMR [116] und ^{15}N -NMR [117] sowie OCD-Messungen [75] wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Orientierung von PGLa in flüssigkristallinen Membranen untersucht: Vom zunächst flachen Aufliegen auf der Membran, dem S-state (S steht für engl.: surface) bei einem P/L von 1/200 ändert sich ab einem P/L von 1/80 die Orientierung des α -helikalen Peptids über ein Kippen in den sog. T-state (T steht für engl.: tilted) in DMPC-Membranen [66]. Dabei ist die Bildung von Homodimeren wahrscheinlich. Durch Untersuchungen mit ^{19}F -NMR konnte PGLa außerdem bei DMPC/DMPG-Lipiden in der Gelphase im membrandurchspannenden I-state gefunden werden (I steht für engl.: inserted; die Längsachse der Helix ist parallel zur Membrannormalen), was ein Hinweis auf Porenbildung ist [118]. Es scheint sich bei den in einem flüssigkristallinen Lipid durch PGLa gebildeten Poren um sich sehr schnell bildende, transiente Poren zu handeln. Magainin 2-Poren bilden sich langsamer, haben aber eine längere Lebensdauer als PGLa-Poren [119]. Der Durchmesser dieser Poren wurde durch Neutronenstreuung zu etwa 20 Å bestimmt [7].

Die Bildung von Heterodimeren aus Magainin 2 und PGLa führt zu supramolekularen Poren unter Bedingungen, unter denen die einzelnen Peptide keine membrandurchspannende Struktur einnehmen, sondern überwiegend plan auf der Membranoberfläche aufliegen würden. Auch hier wurden zur Untersuchung der exakten Struktur und der Dynamik ^2H -NMR-Messungen vorgenommen, die zu einem detaillierten Porenmodell führten [120]. Einen Überblick über das Verhalten von PGLa und Magainin 2 an Membranen geben Strandberg et al. [121]. Im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 sind PGLa und Magainin 2 am

wirkungsvollsten [119]. Die Vorstellung ist hierbei, dass PGLa zur schnellen Bildung der Pore beiträgt, welche durch Magainin 2 zeitlich stabilisiert wird [119].

Die Bildung von Poren mit Durchmessern von 15 bis 20 Å führt zum Auslaufen von in Vesikel eingeschlossenen niedermolekularen Stoffen. Somit stellen Leakage-Experimente eine geeignete und relativ einfache Methode dar, um synergistisches Verhalten von Peptiden zu quantifizieren. Im Gegensatz zu Versuchen an biologischen Systemen kann hierbei der Fokus auf die Untersuchung verschiedener Lipidzusammensetzungen gerichtet werden, was zur Klärung der Frage beitragen kann, ob primär die Lipide oder auch andere Parameter wie Konzentrationsbereiche oder Temperaturen zur optimalen antimikrobiellen Wirkungsweise von PGLa und Magainin 2 beitragen.

4.4.1 Ergebnisse

Die Untersuchungen zum synergistischen Verhalten von PGLa und Magainin 2 wurden entsprechend der in Kapitel 4.3 beschriebenen Leakage-Experimente durchgeführt. In Abbildung 4-24 ist durch PGLa und/oder Magainin 2 über einen Zeitverlauf von 30 min verursachtes Leakage am Beispiel der Lipidmischung POPC/POPG (90/10) dargestellt. Die Peptide wurden einerseits als Einzelkomponenten mit einem P/L von 1/200 zugegeben. Andererseits wurden sie einer molaren 1:1-Mischung zugefügt, in der PGLa und Magainin 2 mit je einem P/L von 1/400 enthalten waren, so dass die Gesamtpeptidmenge ebenfalls einem P/L von 1/200 entsprach. Dies ist in Abbildung 4-24 mit „Mix“ bezeichnet. Ebenfalls dargestellt ist das erwartete Signal, welches sich aus der halben Summe der Einzelsignale von PGLa und Magainin 2 ergibt. Der Vergleich des Signals, das bei Zugabe beider Peptide erhalten wird, mit dem erwarteten Signal zeigt deutlich die verstärkende synergistische Wirkung von Magainin 2 und PGLa; das Leakage ist in diesem Fall um den Faktor 19,2, also um das fast 20-Fache verstärkt.

Zum quantitativen Vergleich der Synergieeffekte an weiteren Vesikeln unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurde ein sogenannter Synergiefaktor definiert, der aus dem Quotienten des nach 30 min erhaltenen Fluoreszenzwertes der molaren 1:1-Mischung und der halben Summe der Einzelwerte erhalten wird. Da Leakage-Signale per se auf den 100 %-Wert begrenzt sind, wurden die Synergiefaktoren auf der Grundlage von P/L-Verhältnissen ermittelt, bei denen der mit den Mischungen erhaltene Leakagewert unter 100 % liegt.

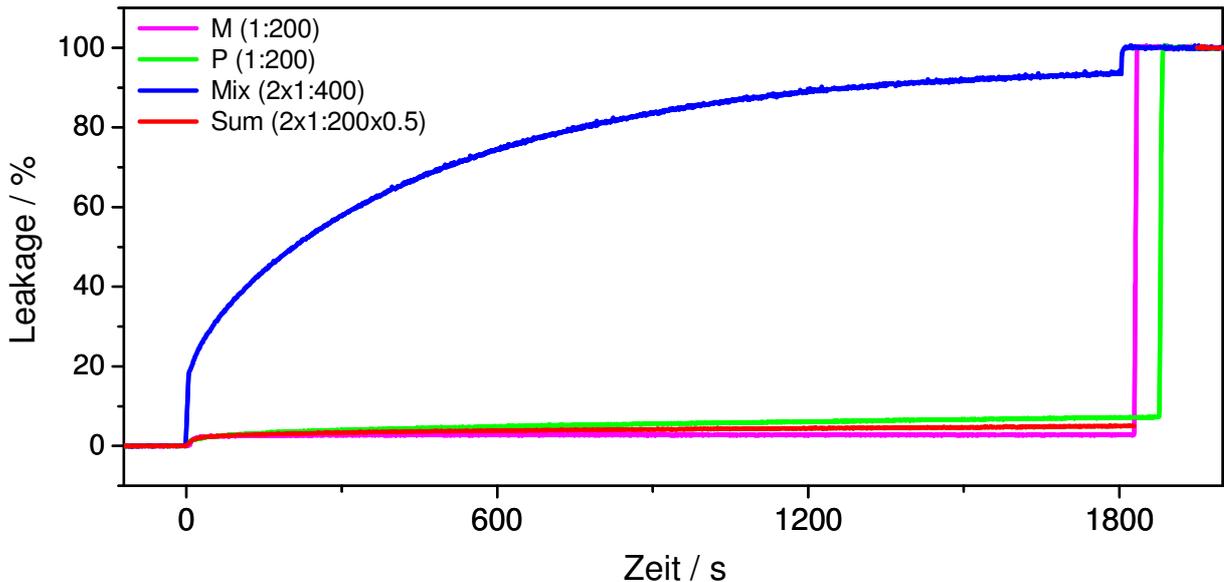


Abbildung 4-24: Zeitlicher Verlauf des Leakage mit PGLa und Magainin 2

An POPC/POPG (90/10) Vesikeln wurde Peptid-verursachtes Leakage gemessen, wobei Magainin 2 (M) und PGLa (P) als Einzelkomponenten bei einem P/L von 1/200, sowie ein 1:1 molares Gemisch (Mix) mit einem P/L von je 1/400 zugegeben wurden. Nach 30 min wurden die Vesikel durch 0,5 vol% Triton X-100 aufgelöst, wodurch der 100 %-Leakagewert erhalten wurde. Ohne Synergieeffekt wäre bei einer 1:1 molaren Mischung von Magainin 2 und PGLa der rot dargestellte Kurvenverlauf zu erwarten gewesen. Diese Kurve wurde erhalten, indem die Summe der Einzelwerte P + M halbiert wurde. Weitere Parameter: T = 37 °C, $c_{\text{Lipid}} = 200 \mu\text{M}$, Phosphatpuffer pH 7,4.

Im Folgenden wurde zum einen der Einfluss der Zumischung von negativem Lipid wie POPG und von Cholesterin auf den Synergiefaktor untersucht, sowie zum anderen die Synergie an drei Mischungen ermittelt, die bakterielle Membranen und eukaryotische Zellmembranen simulieren. In einer ersten Serie (A, Tabelle 4-1) wurde POPC als Hauptkomponente verwendet und negativ geladenes POPG in drei Stufen erhöht. Die Erhöhung des Synergiefaktors ist bei 10 mol% POPG besonders deutlich, er steigt von etwa 3 auf etwa 20. Bei weiterer Erhöhung des POPG-Anteils auf bis zu 50 mol% nimmt die Synergie wieder ab.

Da AMPs bei prokaryotischen Membranen deutlich stärker wirken sollten und bakterielle Membranen kein POPC, aber POPE enthalten, wurde in einer zweiten Serie (B) der Einfluss verschiedener Konzentrationen von POPG in Kombination mit POPE untersucht. Ähnlich wie in der vorigen Serie wurde auch hier ein hoher synergistischer Faktor von etwa 15 bei 30 mol% POPG gefunden. Verglichen mit der POPC-Serie (A) ist das Maximum zu einem höheren POPG-Gehalt verschoben und liegt sehr gut in einem Bereich, der mit 25 bis 40 mol% dem durchschnittlichen Gehalt an negativem Lipid bakterieller Membranen entspricht [122].

Tabelle 4-1: Synergiefaktoren in Abhängigkeit der verwendeten Lipidmischungen

Peptid-induziertes ANTS-Leakage wurde über einen Zeitraum von 30 min verfolgt. Gemessen wurden sowohl die einzelnen Peptide Magainin 2 und PGLa mit angegebenem P/L sowie eine Mischung der beiden im molaren Verhältnis 1:1. Zur Ermittlung des synergistischen Faktors wurde der gemessene Wert in Bezug zur halben Summe der einzeln ermittelten Werte mit gleichem P/L gesetzt.

Serie	Vesikelzusammensetzung	Molares Verhältnis in %	Synergiefaktor	P/L
A	POPC	100	3,2 ± 0,8	1/200
	POPC/POPG	90/10	19,2 ± 2,8	1/200
	POPC/POPG	70/30	10,5 ± 1,8	1/200
	POPC/POPG	50/50	3,5 ± 1,9	1/200
B	POPE/POPG	90/10	1,7 ± 0,4	1/50
	POPE/POPG	70/30	15,3 ± 2,2	1/50
	POPE/POPG	50/50	3,5 ± 2,8	1/50
<i>E. coli</i> -Extrakt				
	PE/PG/CL	72/23/5	35,9 ± 3,5	1/50
<i>LM_{wbc}</i>				
	POPC/POPE/POPS/SM/Chol	30/20/10/10/30	2,7 ± 0,4	1/50
<i>LM_{rbc}</i>				
	POPC/POPE/POPS/SM/Chol	15/10/10/15/50	2,1 ± 0,5	1/50
C	POPC/Chol	90/10	2,7 ± 0,3	1/100
	POPC/Chol	70/30	1,7 ± 0,2	1/100
	POPC/Chol	50/50	1,6 ± 0,2	1/100
D	POPC/POPG/Chol	72/8/20	2,4 ± 0,4	1/100
	POPC/POPG/Chol	56/24/20	4,5 ± 1,6	1/100
	POPC/POPG/Chol	40/40/20	2,9 ± 0,3	1/100

Die Serien A und B zeigen unterschiedliche P/L-Empfindlichkeiten. POPC-haltige Membranen sind, verglichen mit POPE-haltigen Membranen, etwa viermal empfindlicher, d. h. 100 %-Leakagewerte bei Mischungen werden bereits bei deutlich geringeren P/L-Verhältnissen erreicht. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die Oberflächen von PE/PG-Membranen glatter ausfallen, da PE eine konische Form aufweist [30]; diese wird zusammen mit PG (invertierte konische Form) in etwa kompensiert. Hingegen werden die Oberflächen von PC/PG-Mischungen rauher ausfallen und somit den Peptiden leichteren Zugang zur Interaktion mit dem Membranlumen bieten, da zylindrisches PC [30] mit konischem PG nicht perfekt glatte, und damit weniger geschlossene Membranoberflächen ausbildet.

Die synergistische Wirkung von PGLa und Magainin 2 zeigte sich in besonderem Maße bei Vesikeln aus *E. coli*-Lipidextrakt. Hier betrug der synergistische Faktor etwa 36. Vergleicht man dies mit dem synergistischen Faktor bei Lipidzusammensetzungen, welche Blutzellmembranen (Leukozyten (LM_{wbc}) und Erythrozyten (LM_{rbc})) simulieren [60] bzw. bei Mischungen, die Cholesterin enthalten, so ist dieser wesentlich kleiner, da hier nur Faktoren zwischen 1,6 bei POPC/Chol (50/50) (Serie C) und etwa 3 bei simulierten Leukozytenmembranen beobachtet wurden. Für die Simulation der Blutzellmembranen wurden ausgehend von Leidl et al. [123] die molaren Verhältnissen für die einzelnen Lipide berechnet. Hierzu wurden die Werte für Zellmembranen von Leukozyten entsprechend der im Blut enthaltenen Anteile von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten gewichtet, wobei Lipidkomponenten unter 3 mol% vernachlässigt und die durchschnittlichen Werte auf ± 5 mol% gerundet wurden.

In der Serie C wurde der Einfluss von Cholesterin separat bestimmt. Hier wurden POPC-Vesikel mit stufenweise erhöhtem Cholesterinanteil untersucht. Es zeigte sich mit steigendem Cholesteringehalt eine graduelle Abnahme der Synergie von 2,7 (0 % Chol) auf 1,6 (50 % Chol), was insgesamt einen abschwächenden Effekt von Cholesterin widerspiegelt.

Um den dämpfenden Einfluss von Cholesterin auf den Synergiefaktor im Vergleich zum verstärkenden Einfluss von PG zu untersuchen, wurde in einer weiteren Serie (D) Cholesterin in einem konstantem molaren Verhältnis von 20 % gehalten und das Verhältnis der Phospholipide POPC zu POPG von 90:10 (Serie D, 72:8:20) über 70:30 (Serie D, 56:24:20) auf 50:50 (Serie D, 40:40:20) verändert. Verglichen mit den Synergiefaktoren der Serie A, in welcher dieselben POPC/POPG-Verhältnisse ohne Cholesterin untersucht wurden, erfolgt hier eine Abschwächung des Synergiefaktors bei allen Verhältnissen. Am deutlichsten ausgeprägt ist dies bei der 90/10-Mischung, hier erfolgt eine Verringerung des Faktor von 19,4 auf 2,4. Weitere Erhöhung des POPG-Anteils bewirkt wieder eine Erhöhung der Synergie (Faktor 4,5), die bei weiterer Zugabe (50 mol%) zurückgeht (Faktor 2,9). Dies entspricht in etwa dem Faktor bei reinen POPC-Membranen (Faktor 2,4).

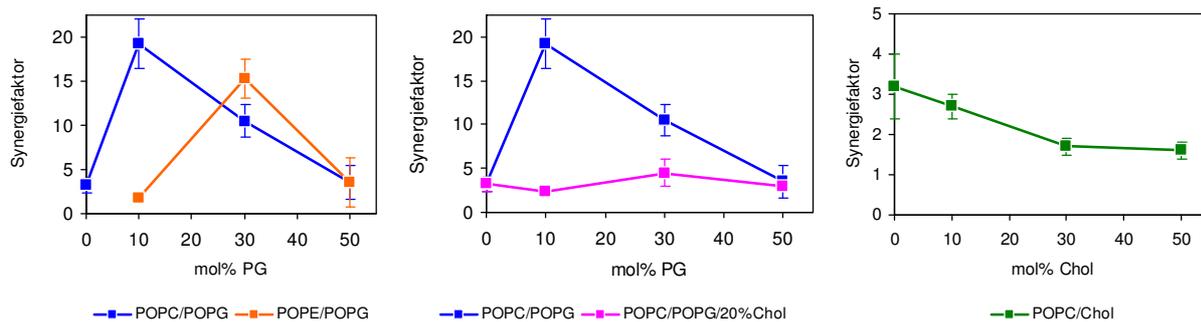


Abbildung 4-25: Synergiefaktoren in Abhängigkeit des POPG- und Cholesterin-gehalts

Links ist die Veränderung des Synergiefaktors bei Phospholipidmischungen mit unterschiedlichen molaren POPG-Anteilen dargestellt. Bei POPE/POPG-Mischungen verschiebt sich im Vergleich zu POPC/POPG-Mischungen der maximale Synergiefaktor zu höheren POPG-Gehalten hin. In der Mitte ist die abschwächende Wirkung von Cholesterin auf den Synergiefaktor gezeigt. Verglichen mit der cholesterinfreien Mischung POPC/POPG wird der dortige hohe Synergiefaktor bei 10 mol% POPG durch 20 mol% Cholesterin vollständig unterdrückt. Rechts ist der Synergiefaktor in POPC-Mischungen mit verschiedenen mol% Cholesterin ermittelt, der sich mit zunehmendem Cholesteringehalt graduell vermindert. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung von drei Messungen.

4.4.2 Diskussion

Obwohl bereits Leakage-Experimente zur Untersuchung der verstärkenden synergistischen Wirkungsweise von PGLa und Magainin 2 bei der Membranpermeabilisierung herangezogen wurden [124], beschränkten sich derartige Untersuchungen meist auf den Nachweis einer synergistischen Verstärkung oder auf die Ermittlung des wirkungsvollsten stöchiometrischen Verhältnisses beider Peptide [119].

So benutzten Vas Gomes et al. [114] kleine unilamellare Vesikel aus Eidotter-POPC und Dicetylphosphat sowie Vesikel aus Eidotter-POPC, Dicetylphosphat und Stearylamin-Lipidgemischen, um verstärktes synergistisches Verhalten von PGLa und der amidierten Form von Magainin 2 zu zeigen [114]. Auch Williams et al. [124] führten Leakage-Experimente an kleinen unilamellaren PC/PE/PS (2/5/3) Vesikeln durch. Dabei wurde das gemessene Leakage durch Zugabe einer geringen Menge der amidierten Form von Magainin 2 zu PGLa derart verstärkt, dass es dem Leakage entsprach, welches durch eine etwa 23-fach höhere PGLa-Konzentration verursacht wurde [124]. Matsusaki et al. [119] ermittelten 1998, dass Magainin 2 und PGLa einen Komplex mit einer Stöchiometrie von 1:1 bilden, und zeigten ihre Synergie bei der Membranpermeabilisierung mit Leakage-Experimenten an synthetischen Vesikeln. Bestimmt man von diesen Messungen die synergistischen Faktoren, so liegen sie zwischen 3 und 4. Allerdings bestanden deren

Vesikel aus 100 % Eidotter-PG, einem Lipid, das die Verhältnisse von bakteriellen Membranen – den eigentlichen Zielmembranen von AMPs – nicht widerspiegelt.

In dieser Arbeit wurden Leakage-Experimente an Lipidvesikeln durchgeführt, die näher an den realen Bedingungen liegen sollten, indem Lipidmischungen eingesetzt wurden, die bakterielle Membranen und eukaryotische Membranen simulieren.

Eindeutig zu erkennen ist die synergieverstärkende Wirkung von anionischen Lipiden – hier beispielhaft mit POPG gezeigt – und die abschwächende Wirkung von Cholesterin.

Besonders hervorzuheben ist weiterhin der für die *E. coli*-Lipidmischung gemessene hohe Synergiefaktor von 36. Er verdeutlicht sehr klar die Lipid-Abhängigkeit des Synergieeffektes und gibt einen Hinweis, wie perfekt AMPs im Allgemeinen und die Mischung der beiden Peptide PGLa und Magainin 2 im Besonderen auf die Schädigung von bakteriellen Membranen ausgelegt sein können.

