

# Biophysikalische Untersuchungen an antimikrobiellen Peptiden: Von der Modellmembran zur natürlichen Umgebung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. Nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

**Dissertation**

von

Diplom-Chemikerin Julia Misiewicz

aus

Pforzheim

Dekan:	Prof. Dr. Peter Roesky
Referent:	Prof. Dr. Anne S. Ulrich
Korreferent:	Prof. Dr. Burkhard Luy
Tag der mündlichen Prüfung:	19.12.2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis Oktober 2014 am Lehrstuhl Biochemie (Institut für Organische Chemie) sowie am Institut für Biologische Grenzflächen 2 (IBG-2) des Karlsruhe Institut für Technologie unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich durchgeführt.

## Erklärung

Ich erkläre hiermit wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher weder an dieser noch an einer anderen Hochschule als Prüfungsschrift eingereicht.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Julia Misiewicz'.

Julia Misiewicz

Straubenhardt, den 04.11.2014

# Danksagung

*Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich, für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, die freundliche Arbeitsatmosphäre und für die fortwährende Unterstützung bei meiner Arbeit und darüber hinaus.*

*Herrn Prof. Dr. Burkhard Luy danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.*

*Herrn Dr. Sergii Afonin danke ich für die großartige Betreuung, seine stete Hilfsbereitschaft, die viele Zeit, die er für mich aufgebracht hat, die vielen hilfreichen Ratschläge, das viele Wissen, das er an mich weiter gegeben hat sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit. I cannot list everything, but I think you know it. Thanks a million!*

*Frau Dr. Marina Berditsch danke ich für ihre Unterstützung und große Hilfsbereitschaft beim Gramacidin S-Granula-Projekt und allen mikrobiologischen Fragestellungen sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Cnacубo!*

*Frau Dr. Birgid Langer danke ich für ihre Unterstützung, insbesondere beim Wiedereinstieg.*

*Frau Dr. Katja Koch danke ich für die hilfsbereite und freundliche Einführung zu Beginn meiner Arbeit.*

*Frau Elena Löhr, Frau Eva-Maria Weis und Herrn Alexander Böser danke ich für die gute Arbeit im Rahmen ihrer Vertiefer- bzw. Bachelorarbeiten.*

*Herrn Dr. Parvesh Wadhwani, Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck danke ich für die Bereitstellung der synthetischen Peptide.*

*Herrn Dr. Stephan Grage danke ich für die Unterstützung bei den NMR-Messungen.*



*Herrn Dipl. Ing. Stefan Kühn (Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT) danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.*

*Herrn Dr. Alexander Welle (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) danke ich für die Durchführung der TOF-SIMS-Messungen.*

*Frau Dipl. Chem. Katharina Becker, Frau M. Sc. Lena Steger und Frau Dr. Christina Gottselig danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.*

*Ganz besonders möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft, die tolle Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit, auch außerhalb des Labors, danken.*

*Ich danke dem Karlsruher Institut für Technologie für die Unterstützung durch das Wiedereinstiegsprogramm für Wissenschaftler/Innen.*

*Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Rita und Rainer, meinen Brüdern Till und Robin und ganz besonders meinem Mann Juha und meinem Sohn Mikko für ihre immerwährende Unterstützung, ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Liebe.*

*Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungsverzeichnis .....	iv
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung .....	4
2.1 Klassische Antibiotika und resistente Keime .....	4
2.2 Antimikrobielle Peptide als potenzielle Antibiotika.....	5
2.2.1 Vielfalt antimikrobieller Peptide .....	5
2.2.2 Wirkmechanismus von AMP.....	6
2.2.3 Selektivität gegenüber Bakterien.....	8
2.2.4 Einsatz von AMP als Therapeutika .....	8
2.3 Antimikrobielle Peptide in dieser Arbeit .....	9
2.3.1 PGLa .....	9
2.3.2 Temporin A.....	11
2.3.3 BP100 .....	12
2.3.4 KIGAKI .....	13
2.3.5 Gramicidin S und Gramicidin S-Granulae .....	15
2.4 Biophysikalische Untersuchungen der Wechselwirkung von AMP mit Biomembranen .....	17
2.4.1 Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung antimikrobieller Peptide.....	17
2.4.2 NMR in Modellmembranen.....	19
2.4.3 Doppelschichten aus synthetischen Lipiden als Modell für natürliche Membranen .....	20
2.4.4 Lipidpolymorphismus.....	21
2.4.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Wechselwirkung zwischen AMP und Modellmembranen .....	22
2.4.6 Natürliche Biomembranen.....	22
2.4.7 Bakterielle Zellwände .....	23
3 Aufgabenstellung .....	26
4 Methoden .....	27
4.1 Steriltechnik .....	27
4.2 Peptidsynthese und Aufreinigung.....	27
4.3 Vorbereitung von NMR-Proben .....	29
4.3.1 Allgemeine Vorbereitung orientierter NMR-Proben.....	29
4.3.2 NMR-Messungen bei definiertem pH-Wert .....	29
4.3.4 Präparation von Erythrozytenmembranen für NMR-Proben.....	31
4.3.5 Präparation von <i>M. luteus</i> -Vesikeln für NMR-Proben .....	31

4.3.6	Lipid-Extraktion .....	32
4.3.7	Phosphatbestimmung.....	32
4.3.8	Vorbereitung orientierter NMR-Proben mit Biomembranen ....	33
4.4	Dynamische Differenzkalorimetrie.....	33
4.4.1	Vorbereitung von Lipidproben für DSC-Messungen .....	33
4.4.2	Vorbereitungen peptidhaltiger Proben für DSC-Messungen....	34
4.5	Festkörper-NMR-Messungen orientierter Proben .....	34
4.6	Gewinnung von Gramacidin S-Granulae .....	36
4.6.1	Anzucht von <i>A. migulanus</i> .....	36
4.6.2	Kontrolle des Wachstums von <i>A. migulanus</i> .....	36
4.6.3	Fluoreszenzfärbung der <i>A. migulanus</i> -Zellen .....	37
4.6.4	GS-Extraktion aus Zellkulturproben.....	37
4.6.5	Bestimmung der GS-Konzentration in Extrakten.....	38
4.6.6	Zellernte von <i>A. migulanus</i> .....	38
4.6.7	Zellaufschluss von <i>A. migulanus</i> .....	38
4.6.8	Isolation von GSG .....	39
4.6.9	Entfernung von DNA aus GSG .....	41
4.7	Charakterisierung von Gramacidin S-Granulae .....	41
4.7.1	Bestimmung der GS-Konzentration in GSG .....	41
4.7.2	Größenbestimmung durch dynamische Lichtstreuung .....	42
4.7.3	Rasterelektroenenmikroskopische Untersuchung.....	42
4.7.4	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität .....	43
4.7.5	Bestimmung der hämolytischen Aktivität .....	44
4.7.6	Extraktion von GS aus GSG.....	45
4.7.7	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	45
4.7.8	NMR-Spektroskopische Untersuchungen .....	46
5	Der Einfluss des pH-Wertes auf Peptid-Lipid-Wechselwirkungen .....	48
5.1	Orientierte NMR-Proben mit kontrolliertem pH-Wert.....	48
5.2	Dynamische Differenzkalorimetrie.....	49
5.3	Festkörper- <sup>2</sup> H-NMR-Analyse .....	52
5.4	Festkörper- <sup>31</sup> P-NMR-Analyse .....	54
5.5	Festkörper- <sup>19</sup> F-NMR -Analyse .....	56
5.6	Rolle des pH-Wertes bei Peptid-Lipid-Wechselwirkungen in orientierten Proben .....	59
6	Festkörper-NMR-Studien an antimikrobiellen Peptiden in nativen Membranen ..	63
6.1	Mykolsäuren als Membran für Festkörper-NMR .....	63
6.2	Temporin A in Erythrozyten- und <i>M. luteus</i> -Membranen .....	65
6.3	KIGAKI in Erythrozyten- und <i>M. luteus</i> -Membranen .....	68
6.4	BP100 in Erythrozyten- und <i>M. luteus</i> -Membranen.....	70
6.5	<sup>15</sup> N-NMR in nativen Membranen .....	73
6.6	Native Membranen für Festkörper-NMR .....	74

7	Gramicidin S-Granulae .....	80
7.1	Wachstum und GS Produktion von <i>A. migulanus</i> .....	80
7.1.1	Einfluss des Inokulationsmaterials .....	80
7.1.2	Einfluss des Kulturvolumens .....	81
7.1.3	Einfluss des Mediums.....	82
7.1.4	Medium für die Isotopenmarkierung von GSG.....	83
7.2	Gewinnung und Charakterisierung von GSG .....	84
7.2.1	Zellaufschlussmethoden .....	85
7.2.2	Isolation .....	88
7.2.3	Bestimmung des GS-Gehaltes .....	89
7.2.4	Extraktion von GS aus GSG.....	90
7.2.5	Antimikrobielle Aktivität.....	90
7.2.6	Hämolytische Aktivität.....	91
7.3	Massenspektrometrie von GSG .....	93
7.3.1	MALDI-TOF-MS .....	93
7.3.2	FAB-MS .....	94
7.3.3	TOF-SIMS .....	94
7.4	NMR-spektroskopische Analyse von GSG .....	97
7.4.1	Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	97
7.4.2	Flüssig-NMR-Spektroskopie .....	98
7.5	Eigenschaften von Gramicidin S-Granulae .....	100
7	Literatur.....	107
8	Materialien .....	115
9	Publikationen .....	124
10	Lebenslauf.....	125

## Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
CF <sub>3</sub> -Bpg	3-(Trifluoromethyl)bicyclopent-[1.1.1]-1-ylglycin
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dynamische Lichtstreuung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	<i>Differential scanning calorimetric</i> (Dynamische Differenzkalorimetrie)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EtOH	Ethanol
FAB	<i>Fast atom bombardment</i>
GS	Gramicidin S
GSG	Gramicidin S-Granuläe
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MAS	<i>Magic angle spinning</i>
MeOH	Methanol
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MH-Medium	Müller-Hinton-Medium
MilliQ	Entionisiertes Wasser aus einer Millipore Anlage
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
OD	Optische Dichte
PGLa	Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid
P/L	Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SIMS	<i>Secondary ion mass spectrometry</i> (Sekundärionen-Massenspektrometrie)
TempA	Temporin A
TFA	<i>Trifluoro acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TOF	<i>Time of flight</i> (Flugzeit)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
wt	Wildtyp

**Phospholipide**

DLPC	1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]

**Lipidphasen(übergänge)**

$L_{\alpha}$	Lamellare Gelphase
$L_{\beta}$	Lamellare fluide Phase
$P_{\beta}$	Lamellare gewellte Gelphase
$T_m$	<i>T melt</i> (Hauptphasenübergangstemperatur)
$T_p$	<i>T pre-transition</i> (Vorphasenübergangstemperatur)
$T_s$	<i>T start</i> (Starttemperatur des Hauptphasenübergangs)
$\Delta T_{1/2}$	Breite auf halber Höhe des Phasenübergangs

**Orientierungszustände eines Peptides in der Membran**

I	<i>Inserted</i> (insertiert)
S	<i>Surface bound</i> (oberfächengebunden)
T	<i>Tilted</i> (gekippt)

**Orientierungsparameter eines Peptides**

$\rho$	Rotationswinkel
$S_{mol}$	Mobilitäts Parameter
$\theta$	Orientierungswinkel im magnetischen Feld
$\tau$	Neigungswinkel im magnetischen Feld

# 1 Zusammenfassung

Viele biophysikalische Untersuchungen, die mit makroskopisch orientierten Membranen arbeiten, vernachlässigen den pH-Wert der Probe. Ein synthetisch hergestelltes Peptid ist aber in der Regel recht sauer und kann so den pH-Wert der Probe ändern. Der pH-Wert kann dabei Effekte auf das Peptid und die Membranlipide haben und somit ihre Wechselwirkung beeinflussen. Wie stark beeinflusst der pH-Wert die Wechselwirkung eines kationischen antimikrobiellen Peptides mit der Membran? Entsprechen bisher gefundene Wirkmechanismen denen bei physiologischem pH?

Im ersten Teil meiner Arbeit ging ich diesen Fragen nach, indem ich systematisch den Einfluss eines breiten pH-Bereiches auf das Lipidphasenverhalten und die spezifische Peptid-Lipid-Wechselwirkung untersuchte. Ich verglich Ergebnisse, die unter Kontrolle des pH-Wertes erhalten wurden, mit denen von auf herkömmliche Weise, ohne pH-Kontrolle, durchgeführten Experimenten.

Gegenstand der Untersuchung war das bereits umfassend charakterisierte,  $\alpha$ -helikale, amphiphile Peptid PGLa in DMPG/DMPC-Membranen. Durch dynamische Differenzkalorimetrie in Suspensionen und Festkörper-NMR in orientierten Doppelschichten konnte ich sowohl die Lipiddoppelschicht ( $^{31}\text{P}$ -,  $^2\text{H}$ -NMR) als auch das Peptid ( $^{19}\text{F}$ -NMR) unabhängig voneinander jedoch, wenn möglich, in derselben Probe, charakterisieren. Tatsächlich zeigte sich abhängig vom pH-Wert der Probe eine signifikante Veränderung der Peptid-Affinität, seiner membrangebundenen Struktur und Orientierung sowie des Lipidpolymorphismus. Im Einzelnen zeigten meine Ergebnisse einen Anstieg der Phasenübergangstemperatur der Lipide bei Erniedrigung des pH-Wertes. Außerdem verursachte sehr saurer (pH 2,6) oder basischer pH (pH 10) Lipidhydrolyse. Unter diesen extremen Bindungen war PGLa entweder komplett ungebunden oder es nahm einen unbekannt strukturellen Zustand an. Nur bei einem pH-Wert nahe dem neutralen Bereich verbleibt das Peptid helikal und ging seine charakteristische, lipidphasenabhängige Reorientierung ein. Bemerkenswerterweise gaben die Daten von herkömmlich vorbereiteten, ungepufferten Proben das Verhalten der schwach sauren Proben (pH 7-4) in den pH-kontrollierten Experimenten wieder.

Als Ergebnis kann nun ein pH-Bereich definiert werden, in dem die PGLa-Membran-Wechselwirkung nicht beeinträchtigt wird. Außerdem kann ich eine Warnung aussprechen, den pH-Wert einer Probe nicht zu ignorieren, da ein stark von neutralen Bedingungen abweichender pH signifikante Änderungen der Probeneigenschaften hervorrufen könnte.

Aufgrund ihrer sehr komplexen Zusammensetzung sind native Membranen *per se* nur schwer für biophysikalische Studien zugänglich. Daher wurden die meisten der Kenntnisse über Wechselwirkungen von antimikrobiellen Peptiden mit Membranen bisher in Modellmembranen, die aus synthetischen Lipiddoppelschichten bestehen, erhalten. Doch sind diese etablierten experimentellen Beobachtungen, in Anbetracht der inhärenten Tendenz vieler Peptide sich Veränderungen in ihrer Membran-Ausrichtung und/oder Konformation zu unterziehen, ebenfalls *in vivo* relevant?

Um diese Frage zu beantworten, nutzte ich im zweiten Teil meiner Arbeit Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR. Aufgrund der hohen NMR-Empfindlichkeit des Fluorkerns und dem Fehlen eines natürlichen Hintergrunds, eignet sich diese Methode sehr gut um die Orientierung antimikrobieller Peptide in natürlichen Membranen zu untersuchen. Ich verwendete hierzu zwei Arten von nativen Biomembransystemen: Prokaryotische Membranen aus dem grampositiven Bakterium *Micrococcus luteus* und eukaryotische Membranen aus humanen Erythrozyten. In diesen natürlichen Systemen untersuchte ich die Membranorientierung dreier verschiedener AMP mittels Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR: Die  $\alpha$ -helikalen Peptide Temporin A und BP100 sowie das  $\beta$ -strukturierte Peptid KIGAKI. Die Qualität der Membranpräparationen und der Orientierung der Lipiddoppelschichten wurden mit  $^{31}\text{P}$ -NMR kontrolliert. Die Proben zeigten eine gute Orientierung, wobei der Mosaik-Spread für bakterielle Membranen, wie zu erwarten, höher war.

Die untersuchten Peptide waren bereits zuvor in Modellmembranen charakterisiert worden. Im Wesentlichen waren die Spektren der Peptide vergleichbar mit denen in Modellmembranen. Die Proben zeigten jedoch einen höheren Anteil unorientierter Peptide, was darauf hindeutet, dass sich in natürlichen Membranen nicht alle Peptide auf gleiche Weise ausrichten. Im Großen und Ganzen konnten die in Modellmembranen gefundenen Peptid-Konformationen und Orientierungen auch in Biomembranen bestätigt werden.



Anhand eines  $^{15}\text{N}$ -markierten GS-Analogons konnte ich zudem zeigen, dass es nicht nur durch  $^{19}\text{F}$ -NMR möglich ist, die Orientierung von AMP in nativen Membranen zu bestimmen, sondern auch durch  $^{15}\text{N}$ -NMR. Gramicidin S zeigte in Erythrozytenmembranen die erwartete Orientierung.

Im dritten Teil der Arbeit beschäftigte ich mich mit der natürlichen Erscheinungsform des antimikrobiellen Peptides Gramicidin S. Durch Elektronenmikroskopie wurden in *A. migulanus*-Zellen sphärische Granulae einer Größe von ca. 200 nm beobachtet, die nur in Gramicidin S-produzierenden Phänotypen vorkamen. Anfärbung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an Gramicidin S bindet, zeigte, dass das Peptid in den Granulae akkumuliert. Können diese Granulae als antibiotisch wirksame Substanz eingesetzt werden? Was ist ihre molekulare Zusammensetzung?

Um Gramicidin S-Granulae weiterhin charakterisieren zu können, sollten sie zunächst aus *A. migulanus*-Zellen gewonnen werden. Ich untersuchte dazu den Einfluss der Wachstumsbedingungen von *A. migulanus* auf Zellwachstum und GS-Syntheseaktivität. Um die Gramicidin S-Granulae zu isolieren, testete ich verschiedene Methoden des Zellaufschlusses und der Trennung der Zellbestandteile. Analytische HPLC zeigte, dass Gramicidin S-Granulae zu ca. 30 % ihrer Trockenmasse aus Gramicidin S bestehen. Zur Untersuchung ihrer biologischen Aktivität führte ich minimale Hemmkonzentrations- und Hämolysetests durch. Gramicidin S-Granulae hatten vergleichbare antimikrobielle Aktivität wie lösliches Gramicidin S, waren aber gleichzeitig weniger hämolytisch aktiv. Zur Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung von Gramicidin S-Granulae verwendete ich Massenspektrometrie sowie Festkörper- und flüssig-NMR. In diesen Experimenten konnte ich zeigen, dass Gramicidin S-Granulae Phosphat und Fettsäuren enthalten. Außerdem gab es Hinweise auf Phospholipidkopfgruppen. Demnach könnte es sich bei Gramicidin S-Granulae um Aggregate von Gramicidin S mit Fettsäuren und/oder Phospholipiden handeln.

## 2 Einleitung

### 2.1 Klassische Antibiotika und resistente Keime

Der Kampf gegen Infektionskrankheiten gehört seit Menschengedenken zu den großen Herausforderungen der Medizin <sup>1-3</sup>. Noch immer zählen Infektionskrankheiten, insbesondere in den Entwicklungsländern, zu den Haupttodesursachen. Antibiotika können Leben retten und leisten einen wichtige Beitrag zur Kontrolle von Infektionskrankheiten <sup>4</sup>.

Die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928 und einige Jahre später die Möglichkeit, es in großem Maßstab herzustellen, leitete den großen medizinischen Durchbruch der Antibiotika ein <sup>5,6</sup>. Zwischen 1940 und 1960 wurden weitere Klassen von Antibiotika natürlichen und synthetischen Ursprungs entdeckt und erforscht <sup>2,4</sup>. Seit dieser Zeit, die als „goldene Ära“ der Antibiotika bekannt ist, kommen Antibiotika gegen zahlreiche Infektionskrankheiten zum Einsatz. Die in der goldenen Ära gefundenen Antibiotika dienten als molekulare Grundgerüste für neue Wirkstoffe und es wurden zahlreiche auf ihnen basierende Medikamente entwickelt <sup>2,4,7</sup>. Jedoch wurden zwischen 1962 und 2000 aufgrund mangelnden Verständnisses für ihre Wirkung sowie aus wirtschaftlichen Gründen keine neuen Klassen von Antibiotika auf den Markt gebracht <sup>7,8</sup>. Während die Neuentwicklung von Antibiotika stagnierte, traten zunehmend resistente Keime auf <sup>7-9</sup>.

Durch übermäßigen Einsatz von Antibiotika, nicht nur in der Humanmedizin sondern z.B. auch in der Futtermittelindustrie, stellen multiresistente Keime eine immer größer werdende Bedrohung dar <sup>3,10-13</sup>. Internationale Reisetätigkeit, Handel und Migration begünstigen ihre weltweite Verbreitung <sup>14</sup>. Allein in der europäischen Union sterben jährlich ca. 25.000 Patienten an durch multiresistente Bakterien verursachten Erkrankungen <sup>15</sup>. 2014 spricht die Weltgesundheitsorganisation in ihrem Bericht über antimikrobielle Resistenz von einer „Post-antibiotischen Ära - in der herkömmliche Infektionen und kleinste Verletzungen töten können - die weit entfernt ist von einem apokalyptischen Szenario, sondern eine sehr reale Möglichkeit für das 21ste Jahrhundert.“ <sup>16</sup>.

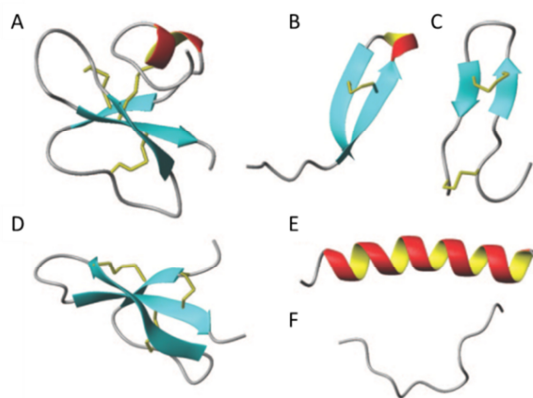
Die Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe und neuer Therapien ist daher dringend nötig. Es stehen dazu zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung<sup>2,4,7,8</sup>. Eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Antibiotika stellen dabei antimikrobielle Peptide und deren Derivate dar.

## 2.2 Antimikrobielle Peptide als potenzielle Antibiotika

### 2.2.1 Vielfalt antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind eine lebenswichtige Komponente der angeborenen Immunabwehr aller Organismen gegen pathogene Eindringlinge<sup>17-21</sup>. AMP zeigen typischerweise ein breites Wirkungsspektrum. Am besten erforscht ist die antibakterielle Wirkung von AMP, wobei mittlerweile aber auch für zahlreiche AMP eine antivirale<sup>22,23</sup>, antifungale<sup>24-27</sup>, antiparasitäre<sup>28,29</sup> und sogar antikanzerogene<sup>30-32</sup> Wirkung bekannt ist. Auch die immun- und Metabolismus-modulatorischen Eigenschaften von AMP geraten zunehmend ins Interesse der Wissenschaft<sup>33</sup>.

Tausende AMP sind in verschiedenen Datenbanken zusammengefasst<sup>34,35</sup>. Sie besitzen eine große Vielfalt in Ursprung, Struktur (Abbildung 1), Länge, Aminosäuresequenz, biologischer Aktivität und Wirkungsweise. Es existiert daher keine allgemein gültige Klassifizierung<sup>36</sup>.



**Abbildung 1:** Repräsentative strukturelle Variationen von AMP. **A** Gemischte Struktur von menschlichem  $\beta$ -Defensin-2. **B:** cyclisch Thanatin **C:**  $\beta$ -Faltblatt Polyphemusin. **D:** Kaninchen Nieren Defensin-1 **E:**  $\alpha$ -helikal Magainin 2 **F:** erweitert Indolicidin. Disulfidbrücken sind gelb gekennzeichnet. Bild modifiziert nach<sup>20</sup>

Trotz der großen strukturellen Vielfalt können den AMP einige generelle Eigenschaften zugeordnet werden. So tragen die meisten eine positive Nettoladung, eine große Zahl hydrophober Aminosäuren und sie haben durch ihre Struktur und Ladungsverteilung einen amphiphilen Charakter<sup>13,17,19,37,38</sup>.

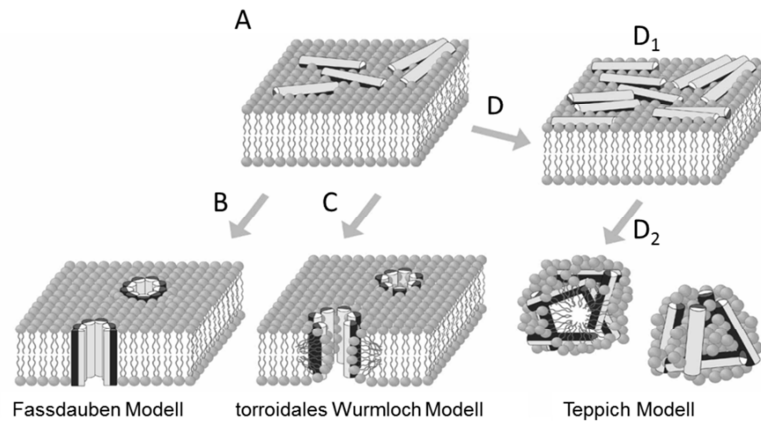
### 2.2.2 Wirkmechanismus von AMP

Die Wirkung von AMP erfolgt nicht stereospezifisch. Daher wird angenommen, dass der Wirkmechanismus von AMP auf einer Wechselwirkung mit der (bakteriellen) Membran basiert<sup>20,37,39-43</sup>. Zuerst kommt es zu einer elektrostatischen Wechselwirkung des positiv geladenen Peptids mit den negativ geladenen Lipiden und dadurch zur Bindung an die Membran. Die darauf folgende Aggregation von AMP und Integration in die Membran durch hydrophobe Wechselwirkung resultiert in einer Ausdehnung der äußeren Lipiddoppelschicht, was wiederum zu einer Membranausdünnung führt<sup>37</sup>. Es wurden verschiedene mechanistische Modelle vorgeschlagen, wie AMP in die Membran eindringen und zur Bildung von Ionenkanälen, Poren oder Membranzerstörung führen können (Abbildung 2). Das klassische Modell der Interaktion von AMP mit der Lipiddoppelschicht beruht auf dem Shai-Matsuzaki-Huang- (SMH-) Konzept<sup>19</sup>. Es beschreibt drei Hauptarten von Wechselwirkungen.

Das Fassdauben Modell (*Barrel-stave* Modell) beschreibt die klassische Bildung von Proteinporen. Oberhalb einer Schwellenkonzentration aggregieren die Peptide und richten sich in einem insertierten Zustand aus. Hierbei wechselwirken die hydrophoben Bereiche der Peptide mit den unpolaren Acylketten der Lipide und die hydrophilen Bereiche bilden das innere einer Pore. Dieser Mechanismus wird für Peptide vorgeschlagen, in denen nicht zu viele kationische Reste im begrenzten Innenraum der Pore akkumulieren wie z.B. Alamethicin, Gramacidin S<sup>43-46</sup>.

Nach dem Wurmloch Modell (*Toroidal wormhole* Modell) tauchen die Peptide aufrecht in die Membran ein, wobei ihre hydrophilen Bereiche mit den Lipidkopfgruppen assoziiert sind, während die hydrophoben Bereiche mit dem Lipidkern wechselwirken. Bei diesem Vorgang krümmt sich die Membran nach innen und die Lipidkopfgruppen bilden ebenfalls einen Teil der Pore wie z.B. Magainin, Melittin oder LL-37<sup>47-49</sup>.

Beim Teppich Modell (*Carpet Modell*) verbleiben die Peptide zunächst parallel zur Membranoberfläche und bedecken diese teppichähnlich. Ab einer bestimmten Schwellenkonzentration kommt es zu einer Desintegration der Membran durch die Bildung von Mizellen oder kleinen Peptid-Lipidaggregaten wie z.B. bei Ovispirin<sup>50</sup>.



**Abbildung 2:** Modelle der Membraninteraktion von AMP nach dem Shai-Matsuzaki-Huang-Konzept. Anlagerung der positiv geladenen Peptide an die negativ geladene Membranoberfläche (A) gefolgt von Membranzerstörung durch Bildung von Poren nach dem Fassdauben Modell (B) oder dem Wurmloch Modell (C) sowie durch Bildung von Mizellen oder Peptid-Lipid-Aggregaten nach dem Teppich Modell (D). Abbildung modifiziert nach<sup>51</sup>.

Inzwischen ist bekannt, dass diese Modelle zu einfach sind, um die vielen verschiedenen Interaktionen von AMP in einer komplexen Umgebung wie der Zellmembran zu beschreiben<sup>52</sup>. So kann ein AMP parallel verschiedene Strukturen annehmen. Außerdem kann ein bestimmtes AMP seine Wirkungsweise in Abhängigkeit von der Zielzelle, Konzentration, physikalischen Eigenschaften der Membran sowie äußeren Einflüssen wie pH-Wert, Temperatur, osmotischem Druck etc. ändern<sup>53</sup>. Es könnte zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Peptiden sowie zufälliger Membranzerstörung kommen. Zahlreiche AMP interagieren auch mit intrazellulären, nicht-lipidischen Zielen und inhibieren so z.B. Transportwege, Nukleinsäuresynthese, enzymatische Aktivität oder Zellwandsynthese<sup>54,55</sup>. Es ist auch wahrscheinlich, dass AMP im Falle einer Infektion nicht nur einen Mechanismus nutzen, sondern beispielweise Destabilisierung der Membran in Kombination mit einem intrazellulären Ziel<sup>20,56,57</sup>.

Die Wirkmechanismen von AMP sind viel komplexer, als einfache Modelle (wie in Abbildung 2 dargestellt) sie wiedergeben können. Daher ist es wichtig bei der Untersuchung von AMP möglichst natürliche Bedingungen herzustellen.

### 2.2.3 Selektivität gegenüber Bakterien

Es wird angenommen, dass AMP selektiv gegenüber Bakterien wirken. Ein wesentlicher Grund für die Selektivität liegt an der negativen Ladung der äußeren Lipiddoppelschicht bakterieller Membranen<sup>52</sup>. Eukaryotische Lipidmembranen sind hingegen insgesamt viel neutraler und reich an Sterolen<sup>37</sup>. Die anionische und fluidere Membran von Bakterien ist zugänglicher für die Bindung und Zerstörung durch kationische AMP. Zudem fördert das höhere Membranpotential in Bakterien die Interaktion mit AMP, indem es als potentielle Antriebskraft für die Peptid Insertion und Translokation wirkt. Einige AMP zeigen außerdem eine strukturelle Spezifität für bakterielle Membranbestandteile wie bestimmte Phospholipid-Kopfgruppen<sup>58</sup>. Zusätzlich interagieren manche kationische Peptide mit Lipopolysacchariden an der Oberfläche gramnegativer Bakterien und werden mittels „selbst-beförderter Aufnahme“ („*self-promoted uptake*“) aufgenommen<sup>17</sup>. Dieser und ähnliche Mechanismen erklären auch die synergistische Wirkung von AMP mit konventionellen Antibiotika.

*In vivo* spielt auch die Lokalisierung von AMP eine Rolle bei deren Selektivität. So sind insbesondere die Hautoberfläche und die Schleimhäute reich an AMP. Dort kommen AMP nicht mit Körperzellen, wie Erythrozyten, auf die sie toxisch wirken könnten, in Berührung.

### 2.2.4 Einsatz von AMP als Therapeutika

Das Interesse an AMP als potentielle Antibiotika war schon immer hoch<sup>20,59,60</sup>. Aufgrund ihrer schnellen und breit gefächerten antimikrobiellen Wirkungsweise wurden diese Peptide rasch als potentielle Antibiotika, insbesondere gegen resistente Keime, erkannt<sup>37,61</sup>. Durch ihre nicht-(stereo)selektive Wirkungsweise und multiplen Angriffspunkte ist eine Resistenzentwicklung im Vergleich zu konventionellen Antibiotika, die spezifischere Angriffspunkte wie Rezeptoren oder Enzyme haben, unwahrscheinlich. In Studien, in denen subinhibitorische Konzentrationen von AMP eingesetzt wurden, konnten auch in mehrfachen Zellzyklen keine resistenten Bakterien beobachtet werden<sup>62-64</sup>. Des Weiteren kann ein antimikrobielles Peptid gleichzeitig auf mehrere Pathogene wirken. Eine besonders interessante Anwendung von AMP ist die kombinatorische Therapie mit anderen Medikamenten. Es konnte für AMP ein synergetischer bzw. additiver Effekt mit konventionellen Antibiotika gezeigt werden<sup>65</sup>. Trotz der zahlreichen Möglichkeiten, AMP in der Medizin einzusetzen, stellt ihre Zytotoxizität sowie

Protease-Instabilität weiterhin eine Herausforderung dar<sup>66,67</sup>. Ein allgemeines Problem von Medikamenten auf Peptid-Basis ist deren Bioverfügbarkeit<sup>68</sup>. So zeigten AMP in Tierversuchen oft geringe bakteriologische Effekte. Der Verlust ihrer Aktivität unter physiologischen Bedingungen und ihre rasche Pharmakokinetik stellt die generelle Eignung von AMP als Therapeutika in Frage<sup>59</sup>. Hinzu kommen die hohen Produktionskosten für Peptide<sup>69</sup>.

Durch rationelles chemisches Design auf Grundlage von AMP können einerseits Kosten gesenkt und andererseits therapeutische Eigenschaften verbessert und Peptid-Antibiotika so für den klinischen Einsatz verfügbar gemacht werden. Eine genaue Kenntnis der Wirkungsweise natürlicher AMP ist unabdingbar, um neue synthetische Strategien zu entwickeln.

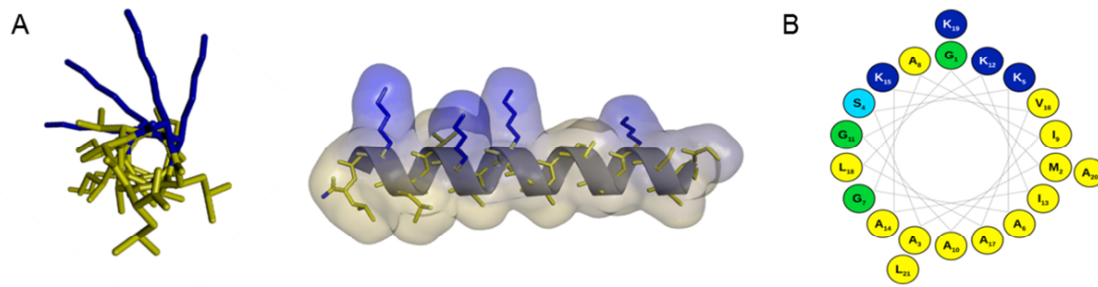
## 2.3 Antimikrobielle Peptide in dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden AMP unterschiedlicher Struktur und Herkunft untersucht. Die  $\alpha$ -helikalen AMP PGLa und Temporin A stammen aus Amphibien. Das  $\alpha$ -helikale BP100 und das  $\beta$ -Faltblatt bildende KIGAKI wurden synthetisch entwickelt, während es sich beim cyclischen  $\beta$ -Faltblatt Gramacidin S um ein bakterielles AMP handelt. Im folgenden Abschnitt werden diese Peptide jeweils vorgestellt.

### 2.3.1 PGLa

Peptidyl-Glycin-Leucin-Carboxyamid (PGLa, GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH<sub>2</sub>) ist ein kationisches lineares Peptid mit 21 Aminosäure Resten und einer Nettoladung von +5. Es wurde in der Haut des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* gefunden. PGLa zeigt starke antimikrobielle Aktivität mit hoher Selektivität gegen Bakterien und nur geringe hämolytische Aktivität<sup>70</sup>.

In wässriger Lösung ist das Peptid unstrukturiert, nimmt aber in Membran-imitierender Umgebung amphiphile  $\alpha$ -helikale Struktur an (Abbildung 3)<sup>71-75</sup>.

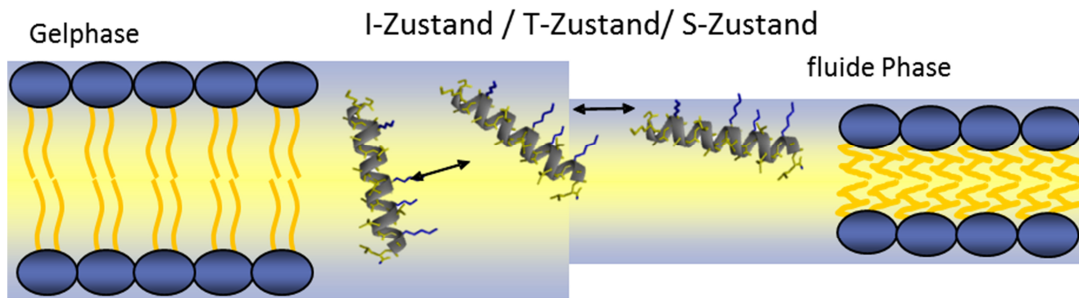


**Abbildung 3:** Das antimikrobielle Peptid PGLa **A:** Helixaufsicht sowie Seitenansicht der Peptidhelix. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb, hydrophile Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. **B:** Darstellung als helikales Rad. Hier sind zusätzlich Helixbrecher (Gly, Pro) grün und polare Aminosäuren hellblau gekennzeichnet.

PGLa wurde mittels Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) umfassend strukturell charakterisiert. Es kann, abhängig von den experimentellen Bedingungen, verschiedene Orientierungen einnehmen. PGLa unterliegt bei Raumtemperatur in synthetischen Lipiddoppelschichten aus DMPC und DMPG einer konzentrationsabhängigen Umorientierung<sup>76</sup>. Bei einem niedrigen Peptid- zu Lipid-Verhältnis ( $P/L = 1:200$ ) liegt es in einem oberflächengebundenen S- (*surface*) Zustand vor. Bei höheren Konzentrationen ( $P/L \geq 1:50$ ) nimmt es einen gekippten T- (*tilted*) Zustand ein (Abbildung 4). Bei der Umorientierung taucht der C-Terminus der Helix in den hydrophoben Kern der Doppelschicht ein (Abbildung 4). Das Gleichgewicht wird durch Erhöhung der Peptidkonzentration sowie Erniedrigung des Hydrationsgrades oder der Temperatur von S- nach T-Zustand verschoben. Die Anwesenheit des T-Zustandes deutet auf Dimerisierung der Peptide hin<sup>76,77</sup>. In metastabilen Lipiddoppelschichten in der Gelphase nimmt PGLa bei hohem P/L (z.B. 1:50) einen nahezu aufrechten Membran-durchspannenden I- (*inserted*) Zustand ein<sup>78</sup>. Die Ausbildung eines I-Zustandes kann durch Anwesenheit lokaler Defekte in der Lipiddoppelschicht, die die volle Insertion von PGLa in den hydrophoben Membrankern ermöglichen, erklärt werden.

Mit Magainin 2, das in denselben Drüsen in *X. laevis* vorkommt, bildet PGLa bei niedriger Peptidkonzentration ( $P/L 1:100$ ) in DMPC/DMPG-Membranen Heterodimere im Verhältnis 1:1, die im I-Zustand vorliegen. Hierin zeigt sich die natürliche synergistische Wirkung von PGLa und Magainin. Das Vorliegen eines I-Zustandes gibt Hinweise auf eine Porenbildung nach dem Wurmloch Modell<sup>79</sup>.



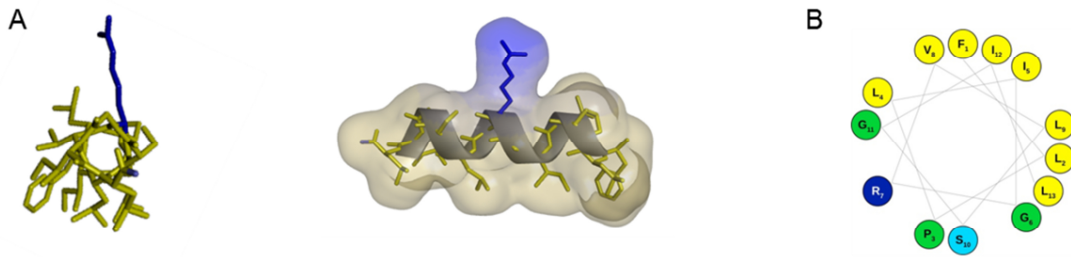


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung möglicher Zustände von PGLa in einer Lipiddoppelschicht.

### 2.3.2 Temporin A

Temporin A (TempA, FLPLIGRVLSGIL-NH<sub>2</sub>) wurde erstmals aus dem Hautsekret von *Rana temporaria* isoliert. Es besteht aus 13 vorwiegend hydrophoben AS und bildet eine amphiphile Struktur aus (Abbildung 5). Bei physiologischen pH-Wert besitzt es eine Nettoladung von +2. TempA hat eine hohe, selektive antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien, unter anderem auch gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente Stämme von *Enterococcus faecium*<sup>80,81</sup>. TempA zeigt synergistische Effekte mit TempL (FVQWFSKFLGRIL-NH<sub>2</sub>). Eine Kombination aus TempA und TempL ist auch gegen gramnegative Bakterien wirksam<sup>82</sup>. Aufgrund seiner kurzen Aminosäuresequenz ist die Herstellung von TempA vergleichsweise günstig. Daher besitzt TempA großes Potenzial als Grundlage für Peptid-Antibiotika.

Da TempA nicht lang genug ist, um Biomembranen vollständig zu durchspannen, wird vermutet, dass es keine geordneten transienten oder persistenten Poren ausbilden kann. Festkörper-NMR spektroskopische Untersuchungen von TempA zeigten, dass Dicke und Ladung der Lipiddoppelschicht sowie die Peptidkonzentration keinen Einfluss auf die Membranorientierung von TempA haben<sup>83</sup>. Nur in DMPC-Doppelschichten in der Gelphase konnte eine Umorientierung zum oberflächengebundenen S-Zustand beobachtet werden. Darüber hinaus wurde in fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an Lipidvesikeln weder ein Ionentransport noch ein Ausfluss von Farbstoffmolekülen („Leakage“) beobachtet. Allerdings ist TempA in der Lage einen pH-Gradienten abzubauen.



**Abbildung 5:** Das antimikrobielle Peptid TempA: **A:** Helixansicht sowie Seitenansicht der Peptidhelix. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb, hydrophile Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. **B:** Darstellung als helikales Rad. Hier sind zusätzlich Helixbrecher (Gly, Pro) grün und polare Aminosäuren hellblau gekennzeichnet.

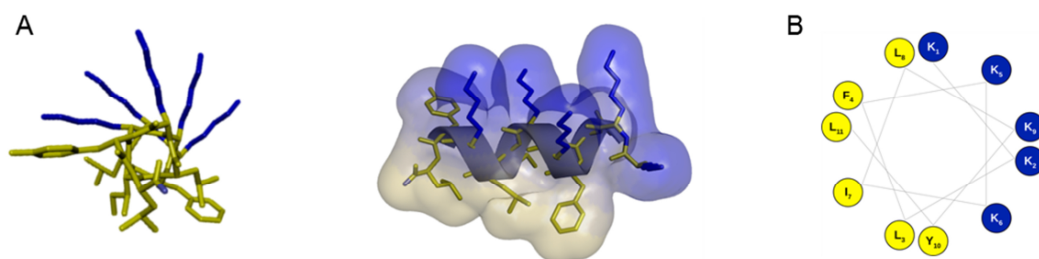
Diese Ergebnisse lassen drauf schließen, dass TempA selektiv unter anderem Protonengradienten abbauen kann. Es könnte seine antimikrobielle Wirkung durch Entkopplung der Atmungskette entfalten. Dieser Mechanismus, in dem TempA als Protonen-Entkoppler bzw. Protonen-Shuttle wirkt, stellt einen völlig neuartigen Wirkmechanismus für ein AMP dar <sup>83</sup>.

