

Untersuchung der synergistischen Interaktion der antimikrobiellen Peptide PGLa und Maganinin 2

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

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

DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker Jonathan Zerweck

aus

Bietigheim-Bissingen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich
Korreferent: Prof. apl. Dr. Wolfgang Wenzel
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2012 bis November 2014 am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß, die Arbeit bis auf die dem Aufgabensteller bereits bekannte Hilfe selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Änderung übernommen wurde.

Danksagungen

Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich danke ich für die interessante Aufgabenstellung, für die Bereitstellung aller benötigten Hilfsmittel und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrem Arbeitskreis durchführen zu können.

Dr. Erik Strandberg danke ich für seine gute Betreuung und unermüdliche Unterstützung während der Doktorarbeit. Insbesondere bei den NMR-Experimenten war er eine großartige Hilfe.

Dr. Parvesh Wadhvani danke ich für die kompetente Betreuung, die Ratschläge zur Durchführung der Experimente und für die immer offene Tür, sobald Probleme auftauchten.

Dr. Johannes Reichert danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und deren Auswertung.

Dr. Jochen Bürck und Bianca Posselt danke ich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der CD-Messungen und deren Auswertung.

Dr. Marina Berditsch danke ich für die Unterstützung bei den mikrobiologischen Tests.

Ich danke Sarah Flade und Olga Kukharensko für die Unterstützung bei dem Projekt und die wertvollen Ergebnisse die mich ein gutes Stück weitergebracht haben.

Ich danke dem gesamten PepSy-Labor, Andrea Eisele, Kerstin Scheubeck, Philipp Mühlhäuser, Papiya Sanyal, Xiaojun Xu und Benjamin Zimpfer für die anregenden Diskussionen und die gute Stimmung im Büro. Besonders danke ich Andrea und Kerstin für die Unterstützung in und ums Labor.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Brüdern für die Unterstützung während dem Studium und bei der Doktorarbeit.

Zu guter Letzt danke ich Erik, Jochen, Johannes, David, Korinna, Christiane und Martin für die Kommentare und Korrekturvorschläge für diese Arbeit.

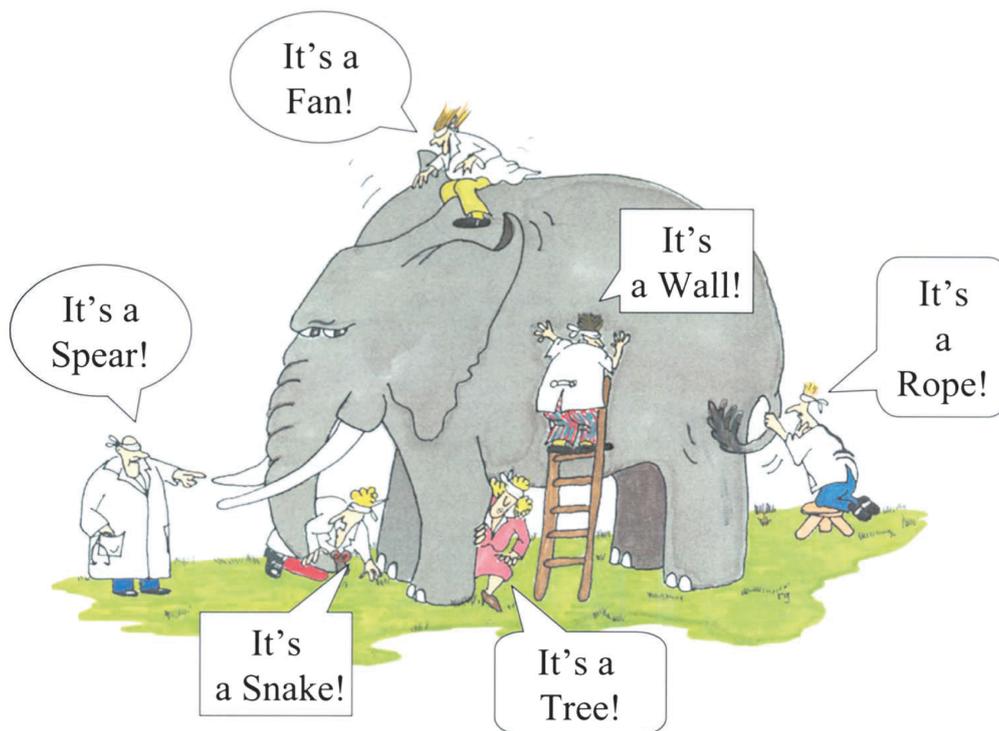


Abbildung 0.1: Nach einem Gedicht von John Godfrey Saxe: „The blind men and the elephant“ (Cartoon ursprünglich urheberrechtlich geschützt von den Autoren; G. Renee Guzlas, Künstler).^[1]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Antimikrobielle Peptide	1
1.3 Biologische Membranen	2
1.4 Lipide	4
1.5 Form der Lipide	5
1.6 Peptid-Membran-Interaktionen	6
1.7 Die Familie der Magainin-Peptide	8
1.7.1 PGLa	9
1.7.2 Magainin 2	10
1.7.3 Synergie zwischen PGLa und Magainin 2	11
2 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Material	14
3.1.1 Verwendete Chemikalien	14
3.1.2 Festphasenpeptidsynthese	14
3.1.3 Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC	17
3.1.4 Produktkontrolle	17
3.1.5 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	18
3.1.6 Festkörper-NMR-Spektroskopie	18
3.1.7 Fluoreszenzspektroskopie	18
3.1.8 Hämolyse	19
3.1.9 Biologische Tests	19
3.1.10 Peptidgrafiken	19
3.2 Methoden	19
3.2.1 Festphasenpeptidsynthese	19
3.2.2 Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC	23
3.2.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	23
3.2.4 Festkörper-NMR-Spektroskopie	28
3.2.5 Hämolyse	33
3.2.6 Fluoreszenzspektroskopie	34
3.2.7 Biologische Tests	38
4 Lipidabhängige Orientierung von antimikrobiellen Peptiden in orientierten Lipiddoppelschichten	41
4.1 Ergebnisse	41
4.1.1 Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung	41