Wie schon die Ergebnisse des vorigen Kapitels zeigen, weisen POPC/POPG-Mischungen eine relativ starke Anfälligkeit gegenüber Leakage auf. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde diese Versuchsreihe bei einem P/L von 1/200 durchgeführt. Da eukaryotische Zellmembranen auf der Außenseite zwitterionisch sind und POPC in bakteriellen Membranen nicht vorkommt, ist die biologische Relevanz dieser Mischung zunächst sekundär. Ein Vergleich mit POPE/POPG-Mischungen ist jedoch durchaus von Interesse: So macht aus evolutionsbiologischer Sicht POPE statt POPC in bakteriellen Membranen offensichtlich Sinn, da POPE zunächst weniger Leakage-anfällig ist. Jedoch wird durch die Anwesenheit von anionischen Lipiden wie POPG die Synergie drastisch verstärkt, und die kationischen Peptide PGLa und Magainin 2 bei 30 mol% POPG wirken maximal. Dies entspricht weitestgehend dem in bakteriellen Membranen enthaltenen prozentuellen Anteil an negativem Lipid mit 25 bis 40 mol% [122].

POPC und POPE unterscheiden sich durch ihre Kopfgruppen und ihre Form; PCs werden als Zylinder beschrieben, während PEs eine konische Gestalt aufweisen [30]. Zusammen mit PG, das einen invertierten Konus darstellt, wird der Angriff kationischer Peptide zum einen durch elektrostatische Wechselwirkung verstärkt, und zum anderen wird eine nicht perfekt glatte Membranoberfläche die Interaktion und letztlich eine Insertion der Peptide erleichtern.

In eukaryotischen Membranen stellen Phosphatidylcholine üblicherweise einen Phospholipidanteil von über 50 % dar. Eukaryotische Membranen enthalten außerdem Cholesterin und werden durch dieses hinsichtlich der Störung durch AMPs geschützt. Weiterhin wird, wie der Vergleich der Messreihen A und D deutlich macht, sowohl die Empfindlichkeit von POPC gegenüber den AMPs herabgesetzt – P/L von 1/100 in Messreihe

POPC/Chol (C) – als auch der vormals hohe Synergiefaktor bei POPC/POPG (90/10) von etwa 19 durch einen physiologischen Cholesterinanteil von 20 % auf knapp 3 reduziert. Die Schutzwirkung von Cholesterin zeigt sich generell an verminderten Synergiefaktoren, keine der cholesterinhaltigen Mischungen zeigte einen Synergiefaktor von über 5, bei den meisten lag der Faktor sogar unter 3. Somit scheint das Vorhandensein von Cholesterin die synergiefördernde Wirkung von anionischem Lipid vollständig zu kompensieren. Dies ist einen nahezu eindeutiger Beleg für die Schutzwirkung von Cholesterin gegen synergistisch wirksame AMPs, selbst bei Vorhandensein von negativ geladenen Lipiden.

Der extreme Synergiefaktor von über 30, der an Vesikeln mit *E. coli*-Lipidextrakt erhalten werden konnte, hebt sich deutlich ab von den relativ geringen Faktoren von etwa 3 bei der LM_{wbc}-Lipidmischung und etwa 2 bei der LM_{rbc}-Lipidmischung. Hier zeigen sich sehr deutlich Unterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Membranen. Das bakteriensimulierende *E. coli*-Lipid besteht aus den Lipiden POPE, POPG und CL. Da CL zweifach negativ geladen ist, ergibt sich ein effektiv negativ geladener Lipidanteil von 28 %. Verglichen mit Vesikeln aus POPE und 30%igem POPG-Anteil, bei denen ein Synergiefaktor von ca. 15 erhalten wurde, ist der Extremwert bei der *E. coli*-Lipidmischung nochmals um etwa Faktor 2 größer. Inwieweit dies auf die dritte Komponente CL zurückzuführen ist, bleibt abzuklären. Hier könnten, ähnlich den Überlegungen zu den Unterschieden in der Empfindlichkeit bei POPC- und POPE- Vesikeln, geometrische bzw. sterische Faktoren eine Rolle spielen. Denn die deutlich ausgeprägte konusartige Form von CL dürfte die Membran für eine Peptidinsertion stark sensibilisieren.

Bei den zellsimulierenden Lipidmischungen dagegen, die aus POPC, POPE, POPS, SM und Chol bestehen, ist der Anteil des negativ geladenen POPS mit 10 % deutlich geringer und scheint durch 30 % bzw. 50 % Cholesterin in seiner eigentlich Leakage verstärkenden Wirkung weitestgehend unterdrückt zu werden.

Insgesamt lassen die Untersuchungen zur Synergie von PGLa und Magainin 2 auf Basis von Leakage-Experimenten an unterschiedlichen Lipidvesikeln deutlich folgende Schlussfolgerungen zu:

1. Lipide mit negativer Nettoladung wirken synergieverstärkend.
2. Cholesterin wirkt stark synergieabschwächend.
3. Diese beiden Effekte zusammen können die starke Präferenz dieser AMPs bezüglich bakterieller Membranen erklären, und dies bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber eukaryotischen Biomembranen.

4.5 Fluoreszenzmessungen zur Peptidtranslokation an Liposomen

Die Messung der Translokationseigenschaften membranaktiver Peptide wird in diesem Kapitel an Lipidvesikeln durchgeführt. Die dafür erforderlichen Voraussetzungen wurden in den vorausgegangenen Kapiteln erarbeitet, in denen sich zum einen die Notwendigkeit eines sicheren Einschusses des Reduktionmittels GSH gezeigt hat (Kapitel 4.2), und zum anderen möglichst membranschonende CPPs durch breit angelegte Leakage-Experimente identifiziert wurden (Kapitel 4.3). Im Folgenden wird nun für die Translokationsuntersuchungen das CPP TAT verwendet, welches in den Leakage-Experimenten nur sehr geringe membranstörende Wirkung zeigte.

4.5.1 Ergebnisse

GSH-Dextransynthese

Um das Ausfließen des Reduktionsmittels GSH aus den Vesikeln während der Zeitdauer eines Experimentes zu gewährleisten, wurde GSH an ein hydrophiles Makromolekül, ein Dextran mit Molmasse 70 kDa, gekoppelt. Die Synthese von dextrangebundenem GSH wurde nach dem in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dabei erfolgt zunächst die Oxidation des Dextrans durch ein Oxidationsmittel wie Natriummetaperiodat. Die anschließende Kopplung von GSH an Aldehydgruppen des Dextrans ergibt die entsprechenden Schiff'schen Basen bei leicht alkalischem pH-Wert von 8,0 bis 8,5. Anschließend erfolgt die Reduktion durch Natriumborhydrid. Ungebundenes GSH wird durch intensive Dialyse gegen 4 l H₂O bidest. entfernt, und das Produkt wird anschließend gefriergetrocknet.

Zur Überprüfung, ob nicht abreagiertes GSH durch die Dialyse restlos entfernt werden konnte, erfolgte die SH-Bestimmung der Probe mittels DTNB. Dazu wurden täglich 10 µl Probe aus dem Dialyseschlauch abgenommen und nach dem in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Verfahren mit DTNB die Thiolgruppen bestimmt. Wie in Abbildung 4-26 dargestellt, war bei täglichem Wasserwechsel nach sieben bis acht Tagen ein konstanter Endwert des relativen Thiolgruppen-Gehaltes zu verzeichnen. Ab hier konnte somit von einer ausreichenden Abtrennung des noch freien GSH ausgegangen werden. Die in Abbildung 4-26 dargestellten Werte sind relativ bezogen auf die Konzentration des bei der Synthese eingesetzten GSH (325 mM = 100 %-Wert).

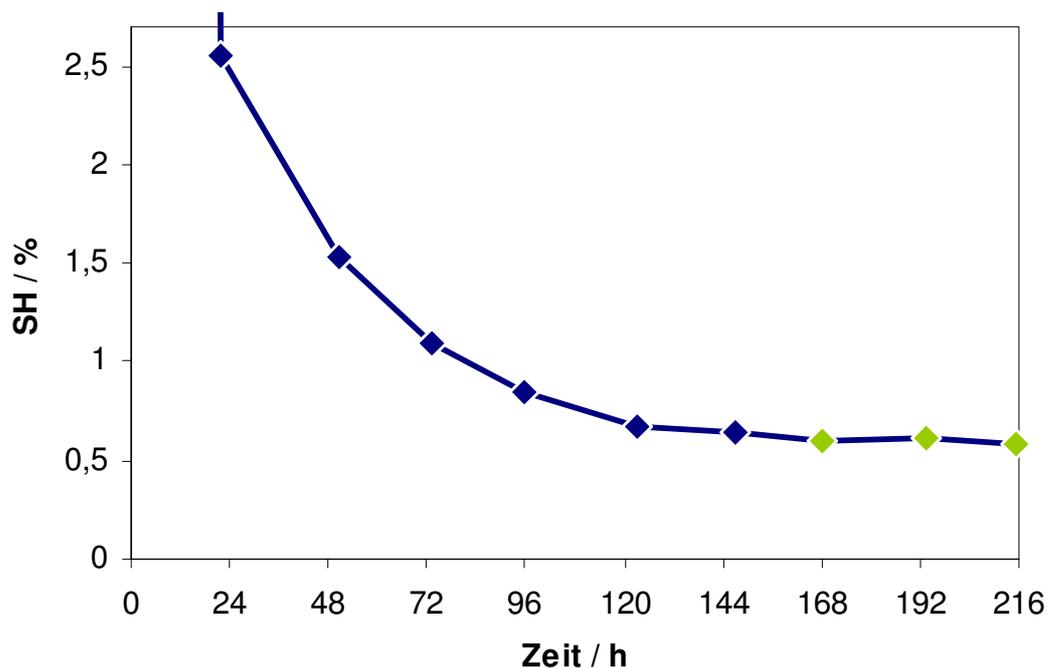


Abbildung 4-26: Thiolgruppen-Gehalt der GSH-Dextran-Lösung im Verlauf der Dialyse

Dialysieren über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen führt zur vollständigen Entfernung von ungebundenem GSH (grüne Messpunkte).

Effektivität der Reduktion von GSH-Dextran

Bei bekannter Einwaage kann mittels DTNB die GSH-Konzentration in einer GSH-Dextran-Probe ermittelt werden. Setzt man dies in Bezug zu den in einem 70 kDa-Dextran enthaltenen Glucoseresten, so ergibt sich eine Belegung des Dextrans von ca. 11 % mit GSH. Dies ergibt pro 70 kDa-Dextran mit ca. 390 Glucoseresten eine Belegung von ca. 43 GSH-Resten, und für die in den späteren Versuchen verwendete GSH-Dextran-Konzentration von 10 mg/ml (= 125 μ M) errechnet sich eine GSH-Konzentration von ca. 5 mM.

Ob diese berechneten 5 mM ähnlich effizient reduzierend wirken wie freies GSH, wurde in einer Versuchsreihe untersucht, in welcher der Zeitverlauf der Spaltung von 10 μ M TAT-FQC durch 10 mg/ml GSH-Dextran im Vergleich zur Aktivität verschiedener Konzentrationen an freiem GSH beobachtet wurde. Die Reaktion verläuft im Bereich einer Minute vollständig, wobei GSH-Dextran ähnlich aktiv ist wie freies GSH in einer Konzentration von 5 mM. Die GSH-Kopplung an Dextran scheint somit keinen Einfluss auf die Reduktionseffektivität zu haben. (siehe Abbildung 4-27).

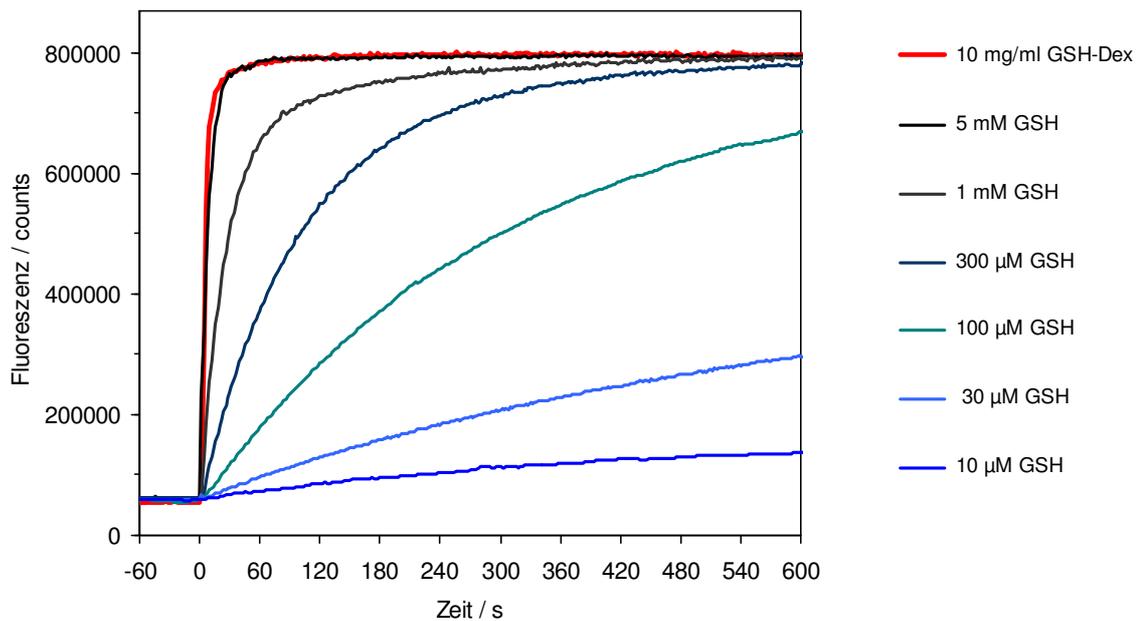


Abbildung 4-27: Zeitverlauf der TAT-FQC-Spaltung

Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der TAT-FQC Reduktion bei unterschiedlichen GSH-Zugaben (10 μM - 5 mM), daneben der zeitliche Verlauf der TAT-FQC-Reduktion nach Zugabe von 10 mg/ml synthetisiertem GSH-Dextran (rote Kurve). Die mit 5 mM GSH und mit 10 mg/ml GSH-Dextran erhaltenen Signale verlaufen vergleichbar schnell, die Kopplung von GSH an Dextran hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Effektivität der Reduktion. Weitere Parameter: $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $c_{\text{TAT-FQC}} = 10\text{ }\mu\text{M}$, Phosphatpuffer pH 7,4.

Leakagebestimmung mittels Fluorescein-Antikörper

Um zu überprüfen, ob Dextrane mit 70 kDa Masse nach Peptidzugabe in den Vesikeln verbleiben, wurde ein Assay aufgebaut, der auf dem Quenchen von Fluorescein mit einem Antikörper basiert [125]. Das Prinzip ist hierbei, dass in Vesikel eingeschlossenes Fluorescein nicht von Antikörpern gebunden werden kann, die sich im Außenmedium befinden, und dass infolge dessen die Fluoreszenz nicht gequencht werden kann. Erfolgt jedoch ein Leakage, und Fluorophore gelangen ins Außenmedium, so wird die Fluoreszenz abnehmen. Der zeitliche Verlauf dieser Abnahme spiegelt somit unmittelbar das Leakage wider. Als Fluorophor wurde zum einen CF mit einer Molmasse von 376,32 Da und zum anderen FD70 mit einer Molmasse von ca. 70 kDa verwendet.

Bei dem Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen Kaninchen IgG, mit dem nach Herstellerangaben durch eine 20 μl Antikörperlösung (1 mg/ml) eine 50%ige Fluoreszenzlöschung von 1 ml einer 50 nM Fluoresceinlösung (= 50 pmol) in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0, erreicht wird.

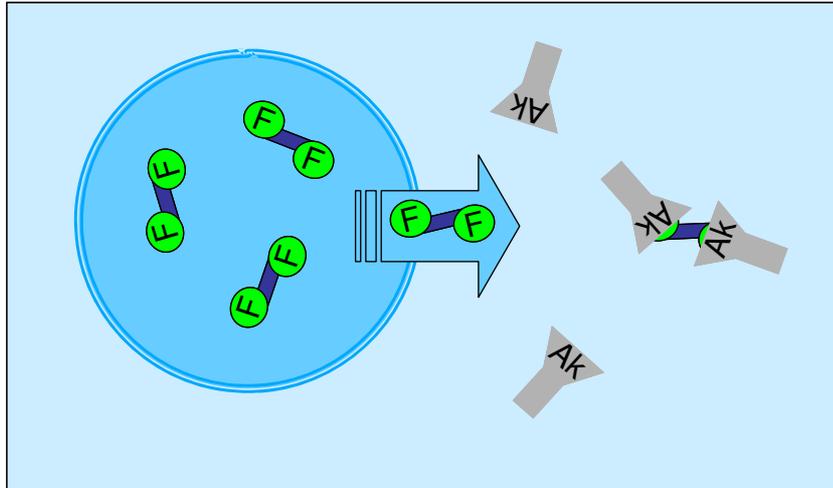


Abbildung 4-28: Prinzip Leakage-Assay von Fluoresceindextran mittels Antikörper

Fluorescein-Antikörper (polyklonaler Kaninchen IgG) außerhalb der Vesikel löschen die Fluoreszenz des ausgeflossenen Fluorescein-markierten Dextrans.

Je Versuch wurden 200 μ l Vesikelsuspension mit einer 2 ml Spin Column mit Sephacryl 500-HR einmal gewaschen (1500 \times g, 2 min) und anschließend für den Versuch verwendet. Durch die in Kapitel 4.2 festgestellte Effektivität des Waschschrilles konnte bei Verwendung des Sephacryl 500-HR von einem Pufferaustausch bis zu einer verbleibenden Restmenge von 10^{-3} ausgegangen werden.

Wie in Kapitel 4.3 beschrieben, wurde auch hier über eine Rhodaminbestimmung zunächst der Lipidverlust bestimmt und die zuzugebende Menge an Peptid darauf abgestimmt. Anschließend wurde die FD70-Fluoreszenz bei 515 nm zeitabhängig verfolgt (Abbildung 4-29 blau). Nach 15 min wurden 20 μ l der 1 mg/ml Antikörperlösung zugegeben. Die schnelle Abnahme des Fluoreszenzsignals zeigte eine Löschung der Fluoreszenz von FD70 an, welches sich nach einmaligem Waschen mit Sephacryl 500-HR noch außerhalb der Vesikel befand. Im weiteren Verlauf blieb die Fluoreszenz dann konstant. Folglich verloren die Vesikel während des gemessenen Zeitraums von 70 min keine messbaren Mengen von Fluoresceindextran. Am Ende des Experimentes wurden die Vesikel durch die Zugabe von 0,5 vol% Triton X-100 zerstört, was eine sofortige, ca. 90%ige Löschung der Fluoreszenz zur Folge hatte.

Im nächsten Schritt wurde ein durch TAT gegebenenfalls induziertes FD70-Leakage überprüft (Abbildung 4-29 pink). Dazu wurden zunächst 20 μ l des Antikörpers zugegeben, was übereinstimmend mit der oben beschriebenen Messung zur Abnahme der Fluoreszenz führte. Nach 10 min wurde dann TAT im P/L von 1/50 zugegeben, und die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 70 min verfolgt. Dabei war keine

Fluoreszenzabnahme messbar. Im Anschluss daran wurde – wie bei oben beschriebener Messung – Triton X-100 zugefügt und die Löschung der Fluoreszenz nach der Zerstörung der Vesikel beobachtet.

Als Fazit dieses Versuchsteils kann gesehen werden, dass bei Verwendung des Peptids TAT im geplanten P/L von 1/50 ein Leakage von 70 kDa Fluoresceindextran nicht zu beobachten ist und allenfalls in einem Bereich unter 1 % liegen würde. Demzufolge sollte auch dextrangekoppeltes GSH stabil in den Vesikeln verbleiben.