### 2.3.3 BP100

Bei BP100 (KKLFFKKILKYL-NH<sub>2</sub>) handelt es sich um ein synthetisches Peptid. Es wurde durch systematisches Screening einer Bibliothek aus CecropinA-Melittin Hybriden gefunden <sup>84</sup>. Seine antimikrobiellen Eigenschaften richten sich gegen Pflanzenpathogene, aber auch gegen gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* und grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* <sup>84</sup>. Gleichzeitig besitzt es nur geringe hämolytische Aktivität <sup>84</sup>. BP100 ist ein vielseitiges Peptid. Es kann in Tabakzellen eindringen, ohne deren Membran zu zerstören <sup>85</sup>. BP100 ist daher sowohl als antimikrobielles als auch als zellpenetrierendes Peptid interessant.

BP100 nimmt in Gegenwart von Membranmodellen eine amphiphile,  $\alpha$ -helikale Struktur an (Abbildung 6) <sup>86</sup>. Eine Seite der Helix besteht aus positiv geladenen Aminosäuren, die andere aus hydrophoben. Mit nur 11 Aminosäuren und einer Nettoladung von +6 ist BP100 ein sehr kurzes, stark positiv geladenes AMP. Es ist zu kurz um eine Membran zu durchspannen. Daher ist eine Porenbildung als Wirkmechanismus für BP100 unwahrscheinlich. Rasterkraftmikroskopie zeigte, dass BP100 die Membran von

*Escherichia Coli*-Zellen bei der minimalen Hemmkonzentration von  $3 \mu\text{M}$  zerstört<sup>87</sup>. Das weist darauf hin, dass die Zellmembran der Angriffspunkt von BP100 ist und sein antimikrobieller Effekt auf der Membranzerstörung beruht. Durch Zirkulardichroismus-, orientierte Zirkulardichroismus-, Festkörper-<sup>15</sup>N- und <sup>19</sup>F-NMR-Messungen wurde festgestellt, dass BP100 in der Membran sehr beweglich ist<sup>86</sup>. BP100 verbleibt auch in hohen Konzentrationen in einem oberflächengebundenen Zustand. Wahrscheinlich beruht seine antimikrobielle Wirkung auf dem Teppich-Mechanismus.



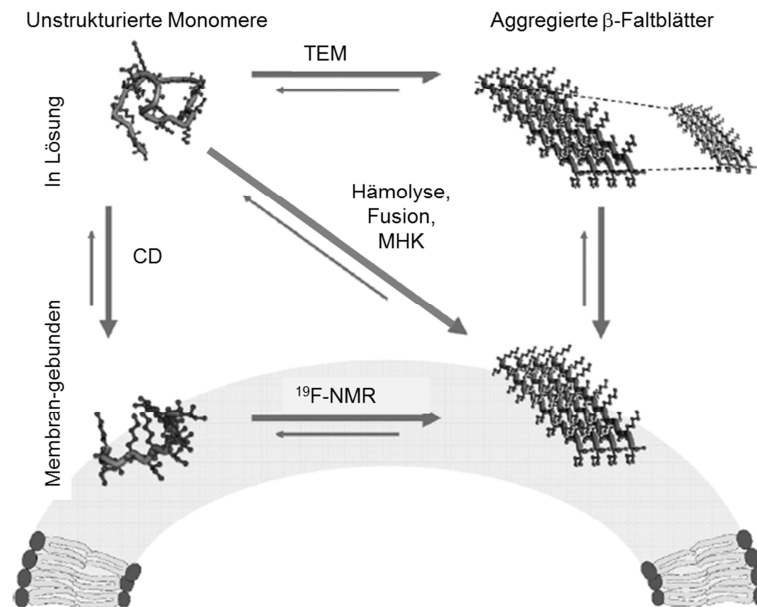
**Abbildung 6:** Das antimikrobielle Peptid BP100: **A:** Helixaufsicht sowie Seitenansicht der Peptidhelix. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb, hydrophile Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. **B:** Darstellung als helikales Rad.

#### 2.3.4 KIGAKI

Das kationische Peptid KIGAKI (KIGAKIKIGAKIKIGAKI-NH<sub>2</sub>) mit einer Nettoladung von +7, wurde als amphiphiler  $\beta$ -Strang entworfen und dient als Modell für  $\beta$ -Faltblatt Aggregation in Membranen<sup>88</sup>. Diese Selbstassemblierung monomerer Peptide spielt eine entscheidende Rolle in vielen Krankheiten wie z.B. Alzheimer. Ein interessanter biologischer Aspekt des KIGAKI-Modellsystems ist, dass das Peptid eine ausgeprägte antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien zeigt, während hämolytische Nebeneffekte recht gering sind<sup>88,89</sup>.

Zirkulardichroismus- und Infrarot-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Peptid in geringen Konzentrationen in Lösung unstrukturiert als Monomer vorliegt<sup>88,90,91</sup>. Bei höherer Konzentration und längerer Inkubationszeit beginnt das Peptid zu aggregieren und bildet amyloide  $\beta$ -Faltblatt Strukturen aus (Abbildung 7)<sup>92</sup>.

In Gegenwart von Membranen bindet KIGAKI an die Membranoberfläche. In geringer Konzentration verbleibt es monomer und flexibel. Bei höheren Konzentrationen begünstigt die Membranumgebung die Aggregation zu amyloiden  $\beta$ -Faltblatt Strukturen. In Membranumgebung aggregieren die Peptide schneller als in Lösung.



**Abbildung 7:** Konformationsgleichgewicht von KIGAKI. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigt, dass das Peptid in Lösung konzentrationsabhängig amyloide Fibrillen ausbildet. Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) zeigt, dass das Peptid eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur annimmt, wenn es an negativ geladene Vesikel bindet. Mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie kann das Aggregationsverhalten des membran-gebundenen Peptides untersucht werden. Die Tendenz von KIGAKI zu aggregieren hängt in Hämolyse-, minimale Hemmkonzentration- (MHK) oder Fusionstests nicht nur von der Peptidkonzentration, sondern auch von seiner Affinität gegenüber der jeweiligen Membran ab. Abbildung modifiziert nach <sup>92</sup>.

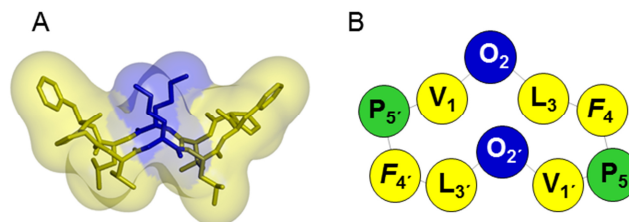
In eine Studie mit verschiedenen Analoga von KIGAKI, bei denen einzelne Aminosäuren durch die D- oder L-Form der unnatürlichen, konformationell starren Aminosäure  $\text{CF}_3$ -Bpg ausgetauscht wurden, neigten die L- $\text{CF}_3$ -Bpg enthaltenden Analoga eher zur Aggregation als die mit D- $\text{CF}_3$ -Bpg <sup>92</sup>. Die minimale Hemmkonzentration war unabhängig von der Sequenz der Peptide und somit auch vom Aggregationsverhalten. Die zur Aggregation neigenden Analoga waren jedoch stärker hämolytisch aktiv. Diese Ergebnisse liefern einen Ansatzpunkt zur Verbesserung des Therapeutischen Index von zur Aggregation neigenden Peptiden.

### 2.3.5 Gramicidin S und Gramicidin S-Granulae

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit widmet sich der natürlichen Erscheinungsform des antimikrobiellen Peptids Gramicidin S (GS) als Gramicidin S-Granulae (GSG).

GS  $\text{cyclo(DFPVOL}^{\text{D}}\text{FPVOL)}$  stammt aus dem Bodenbakterium *Aneurinibacillus migulanus* (früher *Bacillus brevis*)<sup>93</sup>. Es ist antimikrobiell aktiv gegenüber grampositiven, gramnegativen Bakterien sowie einigen pathogenen Pilzen<sup>93-95</sup>. Trotz seiner hohen hämolytischen Aktivität ist GS eines der wenigen AMP, die als antibiotisches Medikament eingesetzt werden<sup>96</sup>.

Durch seine cyclische Struktur und das Vorhandensein der unnatürlichen Aminosäuren Ornithin und D-Phenylalanin ist es sehr stabil gegenüber Proteasen<sup>97</sup>. Es besitzt eine antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, welche durch vier Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen den Atomen des Peptidrückgrats ausgebildet wird<sup>98-100</sup>. Die räumliche Trennung zwischen zwei positiv geladenen Ornithinresten auf der einen Seite und hydrophoben Resten auf der anderen Seite des  $\beta$ -Faltblatt-Rückgrats verleiht GS einen amphiphilen Charakter (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** **A:** Cyclische  $\beta$ -Faltblatt Struktur des antimikrobiellen Peptids GS. Zwei positiv geladene Ornithinreste (blau) auf der einen und hydrophoben Reste (gelb) auf der anderen Seite des  $\beta$ -Faltblatt-Rückgrats verleihen dem Molekül amphiphilen Charakter. **B:** Zwei Prolinreste (grün) bilden  $\beta$ -Schleifen.

In DMPC/DMPG-Membranen bindet GS zuerst an die Membranoberfläche. Abhängig von Konzentration und Temperatur kann es sich umorientieren und in den hydrophoben Kern eintauchen<sup>101</sup>. Es wurde vorgeschlagen, dass die Einlagerung der GS-Moleküle in die Membran zur Ausbildung oligomerer  $\beta$ -Fassdauben und daraufhin zur Lyse der Zellen führt<sup>101,102</sup>.

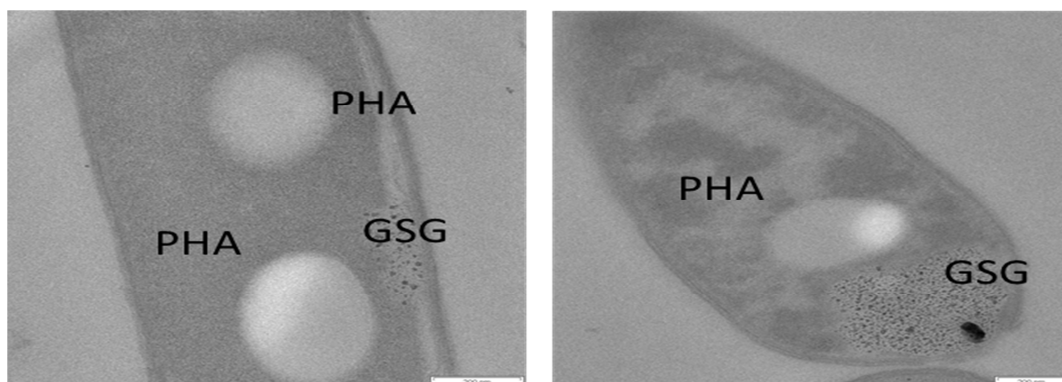
### *GS-Produzent Aneurinibacillus migulanus*

*Aneurinibacillus migulanus* (früher *Bacillus brevis*) ist ein grampositiver, nicht-pathogener Sporenbildner aus der Familie der Paenibacillaceae<sup>103,104</sup>. GS wird in *A. migulanus* nicht-ribosomal durch die GS-Synthetase synthetisiert<sup>105</sup>.

Abhängig von den Wachstumsbedingungen differenziert *A. migulanus* in verschiedene Kolonie-Phänotypen<sup>93</sup>, von denen nicht alle in der Lage sind GS zu synthetisieren. Kolonien der GS produzierenden Phänotypen erscheinen rau, während Kolonien der nicht-produzierenden Phänotypen glatt aussehen. Da die Differenzierung der Phänotypen stark von den Wachstumsbedingungen abhängt, steht auch die Produktion von GS in direktem Zusammenhang damit.

### *Gramicidin S-Granulae*

Frau Dr. Marina Berditsch (Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie) entdeckte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *A. migulanus*-Zellen ca. 200 nm große, elektronendichte, sphärische Einschlusskörperchen (Abbildung 9), die ausschließlich in GS produzierenden Zellen vorkamen<sup>106</sup>. Durch selektive Fluoreszenzfärbung konnte GS in den Granulae nachgewiesen werden. Bei den Granulae handelt es sich also um die natürliche Erscheinungsform von GS in der Produzentenzelle.



**Abbildung 9:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *A. migulanus*-Zellen. Es sind neben hell erscheinenden Polyhydroxyalkanoaten (PHA) kleine dunkle GSG zu erkennen. GSG sind dabei nahe der Zellmembran lokalisiert, wo sich auch die GS Synthetase befindet<sup>107</sup>. Bilder: Dr. M. Berditsch, unveröffentlicht.

Erste Experimente zeigten eine mit reinem GS vergleichbare antimikrobielle Aktivität, bei gleichzeitig geringer hämolytischer Aktivität. Die biologische Aktivität von GSG birgt hohes Potential als Antibiotikum. Vielleicht ist es möglich, bei Kenntnis der genauen Zusammensetzung und Struktur Granula künstlich zu rekonstituieren und diesen Ansatz auf andere AMP zu übertragen. So könnte die medizinische Anwendbarkeit von natürlichen AMP verbessert werden.

## 2.4 Biophysikalische Untersuchungen der Wechselwirkung von AMP mit Biomembranen

Unabhängig davon, ob der Wirkmechanismus eines AMPs auf Membranzerstörung oder der Wechselwirkung mit einem intrazellulären Ziel beruht, stellt die Membran den ersten Angriffspunkt dar. Daher ist das Verständnis der Wechselwirkung von AMP mit Membranen unabdingbar für das Verständnis von deren Wirkmechanismus.

Der komplexe Wirkmechanismus von AMP sollte idealerweise in lebenden Zellen, statt *in vitro* untersucht werden. Nur eine natürliche Umgebung bringt alle biologisch relevanten Strukturen zum Vorschein. Aus verschiedenen Gründen ist es oft nicht möglich, diese Bedingungen präzise *in vitro* herzustellen.

### 2.4.1 Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung antimikrobieller Peptide

NMR-Spektroskopie bietet eine nicht-invasive biophysikalische Methode zur Charakterisierung von Proteinen, Peptiden und Lipiden. Sie ist daher perfekt vereinbar mit einem lebenden Organismus und findet daher zum Beispiel auch in der medizinischen Diagnostik (Magnetresonanztomographie) Anwendung und ist als Methode zur Charakterisierung von Biomolekülen in der Zelle geeignet<sup>108,109</sup>.

Membranproteine und membranaktive Peptide - wie auch AMP - in Membranumgebung sind für flüssig-NMR nur beschränkt zugänglich. So können für die meisten AMP mindestens zwei verschiedenen Zustände angenommen werden: der ungebundene Zustand in Lösung und der membrangebundene Zustand.

Um AMP in ihrer nativen Umgebung - der Membran - charakterisieren zu können, ist daher Festkörper-NMR die Methode der Wahl. Mittels Festkörper-NMR können unter anderem die Struktur von Membranproteinen, die Wechselwirkung von Membranaktiven Peptiden - wie AMP - mit Lipiden und nicht kristalline Komplexe wie Amyloidfibrillen untersucht werden<sup>110-114</sup>. Festkörper-NMR ist die einzige Methode, die fähig ist, die reale Struktur von AMP in quasi-atomarer Auflösung, sogar in einer nativen Biomembran wiederzugeben<sup>112,115-117</sup>.

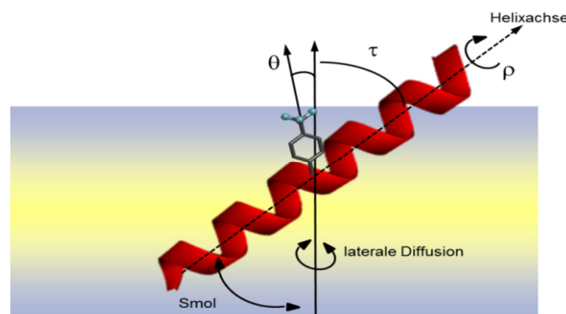
Eine Schwäche der Festkörper-NMR im Vergleich zur flüssig-NMR und anderen spektroskopischen Techniken ist die größere Linienbreite und das geringere Signal-Rausch-Verhältnis. Durch Verwendung makroskopisch orientierter Proben oder schnelles Rotieren der Probe um den magischen Winkel (*magic-angle-spinning* MAS) können auch in der Festkörper-NMR recht schmale Linien erhalten werden<sup>118</sup>.

Zur Festkörper-NMR-Untersuchung von Peptiden eignen sich z.B. die NMR-aktiven Isotope <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C oder <sup>2</sup>H. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit dieser Isotope müssen Peptide für NMR-Untersuchungen entsprechend markiert werden. Hierbei kann die Markierung sowohl synthetisch als auch über biologische Peptidsynthese in Bakterien durch Isotopen-Anreicherung des Nährmediums, wie im Falle von GS, erfolgen. Wegen ihrer geringen NMR-Empfindlichkeit sind diese Isotope hauptsächlich für hohe P/L geeignet. Ebenfalls aufgrund ihrer geringen Empfindlichkeit, aber auch wegen ihres natürlichen Vorkommens in biologischen Proben, sind sie darüber hinaus nicht ideal für Festkörper-NMR-Untersuchungen in biologischen Membranen.

In makroskopisch orientierten Festkörper-NMR-Proben hat sich die selektive Markierung von Peptiden mit <sup>19</sup>F als nützlich erwiesen. Aufgrund der hohen NMR-Sensitivität des Fluorkernes und der Abwesenheit eines natürlichen Fluorhintergrunds in biologischen Materialien eignet sich eine selektive Fluormarkierung besonders gut<sup>119</sup>. Es wurden mittlerweile zahlreiche geeignete fluormarkierte Aminosäuren entwickelt, die synthetisch in Peptide eingebaut werden können<sup>120-123</sup>. Nachteil einer Fluormarkierung ist die Anwesenheit einer nicht natürlichen Aminosäure, die eventuell Struktur und Funktion des Peptids stören könnte.



Mittels Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR konnten für zahlreiche AMP Membranorientierungen ermittelt und Wirkmechanismen vorgeschlagen werden<sup>76,86,92,119,124-126</sup>. Hierzu werden selektiv Aminosäuren, die eine  $\text{CF}_3$  Gruppe tragen und starr an das Peptidrückgrat gebunden sind, in die Peptide eingebaut. Gängige fluoriierte Aminosäuren, die im Peptid hydrophobe Aminosäuren ersetzen können, sind zum Beispiel  $\text{CF}_3$ -bicyclopentylglycin ( $\text{CF}_3$ -Bpg) oder 4- $\text{CF}_3$ -Phenylglycin. Die Analyse von mindestens vier individuell mit einer solchen Aminosäure markierten Peptiden in makroskopisch orientierten Membranproben erlaubt direkt Rückschlüsse auf die Orientierung des Wildtyp-Peptides in der Membran. So reflektieren die dipolaren Kopplungen der Fluoratome, die in einem Triplett im NMR-Spektrum resultieren, direkt den Winkel  $\theta$  zwischen den  $\text{CF}_3$ -Gruppen am Peptidrückgrat und dem statischen magnetischen Feld. Woraus sich wiederum der Neigungswinkel  $\tau$ , der azimutale Rotationswinkel  $\rho$  und der Mobilitäts-Parameter  $S_{\text{mol}}$  des Peptides ableiten lassen (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Orientierungsparameter eines  $\alpha$ -helikalen Peptides in der Membran. Aus dem Winkel  $\theta$  zwischen den  $\text{CF}_3$ -Gruppen (mindestens 4) und dem Magnetfeld ergeben sich der Neigungswinkel  $\tau$ , der Rotationswinkel  $\rho$  und die Mobilität  $S_{\text{mol}}$  der Peptidhelix.

#### 2.4.2 NMR in Modellmembranen

Festkörper-NMR-Studien an AMP werden meist in synthetischen Modellmembranen aus wenigen klar definierten Komponenten durchgeführt. Einzelne Parameter wie Lipidzusammensetzung, Peptidkonzentration, Ladung, Lipidphase, Membrandicke oder Membrankrümmung können so gezielt verändert werden<sup>78,79,101,127-129</sup>. So kann die Peptid-Lipid-Wechselwirkung von AMP detailliert in Abhängigkeit von den gegebenen Bedingungen untersucht werden.

Lamellare Doppelschichten aus synthetischen Lipiden sind die zu bevorzugenden Modelle für natürliche Zellmembranen. Multilamellare Vesikel werden typischerweise als unorientierte Proben für die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendet. Sie haben den Vorteil, dass überschüssiges Wasser vorhanden ist. Somit kann sowohl der Anteil des überschüssigen Wassers als auch der pH-Wert der Probe einfach kontrolliert werden. Allerdings sind sie im Vergleich zu lebenden Zellen recht klein und flache Lipiddoppelschichten sind, außer im Falle von Viren oder sub-zellulären Membranen, die einzig relevanten Membranmodelle <sup>119</sup>.

Makroskopisch orientierte Lipiddoppelschichten sind eine gute Wahl zur Festkörper-NMR-spektroskopischen Charakterisierung membrangebundener AMP <sup>116,130,131</sup>. Obwohl vollständig hydratisiert, enthalten diese Membranen kein überschüssiges Wasser, daher spielt die Affinität von Peptiden eine untergeordnete Rolle in der Bindung an die Membran. Das Peptid wird aufgrund des Bindungs-Gleichgewichtes in die Membran gedrängt, selbst wenn die Elektrostatik nicht optimal ist. So können auch AMP mit geringer Membranaffinität, in manchen Fällen sogar Übergangszustände, festgehalten und charakterisiert werden <sup>101,129,132</sup>. In mechanisch orientierten Doppelschichten kann die Lipidzusammensetzung recht frei gewählt werden, darüber hinaus kann die Peptidkonzentration vollständig kontrolliert werden. Eine Kontrolle des pH-Wertes oder der Ionenstärke gestaltet sich allerdings schwieriger als in multilamellaren Vesikeln. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Kontrolle des pH-Wertes auch in orientierten Lipiddoppelschichten möglich ist.

Die in dieser Arbeit untersuchten antimikrobiellen Peptide wurden bereits unter verschiedenen Bedingungen in Modellmembranen charakterisiert <sup>78,79,83,86,92,101,125,128,129,133</sup>.

#### 2.4.3 Doppelschichten aus synthetischen Lipiden als Modell für natürliche Membranen

Durch geeignete Wahl der Lipide können mechanisch angeordnete Lipiddoppelschichten als kompositionelles Modell für natürliche Biomembranen eingesetzt werden. Hierbei werden Mischungen der Hauptkomponenten eukaryotischer oder prokaryotischer Membranen gewählt. Durch Lipide mit teilweise ungesättigten Acylketten erhalten die Membranen fluiden Charakter. Prokaryotische Membranen werden durch Mischungen anionischer Phosphatidylglycerole und Cardiolipine mit dem zwitterionischen Phosphatidylethanolamin nachgeahmt.

Eukaryotische Plasmamembranen bestehen vorwiegend aus zwitterionischen Phosphatidylcholinen, Sphingomyelinen und Phosphatidylethanolamin. Sie enthalten außerdem kleinere Mengen Phosphatidylglycerol, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol. Einer der Hauptunterschiede zu Prokaryoten ist die Anwesenheit von Sterolen, wie dem tierischen Cholesterol, welches die größere Stabilität eukaryotischer gegenüber prokaryotischen Membranen verursacht. Nichtsdestotrotz können solche Modelle nicht die wahre Komplexität natürlicher Biomembranen wiedergeben.

#### 2.4.4 Lipidpolymorphismus

Polymorphismus ist der biophysische Aspekt des Verhaltens von Lipiden der ihre Fernordnung, das heißt ihre Art der Selbstassemblierung beeinflusst. Je nach Art der Lipide sowie äußeren Einflüssen wie Hydratisierung, Temperatur, pH-Wert etc. ordnen sich Lipide zu verschiedenen Lipidphasen an. Eine Phase ist hierbei definiert als Anhäufung von vielen Lipiden, die über ein weites Volumen strukturell homogen ist.

Die häufigsten Lipidphasen natürlicher Phospholipide sind die lamellaren (L), die hexagonalen, die kubischen Phasen sowie mizellaren Phasen<sup>134</sup>. Lamellare Phasen sind aus Lipiddoppelschichten aufgebaut. Hexagonale Phasen haben eine zylindrische Anordnung, kubische Phasen bestehen aus einem dreidimensionalen Netzwerk und mizellare Phasen bilden kugelförmige oder zylindrische Aggregate<sup>134</sup>. Innerhalb der Phase können sich die Lipide mit den Kopfgruppen nach außen wie Öl in Wasser oder nach innen wie Wasser in Öl anordnen.

Schließlich wird, insbesondere bei lamellaren Phasen, noch zwischen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Phasen unterschieden. In der Gelphase ( $L_{\beta}$ -Phase) haben die Acylreste eine hohe räumliche Ordnung, die Kohlenwasserstoffketten liegen in einer *all-trans* Konfiguration vor. Aufgrund der geringeren Fluidität der Lipide ist das System relativ starr. Bei höheren Temperaturen gehen Gelphasen in fluide Phasen ( $L_{\alpha}$ -Phasen) über. Es kommt hier zu schnellen Konformationsänderungen in der Lipidkette. Durch die freie Beweglichkeit der Lipidanteile liegt ein größeres Fließvermögen vor. Lamellare Gelphasen haben aufgrund zahlreicher Knicke in den Kohlenwasserstoffketten eine geringere Dichte und Dicke der Doppelschicht als lamellare fluide Phasen desselben Lipids.

Neben den genannten äußeren Einflüssen hat die geometrische Gestalt der Lipide wesentlichen Einfluss darauf, welche Phase gebildet wird.

#### 2.4.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Wechselwirkung zwischen AMP und Modellmembranen

Um den molekularen Mechanismus amphiphiler AMP zu verstehen, sollten biophysikalische Studien ihrer Wechselwirkung mit Lipiddoppelschichten unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Allerdings ist es in Experimenten, die Gebrauch von makroskopisch angeordneten multilamellaren Membranen auf einen festen Träger machen, schwierig den pH-Wert einer Probe zu kontrollieren. Synthetische Peptide, die durch HPLC aufgereinigt wurden, sind erfahrungsgemäß sauer und können den pH-Wert einer Probe signifikant ändern. Der Protonierungszustand sowohl des Peptids als auch bestimmter Lipide kann eine kritische Rolle in ihrer Struktur und Funktion spielen. Saure Hydrolyse von Phospholipiden, die zur Bildung von Lysolipiden und Fettsäuren führt, ändert die Membranzusammensetzung und damit deren Eigenschaften<sup>135,136</sup>. Auch das Lipidphasenverhalten hängt nicht nur von Temperatur und Ionenstärke sondern auch vom pH-Wert ab<sup>137-140</sup>. Da in Lipidmembranen mehrere ionisierbare Gruppen vorhanden sind, kann der pH-Wert einer Probe direkten Einfluss auf die Ladung der Membran, Membrankrümmung und/oder das laterale Druckprofil der Membran haben.

Das Peptid kann ebenfalls vom pH beeinflusst werden. Der Ionisierungszustand der Seitenketten kann geändert werden und somit die Peptid Konformation und die Wechselwirkung des Peptides mit der Lipiddoppelschicht. Ein bekanntes Beispiel ist die pH-abhängige Reorientierung von amphiphilen Helices durch Protonierung/Deprotonierung von Histidin<sup>141</sup>. Eine weitere pH-sensitive Gruppe in Peptiden ist ihr N-Terminus, mit einem pKa nahe 7. Auch hier könnte durch Protonierung die Interaktion mit der Membran verändert werden.

Es ist also fraglich, ob Ergebnisse aus zahlreichen biophysikalischen Studien, die ohne Kontrolle des pH-Wertes durchgeführt wurden, tatsächlich die Wechselwirkung von kationischen AMP mit Membranen unter physiologischen Bedingungen wiedergeben.

#### 2.4.6 Natürliche Biomembranen

Im Gegensatz zu synthetischen Modellmembranen, die in Abschnitt 2.3.3 vorgestellt wurden, bestehen natürliche Membranen aus sehr vielen verschiedenen Lipidklassen. Die Zahl verschiedener Lipide in der Plasmamembran einer Zelle kann 1000 übersteigen<sup>142</sup>. Die große Anzahl verschiedener polymorpher Strukturen, die Lipide *in vitro* bilden, deutet darauf hin, dass Membranen auch *in vivo* stark variieren können.

So können Lipide nicht nur unter bestimmten Bedingungen verschiedene Lipidphasen bilden (Abschnitt 2.3.4), sondern auch innerhalb einer Membran unterschiedliche Strukturen (Membran-Mikrodomänen oder „*lipid-rafts*“) <sup>143-145</sup>.

Biologische Membranen bestehen außerdem zu einem großen Teil aus Bestandteilen, die keine Lipide sind. Den Hauptteil machen Proteine aus. So kann der Proteingehalt abhängig von Art der Membran bis zu 78 % betragen. Neben Lipiden und Proteinen kommen Bestandteile wie Wasser, verschiedene anorganische Ionen, Metabolite und manchmal Nukleinsäuren oder Kohlenhydrate bis zu einigen Prozent der Gesamtmasse der Membran vor.

Die grundlegende Membranarchitektur basiert auf der lamellaren Lipidphase, einer kontinuierlichen Lipiddoppelschicht, in welcher die übrigen Membrankomponenten eingebettet sind. Die meisten biologischen Membranen sind in Bezug auf ihre beiden Lipidschichten asymmetrisch <sup>145,146</sup>. Da sich Membranen nicht durch kovalente Bindung bilden, besitzen die Moleküle darüber hinaus laterale Beweglichkeit. So kann sich ihre Position innerhalb der Membran verändern. In den meisten Membranen existieren gleichzeitig verschiedene Bereiche und Domänen mit einem definierten Lipid und Proteingehalt und somit unterschiedlichen Eigenschaften <sup>142</sup>. Das Flüssigmosaikmodell von Nicholson und Sanger beschreibt die klassische Vorstellung der Membranstruktur. Das grundlegende Konzept hat noch immer Bestand, wurde jedoch durch neue Erkenntnisse ergänzt. So wird heute die Betonung eher auf die mosaikartige Struktur der Membran gelegt, in der Proteine und Lipide durch verschiedene Wechselwirkungen in ihrer Mobilität innerhalb der Membran eingeschränkt sind <sup>145</sup>. Die Struktur und die Vorgänge in und an einer Biomembran sind weitaus komplexer, als es ein einfaches Modell wiedergeben könnte. So wird auch deutlich, dass eine künstliche Membran aus synthetischen Lipiden nur ein unzureichendes Bild der Wirkung eines AMP *in vivo* liefern kann.

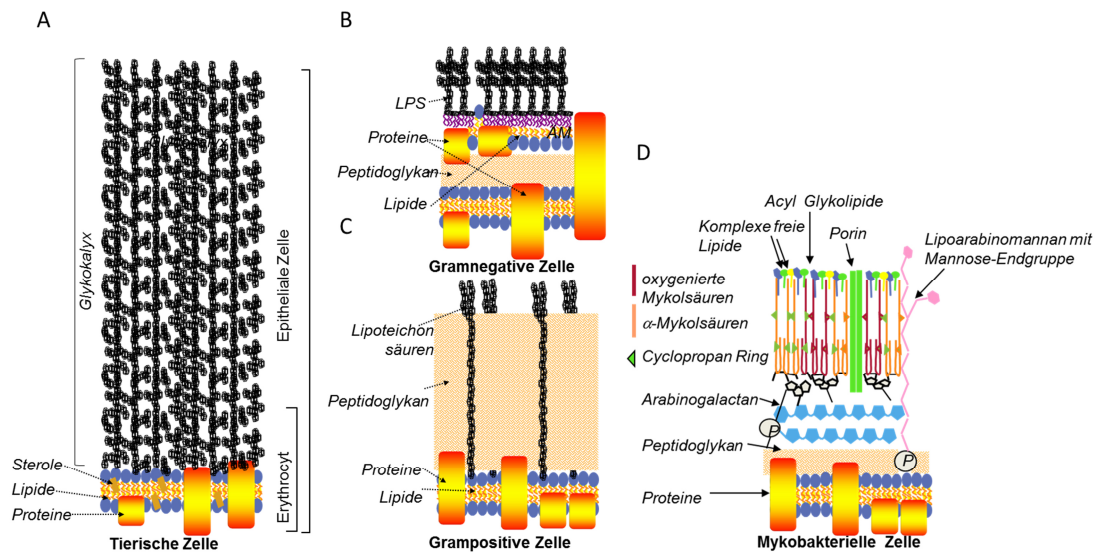
#### 2.4.7 Bakterielle Zellwände

Um ihren eigentlichen Angriffspunkt, die Plasmamembran, zu erreichen, müssen AMP oft Hindernisse überwinden. So besitzen Bakterienzellen eine feste Zellwand außerhalb der Zellmembran. Diese Zellwand besteht aus dem komplexen Heteropolymer Peptidoglykan. In grampositiven Zellen, besteht die Zellwand aus bis zu 40 Schichten und kann bis zu 25 nm dick sein (Abbildung 11). Sie ist von extrazellulären anionischen Polymeren, die bis zu 10 % der Gesamtmasse ausmachen, bedeckt <sup>147,148</sup>. Das sind in

der Regel Teichonsäuren. Manche grampositiven Bakterien besitzen keine Teichonsäuren, sondern funktionell analoge Polyanionen. So besitzt *Micrococcus luteus* zum Beispiel Lipomannan, ein Polymer aus Mannosylresten, die zu ca. 25 % mit Succinylgruppen verestert sind <sup>149</sup>.

Die Zellwand gramnegativer Bakterien ist nur ca. 3 nm dick und im periplasmatischen Raum zwischen der inneren Membran und einer zusätzlichen äußeren Membran lokalisiert (Abbildung 11)<sup>147,148</sup>. Die Lipideinzelschicht der äußeren Membran enthält ca. 90 % Lipopolysaccharide. Lipopolysaccharide bestehen aus Lipid und einer Oligosaccharidkomponente, die hoch spezifisch für individuelle bakterielle Spezies und Phänotypen ist.

Eine Besonderheit stellt die Membran von Mykobakterien, wie dem Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis*, dar. Mykobakterien besitzen eine dicke, komplex aufgebaute, nahezu undurchlässige Zellwand (Abbildung 11). Die drei vorwiegenden Moleküle in der Zellwand von Mykobakterien sind Peptidoglykan, Arabinogalactan und Mykolsäuren. Bei Mykolsäuren handelt es sich um langkettige, verzweigte Hydroxyfettsäuren <sup>150</sup>. Sie unterscheiden sich je nach Spezies in ihrer Kettenlänge (bis zu 100 C-Atome) und ihren funktionellen Gruppen wie Doppelbindungen, Cyclopropanringen oder Sauerstoff-haltigen Substituenten. Mykolsäuren sind dicht gepackt und bilden einen feste Lipidmonoschicht, die das Mureinnetzwerk und das Arabinogalaktan darunter vollständig abschirmt. Die Barrierefunktion der Zellwand, mit ihrer wachsartigen äußeren Schicht aus Mykolsäuren, macht *M. tuberculosis* besonders resistent gegen äußeren Stress, aber auch gegen Antibiotika. Zum Beispiel ist die Diffusion von  $\beta$ -Laktamen durch die mykobakterielle Zellwand hundertmal langsamer als ihr Eindringen in *E. coli*-Zellen <sup>151</sup>. Neben ihrer schützenden Funktion für das Bakterium sind Mykolsäuren selbst pathogen und besitzen verschiedenen immunologischen Funktionen und sind an der Bildung von Biofilmen beteiligt <sup>152,153</sup>.



**Abbildung 11:** Allgemeiner Aufbau tierischer und bakterieller Zellhüllen. **A:** Tierische Zellen besitzen keine Zellwand. Ihre Membran ist je nach Zelltyp von einer dicken Schicht aus Kohlenhydraten, der Glykokalyx umgeben. **B:** Die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht aus Peptidoglykan, einer äußeren Membranschicht (ÄM) und Lipopolysacchariden (LPS). **C:** Grampositive Bakterien sind von einer dicken Peptidoglykanschicht umgeben, in die Lipoteichonsäuren eingebettet sind. **D:** Wesentliche Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand sind Peptidoglycan, Arabinogalactan und Mykolsäuren.

Antibiotika-resistente Tuberkuloseerreger stellen ein zunehmendes globales Gesundheitsproblem dar <sup>154,155</sup>. Antimikrobielle Peptide wären aufgrund ihrer multiplen Wirkmechanismen geeignete Kandidaten als Medikament gegen Tuberkulose <sup>156-158</sup>. Es ist daher von Interesse die Wechselwirkung von AMP mit Mykolsäuren, ihrem ersten Angriffspunkt in der mykobakteriellen Zellwand, zu untersuchen.

### 3 Aufgabenstellung

Viele biophysikalische Studien über die Wechselwirkung von AMP mit Membranen, werden unter künstlichen Bedingungen in einfachen Modellmembranen durchgeführt. AMP sind jedoch konformationell sehr flexibel und wirken hochspezifisch in Bezug auf ihre Umgebung. Ziel dieser Arbeit war es, antimikrobielle Peptide in möglichst natürlicher Umgebung zu charakterisieren.

Hierzu sollte zunächst der Einfluss des pH-Wertes auf die Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit Membranen untersucht werden. Viele biophysikalische Untersuchungen, die mit makroskopisch orientierten Membranen arbeiten, vernachlässigen den pH-Wert der Probe. Der pH-Wert kann aber Effekte auf das Peptid und die Membranlipide haben und somit ihre Wechselwirkung beeinflussen. Daher sollte der Einfluss des pH-Wertes sowohl auf Lipidordnung und Lipidhydrolyse, als auch auf das Orientierungsverhalten eines antimikrobiellen Peptides in der Membran systematisch untersucht werden.

Biologische Membranen sind weitaus komplexer, als Modellmembranen, die für Untersuchungen der Orientierung von AMP genutzt werden. Oft können Studien in Modellmembranen aus synthetischen Lipiden den komplexen Wirkmechanismus eines antimikrobiellen Peptides nur teilweise wiedergeben. In dieser Arbeit sollten daher die Orientierungen der antimikrobiellen Peptide Temporin A, KIGAKI, BP100 und Gramicidin S in nativen eukaryotischen und prokaryotischen Membranen mittels Festkörper-NMR untersucht werden. Außerdem sollte die Eignung von Mykolsäuren als Modellmembran für Festkörper-NMR geprüft werden.

Eine natürliche Erscheinungsform eines antimikrobiellen Peptides sind Gramicidin S-Granulae, die im Gramicidin S Produzenten *A. migulanus* vorkommen. Hier sollten geeignete Methoden zur Gewinnung von Gramicidin S-Granulae gefunden werden. Außerdem sollten ihre biologischen Eigenschaften sowie die molekulare Zusammensetzung charakterisiert werden.



## 4 Methoden

### 4.1 Steriltechnik

Alle Arbeiten, die sterile Bedingungen erforderten, wurden unter der Reinraumbank durchgeführt. Die verwendeten Glasgeräte wurden vor Gebrauch entweder im Trockenschrank 3 h bei 200 °C oder durch Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar) sterilisiert. Verbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen sowie Lösungen wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen oder kleine Mengen von Lösungen wurden mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Arbeitsmaterialien wie Pinzetten, Drahtösen etc. sowie die Öffnungen von Behältnissen wurden abgeflammt.

### 4.2 Peptidsynthese und Aufreinigung

Die verschiedenen fluormarkierten Peptide wurden im PepSyLab der Arbeitsgruppe Ulrich unter der Leitung von Dr. Parvesh Wadhvani mittels Fmoc-Chemie über Festphasenpeptidsynthese hergestellt und als Rohpeptid zur Verfügung gestellt. Eine Auflistung aller Peptide findet sich in Tabelle 1. Die Peptide wurden per Umkehrphasen Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mittels Acetonitril/Wasser-Gradienten aufgereinigt. Hierbei wurden die geeigneten Gradienten für jedes Peptid empirisch ermittelt. Die aufgereinigten Peptide wurden gefriergetrocknet und ihre Reinheit per analytischer HPLC und Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie (*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS) überprüft. Die trockenen Peptidpulver wurden bei -20 °C aufbewahrt.

**Table 1:** In dieser Arbeit verwendete synthetische  $^{19}\text{F}$ -markierte Peptide sowie die jeweiligen Wildtyp (wt) Sequenzen.

Peptidname	AS-Sequenz
BP100 wt	KKLFFKKILKYL-NH <sub>2</sub>
BP100-3L	KK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)FKKILKYL-NH <sub>2</sub>
BP100-4F	KKL(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)KKILKYL-NH <sub>2</sub>
BP100-7I	KKLFFKK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)LKYL-NH <sub>2</sub>
BP100-8L	KKLFFKKI(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)KYL-NH <sub>2</sub>
BP100-10Y	KKLFFKKILK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)L-NH <sub>2</sub>
BP100-11L	KKLFFKKILKY(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)-NH <sub>2</sub>
KIGAKI wt	KIGAKIKIGAKIKIGAKI-NH <sub>2</sub>
KIGAKI-6I	KIGAK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)KIGAKIKIGAKI-NH <sub>2</sub>
KIGAKI-8I	KIGAKIK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)GAKIKIGAKI-NH <sub>2</sub>
KIGAKI-10A	KIGAKIKIG(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)KIKIGAKI-NH <sub>2</sub>
KIGAKI-12I	KIGAKIKIGAK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)KIGAKI-NH <sub>2</sub>
KIGAKI-14I	KIGAKIKIGAKIK(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)GAKI-NH <sub>2</sub>
PGLa wt	GMASKAGAIAGKIAKVALKAK-NH <sub>2</sub>
PGLa-13A	GMASKAGAIAGKI(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)KVALKAK-NH <sub>2</sub>
TempA wt	FLPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-1F	(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)LPLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-2L	F(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)PLIGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-4L	FLP(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)IGRVLSGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-5I	FLPL(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)GRVLSGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-8V	FLPLIGR(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)LSGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-9L	FLPLIGRV(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)SGIL-NH <sub>2</sub>
TempA-12I	FLPLIGRVLSG(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)L-NH <sub>2</sub>
TempA-13L	FLPLIGRVLSGI(CF <sub>3</sub> -L-Bpg)-NH <sub>2</sub>

## 4.3 Vorbereitung von NMR-Proben

### 4.3.1 Allgemeine Vorbereitung orientierter NMR-Proben

Dieser Abschnitt beschreibt das allgemeine Vorgehen zur Vorbereitung orientierter Membranproben. Abweichungen von diesem Vorgehen sind im jeweiligen Abschnitt aufgeführt.

Glasplättchen, die als Probenträger dienen, wurden in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  gewaschen und mindestens 2 h im Vakuum getrocknet. Peptid und Lipid wurden im gewünschten molaren Verhältnis (P/L) in geeignetem Lösemittel (meist  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) gelöst oder in wässriger Suspension durchmischt. Die Lösung oder Suspension wurde gleichmäßig auf die gewünschte Anzahl vorbereiteter Glasplättchen verteilt. Die Glasplättchen wurden 12 h-24 h im Exsikkator über Silicagel (je nach Probe unter Vakuum) getrocknet, anschließend gestapelt, mit einem leeren Plättchen bedeckt und für 12 h-24 h bei 96 % relativer Feuchtigkeit und 48 °C über gesättigter  $\text{K}_2\text{SO}_4$ -Lösung rehydratisiert. Die Stapel wurden in Parafilm und Polyethylenfolie gewickelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Stapel wurden bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt.