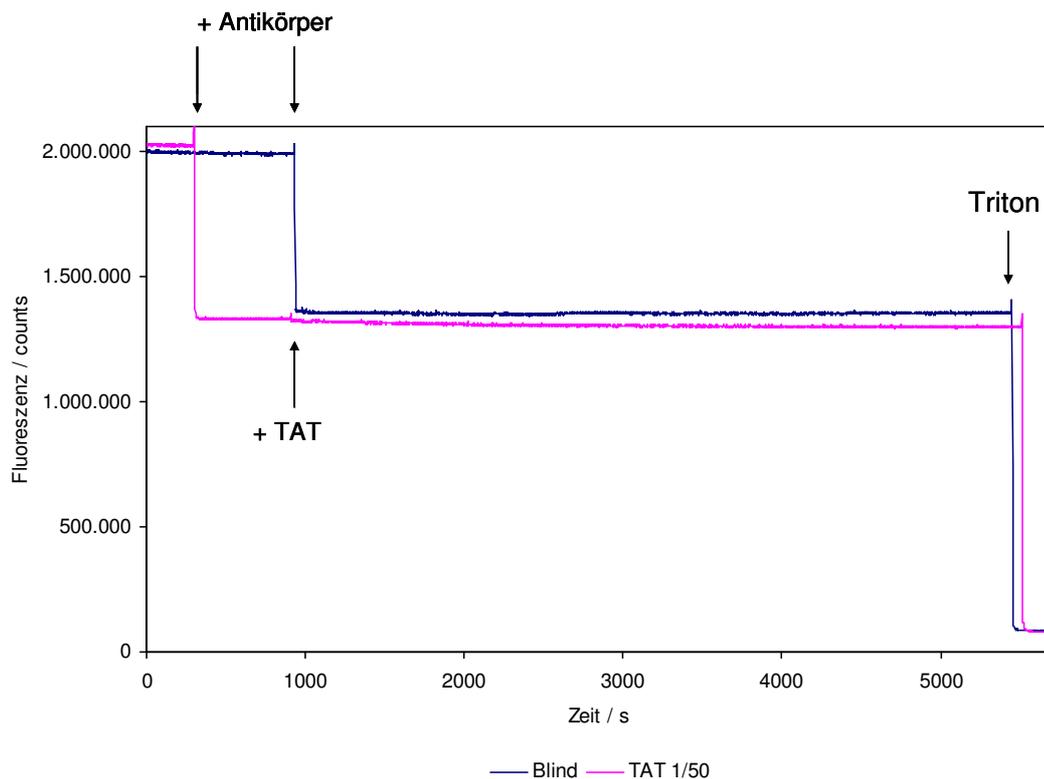


Abbildung 4-29: TAT-verursachtes Leakage von FD70

Die Zugabe von TAT in einem P/L von 1/50 verursacht kein messbares Leakage von FD70. Die Pfeile markieren die Zugabe des Antikörpers bzw. die Zugabe von TAT oder Triton. Die Durchführung des Experimentes erfolgte an POPE/POPG 70/30-Vesikeln. Diese wurden in physiologischem Phosphatpuffer pH 7,4 präpariert und enthielten 10 μM 70 kDa FD70. Weitere Parameter: $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{Excitation}} = 470 \pm 1,6\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \pm 1,6\text{ nm}$.

Um einen Eindruck zu erhalten, in welchem Ausmaß peptidinduzierte Membranstörungen sich in dem soeben beschriebenen Antikörper-Assay abbilden, wurde mit zwei weiteren, deutlich membranaktiveren Peptiden das Leakageverhalten von Vesikeln untersucht, nämlich mit den sich synergistisch verstärkenden Peptiden PGLa und Magainin 2, und zwar unter Bedingungen, bei denen nach den Ergebnissen des Kapitels 4.4 deutliche Effekte auftreten müssen.

Zum einen wurde der Assay mit CF durchgeführt, das von seiner Molekülgröße her mit dem in Kapitel 4.2 und 4.3 verwendeten ANTS vergleichbar ist, und somit in ähnlicher Weise aus den Vesikeln ausfließen dürfte. Zum anderen wurde FD70 eingesetzt, analog zu den gerade beschriebenen Versuchen mit TAT.

Bei diesen Experimenten, welche in Abbildung 4-30 gezeigt sind, wurde für PGLa, Magainin 2 und deren Mischung ein Leakageverhalten beobachtet, das dem bereits bekannten sehr ähnelt: CF (links) entweicht in der Abstufung PGLa > Magainin 2 aus den Vesikeln und die Synergie wird ebenfalls ersichtlich. Die Serie wurde bewusst bei einem P/L von 1/100 durchgeführt, um in jedem Falle ein 100%-Leakage-Signal zu erhalten. Im Gegensatz dazu kann bei Verwendung von FD70 (rechts) kein Leakage festgestellt werden, und das auch in dem Fall, bei dem bei CF ein 100%iges Leakage beobachtet wurde.

Somit kann nochmals gefolgert werden, dass ein Leakage von dextrangebundenem GSH nahezu ausgeschlossen werden kann, und es sollte sich daher als impermeables Reduktionsmittel für die Experimente mit TAT-FQC und Lipidvesikeln sehr gut eignen.

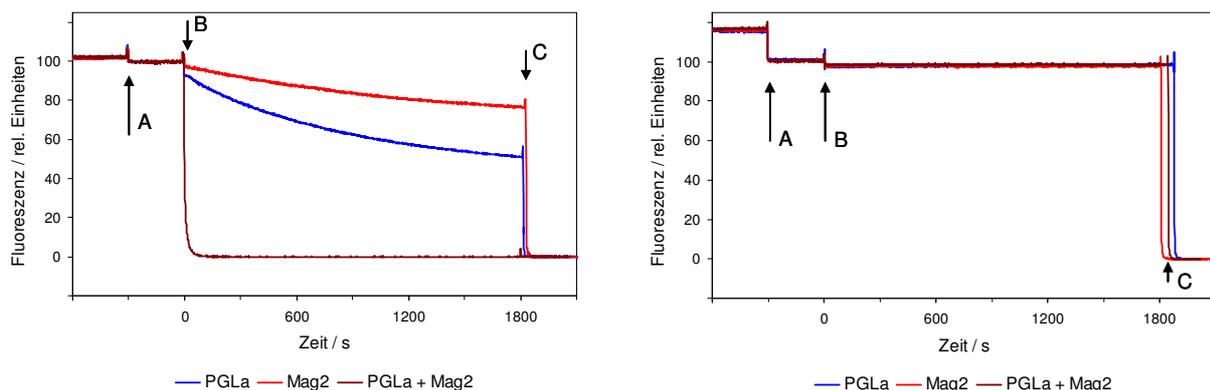


Abbildung 4-30: Leakage von CF und FD70 bei PGLa, Magainin 2 und deren Mischung

Links ist CF-Leakage bei POPC/POPG (70/30) Vesikeln nach Peptidzugabe gezeigt, rechts das Leakage von FD70 bei POPC/POPG (70/30) Vesikeln. (A) Zugabe des Antikörpers, (B) Peptidzugabe (PGLa blau, Magainin 2 rot, Mischung schwarz), (C) Zugabe von 0,5 vol% Triton X-100. Weitere Parameter: T = 37 °C, P/L = 1/100, Phosphatpuffer pH 7,4.

Anlegen eines Transmembranpotenzials

Am Beispiel von Penetratin konnte gezeigt werden, dass die Translokation von CPPs über Lipidmembranen in erheblichem Ausmaß vom Vorliegen eines Transmembranpotenzials abhängig sein kann [64]. Um diesen Aspekt auch bei den im Folgenden durchgeführten Untersuchungen mit dem CPP TAT berücksichtigen zu können, wurde zum Anlegen eines

Potenzials über Lipidmembranen das gängige Verfahren über Kalium-Konzentrationsgradienten an die hier vorliegenden Verhältnisse angepasst. Der Konzentrationsgradient wurde durch Puffer unterschiedlicher Kaliumionenkonzentration innerhalb und außerhalb der Vesikel generiert. Innerhalb der Vesikel wurde ein Puffer mit 150 mM Kaliumionen verwendet, außerhalb befanden sich 5 mM Kaliumionen. Um den osmotischen Druck zu kompensieren, der daraus resultieren würde, wurde die Ionenstärke durch Natriumionen ausgeglichen, d. h. außerhalb der Vesikel waren 150 mM Natriumionen, innerhalb 5 mM Natriumionen. Mit diesem Gradienten von Faktor 30 wird nach der Nernst-Gleichung ein Potenzial von 90 mV erhalten, wenn die Membran selektiv für eines der beiden Ionen, K^+ oder Na^+ , permeabel ist. Dies wird durch Zugabe von Valinomycin erreicht. Valinomycin (MW: 1111,32 g/mol) ist ein Carrier-Ionophor, der selektiv Kalium-Ionen transportiert. Es wurde in Ethanol (EtOH) gelöst und in einer Konzentration von 0,08 μM zugegeben, das einem P/L von 1/2500 entspricht.

Bei der Erstellung einer Kalibrierkurve und der Prüfung der Potenzialstabilität wurde 1,1',3,3',3'-Hexamethyl-indodicarbocyanine Iodide ($DiIC_1(5)$); MW: 510,46 g/mol [126]), ein potenzialabhängiger Farbstoff verwendet. Er wurde in einer Mischung 1:9 EtOH:H₂O bidest. gelöst. Der kationische Carbocyaninfarbstoff akkumuliert an überpolarisierten Membranen, wird in die Lipid-Bilayerschicht transportiert und reichert sich dort an. Der Farbstoff wurde wie bei Apell et al. [127] beschrieben in einer Konzentration von 2 mol% zu den Vesikeln gegeben. Die Excitation erfolgte bei 620 nm, und die Emission bei 680 nm.

Das Membranpotenzial Ψ wird durch die relativen Fluoreszenzintensitäten $\Delta F/F_0$ bei verschiedenen Kaliumionengradienten zugänglich und in einer Kalibrierkurve dargestellt. Zur Erstellung dieser Kalibrierkurve wurde nach der von Hoffman und Laris [128] verwendeten Methode vorgegangen (vergl. Abbildung 4-31): Zuerst wurde der Carbocyaninfarbstoff vorgelegt (A), anschließend stieg die Fluoreszenz bei Zugabe der Vesikel (B) weiter an. Dieser Anstieg zeigt die Membranbindung des Farbstoffmoleküls und die damit verbundene Polaritätsänderung in dessen Umgebung an [127]. Zu diesem Zeitpunkt lag innerhalb der Vesikel eine Kaliumkonzentration von 150 mM vor. Im Puffer außerhalb der Vesikel betrug die Konzentration 5 mM (E). Nach Zugabe von Valinomycin (C) und dem damit verbundenen Potenzialaufbau ergab sich erneut ein Anstieg der Fluoreszenz, welcher die Bildung des Membranpotenzials für Kaliumionen widerspiegelt. Das Potenzial innerhalb der Vesikel berechnet sich nach der Nernst-Gleichung auf $U = -90$ mV (siehe Anhang C-G). Die Erhöhung der Kaliumkonzentration außerhalb der Vesikel durch die Zugabe definierter Mengen einer 3 M KCl-Lösung in das externe Medium (D) baut den Konzentrationsgradienten schrittweise ab. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenzintensität auf den dem jeweils vorliegenden Konzentrationsgradienten α_K^a / α_K^i entsprechenden Wert

abnimmt. Da in Abbildung 4-31 die Verdünnungseffekte, die durch die schrittweise Zugabe der 3 M KCl-Lösung entstehen, nicht berücksichtigt werden, fällt die Fluoreszenz im Schaubild unter den durch $\Delta F = 0$ gegebenen Wert. Bei der Auswertung der Kalibrierkurve in Abbildung 4-32 sind Verdünnungseffekte dann berücksichtigt. Mögliche Fluoreszenzeffekte, die auf durch Verdünnung veränderte Streueigenschaften der Vesikel zurückzuführen wären, können vernachlässigt werden, denn derartige Signale, die von einer Vesikelsuspension ohne den Carbozyaninfarbstoff erhalten werden, liegen nach Hoffman und Laris [128] unter 1 % des Gesamtsignals einer farbstoffhaltigen Probe.

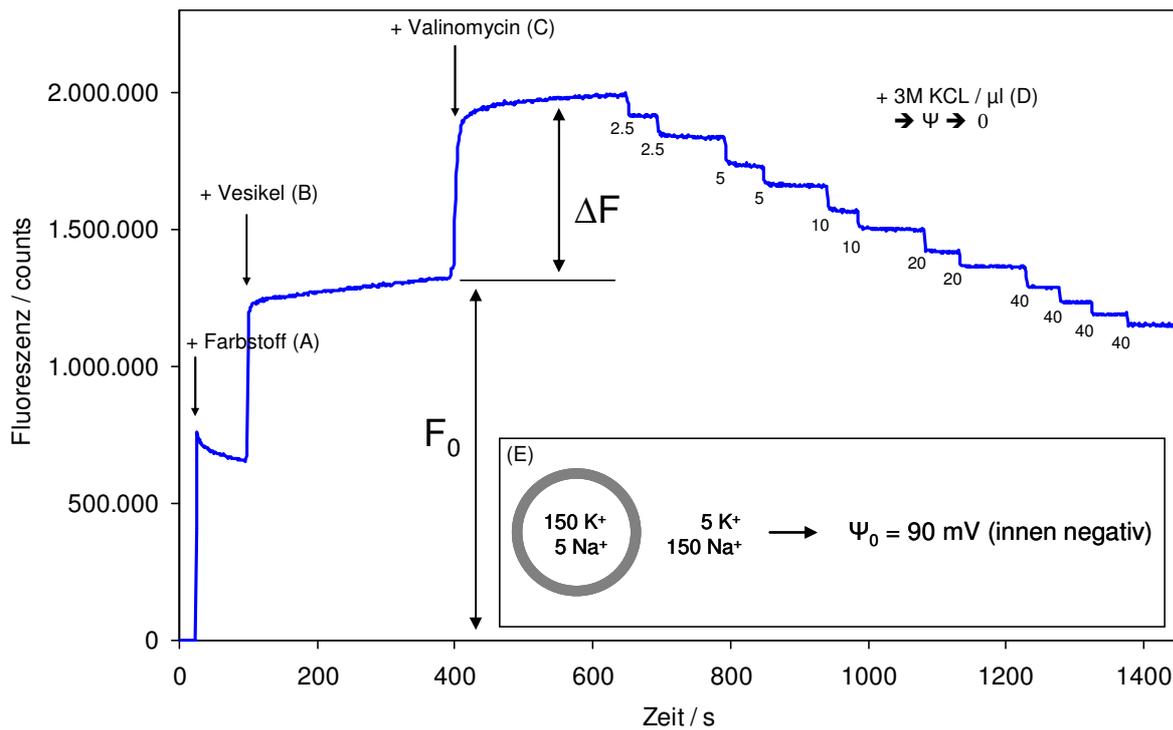


Abbildung 4-31: Messbeispiel zur Erstellung einer Kalibrierkurve

Nach dem Einlagern eines potenzial-sensitiven Farbstoffs in die Vesikelmembran (A & B) wird der Ionophor Valinomycin (C) zugegeben. Der Konzentrationsgradient von Kalium wird durch die Zugabe definierter Mengen einer 3 M KCl-Lösung schrittweise wieder abgebaut (D). Bei der Erstellung der Kalibrierkurve wird bei der Berechnung von $\Delta F/F_0$ die jeweilige Verdünnung berücksichtigt. Weitere Parameter: $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, POPC/POPE (70/30) Vesikel, Lipidkonzentration $200 \text{ } \mu\text{M}$, $C_{\text{Farbstoff}} = 4 \text{ } \mu\text{M}$, $C_{\text{Valinomycin}} = 80 \text{ nM}$, $\lambda_{\text{Excitation}} = 620 \pm 3 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 680 \pm 15 \text{ nm}$. (E) zeigt die zur Erzeugung eines Transmembranpotenzials von 90 mV (innen negativ) verwendeten Konzentrationen der Kalium- und Natriumionen in mM innerhalb und außerhalb der Vesikel.

Abbildung 4-32 zeigt das relative Fluoreszenzsignal $\Delta F/F_0$ als Funktion des Membranpotenzials, welches mit den zuvor gemessenen Daten (Abbildung 4-31) berechnet wurde (siehe Anhang C-G). F_0 ist dabei – wie aus Abbildung 4-31 ersichtlich wird – das Fluoreszenzsignal vor der Zugabe von Valinomycin. Nach Apell et al. [127] ist die

Kalibrierkurve ($\Delta F/F_0$ vs. Ψ) relativ temperaturstabil und ändert sich zwischen 6 °C und 22 °C nicht signifikant. $\Delta F/F_0$ ist im Bereich von -80 mV bis -40 mV eine lineare Funktion von Ψ .

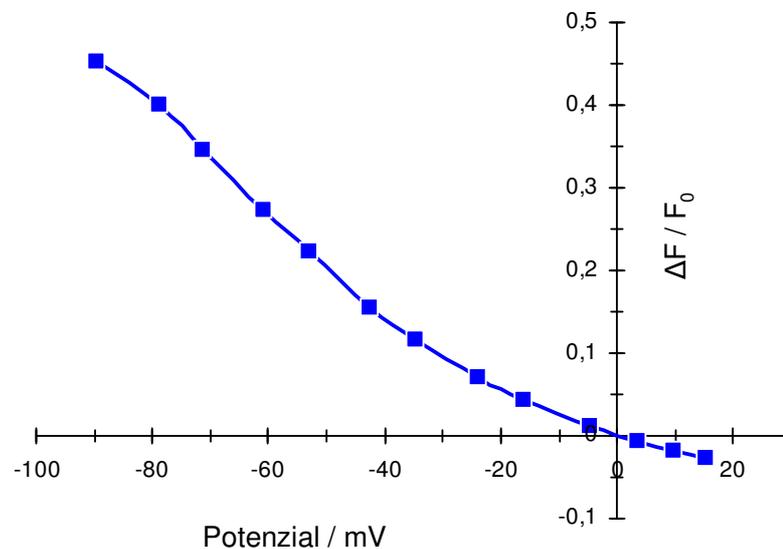


Abbildung 4-32: Kalibrierkurve

Mit den aus Abbildung 4-31 erhaltenen Werten lässt sich eine Kalibrierkurve erstellen, aus der das Potenzial innerhalb der Vesikel in Abhängigkeit des relativen Fluoreszenzsignals $\Delta F/F_0$ abgelesen werden kann. F_0 ist dabei – wie aus Abbildung 4-33 ersichtlich – die Fluoreszenzintensität bei Potenzial Null, d. h. vor der Zugabe von Valinomycin. ΔF ist die Erhöhung der Fluoreszenz abhängig vom jeweiligen Kaliumkonzentrationsgradienten c_K^a / c_K^i .

Auf Basis dieser Kalibrierexperimente wurde weiterhin ein möglicherweise bei TAT-Zugabe auftretender Stabilitätsverlust des Potenzials untersucht. Dazu erfolgte unter Verwendung des potenzialabhängigen Farbstoffs DiIC₁(5) und nach der Bildung eines stabilen Potenzials die Zugabe des CPP TAT im P/L von 1/50 zu den Vesikeln. Über den Farbstoff konnte daraufhin der Verlauf des Potenzials verfolgt werden. Abbildung 4-33 zeigt, dass bei Verwendung von TAT im Verhältnis 1:50 über einen Zeitraum von etwa 1 h keine Potenzialabnahme messbar ist. Bei einem P/L von 1/25 geht das Potenzial leicht zurück, innerhalb 1 h von -90 mV auf ca. -80 mV, und sollte somit als genügend stabil angesehen werden. Zur Überprüfung der Messungen wurde das Potenzial am Ende des Experimentes durch die Zugabe von 150 mM KCl vollständig abgebaut.