### 4.3.2 NMR-Messungen bei definiertem pH-Wert

Um den pH-Wert der NMR-Proben konstant zu halten, wurden Pufferlösungen für verschiedene pH-Werte hergestellt. Die Pufferkonzentration der Stammlösungen war in allen Fällen 100 mM. Es wurden jeweils die benötigten Substanzmengen eingewogen (Tabelle 2) und in entgastem, entionisiertem MilliQ gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt. Die Puffer wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Um die Probenvorbereitung orientierter Membranproben mit definiertem pH-Wert zu optimieren und ein reproduzierbares Protokoll zu erstellen, wurden zunächst verschiedene Pufferkonzentrationen sowie verschiedene Methoden der Pufferzugabe zum multilamellaren System getestet. Hierbei war es besonders wichtig, eine geeignete Pufferkonzentration zu finden, die einerseits über ausreichende Pufferkapazität verfügt, um die in der Peptidlösung enthaltene Säure zu kompensieren, und andererseits möglichst wenig Salz in die NMR-Probe einbringt. Daher wurde zunächst überprüft, wie viel Puffer benötigt wird, um den gewünschten pH-Wert in der Probe zu erhalten und welchen

Einfluss verschiedene Puffer sowie verschiedene Pufferkonzentrationen auf die Qualität der erhaltenen NMR-Spektren haben. Es wurden verschiedene Pufferkonzentrationen zwischen 0,4 und 20  $\mu\text{mol}$  getestet. Hierzu wurde jeweils der pH-Wert der Suspension aus Lipiden, Peptid und Puffer mittels einer micro-pH Elektrode überprüft sowie von geeigneten Proben  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Puffer zur Einstellung des pH-Wertes von NMR-Proben. Alle Angaben beziehen sich auf 250 ml Pufferlösung.

pH Wert	Puffer	Masse [g]	Stoffmenge [mmol]
2,6	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ (Gly)	1,87	25
4,0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	2,49/2,31	14/11
7,0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,78/2,34	10/15
7,0	HEPES	5,95	25
10,0	$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$	4,23/0,84	15/10

Als Lipidsystem wurde das gut charakterisierte Gemisch aus DMPC/DMPG im Verhältnis 3:1 (mol/mol) verwendet wobei, um  $^2\text{H}$ -Messungen zu ermöglichen, 10% des Anteils an DMPG durch  $\text{DMPG}_{\text{d}54}$  ersetzt wurden. Als Peptid wurde PGLa mit einer  $\text{CF}_3$ -Bpg Markierung an Position 13 gewählt. Das P/L betrug 1:50 (mol/mol) (0,5 mg Peptid, 8,5 mg Gesamtmenge Lipid oder 0,75 mg Peptid, 12,75 mg Gesamtmenge Lipid).

Eine gute Kontrolle des pH-Wertes und gute Reproduzierbarkeit wurde durch folgende Probenvorbereitung erreicht. Die Lipide sowie das Peptid wurden in MeOH gelöst. Das Lösemittel wurde im Stickstoffstrom evaporiert und die Probe über Nacht am Lyophilisator getrocknet. Die Peptid-Lipid-Mischung wurde dann in einem großzügigen Volumen (ca. 850  $\mu\text{l}$ ) wässrigen Puffers geeigneter Konzentration (typischerweise 20  $\mu\text{mol}$  für 2,4  $\mu\text{mol}$  Peptid in 120  $\mu\text{mol}$  Lipid) suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde überprüft und ggf. mit HCl oder NaOH justiert. Die Proben wurden dann sechs Gefrier-Tau Zyklen in flüssigem Stickstoff und einem auf 48 °C erwärmten Wasserbad unterzogen. Die Suspension wurde gleichmäßig auf 17 Glasplättchen verteilt, unter Vakuum getrocknet und wie in 4.3.1 hydratisiert und verpackt.

#### 4.3.4 Präparation von Erythrozytenmembranen für NMR-Proben

Die Isolierung von Erythrozytenmembranen erfolgte nach <sup>119,159</sup>. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C. Zunächst wurden Erythrozyten aus Erythrozytenkonzentrat dreimal mit 172 mM Tris-Puffer (pH 7,6, 4 °C) gewaschen (600×g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen durch langsames Schütteln für 5 min in hypotonem 9 mM Tris-Puffer (pH 7,6, 4 °C) lysiert. Die so erhaltenen Zellmembranen wurden dreimal mit 9 mM Tris-Puffer sowie zweimal mit 9 mM Tris-Puffer mit 0,01% NaN<sub>3</sub> (pH = 7,6, 4 °C) gewaschen (20000×g, 70 min, 4 °C). NaN<sub>3</sub> wurde dem Puffer hierbei für die letzten Waschschrte zugefügt, um mikrobielles Wachstum zu verhindern. Das durchscheinende, schwach rosa gefärbte Pellet wurde in letzterem Puffer aufgenommen und bis zur baldigen Verwendung auf Eis gelagert.

#### 4.3.5 Präparation von *M. luteus*-Vesikeln für NMR-Proben

Die Zellkultur und Gewinnung von Membranvesikeln von *M. luteus* erfolgte nach <sup>119,159</sup>. *M. luteus* wurden bis zur späten Wachstumsphase in Basalmedium bei 37 °C und 220 rpm wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet und zweimal in 0,9 % NaCl-Lösung sowie einmal in Verdaupuffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5 RT) gewaschen (6000×g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen sorgfältig zu 200 mg Zell-Nassmasse pro ml Puffer in Verdaupuffer resuspendiert und 1 mg/ml Lysozym sowie je 10 µg/ml DNaseI und RNaseA zugegeben. Die Zellsuspension wurde unter konstantem Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Zellsuspension 20fach mit 9 mM Tris-Puffer (pH = 7,6, 4 °C) verdünnt und 5 min auf Eis geschwenkt. Nicht-lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt (700×g, 30 min, 4 °C). Um die Ausbeute an Membranen zu erhöhen wurde das Sediment aus unlysierten Zellen erneut in 9 mM Tris Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis geschwenkt und zentrifugiert (700×g 30 min, 4 °C). Die Überstände wurden vereint und die darin enthaltenen Membranen pelletiert (26000×g, 150 min, 4 °C) und anschließend zweimal mit 9 mM Tris sowie zweimal mit 9 mM Tris mit 0,01% NaN<sub>3</sub> gewaschen. NaN<sub>3</sub> wurde dem Puffer hierbei für die letzten Waschschrte zugefügt, um mikrobielles Wachstum zu verhindern. Das leuchtend gelbe Membranpellet wurde in einem kleinen Volumen 9 mM Tris Puffer mit 0,01% NaN<sub>3</sub> (pH = 7,6, 4 °C) aufgenommen und bis zur baldigen Verwendung auf Eis gelagert.

#### 4.3.6 Lipid-Extraktion

Die Extraktion von Lipiden aus Biomembranen wurde mittels Standard-Folch-Extraktion mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  durchgeführt<sup>160,161</sup>.

Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  der zu extrahierenden Membransuspension (aus Kapitel 4.3.4 und 4.3.5) in 20fachem Volumen  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1, Volumen/Volumen) aufgenommen. Die Proben wurden durch mehrmaliges Behandeln mit Ultraschall und kräftiges Schütteln homogenisiert. Um die Lipide weiter in die organische Phase zu drängen, wurden 400  $\mu\text{l}$  0,9 % NaCl zugegeben und nochmals homogenisiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (9000 $\times$ g, 10 min, 4 °C). Die untere organische Phase (ca. 1,1 ml–1,2 ml) wurde mit einer sauberen Glasspritze entnommen und bis zur Verwendung für die Phosphatbestimmung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.3.7 Phosphatbestimmung

Die Phospholipidmenge in Membranproben wurde durch eine quantitative kolorimetrische Analyse bestimmt<sup>159,162</sup>.

Aus dem Lipid-Extrakt (Abschnitt 4.3.6) wurden Aliquote entnommen (50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$ ) und in Duranglasröhrchen überführt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels unter  $\text{N}_2$ -Strom wurde zu jeder Probe 50  $\mu\text{l}$  10 %  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  in EtOH zugeben und über der Flamme verascht. Dann wurden 300  $\mu\text{l}$  1 M HCl zugegeben und 20 Minuten im Wasserbad bei 95 °C inkubiert. Die Glasröhrchen wurden während der Inkubation im Wasserbad jeweils mit einer Glasmurmelt verschlossen. Die Proben wurden abkühlt, 700  $\mu\text{l}$  einer frisch hergestellten Lösung aus Ascorbat (10 %) und Ammoniummolybdat (0,42 % in 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (im Verhältnis 1:6) zugegeben und für weitere 30 min bei 40–45 °C im Wasserbad inkubiert. Hierbei bildete sich ein blauer Farbkomplex, dessen Absorption bei 820 nm gegen Wasser gemessen wurde. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Wasser, die ebenfalls mit 700  $\mu\text{l}$  einer frisch hergestellten Lösung aus Ascorbat (10 %) und Ammoniummolybdat (0,42 % in 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (im Verhältnis 1/6) für 30 min bei 40–45 °C im Wasserbad inkubiert wurde.

#### 4.3.8 Vorbereitung orientierter NMR-Proben mit Biomembranen

Zur Vorbereitung orientierter Membranproben für Festkörper-NMR-Messungen wurden Erythrozyten- oder *M. Luteus*-Membranen zunächst mit MilliQ mit 0,005 %  $\text{NaN}_3$  gewaschen (18000×g, 90 min, 4 °C), um Salze zu entfernen, die beim Trocknen der NMR-Proben sowie den NMR-Messungen, bspw. durch Erhitzen der Proben, stören könnten<sup>163,164</sup>. Die gewünschte Peptidmenge (0,3 mg-0,5 mg) wurde zu der entsprechenden Menge an wässriger Lipidsuspension (ca. 2 ml-4 ml) gegeben und gut durchmischt. Nun wurde die Suspension gleichmäßig auf bis zu 17 Glasplättchen verteilt und wie in 4.3.1 beschreiben getrocknet, hydratisiert und verpackt.

### 4.4 Dynamische Differenzkalorimetrie

Für die dynamischen differenzkalorimetrischen (*differential scanning calorimetric*, DSC) Messungen wurde ein MicroCal VP-DSC MicroCalorimeter verwendet.

#### 4.4.1 Vorbereitung von Lipidproben für DSC-Messungen

Für DSC-Proben wurde eine Mischung von DMPC und DMPG (3:1, mol/mol) in Methanol hergestellt. Das Lösemittel wurde im Stickstoffstrom abgedampft, die Probe in 1 ml MilliQ resuspendiert und über Nacht lyophilisiert.

Die getrockneten Lipide wurden dann mit je 1 ml verschiedener Pufferlösungen bzw. MilliQ rehydratisiert und gut durchmischt. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 48 °C inkubiert. Zur Homogenisierung wurde die Probe 15 min bei -80 °C eingefroren und 15 min bei 48 °C aufgetaut, diese Prozedur wurde insgesamt 6 Mal wiederholt. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt. Nach 15 min Auftauen bei 48 °C wurde 1 min im Argonstrom entgast.

Die DSC-Messungen wurden zuerst mit reinem Puffer bzw. Wasser und anschließend mit der entsprechenden Probe und Puffer bzw. Wasser als Referenz durchgeführt. Der Temperaturbereich der Messungen wurde von 5 °C-40 °C gewählt, die Aufheiztemperatur betrug 1 °C/min. Die Proben wurden vor jedem Messvorgang 30 min bei der Starttemperatur gehalten. Es wurde sowohl beim Aufheizen, als auch beim Abkühlen gemessen. Um Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Messungen mit frischen Proben wiederholt.

#### 4.4.2 Vorbereitungen peptidhaltiger Proben für DSC-Messungen

Die peptidhaltigen DSC-Proben enthielten PGLa wt (P/L = 1:50 bzw. 1:200). Sie wurden analog den Lipidproben vorbereitet. Das Peptid wurde aus einer 1 mg/ml Stammlösung der methanolischen Lipidlösung zugefügt, bevor das Methanol evaporiert wurde. Als Referenz bei den Messungen diente wiederum der entsprechende Puffer.

Der Temperaturbereich der DSC-Messungen wurde für die ersten Messvorgänge zwischen 5 °C-40 °C gewählt, darauf folgten 4 Messvorgänge zwischen 5 °C-80 °C um das eventuelle Auftreten einer weiteren Lipidphase zu erkennen. Zuletzt folgten weitere Scans im Temperaturbereich von 5 °C-40 °C. Die Aufheiztemperatur betrug dabei immer 1 °C/min. Die Proben wurden vor jedem Messvorgang 30 min bei Starttemperatur gehalten. Es wurde sowohl beim Aufheizen, als auch beim Abkühlen gemessen.

#### 4.5 Festkörper-NMR-Messungen orientierter Proben

Die Festkörper-NMR-Messungen wurden an einem Bruker Avance 500 MHz bzw. 600 MHz NMR-Spektrometer (Bruker Biospin) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software TopSpin (Bruker).

<sup>31</sup>P-NMR-Experimente wurden bei 202 MHz unter Verwendung eines Standard Bruker Doppelresonanzprobenkopfes, der mit einem Goniometer ausgestattet ist, durchgeführt. Eine Hahn-Echo Pulsfolge mit einer 90° Pulslänge von 7 μs und einer Echoverzögerungszeit von 30 μs wurde benutzt um ein <sup>1</sup>H-entkoppeltes <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum orientierter Membranen zu erhalten. Die <sup>31</sup>P-NMR-Spektren wurden durch Festlegen der Phosphat-Resonanz auf 0 ppm auf die primäre Referenz (85 %ige Phosphorsäurelösung) bezogen.

<sup>19</sup>F-NMR-Messungen wurden mit einem <sup>19</sup>F/<sup>1</sup>H-Flachspulenprobenkopf (Doty Scientific), der manuell gekippt werden kann, durchgeführt. Einfache 1-Puls-Experimente mit einer 90° Pulslänge von 1,8 μs und 10 kHz-15 kHz Zwei-Puls-Phasenmodulation <sup>1</sup>H-Entkopplung und einer Rückkehrverzögerung von 1 s wurden verwendet um <sup>19</sup>F-NMR-Spektren zu erhalten. Die <sup>19</sup>F-NMR-Spektren wurden durch Festlegen der Fluorresonanz einer 100 mM wässrigen NaF-Lösung (bei entsprechender Temperatur) auf -119,5 ppm referenziert<sup>165</sup>.



$^2\text{H}$ -NMR-Experimente wurden bei 76,77 MHz unter Verwendung eines Standard Bruker Doppelresonanzprobenkopfes, der mit einem Goniometer ausgestattet war, durchgeführt. Es wurde eine quadrupolare Echo Sequenz ohne  $^1\text{H}$ -Entkopplung mit einer  $90^\circ$  Pulslänge von 4,5 ms, einer Echoverzögerungszeit von 30 ms und einer Relaxationsverzögerung von 80 ms benutzt.

$^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen wurden mit einem eigens konstruierten Flachspulen-Probenkopf durchgeführt. Alle Proben wurden intern auf 4,7 ppm für  $\text{H}_2\text{O}$  referenziert. Die Feldhomogenität wurde an der Wasserlinie optimiert. Das 1D- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum wurde mit Kreuzpolarisation aufgenommen, wobei die CP-MOIST Pulssequenz angewendet wurde<sup>166</sup>. Es wurde eine Kreuzpolarisations-Kontaktzeit von 1,2 ms und ein recycle delay von 6 s-8 s zwischen den Scans zur Vermeidung der Probenaufheizung sowohl in den 1D-Experimenten als auch in den, im Folgendem beschriebenen, 2D-Experimenten verwendet.

Für die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung/ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolare Kopplung Korrelationsexperimente wurde das SAMMY-Experiment<sup>167</sup> mit der verbesserten SAMPI4 Pulssequenz verwendet<sup>168</sup>. Die Hartmann-Hahn Bedingung und die  $^1\text{H}$ -Pulslänge wurden direkt an der Probe bestimmt. Es wurde eine  $^1\text{H}$ - $B_1$  -Feldstärke von 51 kHz verwendet und während der 10 ms Akquisitionszeit mit einer 30 kHz Feldstärke entkoppelt.

## 4.6 Gewinnung von Gramacidin S-Granulae

### 4.6.1 Anzucht von *A. migulanus*

Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen von *A. migulanus* für die maximale Produktion von GSG wurden in dieser Arbeit verschiedene Faktoren untersucht:

- i.) Wachstumsdauer der Bakterien auf LBY-Agarplatten (1, 3 oder 5 Tage)
- ii.) Zusammensetzung des Flüssigmediums (G4/4, G4/4FM, GATF)
- iii.) Volumen der Flüssigkultur (300, 400 und 500 ml)
- iv.) Wachstumsdauer der Bakterien in Flüssigmedium

Im Allgemeinen wurde die Anzucht von *A. migulanus* wie folgt durchgeführt: Aus einem Kryostock wurden 10 µl einer Sporensuspension von *A. migulanus* DSM 5759 in 1 ml YP-Medium gegeben und im Brutschrank bei 37 °C mindestens 2 Tage inkubiert. Auf 5 oder 9 Platten mit LBY-Agar<sup>93</sup> wurden je 20 µl YP-Medium vorgelegt und auf die erste Platte 2-10 µl (je nach Dichte der YP-Kultur) der Bakteriensuspension in 20 µl YP-Medium gegeben. Nun wurde mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels bis fast zur Trockenheit ausplattiert und dann fortlaufend auf die Platten 2-5 übertragen um eine Verdünnungsreihe zu erhalten. Bei 9 Platten wurde zusätzlich ausgehend von Platten 2 und 3 auf je zwei weitere Platten 2a, 2b sowie 3a und 3b ausplattiert. Die Agarplatten wurden 1-3 Tage im Brutschrank bei 37 °C und anschließend bis zu 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Beimpfung der Flüssigkulturen wurden nur Kolonien verwendet, bei denen der Phänotyp deutlich zu erkennen war (in der Regel von den Platten 4 und 5 sowie 2a, 2b, 3a, 3b). Die Kolonienzentren wurden mit einer sterilen Impföse aufgenommen und in 1 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung suspendiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden sedimentieren gelassen und mit dem Überstand wurde das gewünschte Volumen (300, 400 oder 500 ml) G4/4, G4/4FM oder GATF-Medium bis zu  $OD_{660} = 0,02$  angeimpft und bei 40 °C und 220 rpm bis zur gewünschten optischen Dichte angezogen.

### 4.6.2 Kontrolle des Wachstums von *A. migulanus*

Zur Kontrolle des Wachstums von *A. migulanus* wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte der Kulturen bei 660 nm gemessen. Ab einer optischen Dichte von 3-4 wurden pro Kultur 2 Proben von je 1 ml entnommen. Diese Proben dienten der späteren

Bestimmung der GS-Konzentration. Die Proben wurden 5 min bei 17000×g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets bis zur GS-Extraktion bei -20 °C aufbewahrt.

Zusätzlich wurden die Bakterien regelmäßig mikroskopiert um die Entwicklung der Zellen sowie die Bildung von GSG zu überprüfen.

#### 4.6.3 Fluorezenzfärbung der *A. migulanus*-Zellen

Um die Entwicklung von GSG mikroskopisch besser beobachten zu können, wurde bei einigen Zellproben eine Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei wurde 5(6)-Carboxyfluorescein-N-Succinimidyl-Ester (CSE  $\lambda_{ex}$  492,  $\lambda_{em}$  517) verwendet, der bei pH = 8,3 selektiv an die NH<sub>2</sub>-Gruppen der Ornithin-Seitenketten des GS bindet und somit GSG spezifisch anfärbt <sup>169</sup>.

Das Zellpellet wurde zweimal in Natriumhydrogencarbonat-Puffer (150 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3) gewaschen. Hierzu wurde es in 500  $\mu$ l Natriumhydrogencarbonat-Puffer suspendiert und 5 min bei RT und 17000×g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das gewaschene Zellpellet wurde in 1 ml Natriumhydrogencarbonat-Puffer resuspendiert und 1  $\mu$ l einer 10 mg/ml CSE-Lösung in DMSO dazugegeben. Die Suspension wurde 30 min bei 37 °C und 220 rpm unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen, wie oben beschrieben, zweimal mit Natriumhydrogencarbonat-Puffer gewaschen um überschüssige Farblösung zu entfernen. Die Zellen wurden bei 1000facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Filtersatz 09 ( $\lambda_{ex}$  450 nm-490 nm,  $\lambda_{em}$  515 nm) beobachtet und zur Dokumentation fotografiert.

#### 4.6.4 GS-Extraktion aus Zellkulturproben

Die Zellpellets der Proben aus 4.6.2 wurden in 500  $\mu$ l 0,9 % NaCl suspendiert und 50  $\mu$ l 0,2 N HCl zugegeben. Die Proben wurden 15 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Zu jeder Probe wurden 450  $\mu$ l 50 % EtOH gegeben und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Zellreste wurden 15 min bei 17000×g abzentrifugiert. Der GS beinhaltende Überstand wurde bis zur GS Bestimmung mittels HPLC bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.6.5 Bestimmung der GS-Konzentration in Extrakten

Die GS-Konzentration in den Extrakten wurde per Umkehrphasen HPLC über eine C18-Säule bestimmt. Es wurde ein linearer Acetonitril/Wasser-Gradient von 45 % zu 90 % Lösemittel B in 15 min gewählt. Dem Laufmittel wurden dabei 1 mM HCl zugegeben. Die Analyse wurde bei 35 °C mit einer Flussrate von 1,5 ml/min und einem Injektionsvolumen von 20 µl, mittels manueller Injektion oder mit Hilfe eines automatischen Probennehmers, durchgeführt. Für jede Bestimmungsreihe wurde eine Eichgerade aus GS-Lösungen bekannter Konzentration erstellt. Das hierbei verwendete GS war aus *A. migulanus* extrahiert und per HPLC aufgereinigt worden. Es hatte eine Reinheit von > 98 % (bestimmt mittels analytischer HPLC). Zur Erstellung der Standardreihe wurden aus einer GS Stammlösung in 50 % EtOH Verdünnungsreihen erstellt.

#### 4.6.6 Zellernte von *A. migulanus*

Die *A. migulanus* Kulturen wurden bis zur gewünschten optischen Dichte wie in 4.6.1 beschrieben angezogen. Die Zellen wurden bei 6000×g und 4 °C 15 min abzentrifugiert und zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.6.7 Zellaufschluss von *A. migulanus*

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden des Zellaufschlusses von *A. migulanus* zur Gewinnung von GSG untersucht.

##### *Enzymatischer Zellaufschluss*

Die Zellpellets wurden in Glycin-HCl Puffer (100 mM Glycin, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 1 mM Gluthation, pH = 2,5) zu ca. 25 mg Zellmasse pro ml Puffer suspendiert und 2 h bei RT geschüttelt. Dann wurden die Zellen bei 6000×g 15 min, bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in Zellaufschlusspuffer resuspendiert (1 ml pro 200 mg Zellmasse) und Lysozym zugegeben (1 mg/ml). Die Suspension wurde 2 h bei RT schüttelnd inkubiert.

### *Zellaufschluss mittels Ultraschall*

Die nach 4.6.5 gewonnen Zellpellets wurden in Zellaufschlusspuffer A (172 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 1 mM Gluthation , pH = 7,4) suspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden unter Eiskühlung in einem speziellen Ultraschallgefäß dreimal für 2 min bei 70 % Leistung des Gerätes mit Ultraschall behandelt. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wurden die Suspensionen mindestens 5 min bei 0 °C gekühlt, um ein Überhitzen zu vermeiden.

### *Zellaufschluss mittels French® Press*

Die Zellpellets wurden in Zellaufschlusspuffer A suspendiert. Die Zellsuspension wurde dreimal unter ca. 420 bar mittels French® Press aufgeschlossen.

## 4.6.8 Isolation von GSG

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Isolation von GSG getestet.

### *Isolierung von GSG mittels differenzieller Zentrifugation*

Die Suspension wurde nach dem Zellaufschluss zunächst 15 min bei 4 °C und 600×g zentrifugiert, um größere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und 15 min bei 4 °C und 1000×g zentrifugiert. Diese Schritte wurden bei 3000×g, 5000×g und 7000×g wiederholt. Die Pellets der einzelnen Zentrifugationsschritte wurden in Zellaufschlusspuffer A resuspendiert, vereinigt und erneut, wie in 4.5.6 beschreiben, aufgeschlossen. Daraufhin wurden die zuvor beschriebenen Zentrifugationsschritte wiederholt. Die Überstände nach 7000×g wurden jeweils mittels Ultrazentrifugation bei 100000×g pelletiert und die resultierenden GSG-Pellets zweimal in sterilem MilliQ gewaschen. Die Pellets wurden in einem kleinen Volumen sterilem MilliQ resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

### *Isolierung von GSG mittels Dichtegradienten-Zentrifugation*

Es wurden verschiedene Dichtegradienten zur Isolierung von GSG getestet (Tabelle 3). Für alle Gradienten wurde die entsprechende Menge Glycerol oder Saccharose in 100 mM Tris-Puffer pH = 7,8 gelöst.

**Tabelle 3** Glycerol- und Saccharosegradienten verschiedener Zusammensetzung zur Isolation von GSG

Glycerolgradienten		Zusammensetzung der Gradienten		
linear	88/44 %	95/75/60 %	100/90/70/50 %	95/80/70/60 %
diskontinuierlich	88/44 %	95/75/60 %	100/90/70/50 %	95/80/70/60 %
Saccharosegradienten		Zusammensetzung der Gradienten		
linear	69/57/45/34 %			
diskontinuierlich	69/57/45/34 %	60/50/30 %	65/60/55/50 %	65/62/58/55 %

Es wurden verschiedene Methoden zur Erzeugung von Dichtegradienten getestet. Zuerst wurden jeweils diskontinuierliche (i-iii) und daraus dann ggf. lineare Gradienten (iv-vi) erstellt.

- i.) Vorsichtiges Überschichten der jeweils dichten Lösung mit der weniger dichten.
- ii.) Vorsichtiges Unterschichten der weniger dichten Lösung mit der dichteren.
- iii.) Einfrieren der dichteren Schicht in flüssigem Stickstoff gefolgt von Aufbringen der weniger dichten Schicht und ggf. Wiederholung des Vorganges.
- iv.) Einfrieren des entsprechenden diskontinuierlichen Gradienten für 1 h bei -80 °C, gefolgt von Auftauen in waagerechter Position für 1,5 h bei 4 °C.
- v.) Einfrieren des entsprechenden diskontinuierlichen Gradienten für 1 h bei -80 °C, gefolgt von Auftauen in senkrechter Position über Nacht.
- vi.) Stehenlassen des entsprechenden diskontinuierlichen Gradienten für 1 h bei Raumtemperatur.

Das langsame Auftauen, oder Stehen bei Raumtemperatur ermöglicht eine Diffusion zwischen den einzelnen Schichten, wodurch ein linearer Gradient entsteht. Die richtige Ausbildung des Gradienten wurde durch Entnahme von Proben einzelner Schichten und Messung deren Brechungsindizes bestätigt.

Die beste Reproduzierbarkeit wurde für diskontinuierliche Gradienten durch vorsichtiges Unterschichten (ii) und für lineare Gradienten durch Stehenlassen bei Raumtemperatur (vi) erzielt.

Die Auftrennung per Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte direkt mit der aufgeschlossenen Zellsuspension. Es wurden je 5 ml der Zellsuspension vorsichtig auf den Gradienten gegeben und bei 4 °C und 120000×g zwischen 30 min und 2 h im Ausschwenkrotor zentrifugiert. Die benötigte Zeit war jeweils von Gradienten abhängig und wurde empirisch bestimmt. Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen Schichten vorsichtig mit Hilfe einer Pipette getrennt. Ggf. wurden einzelne Schichten einer erneuten Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Die Schichten in denen die GSG vermutet wurden, wurden 1 h bei 4 °C und 100000×g pelletiert. Um Glycerol bzw. Saccharose zu entfernen wurden die Pellets in sterilem MilliQ aufgenommen, 10 min im Ultraschallbad mit Ultraschall behandelt und erneut zentrifugiert. Letzterer Schritt wurde zweimal wiederholt. Die resultierenden GSG-Pellets wurden in einem kleinen Volumen sterilem MilliQ suspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### 4.6.9 Entfernung von DNA aus GSG

Um eventuell vorhandene DNA-Reste aus den GSG-Proben zu entfernen wurden die Suspensionen mit Bezonase® behandelt. Hierzu wurden 2 µl Bezonase® pro ml GSG-Suspension zugegeben und für 2 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die GSG 1 h bei 4 °C und 100000×g pelletiert und zweimal mit sterilem MilliQ gewaschen. Die resultierenden GSG Pellets wurden in einem kleinen Volumen sterilem MilliQ suspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

### 4.7 Charakterisierung von Gramacidin S-Granulae

#### 4.7.1 Bestimmung der GS-Konzentration in GSG

Zu Bestimmung der GS-Konzentration der GSG-Suspensionen wurde ein Teil der Suspension in DMSO + 0,1 % TFA gelöst. Es wurden dabei, je nach Dichte der Suspension, Verdünnungen mit DMSO von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 (Volumen/Volumen) hergestellt. Die Proben wurden ggf. mit Ultraschall behandelt um die GSG zu lösen. Eventuell vorhandene unlösliche Bestandteile, die die HPLC-Säule verstopfen könnten, wur-

den durch Zentrifugation (5 min, 4 °C, 13000×g) entfernt. Die GS-Konzentration wurde mittels Umkehrphasenchromatographie über eine C18-Säule bestimmt. Es wurde ein Acetonitril/Wasser-Gradient verwendet (40 % zu 70 % B in 2 min, 70 % zu 95 % B in 0,2 min) dem Laufmittel wurden dabei 0,1 % TFA zugefügt (Tabelle 13). Die Analyse wurde bei 60 °C mit einer Flussrate von 1,5 ml/min und einem Injektionsvolumen von 50 µl, mittels manueller Injektion oder mit Hilfe eines automatischen Probennehmers, durchgeführt. Für jede Bestimmungsreihe wurde eine Eichgerade aus GS Lösungen bekannter Konzentration erstellt. Das hierbei verwendete GS war aus *A. migulanus* extrahiert und per HPLC aufgereinigt worden. Es hatte eine Reinheit von > 98 %. Zur Erstellung der Standardreihe wurden aus einer GS-Stammlösung in 50 % DMSO + 0,1 % TFA Verdünnungsreihen erstellt.

#### 4.7.2 Größenbestimmung durch dynamische Lichtstreuung

Der mittlere Durchmesser der GSG in den Suspensionen wurde durch dynamische Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) bestimmt. Hierzu wurden in einer Messküvette 800 µL filtrierte (mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm) MilliQ vorgelegt und 20 µL der GSG-Suspension zugegeben. Die GSG-Suspensionen wurden vor der Zugabe für 2 min mit Ultraschall behandelt, um aggregierte GSG voneinander zu trennen. Es wurden pro Messung 50 Scans mit einer jeweiligen Dauer von 20 s bei 25 °C durchgeführt.

#### 4.7.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Um die Größe und vor allem das Aussehen der GSG bestimmen zu können, wurden einige Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Hierzu wurden die GSG-Suspensionen mit membransterilem MilliQ verdünnt und je 1 ml dieser Suspension auf einen Siliziumträger aufgebracht. Die Proben wurden bei Raumtemperatur unter Vakuum mindestens 2 h getrocknet. Vor der Messung wurden die Proben durch Bedampfen mit einer dünnen Schicht Platin überzogen. Dies gewährleistet, dass ausreichend viele Sekundärelektronen zur Erzeugung eines Bildes detektiert werden können, da biologische Präparate selbst oft nicht elektrisch leitend sind. Gleichzeitig muss darauf geachtet werden, dass die Schicht nicht zu dick ist und so feine Oberflächenstrukturen der Probe verdeckt. Zur Untersuchung der Präparate wurden Übersichtsbilder bei



einer 5000fachen Vergrößerung und einer Beschleunigungsspannung von 10 kV sowie Nahaufnahmen der GSG bei bis zu 25000facher Vergrößerung und 3 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen.

Die Messungen wurden von Dipl. Ing. Stefan Kühn, Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Karlsruher Institut für Technologie, durchgeführt.

#### 4.7.4 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität von GSG wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der GSG-Suspensionen gegen *S. aureus* DSM 1104 untersucht. Die MHK gibt die Konzentration eines Stoffes an, die benötigt wird, um die Zellteilung von Bakterien zu inhibieren.

Beim hier durchgeführten Mikrobouillonverdünnungstest handelt es sich um eine Standardmethode nach DIN 58940 („Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika“).

Die MHK-Tests wurden mit entsprechend vorbereiteten GSG-Suspensionen, deren GS-Konzentration per HPLC bestimmt wurde, in sterilem MilliQ durchgeführt. Als Kontrolle wurde stets eine GS Lösung in 50 % EtOH verwendet. Da die antimikrobielle Wirkung des GS gut bekannt ist, konnten so Rückschlüsse auf die Aussagekraft des jeweiligen Tests getroffen werden.

Zur Anzucht von *S. aureus* wurden zunächst Übernachtskulturen aus Kryokulturen in 10 ml MH-Medium hergestellt und 16 h-18 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurde anschließend ein Verdünnungsstrich auf einer LB-Agar-Platte gemacht und 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von der Platte wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse einzelne Kolonien entnommen und damit Übernachtskulturen in 10 ml MH-Medium mit  $OD_{550} = 0,02$  angeimpft und 16 h-18 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurde mit  $OD_{550} = 0,2$  in 10 ml MH-Medium übergeimpft und diese Testkultur 3 h-4 h bis zu einer  $OD_{550} = 1-2$  bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Testkultur wurde schließlich für den MHK-Test mit MH-Medium zu einer  $OD_{550} = 0,002$  verdünnt.

Für den MHK-Test wurden 96-Well-Mikrotiterplatten wie folgt vorbereitet: In alle Wells der Reihe A wurden je 50 µl 2fach konzentriertes, in die Wells der Reihen B bis H je 50 µl 1fach konzentriertes MH-Medium vorgelegt. In die Wells der Spalte 12 (Ne-

gativkontrolle) wurden zusätzlich je 50 µl MH-Medium gegeben. In die Wells 1-10 der Reihe A wurden dann je 50 µl der entsprechenden Testlösungen in 2-3facher Wiederholung gegeben. In Well A11 (Negativkontrolle) wurden 50 µl MH-Medium (1x) gegeben. Nun wurden mittels einer Multikanalpipette aus jeder Well der Reihe A 50 µl entnommen und in Reihe B gegeben, gut durchmischt und der Vorgang für alle Reihen wiederholt um eine Verdünnungsreihe zu erhalten. Die letzten 50 µl aus Reihe H wurden verworfen. Nun wurden in jede Well der Spalten 1 bis 11 50 µl der auf  $OD_{550} = 0,002$  verdünnten Testkultur gegeben und die Mikrotiterplatten im Brutschrank bei 37 °C für 22 h inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 20 µl Resazurin-Lösung (0,8 mM) zugegeben und die Platte für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurden die Tests ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert.

#### 4.7.5 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Die Hämolysemessungen wurden mit Erythrozytenkonzentraten aus der Blutspendenzentrale des städtischen Klinikums Karlsruhe durchgeführt.

Die Erythrozyten wurden zunächst mit Waschpuffer (172 mM Tris pH 7,4 bei  $T = 4\text{ °C}$ ) gewaschen. Hierzu wurden 45 ml Puffer vorgelegt und 5 ml Erythrozytenkonzentrat zugegeben, vorsichtig durchmischt und die Erythrozyten 10 min bei RT und 600×g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in Waschpuffer suspendiert und der Waschvorgang wiederholt. Daraufhin wurde 1 ml der gewaschenen Zellsuspension in 9 ml Waschpuffer überführt. Nun wurden 0,5 ml dieser Suspension mit 9,5 ml Reaktionspuffer (172 mM Tris, pH = 7,4 bei  $T = 37\text{ °C}$ ) verdünnt um einen Hämatokrit von 0,5 % zu erhalten. Diese Test-Zellsuspension wurde für den nachfolgenden Hämolysetest für 5 min bei 37 °C im Heizblock gewärmt.

Die GSG-Suspension wurden direkt vor dem Experiment mit Reaktionspuffer zur gewünschten GS-Anfangskonzentration verdünnt und daraus Verdünnungsreihen hergestellt. Bei jedem Experiment wurde eine GS-Lösung in 10 % DMSO (in MilliQ) mit untersucht. In Eppendorf-Gefäßen wurden je 200 µl der entsprechenden Testlösungen vorgelegt. Als Negativkontrolle (Autohämolyse) diente reiner Reaktionspuffer, als Positivkontrolle (100 % Hämolyse) 0,2 % Triton-X100 in Reaktionspuffer. Zu den Testlösungen wurden je 200 µl der vorgewärmten Test-Zellsuspension gegeben und das Ganze 30 min bei 37 °C unter diskontinuierlichem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation

wurden die Proben für 10 min bei RT und 7000×g zentrifugiert und je 350 µl des Überstandes in Kunststoffküvetten überführt. Die Absorption des freigesetzten Hämoglobins wurde bei 540 nm gemessen, wobei die Autohämolyse in Reaktionspuffer als Referenz diente.

#### 4.7.6 Extraktion von GS aus GSG

Die Extraktion von GS aus GSG erfolgte analog der Extraktion von GS aus Bakterienzellen mit saurem 50 %igen EtOH (siehe 4.6.4). Es wurden 5 mg getrocknete Granula pro ml Extraktionslösung verwendet.

#### 4.7.7 Massenspektrometrische Untersuchungen

##### *Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator MALDI-TOF*

Bei MALDI wird die Probe mit einer Matrix co-kristallisiert und die Moleküle mit einem Laserstrahl ionisiert<sup>170</sup>. Dieser Ionisierungsprozess minimiert die Fragmentierung von Molekülen und ist gut geeignet zur Detektion von Molekülen mit hohen Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z 500-20000).

Zur Messung eines MALDI-TOF Massenspektrums wurde eine kleine Menge der Probe (GSG-Suspension oder getrocknete GSG) in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dann wurden 5 µl -10 µl der Matrix-Lösung (gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril/Wasser (1:2) mit 0,1 % TFA) hinzugegeben und für 5 min bei 3000×g zentrifugiert. Anschließend wurde 0,5 µl-1 µl Probelösung auf einen Metallträger aufgetragen und nach Auskristallisieren an der Luft mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer gemessen.

Die Messungen wurden von Dr. Sergii Afonin, Institut für Biologische Grenzflächen 2, Karlsruher Institut für Technologie, durchgeführt.

##### *Fast Atom Bombardment FAB:*

Bei FAB handelt es sich um ein sanftes Ionisierungsverfahren, das hauptsächlich Ionen und nur wenig Fragmentierung erzeugt<sup>171</sup>.

Die Analysen mittels FAB-MS wurden von Frau Kernert und Frau Roßnagel in der analytischen Abteilung des Institutes für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für

Technologie durchgeführt. Für FAB-Messungen wurden ethanolische Extrakte aus GSG verwendet (4.7.7). Alle Proben wurden vor der Analyse getrocknet. Als Matrixsubstanz wurde Glycerol verwendet.

#### *Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie TOF-SIMS:*

TOF-SIMS ist eine Methode mit sehr hoher Massenauflösung, bei der durch einen Primärionenstrahl Sekundärionen erzeugt werden <sup>172</sup>. Sie erlaubt eine Analyse der chemischen Oberflächenzusammensetzung. Durch die hohe Massenauflösung können Sekundärionen gleicher Nominalmasse aber unterschiedlicher Summenformel getrennt werden. Es können alle stabilen Elemente und ihre Isotope bis zu einer Nachweisgrenze im ppm Bereich nachgewiesen werden. Insbesondere anorganische Elemente können eindeutig identifiziert werden.

Die Untersuchungen mittels TOF-SIMS wurden von Dr. Alexander Welle am Institut für Funktionelle Grenzflächen des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt.

Dazu wurden jeweils 20 µl einer wässrigen Probensuspension auf einen Siliziumträger aufgebracht und unter Vakuum trocknen gelassen. Die Proben wurden im Hochvakuum mit Bi<sup>3+</sup> ionisiert. Zusätzlich wurden die Proben mit einem hochenergetischen Sauerstoffionenstrahl behandelt, um das organische Material abzutragen und eventuell vorhandene anorganische Moleküle im Inneren der Partikel nachzuweisen.

#### 4.7.8 NMR-Spektroskopische Untersuchungen

##### *Flüssig-NMR-Untersuchungen:*

Die flüssig-NMR-Untersuchungen wurden von Frau Lang und Frau Emmerich in der analytischen Abteilung des Institutes für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt

Die Proben wurden hierfür im entsprechenden (deutერიerten) Lösemittel gelöst und in ein NMR-Probenröhrchen gefüllt.

##### *Magic-Angle-Spinning- (MAS-) NMR-Spektroskopie an GSG*

Für MAS-Festkörper-NMR-Messungen wurden die trockenen Proben in einen 4 mm Keramikrotor gefüllt. Die Messungen wurden bei Umgebungstemperatur mit einem HXY 4 mm MAS-Probenkopf der Firma Bruker durchgeführt.

$^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen wurden mit einer recycle delay von 1 s und einer  $^{13}\text{C}$   $90^\circ$  Pulslänge von  $8,5\ \mu\text{s}$  und einem  $^1\text{H}$   $90^\circ$  Puls von  $3,05\ \mu\text{s}$  durchgeführt. Die Referenzierung erfolgte extern auf Adamantan ( $29,46\ \text{ppm}$ ).

$^{31}\text{P}$ -NMR-Experimente wurden mit einer  $^{31}\text{P}$   $90^\circ$  Pulslänge von  $2,9\ \mu\text{s}$  und einer  $^1\text{H}$   $90^\circ$  Pulslänge von  $3,125\ \mu\text{s}$  durchgeführt. Es wurde extern auf DMPC ( $0\ \text{ppm}$ ) referenziert.

## 5 Der Einfluss des pH-Wertes auf Peptid-Lipid-Wechselwirkungen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des pH-Wertes auf ein typisches Festkörper-NMR-Experiment untersucht. Hierbei sollte gezeigt werden, ob Ergebnisse aus Studien ohne pH-Kontrolle auch unter physiologischen Bedingungen relevant sind.

Als Testsystem wurde die Lipidmischung DMPC/DMPG 3:1 (mol/mol) gewählt. Dieses anionische Lipidsystem wird oft verwendet, um negativ geladene bakterielle Membranen zu imitieren und ist daher für Studien an AMP von Bedeutung<sup>119,173,174</sup>. Als Peptid wurde PGLa gewählt. Es wurde im oben beschriebenen Lipidsystem bereits ausführlich charakterisiert<sup>78,129,173,175</sup>. Für PGLa sind drei Orientierungszustände bekannt. Der oberflächengebundene S-Zustand, der gekippte T-Zustand und der insertierte I-Zustand (siehe 2.2.4). Änderungen zwischen diesen drei Orientierungszuständen können anhand nur eines fluormarkierten Peptids mit CF<sub>3</sub>-Bpg anstelle des Alanins an Position 13 beobachtet werden<sup>173</sup>.

Durch DSC-Experimente an multilamellaren Lipidvesikeln in überschüssigem Puffer wurden Lipidpolymorphismus und Peptid-Lipid-Interaktionen untersucht. <sup>2</sup>H- und <sup>31</sup>P-Festkörper-NMR wurde genutzt, um den Einfluss des pH-Wertes auf die DMPC/DMPG-Matrix zu beobachten. Die Peptidorientierung wurde mittels <sup>19</sup>F-Festkörper-NMR untersucht.

### 5.1 Orientierte NMR-Proben mit kontrolliertem pH-Wert

Der biologisch relevante pH-Wert der typischen intra- und extrazellulären Umgebungen von AMP liegt zwischen 5 und 8. Synthetische, per HPLC aufgereinigte Peptide können jedoch sehr sauer sein. Um einen Ausgangswert zu erhalten, wurde per HPLC aufgereinigtes, getrocknetes Peptidpulver in Wasser gelöst und der pH-Wert gemessen. Verschiedene Peptidproben hatten pH-Werte zwischen 2,6 und 4. Daher wurden für diese Studie vier repräsentative pH-Werte ausgewählt: pH 2,6 (Glycin/HCl) für stark saure Bedingungen, unter denen die Phosphatgruppen der Lipide protoniert werden können, pH 4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Zitronensäure) als Beispiel für sauren pH, bei dem die Phosphatgruppen jedoch nicht protoniert werden, pH 7 (HEPES) um physiologisch relevante

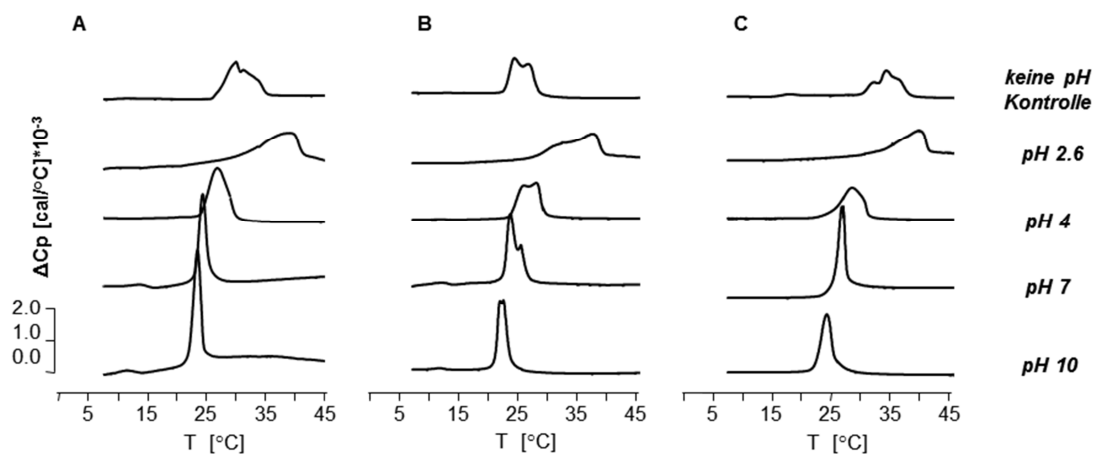
Bedingungen herzustellen; pH 10 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ) als Kontrolle für basische Bedingungen, unter welchen die Lysin-Seitenketten des PGLa deprotoniert werden können.

Mit einer optimierten Probenvorbereitung für Festkörper-NMR-Proben mit definiertem pH-Wert (4.3.2), konnten  $^{31}\text{P}$ -,  $^2\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren guter Qualität erhalten werden. Um sicher zu gehen, dass die Pufferkapazität auch unter den Bedingungen der orientierten Proben ausreicht, wurden zuerst DSC-Experimente in nicht-orientierten Proben mit überschüssigem Puffer durchgeführt. So konnte das Phasenverhalten der verschiedenen Proben unabhängig charakterisiert und mit den Festkörper-NMR-Ergebnissen verglichen werden.

## 5.2 Dynamische Differenzkalorimetrie

Dynamische Differenzkalorimetrie (*dynamic scanning calorimetry*, DSC) wird allgemein verwendet, um den thermischen Polymorphismus von Lipiden zu untersuchen. Änderungen in den Phasenübergängen können Wechselwirkungen verschiedener Substanzen, die an die Lipidmatrix binden oder in sie insertieren, aufzeigen. Diese thermodynamische Technik ist einfach, nicht invasiv und weitgehend anwendbar, um Peptid/Lipidsysteme zu untersuchen<sup>176-178</sup>. Als Kontrolle wurden multilamellare Vesikel aus DMPC/DMPG (3:1 mol/mol) bei definiertem pH-Wert genutzt. Anschließend wurden dieselben Experimente mit Proben, die verschiedenen Mengen an PGLa enthielten, durchgeführt. In einem Standard-DSC-Experiment mit Liposomen werden für die hier verwendete Mischung aus DMPC/DMPG zwei endotherme Vorgänge erwartet. Zuerst ein Vorphasenübergang ( $T_p \sim 14 \text{ }^\circ\text{C}$ ) von der lamellaren Gelphase  $L_\beta$  zu einer gewellten Gelphase (*rippled Phase*)  $P_\beta$ . Bei weiterem Erwärmen kommt es zum Hauptphasenübergang ( $T_m \sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$ ) von der lamellaren Gel- zur fluiden Phase  $L_\alpha$ <sup>179</sup>. Diese Werte wurden bei pH 7 gefunden (Abbildung 12 A). Für pH 7 wurden zwei verschiedene Puffer, HEPES- und Phosphatpuffer, verwendet (Daten nicht gezeigt), um auszuschließen, dass die verwendete Puffersubstanz bzw. Ionenstärke einen Einfluss auf das Phasenverhalten hat. Es zeigten sich zwischen den beiden Puffern lediglich geringe Unterschiede in der Enthalpie der Phasenübergänge, woraus sich schließen lässt, dass die Effekte tatsächlich auf dem pH-Wert beruhen. Bei systematischer Änderung des pH-Wertes (von 10 bis 2,6) kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Hauptphasenübergangstemperatur  $T_m$  und einer Verringerung der Enthalpie.

Ein ähnlicher Effekt konnte beim Vorphasenübergang  $T_p$  beobachtet werden. Bei pH 4 und darunter verschwand der Vorphasenübergang komplett. Unter extrem sauren Bedingungen (pH 2,6) fand der Hauptphasenübergang in einem breiten Temperaturbereich von 20 °C bis 52 °C statt. Zusätzlich war der Phasenübergang stark asymmetrisch und schien aus mehreren Komponenten zu bestehen. Die Hauptphasenübergangstemperatur der Probe ohne pH-Kontrolle lag zwischen der bei pH 2,6 und pH 4. Der Hauptphasenübergang fand in einem Temperaturbereich zwischen 25 °C und 35 °C statt. Dieses Verhalten könnte auch dem komplexen Polymorphismus von reinem DMPG in wässrigen Lösungen geringer Ionenstärke zugeschrieben werden, das die gemischten DMPC/DMPG-Doppelschichten in der Messung beeinflusst haben könnte<sup>137,138</sup>.



**Abbildung 12:** DSC-Thermogramme des Lipidphasenpolymorphismus von multilamellaren DMPC/DMPG-Vesikeln. **A:** ohne PGLa **B:** mit PGLa P/L 1:200 und **C:** P/L 1:50.

Die Zugabe von PGLa änderte das DSC-Verhalten nur geringfügig (Abbildung 12 B und C). Beide Phasenübergänge  $T_p$  und  $T_m$  fanden bei etwas höheren Temperaturen als in der reinen Lipidmischung statt. Bei geringer Peptidkonzentration (P/L 1:200) zeigte der Hauptphasenübergang bei allen pH-Werten zwei Komponenten. Eine davon entsprach der Phasenübergangstemperatur der reinen Lipide, die andere entsprach ungefähr der Phasenübergangstemperatur bei höherer PGLa-Konzentration. Daher kann die erste Komponente den reinen Lipiden und die zweite peptidgebundenen Lipiden zugeordnet werden. Der Vorphasenübergang war für  $\text{pH} \geq 7$  bei geringer Peptidkonzentration sichtbar, verschwand jedoch bei hoher Peptidkonzentration P/L 1:50 vollständig. Ohne Kontrolle des pH-Wertes lagen die Temperaturen des Hauptphasenüberganges zwischen denen der Proben bei pH 7 und pH 4. Bei hoher Peptidkonzentration dagegen zwischen



pH 4 und pH 2,6. Das deutet darauf hin, dass PGLa vom sauren pH-Wert der ungepufferten Probe beeinflusst wurde. Dadurch konnte die Lipidphasenübergangstemperatur um bis zu 10 °C im Vergleich zu pH 7 erhöht werden. Die wichtigsten Parameter des Hauptphasenüberganges multilamellarer DMPC/DMPG-Vesikel, ohne und mit PGLa, bei verschiedenen pH Werten sind in Tabelle 4 zusammen gefasst.

**Tabelle 4:** Charakteristika des Hauptphasenüberganges für multilamellare DMPC/DMPG- (3:1 mol/mol) Vesikel sowie für DMPC/DMPG-Vesikel mit Zusatz von PGLa  $P/L = 1:200$  und  $P/L = 1:50$  bei verschiedenen pH-Werten.  $T_s$  ( $T$  start) bezeichnet die Temperatur bei Beginn des Phasenüberganges.  $T_m$  ( $T$  melt) die Schmelztemperatur, also die Mitte des Phasenüberganges und  $\Delta T_{1/2}$  die Breite auf halber Höhe des Phasenüberganges. Unsymmetrischen Phasenübergänge sind mit einem \* gekennzeichnet. Hier wurde der Mittelpunkt  $T_m$  sowie die Breite auf halber Höhe des gesamten  $\Delta T_{1/2}$  Phasenüberganges angegeben, auch wenn sich der Übergang aus mehreren Komponenten zusammensetzt.

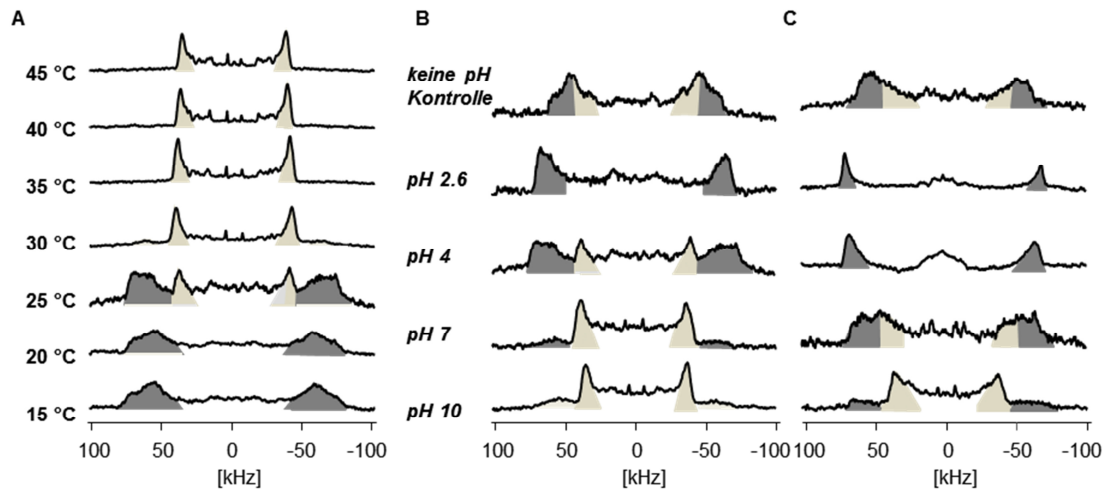
pH Puffer	Kein Peptid			P/L 1:200			P/L 1:50		
	$T_s$	$T_m$	$\Delta T_{1/2}$	$T_s$	$T_m$	$\Delta T_{1/2}$	$T_s$	$T_m$	$\Delta T_{1/2}$
10 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$	21 °C	23 °C	1 °C	21 °C	24 °C	2 °C	22 °C	25 °C	2 °C
7 Hepes	22 °C	24 °C	2 °C	22 °C	24 °C	2 °C	24 °C	27 °C	2 °C
7 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	22 °C	24 °C	2 °C	22 °C	24 °C	2 °C	24 °C	27 °C	2 °C
4 Zitronensäure/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4^*$	22 °C	25 °C	3 °C	23 °C	25 °C	4 °C	25 °C	28 °C	2 °C
2,6 Glycin*	32 °C	37 °C	7 °C	28 °C	37 °C	9 °C	25 °C	34 °C	7 °C
6,5 $\text{H}_2\text{O}^*$	23 °C	27 °C	6 °C	21 °C	23 °C	4 °C	21 °C	26 °C	6 °C

Bei wiederholten Heiz- und Abkühlzyklen von 5 °C-40 °C zeigten alle Proben reproduzierbares Verhalten in aufeinander folgenden Messungen. Nach einmaligem Erhitzen auf 80 °C kam es bei Proben mit pH-Werten von 4 und darunter zu einer deutlichen Verbreiterung des Hauptphasenüberganges bei erhöhter Phasenübergangstemperatur und zu zunehmender Asymmetrie des Phasenüberganges. Proben bei neutralem sowie basischem pH-Wert zeigten dagegen auch nach Erhitzen auf 80 °C reproduzierbares Phasenverhalten. Das deutet darauf hin, dass es bei sauren pH-Werten bei Temperaturen von über 40 °C zu irreversibler Lipidhydrolyse kommen kann.

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

Das Phasenverhalten von DMPG/DMPC-Doppelschichten wurde durch Festkörper- $^2\text{H}$ -NMR umfassender untersucht. Dazu wurden  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren von Proben aus DMPC/DMPC<sub>d54</sub>/DMPG 2,7:0,3:1 (mol/mol/mol), mit und ohne PGLa aufgenommen. Die Linienformen von  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren deuterierter Acylketten sind sehr empfindlich gegenüber molekularen Bewegungen und können daher genutzt werden um den Phasenzustand von Lipiden zu untersuchen. Deuterierung selbst verschiebt die Phasenübergangstemperatur leicht, hat jedoch in gemischten Systemen nur geringen Einfluss auf den Phasenübergang im Gesamten. Hier wurde eine verdünnte Isotopenmischung von 9:1 ( $^1\text{H}/^2\text{H}$ ) verwendet. Protonierte und deuterierte Moleküle sollten ideal mischbar sein und, wenn überhaupt, kann lediglich eine geringe Verbreiterung des endothermen Überganges erwartet werden. Unter Beachtung der geringen Temporauflösung von 5 °C im Festkörper-NMR-Experiment, sollten die beobachteten Phasenübergänge stark denen der DSC-Ergebnisse ähneln, vorausgesetzt der pH-Wert der Proben stimmt überein. In der Tat wurden in den  $^2\text{H}$ -Experimenten dieselben Beobachtungen gemacht, wie in den DSC-Experimenten, das bestätigt den Erfolg der pH-Kontrolle bei der NMR-Probenvorbereitung.

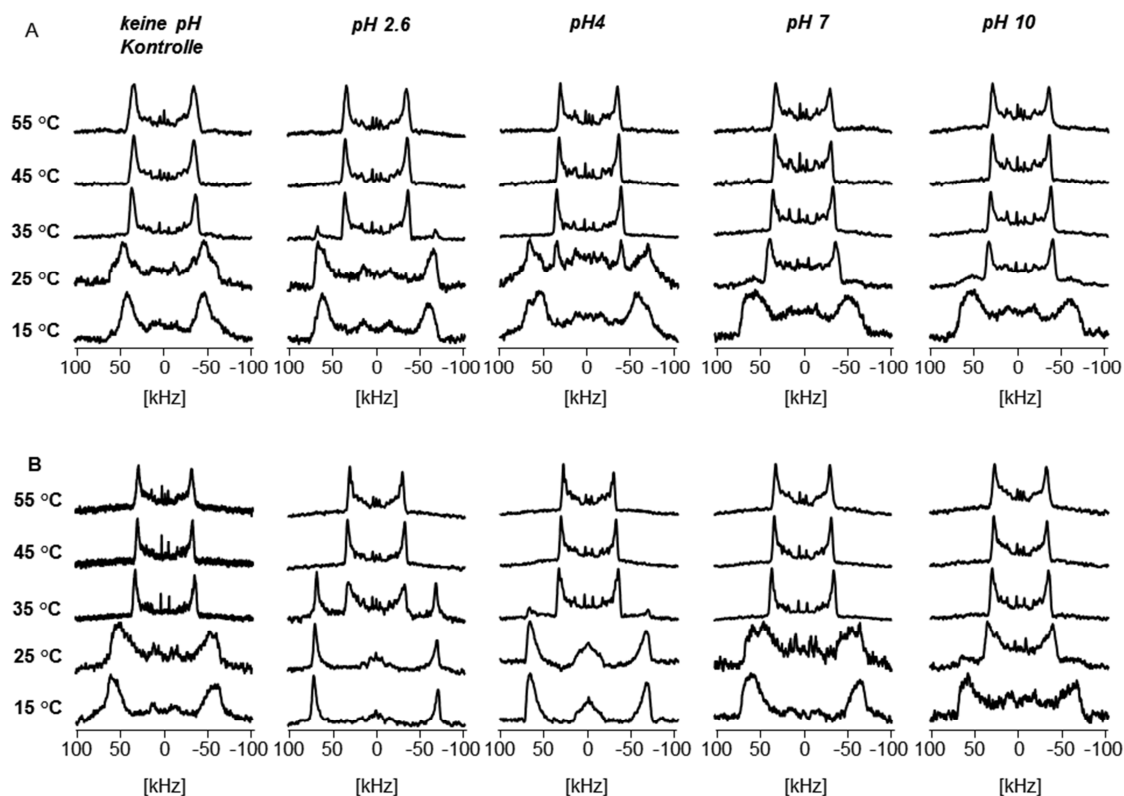
$^2\text{H}$ -NMR-Spektren orientierter Doppelschichten bei unterschiedlichen pH-Werten wurden in Temperaturserien aufgenommen, wie in Abbildung 13 am Beispiel von pH 4 gezeigt. Bei niedrigen Temperaturen zeigten Lipide in der Gelphase große  $^2\text{H}$  quadrupolare Aufspaltungen von ca. 100 kHz. Diese sind den erstarrten  $\text{C}^2\text{H}_2$  Segmenten nahe der Glyceroleinheit zuzuordnen. Unter diesen Bedingungen waren individuelle Signale schlecht aufgelöst. Bei Erhöhung der Temperatur traten zusätzlich Signale der fluiden Phase auf, die bei dieser Temperatur koexistierten. Bei 35 °C verschwanden die äußeren Signale vollständig und die am meisten ausgeprägte Komponente des Spektrums hatte eine Aufspaltung von ca. 60 kHz. Diese Linienform entspricht einer Doppelschicht in der Gelphase. Der Phasenübergang ist also vollständig abgelaufen.



**Abbildung 13:**  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren frisch hydratisierter orientierter DMPC/DMPG<sub>d54</sub>/DMPG - Doppelschichten **A:** Bei pH 4 in einer Temperaturserie (Aufheizen) in 5 °C Schritten. **B:** Proben ohne Peptid bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten. **C:** Proben mit PGLa P/L 1:50 bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten. Die dunkelgrau unterlegten Signale entsprechen Lipiden in der Gelphase, die hellgrau unterlegten Signale entsprechen Lipiden in der fluiden Phase.

Die  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren bei neutralem pH gaben das erwartete Phasenverhalten wieder. Bei 25 °C befanden sich die peptidfreien Proben in der Mitte des Hauptphasenüberganges. Es waren Signale von Lipiden in der Gel- und fluiden Phase sichtbar. In der gesamten Serie von pH-Werten verschob sich der Phasenübergang mit abnehmendem pH zu höheren Temperaturen (Abbildung 14), wie bereits in den DSC-Experimenten gezeigt. Bei pH 10 war der Signalanteil von Lipiden in der Gelphase sehr gering und bei 35 °C komplett verschwunden. Bei pH 2,6 dagegen waren die Signale der Lipide in der Gelphase noch bei 35 °C gut sichtbar. Die Probe ohne Kontrolle des pH-Wertes zeigte, wie schon in den DSC-Experimenten, eine erhöhte Phasenübergangstemperatur (über 25 °C). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Probe recht sauer war.

Die Proben mit PGLa (P/L 1:50) folgten demselben Trend, wie in den DSC-Messungen (Abbildung 14). Die Temperatur des Hauptphasenüberganges war im Vergleich zu Proben ohne Peptid erhöht, was für eine Versauerung der Probe durch das Peptid spricht.



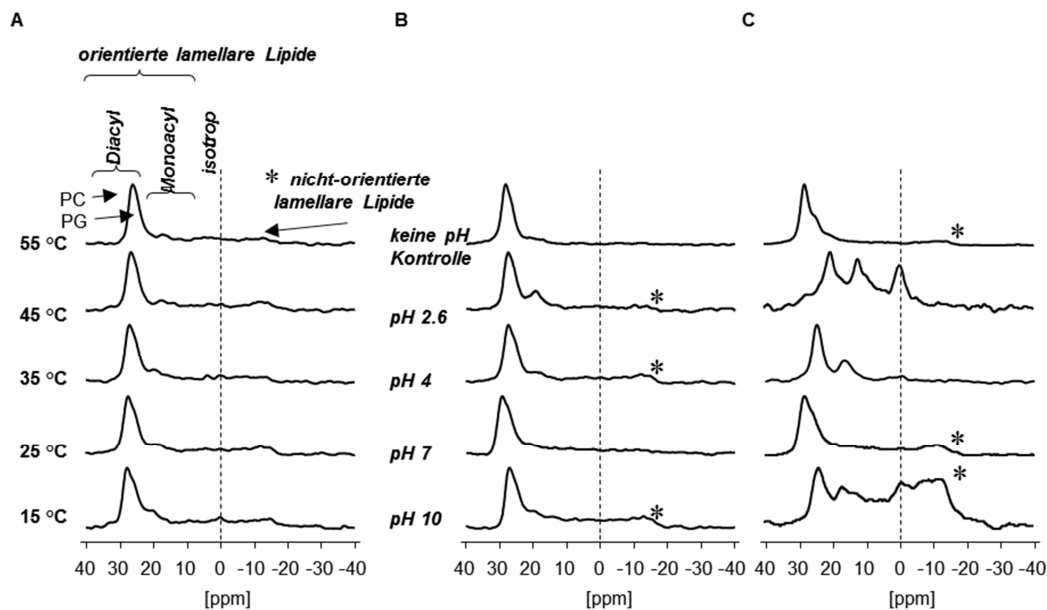
**Abbildung 14:**  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren frisch hydratisierter orientierter DMPC/DMPG<sub>d54</sub>/DMPG-Doppelschichten bei unterschiedlichen pH-Werten in Temperaturserien (Aufheizen) in 10 °C Schritten. **A:** Proben ohne Peptid. **B:** Proben mit PGLa P/L 1:50.

Insgesamt bestätigten die  $^2\text{H}$ -NMR-Messungen die Ergebnisse der DSC-Experimente. Mit abnehmendem pH-Wert wird der Hauptphasenübergang breiter (hier zu sehen an der Koexistenz zweier Phasen über breitere Temperaturbereiche) und zu höheren Temperaturen verschoben. Dieser Effekt wird durch den Zusatz des Peptides verstärkt. Da in den DSC-Messungen mit einem Überschuss an Puffer gearbeitet wurde und die Ergebnisse der NMR-Messungen dieselben sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Kontrolle des pH-Wertes in den orientierten Doppelschichten erfolgreich war.

#### 5.4 Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Analyse

$^{31}\text{P}$ -NMR wird routinemäßig eingesetzt, um die Qualität der Orientierung der Phospholipide in Membranproben auf festen Trägern zu überprüfen<sup>180-182</sup>. Schmale Signale bei ca. 20 ppm bis 30 ppm entsprechen gut orientierten Phospholipiden in der lamellaren Phase. Ein breiterer Peak nahe -15 ppm zeigt die Anwesenheit unorientierter Bereiche in der Probe an.

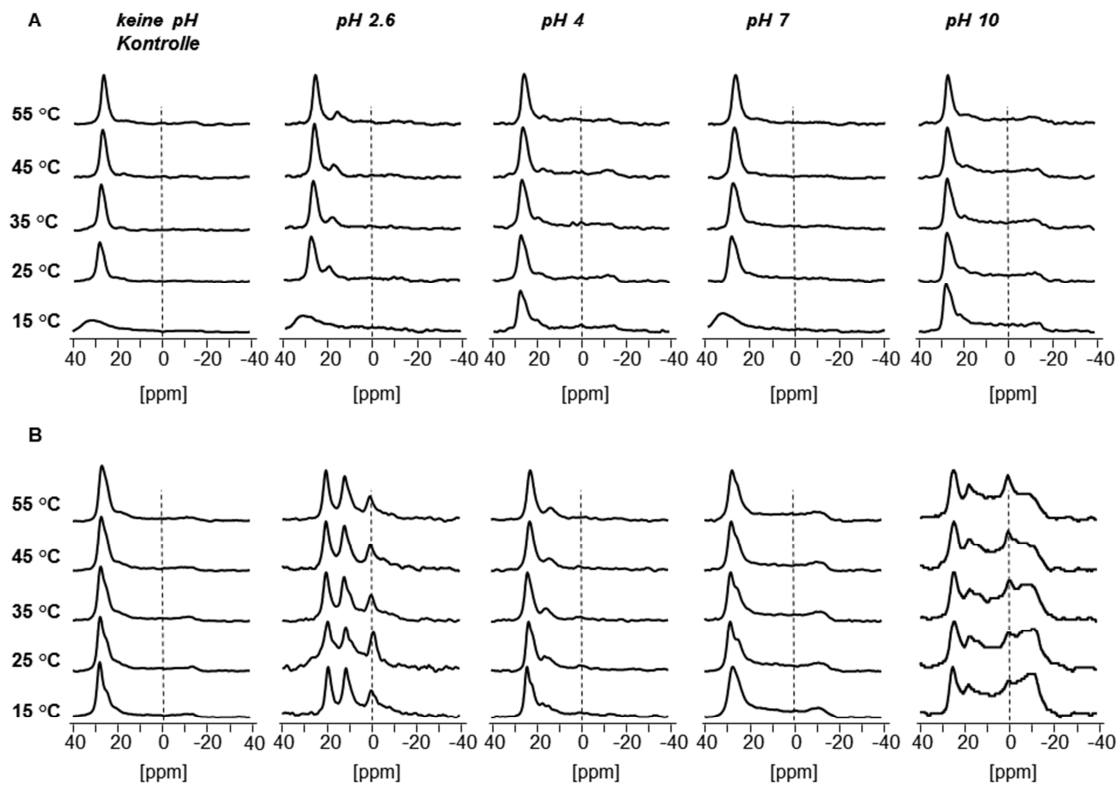
$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden bei verschiedenen pH-Werten in Temperaturserien aufgezeichnet, wie in Abbildung 15 am Beispiel von pH 4 gezeigt. Diese Probe zeigte eine gute Orientierung. Obwohl kaum eine Reaktion der Mobilität der Kopfgruppen auf den Hauptphasenübergang der Lipidkette zu erwarten war, wurde hier eine Serie von Spektren bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten, wie in den  $^2\text{H}$ -NMR-Experimenten, verglichen. Die reinen Lipide zeigten kaum Unterschiede, außer einer kleinen Verschiebung des DMPG-Signals relativ zu dem von DMPC. In Anwesenheit von PGLa (P/L 1:50) waren jedoch dramatische Effekte zu sehen, die sich der Lipidhydrolyse bei extremen pH-Werten zuschreiben lassen (Abbildung 15 und Abbildung 16). Bei pH 2,6 traten zusätzliche Signale auf, die in der Membran eingebettete Lysolipiden (15 ppm) und isotropisch mobilen phosphorylierten Spezies (0 ppm) zugeordnet werden können. Am anderen Extrem -bei pH 10- lag ein großer Teil der Probe ungeordnet vor und hatte seine lamellare Orientierung verloren.



**Abbildung 15:** Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren orientierter DMPC/DMPG-Doppelschichten. **A:** Temperaturserie (Aufheizen) bei pH 4 **B:** Vergleich der Proben bei unterschiedlichen pH-Werten bei 25 °C. **C:** dasselbe wie **B** mit Zusatz von PGLa P/L 1:50. Die Frequenz der isotropen Position ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet, unorientierte Signale sind mit einem \*markiert.

Insgesamt kann das Ausmaß an pH-abhängiger Hydrolyse wie folgt angeordnet werden pH 7  $\approx$  ungepuffert  $\ll$  pH 4  $\ll$  pH 10 < pH 2,6. Der Effekt wurde in Gegenwart von hohen Konzentration an PGLa verstärkt.

Die wichtigste Beobachtung ist jedoch, dass in der Probe ohne pH-Kontrolle weder für reine Lipidproben noch für Proben mit PGLa (P/L 1:50) Lipidhydrolyse stattgefunden hat. Obwohl diese Proben in den DSC- und  $^2\text{H}$ -NMR-Experimenten ein Verhalten vergleichbar mit den sauren Proben gezeigt haben, scheint es zumindest in Bezug auf das Risiko der Lipidhydrolyse sicher zu sein, sie ohne pH-Kontrolle zu untersuchen.



**Abbildung 16:** Festkörper- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren frisch hydratisierter orientierter DMPC/DMPG-Doppelschichten bei verschiedenen pH-Werten, gemessen in Temperaturserien (Aufheizen). **A:** Proben ohne Peptid. **B:** Proben mit PGLa P/L 1:50. Die isotrope Frequenz ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

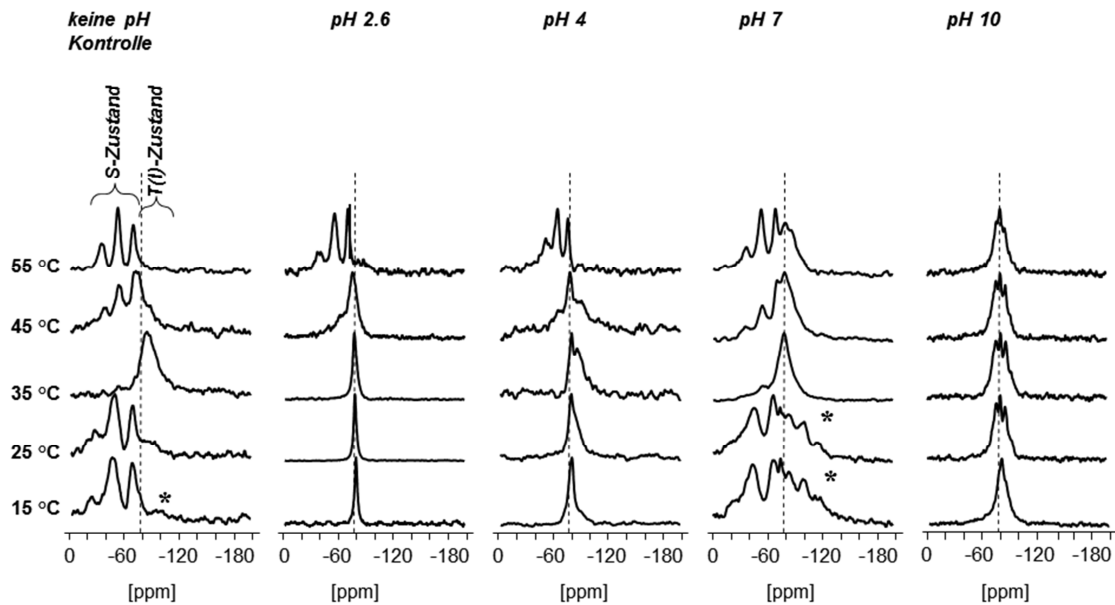
## 5.5 Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR -Analyse

$^{19}\text{F}$ -NMR eines selektiv  $\text{CF}_3$ -markierten PGLa-Analogons wurde benutzt, um pH-abhängige Änderungen seines membrangebundenen Verhaltens zu untersuchen. Die Konformation des Peptides und sein Orientierungsverhalten wurden bereits zuvor ausgiebig mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR untersucht<sup>78,175</sup>. Daher war es hier möglich, nur eine Markierung an Position des Isoleucin13 zu nutzen, um den Orientierungszustand der gesamten Peptidhelix zu charakterisieren<sup>173</sup>. Die Signale des S-, T- oder I-Zustandes, die zuvor in

Proben ohne pH-Kontrolle charakterisiert wurden, können anhand der Signalaufspaltung des  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrums zugeordnet werden<sup>78,128,129,175,183</sup>. Der oberflächengebundene S-Zustand ist durch eine große dipolare Aufspaltung von ca. +7 kHz tieffeldig der isotropen Position gekennzeichnet. Der gekippte T-Zustand und der insertierte I-Zustand ergeben Signale mit einer Aufspaltung von -3 kHz bzw. -4 kHz hochfeldig der isotropen Position. Die letzteren Signale könnten von unorientierten Anteilen immobilisierter Moleküle und von Peptiden in unorientierten Bereichen der Doppelschicht überdeckt werden<sup>126</sup>.

Abbildung 17 zeigt eine Übersicht der  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren der peptidhaltigen Proben bei unterschiedlichen pH-Werten, die in Temperaturserien aufgenommen wurden. Die zuvor beschriebene Reorientierung des Peptides, die bei Temperaturen um den Hauptphasenübergang erwartet wird, wurde in der Probe ohne Kontrolle des pH-Wertes gut reproduziert. Der Übergang  $\text{S} \rightarrow \text{T}$  (oder  $\text{I} \rightarrow \text{S}$ ) ist gut erkennbar, da sich die NMR-Signale vom Tieffeld (links der isotropen Position, positive Aufspaltung) zum Hochfeld (rechts der isotropen Position, kleine negative Aufspaltung) und wieder zurück verschieben. Die Probe bei pH 7 zeigte dasselbe Verhalten wie die Probe ohne pH-Kontrolle. Das ist ein sehr wichtiges Ergebnis, zeigt es doch, dass vorherige Analysen nicht mit pH-anhängigen Problemen behaftet sind und auch nicht unter schädlicher Versauerung der Proben litten.

In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen DSC-,  $^2\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Ergebnissen, hatten die peptidhaltigen Proben ohne Kontrolle des pH-Wertes einen leicht sauren pH zwischen 7 und 4, aber das schien die biologisch wichtigen Peptid-Lipid-Wechselwirkungen von PGLa in DMPC/DMPG nicht zu beeinflussen. Tatsächlich hatte das Spektrum der Probe ohne pH-Kontrolle bessere Qualität als die Probe mit Puffer bei pH 7, da letzteres Spektrum einen signifikanten unorientierten Anteil zeigte, was auf schlecht orientierte Membrandomänen hindeutet.



**Abbildung 17:** Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren orientierter DMPC/DMPG-Proben mit selektiv  $\text{CF}_3$ -markiertem PGLa P/L 1:50. Die Proben wurden bei unterschiedlichen pH-Werten in Temperaturserien (Aufheizen) aufgenommen. Die isotrope Frequenz ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet, unorientierte Signale sind mit einem \*markiert.

In allen Proben mit pH-Kontrolle, außer bei pH 7, verhielt sich PGLa unvorhersehbar und uncharakteristisch. Unter sauren Bedingungen bei pH 4 und 2,6 ergab es ein isotropes Signal, wenn die Temperatur unter  $T_m$  gesenkt wurde. Das Peptid könnte in diesem Fall entweder aus den Lipidschichten ausgeschlossen oder getrennt in einer isotropen Lipidphase vorliegen. Ein solches ungebundenes/ungefaltetes Verhalten wurde für PGLa noch nie dokumentiert. Auch die  $^{19}\text{F}$ -Spektren bei pH 10 mit einer konstanten Aufspaltung von ca. -2 kHz bei allen Temperaturen wichen stark von allen bisherigen Ergebnissen ab. Diese Aufspaltung ist mit keiner bekannten Orientierung von PGLa vereinbar und muss daher einen neuen unbekanntem strukturellen Zustand wiedergeben. Um diesen genauer charakterisieren zu können wären Messungen an mindestens vier individuell markierten Peptiden notwendig.

Beim Durchgang durch den Hauptphasenübergang zeigten die meisten Spektren eine deutliche Änderung ihrer spektralen Linienform. So ist es möglich  $T_m$  dieser peptidhaltigen Proben ungefähr abzuschätzen. Im Vergleich zum Phasenübergang der reinen Lipide, war  $T_m$  bei Anwesenheit von PGLa in den  $^{19}\text{F}$ -NMR-Serien bei neutralem pH um 5 °C-10 °C erhöht. Das zeigt in voller Übereinstimmung mit den DSC- und  $^2\text{H}$ -Experimenten, einen klaren Trend zur Erhöhung der Phasenübergangstemperatur mit sinkendem pH-Wert.



## 5.6 Rolle des pH-Wertes bei Peptid-Lipid-Wechselwirkungen in orientierten Proben

Biophysikalische Experimente an makroskopisch orientierten, multilamellaren Membransystemen werden in der Regel ohne pH-Kontrolle und ohne genaue Kenntnis des pH-Wertes der Probe durchgeführt<sup>78,86,92,101,102,116,120,126-129,173,175,180-199</sup>. PH-induzierte Effekte können jedoch sowohl die Lipide<sup>137-140</sup> als auch das Peptid<sup>141,200-207</sup> beeinflussen. Es ist tatsächlich schwierig, den pH-Wert in gestapelten Multidoppelschichten auf festem Träger zu kontrollieren, da diese Proben für gewöhnlich über die Dampfphase einer gesättigten Salz-Lösung mit 96 % Feuchtigkeit hydratisiert werden. Anders als Liposomen oder Bizellen, bei denen die pH-Kontrolle eine Standardprozedur ist, besitzen diese Proben kein überschüssiges Wasser. In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie es dennoch möglich ist, den pH-Wert einer orientierten Festkörper-NMR-Probe auf einem Glaträger zu kontrollieren. Zuerst musste sichergestellt werden, dass die Pufferkapazität in den orientierten NMR-Proben ausreicht, um den pH-Wert konstant zu halten. Daher wurde das Lipidphasenverhalten von zwei Arten von Proben verglichen: multilamellare Vesikel in einem Überschuss an Puffer für DSC-Experimente und orientierte Doppelschichten auf einem festem Träger für Festkörper-NMR-Experimente. Das Lipidphasenverhalten war in beiden Arten von Experimenten vollständig übereinstimmend. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch das hier vorgestellte Protokoll der gewünschte pH-Wert tatsächlich auch in den NMR-Proben eingestellt und beibehalten werden kann.

Allerdings gibt es bei Gebrauch von Puffer in NMR-Experimenten einige technische Herausforderungen. Aufgrund der hohen Ionenstärke werden nicht nur Hardwareeinstellungen erschwert, auch das Austrocknen der Probe durch Radiofrequenz-induzierte Erwärmung kommt mehr zum Tragen als in Proben ohne Puffer<sup>208</sup>. Austrocknen kann zu ausgeprägten Veränderungen in der Probe führen, da Dehydratisierung von Lipiden im Allgemeinen zu einem Anstieg ihrer Phasenübergangstemperatur führt<sup>209</sup>. Dieser wohlbekannte Effekt ist von der Größenordnung her vergleichbar mit dem, der hier für die Versauerung von DMPC/DMPG beobachtet wurde und beide Phänomene können zu einer Fehlinterpretation von Daten führen. Zum Beispiel konnte hier die Aufnahme einer Temperaturserie von 15 °C bis 55 °C (in <sup>31</sup>P, <sup>2</sup>H oder <sup>19</sup>F-NMR) den Hydratationsgrad einer Probe merklich verringern. Als eine Konsequenz wurden alle Ereignisse, die mit  $T_m$  in Zusammenhang stehen (z.B. der Gel-fluid Phasenübergang im

$^2\text{H}$ -NMR-Experiment oder die Peptid-Reorientierung im  $^{19}\text{F}$ -NMR Experiment) um  $5\text{ }^\circ\text{C}$ - $10\text{ }^\circ\text{C}$  verschoben, wenn eine Probe ohne Rehydratisierung in einer nachfolgenden (zweiten) Temperaturserie gemessen wurde. Das bedeutet, dass eine Temperaturserie von ca. 6 Stunden (wie z.B. eine  $^{31}\text{P}$ -NMR-Serie über 6 Temperaturen) bereits ausreicht, um eine Austrocknung der Probe zu verursachen. Rehydratisierung der Proben zwischen den Messungen kann dem ein Stück weit entgegen wirken, jedoch müssen dazu die Membranstapel aus der schützenden Folie ausgepackt werden und dadurch kann die Qualität der Orientierung verschlechtert werden. Die beste Vorkehrung ist, nur frisch vorbereitete Proben direkt aus der Hydrationskammer zu verwenden, wie es für alle hier gezeigten  $^2\text{H}$ -,  $^{31}\text{P}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Daten gemacht wurde. Beachtenswert ist, dass im Falle der Verwendung von Peptiden mit  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -Markierung die Spektren-Aufnahme einige Stunden bis hin zu mehreren Tagen pro Spektrum benötigt und hier noch schwerwiegendere Probleme mit der Probenaustrocknung zu erwarten sind.

Nachdem geeignete Pufferbedingungen gefunden worden waren, wurde der Effekt des pH-Wertes auf die homogene Lipidmischung DMPC/DMPG mittels DSC und  $^2\text{H}$ -NMR systematisch verglichen. DSC zeigte einen stetigen Anstieg der Hauptphasenübergangstemperatur bei sinkendem pH-Wert, dieselben Veränderungen wurden auch in  $^2\text{H}$ -NMR-Experimenten gesehen. Die reinen Lipidproben ohne pH-Wert Kontrolle verhielten sich als sei ihr pH nahe 4, doch diese intrinsische Säure konnte durch die Pufferkapazität in den gepufferten Proben erfolgreich ausgeglichen werden. Bemerkenswerter Weise war das Temperaturmaximum für den Phasenübergang von Gel- zu fluider Phase in der ungepufferten Probe im DSC-Experiment erheblich höher ( $34\text{ }^\circ\text{C}$  anstatt  $24\text{ }^\circ\text{C}$ ) und der Temperaturbereich des Überganges deutlich breiter (ca.  $10\text{ }^\circ\text{C}$ ) als für DMPC und DMPG unter neutralen Pufferbedingungen üblicherweise angenommen wird. Das anionische DMPG (wie auch andere Phosphatidylglycerole) weist bei niedriger Ionenstärke bekanntermaßen ein komplexes Phasenverhalten auf. Der Übergang in die fluide Phase war erst über  $37\text{ }^\circ\text{C}$  vollständig abgelaufen, was bedeutet, dass eine ungepufferte Probe, die zwischen  $25\text{ }^\circ\text{C}$  und  $35\text{ }^\circ\text{C}$  gemessen wird immer noch vom Phasenübergangsprozess beeinflusst werden könnte.

$^{31}\text{P}$ -NMR wurde genutzt um die Lipidkopfgruppen zu untersuchen und so Lipidhydrolyse und die Qualität der Orientierung der Probe zu kontrollieren. Zusätzlich zum beachtenswerten Einfluss des pH-Wertes auf das Lipidphasenverhalten wurde unter sauren und basischen Bedingungen ausgeprägte Lipidhydrolyse beobachtet. Nicht nur im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experiment konnten Signale für Lysolipide gefunden werden,

auch das  $^2\text{H}$ -Spektrum zeigte mehr Peaks als erwartet. Glücklicherweise litt die Probe ohne pH-Kontrolle nicht unter Lipidhydrolyse, genauso wie frisch vorbereitete Proben mit pH 4.

Bei Zugabe von PGLa zur DMPC/DMPG-Matrix blieb das vorherrschende Phasenverhalten der Lipide erhalten, aber die absoluten Phasenübergangstemperaturen und Peakbreiten neigten dazu weiter anzusteigen, wie durch DSC- und  $^2\text{H}$ -NMR-Experimente gezeigt wurde. Bei niedriger Peptidkonzentration (P/L 1:200) zeigte das DSC-Thermogramm bei pH 7 einen Hauptphasenübergang mit zwei Komponenten. Dieser Effekt wurde für PGLa bereits beschrieben. Er könnte der Bildung peptidreicher und peptidarmer Domänen<sup>210-212</sup> oder der lateralen Phasentrennung von DMPC und DMPG basierend auf der Interaktion des kationischen PGLa mit DMPG<sup>120,129</sup> zugeschrieben werden. Bei hohen Peptidkonzentrationen (P/L 1:50) ergab das Thermogramm nur einen Peak für den Hauptphasenübergang, der der Komponente höherer Temperatur bei den peptidarmen Proben entsprach. Diese Beobachtung unterstützt die Interpretation als peptidreiche und peptidfreie Membrandomänen.

Das strukturelle Verhalten von PGLa selbst in der Membran wurde durch  $^{19}\text{F}$ -NMR untersucht. Hierzu wurde ein Peptid-Analogon mit einer spezifischen  $\text{CF}_3$ -markierten Seitenkette verwendet. In früheren Arbeiten waren drei verschiedene Orientierungszustände der amphiphilen Helix in orientierten DMPC/DMPG-Proben ohne pH-Kontrolle identifiziert worden. Demnach orientiert sich PGLa anhängig von Konzentration, Temperatur, Anwesenheit anderer Peptide etc. von einem oberflächengebundenen S-Zustand zu einem gekippten T-Zustand und einem insertierten I-Zustand<sup>78,79,128,129,173,175</sup>. Auf diesen strukturellen Veränderungen beruht die Vorstellung seiner antimikrobiellen Wirkung: Bildung von Dimeren und Transmembranporen. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass dieselbe Reorientierung bei einem pH-Wert von 7 wiedergefunden wurde. Dies bestätigt, dass Ergebnisse aus früheren Experimenten trotz fehlender pH-Kontrolle, gültig und auch unter physiologischen Bedingungen relevant sind. Diese Erkenntnis ist zwar beruhigend, doch die dramatischen Effekte, die unter basischen oder sauren Bedingungen beobachtet wurden, mahnen zur Vorsicht. Bei pH 4 und 2,6 war PGLa in Membranen in der fluiden Phase noch erwartungsgemäß im S-Zustand orientiert, aber in der Gelphase wurde es von den Doppelschichten ausgeschlossen und ergab ein isotropes Signal wie ein ungebundenes und möglicherweise ungefaltetes Molekül. Unter Annahme einer elektrostatischen Abstoßung des kationischen Peptides von einer protonierten, geladenen Lipiddoppelschicht, ist diese Erklärung durchaus plausibel.