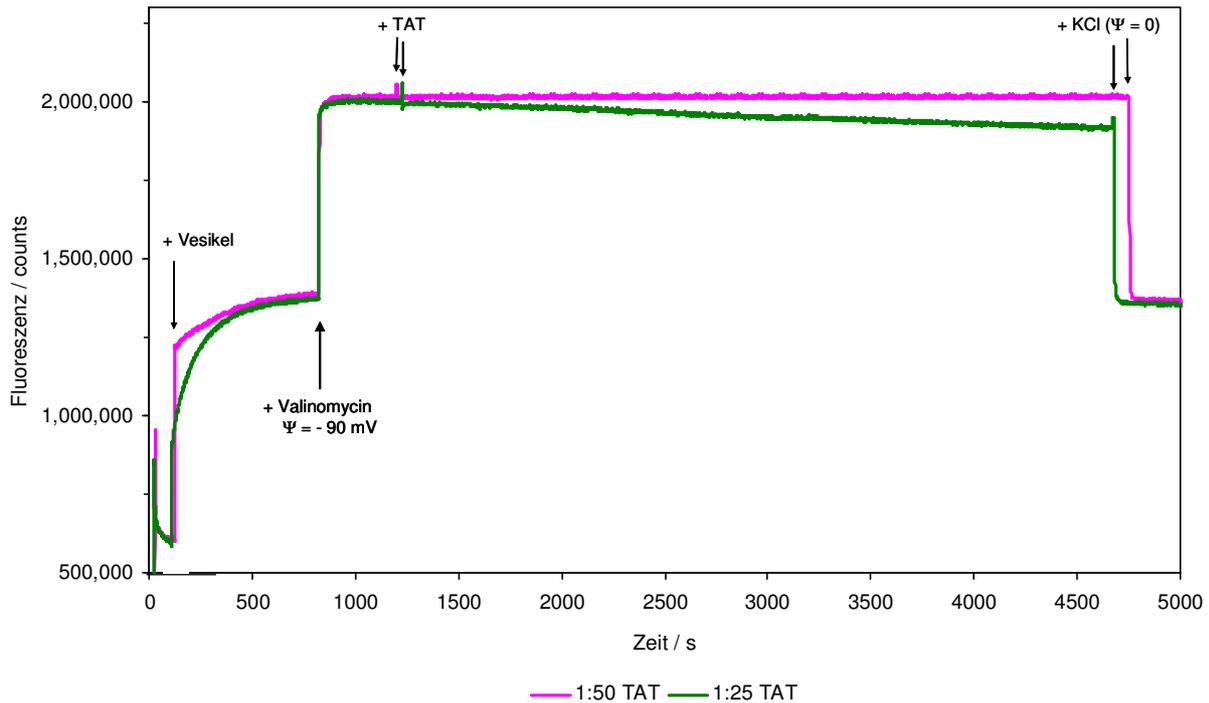


Abbildung 4-33: Membranpotenzial nach Zugabe von TAT

Nach Zugabe eines potenzialsensitiven Farbstoffs, der Vesikel und des Ionophors Valinomycin wurde die Stabilität des Potenzials nach Zugabe von TAT überprüft. Im P/L von 1/50 zugegebenes TAT hat keinen messbaren Effekt auf die Stabilität des Potenzials. Im P/L von 1/25 zugegebenes TAT vermindert das Potenzial über einen Zeitraum von etwa 1 h von -90 mV auf ca. -80 mV. Durch Zugabe von 150 mM KCl am Ende der Versuche wurde der Potenzialnullpunkt erhalten. Weitere Parameter: POPC/POPG 70/30-Vesikel, T = 37 °C.

Die genügende Stabilität eines über der Membran angelegten Potenzials sowie die ausreichende Sicherheit bezüglich des Reduktionsmitteleinschlusses durch die Verwendung von dextrangebundenem GSH machen nun die Durchführung der geplanten Translokationsversuche mit dem CPP TAT an Vesikeln unterschiedlicher Zusammensetzungen mit und ohne Membranpotenzial möglich.

Vesikelpräparation für TAT-FQC-Experimente mit und ohne Potenzial

Zur Herstellung der Vesikel wurde eine 40 mg/ml-Lipidmischung mit Rhodamin-PE im molaren Verhältnis von 10^{-4} in Puffer (K^+ , Na^+ - und Phosphatpuffer) verwendet. Diese wurde 1:1 mit 20 mg/ml GSH-Dextran und 20 μ M Carboxyfluorescein (im selben Puffer wie die Lipide) gemischt. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen wurde extrudiert. Dadurch wurden Vesikel mit 20 mg/ml Lipid, 10 mg/ml GSH-Dex und 10 μ M CF im jeweiligen Puffer erhalten. Für einen Versuch wurden jeweils 400 μ l Vesikellösung gewaschen.

Durchführung der Versuche mit TAT-FQC

Die Vesikel wurden 2 x mit 2 ml Spin Columns gewaschen und die Lipidkonzentration der gewaschenen Vesikel auf 500 μM eingestellt. Der durch das zweimalige Waschen nicht zu vermeidende Lipidverlust wurde in Kauf genommen, da die Abtrennung des GSH-Dextran als vordringlich erachtet wurde. Denn bei zweimaligem Waschen kann von einer Reduktion des GSH-Dextrans auf 10^{-6} ausgegangen werden. Schätzt man – unter der Berücksichtigung, dass 10 mg/ml GSH-Dextran etwa 5 mM GSH entsprechen – die außerhalb der Vesikel noch verbleibende GSH-Konzentration ab, so erhält man 1,3 nM. Dieser Wert liegt um einen Faktor von ca. 7500 unter dem Wert der eingesetzten TAT-FQC-Konzentration von 10 μM und wird somit zu einer vernachlässigbaren Reduktion führen.

Die Vesikel enthielten neben dem GSH-Dextran auch 10 μM CF, mit dessen Hilfe nach dem Waschen das innere Volumen jeder Probe bestimmt wurde. Dies wurde durchgeführt, um von jedem Vesikelpräparat vor den Messungen das innere Volumen zu bestimmen. Denn bei bekanntem innerem Volumen und mit der Kenntnis des Anteils an FQC, der im Verlauf eines Experimentes reduziert wurde, lässt sich die in den Vesikeln umgesetzte Konzentration an FQC berechnen und somit ein Anreicherungsfaktor des Peptids ermitteln.

Während der Durchführung der Experimente wurden die Proben fortlaufend gerührt und die Temperatur durch einen Thermostaten konstant bei 37 °C gehalten. Um Stör- und Streu-Artefakte zu vermeiden, wurde dem Emissionsmonochromator ein optischer Kantenfilter (GG395, 2mm Dicke, Schott, Mainz) vorangestellt.

Die Translokationsmessungen erfolgten mit Vesikeln unterschiedlicher Zusammensetzungen in einer Lipidkonzentration von 500 μM und einer TAT-FQC-Zugabe bei einem P/L von 1/50. In einigen Fällen wurde die TAT-FQC-Zugabe auch auf ein P/L von 1/25 angehoben. Die Anregungswellenlänge lag bei 322 nm, die Emissionswellenlänge bei 425 nm.

Bei den Messungen wurden zunächst die Vesikel vorgelegt, und nach Stabilisieren der Nulllinie wurde TAT-FQC zugegeben. Die erfolgende Änderung der Fluoreszenzintensität wurde sodann über einen Zeitraum bis zu 2 h verfolgt. Üblicherweise wurden nach etwa 1 h konstante Amplitudenwerte beobachtet, und die Messung wurde 10 min nach der Zugabe von 5 mM GSH beendet. Der damit erhaltene Fluoreszenzwert entspricht der kompletten Reduktion des TAT-FQC und repräsentiert den 100 %-Wert, auf den die durch TAT-Zugabe erhaltenen Werte bezogen wurden.

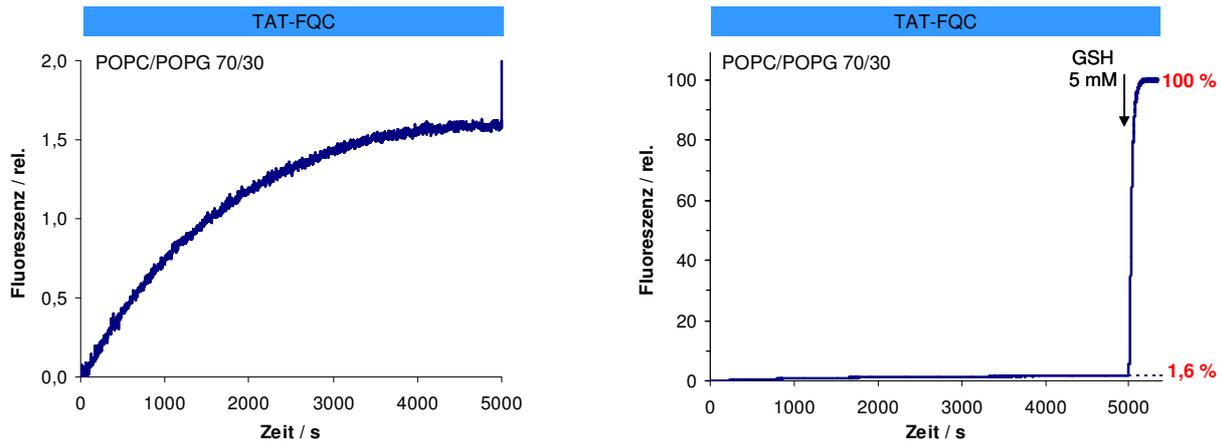


Abbildung 4-34: Signalverlauf der TAT-FQC-Reduktion bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln

Dargestellt ist das Ansteigen der Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten nach TAT-FQC-Zugabe bei $t = 0$ zu mit 10 mg/ml GSH-beladenen Vesikeln. Das Signal mündet nach ca. 70 min auf ein konstantes Niveau (links). Nach 80 min wurde die Messung durch Zugabe von 5 mM GSH beendet (rechts). Aus dem Verhältnis der Signalamplituden, hier nach 70 min, und nach kompletter Reduktion wird der Anteil von gespaltenem, d. h. umgesetztem TAT-FQC von 1,6 % erhalten. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 500\text{ }\mu\text{M}$, $P/L = 1/50$, Phosphatpuffer pH 7,4.

Als Beispiel zeigt Abbildung 4-34 den Versuch mit der Lipidmischung POPC/POPG (70/30), wobei TAT-FQC mit einem P/L von 1/50 zugegeben wurde. Der dabei beobachtete Anstieg der Fluoreszenz erfolgte über ca. 70 min und erreichte dann ein konstantes Niveau. Die Signalamplitude insgesamt, d. h. der nach 90 min erreichte Wert im Verhältnis zum maximal erreichbaren, nach vollständiger Reduktion erhaltenen Wert, beträgt hier 1,6 %. Dies ist ein mittlerer Wert; bei diesen Messungen, die mit verschiedenen Lipidmischungen durchgeführt wurden, stieg die Fluoreszenzintensität durchweg im Bereich von 1 bis 2 % an. Die Zeitverläufe waren ebenfalls sehr ähnlich, und es konnten bei diesen Messungen nur geringe Tendenzen zu verstärkenden oder abschwächenden Versuchsparametern – wie eben der Lipidzusammensetzung – festgestellt werden.

Analog zu den gerade beschriebenen Translokationsversuchen wurden Experimente mit einem angelegten Membranpotenzial von -90 mV (innen negativ) durchgeführt, ebenfalls mit Vesikeln verschiedener Lipidzusammensetzung. Die hier erhaltenen relativen Wertes des Umsatzes an TAT-FQC lagen eher unter 1 %, und es wurden auch keine größeren relativen Umsätze erhalten, wenn – wie in einigen Fällen geschehen – das P/L auf 1/25 angehoben wurde.

Da mittels des ebenfalls in die Vesikel eingeschlossenen CF das innere Volumen bei jedem Experiment mitbestimmt werden konnte, war – bei Kenntnis der im Vesikelinnern umgesetzten TAT-FQC-Menge – die Ermittlung der Konzentration im Innern und damit die Berechnung eines Anreicherungsfaktors möglich. Bei allen untersuchten Lipidmischungen

wurde etwa 1 % des eingesetzten FQC umgesetzt. Das innere Volumen der Vesikel lag durchweg im Bereich von etwa 1 %, so dass sich überschlagsweise ein Anreicherungsfaktor von etwa 10 ergab. Dieser Faktor zeigte bezüglich der verschiedenen Lipidzusammensetzungen keine eindeutige Tendenz zu eventuell verstärkenden oder abschwächenden Faktoren. Jedoch sind im Vergleich der Experimente ohne und mit Potenzial die Faktoren bei angelegtem Potenzial etwas vermindert. Bei den Experimenten mit DMPC und DMPC/DMPG ergaben sich deutlich höhere Faktoren im Bereich von 30 bis 40. Dies dürfte jedoch auf die scheinbar kleinen Innenvolumina zurückzuführen sein, die bei diesen Vesikeln erhalten wurden. Die mit dem Einschluss von CF bestimmten Werte lagen hier im Mittel bei 0,25 μl , also ca. einen Faktor 6 kleiner als bei den übrigen Vesikeln. Da es naheliegend ist, dass bei DMPC im Temperaturbereich um den Phasenübergang ein partielles Leakage des eingeschlossenen Farbstoffes CF erfolgen könnte, wird das über diese Methode bestimmte innere Volumen zu klein ausfallen. In Tabelle 4-2 sind die erhaltenen Ergebnisse aufgelistet. Neben Angaben über die Lipidzusammensetzung der Vesikel, die Temperatur, das P/L-Verhältnis und das Potenzial ψ werden die bestimmten Vesikelinnenvolumina ($\sum V_{\text{Vesikel}}$), der relative Anteil an umgesetztem TAT-FQC sowie die berechnete Anreicherung von TAT in den Vesikeln angegeben.

Tabelle 4-2: Übersicht der TAT-FQC Experimente an Vesikeln

Bei allen Experimenten mit Lipidvesikeln verschiedener Zusammensetzung ($c_{\text{Lipid}} = 500 \mu\text{M}$) wird ein Umsatz des eingesetzten TAT-FQC von ca. 1 % gefunden. Bezogen auf das Vesikelinnenvolumen (ca. 1% des Gesamtvolumens V_G) berechnet sich daraus ein Anreicherungsfaktor von ca. 10. Die erhöhten Faktoren bei den Vesikeln mit DMPC ergeben sich durch den Bezug auf das geringe Innenvolumen, dessen Bestimmung bei diesem Lipid fehlerhaft sein dürfte.

Lipidmischung	T / °C	P/L	Ψ / mV	$\sum V_{\text{Vesikel}}$ / μl	$\sum V_{\text{Vesikel}}$ / V_G	Umsatz TAT-FQC / %	TAT _i / TAT _a
POPE/POPG 70/30	37	1/50	0	1,2	$8,0 \times 10^{-4}$	1,2	14,5
POPE/POPG 70/30	37	1/50	-90	1,5	$1,0 \times 10^{-3}$	1,3	13,0
POPC/Chol 90/10	37	1/50	0	1,6	$1,1 \times 10^{-3}$	1,3	12,2
POPC/Chol 90/10	37	1/50	-90	1,6	$1,1 \times 10^{-3}$	1,1	10,4
POPC/POPG 70/30	37	1/50	0	2,6	$1,7 \times 10^{-3}$	1,6	9,0
POPC/POPG 70/30	37	1/50	-90	2,2	$1,5 \times 10^{-3}$	1,2	8,0
POPC/POPG 50/50	37	1/50	0	2,3	$1,5 \times 10^{-3}$	2,0	13,3
POPC/POPG 50/50	37	1/50	-90	2,6	$1,7 \times 10^{-3}$	2,1	12,3

Lipidmischung	T / °C	P/L	Ψ / mV	$\sum V_{\text{Vesikel}} / \mu\text{l}$	$\sum V_{\text{Vesikel}} / V_G$	Umsatz TAT-FQC / %	TAT _i / TAT _a
POPC	37	1/25	0	1,1	$7,3 \times 10^{-4}$	0,9	5,7
POPC	37	1/25	-90	1,4	$9,3 \times 10^{-4}$	1,0	5,3
LM _{wbc}	37	1/25	0	1,1	$7,3 \times 10^{-4}$	1,2	8,2
LM _{wbc}	37	1/25	-90	1,2	$8,0 \times 10^{-4}$	1,1	6,9
DMPC	25	1/25	0	0,23	$1,5 \times 10^{-4}$	1,2	37,0
DMPC	25	1/25	-90	0,25	$1,7 \times 10^{-4}$	1,1	32,0
DMPC/DMPG 70/30	25	1/25	0	0,22	$1,5 \times 10^{-4}$	1,3	42,5
DMPC/DMPG 70/30	25	1/25	-90	0,24	$1,6 \times 10^{-4}$	1,4	41,7

4.5.2 Diskussion

Nachdem TAT-induziertes Leakage von FD70 mittels des Antikörper-Assays nicht festgestellt werden konnte, war davon auszugehen, dass Dextrane dieser Molmasse stabil in den Vesikeln verbleiben. Konsequenterweise wird daher auch das synthetisierte GSH-Dextran mit Molmasse 70 kDa sicher eingeschlossen bleiben. Die Stabilität des Dextran-Einschlusses in Vesikel generell wurde am Beispiel der stark Leakage verursachenden Peptide PGLa und Magainin 2 deutlich demonstriert, da unter Bedingungen, bei denen niedermolekulare Komponenten ein 100%iges Leakage zeigen, FD70 zu 100 % in den Vesikeln verblieb.

Peptidtranslokationsversuche des synthetisierten TAT-FQC wurden sowohl an Lipidmischungen mit negativer Nettoladung wie POPE/POPG 70/30, POPC/POPG 70/30, POPC/POPG 50/50, LM_{wbc} und DMPC/DMPG 70/30 sowie an den neutralen Mischungen POPC, POPC/Chol 90/10 und DMPC durchgeführt. DMPC und DMPC/DMPG 70/30-Experimente wurden nahe der Phasenübergangstemperatur von L_α in die sogenannte „rippled phase“ (P_β) bei 25 °C durchgeführt. Afonin et al. [129] erhielten unter diesen Bedingungen Hinweise auf eine mögliche Proteintranslokation von TAT nach dem Modell einer invertierten Mizelle. Physiologisch relevant ist dieser Lipidzustand insofern, dass auch in Membranen lebender Zellen ungeordnete Lipidzustände beispielsweise an der Grenze zu Transmembranproteinen oder im Zusammenhang mit Lipid Rafts auftreten können [129].

Der Anreicherungsfaktor, welcher sich aus den erhaltenen relativen Umsätzen an gespaltenem FQC, welche ein Maß für die erfolgte TAT-Translokation darstellen, und aus der Kenntnis des jeweiligen inneren Volumens der Vesikel berechnet, liegt im Mittel bei 10.

Da membranaktive Peptide eine positive Nettoladung haben, und die Peptidtranslokation den Kontakt der Peptide mit der Membran voraussetzt, müssten in jedem Falle an negativ geladenen und neutralen Membranen Unterschiede zu beobachten sein. Dies ist auch der Fall, denn bei Lipidmischungen, die anionische Lipide enthielten, war eine verstärkende Tendenz durchaus festzustellen. Im Falle von POPC mit verschiedenen POPG-Anteilen (0 %, 30 % und 50 %) ist die Erhöhung des Faktors von knapp 6 auf ca. 13, also eine relative Erhöhung um 200 % doch deutlich zu erkennen. Eine elektrostatisch vermittelte Interaktion scheint somit bei der Translokation beteiligt zu sein.

Weiterhin müsste das Anlegen eines Membranpotenzials (innen negativ) die Translokation der kationischen Peptide deutlich begünstigen. In diesem Fall steht die beobachtete, eher abschwächende Wirkung eines Membranpotenzials bei allen getesteten Mischungen im Gegensatz und auch fast im Widerspruch zu der von Terrone et al. [64] am Beispiel des CPP Penetratin beobachteten verstärkenden Wirkung eines Potenzials auf die Translokation bis zu einem Faktor 90! Eine potenzialabhängige Translokation konnte in der vorliegenden Arbeit im Falle des CPP TAT nicht verifiziert werden. Stattdessen wurde eine eher elektrostatisch vermittelte Translokation und Anreicherung im Vesikelinnern gefunden. Dies legt nahe, dass TAT über einen anderen Mechanismus durch die Membran permeiert als z. B. Penetratin, dessen Translokation stark vom Potenzial beeinflusst wird.

Nach Abschluss der experimentellen, hier dargestellten Arbeiten wurde von Yang et al. [4] ein Zusammenhang zwischen der Translokation von TAT und dem Vorliegen der Lipidkomponente Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) in Lipidvesikeln gefunden. BMP, ein Strukturisomer von PG, ist ein für späte Endosomen spezifisches Lipid. Die von den Autoren diskutierte modellhafte Vorstellung der Translokation ist, dass zunächst eine Bindung von TAT an BMP-haltige Liposomen erfolgt, und nach anschließender Fusion, die mit deutlichem Leakage niedermolekularer Stoffe einhergeht, transloziert das Peptid durch die Membran. Möglicherweise stellt BMP tatsächlich einen wesentlichen Parameter für die Translokation von TAT dar. Yang et al. führten ihre Experimente in einem Puffer mit leicht saurem pH-Wert von 5,5 durch, analog den Verhältnissen in späten Endosomen. Dadurch und durch die Verwendung von Lipidmischungen mit 77 mol% BMP wurden in Ansätzen Bedingungen simuliert, wie sie in späten Endosomen vorliegen.

Inwieweit der in dieser Arbeit verwendete Translokations-Assay mit Lipidvesikeln, die einen hohen Anteil BMP enthalten, in saurem Milieu einsetzbar wäre, verbliebe abzuklären. Zwar

wäre zu erwarten, dass ein Leakage des Reduktionsmittels durch Verwendung von GSH-Dextran weitgehend unterbunden werden könnte, jedoch wird der Quencher n-Tyr aufgrund der pH-Abhängigkeit seines Absorptionsspektrums für den Assay nicht geeignet sein. Ein unter sauren Bedingungen anwendbares Konstrukt müsste somit vorab noch entwickelt werden.