Bei pH 10 auf der anderen Seite nahm das Peptid eine völlig unbekannte Struktur an. Diese konnte nicht näher bestimmt werden, da hier nur Messungen an einem  $\text{CF}_3$ -markierten Peptid durchgeführt wurden. Zur Berechnung einer Peptidorientierung sind aber Daten von mindestens vier individuell markierten Peptiden nötig. Die Linienform des Spektrums blieb bei allen Temperaturen unverändert, wurde also nicht durch den Lipidphasenübergang beeinflusst. Unter diesen Bedingungen verlor PGLa offenbar seinen kationischen Charakter, da die Lysin Seitenkette einen  $\text{pK}_a \approx 10,3$  hat. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die ungepufferte PGLa-Probe deutlich sauer war und wohl gerade an der Grenze eines zulässigen pH-Bereichs in dem ein Experiment und seine Interpretation noch sinnvoll sind. Dieselbe Situation trifft wohl auf die meisten anderen kationischen Peptide zu, die Gegenstand einer großen Anzahl von biophysikalischen Studien an orientierten Proben waren.

Ausgehend von den Daten über PGLa ist es wichtig zu begreifen, dass eine Probe ohne pH-Kontrolle nur als „sicher“ betrachtet werden kann, wenn das Peptid selbst nicht zu viele saure Gruppen enthält. PGLa ist ein vollständig kationisches Peptid und behält auch im sauren Bereich seine positive Ladung. Es trägt von der HPLC lediglich negative Gegenionen, wirkt aber selbst nicht als Puffer, wenn es in Wasser ohne pH-Kontrolle gelöst wird. Eine Carboxylgruppe wie Asparagin- oder Glutamin-Seitenketten oder ein freier C-Terminus werden nach der HPLC protoniert und können diese Protonen in wässriger Lösung wieder abgeben. Anionische Peptide können so selbst als Puffer wirken und werden so jede Membranprobe ohne pH-Kontrolle stark versauern. Es ist ein trivialer aber wichtiger Rückschluss, dass in ungepufferten Systemen das Risiko ungewollter pH-Effekte für an sich saure Peptide viel größer ist als hier für PGLa. Der pH-Wert solcher Proben sollte daher trotz höheren Aufwandes bei der Probenvorbereitung kontrolliert werden.

## 6 Festkörper-NMR-Studien an antimikrobiellen Peptiden in nativen Membranen

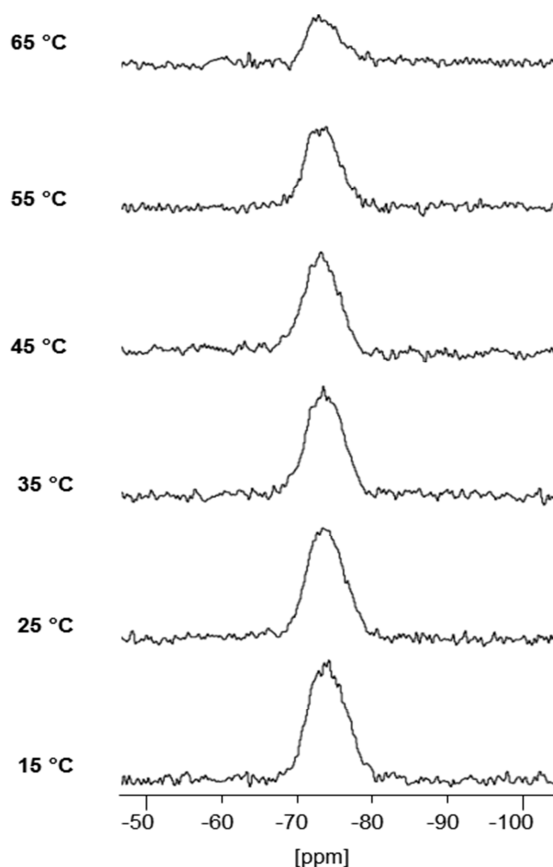
### 6.1 Mykolsäuren als Membran für Festkörper-NMR

Orientierte Schichten aus Mykolsäuren wären ein interessantes Membranmodell für Festkörper-NMR-Studien an AMP. Es wurde daher in dieser Arbeit versucht, Mykolsäuren als orientierte Membranprobe zu verwenden. Die Proben wurden wie in 4.3.1 beschrieben vorbereitet. Als Peptide wurden PGLa sowie KIGAKI verwendet. Diese Peptide wurden ausgewählt, weil sie eine unterschiedliche Struktur und Wirkungsweise haben. Zudem sind beide bereits gut in Modellmembranen charakterisiert und es ist jeweils ein  $\text{CF}_3$ -markiertes Peptid-Analogon ausreichend, um Rückschlüsse auf die Orientierung des gesamten Peptides ziehen zu können.

PGLa mit einer  $\text{CF}_3$ -Markierung an Position 13 kann verwendet werden um das Orientierungsverhalten des Peptides zu beschreiben<sup>78,128,129,175,183</sup> (siehe auch Abschnitt 5.5). Für PGLa wird eine temperaturabhängige Umorientierung von S- zu T- zu I-Zustand erwartet. Der oberflächengebundene S-Zustand ist durch eine große dipolare Aufspaltung von ca. +7 kHz tieffeldig der isotropen Position gekennzeichnet. Der gekippte T-Zustand und der insertierte I-Zustand ergeben Signale mit einer Aufspaltung von -3 kHz bzw. -4 kHz hochfeldig der isotropen Position. Daher wurden für PGLa Messungen einer Temperaturserie in Mykolsäuren durchgeführt (Abbildung 18).

Bei KIGAKI zeigen alle  $\text{CF}_3$ -markierten Peptid-Analoga in Modellmembranen, in Konzentrationen > 1:200 dieselbe Aufspaltung von ca. +15 kHz, das Peptid liegt als oberflächengebundenes oligomeres  $\beta$ -Faltblatt vor. Daher ist es auch hier ausreichend nur ein markiertes Peptid zu betrachten, um eine Aussage über die Orientierung des gesamten Peptides treffen zu können.

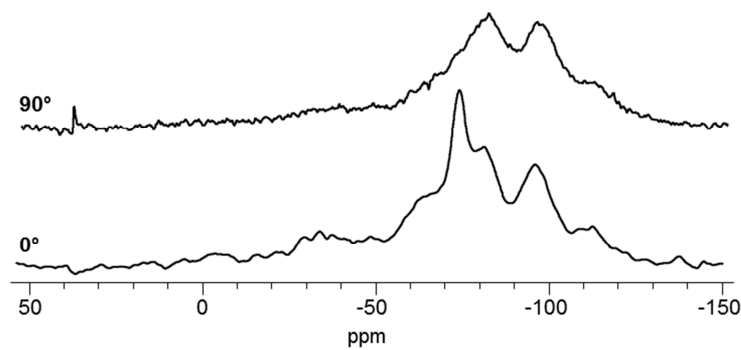
Da Mykolsäuren keine Phosphatgruppe enthalten, konnte ihre Orientierung nicht mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR bestimmt werden. Die Experimente wurden daher ohne Kenntnis der Orientierung der Proben durchgeführt.



**Abbildung 18:** Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von PGLa in Mykolsäuren im Verhältnis  $\approx 1:20$  (mol/mol). Die Messung wurde in einer Temperaturserie (Aufheizen) durchgeführt.

PGLa zeigte in einer Temperaturserie von 15 °C bis 65 °C stets nur ein Signal ohne sichtbare Aufspaltung (Abbildung 18). Die chemische Verschiebung des Signals entsprach der isotropen Position. Allerdings war das Signal breiter als für ein ungebundenes frei rotierendes Peptid zu erwarten.

Auch die für KIGAKI erwartete Signalaufspaltung wurde nicht beobachtet. Es ergab sich ein isotropes Signal sowie ein Signaltuplett mit einer Aufspaltung von -7,5 kHz (Abbildung 19). Um zu überprüfen, ob es sich dabei um ein Signal unorientierter Peptide handelt, wurde zusätzlich die 90° Orientierung gemessen. Dieses Spektrum zeigte die gleichen Signale. Das Peptid liegt also in Mykolsäuren unorientiert aber immobilisiert vor.

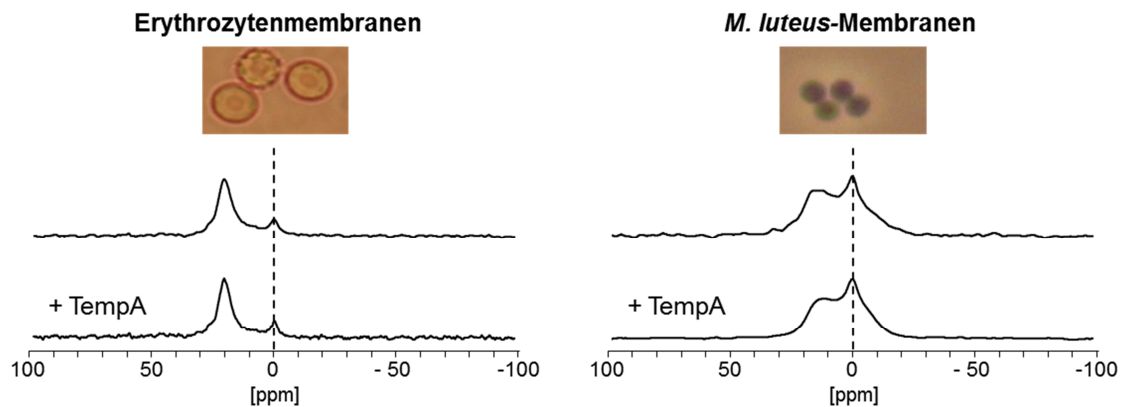


**Abbildung 19:** Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von KIGAKI in Mykolsäuren im Verhältnis  $\approx 1:20$  (mol/mol) bei  $90^\circ$  und  $0^\circ$  Orientierung der Probe. Die Messungen wurden bei  $15^\circ\text{C}$  durchgeführt.

## 6.2 Temporin A in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen

Für das  $\alpha$ -helikale AMP TempA wurde mittels Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR in Modellmembranen eine gekippte Orientierung (T-Zustand) der Peptidhelix gefunden<sup>83</sup>. Diese Orientierung ist weitgehend unabhängig von Peptidkonzentration und den Eigenschaften der Lipiddoppelschicht (Ladung, Dicke, Sättigung der Seitenketten, Krümmung), lediglich bei  $T < T_m$  konnte in DMPC-Doppelschichten eine Umorientierung zum oberflächengebundenen S-Zustand beobachtet werden. Hier sollte nun geprüft werden, ob sich das Peptid in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen in einem T-Zustand oder S-Zustand anordnet.

Zur Kontrolle der Orientierung der Proben wurden  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Die Spektren von Erythrozytenmembranen zeigten einen hohen Anteil orientierter Lipide (Abbildung 20). Getrennte Signale einzelner Phospholipidtypen waren nicht aufgelöst, wie es für eine komplexe Mischung zu erwarten ist. Eine kleine isotrope Komponente variierender Intensität wurde in verschiedenen frisch vorbereiteten Proben beobachtet. Hierbei könnte es sich um einen kleinen Anteil Lipide handeln, die sich nicht in Doppelschichten befinden. Es könnte sich z.B. um Mizellen oder kubische Phasen handeln. Diese Signale erwiesen sich als nützlich als interne Referenz oder um den Hydratationsstatus der Proben zu beobachten. Bei frisch hydratisierten Proben waren sie scharf und schmal, durch Austrocknen der Proben nahmen sie ab oder verschwanden. Nach Rehydratisierung der Probe konnten sie wieder hergestellt werden. Die Zugabe von  $^{19}\text{F}$ -markierten TempA-Analoga änderte nichts am Erscheinen des  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums bei einem P/L  $\approx 1:20$  (bestimmt nach 4.3.7).



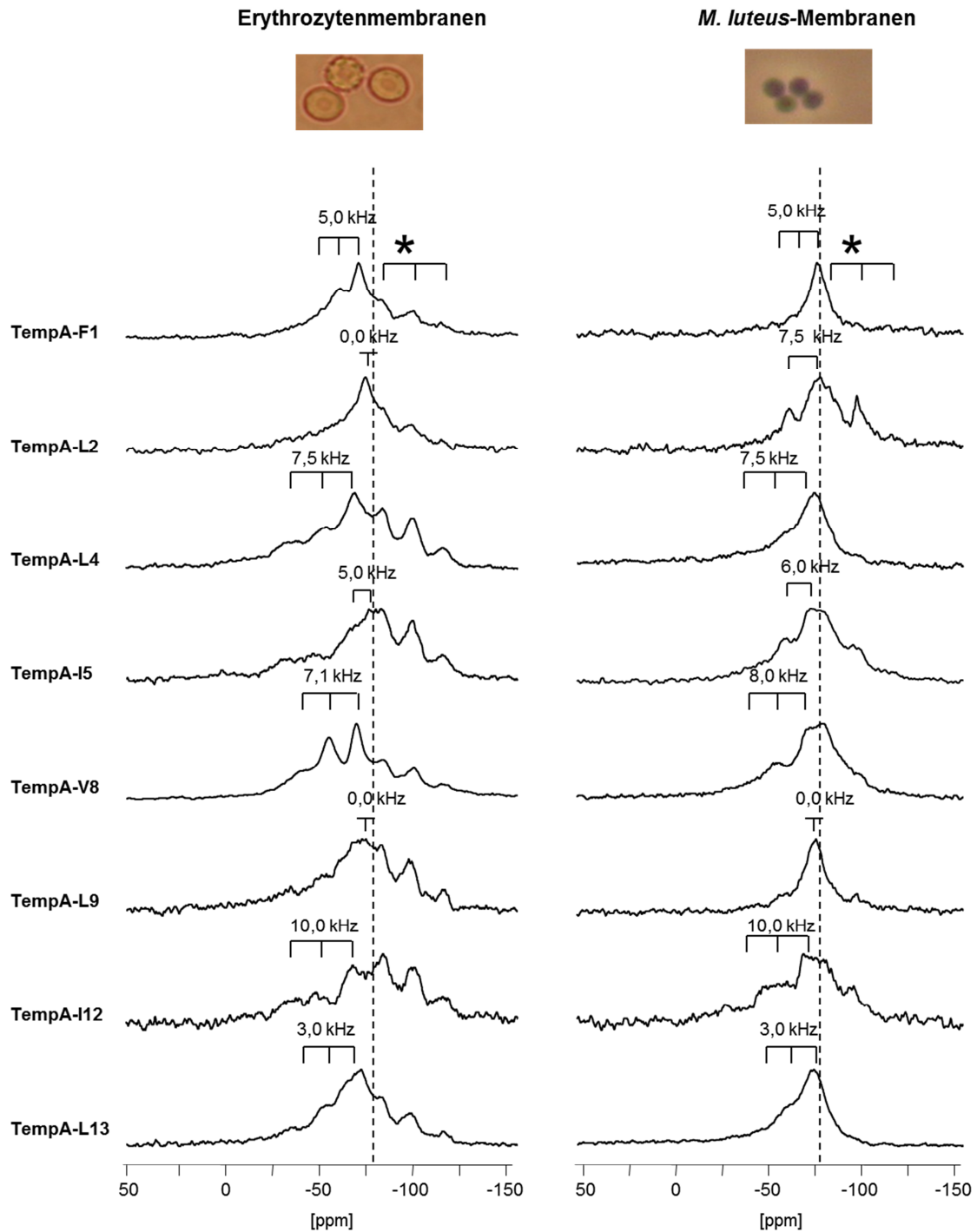
**Abbildung 20:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen. Die Kontrolle ohne Peptid zeigt die Qualität der jeweiligen Membranpräparation. Zugabe von TempA zur entsprechenden Membranprobe ändert die Orientierung der Lipide nicht.

Ähnlich wie Erythrozytenmembranen konnten auch bakterielle Protoplasten auf Glasträgern orientiert werden. Auch hier waren die Signale der einzelnen Phospholipide im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum nicht aufgelöst und isotrope Signale geringer Intensität waren vorhanden (Abbildung 20). Die Linien im NMR-Spektrum der orientierten Protoplastenmembranen waren breiter, als bei orientierten Erythrozytenmembranen. Dieser größere Mosaik-Spread könnte eine Auswirkung des höheren Proteinanteils in der *M. luteus*-Membranen sein. Auch im Falle von bakteriellen Protoplasten beeinflusst die Zugabe des Peptides die Orientierung nicht.

Es wurden acht verschiedene  $^{19}\text{F}$ -markierte Analoga von TempA in einem Peptid zu Lipidverhältnis von ca. 1:20 gemessen (Abbildung 21). Alle Proben zeigten in Erythrozyten erheblichen Pulveranteil. Die Linien waren sehr breit, bei einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis. Eine ähnlich schlechte Auflösung hatten zuvor Peptide in Membranen in der Gelphase bei  $T < T_m$  gezeigt<sup>83</sup>.

Interessanterweise zeigte das Peptid mit der  $\text{CF}_3$ -Markierung anstelle von Valin8 ein sehr gut aufgelöstes Signal und kaum unorientierten Anteil. Dies konnte auch in mehrfacher Wiederholung der Messung, mit jeweils frisch hergestellten Proben, reproduziert werden. Während die Signalauflösung in den anderen Proben auch durch Wiederholungen und Variation des Peptid zu Lipid Verhältnisses nicht verbessert werden konnte. Tabelle 5 listet die gefundenen Signalaufspaltungen im Vergleich zu den im DMPC- und DMPC/DMPG-Doppelschichten gefundenen auf.





**Abbildung 21:**  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren  $\text{CF}_3$ -Bpg markierter TempA-Analoga in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen bei  $T = 45^\circ\text{C}$ . Neben den angegebenen Signalaufspaltungen enthielten die Spektren in Erythrozyten einen ausgeprägten Pulveranteil (markiert mit \*).

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von TempA in *M. luteus*-Membranen waren allgemein schlechter aufgelöst und hatten breitere Linien, als die in Erythrozytenmembranen. Die Signale des unorientierten Anteils waren jedoch weniger stark ausgeprägt. Wiederrum zeigte TempA-V8 ein besonders gut aufgelöstes Spektrum. Die Signale hatten in den meisten

Fällen eine vergleichbare Aufspaltung wie in Erythrozytenmembranen. Lediglich TempA-L2 hatte eine Signalaufspaltung von ca. 7,5 ppm, welche in Erythrozyten nicht zu erkennen war. Diese Aufspaltung ähnelt der in Modellmembranen.

Im Allgemeinen geben die Messungen in nativen Membranen die erwartete Orientierung von TempA wieder (Tabelle 5). Es liegt in einem gekippten Neigungswinkel in der Membran vor, wie es bereits zuvor auch in Modellmembranen gefunden wurde <sup>83</sup>.

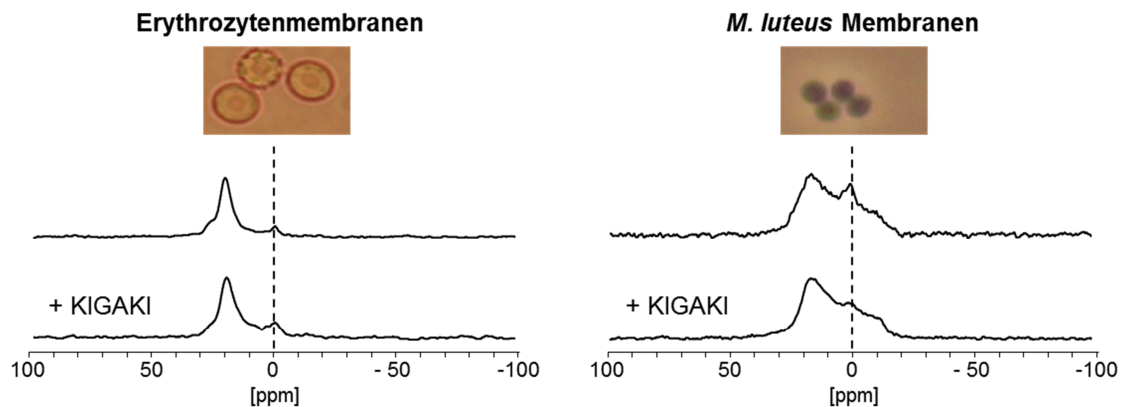
**Tabelle 5:** Dipolare Kopplungen der  $CF_3$ -markierten TempA-Analoga in Erythrozyten- und *M. luteus* Membranen im Vergleich zu Modellmembranen aus DMPC und DMPC/DMPG <sup>83</sup> P/L  $\approx$  1/20

Peptid	Dipolare Kopplung [kHz] $\pm$ 1			
	Erythrozyten	<i>M. luteus</i>	DMPC	DMPC/DMPG
TempA-F1	5,0	5,0	6,4	-
TempA-L2	0	7,5	8,9	-
TempA-L4	7,5	7,5	0	2,2
TempA-I5	5,0	6,0	5,2	5,4
Tempa-V8	7,1	8,0	6,5	6,1
TempA-L9	0	0	0	2,0
TempA-I12	10,0	10,0	10,0	-
TempA-L13	3,0	3,0	2,0	-

### 6.3 KIGAKI in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen

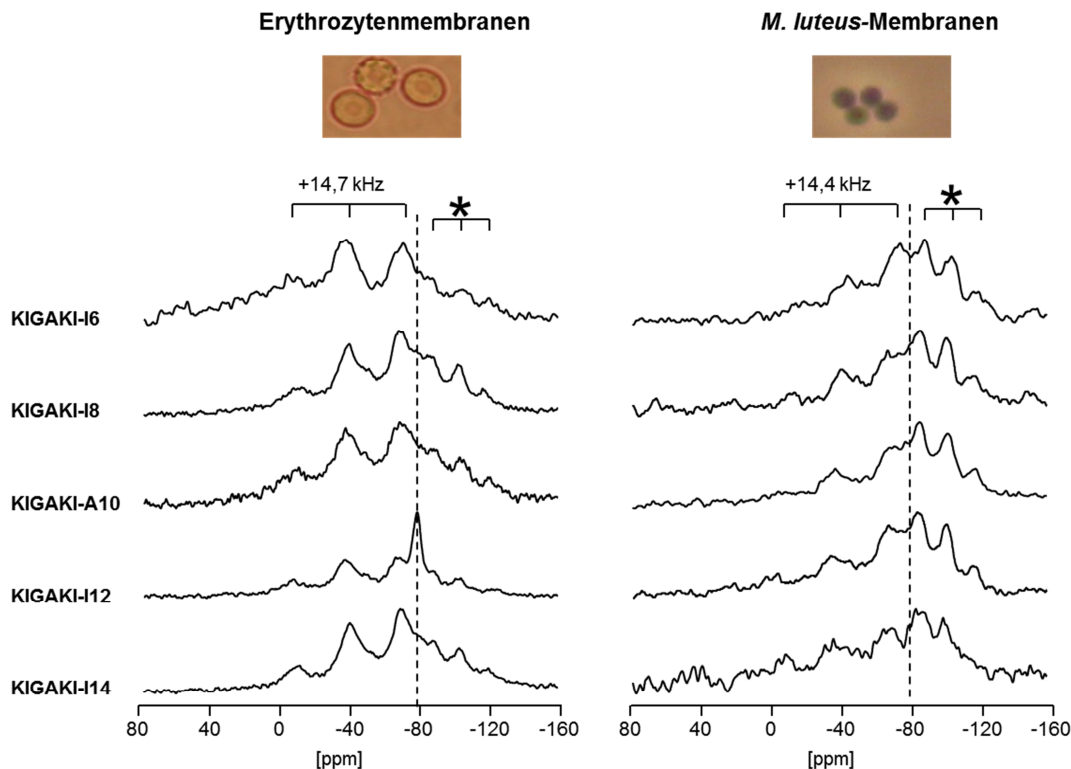
Das antimikrobielle Peptid KIGAKI wurde bereits mittels Festkörper-<sup>19</sup>F-NMR in orientierten, synthetischen Lipiddoppelschichten charakterisiert <sup>92,126</sup>. Bei niedrigen Peptidkonzentrationen ist es als Monomer an die Membranoberfläche gebunden. Dort bildet es flexible  $\beta$ -Stränge, die in der zweidimensionalen Ebene der Lipiddoppelschicht umherschweben. Bei höherer Peptidkonzentration wird KIGAKI in Form von oligomeren  $\beta$ -Faltblättern immobilisiert. Hier sollte dieses Verhalten auch in nativen Membranen bestätigt werden. Dazu wurden orientierte Proben von fünf verschiedenen  $CF_3$ -Bpg markierten KIGAKI-Analoga in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen mit P/L  $\approx$  1:20 vorbereitet.

Zur Kontrolle der Lipidorientierung wurden  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen (Abbildung 22). Das Aussehen der Spektren entsprach im Wesentlichen dem bereits in 6.2 beschriebenen. Sowohl Erythrozyten- als auch *M. luteus*-Membranen waren gut orientiert mit einem kleinen isotropen Signal. Die Zugabe von KIGAKI änderte nichts an der Orientierung.



**Abbildung 22:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen. Die Kontrolle ohne Peptid zeigt die Qualität der jeweiligen Membranpräparation. Zugabe von KIGAKI zur entsprechenden Membranprobe ändert die Orientierung der Lipide nicht.

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren der verschiedenen  $\text{CF}_3$ -Bpg-markierten KIGAKI-Analoga sind in Abbildung 23 zusammengefasst. Die Linienform war breiter und weniger gut aufgelöst als in Modellmembranen. Alle Spektren zeigten grundsätzlich dieselben Linienformen, wie für ein Peptid mit  $\beta$ -Faltblatt Struktur zu erwarten ist. Darüber hinaus wiesen alle eine Signalaufspaltung um +14 kHz-15 kHz auf. KIGAKI bildet demnach in allen Proben immobilisierte  $\beta$ -Faltblattstrukturen aus, die flach an der Membran angeordnet sind. Eine zusätzliche Signalgruppe bei ca. 100 ppm mit einer Aufspaltung von -7,5 kHz, die für *M. luteus*-Membranen stärker ausgeprägt war, deutet auf einen erheblichen Anteil unorientierter Peptidaggregate hin. Wie aus früheren Experimenten bereits bekannt, sind bakterielle Protoplasten weniger homogen und es ist wesentlich schwieriger, aus ihnen orientierte Proben vorzubereiten als aus Erythrozyten und synthetischen Modellmembranen. Die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigten für bakterielle Protoplasten stets einen deutlichen Anteil an unorientierten bzw. isotropisch mobilen Lipiden. Die Peptidaggregate sind daher nicht darauf beschränkt, in der Membranebene zu liegen. Insgesamt konnte hier die erwartete Aggregation von KIGAKI in hohen Peptidkonzentrationen auch in Gegenwart von nativen Membranen bestätigt werden.

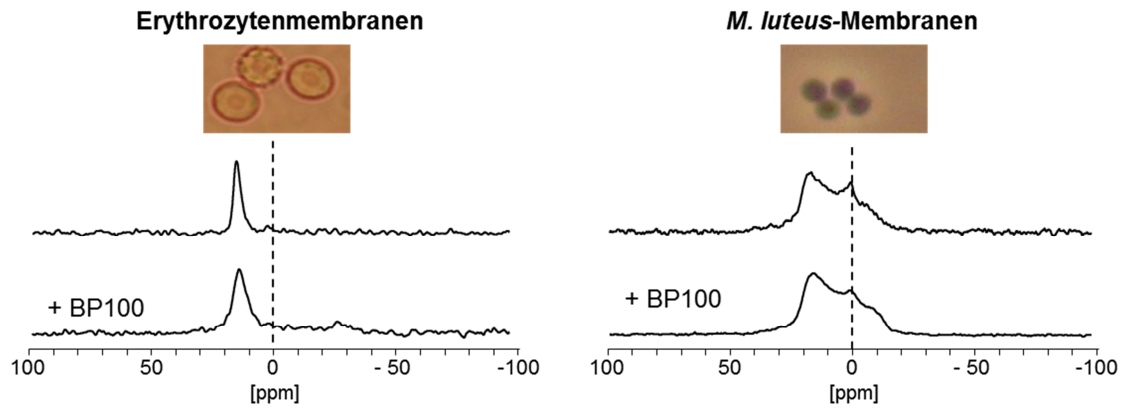


**Abbildung 23:** Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren  $\text{CF}_3$ -Bpg markierter KIGAKI-Analoga in orientierten Erythrozytenmembranen  $P/L \approx 1:20$  und in orientierten Protoplastmembranen von *M. luteus*  $P/L \approx 1:20$ . Alle Spektren wurden bei  $45^\circ\text{C}$  aufgenommen. Es ist die wichtige Signalaufspaltung von ca. 15 kHz tiefelfdig der isotropen Position (gestrichelte Linie) angezeigt. Der unorientierte Anteil mit einer Aufspaltung von ca. -7,5 kHz ist mit einem \* markiert.

#### 6.4 BP100 in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen

Das kurze  $\alpha$ -helikale AMP BP100 hat in Modellmembranen eine hohe Mobilität und nimmt konzentrationsunabhängig einen oberflächengebundenen Zustand an<sup>86</sup>. In dieser Arbeit wurde die Orientierung von BP100 in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen anhand sechs verschiedener  $\text{CF}_3$ -markierter Analoga mittels Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR bestimmt.

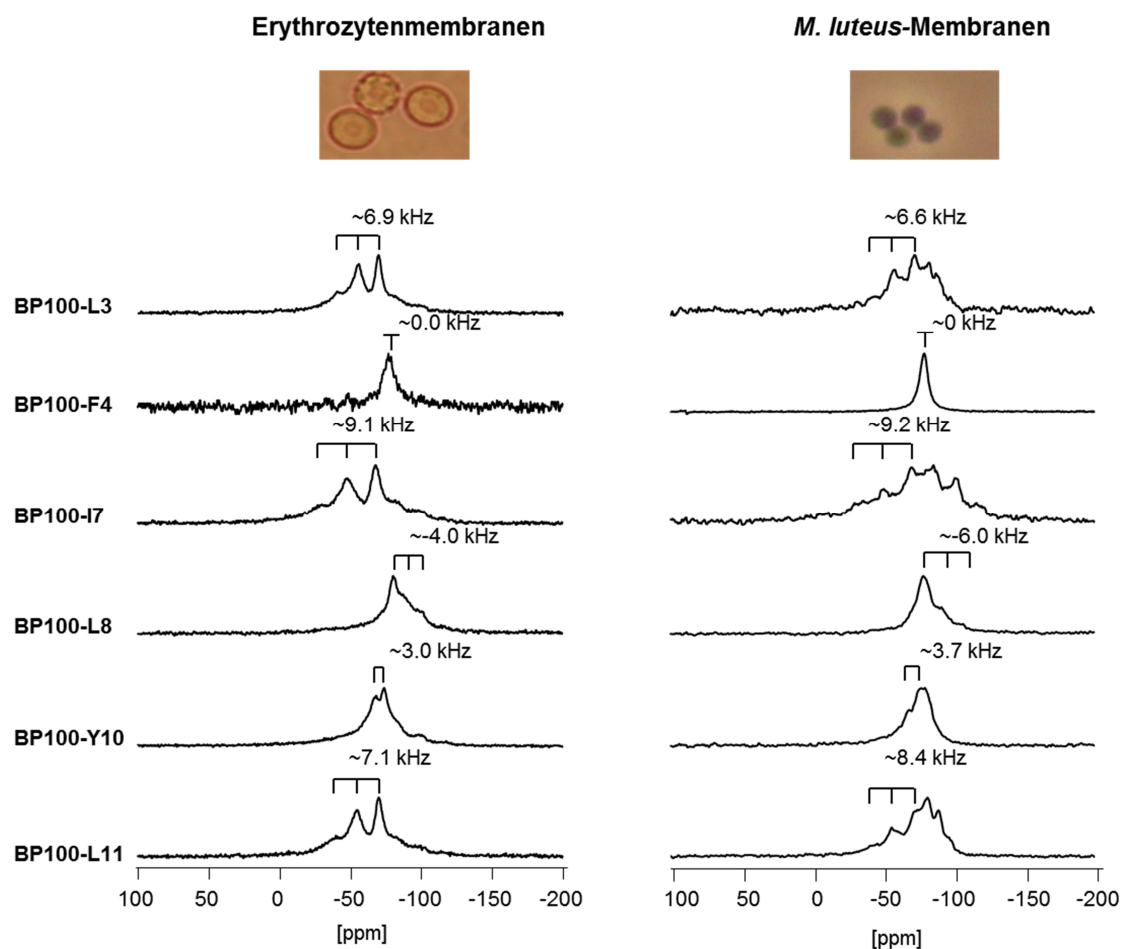
$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zur Kontrolle der Lipidorientierung zeigten eine gute Orientierung der Erythrozytenmembranen mit kaum unorientierten oder isotropen Signalanteilen (Abbildung 24). Wie schon in vorherigen Experimenten sind die Signale im Falle von *M. luteus*-Proben breiter und weniger gut orientiert. In beiden Fällen beeinflusst Zugabe von BP100 die Orientierung nicht.



**Abbildung 24:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen. Die Kontrolle ohne Peptid zeigt die Qualität der jeweiligen Membranpräparation. Zugabe von BP100 zur entsprechenden Membranprobe ändert die Orientierung der Lipide nicht.

$^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren in Erythrozytenmembranen zeigten sehr gut aufgelöste Signale, die nur wenig breiter waren als in Modellmembranen. Es waren kaum Signale, die auf unorientierte Peptide hindeuten, vorhanden (Abbildung 25).

Auch in *M. luteus*-Membranen waren die Signale gut aufgelöst. Die ermittelten Signalaufspaltungen sind in Tabelle 6 zusammen gefasst. Insgesamt sind die Werte sehr gut mit denen in DMPC/DMPG-Modellmembranen vergleichbar. Die Orientierung des Peptides unterscheidet sich in nativen Membranen nicht von der in Modellmembranen.



**Abbildung 25:** Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren von  $\text{CF}_3$ -Bpg-markierten BP100-Analoga in orientierten Erythrozytenmembranen  $P/L \approx 1:20$  und in orientierten Protoplastmembranen von *M. luteus*  $P/L \approx 1:20$ . Alle Spektren wurden bei  $45^\circ\text{C}$  aufgenommen.

**Tabelle 6:** Dipolare Kopplungen der  $\text{CF}_3$ -markierten BP100-Analoga in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen  $P/L \approx 1/20$  im Vergleich zu Modellmembranen aus DMPC/DMPG  $P/L \approx 1:100$ <sup>86</sup>

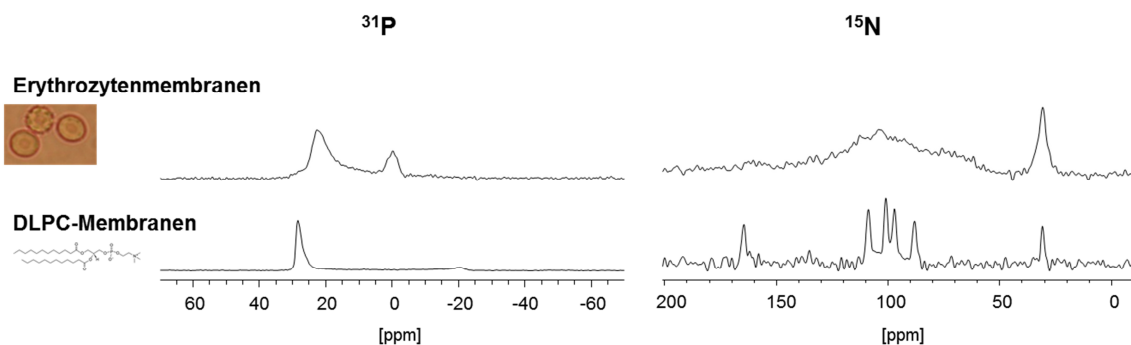
Peptid	Dipolare Kopplung [kHz] $\pm 1$		
	Erythrozyten	<i>M. luteus</i>	DMPC/DMPG
L3- $\text{CF}_3$ -L-Bpg	6,9	6,6	5,1
F4- $\text{CF}_3$ -L-Bpg	0,0	0,0	1,0
I7- $\text{CF}_3$ -L-Bpg	9,1	9,2	8,2
L8- $\text{CF}_3$ -L-Bpg	-4,0	-6,0	-5,2
Y10- $\text{CF}_3$ -L-Bpg	3,0	3,7	3,2
L11- $\text{CF}_3$ -L-Bpg	7,1	8,4	6,5

## 6.5 $^{15}\text{N}$ -NMR in nativen Membranen

Anhand der Peptide TempA, KIGAKI und BP100 in Erythrozyten- und *M. luteus*-Membranen konnte gezeigt werden, dass sich Festkörper- $^{19}\text{F}$ -NMR hervorragend eignet, um AMP in nativen Membranen zu untersuchen. Hier sollte nun am Beispiel des cyclischen  $\beta$ -Faltblattes GS gezeigt werden, ob Experimente dieser Art auch mit  $^{15}\text{N}$ -NMR durchführbar sind.  $^{15}\text{N}$ -Markierung hat gegenüber  $^{19}\text{F}$ -Markierung den Vorteil, dass keine unnatürliche Aminosäure ins Peptid eingebracht werden muss und somit keine Änderungen der Peptidstruktur hervorgerufen werden können. Allerdings ist die NMR-Sensitivität des  $^{15}\text{N}$ -Kerns ( $\gamma = -27,107 \cdot 10^6 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) geringer, als von  $^{19}\text{F}$  ( $\gamma = 251,667 \cdot 10^6 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) <sup>213</sup> und es wird aufgrund des natürlichen Vorkommens ein Hintergrund in biologischen Proben erwartet.

Uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertes GS wurde biosynthetisch durch Fermentation von *A. migulanus* in GATF-Medium erzeugt und wie in 4.6.4 beschrieben, aus der Zellkultur extrahiert. Das Peptid wurde mittels HPLC aufgereinigt. MALDI-TOF zeigte, dass die Markierung zu 100 % erfolgreich war.

Proben von  $^{15}\text{N}$ -markiertem GS in Erythrozytenmembranen wurden analog denen mit  $^{19}\text{F}$ -markierten Peptiden hergestellt (siehe 4.3.8). Aufgrund der erwarteten geringen Signalintensität, wurde P/L  $\approx$  1:10 gewählt. Zusätzlich wurde eine Probe von GS in DLPC-Membranen mit P/L  $\approx$  1:40 hergestellt. Diese wurde benötigt, um die Messparameter für die Erythrozytenprobe zu ermitteln. Außerdem sollte sie als Vergleich dienen, da noch keine entsprechenden Spektren von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem GS vorhanden waren.



**Abbildung 26:** Links:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Erythrozyten und DLPC-Membranen mit GS. P/L  $\approx$  1:10 für Erythrozyten und P/L  $\approx$  1:40 für DLPC. Rechts: Entsprechende  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertem GS in Erythrozyten und DLPC-Membranen.

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigten eine sehr gute Orientierung für DLPC-Membranen (Abbildung 26). Im Falle von Erythrozytenmembranen waren die Signale erwartungsgemäß breiter und es war ein deutliches isotropes Signal vorhanden.

$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von uniform-markiertem GS in DLPC-Membranen zeigten eine sehr gute Auflösung aller zu erwartenden Signale (Abbildung 26). Im Vergleich dazu waren einzelne Signale in Erythrozytenmembranen nicht aufgelöst. Nur ein Signal mit einer chemischen Verschiebung von ca. 30 ppm war deutlich erkennbar. Das Signal war in DLPC-Membranen sowohl bei  $0^\circ$ - als auch bei  $90^\circ$ -Orientierung (Daten nicht gezeigt) an der gleichen Stelle vorhanden. Wahrscheinlich handelt es sich um das Signal der Ornithin Seitenkette (zum Vergleich: Lysin  $\text{NH}_2$  ca. 33 ppm und gleiches Verhalten bei  $0^\circ$ - und  $90^\circ$ -Orientierung der Probe)<sup>214</sup>. Eine deutliche Erhebung im Bereich zwischen 80 ppm und 120 ppm entspricht den in DLPC aufgelösten Signalen. Außerdem lässt sich ein weiteres Signal mit einer chemischen Verschiebung von ca. 160 ppm erkennen, das ebenfalls dem in DLPC-Membranen gefundenen entspricht.

## 6.6 Native Membranen für Festkörper-NMR

Durch die hohe NMR-Sensitivität des  $^{19}\text{F}$ -Kerns und die Abwesenheit eines natürlichen Fluorhintergrunds in biologischen Proben eignet sich  $^{19}\text{F}$ -NMR sehr gut, um AMP in nativen Membranen zu untersuchen. Ein beschränkender Faktor ist die Wahl der Membranprobe. Aus Erythrozyten- oder *M. luteus*-Membranen lassen sich gut orientierte Membrandoppelschichten herstellen. Es wäre allerdings auch interessant AMP in anderen Membranen wie zum Beispiel von gramnegativen Bakterien, Pflanzen, Pilzen oder sogar eukaryotischen Organellen zu charakterisieren.

Eine besonders interessante Membran ist die von Mykobakterien wie *M. tuberculosis*. Hier sollte die Durchführbarkeit von Festkörper-NMR-Messungen an Mykolsäuren untersucht werden. Da Mykolsäuren keine Phosphatgruppe enthalten, kann ihre Orientierung nicht durch  $^{31}\text{P}$ -NMR ermittelt werden. Hier wurden Proben nach derselben Probenpräparation hergestellt, die sonst für orientierte Lipiddoppelschichten verwendet wird (siehe 4.3.1). Ein Rückschluss auf die Orientierung der Probe sollte durch die Orientierung des Peptids getroffen werden. Daher wurde das gut charakterisierte Peptid PGLa gewählt. Das  $^{19}\text{F}$ -NMR-Signal von PGLa-A13 unterliegt in DMPC/DMPG-Membranen einer temperaturabhängigen Umorientierung. Hier wurde jedoch nur ein



Signal, das der isotropen Position entsprach, beobachtet. Das Signal ähnelt dem, das in DMPC/DMPG-Proben bei stark saurem oder basischem pH-Wert gefunden wurde (siehe 5.5). Entweder sind die Mykolsäuren unorientiert oder das Peptid ungebunden und daher frei beweglich. Es wäre auch, dass das Peptid nicht  $\alpha$ -helikal vorliegt.

Als weiteres Peptid wurde KIGAKI gewählt, da dieses eine andere Konformation als PGLa hat und hier ein oberflächengebundener Zustand erwartet wird. Zudem ist die Signalaufspaltung für jede markierte Position gleich, weshalb auch hier die Analyse eines markierten Analogons ausreicht, um Rückschlüsse auf die Orientierung des Peptides zu ziehen. Ein weiterer Vorteil ist eine große positive Aufspaltung, die nicht von einem unorientierten Anteil des Spektrums überdeckt wird und bei der es unwahrscheinlich ist, dass Signale sich überlagern. KIGAKI zeigte in Mykolsäureproben ein isotropes Signal und einen Anteil unorientierter Peptide. Auch KIGAKI ordnete sich also nicht erwartungsgemäß an. Da hier neben dem isotropen Signal auch ein Pulverspektrum vorhanden ist, bindet das Peptid entweder unorientiert an die Membran oder es liegt in Form von Aggregaten unterschiedlicher Ausrichtung vor.

Reine Mykolsäuren sind schwierig für Festkörper-NMR zu handhaben, da wegen der fehlenden Phosphatgruppe kein Rückschluss auf die Orientierung mit  $^{31}\text{P}$ -NMR getroffen werden kann. So ist nicht eindeutig bestimmbar, ob Peptid oder Membran unorientiert vorliegt. Eine Möglichkeit, die Orientierung von Mykolsäuren zu bestimmen wäre  $^{13}\text{C}$ -NMR. Eine Alternative wäre die Mischung mit Phospholipiden. Allerdings könnte es hier zu einer Ausbildung von verschiedenen Bereichen kommen. AMP könnten sich dann vorwiegend an Phospholipid-reiche Bereiche anlagern. Solche Proben würden also nicht unbedingt die Wechselwirkung von AMP mit Mykolsäuren wiedergeben.