4.6 Fluoreszenzmessungen zur Peptidtranslokation in Zellen

Mit der in dieser Arbeit verwendeten und von Meldal und Breddam [21] eingeführten Fluoreszenz-Quencher-Methode wurden von Mattias Hällbrink [23] und Imre Mäger [24] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ülo Langel Versuche an Zellen durchgeführt. Hierbei wurden menschliche Melanomzellen (engl.: Bowes human melanoma cells) (ATCC CRL-9607) und HeLa-Zellen (ATCC CCL-2) verwendet und mit Peptidkonzentrationen im Bereich zwischen 0,1 und 10 μM behandelt. Die Aufnahme verschiedener CPPs – unter anderen TAT – in diese Zellen konnte durch fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen gezeigt werden.

Im Folgenden wird das TAT-FQC-Konstrukt nun an KG-1a-Zellen (ATCC CCL-246.1) untersucht. Diese permanente Zelllinie wurde erstmals 1980 von H. Philip Koeffler et al. [130] beschrieben. Es handelt sich hierbei um Myeloblasten in einem sehr jungen Stadium. Sie wurden aus einer KG-1-Zelllinie [131] isoliert und sind im Gegensatz zu dieser unempfindlich gegenüber Kolonie-stimulierenden Faktoren (engl.: colony-stimulating factor, CSF), was zur Folge hat, dass sie sich nicht weiter differenzieren. KG-1-Zellen stammen ursprünglich aus dem Knochenmark eines an akuter myeloischer Leukämie erkrankten, 59 Jahre alten Mannes. Im Gegensatz zu Bowes human melanoma-Zellen und HeLa-Zellen, die adherent sind, handelt es sich bei KG-1a-Zellen um Suspensionszellen. Dass diese Zellen nicht an den Küvettenboden und -wänden adherieren, ist bei fluoreszenzspektroskopischen Versuchen von Vorteil. Ihr Durchmesser wurde am Mikroskop bestimmt und variiert zwischen 12 und 20 μm .

4.6.1 Ergebnisse

Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 16 μm errechnet sich das Volumen einer kugelförmigen Suspensionzelle zu $2,1 \times 10^{-12}$ l, und somit ergeben 500.000 Zellen ein Volumen von ca. 1 μl , ein den Vesikeln vergleichbares Innenvolumen. Zur Messung der TAT-FQC-Translokation wurde eine bestimmte Menge der Zellen bei 200 x g für 4 min abzentrifugiert, anschließend im Messpuffer (1,5 ml PBS +/- oder direkt in 1,5 ml Kulturmedium) resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Excitation}} = 322$ nm und $\lambda_{\text{Emission}} = 425$ nm) erfolgte dann unter Rühren bei 37 °C über einen Zeitraum von 90 min. Um Stör- und Streu-Artefakte zu vermeiden, wurde dem Emissionsmonochromator ein optisches Kantenfilter (GG395, 2mm Dicke, Schott, Mainz) vorangestellt. Parallel zu den Fluoreszenzmessungen wurden Zellvitalitätstests an den gleichen Proben mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellen wurden in PBS +/- bei 37 °C über mehrere Stunden inkubiert. Die stündliche Auswertung ergab auch nach 4 h keine nennenswerte Zellmortalität.

Abbildung 4-35 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz nach Zugabe von 10 μM TAT-FQC zu unterschiedlichen Mengen von KG-1a-Zellen. Nach 70 min wurde durch Zugabe von 5 mM des Reduktionsmittels GSH das noch nicht umgesetzte TAT-FQC reduziert und so der 100 %-Wert erhalten, auf den die entsprechende Messung normiert wurde. Bei allen Messungen, die bei 37 °C durchgeführt wurden (farbige Kurven) war eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz zu erkennen. Es zeigte sich außerdem ein klarer und in etwa linearer Zusammenhang zwischen der Zellmenge, d. h. dem in der Küvette vorhandenen Innenvolumen, und der Signalamplitude. Wurden jedoch 2 Millionen Zellen statt bei 37 °C bei 7 °C mit TAT-FQC behandelt, konnte keine Änderung der Fluoreszenz beobachtet werden.

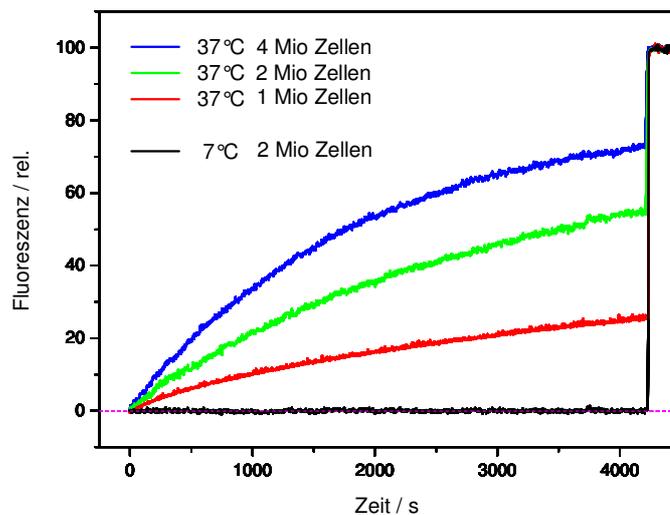


Abbildung 4-35: TAT-FQC-Reduktion in KG-1a-Zellen

Gezeigt ist die relative Fluoreszenz von TAT-FQC im zeitlichen Verlauf nach der Zugabe zu unterschiedlichen Mengen von KG-1a-Zellen. Die Ordinate ist relativ skaliert auf den durch Zugabe von 5 mM GSH erhaltenen 100 %-Wert. Die Messungen fanden in PBS +/- bei 37 °C bzw. 7 °C statt. Weitere Parameter: $\lambda_{\text{Excitation}} = 322 \pm 3 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 425 \pm 3 \text{ nm}$.

1 Million Zellen entsprechen nach der obigen Abschätzung etwa einem Innenvolumen von 2 μl . Das entsprechende Signal weist nach 70 min eine Signalamplitude von ca. 25 % auf. Dieser Umsatz – bezogen auf die Gesamtmenge des im Versuch eingesetzten TAT-FQC ($10 \mu\text{M} \times 1,5 \text{ ml} \times 0,25 = 3,75 \text{ nmol}$) in einem Innenvolumen von 2 μl – ergibt eine Konzentration von 1,9 mM in den Zellen und somit eine Anreicherung um den Faktor 190. Diese Abschätzung zum einen und die Tatsache zu anderen, dass ein klarer Zusammenhang zwischen der Zellzahl und damit dem Innenvolumen zu beobachten ist, spiegelt die bei KG-1a-Zellen erfolgende Translokation des CPP TAT wider.

Weiterhin erkennt man in Abbildung 4-35 einen deutlichen Effekt der Temperatur, bei 7 °C erfolgt keine Reduktion von TAT-FQC, also keine Translokation.

Um die im vorigen Experiment beobachtete Temperaturabhängigkeit der TAT-FQC-Translokation bei KG-1a-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Temperatur während des Experiments verändert. Zuerst wurden 2 Millionen Zellen über 10 min auf 7 °C abgekühlt, dann wurde 10 µM TAT-FQC zugegeben (t = 0). Über einen Zeitraum von 1 h bei 7 °C konnte keine Erhöhung von Fluoreszenz beobachtet werden. Anschließendes Aufwärmen auf 37 °C innerhalb von 400 s führte nach Abschluss der Aufwärmphase zur Erhöhung der Fluoreszenz auf etwa 50 % und somit zur Aufnahme von TAT-FQC (siehe Abbildung 4-36).

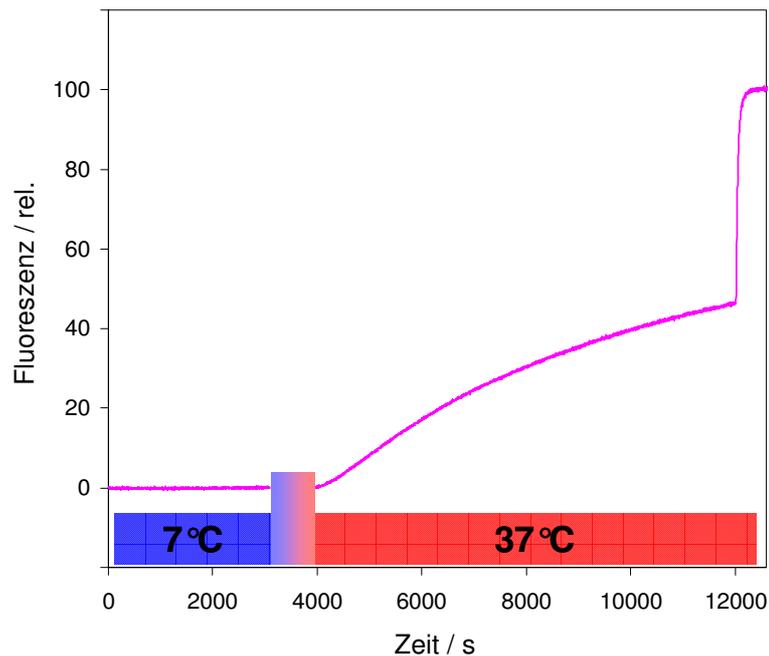


Abbildung 4-36: Temperatureffekte der TAT-FQC-Reduktion in KG-1a-Zellen

Bei 7 °C ist keine TAT-FQC-Reduktion und damit keine Translokation in KG-1a-Zellen nachweisbar. Nach Erwärmung auf 37 °C erfolgt eine TAT-FQC-Translokation. Die Werte sind bezogen auf den durch Zugabe von 5 mM GSH erhaltenen 100 %-Wert. Eingesetzt wurden 2 Millionen KG-1a-Zellen. Die Messung fand in PBS ++ statt. Weitere Parameter: $\lambda_{\text{Excitation}} = 322 \pm 3 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 425 \pm 3 \text{ nm}$.

4.6.2 Diskussion

Die Translokation von TAT-Peptiden in eukaryotische Zellen konnte bisher an verschiedenen Zellen wie HeLa-Zellen [14, 23, 24, 132, 133], CCL39 (Chinese Hamster Ovary-Zellen) [14], HEK 293-Zellen [134] und Tex.loxP.EG-Zellen [19] gezeigt werden. Auch scheint die Translokation nicht auf Heparansulfat-Proteoglykane als Bindungsstellen angewiesen zu sein, wie Silhol et al. 2002 an CHO-Mutanten nachweisen konnten [133]. An MDCK- [135] und CaCo2-Zellen [132] konnte dagegen keine Translokation beobachtet werden.

Die Translokation eines TAT-Peptids in intakte KG-1a-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit deutlich gezeigt werden. Aufgrund der Funktionsweise des Assays, d. h. der Verwendung eines FQCs, das unter den reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma umgesetzt wird, kann eine eventuell erfolgende Akkumulation des Peptids auf der Zelloberfläche als Ursprung des Fluoreszenzsignals ausgeschlossen werden und somit die tatsächliche Peptidtranslokation nachgewiesen werden. Abbildung 4-35 zeigt klar den Zusammenhang der Menge translozierten TAT-Peptids mit der verwendeten Zellzahl, d. h. mit dem zur Verfügung stehenden inneren Volumen. Im Verlauf von 1 bis 2 h erreicht die Fluoreszenzintensität ein konstantes Plateau, und die Translokation des CPP in das Zellinnere scheint zum Erliegen zu kommen. Eine Abschätzung der erfolgten Akkumulation ergibt, dass bei 1 Million Zellen mit einem Innenvolumen von 2 μl eine Anreicherung des CPP TAT etwa um den Faktor 200 erfolgt, und dieser damit eine Größenordnung über den bei Lipidvesikeln erhaltenen Faktoren liegt. Durch Abkühlung auf 7 °C wird die Translokation effektiv unterbunden. Wärmt man derartig vorbehandelte Zellen auf 37 °C auf, so kann die zunächst unterbundene Peptidtranslokation wieder beobachtet werden. Dieses Verhalten lässt auf einen energieabhängigen, endozytotischen Aufnahmemechanismus für das CPP TAT schließen.

4.7 Ausblick

Wie die Arbeiten von Terrone et al. [64] und Yang et al. [4] stellvertretend für viele gezeigt haben, können Experimente mit künstlichen Vesikeln durchaus Beiträge zum Verständnis des Translokationsverhaltens membranaktiver Peptide leisten. Jedoch geben die in Kapitel 4.3 durchgeführten Leakage-Experimente an einer ganzen Reihe membranaktiver Peptide Hinweise, mit welchen Einschränkungen gegebenenfalls zu rechnen ist. So werden Translokationsuntersuchungen mit dem hier vorgestellten Versuchssystem, bei dem die Integrität der Vesikel in jedem Fall erhalten bleiben muss, für einige der Peptide wie z. B. MAP und Transportan aufgrund ihrer zerstörenden Wirkung auf Vesikelmembranen nicht durchführbar sein. Außerdem sind Experimente mit solch aggressiven Peptiden, sofern sie ein stabiles Membranpotenzial zur Translokation benötigen, in Frage zu stellen. Hier erweist sich die Membranaggressivität als Ausschlusskriterium, da die Stabilität eines ionenvermittelten Potenzials sehr empfindlich auf geringste Störungen der Membranintegrität reagiert.

Im Gegensatz zu den aggressiven amphiphilen Peptiden scheint jedoch das TAT-System einen relativ zerstörungsfreien Weg durch Zellmembranen zu finden. Angesichts der beobachteten hohen Anreicherung von TAT-FQCs in den lebenden KG-1a Zellen erscheint daher die Verwendung dieses reduktionssensitiven Reportersystems zur Untersuchung des Translokationsverhaltens membranaktiver Peptide an anderen Modellorganismen möglich und durchaus Erfolg versprechend. Als Tiermodell ist hier besonders der Zebrafisch *Danio rerio* geeignet, da dessen Entwicklung außerhalb des Mutterleibs verläuft. Die Embryonen sind durchsichtig und somit sind alle Zellen sichtbar. Zum Abschluss und Ausblick dieser Dissertation wurden bereits erste Untersuchungen an 16 h alten Embryonen durchgeführt. Ein Beispiel ist in Abbildung 4-37 dargestellt, es zeigt die Fluoreszenz eines mit TAT-FQC behandelten und eines unbehandelten Embryos im Vergleich. Im oberen Teil der Abbildung 7-3 ist der unbehandelte Embryo zu sehen, links die Aufnahme im Durchlicht, rechts die zugehörige Fluoreszenzaufnahme. Im Vergleich dazu zeigt der untere Teil der Abbildung einen mit TAT-FQC behandelten Embryo mit deutlich erhöhter Fluoreszenz.

Da für die Aufnahmen der Fluoreszenz eine Belichtungszeit von 6 s erforderlich war, ergab sich ein eingeschränktes Zeitfenster, innerhalb dessen die Versuche durchgeführt werden mussten. Denn aufgrund der benötigten langen Belichtungsdauer konnten an älteren Embryonen, die bereits eine beachtliche Beweglichkeit aufweisen, keine Fluoreszenzaufnahmen mehr mit der erforderlichen Qualität erhalten werden.

Eine Möglichkeit der Fixierung der Embryonen wäre die Behandlung mit dem Anästhetikum 3-Aminobenzoessäureethylester Methansulfonat (MESAB), das hier jedoch wegen seiner Fluoreszenzeigenschaften nicht verwendbar ist. Ein eher Erfolg versprechender Lösungsansatz wäre die Verwendung einer Mutante die sich während ihrer Entwicklung nicht bewegt, wie beispielsweise eine *ache* Mutante [136].

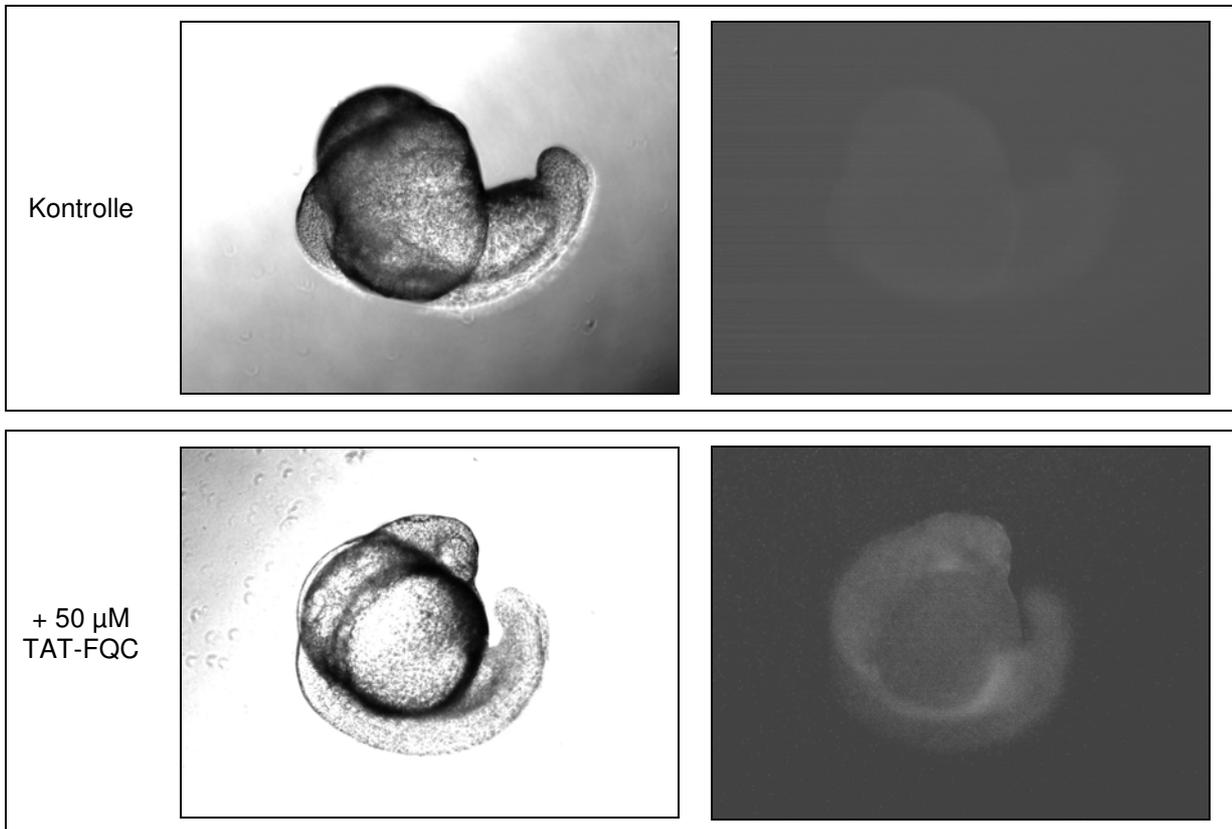


Abbildung 4-37: Mikroskopaufnahmen eines mit TAT-FQC behandelten und eines unbehandelten Zebrafisch-Embryos

Im oberen Teil ist ein 16 h alter Embryo mit etwa 1 mm Durchmesser gezeigt, links im Durchlicht, rechts die zugehörige Fluoreszenzaufnahme. Im unteren Teil ist im Vergleich ein gleichaltriger Embryo dargestellt, der über 90 min mit 50 µM TAT-FQC behandelt wurde. Deutlich zu erkennen ist die erhöhte Fluoreszenz des behandelten Embryos (unten rechts). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem invertierten Fluoreszenzmikroskop, Typ Zeiss Axiovert 200 M, bei 6-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 6 s erhalten. Bandpassfilter Anregung 320 - 380 nm, Bandpassfilter Emission 420 - 470 nm.

Wie in der vorliegenden Arbeit insgesamt gezeigt, stellt also die Verwendung von FQC-markierten membranaktiven Peptiden, insbesondere durch ihre Einsetzbarkeit an Systemen unterschiedlicher Komplexität, eine viel versprechende Möglichkeit dar, die Translokation und/oder Transportprozesse über Biomembranen in Echtzeit und quantitativ zu verfolgen. Auf Basis der vorgestellten Ergebnisse können somit weitere Versuche gezielt geplant werden und in Arbeiten an höheren Organismen einfließen, um optimierte Transportsysteme für membranimpermeable Substanzen zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Membranaktive Peptide wie antimikrobielle und zellpenetrierende Peptide können mit Biomembranen in sehr unterschiedlicher Weise interagieren. Dies reicht von der schonenden Membrantranslokation und Penetration in Zellen bis hin zur Permeabilisierung von Membranen in unterschiedlichem Ausmaß, was zur Membranlyse und Zerstörung von Zellen führen kann. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen, welche die spezifische Wirkung eines Peptides bedingen, überwiegend nicht bekannt.

Ziel der Arbeit war es daher, Faktoren aufzuzeigen, welche die Wirkungen membranaktiver Peptide beeinflussen bzw. verstärken oder abschwächen. Zum einen wurde hierzu die durch unterschiedliche Peptide verursachte Destabilisierung der Membranintegrität umfassend untersucht und quantifiziert, zum anderen wurde auf Basis dieser Ergebnisse ein für Translokationsuntersuchungen geeignet erscheinendes Peptid ausgewählt, und dessen Aufnahme in künstliche Lipidvesikel als auch in lebende Zellen untersucht.

Die Untersuchung der membranschädigenden Wirkung wurde mit elf antimikrobiellen Peptiden, neun zellpenetrierenden Peptiden und einem fusogenen Peptid durchgeführt. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen einer verstärkten lytischen Wirkung und dem erhöhten Lysingehalt der Peptidsequenz festgestellt werden. Argininreiche Peptide, deren Vertreter überwiegend bei den zellpenetrierenden Peptiden zu finden sind, zeigten eine deutlich schwächere Wirkung. Die synergistisch verstärkend wirkenden antimikrobiellen Peptide PGLa und Magainin 2 zeigten bei Anwesenheit anionischer Membranlipide verstärkte Porenbildung, wobei die deutlichsten Verstärkungen bei Lipidzusammensetzungen erhalten wurden, welche prokaryotische Membranen simulieren. Hingegen zeigte das in eukaryotischen Membranen vorkommende Cholesterin eine sehr ausgeprägte, die Synergie abschwächende Wirkung. Zusammen erklären diese Effekte sowohl die Präferenz dieser beiden antimikrobiellen Peptide bezüglich bakterieller Membranen wie auch deren geringe Wirkung gegenüber eukaryotischen Biomembranen.

Das zellpenetrierende Peptid TAT stellte sich aufgrund seiner nur schwach ausgeprägten membranschädigenden Wirkung als geeignetes Peptid für Translokationsversuche dar, und seine Penetration in lebende T-Lymphozyten konnte mit einem enzymatischen Nachweisverfahren demonstriert werden. Zur Untersuchung der Translokation in Lipidvesikel wurde ein reduktionssensitives fluorogenes Konstrukt synthetisiert, das unter reduzierenden Bedingungen über eine Fluoreszenzverstärkung den erfolgten Membrandurchtritt anzeigt. Als eine notwendige Voraussetzung erwies sich hierbei die stabile Fixierung des Reduktionsmittels Glutathion im Vesikelinnern, welche durch Bindung an das polare Makromolekül Dextran gelang. Bei Lipidvesikeln verschiedener Zusammensetzung wurde eine deutlich messbare Aufnahme des Peptids TAT in das Innere beobachtet, die nach ca. 1 h einen Sättigungswert erreichte, welcher im Mittel einem Anreicherungsfaktor von etwa 10 entsprach. Allerdings konnte durch Anwesenheit anionischer Lipide nur eine geringe Erhöhung der Anreicherung festgestellt werden, und keine verstärkende Tendenz durch Anlegen eines Membranpotenzials. Im Vergleich hierzu ergaben Translokationsversuche an lebenden KG-1a-Zellen eine deutlich stärker ausgeprägte TAT-Aufnahme mit einem Anreicherungsfaktor von etwa 200. Die charakteristische Temperaturabhängigkeit der Translokation legt nahe, dass die Aufnahme des zellpenetrierenden Peptids TAT über Endozytose erfolgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen deutlich auf spezifische Einflüsse von Membranlipiden hin, welche Veränderungen der Wirksamkeit membranaktiver Peptide induzieren können.

6 Literatur

- [1] Henriques ST, Melo MN, Castanho MARB: Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochemical Journal* **399**, 1-7 (2006).
- [2] Heitz F, Morris MC, Divita G: Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology* **157**, 195-206 (2009).
- [3] Tünnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, Cardoso MC: Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *The FASEB Journal* **20**, 1775-1784 (2006).
- [4] Yang ST, Zaitseva E, Chernomordik LV, Melikov K: Cell-Penetrating Peptide Induces Leaky Fusion of Liposomes Containing Late Endosome-Specific Anionic Lipid. *Biophysical Journal* **99**, 2525-2533 (2010).
- [5] Shai Y: Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 55-70 (1999).
- [6] Matsuzaki K: Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 1-10 (1999).
- [7] Yang L, Weis TM, Lehrer RI, Huang HW: Crystallization of Antimicrobial Pores in Membranes: Magainin and Protegrin. *Biophysical Journal* **79**, 2002-2009 (2000).
- [8] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW: Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal* **81**, 1475-1585 (2001).
- [9] Zasloff M: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395 (2002).
- [10] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A: Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 18188-18193 (1996).
- [11] Jenssen H, Hamill P, Hancock REW: Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 491-511 (2006).
- [12] Andreu D, Rivas L: Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers* **47**, 415-433 (1998).
- [13] Stewart KM, Horton KL, Kelley SO: Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Organic & Biomolecular Chemistry* **6**, 2242-2255 (2008).
- [14] Vivès E, Brodin P, Lebleu B: A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 16010-16017 (1997).
- [15] Langel Ü: Cell-penetrating peptides. *CRC Press*, Boca Raton-London-New York-Washington, D.C. (2002).
- [16] Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Langel Ü: Cell penetration by transportan. *The FASEB Journal*. **12**, 67-77 (1998).

- [17] Fischer PM, Zhelev NZ, Wang S, Melville JE, Fahraeus R, Lane DP: Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector penetratin. *Journal of Peptide Research* **55**, 163-172, (2000).
- [18] Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Ghen LL, Pepinsky B, Barsoum J: Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 664-668 (1994).
- [19] Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF: Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature Medicine* **10**, 310-315 (2004).
- [20] Lin Q, Jo D, Gebre-Amlak KD, Ruley HE: Enhanced cell-permeant Cre protein for site-specific recombination in cultured cells. *BMC Biotechnology* **4**, 25 (2004).
- [21] Meldal M, Breddam K: Anthranilamide and Nitrotyrosine as a Donor-Acceptor Pair in Internally Quenched Fluorescent Substrates for Endopeptidases: Multicolumn Peptide Synthesis of Enzyme Substrates for Subtilisin Carlsberg and Pepsin. *Analytical Biochemistry* **195**, 141-147 (1991).
- [22] Duus JØ, Meldal M, Winkler JR, Fluorescence Energy-Transfer Probes of Conformation in Peptides: The 2-Aminobenzamide/Nitrotyrosine Pair, *Journal of Physical Chemistry B* **102**, 6413-6418 (1998).
- [23] Hällbrink M, Florén A, Elmquist A, Pooga M, Bartfai T, Langel Ü: Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1515**, 101-109 (2001).
- [24] Mäger I, Eiríksdóttir E, Langel K, El Andaloussi S, Langel Ü: Assessing the uptake kinetics and internalization mechanisms of cell-penetrating peptides using a quenched fluorescence assay. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1798**, 338-343 (2009).
- [25] Steinem C, Janshoff A: Modellmembranen auf Oberflächen. *Chemie in unserer Zeit* **42**, 116-127 (2008).
- [26] Tan S: Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* **8**, 3924-3932 (2008).
- [27] Rietveld A, Simons K: The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Biomembranes* **1376**, 467-479 (1998).
- [28] Singer SJ, Nicolson GL: The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
- [29] Rothman JE, Lenard J: Membrane Asymmetry. *Science* **195**, 743-753 (1977).
- [30] Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GM: Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 112-124 (2008).
- [31] Marsh D: Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes. *Biophysical Journal* **93**, 3884–3899 (2007).

-
- [32] Van Meer G, Lisman Q: Sphingolipid Transport: Rafts and Translocators. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 25855-25858 (2002).
- [33] Jablonski A: Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik* **94**, 38-46 (1935).
- [34] Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer*, New York (2006).
- [35] Jo D, Nashabi A, Doxsee C, Lin Q, Unutmaz D, Chen J, Ruley HE: Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nature Biotechnology* **19**, 929-933 (2001).
- [36] Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-23 (1979).
- [37] <http://expasy.org>
- [38] Schägger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kd. *Analytical Biochemistry* **166**, 368–379 (1987).
- [39] Merrifield RB: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149-2154 (1963).
- [40] Eichler J, Houghten RA: Synthesis of cyclic disulfide peptides: comparison of oxidation methods. *Protein and Peptide Letters* **4**, 157-164 (1997).
- [41] Deutsches Patent- und Markenamt, Zweibrückenstraße 12, 80331 München; <http://depatisnet.dpma.de>
- [42] Radbruch A: Flow Cytometry and Cell Sorting. Springer, Berlin-Heidelberg (2010).
- [43] Longobardi Givan A: Flow Cytometry – First Principles. *Wiley Liss*, New York (1992).
- [44] Nebe CT: Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* **23**, 111-113 (1996).
- [45] Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599 (1975).
- [46] Abremski K, Hoess R, Sternberg N: Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**, 1301–1311 (1983).
- [47] Sternberg N, Hamilton D, Austin S, Yarmolinsky M, Hoess R.: Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1**, 297–309 (1981).
- [48] Guo G, Gopaul DN, Van Duyne GD: Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a sitespecific recombination synapse. *Nature* **389**, 40-46 (1997).
- [49] Joshi Sk, Hashimoto K, Koni PA: Induced DNA Recombination by Cre Recombinase Protein Transduction. *Genesis* **33**, 48-54 (2002).
- [50] Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H: Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 6232–6236 (1992).
-

- [51] Morgenstern JP, Land H: Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helperfree packaging cell line. *Nucleic Acids Research* **18**, 3587–3596 (1990).
- [52] Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D: Production of high-titer helperfree retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 8392–8396 (1993).
- [53] Will E, Klump H, Heffner N, Schwieger M, Schiedlmeier B, Ostertag W, Baum C, Stocking C: Unmodified Cre recombinase crosses the membrane. *Nucleic Acids Research* **30**, e59 (2002).
- [54] Shaw PA, Catchpole IR, Goddard CA, Colledge WH: Comparison of Protein Transduktion Domains in Mediating Cell Delivery of a Secreted CRE Protein. *Biochemistry* **47**, 1157-1166 (2008).
- [55] Le Y, Gagneten S, Tombaccini D, Bethke B, Sauer B: Nuclear targeting determinants of the phage P1 Cre DNA recombinase. *Nucleic Acids Research* **27**, 4703-4709 (1999).
- [56] Förster T: Energiewandering and Fluoreszenz. *Naturwissenschaftler* **33**, 166-175 (1946).
- [57] Aslund F, Berndt KD, Holmgren A: Redox Potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 30780–6 (1997).
- [58] Rathinakumar R, Wimley WC: Biomolecular Engineering by Combinatorial Design and High-throughput Screening: Small, Soluble Peptides that Permeabilize Membranes. *Journal of American Chemical Society* **130**, 9849-9858 (2008).
- [59] Ellens H, Bentz J, Szoka FC: pH-Induced Destabilization of Phosphatidylethanolamine-Containing Liposomes: Role of Bilayer Contact. *Biochemistry* **23**, 1532-1538 (1984).
- [60] Leidl K, Liebisch G, Richter D, Schmitz G: Mass spectrometric analysis of lipid species of human blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**, 655-664 (2008).
- [61] Matsuzaki K, Harada M, Handa T, Funakoshi S, Fujii N, Yajima H, Miyajima K: Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **981**, 130-134 (1989).
- [62] Jin Y, Hammer J, Pate M, Zhang Y, Zhu F, Zmuda E, Blazyk J: Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic β -Sheet and α -Helical Potentials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 4957-4964 (2005).
- [63] Ladokhin AS, Selsted ME, White SH: Sizing Membrane Pores in Lipid Vesicles by Leakage of Co-Encapsulated Markers: Pore Formation by Melittin. *Biophysical Journal* **72**, 1762-1766 (1997).
- [64] Terrone D, Sang SLW, Roudaia L, Silviu JR: Penetratin and Related Cell-Penetrating Cationic Peptides Can Translocate Across Lipid Bilayers in the Presence of a Transbilayer Potential. *Biochemistry* **42**, 13787-13799 (2003).
- [65] Blazyk J, Wiegand R, Klein J, Hammer J, Epanand RM, Epanand RF, Maloy WL, Kari UP: A Novel linear Amphipathic β -Sheet Cationic Antimicrobial Peptide with Enhanced

- Selectivity for Bacterial Lipids. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 27899-27906 (2001).
- [66] Bürck J, Roth S, Wadhvani P, Afonin S, Kanithasen N, Strandberg E, Ulrich AS: Conformation and Membrane Orientation of Amphiphilic Helical Peptides by Oriented Circular Dichroism. *Biophysical Journal* **95**, 3872-3881 (2008).
- [67] Meyer CE, Reusser F: A polypeptide antibacterial agent isolation from *Triconderma viride*. *Experientia* **23**, 85-86 (1967).
- [68] Qian S, Wang W, Yang L, Huang HW: Structure of the Alamethicin Pore Reconstructed by X-Ray Diffraction Analysis. *Biophysical Journal* **94**, 3512-3522 (2008).
- [69] Hall JE, Vodyanoy I, Balasubramanian TM, Marshall GR: Alamethicin. A rich model for channel behavior. *Biophysical Journal* **45**, 233-247 (1984).
- [70] Mak DOD, Webb WW: Two Classes of Alamethicin Transmembrane Channels: Molecular Models from Single-Channel Properties. *Biophysical Journal* **69**, 2323-2336 (1995).
- [71] Habermann E, Jentsch J: Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hope-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 37-50 (1967).
- [72] Terwilliger TC, Eisenberg D: The Structure of Melittin, *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 6610-6015 (1982).
- [73] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW: Barrel-stave model of toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal* **81**, 1475-1485 (2001).
- [74] Maloy WL, Kari UP: Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* **37**, 105-122 (1995).
- [75] Hoffmann W, Richter K, Kreil G: A novel peptide designated PYLa and its precursor as predicted from cloned mRNA of *Xenopus laevis* skin. *European Molecular Biology Organization Journal* **2**, 711-714 (1983).
- [76] Strandberg E, Kanithasen N, Tiltak D, Bürck J, Wadhvani P, Zwernemann O, Ulrich AS: Solid-State NMR Analysis Comparing the Designer-Made Antibiotic MSI-103 with Its Parent Peptide PGLa in Lipid Bilayers. *Biochemistry* **47**, 2601-2616 (2008).
- [77] Strandberg E, Tiltak D, Ieronimo M, Kanithasen N, Wadhvani P, Ulrich AS: Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and haemolytic activities of cationic α -helical Peptides. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 717-728 (2007).
- [78] Zasloff M: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5449-5453 (1987).
- [79] Matsuzaki K, Sugishita K, Miyajima K: Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of Gram-negative bacteria. *FEBS Letters* **449**, 221-224 (1999).
- [80] Matsuzaki K: Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochimica et Biophysica Acta* **1376**, 391-400 (1998).

- [81] Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D: Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry* **242**, 788-792 (1996).
- [82] Mangoni ML: Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 1060-1069 (2006).
- [83] Gause, GF, Brazhnikova MG: Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature* **154**, 703 (1944).
- [84] Gause GF, Brazhnikova MG: Gramicidin S. Origin and mode of action. *Lancet* **247**, 715-716 (1944).
- [85] Berditsch M, Afonin S, Ulrich AS: The Ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) To Produce the Antibiotic Gramicidin S Is Correlated with Phenotype Variation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6620-6628 (2007).
- [86] Hancock REW, Chapple DS: Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323 (1999).
- [87] Zhang L, Dhillon P, Yan H, Farmer S, Hancock REW. Interactions of Bacterial Cationic Peptide Antibiotics with Outer and Cytoplasmic Membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3317-3321 (2000).
- [88] Ulrich AS: Solid State ¹⁹F-NMR Analysis of Oriented Biomembranes, in: Webb GA (ed.): *Modern Magnetic Resonance*, 261-267 (2008).
- [89] Badosa E, Ferre R, Planas M, Feliu L, Besalú E, Cabrefiga J, Bardají E, Montesinos E: A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* **28**, 2276-2285 (2007).
- [90] Eggenberger K, Mink C, Wadhvani P, Ulrich AS, Nick P: Using the Peptide Bp100 as a Cell-Penetrating Tool for the Chemical Engineering of Actin Filaments within Living Plant Cells. *Chembiochem* **12**, 132-137 (2011).
- [91] Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschenz E, Melzig M, Bienert M, Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the Potenzial to deliver polar compounds into the cell interior non-endolytically: *Biochimica et Biophysica Acta* **1414**, 127-139 (1998).
- [92] Soomets U, Lindgren M, Gallet X, Hällbrink M, Elmquist A, Balaspiri L, Zorko M, Pooga M, Brasseur R, Langel Ü: Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta* **1467**, 165-176 (2000).
- [93] Lin Y, Yao S, Hawiger J: Role of the Nuclear Localization Sequence in Fibroblast Growth Factor-1-stimulated Mitogenic Pathways. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 5305-5308 (1996).
- [94] Lindberg M, Jarvet J, Langel U, Gräslund A: Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide Transportan in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry* **40**, 3141-3149 (2001).
- [95] Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz G, Divita G: A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnology* **19**, 1173-1176 (2001).

-
- [96] Henriques ST, Castanho MA: Consequences of nonlytic membrane perturbation to the translocation of the cell penetrating peptide pep-1 in lipidic vesicles. *Biochemistry* **43**, 9716-9724 (2004).
- [97] Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A: The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 10444-10450 (1994).
- [98] Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB (2000). The design, synthesis and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13003–13008.
- [99] Fernandez-Carneado J, Kogan MJ, Castel S, Giralt E: Potenzial peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of γ -zein. *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 1811–1814 (2004).
- [100] Pujals S, Fernandez-Carneado J, Lopez-Iglesias C, Kogan MJ, Giralt E: Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**, 264–279 (2006).
- [101] Pujals S, Giralt E: Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 473-484 (2008).
- [102] Vives E, Brodin P, Lebleu B: A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 16010-16017 (1997).
- [103] Gump JM, Dowdy SF: TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *TRENDS in Molecular Medicine* **13**, 443-448 (2007).
- [104] Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP: Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 637-651 (2005).
- [105] Bosch ML, Earl PL, Fargnoli K, Picciafuoco S, Giombini G, Wong-Staal F, Franchini G: Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science* **244**, 694-697 (1989).
- [106] Castano S, Desbat B: Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1715**, 81-95 (2005).
- [107] Zheng Z, Yang R, Bodner ML, Weliky DP: Conformational flexibility and strand arrangements of the membrane-associated HIV fusion peptide trimer probed by solid-state nmr spectroscopy. *Biochemistry* **45**, 12960-12975 (2006).
- [108] Reichert J, Grasnack D, Afonin S, Bürck J, Wadhvani P, Ulrich AS: A critical evaluation of the conformational requirements of fusogenic peptides in membranes. *European Biophysics Journal* **36**, 405-413 (2007).
- [109] Wadhvani P, Reichert J, Bürck J, Ulrich AS: Antimicrobial and cell penetrating peptides can trigger membrane fusion by folding and aggregation. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Biophysical Journal* (2011).
-

- [110] Soravia E, Martini G, Zasloff M: Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Letters* **228**, 337–340 (1988).
- [111] Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L: Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* **323**, 268-275 (2004).
- [112] Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van't Hof W, Veerman ECI, Amerongen AVN: A critical comparison of the haemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters* **449**, 105-110 (1999).
- [113] Westerhoff HV, Zasloff M, Rosner JL, Hendler RW, De Waal A, Vaz Gomes A, Jongsma APM, Riethorst A, Juretic D: Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *European Journal of Biochemistry* **228**, 257-264 (1995).
- [114] Vaz Gomes A, De Waal A, Berden JA, Westerhoff HV: Electric Potentiation, Cooperativity, and Synergism of Magainin Peptides in Protein-Free Liposomes. *Biochemistry* **32**, 5365-5372 (1993).
- [115] Wieprecht T, Apostolov O, Beyermann M, Seeling J, Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry* **39**, 442-452 (2000).
- [116] Glaser RW, Sachse C, Dürr UHN, Wadhvani P, Ulrich AS: Orientation of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes determined from ¹⁹F-NMR dipolar couplings of 4-CF₃-phenylglycine labels. *Journal of Magnetic Resonance* **168**, 153-163 (2004).
- [117] Glaser RW, Sachse C, Dürr UHN, Afonin S, Wadhvani P, Strandberg E, Ulrich AS: Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes observed by solid-state ¹⁹F-NMR. *Biophysical Journal* **88**, 3392-3397 (2005).
- [118] Afonin S, Grage SL, Ieronimo M, Wadhvani P, Ulrich AS: Temperature-Dependent Transmembrane Insertion of the Amphiphilic Peptide PGLa in Lipid Bilayers Observed by Solid State ¹⁹F NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 16512-16514 (2008).
- [119] Matsuzaki K, Mitani Y, Akada K, Murase O, Yoneyama S, Zasloff M, Miyajima K: Mechanism of Synergism between Antimicrobial Peptides Magainin 2 and PGLa. *Biochemistry* **37**, 15144-15153 (1998).
- [120] Tremouilhac P, Strandberg E, Wadhvani P, Ulrich AS: Synergistic Transmembrane Alignment of the Antimicrobial Heterodimer PGLa/Magainin. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 32089-32049 (2006).
- [121] Strandberg E, Tremouilhac P, Wadhvani P, Ulrich AS: Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/Magainin 2 complex studied by solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 1667-1679 (2009).
- [122] Epand RM, Epand RF, Arnusch CJ, Papahadjopoulos-Sternberg B, Wang G, Shai Y : Lipid clustering by three homologous arginin-rich antimicrobial peptides is insensitive to amino acid arrangement and induced secondary structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1798**, 1272-1280 (2011).