Es bietet sich an, für weitere Untersuchungen Peptide zu verwenden, von denen eine antimykobakterielle Wirkung bekannt ist zB. Pandinin<sup>157</sup>. Hier sollte eine Wechselwirkung zu beobachten sein.

Im Gegensatz zu mykobakteriellen Membranen sind Membranen von menschlichen Erythrozyten und grampositiven *M. luteus* bereits für Festkörper-NMR etabliert. Hier wurde die Membranorientierung der AMP TempA, KIGAKI und BP100 mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR in diesen Membranen beschrieben. Mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR wurde die Orientierung der Lipide überprüft.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigten für Erythrozytenmembranen eine gute Orientierung und ein isotropes Signal variierender Intensität, das auf nicht-lamellare Lipide hindeutet.

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von *M. luteus*-Membranen hatten breitere Signale, was auf die größere Heterogenität der bakteriellen Membran und die höhere Anzahl von Defektstellen zurückzuführen ist. Keines der hier untersuchten Peptide hatte Einfluss auf die Orientierung der Membranen.

TempA lag in Erythrozytenmembranen teilweise unorientiert vor. Im Wesentlichen zeigte es aber dieselbe Orientierung, wie bereits zuvor in Modellmembranen beschrieben. In *M. luteus*-Membranen war der unorientierte Anteil im Vergleich geringer. Dies könnte daran liegen, dass das in eukaryotischen Membranen vorhandene Cholesterol das Peptid zum Teil daran hindert sich in der Membran zu orientieren. So ist zum Beispiel von TempL bekannt, dass Sterole seine Interkalation in die Membran verringern<sup>215</sup>. Auch eine Wechselwirkung mit Cholesterol könnte TempA zu hohen Anteilen unorientierter Peptide führen. Die Signale sind in *M. luteus*-Membranen allgemein breiter und weniger gut aufgelöst. Dies war für alle hier untersuchten Peptide der Fall und ist der schlechteren Orientierung und größeren Heterogenität der *M. luteus*-Membranen zuzuschreiben. Im Allgemeinen zeigte TempA aber auch in bakteriellen Membranen die erwartete gekippte Orientierung. Somit konnte die biologische Relevanz der Orientierung, die in Modellmembranen gefunden wurde, bestätigt werden.

KIGAKI bildet in hohen Konzentrationen  $\beta$ -Faltblatt-Aggregate auf der Membranoberfläche von Modellmembranen<sup>126</sup>. Dies konnte hier auch für native Membranen bestätigt werden. Im Gegensatz zu TempA war der unorientierte Anteil hier in bakteriellen Membranen größer. Die Aggregation des Peptides hat keinen Einfluss auf seine antimikrobielle Aktivität, aber zur Aggregation neigende Peptide sind stärker hämolytisch aktiv<sup>92</sup>. Die Aggregation scheint also insbesondere bei der hämolytischen Aktivität und somit bei der Bindung an Erythrozytenmembranen eine Rolle zu spielen.

BP100 ergab in nativen Membranen besonders gut aufgelöste Spektren. Das kurze AMP ist sehr mobil, was zu einer Ausmittelung der Orientierungen und schärferen Signalen führen kann. Auch hier konnten die in Modellmembranen gefundenen Ergebnisse bestätigt werden. BP100 ist allerdings ein sehr kurzes Peptid und alle Aminosäuren, die sich für  $\text{CF}_3$ -Bpg-Markierung anbieten, liegen auf einer Seite der Helix. Um eine sichere Aussage über die Peptidorientierung treffen zu können, sollten alle Markierungen so gleichmäßig wie möglich verteilt sein. Für amphiphile Peptide, insbesondere solch kurze wie BP100, ist dies meist schwierig.

Geeignete Markierungen für geladene Aminosäuren wären eine Möglichkeit das zu lösen. Eine weitere Möglichkeit, ist der Vergleich der Ergebnisse aus mehreren Methoden. Zur Lösung der Orientierung von BP100 in Modellmembranen wurden beispielsweise  $^{19}\text{F}$ -NMR,  $^{15}\text{N}$ -NMR und orientierter Zirkulardichroismus herangezogen<sup>86</sup>.

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob sich die Methode der  $^{15}\text{N}$ -NMR für NMR-Studien an AMP in nativen Membranen eignet. Dazu wurde uniform  $^{15}\text{N}$ -markiertes GS verwendet, das sich kostengünstig über Biosynthese herstellen lässt. Ein  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum in DLPC-Membranen, das dem Vergleich dienen sollte, zeigte eine sehr gute Signalauflösung und die erwartete oberflächengebundene Orientierung. In Erythrozytenmembranen waren die Signale nicht aufgelöst und es war nur ein deutliches Signal mit einer chemischen Verschiebung von ca. 30 ppm zu erkennen, welches der Ornithin Seitenkette zuzuordnen ist. Lediglich eine Erhebung im selben Bereich, in dem bei der DLPC-Probe vier Signale zu sehen waren, deutete auf eine mögliche Orientierung des Peptides hin. Obwohl für die Probe mit Erythrozyten die 4fache Peptidmenge verwendet und darüber hinaus länger gemessen wurde, waren kaum aufgelöste Signale vorhanden. Hier kommen klar die Vorteile von  $^{19}\text{F}$ -NMR gegenüber  $^{15}\text{N}$ -NMR zum Vorschein. Die höhere Sensitivität des Fluorkerns und das Fehlen eines Fluorhintergrundes in biologischen Proben ermöglicht eine Analyse von AMP in Biomembranen mit vergleichsweise wenig Probe (0,3 mg-0,5 mg für Peptide mit einer  $^{19}\text{F}$ -Markierung, 1 mg im Falle von uniform  $^{15}\text{N}$  markiertem GS) in kürzerer Messzeit. So konnte in 7 h eine sehr gute Signalintensität für die  $^{19}\text{F}$ -markierte BP100-Analoga erhalten werden, während  $^{15}\text{N}$ -markiertes GS in derselben Zeit kaum Signal ergab.

Unabhängig von den offenkundigen Nachteilen einer  $^{15}\text{N}$ - gegenüber einer  $^{19}\text{F}$ -Markierung in biologischen Proben, kann die unzureichende Signalauflösung zum Teil auch auf das GS selbst zurückgeführt werden. So hatte GS schon in früheren  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messungen in nativen Membranen hohe Anteile unorientierter Peptide gezeigt. In einem Fall wie dem von BP100, das sich in Erythrozyten gut orientiert, könnte  $^{15}\text{N}$ -NMR in nativen Membranen eine sinnvolle Ergänzung sein. Allerdings können  $^{15}\text{N}$ -NMR-Messungen in nativen Membranen nur für hohe P/L durchgeführt werden, da aufgrund der geringen Empfindlichkeit eine große Peptidmenge nötig ist. Dies ist nicht nur für  $^{15}\text{N}$ -NMR, sondern in geringerem Maße auch für  $^{19}\text{F}$ -NMR, ein Nachteil von Messungen in nativen Membranen.

In Modellmembranen kann insbesondere bei  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messungen das P/L über einen großen Bereich variiert werden. So ist es möglich auch sehr kleine P/L wie 1:3000 zu messen<sup>83,86</sup>. Bei Verwendung von nativen Membranen besteht hier eine Einschränkung. Das P/L kann entweder durch Verringerung der Peptidmenge oder Erhöhung der Lipidmenge verkleinert werden. In NMR-Messungen in nativen Membranen kann die Peptidmenge nicht beliebig verringert werden, da aufgrund der größeren Signalbreite eine gewisse Peptidmenge ( $\geq 0,3$  mg für  $^{19}\text{F}$ -markierte Peptide) nötig ist, um ausreichend Signal zu erhalten. Eine Erhöhung der Lipidmenge andererseits ist aus praktischen Gründen nur begrenzt möglich. Um eine NMR-Probe aus nativen Membranen mit P/L 1:20 vorzubereiten werden für 0,3 mg Peptid bereits ca. 2-4 ml wässriger Membransuspension benötigt. Die Proben werden dadurch sehr dick und passen je nach verwendetem NMR-Probenkopf nicht mehr in die Spule hinein. Eine Verringerung des P/L, insbesondere durch Verringerung der Peptidmenge hätte außerdem eine längere Messzeit zur Folge. Messzeiten für Biomembranproben sind ohnehin schon vergleichsweise lang und hier besteht die Gefahr, dass die Proben austrocknen.

Neben der längeren Messzeit ist auch die Vorbereitung einer NMR-Probe aus nativen Membranen wesentlich anspruchsvoller als im Falle von Modellmembranen. Insbesondere bei bakteriellen Membranen nimmt die Kultivierung der Bakterien und die Isolierung der Membranen mehrere Tage in Anspruch, während eine entsprechende Modellmembranprobe innerhalb weniger Stunden vorbereitet werden kann.

Nicht jedes Peptid zeigt in nativen Membranen gut aufgelöste Spektren, so konnten zwischen den hier untersuchten Peptiden große Unterschiede festgestellt werden. Eine eindeutige Identifizierung der Orientierung eines AMP ist oft schwierig, da die Peptide gleichzeitig mehrere Orientierungszustände annehmen. So ist meist ein Vergleich zu Modellmembranen notwendig, um die Signale zuordnen zu können.

Die hier untersuchten Peptide TempA, KIGAKI und BP100 zeigten keine Unterschiede in ihrer Orientierung zwischen Modellmembranen, Erythrozytenmembranen oder *M. luteus*-Membranen. Dadurch kann bestätigt werden, dass es sich bei den in Modellmembranen gefundenen Orientierungen tatsächlich um die biologisch relevanten handelt.

Obwohl es sinnvoll und zum Teil notwendig ist, AMP in Modellmembranen zu studieren, um zum Beispiel eine Umorientierung zu zeigen, die von Peptidkonzentration, Membrankrümmung, Membranladung oder Membrandicke abhängt, bieten NMR-Messungen in nativen Membranen eine gute Ergänzung und Bestätigung dieser Experimente.

## 7 Gramicidin S-Granulae

Die Akkumulation des antimikrobiellen Peptids in *Aneurinbacillus migulanus* in Form granulärer Einschlusskörperchen wurde von Frau Dr. Marina Berditsch (Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie) entdeckt<sup>106</sup>. In dieser Arbeit sollten die Methoden zur Gewinnung dieser Gramicidin S-Granulae (GSG) optimiert und ihre biologischen Eigenschaften sowie ihre molekulare Zusammensetzung charakterisiert werden.

### 7.1 Wachstum und GS Produktion von *A. migulanus*

*A. migulanus* differenziert abhängig von den Wachstumsbedingungen in unterschiedliche Phänotypen, von denen nicht alle GS produzieren<sup>93</sup>. Außerdem wurde beobachtet, dass auch die Produktion von GSG mit den Wachstumsbedingungen zusammenhängt. Während des Zellwachstums werden zuerst kleine (ca. 10 nm-20 nm) GSG gebildet, die dann zu größeren (ca. 200 nm) GSG fusionieren. Um eine maximale Ausbeute an GSG zu erhalten, ist es daher wichtig sowohl die richtigen Wachstumsbedingungen als auch die ideale Wachstumsdauer zu finden. Besonders bedeutend für die Gewinnung von GSG ist die GS-Syntheseaktivität der Zellen. Daher wurden während des Zellwachstums Proben entnommen und deren GS-Konzentration mittels HPLC bestimmt.

#### 7.1.1 Einfluss des Inokulationsmaterials

Zunächst wurde der Einfluss des Inokulationsmaterials auf Wachstum und GS-Syntheseaktivität der *A. migulanus*-Zellen untersucht.

Die Flüssigkulturen (G4/4 Medium, 400 ml) wurden mit ein, drei oder fünf Tage gewachsenen Kolonien von LBY-Agar Platten beimpft. Nach 24 h war die GS-Konzentration in allen Kulturen vergleichbar (ca. 0,45 mg/ml), jedoch zeigten sich im weiteren Verlauf des Wachstums signifikante Unterschiede. Flüssigkulturen, die mit einem Tag alten Kolonien beimpft wurden, wuchsen schnell, es wurde aber ab 28 h Wachstum kein Anstieg der GS-Konzentration mehr beobachtet. Die GS-Konzentration verblieb zwischen 0,4 mg/ml und 0,5 mg/ml. Ähnlich verhielt es sich bei drei Tage alten Kolonien, hier stieg die GS-Konzentration ab 32 h nicht weiter an und erreichte einen

Endwert von ca. 0,6 mg/ml. Bei Beimpfung mit fünf Tage alten Kolonien hatte die GS-Konzentration bei 32 h einen Wert von ca. 0,75 mg/ml und stieg weiter an. Es konnten hier nach 36 h GS-Konzentrationen  $> 1,0$  mg/ml erreicht werden.

Kolonien, die lediglich einen Tag auf LBY-Agar Platten gewachsen sind, enthalten viele vitale Zellen, daher wachsen Flüssigkulturen, die mit diesen beimpft wurden, schnell. Flüssigkulturen, die mit fünf Tage alten Kolonien beimpft wurden, wachsen dagegen langsamer. Es wurde bereits mehrfach beobachtet, dass langsam wachsende Zellen mehr GS und mehr GSG produzieren <sup>96</sup>. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die GS-Produktion bei starkem Zellwachstum stagniert und bei langsamem Zellwachstum ansteigt. Die Zellen wachsen und produzieren also nicht gleichzeitig. Das könnte erklären, warum stark wachsende Zellen verhältnismäßig wenig GS synthetisieren. Zur Inokulation einer Flüssigkultur eignen sich demnach fünf Tage alte Kolonien am besten. Alle weiteren Flüssigkulturen wurden daher mit fünf Tage alten Kolonien beimpft.

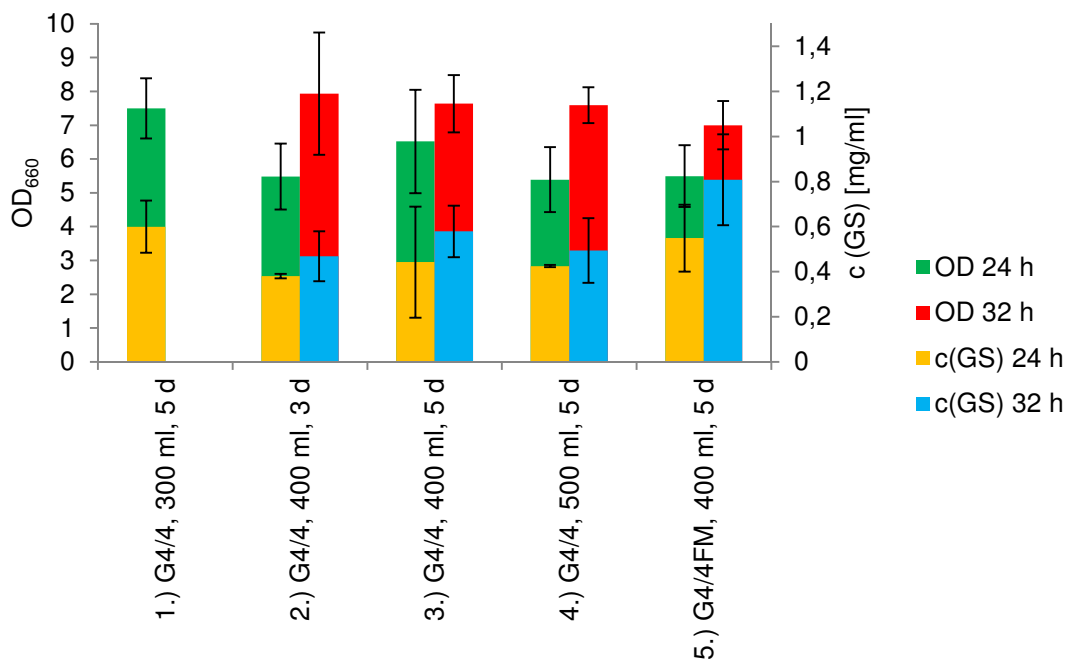
### 7.1.2 Einfluss des Kulturvolumens

Auch das Volumen der Flüssigkultur hat bekanntermaßen Einfluss auf das Zellwachstum und die GS-Syntheseaktivität von *A. migulanus*. So hatten Zellen im 40 ml Maßstab in früheren Experimenten hohe biosynthetische Aktivität gezeigt <sup>96</sup>. Jedoch ist ein solch geringes Kulturvolumen zur Gewinnung großer Mengen GSG impraktikabel, daher wurden hier Experimente mit Volumina von 300 ml, 400 ml und 500 ml G4/4 Medium durchgeführt. Es zeigte sich hier kein systematischer Einfluss. Zwar produzierten Zellen in 300 ml Zellkultur im Durchschnitt am meisten GS, allerdings war die Produktion im 400 ml Maßstab geringer als im 500 ml. Im Allgemeinen traten unabhängig vom Volumen der Flüssigkultur starke Schwankungen in Wachstum und Syntheseaktivität auf. In Abbildung 27 ist ein Vergleich der optischen Dichte und GS-Konzentration nach 24 h und 32 h Zellkultur unter verschiedenen Bedingungen gezeigt. Anhand der gezeigten Standardabweichungen wird deutlich, dass die Werte starken Schwankungen unterliegen. Insgesamt scheint das Volumen einer Flüssigkultur nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Um mehr Material zu erhalten, wurden die folgenden Experimente im 400 ml oder 500 ml Maßstab durchgeführt.

### 7.1.3 Einfluss des Mediums

Beim G4/4 Medium (Tabelle 12, Anhang) handelt es sich um ein chemisch definiertes Medium, das den *A. migulanus*-Zellen alle zum Wachstum und zur GS-Synthese benötigten Nährstoffe liefert <sup>96,216</sup>. Da erste massenspektrometrische Untersuchungen an GSG Hinweise auf phosphorylierte Fettsäuren als Bestandteil der GSG gaben, wurde der Einfluss von Fumarat und Malat auf Wachstum und GS-Syntheseaktivität von *A. migulanus* untersucht. Dazu wurde hier dem G4/4 Medium 5 mM Fumarat und 25 mM Malat zugegeben (im Folgenden G4/4FM Medium).

Die GS-Syntheseaktivität von *A. migulanus* in G4/4FM Medium war durchschnittlich höher als in G4/4 Medium (Abbildung 27). Bei vergleichbarem Zellwachstum lag die GS-Konzentration in G4/4FM Medium nach 24h durchschnittlich bei 0,55 mg/ml und nach 32 h bei 0,81 mg/ml, während in G4/4 Medium nach 24 h 0,38 mg/ml und nach 32 h 0,47 mg/ml erreicht wurden. Der Zusatz von Fumarat und Malat kann die GS-Syntheseaktivität also merklich steigern.



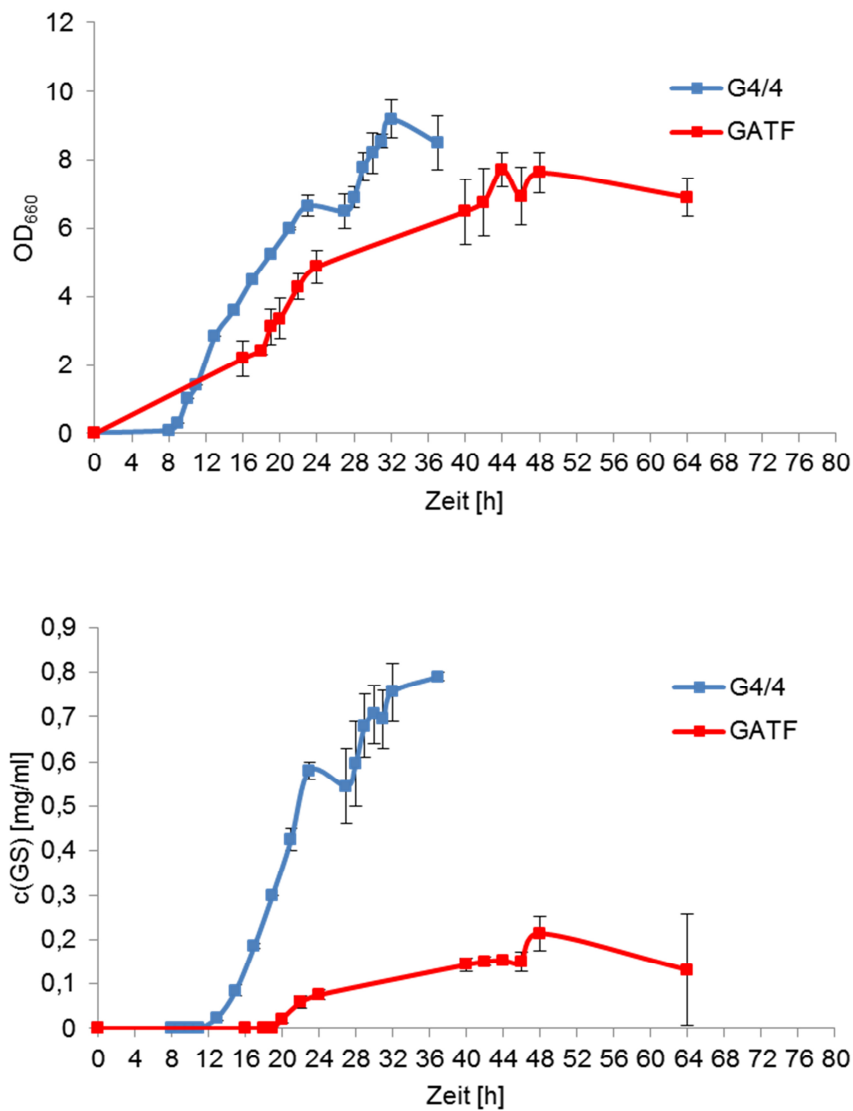
**Abbildung 27:** Wachstum und GS-Produktion von *A. migulanus*-Kulturen unter optimierten Bedingungen wie Volumen des Mediums (300 ml, 400 ml, 500 ml) Alter des Inokulationsmaterials (3 d, 5 d) sowie Zusammensetzung des Mediums (G4/4, G4/4FM). Es ist jeweils die  $OD_{660}$  und GS-Konzentration nach 24 h und nach 32 h verglichen (bei 1.) nur 24 h, da aufgrund des schnellen Wachstums bereits bei 28 h geerntet wurde). Es sind die Mittelwerte aus jeweils mindestens vier Zellkulturen sowie die Standardabweichung aufgetragen.



#### 7.1.4 Medium für die Isotopenmarkierung von GSG

Für spätere NMR-Messungen sollten in dieser Arbeit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte GSG gewonnen werden. Die Isotopenmarkierung von GS wurde von Frau Dr. Marina Berditsch (Institut für Organische Chemie, Karlsruher Institut für Technologie) entwickelt<sup>96</sup>. Sie erfolgt durch Anzucht der *A. migulanus*-Zellen in GATF-Medium (Tabelle 12, Anhang). Im Vorfeld dieser Arbeit waren nur Experimente im 40 ml Maßstab durchgeführt worden. Um eine ausreichende Menge an GSG zu erhalten, sollte nun der Maßstab entsprechend erhöht sowie die geeignete Kulturdauer gefunden werden.

Erwartungsgemäß zeigten die Zellen in GATF-Medium langsames Zellwachstum als in G4/4 oder G4/4FM Medium (Abbildung 28). Auch die GS-Syntheseaktivität war wesentlich geringer. So konnte erst nach 18 h ein leichter Anstieg der GS-Konzentration gemessen werden. Nach 48 h erreichte die Konzentration 0,2 mg/ml und es konnte selbst nach 64 h Wachstum kein weiterer Anstieg beobachtet werden.



**Abbildung 28:** Repräsentative Wachstums- und GS-Konzentrationskurven von *A. migulanus* DSM5759 in 400 ml G4/4 bzw. GATF Medium, es sind die optischen Dichten bei 660 nm ( $OD_{660}$ ) bzw. die GS-Konzentration ( $c(GS)$  [mg/ml]) sowie die jeweilige Standardabweichung aufgetragen.

## 7.2 Gewinnung und Charakterisierung von GSG

Zur Gewinnung von GSG wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden des Zellaufschlusses und der Isolierung von GSG verglichen. Durch DLS und REM wurden die erhaltenen GSG hinsichtlich ihrer Größe und ihres Aussehens charakterisiert. Ihr GS-Gehalt wurde mittels HPLC bestimmt und die Ausbeute an erhaltenen GSG in Bezug auf die GS-Konzentration des Ausgangsmaterials berechnet. Durch MHK- und Hämolysetests konnte schließlich die biologische Aktivität der GSG bestimmt werden.

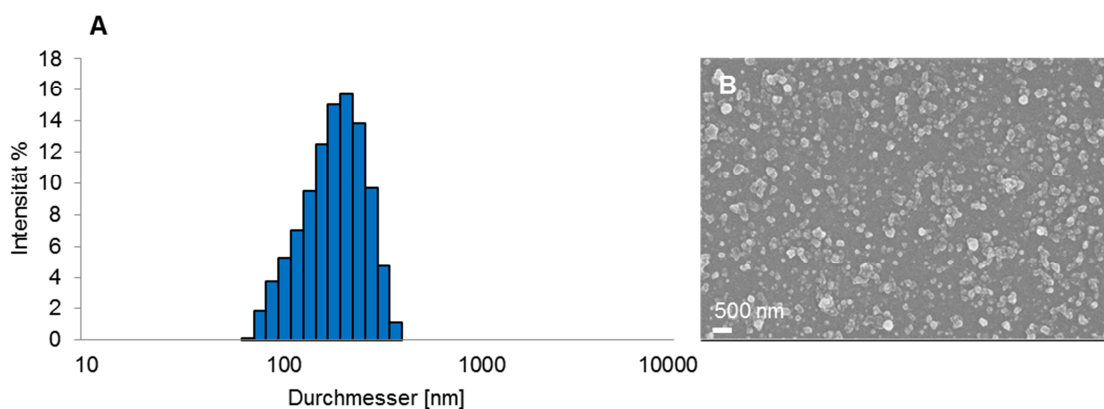
### 7.2.1 Zellaufschlussmethoden

Zur Gewinnung von GSG wurden drei verschiedene Methoden des Zellaufschlusses verglichen. Zum Vergleich der Methoden wurden *A. migulanus*-Zellkulturen aus 400 ml G4/4 Medium verwendet, das mit 5 Tage alten Kolonien beimpft worden war. Die Zellkulturen hatten vergleichbare optische Dichten und GS-Konzentrationen.

#### *Zellaufschluss mit Ultraschall*

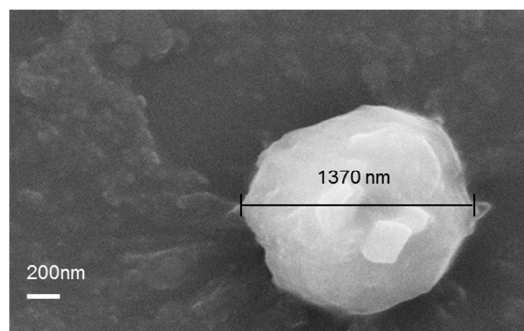
Die *A. migulanus*-Zellen wurden wie in 4.6.7 beschrieben mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde durch lichtmikroskopische Aufnahmen kontrolliert. *A. migulanus*-Zellen konnten durch dreimalige Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen werden. Anschließend wurden die Zellbestandteile mittels differenzieller Zentrifugation getrennt (siehe 4.6.8). Der Überstand nach Zentrifugation bei 7000×g hatte einen leicht orangen Schimmer und reflektierte Licht. Dieses Aussehen ist typisch für GSG-Suspensionen. DLS-Messungen des Überstandes zeigten einen mittleren Partikeldurchmesser von 150 nm-200 nm. Die im Überstand erhaltenen Partikel wurden bei 100000×g pelletiert. Der Überstand nach 100000×g enthielt keine Partikel mehr, das gesamte Material befand sich also im Pellet. Das Pellet war durchscheinend und hatte eine klebrige, wachsartige Konsistenz. Es wurde für weitere Untersuchungen in MilliQ suspendiert und mit Ultraschall behandelt.

Die so erhaltene wässrige Suspension wurde mittels REM und DLS weiter untersucht (Abbildung 29). Nach Ultraschallaufschluss erhaltene GSG hatten einen mittleren Durchmesser von 150 nm-200 nm und es waren keine Teilchen > 400 nm enthalten.



**Abbildung 29:** **A:** Größenverteilung in einer exemplarischen GSG-Suspension nach Ultraschallaufschluss, ermittelt durch DLS. **B:** REM-Aufnahme der entsprechenden GSG in 25000facher Vergrößerung.

In REM-Aufnahmen konnte zusätzlich zur Größe auch die Form der GSG betrachtet werden. Einzelne GSG hatten eine runde Form mit einem Durchmesser von ca. 200 nm. Allerdings könnten GSG durch starken Ultraschall eventuell zerstört werden und es dadurch zu einem Ausbeuteverlust kommen. In Proben von *A. migulanus*, die mit Ultraschall aufgeschlossen wurden, wurde in REM-Aufnahmen eine Zerstörung von Polyhydroxyalkanoat-Granulae beobachtet (Abbildung 30). Ähnliches könnte auch mit GSG passieren, außerdem könnten Bruchstücke der Polyhydroxyalkanoat-Granulae die GSG-Proben verunreinigen. Daher wurde der enzymatische Zellaufschluss als sanftere Alternative getestet.



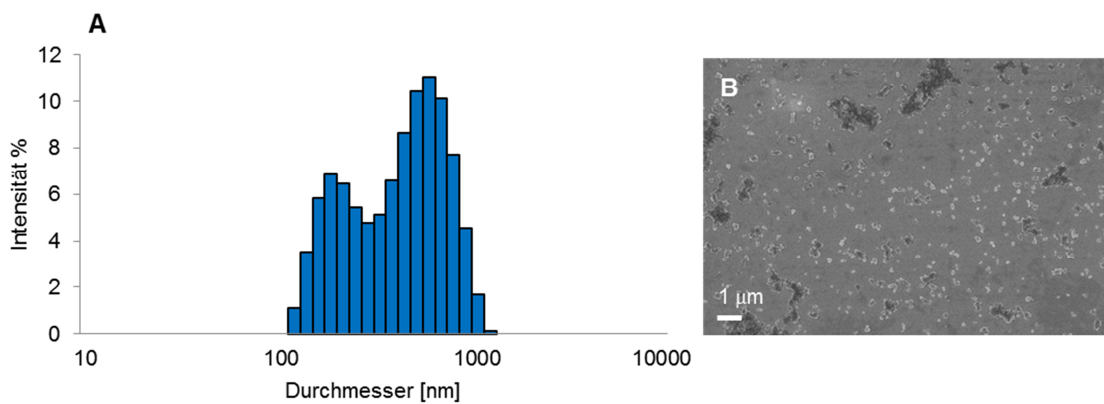
**Abbildung 30:** REM-Aufnahme eines Polyhydroxyalkanoat-Granulas aus einer mit Ultraschall aufgeschlossenen *A. migulanus* Zelle.

#### *Enzymatischer Zellaufschluss*

Der enzymatische Zellaufschluss erfolgte wie in 4.6.7 beschrieben mit Lysozym. Die Zellbestandteile wurden mittels differenzieller Zentrifugation getrennt (siehe 4.6.8). Hierbei sollten GSG, wie beim Zellaufschluss mit Ultraschall, im Überstand verbleiben. Jedoch erschien der Überstand bereits nach Zentrifugation bei 5000×g vollständig klar. Auch DLS Messungen zeigten keine Partikel, der GSG entsprechenden Größe. Nach Zentrifugation des Überstandes bei 100000×g wurde kein Pellet erhalten. Durch enzymatischen Zellaufschluss konnten also keine GSG gewonnen werden. Entweder werden GSG durch Lysozym abgebaut oder sie können durch diese Methode nicht von anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Als eine weitere Alternative zu Ultraschall oder enzymatischen Zellaufschluss wurde der Zellaufschluss mittels French-Press getestet.

### Zellaufschluss mittels French-Press

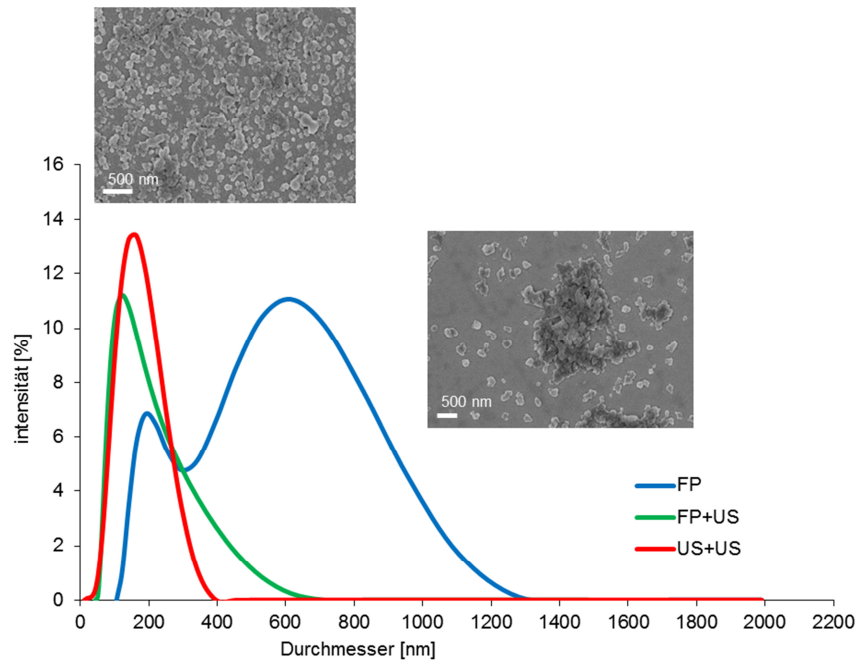
Der Zellaufschluss mittels French-Press erfolgte wie in 4.6.7 beschrieben. Wie lichtmikroskopische Aufnahmen nach dem Aufschluss zeigten, eignet sich French-Press gut um *A. migulanus*-Zellen aufzuschließen. Anders als beim Zellaufschluss mit Ultraschall war hier bei anschließender differenzieller Zentrifugation der Überstand bereits nach 5000×g fast klar. DLS- und REM-Aufnahmen des Überstandes zeigten außerdem hauptsächlich große Aggregate von GSG (Abbildung 31). Nach Zentrifugation bei 5000×g und anschließender Zentrifugation des Überstandes (100000×g) wurden im Vergleich zum Ultraschallaufschluss sehr geringe Mengen an GSG erhalten.



**Abbildung 31:** A: Größenverteilung in GSG-Suspension nach Zellaufschluss mittels French-Press, ermittelt durch DLS. B: REM Aufnahmen der entsprechenden Probe 5000fache Vergrößerung

### Einfluss von Ultraschall auf GSG

Mit Ultraschall Zellaufschluss konnten die größten Mengen an GSG gewonnen werden, daher wurde der Einfluss von Ultraschall auf GSG untersucht. GSG-Pellets die in Wasser suspendiert wurden, enthielten unabhängig von der Zellaufschlussmethode (Ultraschall oder French-Press) größere Aggregate von GSG (Abbildung 32). Eine Ultraschallbehandlung konnte diese aufbrechen. Auch Aggregate, die sich nach längerer Aufbewahrung (mehrere Tage) hochkonzentrierter GSG-Proben gebildet hatten, konnten durch Ultraschall wieder aufgebrochen werden.



**Abbildung 32:** Größenverteilung von GSG-Suspension nach Zellaufschluss mit French-Press und Suspension des erhaltenen GSG-Pellets ohne Ultraschallbehandlung (FP) und mit Ultraschallbehandlung (FP+US) sowie REM-Aufnahmen bei 25000facher Vergrößerung der selben Proben. Zum Vergleich, GSG-Suspension nach Ultraschallaufschluss und Ultraschallbehandlung der Probe (US+US).

## 7.2.2 Isolation

Zur Isolation von GSG nach dem Zellaufschluss wurden die Methoden der differentiellen- und Dichtegradienten-Zentrifugation (4.6.8) verglichen.

### *Differenzielle Zentrifugation*

Durch differenzielle Zentrifugation konnten GSG gewonnen werden. Die erhaltenen Suspensionen zeigten sich in REM-Aufnahmen oft als heterogene Mischung verschiedener Zellbestandteile und Aggregate. Dies konnte durch erneute Behandlung der Suspension mit Ultraschall und erneuter Zentrifugation bei 9000×g verbessert werden.

### *Dichtegradienten-Zentrifugation*

Zunächst mussten geeignete Materialien und Dichtegradienten zur Isolation von GSG gefunden werden. Dazu wurden verschiedene Glycerol- oder Saccharose-Gradienten getestet (siehe 4.6.8). Eine gute Trennung verschiedener Zellbestandteile wurde durch einen vierstufigen Gradienten von 95/80/70/60 % Glycerol oder 65/63/58/55 % Saccharose erhalten. Die einzelnen Schichten wurden getrennt und die GSG enthaltenden Fraktionen durch REM charakterisiert. GSG befanden sich in Schichten bei einer

Dichte von ca. 70 % Glycerol bzw. ca. 58 % Saccharose. Allerdings zeigten REM-Aufnahmen, dass andere Fraktionen Aggregate von GSG mit anderen Zellbestandteilen (z.B. Polyhydroxyalkanoat-Granulae) oder größere Aggregate aus GSG enthielten. MALDI-TOF-Messungen bestätigten, dass in jeder Fraktion GS enthalten war. Es konnten also nicht alle GSG in einer separaten Fraktion erhalten werden. Die gewonnenen Mengen an GSG waren im Vergleich zur differentiellen Zentrifugation gering. Außerdem musste durch weitere Reinigungsschritte Glycerol oder Saccharose entfernt werden, da dies die antimikrobielle Aktivität der GSG störte.

Weder differentielle Zentrifugation noch Dichtegradienten-Zentrifugation ergab völlig zufriedenstellende Ergebnisse. Da durch differentielle Zentrifugation höhere Ausbeuten erhalten wurden, wurde diese Methode bevorzugt.

### 7.2.3 Bestimmung des GS-Gehaltes

Um die biologischen Eigenschaften von GSG charakterisieren zu können war, die Kenntnis des GS-Gehaltes der Suspensionen notwendig. Im Gegensatz zu reinem GS waren GSG nicht vollständig in 50 % igem saurem EtOH löslich. Es gelang jedoch die GSG in DMSO + 0,1 % TFA in geringen Konzentrationen (< 1:5 Volumen GSG-Suspension/Volumen Lösemittel) zu lösen. Mit einer entsprechend optimierten Methode (siehe 4.7.1) konnte der GS-Gehalt der GSG mittels analytischer HPLC bestimmt werden.

Auf dieser Grundlage konnte nun der GS-Gehalt von GSG berechnet werden. GSG bestanden zu ca. 30 Gewichts% ihrer Trockenmasse aus GS. Die Kenntnis des GS-Gehaltes der GSG-Suspensionen erlaubte zudem eine Berechnung der Ausbeute in Bezug auf den berechneten GS-Gehalt der Zellkulturen, aus denen die GSG gewonnen wurden.

Die besten Ausbeuten ergaben sich für GSG, die durch Zellaufschluss mit Ultraschall und anschließende differentielle Zentrifugation, gewonnen wurden. Hier konnten Ausbeuten von ca. 10 % des Gesamt GS-Gehaltes der Zellkultur erhalten werden. Die Ausbeuten aus anderen Präparationsmethoden lagen dagegen meist bei < 2 %.

Die Ausbeuten an isotoopenmarkierten GSG waren auch nach Ultraschallaufschluss und differenzieller Zentrifugation mit  $< 2 \%$  gering. Da Zellen, die in isotoopenmarkiertem Medium wuchsen, ohnehin sehr wenig GS produzierten, war es besonders problematisch hier ausreichende Mengen GSG für weitere Analysen zu erhalten.

#### 7.2.4 Extraktion von GS aus GSG

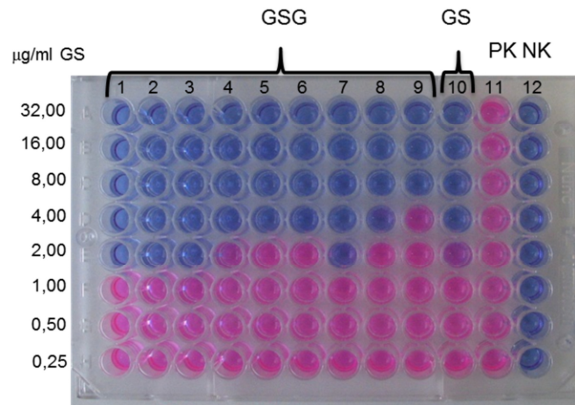
Isolierte GSG waren in 50 % saurem EtOH, das zur Extraktion von GS aus *A. migulanus* Zellkulturen verwendet wird, nicht vollständig löslich. Besonders bei Zellen, die viele GSG gebildet haben, besteht daher die Möglichkeit, dass nicht das gesamte GS aus der Zellkultur extrahiert wurde. Es wurde daher dieselbe Extraktionsmethode an GSG getestet und sowohl der Extrakt als auch das verbleibende unlösliche Pellet mittels FAB-MS auf GS untersucht. Es zeigte sich, dass GS sich hauptsächlich im Extrakt befand, während das Pellet nur Spuren von GS enthielt. Daher ist davon auszugehen, dass durch ethanolische Extraktion zwar ein Großteil, aber nicht das gesamte GS aus *A. migulanus*-Zellen extrahiert wird. Somit ist der tatsächliche GS-Gehalt in den Zellen wohl etwas höher und die Ausbeute an GSG in Bezug auf die Gesamtmenge GS folglich etwas geringer.

#### 7.2.5 Antimikrobielle Aktivität

Die Kenntnis des GS-Gehaltes von GSG erlaubt eine Untersuchung ihrer antimikrobiellen Eigenschaften in Bezug auf den GS-Gehalt. Es wurde die minimale Hemmkonzentration gegen *S. aureus* ermittelt. Manche Proben waren nicht aktiv oder zeigten zwei bis drei Wochen nach einem ersten Test keine Aktivität mehr. DLS Messungen dieser Proben zeigte starke Aggregation der GSG, was ihre fehlende Aktivität begründen könnte. In der Regel konnte die Aktivität durch Behandlung der Proben mit Ultraschall wieder hergestellt werden.

Aktive Proben zeigten eine Aktivität von 2  $\mu\text{g/ml}$ -4  $\mu\text{g/ml}$  (bezogen auf GS-Gehalt, Abbildung 33). Dieses Ergebnis konnte in neun unabhängigen Experimenten mit elf verschiedenen GSG-Proben bestätigt werden. Die antimikrobielle Aktivität isotoopenmarkierter GSG unterschied sich nicht von der nichtmarkierter. Ihre antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* ist somit vergleichbar mit der für GS.

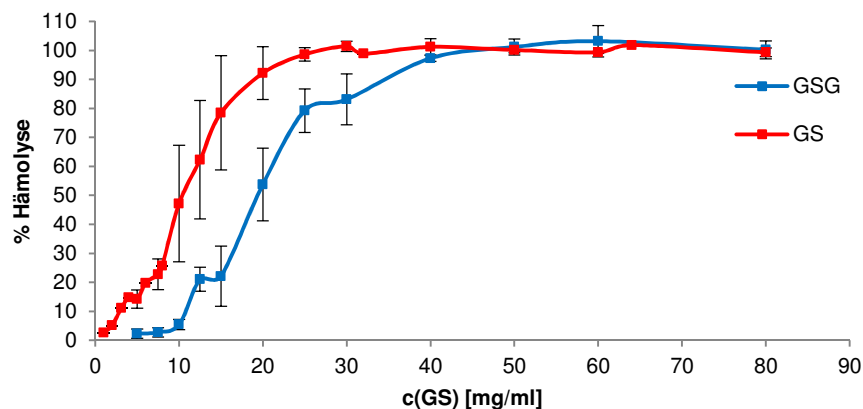




**Abbildung 33:** Beispiel für ein MHK-Experiment mit verschiedenen GSG-Proben (Reihe 1-9) im Vergleich zu GS (Reihe 10) gegen *S. aureus* DSM1104. Reihe 11 enthält kein Antibiotikum und dient somit der Positivkontrolle (PK) des Zellwachstums. Reihe 12 enthält keine Zellen und dient der Negativkontrolle (NK) zur Überprüfung der Sterilität des Mediums.