-
- [123] Leidl K, Liebisch G, Richter D, Schmitz G: Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**, 655-664 (2008).
- [124] Willialms RW, Starman R, Taylor KMP, Gable K, Becker T, Zasloff M, Covell D: Raman Spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides Magainin 2a und PGLa. *Biochemistry* **29**, 4490-4496 (1990).
- [125] Stutzin A: A fluorescence assay for monitoring and analyzing fusion of biological membrane vesicles in vitro. *FEBS Letters* **197**, 274-280 (1986).
- [126] Lüdi H, Oetliker H, Brodbeck U, Ott P, Schwendimann B, Fulpius BW: Reconstitution of pure acetylcholine receptor in phospholipid vesicles and comparison with receptor-rich membranes by the use of a potentiometric dye. *The Journal of Membrane Biology* **74**, 75-84 (1983).
- [127] Apell HJ, Marcus MM, Anner BM, Oetliker H, Läger P: Optical Study of Active Ion Transport in Lipid Vesicles Containing Reconstituted Na, K-ATPase. *The Journal of Membrane Biology* **85**, 49-63 (1985).
- [128] Hoffman JF, Laris PC: Determination of membrane potentials in human and *Amphiuma* red blood cells by means of a fluorescent probe. *Journal of Physiology London* **239**, 519-552 (1974).
- [129] Afonin S, Frey A, Bayerl S, Fischer D, Wadhvani P, Weinkauf S, Ulrich AS: The Cell-Penetrating Peptide TAT(48-60) Induces a Non-Lamellar Phase in DMPC Membranes. *ChemPhysChem* **7**, 2134-2142 (2006).
- [130] Koeffler HP, Billing R, Luisis AJ, Sparkes R, Golde DW: An Undifferentiated Variant Derived From the Human Acute Myelogenous Leukemia Cell Line (KG-1). *Blood* **65**(2), 265-273 (1980).
- [131] Koeffler HP, Golde DW: Acute myelogenous leukemia: A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**, 1153 (1978).
- [132] Violini S, Sharma V, Prior JL, Dyszlewski M, Piwnica-Worms D: Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: lack of correlation with heparan sulfate. *Biochemistry* **41**, 12652-12661 (2002).
- [133] Silhol M, Tyagi M, Giacca M, Lebleu B, Vivès E: Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *European Journal of Biochemistry* **269**, 494-501 (2002).
- [134] Niesner U, Halin C, Lozzi L, Günthert M, Neri P, Wunderlich-Allenspach H, Zardi L, Neri D: Quantitation of the tumor-targeting properties of antibody fragments conjugated to cell-permeating HIV-1 TAT peptides. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 729-736 (2002).
- [135] Krämer SD, Wunderli-Allenspach H: No entry for TAT(44-57) into liposomes and intact MDCK cells: novel approach to study membrane permeation of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1609**, 161-169 (2003).
- [136] Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strähle U: Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience* **5**, 111-118 (2002).
-

7 Anhang

7.1 Anhang A: Ergänzendes Material

7.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller / Bezugsquelle
Absauganlage Zellkulturlabor	HERAsafe®	Thermo Electron Corporation, St. Johann, Österreich
Autoklaven	Systec™ VX-95	Systec™ GmbH, Wettenberg
	Tuttnauer 2540EL	Tuttnauer Europe B. V., Breda, NL
Brutschrank	Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München
Dialyseklammern	Spectra/Por® Closures 55 mm	Spectrum Europe B.V., Breda, NL
	Spectra/Por® Magnetic Weighted Closures 55mm	Spectrum Europe B.V., Breda, NL
Econo Column	Aufreinigung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese	Bio-Rad Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Extruder	Avanti® Mini-Extruder	Avanti® Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA
Gelelektrophorese	Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock	Wealtec Corp. HB-2	Wealtec Corp., Sparks, NV, USA
HPLC	Diodenarray-Detektor	Jasco® GmbH Deutschland, Gross-Umstadt
	MD-2010	
	Entgaser	
	Degasys DG-1100	
	Hochdruckmischer	
	2080-DHD	
	manueller Injektor	
7725i Rheodyne		
Pumpen		
2087-PU		
Säulenthermostat		
CO-200		
Steuerbox		
Jasco®-LC-Net II / ADC		

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller / Bezugsquelle
HPLC Säule	UP5WTF-25QS, Modulo-Cart QS UPTISPHERE SWTF, 250 x 4,6 mm	Interchim SA France, Montluçon, Frankreich
LC/MS	Agilent 1100 series; micrOTOF LC	Bruker GmbH, Rheinstetten
Lyophilisator	Alpha 2-4 LD	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
MALDI-TOF	Massenspektrometer Autoflex® III	Bruker GmbH, Rheinstetten
Mikroskop	Axioskop 40	Carl Zeiss AG Deutschland, Jena
Mikrowelle	Samsung T.D.S.	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach/Ts.
Optische Filter	GG395, GG495, 2mm Dicke	Schott AG, Mainz
PCR-Cycler	PCR Express Hybaid	Labsystems GmbH, Quickborn
Peptidsynthesizer	433A	Applied Biosystems™, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Polycarbonat Membran	100 nm	Whatman®, Teil von GE Healthcare, München
Reinraumbank	HERAsafe®	Heraeus Instruments Uni
Schüttler	Inkubator shaker series innova® 44	New Brunswick, Teil von Eppendorf GmbH, Hamburg
Spektrometer (Fluorimeter)	FluoroMax-2®	HORIBA Jobin Yvon GmbH, München
Spektrometer (UV/Vis)	NanoDrop® 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	Shimadzu UV-2100	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
	SmartSpec™ 3000 Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH, Sankt Augustin-Buisdorf
Ultraschallgerät	Branson Sonifier® 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultraschallprozessor	UTR200	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller / Bezugsquelle
Waagen	Analytic CP64	Sartorius AG, Göttingen
	Mettler AE260 Deltarange®	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
	PB3001	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Wasserbad	006T	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zellzähler	CASY® TT	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Zentrifugen	Centrifuge 5415C	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Coulter TM Avanti® J-25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
	Sigma 2-6 swing-out	Sigma-Aldrich®, Steinheim
	Sigma 3-18K	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Zentrifugenrotor für Coulter TM Avanti J-25	Rotor: JLA-9100	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugenrotor für Sigma 2-6 swing-out	247 / J Rotor 11030 4000/min	Sigma-Aldrich®, Steinheim

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Modell	Hersteller / Bezugsquelle
Acrylküvetten	67.755	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Dialyseschlauch	MWCO: 12 kDa	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Eppendorf-Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (LowBind)	0,5 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg
Küvetenschleuder	KS 8	ITS – Thorsten Betzel, Hattersheim
Quarzküvetten	101-QS	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Skalierter Objektträger	Neubauer-improved	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SpinColumns	0,5 ml, 2 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sterilfilter	Minisart 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen

Materialbezeichnung	Modell	Hersteller / Bezugsquelle
Suspensionskulturflaschen	Cellstar® 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tandemküvette	58/Q/2x10	Starna GmbH, Pfungstadt
Zellkultur Microplatte	Cellstar® 96 Loch	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Cellstar® 60 x 15 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

7.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
1,1',3,3,3',3'-hexamethylindo-dicarbocyanin Iodid	Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich®, Steinheim
2-Chloritryl chloride	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
5(6)-Carboxyfluorescein	Sigma-Aldrich®, Steinheim
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	Sigma-Aldrich®, Steinheim
8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure	Invitrogen™, Molecular Probes®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Acetonitril	Biosolve, Valkenswaard, NL
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Bactotrypton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Benzamidin	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Chloramphenicol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Dextran 70.000, von <i>Leuconostoc spp.</i>	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Diethylether	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Eisessig	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Essigsäureanhydrid	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Teil von Merck KGaA, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Fermentas Page Ruler Unstained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Fluorescein isothiocyanat-dextran	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Guanidin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumsulfat	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
L-Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
N,N-Diisopropylethylamin	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
N,N-Dimethylformamid	Biosolve, Valkenswaard, NL
Natriumborhydrid	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Natriumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriummetaperiodat	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Natriumphosphatpuffer pH 7,4	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
N-Hydroxybenzotriazol	Biosolve, Valkenswaard, NL
Nickel-Nitrilotriessigsäure	Qiagen, Hilden
O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat	Biosolve, Valkenswaard, NL
Pefablock	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
Phenol	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Phosphatpuffer pH 7	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Piperidin	Biosolve, Valkenswaard, NL

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
p-Xylen-bis-pyridiniumbromid	Invitrogen™, Molecular Probes®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Sephacryl 100-HR	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Sephacryl 500-HR	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Tetrafluorethylen	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethyldiamin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thioanisol	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Trifluoressigsäure	Biosolve, Valkenswaard, NL
Triisopropylsilane	Teil von Merck KGaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Valinomycin	Sigma-Aldrich®, Steinheim

7.1.4 Chemikalien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
FCS Gold PAA (Serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glutamax	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Isoton	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Mem	Gibco®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Natrium-Pyruvat	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
PBS +/-	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640	Gibco®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
RPMI 1640 (-) L-Glutamine	Gibco®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau, Natrium ditolyldisazobis-8-amino-1-naphthol-3,6-disulfonat	Invitrogen®, Teil von Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA

7.1.5 Puffer und Lösungen

Reagenz zur Peptidabspaltung vom Harz

TFA	92,5 %
TIS	5 %
H ₂ O bidest.	2,5 %

Physiologischer Phosphatpuffer

Phosphatpuffer	20 mM
NaCl	130 mM
pH 7,4 mit NaOH eingestellt	

K⁺-Puffer

K ₂ SO ₄	72,5 mM
EDTA	1 mM
HEPES	10 mM
Mit 1M KOH auf pH 7,4 eingestellt	
c _K im Puffer nach pH-Einstellung: 150 mM	

Na⁺-Puffer

Na ₂ SO ₄	72,5 mM
EDTA	1 mM
HEPES	10 mM
Mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt	
c _{Na} im Puffer nach pH-Einstellung: 150 mM	

ANTS/DPX-Lösung 1,2 x isoton

ANTS	15 mM
DPX	54 mM
NaCl	32 mM
in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4	

DTNB-Lösung

DTNB	100 µM
------	--------

in 15 mM Phosphatpuffer pH 7

Luria Bertani (LB)-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
-------------	-------

Baktotrypton	1 %
--------------	-----

NaCl	0,5 %
------	-------

ad 1l H₂O bidest. pH 7,4

LB-Agar

Hefeextrakt	0,5 %
-------------	-------

Trypton	1 %
---------	-----

NaCl	0,5 %
------	-------

ad 1l H₂O bidest. pH vor Zugabe von Agar auf 7,4

Agar	1,5 %
------	-------

Chloramphenicol

Chloramphenicol	34 mg/ml
-----------------	----------

In EtOH

Kanamycin

Kanamycin	50 mg/ml
-----------	----------

Anodenpuffer SDS-PAGE

Tris-HCl	200 mM
----------	--------

pH 8,9

Kathodenpuffer SDS-PAGE

Tris	100 mM
------	--------

Kathodenpuffer SDS-PAGE

Tricine	100 mM
SDS	0,1 % (w/v)
pH 8,25	

2x SDS-PAGE Probenpuffer

Tris-Base pH 6,8	1,75 ml 1 M
Glycerin	1,5 ml
SDS (10 %)	5 ml
DTT	0,24 g
Bromphenolblau	1 kl. Spatelspitze
ad 10 ml H ₂ O bidest.	

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	2 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
KCl 1M	2,5 ml
Ad 1l H ₂ O bidest. pH auf 7,0 mit NaOH, autoklavieren	
Glucose 1 M (sterilfiltriert)	20 ml
MgSO ₄	20 mM

4x Tris-HCl-Puffer

Tris	6,05 g
H ₂ O bidest.	100 ml
pH 6,8 mit 1M HCl eingestellt, sterilfiltriert (0,45 µm Membran), Zugabe von	
SDS	0,4 g

Tris-Cl-Puffer

Tris	182 g
H ₂ O bidest.	500 ml
pH 8,45 mit 1M HCl eingestellt, sterilfiltriert (0,45 µm Membran), Zugabe von	

Tris-Cl-Puffer

SDS	1,5 g
-----	-------

Lysepuffer 10 ml pro g sedimentierter Zellen (Nassgewicht)

Imidazol	10 mM (pH 8,0)
Tris HCl	20 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
Lysozym (50 mg/ml)	100 µl pro g abzentrifugierter Zellen (Nassgewicht)
Pefablock (20 mM)	100 µl pro g abzentrifugierter Zellen (Nassgewicht)
Benzamidin (75 mg/ml)	100 µl pro g abzentrifugierter Zellen (Nassgewicht)
PMSF (100 mM in DMSO)	100 µl pro g abzentrifugierter Zellen (Nassgewicht)
Benzonase	2 µl pro g abzentrifugierter Zellen (Nassgewicht)

Waschpuffer

NaCl	1 M
------	-----

in Lysepuffer

Elutionspuffer

Imidazol	330 mM, 1 M
----------	-------------

In Lysepuffer

Fixierlösung

Glutardialdehyd	2,5 %
-----------------	-------

Coomassie-Färbelösung

Coomassie G-250	25 % (w/v)
Essigsäure	0,05 % (w/v)
EtOH	45 % (v/v)

Coomassie-Entfärber

Essigsäure	0,05 % (v/v)
EtOH	25 % (v/v)

7.1.6 Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Kulturmedium für KG-1a-Zellen	Kulturmedium für TEX.loxP.EG-Zellen
RPMI 1640	RPMI 1640 (-) L-Glutamine
10 % FBS Gold PAA	10 % FCS Gold PAA
1,5 % Glutamax	1,5 % Glutamax
1 % nicht-essentielle Aminosäuren	1 % MEM
1 % Natrium-Pyruvat	1 % Natrium-Pyruvat
0,5 % P/S	1 % P/S

7.2 Anhang B: Leakage-Daten

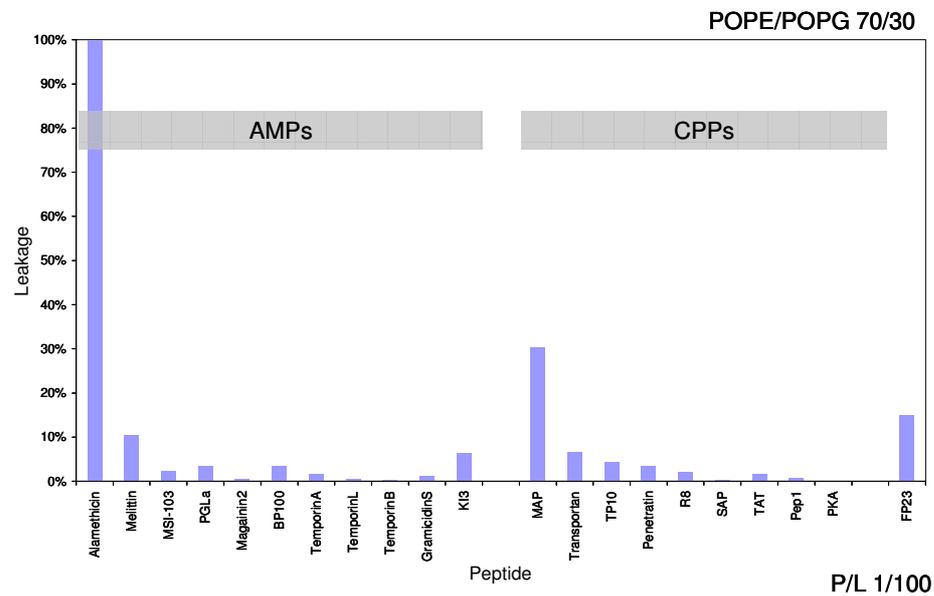


Abbildung 7-1: Peptidinduziertes Leakage bei POPE/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/100)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/100. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{Peptid}} = 4\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

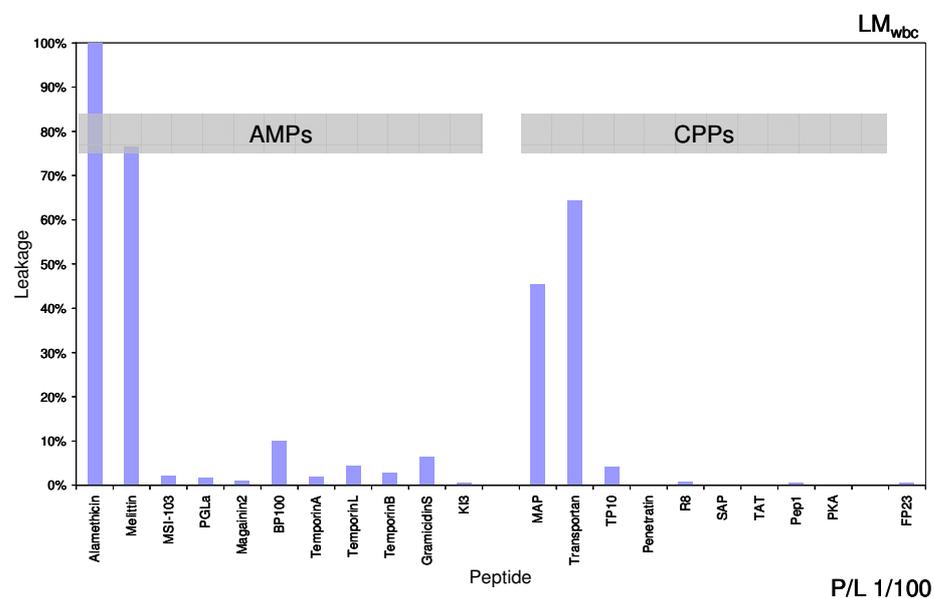


Abbildung 7-2: Peptidinduziertes Leakage bei LM_{wbc} -Vesikeln (P/L 1/100)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/100. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