### 7.2.6 Hämolytische Aktivität

Von antimikrobiell aktiven GSG-Proben wurde zusätzlich die hämolytische Aktivität untersucht. Die Proben wurden direkt vor der Mischung frisch vorbereitet und mit Ultraschall behandelt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Aggregation zu vermeiden. Da Hämolysewerte starken Schwankungen unterliegen und stark abhängig von der jeweilig verwendeten Blutprobe sind, wurde stets eine Kontrollreihe mit GS zum Vergleich gemessen. GSG waren in allen Experimenten weniger hämolytisch aktiv als GS (Abbildung 34). Der durchschnittliche  $HC_{50}$  lag für GSG-Proben bei ca. 20 µg/ml und für GS bei ca. 12 µg/ml. Die hämolytische Aktivität isotopenmarkierter GSG war vergleichbar mit der nichtmarkierter.



**Abbildung 34:** Hämolytische Aktivität von GSG im Vergleich zu freiem GS. Es sind die Mittelwerte aus sieben (GSG) bzw. vier (GS) Proben (in vier unabhängigen Experimenten) sowie die jeweilige Standardabweichung aufgetragen.

### 7.2.7 Löslichkeit von GSG

Für nachfolgende flüssig-NMR-Studien sollte ein geeignetes Lösemittel für GSG gefunden werden. Lösungen, in denen optisch kein opaleszierender Schimmer (typische Erscheinung von GSG-Suspensionen) mehr zu erkennen war, wurden als gelöst bezeichnet (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Löslichkeit von GSG in verschiedenen Lösemitteln. Lösungen/gemische wurden in MilliQ hergestellt.

Lösemittel	Löslichkeit	Lösemittel	Löslichkeit
Aceton	-	MeOH	-
Dichlormethan	-	Trifluorethanol	-
CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1:1	-	MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat 1 M	-
CHCl <sub>3</sub> /MeOH 3:1	-	Tris 0,2 M	-
DMSO	-	KHCO <sub>3</sub> gesättigt	-
DMSO + 0,05 %-10 % TFA	✓*	EDTA 200 mM	-
DMSO + 10 % HCl (konz.)	✓	TFA	✓
Eisessig	-	HCl 1M	-
EtOH 50%	-	NaOH gesättigt	-
EtOH + 0,02 N HCl	-	Na-Cholat 0,3 M	✓
Isopropanol	-	SDS 1 %-10 %	✓
H <sub>2</sub> O	-	Triton X-100 10 %	-

Bei den meisten Lösemitteln, bei denen GSG hier als unlöslich bezeichnet wurden (z.B. CHCl<sub>3</sub>, EtOH, MeOH, HCl, NaOH), konnte eine Änderung des Aussehens der GSG-Suspension beobachtet werden. Oft blieben die GSG nach Behandlung mit einem Lösemittel nicht mehr in stabiler disperser Suspension, sondern fielen als Niederschlag aus. Das weist darauf hin, dass sich etwas an der Struktur der GSG änderte. Auch Erhitzen oder Ultraschallbehandlung führte nicht zu einer vollständigen Lösung.

## 7.3 Massenspektrometrie von GSG

Um die molekulare Zusammensetzung von GSG zu untersuchen wurden MALDI-TOF, FAB und TOF-SIMS verwendet. Zusätzlich wurde mit TOF-SIMS eine qualitative Elementaranalyse durchgeführt.

### 7.3.1 MALDI-TOF-MS

Mittels MALDI-TOF-MS wurden GSG-Suspensionen und getrocknete GSG untersucht. Im negativen Ionisierungsmodus konnten GS und verschiedene weitere Bestandteile gezeigt werden. Es ergab sich ein besonderes Massenspektrum aus Gruppen von Molekülen, die sich jeweils um eine Masse von 14 m/z unterschieden (Abbildung 35). Dies entspricht der Masse einer CH<sub>2</sub>-Einheit und deutet auf Moleküle unterschiedlicher CH<sub>2</sub>-Kettenlänge hin. Diese Moleküle wurden nicht als freie Moleküle im kleinen Massenbereich sondern nur zusätzlich zur GS-Masse gefunden. Allerdings ist die Identifikation von kleinen Massen hier ohnehin schwierig, da es zur Überlagerung mit den Signalen der Matrix kommt. Die hier gefunden Massen könnten kurzen phosphorylierten Fettsäuren wie Propionylphosphat (154 Da), Butyrylphosphat (168 Da) und Valerylphosphat (182 Da) zugeordnet werden. Eine Massendifferenz von 236 Da entspricht einer Palmitoylierung.

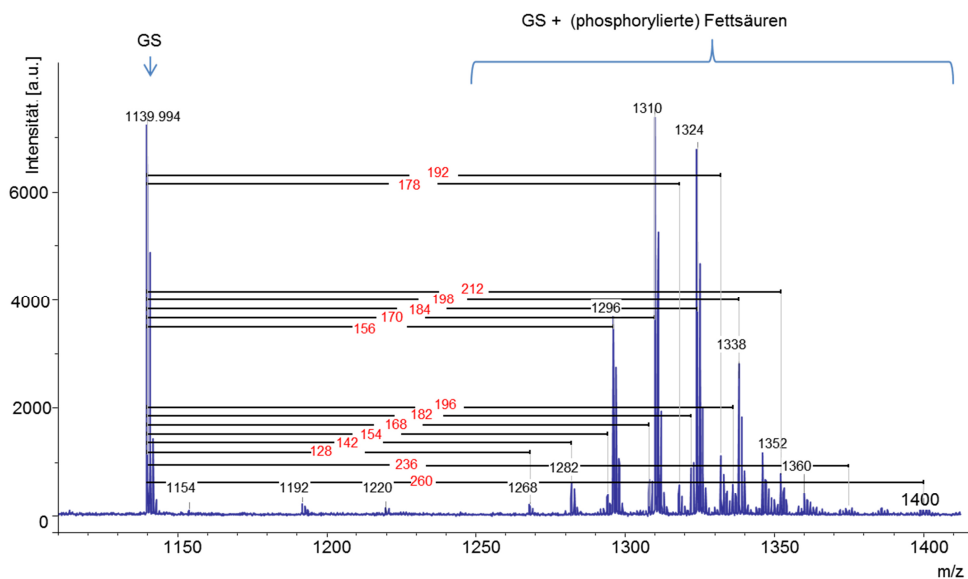


Abbildung 35: MALDI-TOF Massenspektrum von einer GSG-Suspension.

### 7.3.2 FAB-MS

FAB-MS-Aufnahmen wurde von sauren EtOH-Extrakten aus GSG gemacht. Hier wurden im negativen Ionisierungsmodus ebenfalls Massen gefunden, die kurzen phosphorylierten Fettsäuren zugehören könnten (Abbildung 36). In diesem Fall wurden diese Massen im geringen Massenbereich detektiert, nicht als Zusatz zur GS-Masse. Die Bindung an GS wurde also entweder durch die Extraktion gelöst oder die Moleküle wurden durch FAB fragmentiert. Auch hier konnte wie bei MALDI ein Muster von Gruppen mit einer Massendifferenz von  $m/z = 14$  gefunden werden. Das weist auf die Anwesenheit unterschiedlich langer Alkylketten hin, dabei handelt es sich wahrscheinlich um Acylketten von Fettsäuren.

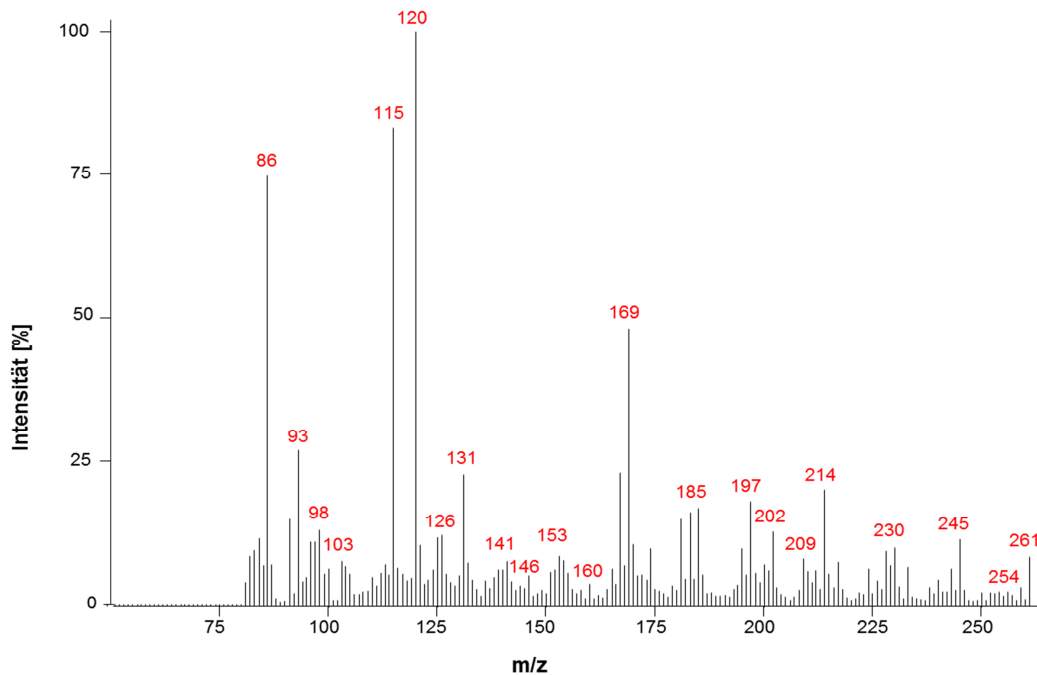


Abbildung 36: Ausschnitt eines FAB Massenspektrum eines ethanolischen Extraktes aus GSG.

### 7.3.3 TOF-SIMS

TOF-SIMS ist besonders geeignet, um anorganische Moleküle nachzuweisen und wurde daher insbesondere genutzt, um GSG auf Anwesenheit anorganischer Moleküle zu analysieren. Die Aufnahmen zeigten in GSG-Proben keine anorganischen Bestandteile außer Spuren von  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Cl^-$  (Abbildung 37). Diese stammten wahrscheinlich von in der Probe enthaltenen Salzresten aus Puffern oder äußeren Verunreinigungen der Probe Sie wurden nur als freie Ionen und nicht als Verbindungen detektiert.

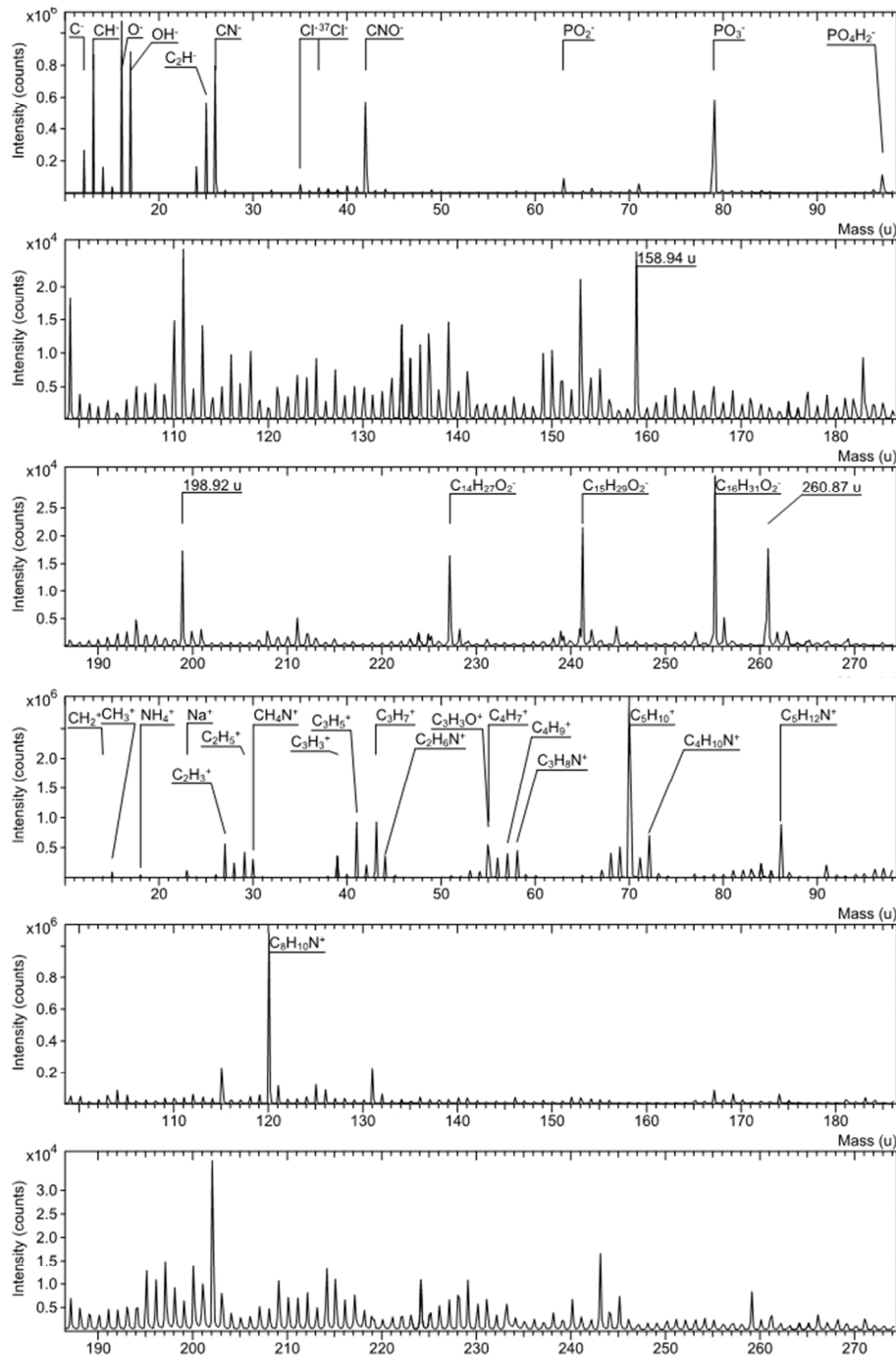


Abbildung 37: TOF-SIMS Massenspektren von getrockneten GSG.

In Bezug auf organische Verbindungen kann durch TOF-SIMS oft keine ganz eindeutige Aussage getroffen werden. So zerfallen organische Moleküle bei TOF-SIMS durch den Beschuss mit Ionen in der Regel in Fragmente. Außerdem werden Neutralteilchen nicht detektiert und es kann daher zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Durch TOF-SIMS wurden in GSG-Proben verschiedene organische Phosphatverbindungen nachgewiesen. Eindeutig zugeordnet werden konnten hier Fragmente von Aminosäuren, die dem GS zuzuordnen sind, sowie Alkylgruppen und Fettsäuren wie Myristinsäure

(Abbildung 37). Diese Ergebnisse passen zu den in MALDI und FAB gefundenen. Die Anwesenheit kurzer phosphorylierter Fettsäuren konnte nicht bestätigt werden. Allerdings ist von diesen ohnehin zu erwarten, dass sie unter TOF-SMIS-Bedingungen nicht stabil sind. Tabelle 8 zeigt eine mögliche Zuordnung der Molekülmassen, die durch verschiedene MS-Methoden gefunden wurden.

**Tabelle 8:** Mögliche Zuordnung der in GSG gefundenen Molekülmassen.

Verbindung	Chemische Formel	Molekularmasse [Da]	Methode		
			MALDI	FAB	TOF-SIMS
Gramicidin S	$C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$	1141	✓	✓	✓
Acetylphosphat	$C_2H_5O_5P$	140	✓	✓	
Propionylphosphat	$C_3H_7O_5P$	154	✓	✓	
Butyrylphosphat	$C_4H_9O_5P$	168	✓	✓	
Valerylphosphat	$C_5H_{11}O_5P$	182	✓	✓	
Myristinsäure	$C_{14}H_{28}O_2$	228		✓	✓
Pentadecansäure	$C_{15}H_{30}O_2$	242		✓	✓
Palmitinsäure	$C_{16}H_{32}O_2$	256	✓*		✓
Phosphat-Anion	$PO_4^{3-}$	95			✓

\* als Palmitoylierung

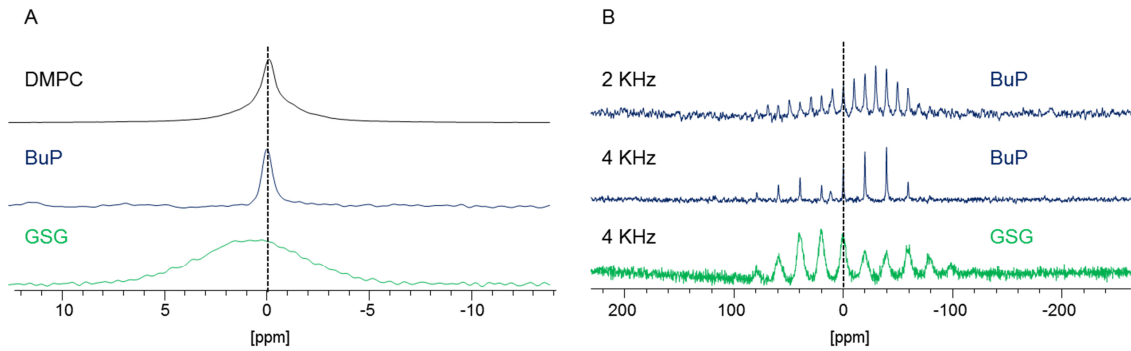
Da die Interpretation von Massenspektren nicht immer eindeutig erfolgen kann, sollte diese Theorie anhand weiterer Techniken belegt werden.

## 7.4 NMR-spektroskopische Analyse von GSG

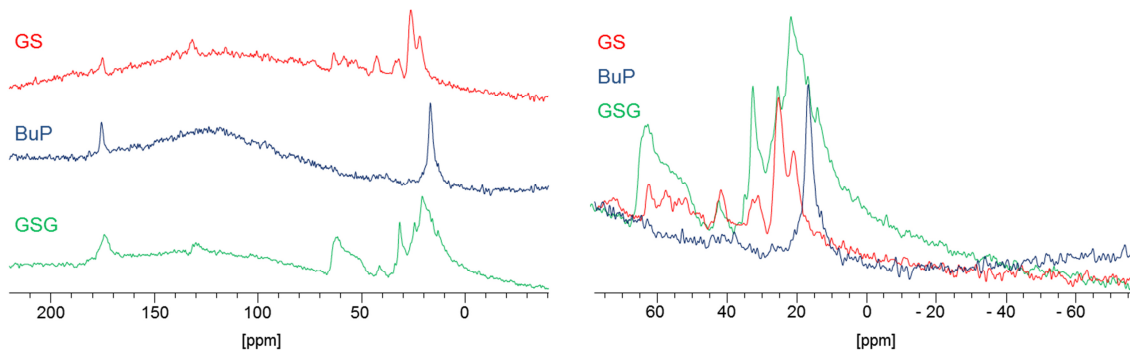
### 7.4.1 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Es wurden MAS-Festkörper-NMR-Messungen an isolierten, getrockneten GSG durchgeführt.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen zeigten eine ähnliche isotrope Position des Phosphorsignals für GSG, wie für Butyrylphosphat oder DMPC (0 ppm), die als Referenzsubstanzen verwendet wurden (Abbildung 38). Der Peak der GSG-Probe war jedoch viel breiter, daher konnte die chemische Verschiebung nicht eindeutig bestimmt werden. Es könnte sich dabei um eine Überlagerung mehrerer Signale handeln, da davon auszugehen ist, dass GSG mehrere verschiedene phosphorhaltige Spezies enthält. Die Ergebnisse bestätigen die Anwesenheit von Phosphor in den GSG. Außerdem lag die chemische Verschiebung im Bereich derer von Phospholipiden oder phosphorylierten Fettsäuren.

$^{13}\text{C}$ -NMR zeigte die für GS erwarteten und zusätzliche Signale (Abbildung 39). Durch eine Überlagerung der Spektren von GSG und GS und Skalierung auf die GS-Signale kann zugeordnet werden, welche Signale nicht zu GS gehören. Hierbei fällt zunächst eine größere Signalintensität des Carbonylsignals bei 180 ppm auf. Außerdem gibt es zusätzliche Signale zwischen 0 ppm und 70 ppm. Die einzelnen Signale sind nicht aufgelöst. Besonders auffällig ist eine hohe Signalintensität um ca. 60 ppm, ein ausgeprägtes Signal bei ca. 30 ppm sowie 20 ppm, 15 ppm und 10 ppm. Eine Überlagerung mit einem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Butyrylphosphat zeigt, dass das Signal bei ca. 15 ppm Butyrylphosphat zugehören könnte. Signale zwischen 0 ppm und 40 ppm lassen sich den Acylketten von Fettsäuren zuordnen. Die Signale im Bereich um ca. 60 ppm deuten auf C-Atome in Nachbarschaft von O-Atomen hin und könnten sich Phospholipidkopfgruppen zuordnen lassen. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass GSG Phosphat und Fettsäuren enthält. Dabei könnte es sich sowohl um phosphorylierte Fettsäuren, als auch um Phospholipide handeln. In Einklang mit den Ergebnissen der MS lässt sich sagen, dass es sich bei GSG um eine Mischung mehrerer verschiedener Moleküle handelt.



**Abbildung 38:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von getrockneten GSG im Vergleich zu Butyrylphosphat- (BuP) und DMPC-Pulver. **A:** Isotroper Peak. **B:** Vergleich des chemischen Verschiebungsanisotropie-Tensors von GSG und Butyrylphosphat. Die Isotrope Position ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.



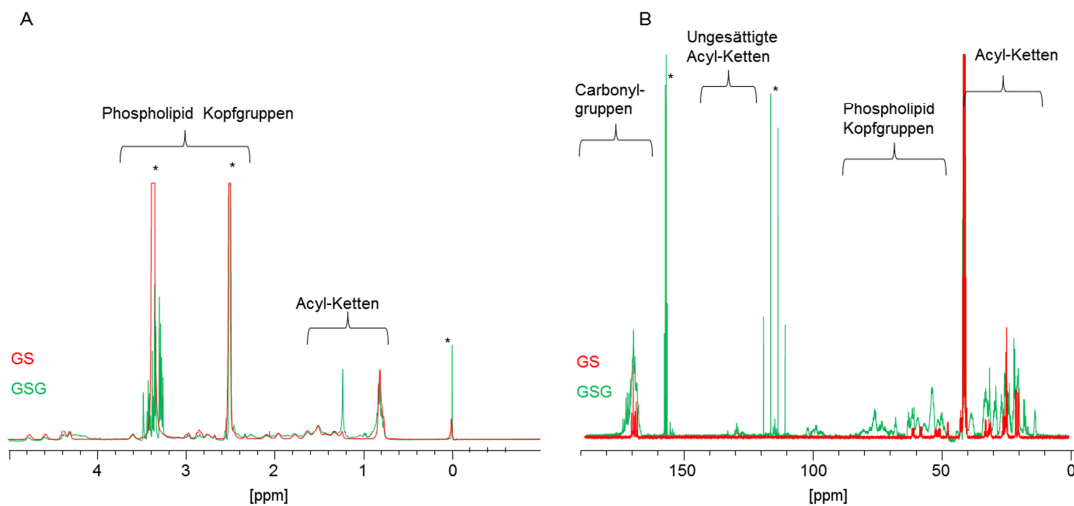
**Abbildung 39:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von getrockneten GSG im Vergleich zu GS und Butyrylphosphat- (BuP) Pulver.

#### 7.4.2 Flüssig-NMR-Spektroskopie

Um besser aufgelöste Signale als durch MAS-NMR zu erhalten und eventuell genauere Aussagen über Signalzugehörigkeiten treffen zu können, wurden flüssig-NMR-Experimente an GSG durchgeführt. Hierbei stellte die geringe Löslichkeit der GSG eine Herausforderung dar. Die besten Ergebnisse wurden durch Lösen der GSG in  $\text{DMSO-d}_6$  + 0,1 %  $\text{TFA-d}_4$  erhalten.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von GSG zeigten im Vergleich zu GS zusätzliche Signale bei 1,2 ppm sowie zwischen 3,2 ppm und 3,6 ppm (Abbildung 40). Das Signal bei 1,2 ppm könnte Acylketten von Fettsäuren zugeordnet werden. Die Signale zwischen 3,2 ppm und 3,6 ppm liegen im Bereich, in dem auch Signale für Lipidkopfgruppen zu erwarten sind. Durch die starke Überlagerung der Signale konnten keine Multipletts und somit keine genauen Signalzugehörigkeiten zugeordnet werden.



$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren konnten nur von  $^{13}\text{C}$ -markierten GSG erhalten werden. nicht-markierte GSG ergaben kein Signal. Hier sind im Spektrum von GSG im Vergleich zu  $^{13}\text{C}$ -markiertem GS mehrere zusätzliche Signalgruppen vorhanden (Abbildung 40). Signale zwischen 10 ppm und 40 ppm könnten Acylketten von Fettsäuren zugeordnet werden. Signale zwischen 50 ppm und 80 ppm könnten auf Lipidkopfgruppen hindeuten. Eine Signalgruppe um ca. 130 ppm könnte von ungesättigten Fettsäureketten stammen. Außerdem sind zusätzliche Signalintensitäten im Carbonylbereich (ca. 170 ppm) zu erkennen. Auch hier können aufgrund der geringen Signalauflösung und Überlappung der Signale keine einzelnen Signale zugeordnet werden.



**Abbildung 40:** A: flüssig- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von GSG im Vergleich zu GS, jeweils gelöst in  $\text{DMSO}_{d6} + 0,1\%$  TFA $_d$ , referenziert auf Tetramethylsilan. B: flüssig- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $^{13}\text{C}$ -markierten GSG und  $^{13}\text{C}$ -markiertem GS jeweils gelöst in  $\text{DMSO}_{d6} + 0,1\%$  TFA $_d$ . \*markieren jeweils Signale des Lösemit-tels.

## 7.5 Eigenschaften von Gramicidin S-Granulae

Ziel dieser Arbeit war es die biologischen sowie molekularen Eigenschaften von GSG zu charakterisieren. Hierzu wurden zunächst die Wachstumsbedingungen für *A. migulanus* und die Gewinnung von GSG optimiert. Die biologischen Eigenschaften von GSG wurden mittels MHK- und Hämolysetests untersucht. Erste Einblicke in die molekulare Zusammensetzung von GSG wurden durch Massenspektrometrie und NMR gewonnen.

### *Optimierung der Wachstumsbedingungen zur Produktion von GSG*

Das Zellwachstum und die GS-Syntheseaktivität von *A. migulanus* sind wichtig für die GS-Synthese und Bildung von GSG. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen im mittelgroßen Maßstab wurde der Einfluss des Inokulationsmaterials, der Zusammensetzung und des Volumens des Mediums auf das Wachstum und GS-Syntheseaktivität untersucht. Sowohl das Inokulationsmaterial, als auch die Zusammensetzung des Mediums beeinflussten das Wachstum und GS-Syntheseaktivität. Das Volumen der Flüssigkultur spielte im Bereich zwischen 300 ml und 500 ml eine untergeordnete Rolle. Sowohl Wachstum als auch GS-Syntheseaktivität unterlagen starken Schwankungen. Das hängt vermutlich damit zusammen, dass das Inokulationsmaterial durch Suspendieren von Zellkolonien in Medium gewonnen wurde und daher heterogen sein kann. Hier wurden für Kulturen, die im gleichen Medium unter gleichen Bedingungen gewachsen sind, starke Unterschiede gefunden, die wahrscheinlich auf unterschiedliche Qualität des Inokulats zurückzuführen sind. Die Qualität des Inokulationsmaterials schien das Zellwachstum und die Syntheseaktivität besonders stark zu beeinflussen. Die beste GS-Syntheseaktivität wurde durch Inokulation mit fünf Tage alten Kolonien in G4/4FM Medium erhalten. Eine Zellkulturdauer von 36 h-40 h ist empfehlenswert, da die Zellen hier schon große Mengen an GSG produzieren und noch nicht zu viele Zellen absterben. Um ein längeres Zellwachstum und so eventuell eine höhere Ausbeute an GSG zu ermöglichen, ohne dass die Zellen absterben, könnte dem Medium ein Puffer (z.B. Tris wie in GATF-Medium) zugesetzt werden, der den pH-Wert stabil hält.

Durch Anzucht von *A. migulanus* in GATF Medium konnten isoto­penmarkierte GSG für spätere NMR-Messungen erhalten werden. Allerdings produzierten die Bakterien in diesem Medium nur sehr wenig GS. Folglich konnten aus diesen Zellen auch nur wenige GSG erhalten werden. Der Zusatz von weiteren isoto­penmarkierten Aminosäuren insbesondere Arginin könnte die GS-Syntheseaktivität erhöhen, wäre aber mit erheblichen Kosten verbunden<sup>96,217</sup>.

#### *Bewertung der Gewinnungsmethoden von GSG*

Die Ausbeute an reinen GSG wurde als Kriterium für die Eignung verschiedener Gewinnungsmethoden zugrunde gelegt. Zum Zellaufschluss von *A. migulanus* eigneten sich sowohl Ultraschall als auch French-Press. Es bestanden jedoch erhebliche Unterschiede in der Qualität und Ausbeute der erhaltenen GSG. Die Ausbeute an GSG war, in Bezug auf den GS-Gehalt des Ausgangsmaterials, nach Zellaufschluss mit French-Press wesentlich geringer als nach Zellaufschluss mit Ultraschall. DLS-Messungen zeigten, dass Suspensionen, die nach Zellaufschluss mit French-Press gewonnen wurden, größere Teilchen enthielten, als die nach Ultraschallaufschluss gewonnenen. REM-Aufnahmen bestätigten, dass es sich dabei um größere Aggregate von GSG handelte. GSG werden nahe der Zellmembran gebildet und können an der Membran oder anderen Zellbestandteilen anhaften<sup>106</sup> (Abbildung 9). Beim Zellaufschluss mit French-Press werden sie nicht von diesen getrennt. Aggregate aus GSG oder an anderen Zellbestandteilen anhaftende GSG gehen bei anschließender differenzieller oder Dichtegradienten-Zentrifugation verloren.

DLS-Messungen einer Probe vor und nach Behandlung mit Ultraschall zeigten eine Verringerung des Partikeldurchmessers. In REM-Aufnahmen von Proben vor Ultraschallbehandlung waren große Aggregate zu erkennen. Nach Ultraschallbehandlung wurde eine insgesamt homogene Suspension erhalten. Ultraschall scheint nötig zu sein, um GSG von anderen Zellbestandteilen zu trennen und Aggregate aufzubrechen. GSG-Suspensionen, die größere Aggregate enthielten, waren zudem nicht antimikrobiell aktiv. Nach einer Behandlung dieser Suspensionen mit Ultraschall zeigten sie jedoch Aktivität. Das deutet darauf hin, dass GSG als große Aggregate ihre Aktivität verlieren.

Um die GSG von anderen Zellbestandteilen zu isolieren, eignen sich die Methoden der differentiellen und der Dichtegradienten-Zentrifugation. Durch differentielle Zentrifugation konnten größere Mengen GSG erhalten werden. Es waren jedoch mehrere Aufreinigungsschritte notwendig, um homogene Proben zu erhalten. Die Dichtegradienten-Zentrifugation resultierte in sehr geringen Ausbeuten an GSG. Dies könnte der Aggregation der GSG sowie dem großen Materialverlust bei Trennung der Schichten und den anschließend notwendigen Waschschritten geschuldet sein. Dichtegradienten-Zentrifugation verspricht allerdings eine bessere Trennung der GSG von anderen Zellbestandteilen und somit weniger Kontaminationen der Proben.

Die besten Ausbeuten ergaben sich für GSG, die durch Zellaufschluss mit Ultraschall und anschließende differentielle Zentrifugation, gewonnen wurden. Es konnten jedoch nur ca. 10 % des Gesamt-GS-Gehaltes der *A. migulanus* Zellkultur in Form von GSG erhalten werden. Mikroskopische Aufnahmen Fluoreszenz-gefärbter GSG legen nahe, dass die Zellen GS intrazellulär in GSG speichern. Wahrscheinlich sind in den Zellen mehr GSG vorhanden, als mit den hier vorgestellten Methoden isoliert werden können. Dies zeigt die Notwendigkeit einer Verbesserung der Isolationsmethoden. Eine Möglichkeit gute Ausbeuten an reinen GSG zu erhalten wäre möglicherweise die Kombination verschiedener Techniken. So könnten durch differentielle Zentrifugation zunächst größere Bestandteile abgetrennt und die resultierenden Suspensionen durch anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation weiter aufgereinigt werden. Es bietet sich zudem an, die Suspension vor der Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ultraschall zu behandeln um Aggregate von GSG zu trennen. Auch die einzelnen Fraktionen nach Dichtegradienten-Zentrifugation sollten nochmals mit Ultraschall behandelt werden.

Die Ausbeuten unterschieden sich auch unabhängig von der Gewinnungsmethode erheblich. So konnten zum Teil auch durch Zellaufschluss mit Ultraschall und differentielle Zentrifugation lediglich Ausbeuten < 3 % erhalten werden. Das legt nahe, dass nicht nur die Gewinnungsmethode der GSG, sondern auch die Zellkultur, aus der die GSG gewonnen werden, starken Einfluss auf die Ausbeute an GSG hat. So sollten auch weitere Verbesserungen der Wachstumsbedingungen im mittleren Maßstab sowie die Eignung anderer *A. migulanus* Phänotypen zur Gewinnung von GSG geprüft werden.

### *Biologische Aktivität von GSG*

Die biologische Aktivität von GSG im Vergleich zu GS wurde durch MHK-Tests gegen *S. aureus* und Hämolysetests an menschlichen Erythrozyten untersucht.

GSG haben eine mit GS vergleichbare antimikrobielle Aktivität, sind aber gleichzeitig weniger hämolytisch aktiv. Die Selektivität von GSG ist also höher als die von GS. Der therapeutische Index ( $HC_{50}/MHK$  <sup>218</sup>) von GSG liegt zwischen 10-5 und der für GS zwischen 6-3. Diese Beobachtung überrascht. In GS- und GSG-Probelösungen gleicher GS-Konzentration sollte die Anzahl an GS-Molekülen ungefähr gleich sein, allerdings sind im Fall von GSG die Moleküle nicht frei sondern als große Aggregate von GS mit anderen Molekülen wie z.B. (phosphorylierten) Fettsäuren oder Phospholipiden vorhanden. Die GSG haben einen mittleren Durchmesser von ca. 200 nm und somit ein Volumen von ca.  $4,2 \cdot 10^6 \text{ nm}^3$  im Vergleich dazu hat ein GS-Molekül ein Volumen von ca.  $1,4 \text{ nm}^3$  <sup>219</sup>. Ein GSG-Teilchen kann also hunderttausende GS Moleküle enthalten, die sich wahrscheinlich nicht nur an der Oberfläche des GSGs sondern auch im Inneren befinden. Somit sind weitaus weniger GS-Moleküle zugänglich als in gelöstem GS.

Auch im Vergleich zu Aggregaten anderer AMP verhalten sich GSG unerwartet. Von einigen AMP wie Dermaseptin, Melittin, LL37 und auch KIGAKI ist bekannt, dass sie in hohen Konzentrationen bereits in Lösung Aggregate ausbilden <sup>92,220-222</sup>. Auch GS selbst neigt in hohen Peptidkonzentrationen zur Aggregation. Diese Aggregate weisen oft eine geringere antimikrobielle Aktivität, insbesondere gegen gramnegative Bakterien auf. Gleichzeitig verlieren sie ihre Selektivität und zeigen höhere hämolytische Aktivität als die nicht-aggregierten Peptide. Die höhere hämolytische Aktivität wird einer hohen lokalen Konzentration des Peptides zugeschrieben <sup>223</sup>. Außerdem sind die Aggregate in der Regel hydrophober als die freien Peptide und interagieren daher stärker mit Phosphatidycholin eukaryotischer Membranen, als mit den negativ geladenen Kopfgruppen bakterieller Membranen <sup>223,224</sup>. GSG zeigen ein gegenteiliges Verhalten, die antimikrobielle Aktivität bleibt erhalten während die hämolytische Aktivität sinkt. Dabei wäre auch für GSG eine erhöhte Hydrophobizität und damit größere Affinität für eukaryotische Membranen im Vergleich zu GS zu erwarten.

GSG bestehen im Gegensatz zu oben beschriebenen Peptidaggregaten jedoch nicht nur aus Peptid, sondern auch aus anderen Komponenten. Es konnte in mehreren Experimenten die Anwesenheit von Alkanen und/oder Alkanderivaten sowie Fettsäuren bestätigt werden. MALDI-TOF gab außerdem Hinweise darauf, dass diese an GS gebunden sein

könnten. Die Selektivität von GSG unterscheidet sich jedoch von der acylierter AMPs. Eine systematische Studie der Aktivität von acylierten Dermaseptin-Derivaten zeigte beispielweise, dass kurze Acylketten (z.B. C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>) die cytotoxische Aktivität der Peptide vermindern, längere Ketten sie aber drastisch erhöhen<sup>225</sup>. Die antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* wurde von kurzen Ketten verringert, während längere (bis C<sub>8</sub>) sie erhöhten. Ab einer Acylkettenlänge von C<sub>8</sub> nahm die Aktivität ab und ging schließlich für C<sub>14</sub> und C<sub>16</sub> komplett verloren (> 50 µM). Auch hier liegt eine mögliche Erklärung in der Bildung hydrophober Aggregate, die bevorzugt mit Phosphatidycholin interagieren und aufgrund der hohen lokalen Peptidkonzentration zytotoxisch wirken. In GSG wurden sowohl kurze als auch lange Fettsäuren (z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure) gefunden. So sollte auch hier die Hydrophobizität und folglich die Affinität für eukaryotische Membranen verstärkt sein, was allerdings nicht beobachtet wurde.

GSG zeigen also ein völlig anderes Verhalten als vergleichbare Aggregate von (acylierten) AMP. Eine Rolle könnte dabei eine höhere Affinität von GS für negativ geladene Phospholipide im Vergleich zu phosphorylierten Fettsäuren spielen. In Gegenwart dieser könnte die elektrostatische Wechselwirkung zwischen GS und phosphorylierten Fettsäuren aufgehoben werden. Ohne genauere Kenntnis der molekularen Zusammensetzung und Struktur von GSG lässt sich der Grund für ihre einzigartige Wirkungsweise sowie den ihr liegenden Wirkmechanismus jedoch nicht festlegen.

#### *Molekulare Zusammensetzung von GSG*

Massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Untersuchungen von GSG bestätigten, dass GSG sowohl GS als auch Phosphat enthalten. Außerdem gab es Hinweise auf die Anwesenheit von Fettsäuren mit verschiedenen langen gesättigten Acylketten.

Mittels TOF-SIMS konnten die Fettsäuren C14:0, C15:0 und C16:0, nachgewiesen werden. Mit MALDI-TOF-MS wurden Addukte von GS und Fettsäuren gefunden. Zum Beispiel lieferte MALDI-TOF Hinweise auf eine mögliche Palmitoylierung von GS. Zudem wurden sowohl in MALDI-TOF- als auch in FAB-MS Massen, die zu denen kurzer phosphorylierter Fettsäuren (z.B. Propionylphosphat, Butyrylphosphat etc.) passen, gefunden.

Auch flüssig- und Festkörper-NMR-Spektren von GSG wiesen Signale von Fettsäureketten auf. Ein breites <sup>31</sup>P-NMR-Signal deutete auf die Anwesenheit verschiedener phosphathaltiger Moleküle hin. Zusätzlich waren in den <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Spektren Signale vorhanden, die zu Phospholipid-Kopfgruppen passen. GSG könnten also sowohl kurze

phosphorylierte Fettsäuren als auch Phospholipide enthalten. Es ist bekannt, dass GS Phospholipide bindet. Durch die Komplexbildung von GS mit Phospholipiden wird die Konzentration an freiem GS in der Produzentenzelle gesenkt<sup>226</sup>. Die Zellmembran von *A. migulanus* besteht hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin<sup>227</sup>. Dabei bindet GS durch die elektrostatische Wechselwirkung bevorzugt an Phosphatidylglycerol und Cardiolipin<sup>228</sup>. Zugabe von GS zu DMPG-Vesikeln schützt das Lipid sogar vor Hydrolyse<sup>229</sup>. Auf ähnliche Weisen könnte es auch phosphorylierte Fettsäuren vor De-phosphorylierung schützen.

Das Löslichkeitsverhalten von GSG ist anders als es von den einzelnen Bestandteilen zu erwarten wäre. GS ist z.B. gut in EtOH und DMSO löslich. Butyrylphosphat ist wasserlöslich. Fettsäuren sind z.B. in CHCl<sub>3</sub> löslich. Die Bindung an GS könnte das Löslichkeitsverhalten der anderen Bestandteile verändern. Das Ausfallen eines Niederschlages nach Behandlung mit z.B. CHCl<sub>3</sub>/MeOH oder EtOH deutet auf eine Zerstörung dieser Struktur hin. GSG verhalten sich anders, als eine einfache Summe der hier gefundenen Komponenten, sie könnten weitere, noch nicht identifizierte, schwerlösliche Bestandteile enthalten.

Insbesondere aufgrund ihrer Größe ist ein mehrschichtiger Aufbau von GSG vorstellbar, in dem phosphorylierte Fettsäuren und Phospholipide sowohl über hydrophobe als auch ionische Wechselwirkungen an GS binden. Dies könnte die hohe Stabilität von GSG erklären. Durch die Aggregation von GS könnte die Konzentration von löslichem GS in der Produzentenzelle gesenkt werden, was eine schützende Funktion haben könnte und den Bakterien erlaubt große Mengen eines antimikrobiellen Peptides zu produzieren. Andererseits könnten GSG als Energiespeicher fungieren.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob Phospholipide bereits in den GSG in intakten Bakterienzellen vorhanden sind oder ob es sich um Membranfragmente handelt, die beim Zellaufschluss entstanden und sich an die GSG anlagern. In *B. subtilis*-Zellen konnten Cardiolipin oder Phosphatidylethanolamin durch selektive Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden<sup>230,231</sup>. Dies könnte auch für *A. migulanus* getestet werden. So könnte gezeigt werden, ob Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin in GSG akkumulieren. 2D-NMR-Spektroskopie könnte die Zuordnung der einzelnen Signale zu Molekülen erleichtern. Durch Abstandsmessungen zwischen <sup>31</sup>P der Phosphatgruppen und <sup>15</sup>N des Ornithins in GS könnte eine Bindung von Phospholipiden oder phosphorylierten Fettsäuren an GS gezeigt werden. Außerdem könnten die in GSG vorhandenen

Fettsäuren mittels Gas-Chromatographie-MS analysiert werden. Ein weiterer Schritt wäre der Versuch einer artifiziellen Rekonstitution der GSG und eine mögliche Anwendung auf andere Peptide um deren biologische Aktivität zu verbessern.



## 7 Literatur

- (1) Kaushik, D.; Mohan, M.; Borade, D. M.; Swami, O. C. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **2014**, 8, Me01.
- (2) Singh, S. B. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, 24, 3683.
- (3) Tanwar, J.; Das, S.; Fatima, Z.; Hameed, S. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* **2014**, 2014, 7.
- (4) Aminov, R. I. *Frontiers in microbiology* **2010**, 1, 134.
- (5) Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. G. *Clin Orthop Relat Res* **2005**, 439, 23.
- (6) Fleming, A. *Rev Infect Dis* **1980**, 2, 129.
- (7) Walsh, C. T.; Wencewicz, T. A. *J Antibiot (Tokyo)* **2014**, 67, 7.
- (8) Silver, L. L. *Clin Microbiol Rev* **2011**, 24, 71.
- (9) Mehta, K. C.; Dargad, R. R.; Borade, D. M.; Swami, O. C. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **2014**, 8, Me05.
- (10) Rice, L. B. *Journal of Infectious Diseases* **2008**, 197, 1079.
- (11) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. *Clin Infect Dis* **2009**, 48, 1.
- (12) Giske, C. G.; Monnet, D. L.; Cars, O.; Carmeli, Y. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, 52, 813.
- (13) Hassan, M.; Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B.; Lotfipour, F. *J Appl Microbiol* **2012**, 113, 723.
- (14) Memish, Z. A.; Venkatesh, S.; Shibl, A. M. *Int J Antimicrob Agents* **2003**, 21, 135.
- (15) European Center for Disease Prevention and Control *Annual epidemiological report* **2013**, 199.
- (16) World Health Organization *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* **2014**.
- (17) Hancock, R. E. *Lancet* **1997**, 349, 418.
- (18) Reddy, K. V.; Yedery, R. D.; Aranha, C. *Int J Antimicrob Agents* **2004**, 24, 536.
- (19) Zasloff, M. *Nature* **2002**, 415, 389.
- (20) Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. *Clin Microbiol Rev* **2006**, 19, 491.
- (21) Li, Y.; Xiang, Q.; Zhang, Q.; Huang, Y.; Su, Z. *Peptides* **2012**, 37, 207.
- (22) Albiol Matanic, V. C.; Castilla, V. *Int J Antimicrob Agents* **2004**, 23, 382.
- (23) Robinson, W. E., Jr.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M. E. *J Leukoc Biol* **1998**, 63, 94.
- (24) De Lucca, A. J.; Walsh, T. J. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, 43, 1.
- (25) Barbault, F.; Landon, C.; Guenneugues, M.; Meyer, J. P.; Schott, V.; Dimarcq, J. L.; Vovelle, F. *Biochemistry* **2003**, 42, 14434.
- (26) Lee, D. G.; Kim, H. K.; Kim, S. A.; Park, Y.; Park, S. C.; Jang, S. H.; Hahm, K. S. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 305, 305.
- (27) Luca, V.; Olivi, M.; Di Grazia, A.; Palleschi, C.; Uccelletti, D.; Mangoni, M. L. *Cell Mol Life Sci* **2014**, 71, 2535.
- (28) Zasloff, M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, 5449.
- (29) Colgrave, M. L.; Kotze, A. C.; Huang, Y. H.; O'Grady, J.; Simonsen, S. M.; Craik, D. J. *Biochemistry* **2008**, 47, 5581.
- (30) Gaspar, D.; Veiga, A. S.; Castanho, M. A. *Frontiers in microbiology* **2013**, 4, 294.

- (31) Mader, J. S.; Hoskin, D. W. *Expert opinion on investigational drugs* **2006**, *15*, 933.
- (32) Hoskin, D. W.; Ramamoorthy, A. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 357.
- (33) Brandenburg, L.-O.; Merres, J.; Albrecht, L.-J.; Varoga, D.; Pufe, T. *Polymers* **2012**, *4*, 539.
- (34) *The antimicrobial peptide database* <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> **24.10.2014**.
- (35) *Collection of anti-microbial peptides* <http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php> **24.10.2014**.
- (36) Wang, G. *Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies*.; CABI: England, **2010**.
- (37) Boman, H. G. *Journal of internal medicine* **2003**, *254*, 197.
- (38) Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J. *Trends Biotechnol* **2011**, *29*, 464.
- (39) Dathe, M.; Wieprecht, T. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1462*, 71.
- (40) Hancock, R. E.; Patrzykat, A. *Current drug targets. Infectious disorders* **2002**, *2*, 79.
- (41) Hancock, R. E.; Rozek, A. *FEMS Microbiol Lett* **2002**, *206*, 143.
- (42) Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7235.
- (43) Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R. E. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 35714.
- (44) He, K.; Ludtke, S. J.; Worcester, D. L.; Huang, H. W. *Biophys J* **1996**, *70*, 2659.
- (45) Laver, D. R. *Biophys J* **1994**, *66*, 355.
- (46) Spaar, A.; Munster, C.; Salditt, T. *Biophys J* **2004**, *87*, 396.
- (47) Hallock, K. J.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A. *Biophys J* **2003**, *84*, 3052.
- (48) Henzler Wildman, K. A.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6545.
- (49) Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11361.
- (50) Yamaguchi, S.; Huster, D.; Waring, A.; Lehrer, R. I.; Kearney, W.; Tack, B. F.; Hong, M. *Biophys J* **2001**, *81*, 2203.
- (51) Wiesner, J.; Vilcinskas, A. *Virulence* **2010**, *1*, 440.
- (52) Melo, M. N.; Ferre, R.; Castanho, M. A. *Nat Rev Microbiol* **2009**, *7*, 245.
- (53) Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. *Pharmacol Rev* **2003**, *55*, 27.
- (54) Brogden, K. A. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 238.
- (55) Cudic, M.; Otvos, L., Jr. *Curr Drug Targets* **2002**, *3*, 101.
- (56) Powers, J. P.; Hancock, R. E. *Peptides* **2003**, *24*, 1681.
- (57) Last, N. B.; Schlamadinger, D. E.; Miranker, A. D. *Protein Sci* **2013**, *22*, 870.
- (58) Aroui, A.; Dathe, M.; Blume, A. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788*, 650.
- (59) Brogden, N. K.; Brogden, K. A. *Int J Antimicrob Agents* **2011**, *38*, 217.
- (60) Hadley, E. B.; Hancock, R. E. *Current topics in medicinal chemistry* **2010**, *10*, 1872.
- (61) Fernebro, J. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2011**, *14*, 125.
- (62) Ge, Y.; MacDonald, D. L.; Holroyd, K. J.; Thornsberry, C.; Wexler, H.; Zasloff, M. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*, 782.
- (63) Steinberg, D. A.; Hurst, M. A.; Fujii, C. A.; Kung, A. H.; Ho, J. F.; Cheng, F. C.; Loury, D. J.; Fiddes, J. C. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, *41*, 1738.
- (64) Zhang, L.; Parente, J.; Harris, S. M.; Woods, D. E.; Hancock, R. E.; Falla, T. J. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*, 2921.
- (65) Mataraci, E.; Dosler, S. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56*, 6366.
- (66) Seo, M. D.; Won, H. S.; Kim, J. H.; Mishig-Ochir, T.; Lee, B. J. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2012**, *17*, 12276.

- (67) Hancock, R. E.; Sahl, H. G. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1551.
- (68) Otvos, L., Jr.; Wade, J. D. *Frontiers in chemistry* **2014**, *2*, 62.
- (69) Marr, A. K.; Gooderham, W. J.; Hancock, R. E. *Current opinion in pharmacology* **2006**, *6*, 468.
- (70) Soravia, E.; Martini, G.; Zasloff, M. *FEBS Lett* **1988**, *228*, 337.
- (71) Latal, A.; Degovics, G.; Epand, R. F.; Epand, R. M.; Lohner, K. *Eur J Biochem* **1997**, *248*, 938.
- (72) Wieprecht, T.; Apostolov, O.; Beyermann, M.; Seelig, J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 442.
- (73) Williams, R. W.; Starman, R.; Taylor, K. M.; Gable, K.; Beeler, T.; Zasloff, M.; Covell, D. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4490.
- (74) Jackson, M.; Mantsch, H. H.; Spencer, J. H. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7289.
- (75) Bechinger, B. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1462*, 157.
- (76) Glaser, R. W.; Sachse, C.; Durr, U. H.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *J Magn Reson* **2004**, *168*, 153.
- (77) Ulmschneider, J. P.; Smith, Jeremy C.; Ulmschneider, Martin B.; Ulrich, A. S.; Strandberg, E. *Biophysical Journal* **2012**, *103*, 472.
- (78) Afonin, S.; Grage, S. L.; Ieronimo, M.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 16512.
- (79) Tremouilhac, P.; Strandberg, E.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 32089.
- (80) Mangoni, M. L.; Shai, Y. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 2267.
- (81) Wade, D.; Silberring, J.; Soliymani, R.; Heikkinen, S.; Kilpelainen, I.; Lankinen, H.; Kuusela, P. *FEBS Lett* **2000**, *479*, 6.
- (82) Rosenfeld, Y.; Barra, D.; Simmaco, M.; Shai, Y.; Mangoni, M. L. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 28565.
- (83) Heidenreich, N. *Dissertation*, Karlsruhe Institute of Technology, 2012.
- (84) Badosa, E.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Besalú, E.; Cabrefiga, J.; Bardají, E.; Montesinos, E. *Peptides* **2007**, *28*, 2276.
- (85) Eggenberger, K.; Mink, C.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S.; Nick, P. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 132.
- (86) Wadhvani, P.; Strandberg, E.; van den Berg, J.; Mink, C.; Burck, J.; Ciriello, R. A.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, 940.
- (87) Alves, C. S.; Melo, M. N.; Franquelim, H. G.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Bardaji, E.; Kowalczyk, W.; Andreu, D.; Santos, N. C.; Fernandes, M. X.; Castanho, M. A. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 27536.
- (88) Blazyk, J.; Wiegand, R.; Klein, J.; Hammer, J.; Epand, R. M.; Epand, R. F.; Maloy, W. L.; Kari, U. P. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 27899.
- (89) Lu, J. X.; Blazyk, J.; Lorigan, G. A. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 1303.
- (90) Meier, M.; Seelig, J. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 1017.
- (91) Kamimori, H.; Blazyk, J.; Aguilar, M. I. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 148.
- (92) Wadhvani, P.; Reichert, J.; Strandberg, E.; Burck, J.; Misiewicz, J.; Afonin, S.; Heidenreich, N.; Fanghanel, S.; Mykhailiuk, P. K.; Komarov, I. V.; Ulrich, A. S. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15*, 8962.
- (93) Berditsch, M.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 6620.
- (94) Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Hancock, R. E.; Hodges, R. S. *Int J Pept Protein Res* **1996**, *47*, 460.
- (95) Salgado, J.; Grage, S. L.; Kondejewski, L. H.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N.; Ulrich, A. S. *J Biomol NMR* **2001**, *21*, 191.
- (96) Berditsch, M.; Afonin, S.; Steinecker, A.; Orel, N.; Jakovkin, I.; Ulrich, A. S. *unpubliziertes Manuskript*

- (97) Maeda, T.; Takagi, M.; Imanaka, T. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1993**, *75*, 173.
- (98) Gibbs, A. C.; Kondejewski, L. H.; Gronwald, W.; Nip, A. M.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D.; Wishart, D. S. *Nat Struct Biol* **1998**, *5*, 284.
- (99) Hull, S. E.; Karlsson, R.; Main, P.; Woolfson, M. M.; Dodson, E. J. *Nature* **1978**, *275*, 206.
- (100) Xu, Y.; Sugar, I. P.; Krishna, N. R. *J Biomol NMR* **1995**, *5*, 37.
- (101) Afonin, S.; Durr, U. H.; Wadhvani, P.; Salgado, J.; Ulrich, A. S. *Top Curr Chem* **2008**, *273*, 139.
- (102) Salgado, J.; Grage, S.; Kondejewski, L.; Hodges, R.; McElhaney, R.; Ulrich, A. *Journal of Biomolecular NMR* **2001**, *21*, 191.
- (103) Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Komagata, K. *Int J Syst Bacteriol* **1996**, *46*, 939.
- (104) Takagi, H.; Shida, O.; Kadowaki, K.; Komagata, K.; Udaka, S. *Int J Syst Bacteriol* **1993**, *43*, 221.
- (105) Hoyer, K. M.; Mahlert, C.; Marahiel, M. A. *Chem Biol* **2007**, *14*, 13.
- (106) Berditsch, M.; Turkson, J.; Afonin, S.; Weber, C.; Ardakani, M. F.; Gerthsen, D.; Ulrich, A. S. *Biospektrum* **2011**, *Sonderausgabe VAAM Jahrestagung*, 221.
- (107) Hartmann, M. *Dissertation*, Karlsruhe Institute of Technology **2012**.
- (108) Serber, Z.; Dotsch, V. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14317.
- (109) Selenko, P.; Wagner, G. *Journal of structural biology* **2007**, *158*, 244.
- (110) Hu, K. N.; Tycko, R. *Biophys Chem* **2010**, *151*, 10.
- (111) Bockmann, A.; Meier, B. H. *Prion* **2010**, *4*, 72.
- (112) Ramamoorthy, A. *Solid State Nucl Magn Reson* **2009**, *35*, 201.
- (113) Baldus, M. *Eur Biophys J* **2007**, *36 Suppl 1*, S37.
- (114) Opella, S. J.; Marassi, F. M. *Chem Rev* **2004**, *104*, 3587.
- (115) Opella, S. J.; Nevzorov, A.; Mesleh, M. F.; Marassi, F. M. *Biochem Cell Biol* **2002**, *80*, 597.
- (116) Naito, A. *Solid State Nucl Magn Reson* **2009**, *36*, 67.
- (117) Hong, M. *J Phys Chem B* **2007**, *111*, 10340.
- (118) Comellas, G.; Rienstra, C. M. *Annu Rev Biophys* **2013**, *42*, 515.
- (119) Koch, K.; Afonin, S.; Ieronimo, M.; Berditsch, M.; Ulrich, A. S. *Top Curr Chem* **2012**, *306*, 89.
- (120) Afonin, S.; Glaser, R. W.; Berditchevskaja, M.; Wadhvani, P.; Guhrs, K. H.; Mollmann, U.; Perner, A.; Ulrich, A. S. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1151.
- (121) Afonin, S.; Mikhailiuk, P. K.; Komarov, I. V.; Ulrich, A. S. *J Pept Sci* **2007**, *13*, 614.
- (122) Kubyshkin, V. S.; Mykhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Org Lett* **2012**, *14*, 5254.
- (123) Mykhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Palamarchuk, G. V.; Shishkin, O. V.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 5765.
- (124) Grage, S. L.; Suleymanova, A. V.; Afonin, S.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *J Magn Reson* **2006**, *183*, 77.
- (125) Strandberg, E.; Kanithasen, N.; Tiltak, D.; Burck, J.; Wadhvani, P.; Zwernemann, O.; Ulrich, A. S. *Biochemistry* **2008**, *47*, 2601.
- (126) Wadhvani, P.; Strandberg, E.; Heidenreich, N.; Burck, J.; Fanghanel, S.; Ulrich, A. S. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 6512.
- (127) Strandberg, E.; Tiltak, D.; Ehni, S.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818*, 1764.
- (128) Strandberg, E.; Zerweck, J.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *Biophys J* **2013**, *104*, L9.

- (129) Tremouilhac, P.; Strandberg, E.; Wadhwani, P.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 1330.
- (130) Auger, M. *Curr Issues Mol Biol* **2000**, *2*, 119.
- (131) Park, S. H.; Das, B. B.; De Angelis, A. A.; Scrima, M.; Opella, S. J. *J Phys Chem B* **2010**, *114*, 13995.
- (132) Grage, S. L.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. *Methods Mol Biol* **2010**, *618*, 183.
- (133) Strandberg, E.; Wadhwani, P.; Tremouilhac, P.; Durr, U. H.; Ulrich, A. S. *Biophys J* **2006**, *90*, 1676.
- (134) Ulrich, A. S. *Biosci Rep* **2002**, *22*, 129.
- (135) Fuller, N.; Rand, R. P. *Biophysical Journal* **2001**, *81*, 243.
- (136) Kooijman, E. E.; Chupin, V.; Fuller, N. L.; Kozlov, M. M.; de Kruijff, B.; Burger, K. N. J.; Rand, P. R. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2097.
- (137) Lamy-Freund, M. T.; Riske, K. A. *Chem Phys Lipids* **2003**, *122*, 19.
- (138) Riske, K. A.; Amaral, L. Q.; Lamy-Freund, M. T. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1511*, 297.
- (139) Boggs, J. M. *Biochim Biophys Acta* **1987**, *906*, 353.
- (140) Eibl, H.; Woolley, P. *Biophys Chem* **1979**, *10*, 261.
- (141) Vogt, T. C.; Bechinger, B. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 29115.
- (142) Escriba, P. V.; Gonzalez-Ros, J. M.; Goni, F. M.; Kinnunen, P. K.; Vigh, L.; Sanchez-Magraner, L.; Fernandez, A. M.; Busquets, X.; Horvath, I.; Barcelo-Coblijn, G. *Journal of cellular and molecular medicine* **2008**, *12*, 829.
- (143) Borovyagin, V. L.; Sabelnikov, A. G. *Electron microscopy reviews* **1989**, *2*, 75.
- (144) Goni, F. M. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, 1467.
- (145) Nicolson, G. L. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, 1451.
- (146) Verkleij, A. J.; Zwaal, R. F.; Roelofsen, B.; Comfurius, P.; Kastelijn, D.; van Deenen, L. L. *Biochim Biophys Acta* **1973**, *323*, 178.
- (147) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Lehrbuch der Biochemie*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2002**.
- (148) Cypionka, H. *Grundlagen der Mikrobiologie*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2010**.
- (149) Sutcliffe, I. C.; Shaw, N. *J Bacteriol* **1991**, *173*, 7065.
- (150) Asselineau, J.; Lederer, E. *Nature* **1950**, *166*, 782.
- (151) Chambers, H. F.; Moreau, D.; Yajko, D.; Miick, C.; Wagner, C.; Hackbarth, C.; Kocagoz, S.; Rosenberg, E.; Hadley, W. K.; Nikaido, H. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**, *39*, 2620.
- (152) Ojha, A. K.; Baughn, A. D.; Sambandan, D.; Hsu, T.; Trivelli, X.; Guerardel, Y.; Alahari, A.; Kremer, L.; Jacobs, W. R., Jr.; Hatfull, G. F. *Mol Microbiol* **2008**, *69*, 164.
- (153) Karakousis, P. C.; Bishai, W. R.; Dorman, S. E. *Cellular microbiology* **2004**, *6*, 105.
- (154) Matteelli, A.; Roggi, A.; Carvalho, A. C. *Clinical epidemiology* **2014**, *6*, 111.
- (155) Sotgiu, G.; Migliori, G. B. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **2014**.
- (156) Lan, Y.; Lam, J. T.; Siu, G. K.; Yam, W. C.; Mason, A. J.; Lam, J. K. *Tuberculosis (Edinb)* **2014**.
- (157) Rodriguez, A.; Villegas, E.; Montoya-Rosales, A.; Rivas-Santiago, B.; Corzo, G. *PLoS One* **2014**, *9*, e101742.
- (158) Padhi, A.; Sengupta, M.; Sengupta, S.; Roehm, K. H.; Sonawane, A. *Tuberculosis (Edinb)* **2014**, *94*, 363.
- (159) Ieronimo, M.; Afonin, S.; Koch, K.; Berditsch, M.; Wadhwani, P.; Ulrich, A. S. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 8822.

- (160) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. *J Biol Chem* **1957**, 226, 497.
- (161) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Can J Biochem Physiol* **1959**, 37, 911.
- (162) Ames, B. N. *Methods in Enzymology* **1966**, 8, 115.
- (163) d'Espinose de Lacaillerie, J.-B.; Jarry, B.; Pascui, O.; Reichert, D. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **2005**, 28, 225.
- (164) Krahn, A.; Priller, U.; Emsley, L.; Engelke, F. *Journal of Magnetic Resonance* **2008**, 191, 78.
- (165) Glaser, R. W.; Ulrich, A. S. *J Magn Reson* **2003**, 164, 104.
- (166) Levitt, M. H.; Suter, D.; Ernst, R. R. *The Journal of Chemical Physics* **1986**, 84, 4243.
- (167) Nevzorov, A. A.; Opella, S. J. *J Magn Reson* **2003**, 164, 182.
- (168) Nevzorov, A. A.; Opella, S. J. *J Magn Reson* **2007**, 185, 59.
- (169) Azuma, T.; Harrison, G. I.; Demain, A. L. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1992**, 38, 173.
- (170) Touboul, D.; Brunelle, A.; Lapr evote, O. *Biochimie* **2011**, 93, 113.
- (171) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliott, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. *Analytical Chemistry* **1982**, 54, 645A.
- (172) Barnes, T. J.; Kempson, I. M.; Prestidge, C. A. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 417, 61.
- (173) Afonin, S.; Glaser, R. W.; Sachse, C.; Salgado, J.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *Biochim Biophys Acta* **2014**, 1838, 2260.
- (174) Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2004**, 23A, 89.
- (175) Glaser, R. W.; Sachse, C.; Durr, U. H.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Biophys J* **2005**, 88, 3392.
- (176) Lohner, K.; Prenner, E. J. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1462, 141.
- (177) McElhaney, R. N. *Chem Phys Lipids* **1982**, 30, 229.
- (178) McElhaney, R. N. *Biochim Biophys Acta* **1986**, 864, 361.
- (179) Lewis, R. N.; Mak, N.; McElhaney, R. N. *Biochemistry* **1987**, 26, 6118.
- (180) Hallock, K. J.; Henzler Wildman, K.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A. *Biophys J* **2002**, 82, 2499.
- (181) LoGrasso, P. V.; Moll, F., 3rd; Cross, T. A. *Biophys J* **1988**, 54, 259.
- (182) Marassi, F. M.; Crowell, K. J. *J Magn Reson* **2003**, 161, 64.
- (183) Burck, J.; Roth, S.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Kanithasen, N.; Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Biophys J* **2008**, 95, 3872.
- (184) He, K.; Ludtke, S. J.; Huang, H. W.; Worcester, D. L. *Biochemistry* **1995**, 34, 15614.
- (185) Marsh, D.; Jost, M.; Peggion, C.; Toniolo, C. *Biophys J* **2007**, 92, 473.
- (186) Olah, G. A., Huang H. W. *J. Chem. Phys.* **1988**, 89, 2531.
- (187) Salditt, T. *Curr Opin Struct Biol* **2003**, 13, 467.
- (188) Salditt, T.; Li, C.; Spaar, A. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1758, 1483.
- (189) Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2004**, Volume 23A, 89.
- (190) Wu, Y.; Huang, H. W.; Olah, G. A. *Biophys J* **1990**, 57, 797.
- (191) Yang, L.; Harroun, T. A.; Heller, W. T.; Weiss, T. M.; Huang, H. W. *Biophys J* **1998**, 75, 641.
- (192) Afonin, S.; Frey, A.; Bayerl, S.; Fischer, D.; Wadhvani, P.; Weinkauff, S.; Ulrich, A. S. *Chemphyschem* **2006**, 7, 2134.
- (193) Grage, S. L.; Afonin, S.; Grune, M.; Ulrich, A. S. *Chem Phys Lipids* **2004**, 132, 65.

- (194) Grasnack, D.; Sternberg, U.; Strandberg, E.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. *Eur Biophys J* **2011**, *40*, 529.
- (195) Muhle-Goll, C.; Hoffmann, S.; Afonin, S.; Grage, S. L.; Polyansky, A. A.; Windisch, D.; Zeitler, M.; Burck, J.; Ulrich, A. S. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 26178.
- (196) Rainey, J. K.; Sykes, B. D. *Biophys J* **2005**, *89*, 2792.
- (197) Wadhvani, P.; Burck, J.; Strandberg, E.; Mink, C.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 16515.
- (198) Dave, P. C.; Billington, E.; Pan, Y.-L.; Straus, S. K. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 2434.
- (199) Mikhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Chernega, A. N.; Rusanov, E. B.; Platonov, M. O.; Dubinina, G. G.; Berditsch, M.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 5659.
- (200) Aggeli, A.; Bell, M.; Carrick, L. M.; Fishwick, C. W.; Harding, R.; Mawer, P. J.; Radford, S. E.; Strong, A. E.; Boden, N. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 9619.
- (201) Andreev, O. A.; Engelman, D. M.; Reshetnyak, Y. K. *Mol Membr Biol* **2010**, *27*, 341.
- (202) Hu, F.; Schmidt-Rohr, K.; Hong, M. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 3703.
- (203) Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C., Jr. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56*, 967.
- (204) Lorieau, J. L.; Louis, J. M.; Schwieters, C. D.; Bax, A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 19994.
- (205) Lowik, D. W.; Leunissen, E. H.; van den Heuvel, M.; Hansen, M. B.; van Hest, J. C. *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 3394.
- (206) Subbarao, N. K.; Parente, R. A.; Szoka, F. C., Jr.; Nadasdi, L.; Pongracz, K. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2964.
- (207) Whitaker, J. R.; Feeney, R. E. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1983**, *19*, 173.
- (208) d'Espinose de Lacaillerie, J. B.; Jarry, B.; Pascui, O.; Reichert, D. *Solid State Nucl Magn Reson* **2005**, *28*, 225.
- (209) Trapp, M.; Gutberlet, T.; Juranyi, F.; Unruh, T.; Deme, B.; Tehei, M.; Peters, J. *J Chem Phys* **2010**, *133*, 164505.
- (210) Seto, G. W.; Marwaha, S.; Kobewka, D. M.; Lewis, R. N.; Separovic, F.; McElhaney, R. N. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768*, 2787.
- (211) Zhang, Y.; Lewis, R. N.; McElhaney, R. N.; Ryan, R. O. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3942.
- (212) Zhang, Y. P.; Lewis, R. N.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N. *Biochemistry* **2001**, *40*, 474.
- (213) Macomber, R. S. *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1998**.
- (214) Biological Magnetic Resonance Data Bank:  
[http://www.bmrb.wisc.edu/ref\\_info/statsel.htm#2](http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm#2) ,**17.10.2014**.
- (215) Sood, R.; Kinnunen, P. K. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 1460.
- (216) David Wu, J. H.; Yang, L.; Demain, A. L. *Journal of Biotechnology* **1984**, *1*, 81.
- (217) Nimi, O.; Kubota, H.; Sugiyama, M. *J Antibiot (Tokyo)* **1982**, *35*, 615.
- (218) Groner, B. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1123.
- (219) Erickson, H. P. *Biological procedures online* **2009**, *11*, 32.
- (220) Kustanovich, I.; Shalev, D. E.; Mikhlin, M.; Gaidukov, L.; Mor, A. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 16941.
- (221) Oren, Z.; Lerman, J. C.; Gudmundsson, G. H.; Agerberth, B.; Shai, Y. *Biochem J* **1999**, *341* ( Pt 3), 501.
- (222) Oren, Z.; Shai, Y. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6103.

- 
- (223) Ghosh, J. K.; Shaool, D.; Guillaud, P.; Ciceron, L.; Mazier, D.; Kustanovich, I.; Shai, Y.; Mor, A. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 31609.
- (224) Feder, R.; Dagan, A.; Mor, A. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 4230.
- (225) Radzishevsky, I. S.; Rotem, S.; Zaknoon, F.; Gaidukov, L.; Dagan, A.; Mor, A. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*, 2412.
- (226) Markelova, S. I.; Iudina, T. P.; Egorov, N. S. *Mikrobiologiya* **1981**, *50*, 650.
- (227) Vostroknutova, G. N.; Bulgakova, V. G.; Udalova, T. P.; Sepetov, N. F.; Sibel'dina, L. A. *Biokhimiia (Moscow, Russia)* **1981**, *46*, 657.
- (228) Prenner, E. J.; Lewis, R. N.; Kondejewski, L. H.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1417*, 211.
- (229) Prenner, E. J.; Lewis, R. N.; McElhaney, R. N. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1462*, 201.
- (230) Kawai, F.; Shoda, M.; Harashima, R.; Sadaie, Y.; Hara, H.; Matsumoto, K. *J Bacteriol* **2004**, *186*, 1475.
- (231) Nishibori, A.; Kusaka, J.; Hara, H.; Umeda, M.; Matsumoto, K. *J Bacteriol* **2005**, *187*, 2163.



## 8 Materialien

*Tabelle 9: Geräte*

Autoklav	2540 EL, Systec VX-95, Systec
Brutschrank	Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen
Differential Scanning Calorimeter	VP-DSC, MicroCal
French-Press	SLM-Aminco, Spectronic Instruments
Gasbrenner	Schütt flammy S, Schütt Labortechnik
Heizblock	HB-2, Wealtec Corp
HPLC-Anlage	Jasco
Diodenarraydetektor	MD-2010, Jasco
Hochdruckmischer	2080-DHD 4, Jasco
Pumpen	PU-2087, Jasco
Säulenthmostat	TCC: 100, Dionex
HPLC-Säulen analytisch, C18	218TP54, 10 µm Partikelgröße, 4,6 x 250 mm, Vydac
semipräparativ, C18	218TP1010, 10 µm Partikelgröße, 10,0 x 250 mm, Vydac
präparativ, C18	218TP1022 10 µm Partikelgröße 250 x 22 mm, Vydac
Inkubationsschüttler	Biometra G25, New Brunswick Scientific Innova 44, New Brunswick Scientific KS250 basic IKA Labortechnik Minitron AI72, HAT Infors AG Unimax 1010 + Inkubator 1000, Heidolph
Kühlschränke 4 °C, -20 °C -80 °C	Siemens Harafreeze, Heraeus Instruments
Lyophilisator:	Alpha 2-4, Christ Alpha 2-4 LD, Christ
Magnetrührer	MR Hei-Mix S, Heidolph MR 80, Heidolph RCT, IKA Labortechnik
Massenspektrometer (MALDI -TOF)	Autoflex III, Bruker Daltonics
Mikroskop	Axioskop 40 Filtersatz 09 (Ex-λ 450-490 nm, Emm-λ 515 nm), Zeiss

Mikrowelle	M1712 N, Samsung
NMR-Probenköpfe	HXY Triple Resonance, statisch austauschbare Spule, Bruker Biospin HXY MAS 4mm, Bruker Biospin HYX Flachspulenprobenkopf Eigenbau des IBG 2 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Goniometer Flachspulenprobenkopf Doty Scientific
NMR-Spektrometer	Avance, 500 MHz (Ultrashield) Wide Bore, Bruker Biospin Avance, 600 MHz (Ultrashield) Standard Bore, Bruker Biospin
pH-Messgerät	pH 315i, WTW QpH 70 VWR International
Photokamera PowerShot G5	Canon
Pipetten Einkanal 0,5-10 $\mu\text{l}$ ; 10-100 $\mu\text{l}$ ; 50-200 $\mu\text{l}$ , 100-1000 $\mu\text{l}$ , 1-5 ml 1-5 ml, 2-10 ml	Reference Eppendorf  Finnpipette, Thermo Scientific
Pipetten Mehrkanal Elektronisch 20-300 $\mu\text{l}$ Manuell 30-300 $\mu\text{l}$	RAININ®, Mettler-Toledo Research® plus, Eppendorf
Pipettierhilfen Akku-betrieben Manuell	Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte Pipetus® Junior, Hirschmann Laborgeräte
Rasterelektronenmikroskop	Supra 55 VP, Zeiss
Reinraumbank	Herasafe, Heraeus Instruments
Reinstwasseranlage	MilliQ®, Millipore
Spektrophotometer	Cary 1E, Varian Smart Spec Plus, Bio-Rad
Trockenschrank	600, Memmert
Ultraschallgeräte	Branson Sonifier 250, G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik UW2200, Bandelin Electronic
Vortexer	BioVortex V1, Lab 4 you Genie K-550-GE, Bender und Hobein
Waagen Ablesbarkeit 0,1 g Ablesbarkeit 0,1 mg Ablesbarkeit 0,001 mg	PB 3001, Mettler Toledo CP64, Sartorius M2P, Sartorius
Wasserbad	006T Lauda 1008 Gesellschaft für Labortechnik SW22, Julabo Labortechnik U3-7A, Julabo Labortechnik

Zentrifugen	3-18K, Sigma Avanti J-25Centrifuge, Beckman Biofuge Pico, Heraeus LM8, Beckmann RC 5B Plus, Sorvall
Zentrifugenrotoren:	19776-H, Sigma 45 Ti, Beckmann 50 Ti, Beckman JA-14, Beckman J-Lite JLA-9.1000, Beckman SLA 1500 Super-Lite, Sorvall SLA-3000 Super-Lite, Sorvall SW 28, Beckman

***Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien***

Aluminiumfolie	Rotilabo-Aluminiumfolie, Roth
Autoklavierband	Comply Indicator Tape, 3M
Cryoröhrchen	Roth
Deckgläschen (20 mm)	Roth
Einmalspritzen (20 ml, 10ml, 1 ml)	Injekt, B. Braun
Einmalsterilfilter (0,22 µm)	Rotilabo-Spritzenfilter steril, Roth
Glaskolben	Schott Duran®
Glasplättchen (7,5 x 12 x 0,08mm; 18 x 7,5 0,08 mm)	Marienfeld Laboratory Glassware
Glasröhrchen	Schott Duran®
Küvetten	Sarstedt
Mikrotiterplatten	Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific
NMR-Probenröhrchen mit Kappe (5 mm)	Wilmad LabGlass
Objektträger	Roth
Objektträger Roth	
Parafilm®	Laboratory Film, American National n
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (5 ml)	Finnpipette, Thermo Scientific
Reagenzröhrchen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten	Roth

Silizium-Plättchen für REM	Plano
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman
Wägebapier (MN 226)	MN 226, Macherez-Nagel
Wägeschälchen	Rotilabo-Einmal-Wägeschälchen, Roth
Zellophan Folie	Rewe Handelsgruppe
Zentrifugengefäße	
13,5 ml	PC Tube., Beckman
500 ml	PPCO, Herolab
15 ml, 50 ml	Sarstedt

***Tabelle 11: Chemikalien***

5(6)-Carboxyfluorescein-N-Succinimidyl-Ester	Sigma-Aldrich
Aceton 100 % EM Grade	Polyscience
Acetonitril	Fisher Scientific Merck
Agar-Agar	Fluka Biochemika
Agar-Agar, Kobe I	Roth
Aktivkohle	Sigma-Aldrich
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Roth
Ammoniumsulfat isotoopenmarkiert: <sup>15</sup> N	Cambridge Isotope Laboratories
Ascorbinsäure	Merck
Bacto Pepton (Trypton)	Roth
Bactotrypton	Beckton, Dickson and Company (BD)
Butyrylphosphat-Dilithiumsalz	Toronto Research Chemicals Inc.
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth
Chloroform	Merck
Dichlormethan	Biosolve BV
Di-Kalium-Hydrogenphosphat	AppliChem
Dimethylsulfoxid	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
DLPC,	Avanti Polar Lipids
DMPC	Avanti Polar Lipids
DMPG-d <sub>54</sub>	Avanti Polar Lipids
DMPG	Avanti Polar Lipids
EDTA	Roth

---

Eisen(3)chlorid-Hexahydrat	AppliChem
Eisessig	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
	Roth
Glukose	Fluka
Glutaraldehyd 8 %, EM Grade	Polysciences
Glutathion (reduziert)	Roth
Glycerin	Roth
Glycerin (isotopenmarkiert: $^{13}\text{C}$ )	Cambridge Isotope Laboratories
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Fluka
	Roth
Hepes	Roth
Hydroxylamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Aldrich
Isopropanol	Fischer Scientific
	Merck
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumsulfat	Roth
L-Arginin	Sigma-Aldrich
L-Glutathion	AppliChem
L-Histidin	Sigma-Aldrich
L-Histidin	Sigma-Aldrich
L-Leucin	Sigma-Aldrich
L-Methionin	Sigma-Aldrich
L-Methionin	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanin (isotopenmarkiert: $^{15}\text{N}$ oder $^{13}\text{C}$ )	Cortecnet
Magnesiumchlorid -hexahydrat	Roth
Magnesiumnitrat	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Roth
Manganchlorid-tetrahydrat	Fluka
Methanol	Merck
	Fisher Chemicals
milliQ $\text{H}_2\text{O}$	Millipore
Müller-Hinton-Bouillon	Beckton, Dickson and Company (BD)
Mykolsäuren aus <i>M.tuberculosis</i>	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Roth
Natriumcarbonat	Riedel-de Haen
	Roth

Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Riedel-de Haen
Natronlauge	AppliChem
	Merck
Perchlorsäure	Roth
Resazurin-Natriumsalz	Aldrich Chemicals
Salzsäure	Roth
Schwefelsäure	Roth
Silica gel	Merck
Trifluoressigsäure (TFA)	Biosolve BV
Tris	Roth
Triton X-100	AppliChem
Zitronensäure	Roth

**Table 12:** Puffer und Lösungen für die Mikrobiologie

Aminosäure-Lösung (10x)	10 g L-Arginin, 1,3 g L-Histidin 0,5 g L-Methionin 1 g L-Phenylalanin mit MilliQ auf 0,1 l
Ammoniumsulfat-Lösung (5 %) (10x) *	5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ggf. <sup>15</sup> N markiert) mit MilliQ auf 0,1 l
Basalmedium #	10 g Bacto Pepton, 5 g NaCl mit MilliQ auf 1 l, pH = 7,5
G4/4FM-Medium	Wie G4/4 mit Zusatz von 5 mM Fumarat und 25 mM Malat
G4/4-Medium	Für 400 ml 280 ml steriles MilliQ 40 ml Glycerol-Lösung 40 ml Aminosäure-Lösung 400 µL SS1 400 µL SS2 40 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung

GATF-Medium	Für 400 ml 200 ml steriles MilliQ, 40 ml 10 %ige Glycerol-Lösung (10x) , 40 ml 6 %ige Tris-Lösung (10x), 40 ml 5 %ige $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ -Lösung (10x), 40 ml 0,25 %ige Phenylalanin-Lösung 400 $\mu\text{l}$ SS1 400 $\mu\text{l}$ SS2, 40 ml $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (10x).
Glycerol-Lösung (10 %) (10x) *	10 g Glycerol mit MilliQ auf 0,1 l
LB-Agar oder LBY-Agar #	LB oder LBY-Medium mit Zusatz von 30 g/l Agar-Agar
LB-Medium #	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl mit MilliQ auf 1 l, pH = 7,4
LBY-Medium #	10 g Bactotrypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit MilliQ auf 1 l, pH = 7,4
MH-Medium (2x) #	44 g MH-Bouillon mit MilliQ auf 1 l
NaCl-Lösung (0,9%ig) #	9 g NaCl mit MilliQ auf 1 l
Phenylalanin-Lösung (0,25%ig) (10x)*	0,25 g L-Phenylalanin ( $^{15}\text{N}$ oder $^{13}\text{C}$ markiert), mit MilliQ auf 0,1 l
Phosphat-Lösung (10x)*	6,5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1,7 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ mit MilliQ auf 0,1 l
SS1 (1000x) *	200 mg $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ mit MilliQ auf 1 ml
SS2 (1000x) *	0,20 mg $\text{FeCl}_3$ mit 10 mM HCl auf 1 ml
Tris-Lösung (6%ig) (10x)	6 g Tris, mit MilliQ auf 0,1 l
YP-Medium	50 g Bactotrypton, 50 g Hefeextrakt, mit MilliQ auf 1 l, pH = 7,4

Die mit \* markierten Lösungen wurden bei 121 °C bei 1 bar Wasserdampfüberdruck 20 min autoklaviert. Die mit # markierten Lösungen wurden durch einen Spritzenfilteraufsatz der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  steril filtriert. Wenn nicht anders angegeben, bezieht sich der pH Wert auf Raumtemperatur.

**Tabelle 13 : HPLC Laufmittel****Allgemeine HPLC Laufmittel**

HPLC-Laufmittel A1	90 % H <sub>2</sub> O, 10 % ACN, 5 mM HCl, entgast
HPLC-Laufmittel B1	90 % ACN, 10 % H <sub>2</sub> O, 5 mM HCl, entgast

**Laufmittel nur für GS Bestimmung aus GSG**

HPLC-Laufmittel A2	90 % H <sub>2</sub> O, 10 % ACN, 0,1 % TFA, entgast
HPLC-Laufmittel B2	90 % ACN, 10 % H <sub>2</sub> O, 0,1 % TFA, entgast

**Tabelle 14: Sonstige Puffer und Lösungen**

Ascorbat-Ammoniummolybdat Lösung	1 Teil 10 % Ascorbat, 6 Teile 0,42 % Ammoniummolybdat in 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Glycin-HCl Puffer	100 mM Glycin, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA, 1 mM Gluthation, pH = 2,5
Hämolyse Reaktionspuffer	172 mM Tris in MilliQ, pH = 7,6
Hämolyse Waschpuffer	172 mM Tris in MilliQ, pH = 7,6 (37°C)
Natriumhydrogencarbonat-Puffer	150 mM NaHCO <sub>3</sub> in MilliQ, pH = 8,3
Verdaupuffer	50 mM Tris, 10 mM EDTA, 30 mM MgCl <sub>2</sub> in MilliQ, pH=7,5
Zellaufschlusspuffer (Puffer A)	172 mM Tris, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA, 1 mM Gluthation in MilliQ, pH = 7,4

Wenn nicht anders angegeben, bezieht sich der pH Wert auf Raumtemperatur.

**Tabelle 15: Enzyme**

Lysozym	Sigma Aldrich
DNaseI	AppliChem



---

RNaseA	AppliChem
Benzonase®	Sigma Aldrich

***Tabelle 16: Mikroorganismen***

<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	DSM 5759
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 1104

## 9 Publikationen

### Fachartikel

(1) Wadhvani, P.; Reichert, J.; Strandberg, E.; Bürck, J.; Misiewicz, J.; Afonin, S.; Heidenreich, N.; Fanghänel, S.; Mykhailiuk, P. K.; Komarov, I. V.; Ulrich, A. S. „Stereochemical effects on the aggregation and biological properties of the fibril forming peptide [KIGAKI]<sub>3</sub> in membranes.” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 15, 8962-8971.

(2) Misiewicz, J.; Afonin, S.; Ulrich, A. S. „Control and role of pH in peptide-lipid interactions in oriented membrane samples.”, *Biochim Biophys Acta – Biomembranes*, **2014**, 1848(3), 833-841.

(3) Misiewicz, J.; Afonin, S.; Grage, S. L.; van den Berg, J.; Strandberg, E.; Wadhvani, P.; Ulrich, A. S. „Action of the multifunctional peptide BP100 on native biomembranes examined by solid-state NMR.” *Journal of Biomolecular NMR, Special Issue – NMR of membrane proteins*, in press.

### Tagungsbeiträge

(1) Babii, O.P.; Grage, S.L.; Afonin, S.; Lochte, R.; Misiewicz, J.; Mykhailiuk, P.K.; Komarov, I.V.; Ulrich, A.S. „Probing local dynamics of antimicrobial peptides in lipid bilayers by using solid-state <sup>19</sup>F-NMR relaxometry. „ Membrane Biophysics and Lipid-Protein Interaction : EBSA Biophysics Course, 24-29.06. 2012, Bordeaux, Frankreich, Posterbeitrag

(2) J. Misiewicz, S. Afonin, A. S. Ulrich, „Antimicrobial peptides in native membranes investigated by solid-state <sup>19</sup>F-NMR.“ Gordon Research Seminar (23.-24.2.13) and Gordon Conference on „Antimicrobial peptides“, 24.02.- 1.3.2013, Ventura, USA, Posterbeitrag

(3) J. Misiewicz, M. Berditsch, S. Afonin, A. S. Ulrich, „The antimicrobial peptide Gramicidin S forms macromolecular peptide assemblies with high energy phosphates “ 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, 31.08.-05.09.14, Sofia, Bulgarien, Posterbeitrag

## 10 Lebenslauf

**Julia Misiewicz (geb. Palmer)**

---

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum: 23. Januar 1984  
 Geburtsort: Pforzheim  
 Familienstand: verheiratet, ein Sohn

### Schulbildung

---

09/1990-07/1994 **Grundschule** Feldrennach  
 09/1994-07/2003 sprachlich-naturwissenschaftliches **Gymnasium** Neuenbürg  
 07/2003 **Abitur** (Note: 2,1)

### Studium

---

09/2003-03/2009 **Chemiestudium** (Diplom) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
 Vertiefungssfach: Biochemie  
 03/2009-12/2009 **Diplomarbeit** am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) bei Prof. Anne S. Ulrich  
 Thema: „Untersuchung des Verhaltens von PGLa in Abhängigkeit vom pH-Wert.“ (Note 1,0)  
 12/2009 **Diplom-Chemikerin** am Karlsruher Institut für Technologie (Abschlussnote: 1,4)  
 Seit 11/2010 **Promotion** am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie/ Institut für biologische Grenzflächen (IBG2) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) bei Prof. Anne S. Ulrich  
 Thema: „Biophysikalische Untersuchungen an antimikrobiellen Peptiden: Von der Modellmembran zur natürlichen Umgebung“

### Weiterbildung

---

11/2011-05/2012 Teilnahme am Weiterbildungsprogramm "**keys2competence-Schlüsselqualifikationen für Young Professionals**" des Karlsruher House of Young Scientists (KHYS)  
 10/2014 Teilnahme am Seminar "**Scientific Writing-Writer's Workshop**" des Karlsruher House of Young Scientists (KHYS)

### Sonstiges

---

12/2009-11/2010 Elternzeit  
 03/2011-03/2013 Förderung durch das **Wiedereinstiegsprogramm für Wissenschaftler/Innen** des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)