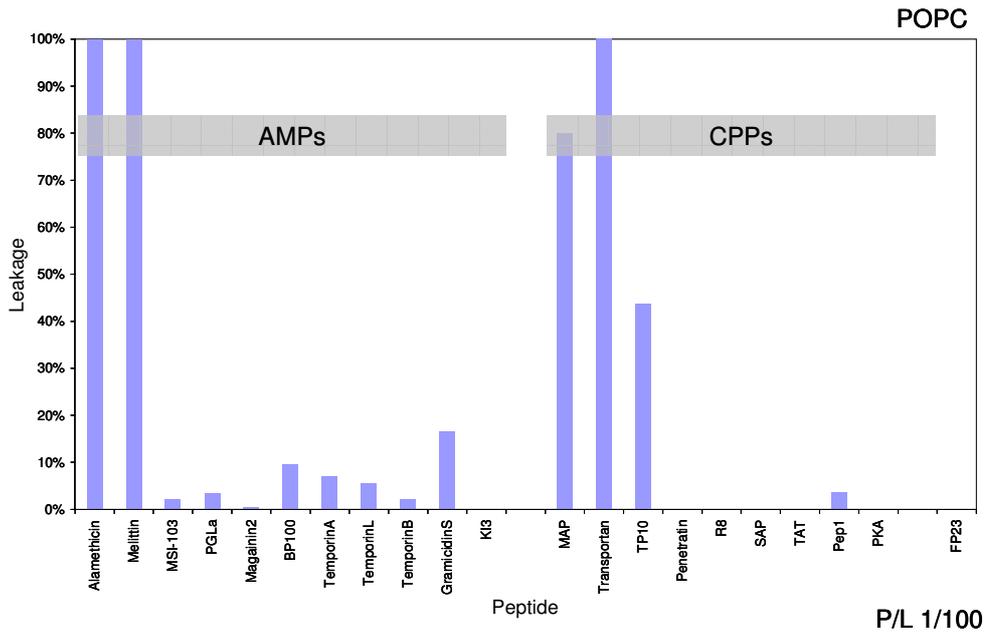


Abbildung 7-3: Peptidinduziertes Leakage bei POPC-Vesikeln (P/L 1/100)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/100. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, $c_{Lipid} = 200 \mu M$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

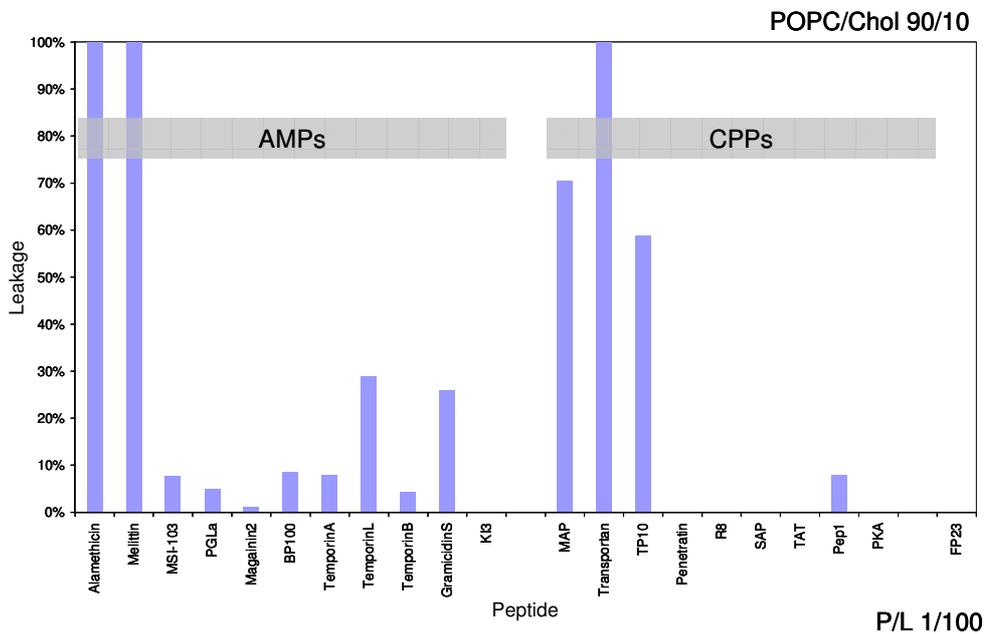


Abbildung 7-4: Peptidinduziertes Leakage bei POPC/Chol 90/10 Vesikeln (P/L 1/100)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/100. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, $c_{Lipid} = 200 \mu M$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

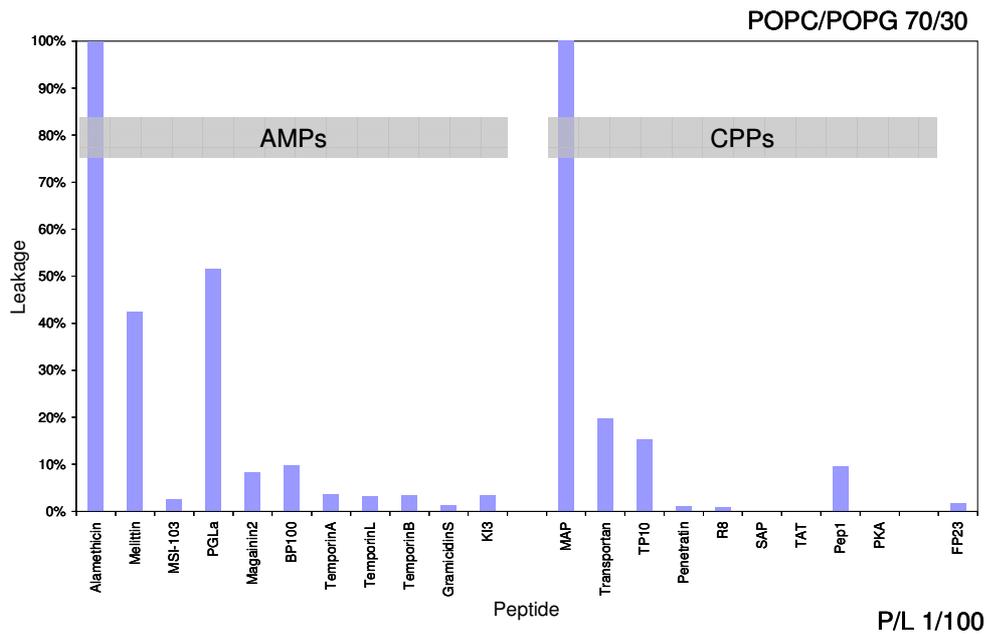


Abbildung 7-5: Peptidinduziertes Leakage bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/100)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/100. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

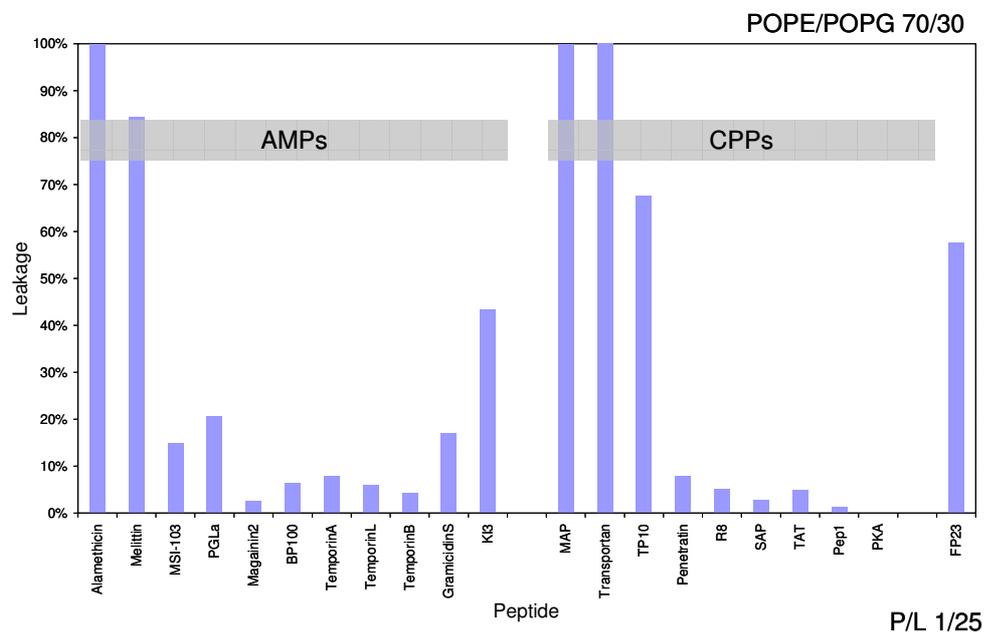


Abbildung 7-6: Peptidinduziertes Leakage bei POPE/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/25)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/25. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, $c_{\text{Peptid}} = 4\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

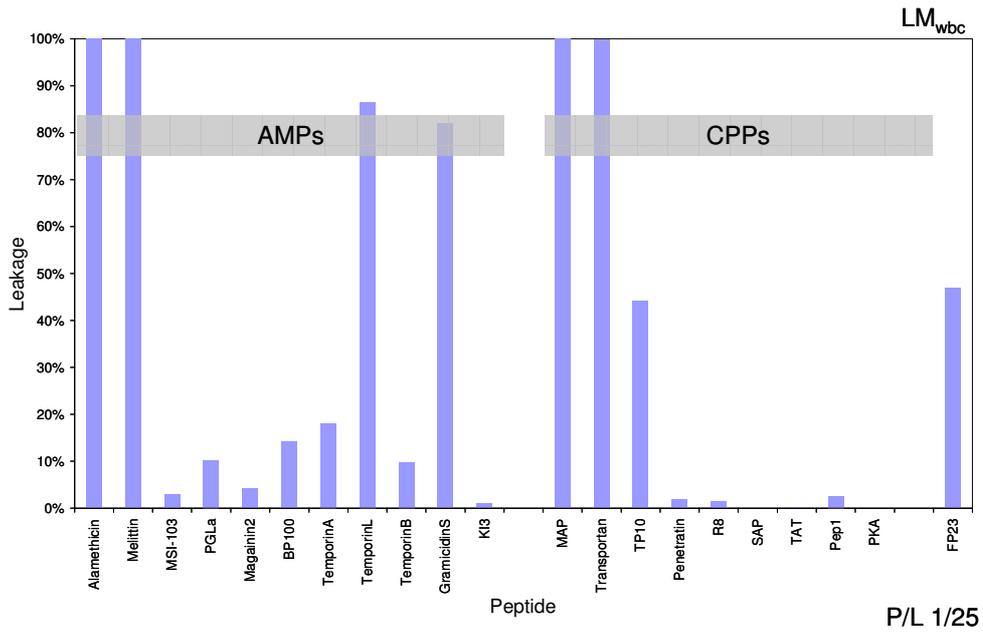


Abbildung 7-7: Peptidinduziertes Leakage bei LM_{wbc}-Vesikeln (P/L 1/25)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/25. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, c_{Lipid} = 200 µM, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

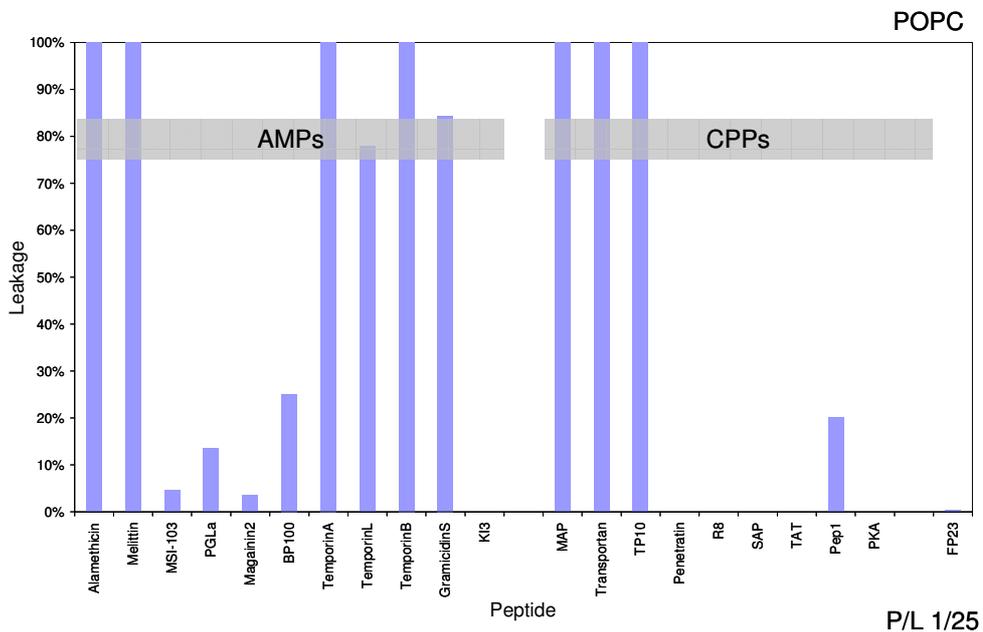


Abbildung 7-8: Peptidinduziertes Leakage bei POPC-Vesikeln (P/L 1/25)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/25. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: T = 37 °C, c_{Lipid} = 200 µM, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

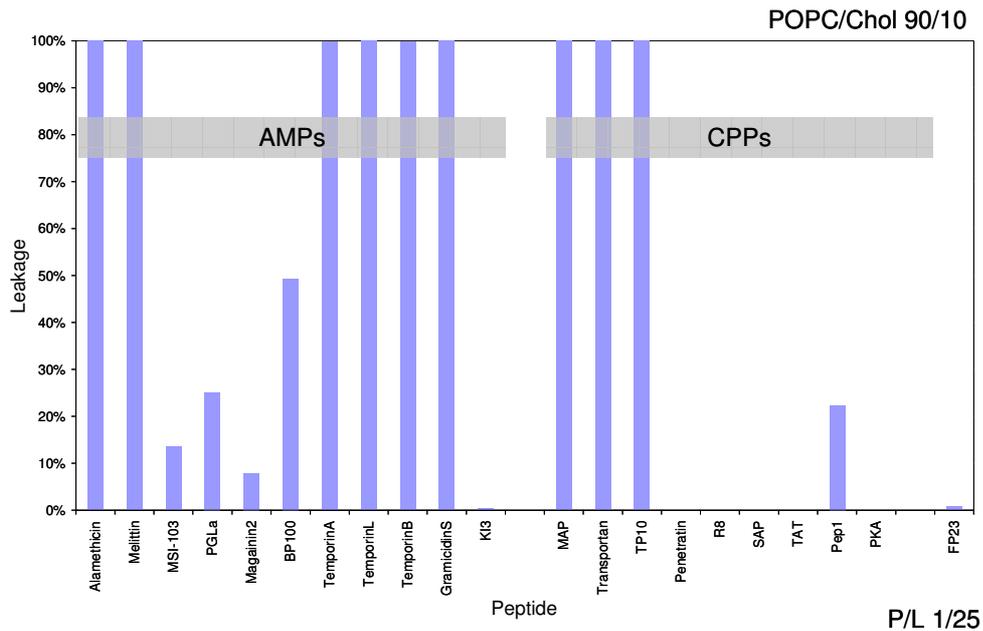


Abbildung 7-9: Peptidinduziertes Leakage bei POPC/Chol 90/10 Vesikeln (P/L 1/25)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/25. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

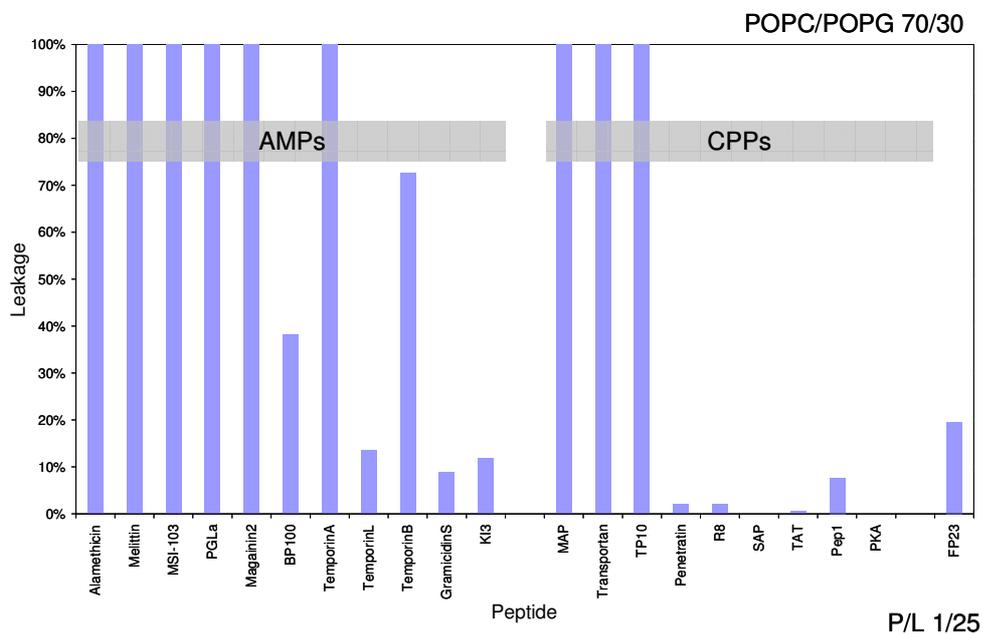


Abbildung 7-10: Peptidinduziertes Leakage bei POPC/POPG 70/30-Vesikeln (P/L 1/25)

Dargestellt ist das nach 30 min erhaltene relative Leakage bei einem P/L von 1/25. Im linken Bereich sind die Werte der AMPs aufgetragen, im rechten Bereich die der CPPs und des fusogenen Peptids FP23. Weitere Parameter: $T = 37\text{ °C}$, $c_{\text{Lipid}} = 200\text{ }\mu\text{M}$, physiologischer Phosphatpuffer pH 7,4.

7.3 Anhang C: Berechnungen

Gesucht	Lösung	Ergebnis
A Vesikelvolumen V_{Vesikel}	$= \frac{4}{3} \pi r^3$ $= \frac{4}{3} \times 3,142 \times (5 \times 10^{-7} \text{ dm})^3$ <hr/> bezogen auf $r = 50 \text{ nm}$	$= 5,2 \times 10^{-19} \text{ l}$
B Vesikelfläche A_{Vesikel}	$= 4 \pi r^2$ $= 4 \times 3,142 \times (50 \text{ nm})^2$ <hr/> bezogen auf $r = 50 \text{ nm}$	$= 31416 \text{ nm}^2$
C Lipidmoleküle pro Vesikel $n_{\text{Lipid/Vesikel}}$	$= 2 \times A_{\text{Vesikel}} / A_{\text{Lipid}}$ $= 2 \times 31416 \text{ nm}^2 / 0,7 \text{ nm}^2$	≈ 90000
D ANTS-Konzentration in der Küvette außerhalb der Vesikel $C_{\text{ANTS}}^{\text{a}}$	$= V_{\text{Probe}} / V_{\text{K}} \times \text{Wascheffektivität} \times C_{\text{ANTS}}^{\text{i}}$ $= 60 \mu\text{l} / 1500 \mu\text{l} \times 10^{-4} \times 12,5 \text{ mM}$ <hr/> $V_{\text{Probe}} = 60 \mu\text{l}$ $V_{\text{G}} = 1500 \mu\text{l}$ Wacheffektivität = 10^{-4} $C_{\text{ANTS}}^{\text{i}} = 12,5 \text{ mM}$	$= 50 \text{ nM}$
E Gesamte ANTS-Konzentration in der Küvette $C_{\text{ANTS}}^{\text{K}}$	$= \sum V_{\text{Vesikel}} / V_{\text{G}} \times C_{\text{ANTS}}^{\text{i}}$ $= 0,5 \mu\text{l} / 1500 \mu\text{l} \times 12,5 \text{ mM}$ <hr/> $V_{\text{G}} = 1500 \mu\text{l}$ $C_{\text{ANTS}}^{\text{i}} = 12,5 \text{ mM}$ bezogen auf $\sum V_{\text{Vesikel}} = 0,5 \mu\text{l}$	$= 4,2 \mu\text{M}$
F Relative ANTS-Konzentration in der Küvette außerhalb der Vesikel $C_{\text{ANTS}}^{\text{a rel.}}$	$= C_{\text{ANTS}}^{\text{a}} / C_{\text{ANTS}}^{\text{K}} \times 100$ $= 50 \text{ nM} / 4200 \text{ nM} \times 100$	$\approx 1 \%$
G Membranspannung U	$U = \Psi_{\text{i}} - \Psi_{\text{e}} = (RT_{\text{K}}) / F \ln(c_{\text{K}}^{\text{a}} / c_{\text{K}}^{\text{i}})$ <hr/> Ψ_{e} = elektrisches Potenzial extern Ψ_{i} = elektrisches Potenzial intern R = Gaskonstante = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ T_{K} = absolute Temperatur F = Faraday-Konstante = 96485 C mol^{-1} c_{K}^{a} = Kaliumkonzentration extern c_{K}^{i} = Kaliumkonzentration intern	= siehe Kalibrierkurve Kapitel 4.5.1, Abbildung 4-32