4.1.2	Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung	47
4.2	Diskussion	51
4.2.1	Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung	51
4.2.2	Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung	54
4.2.3	Zusammenfassung	55
4.2.4	Hydrophobe Schichtdicke <i>versus</i> spontane Krümmung	56
5	Interaktionsstudien mit Peptiden der Mag2-Familie zur Bestimmung der reaktiven Untereinheit, Lokalisation und Stärke der Interaktion	59
5.1	Bestimmung des molaren PGLa-Mag2-Verhältnisses	60
5.1.1	Methode der kontinuierlichen Veränderung	60
5.1.2	¹⁵ N-Festkörper-NMR-Spektroskopie	61
5.2	CD-spektroskopische Interaktionsstudien	63
5.3	Konzentrationsabhängige Interaktionsuntersuchungen	65
5.3.1	Kooperativität	65
5.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der Orientierung von PGLa	70
5.3.3	¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektroskopie	71
5.4	Zusammenfassung	75
6	Von PGLa nach MSI-103 und zurück oder der Einfluss von geladenen Aminosäuren und Glycinen auf die Wechselwirkung zwischen PGLa und Mag2	77
6.1	Salzbrückenmutationen	77
6.1.1	CD-Spektroskopie	79
6.1.2	NMR-Spektroskopie	81
6.1.3	Biologische Untersuchungen	83
6.1.4	Fluoreszenzspektroskopie	85
6.1.5	Diskussion	87
6.2	Einschub: PGLa <i>versus</i> MSI-103	89
6.3	Von PGLa nach MSI-103	91
6.3.1	Mehrfachmutationen	91
6.3.2	Einzelmutationen	97
6.4	Von MSI-103 nach PGLa	103
6.4.1	Einzelmutationen	103
6.4.2	Doppelmutationen	106
6.4.3	Mehrfachmutationen	109
6.5	Der Einfluss des GxxxG-Motivs	114
6.5.1	Ergebnisse	115
6.5.2	Diskussion	118
6.6	Einschub: MSI-103 <i>versus</i> Mag2	120
6.7	Von MSI-103 nach Mag2	122
6.8	Interaktionsmodelle	125
7	Zusammenfassung	132
	Literaturverzeichnis	133
A	Anhang Material und Methoden	141
B	Anhang Lipidabhängige Orientierung	144

C Anhang Interaktionsstudien	146
D Anhang Mutationsstudien	150
Lebenslauf	161

Abkürzungsverzeichnis

Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AMP	Antimikrobielles Peptid
AN	Acetonitril
AS	Aminosäure
ANTS	8-Aminonaphthalin-1,3,6-Trisulfonsäure
AU	<i>engl.</i> : absorption unit Absorptionseinheit
CD	<i>engl.</i> : circular dichroism Zirkulardichroismus
CF ₃ -L-Bpg	L-3-(Trifluoromethyl)bicyclo[1.1.1]pent-1-ylglycin
CM	Cytoplasmatische Membran(en)
δ	chemische Verschiebung
d	Tag(e)
DCM	Dichlormethan
DEPC	1,2-Di-(13Z-Docosenoyl)- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DEPG	1,2-Di-(13Z-Docosenoyl)- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> (1-glycerol)]
di-10:0-PC	1,2-Didecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
di-20:1-PC	1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DMF	Dimethylformamid
DMoPC	1,2-Di-(9Z-tetradecenoyl)- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> (1-glycerol)]
DOPE	1,2-Di-(9Z-Octadecenoyl)- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DPX	<i>p</i> -Xylol-bis(<i>N</i> -Pyridiniumbromid)
EDT	1,2-Ethandithiol
eq.	<i>engl.</i> : equivalent Äquivalent(e)
Et ₂ O	Diethylether
EYPG	<i>engl.</i> : egg yolk phosphatidyl glycerol Eigelb-Phosphoglycerol
FIC	<i>engl.</i> : fractional inhibitory concentration Minimale-Hemm-Konzentration
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
g	Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-

	tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>engl.</i> : high performance liquid chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
konz.	konzentriert
Lsg.	Lösung
LC-MS	<i>engl.</i> : liquid chromatography - mass spectrometry
lyso-MPC	1-Myristoyl-2-Hydroxy- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
LUV	<i>engl.</i> : large unilamellar vesicle
Mag2	Magainin 2
Me ₂ S	Dimethylsulfid
MHK	Minimale-Hemm-Konzentration
MIC	<i>engl.</i> : minimum inhibitory concentration
min	Minute
mL	Milliliter
MLV	<i>engl.</i> : multilamellar vesicle
mmol	Millimol
MRE	<i>engl.</i> : Mean residue ellipticity
MS	Massenspektrometrie
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidinon
NMR	<i>engl.</i> : nuclear magnetic resonance Kernspinresonanz
P/L	molares Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
PGLa	Peptid von Glycin nach Leucinamid
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> (1-glycerol)]
ppm	<i>engl.</i> : parts per million
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino- phosphoniumhexafluorophosphat
RMSD	<i>engl.</i> : root mean square deviation
RP	<i>engl.</i> : reversed phase
RT	Raumtemperatur
S_{mol}	Ordnungsparameter
SG	Schutzgruppe
sn	<i>engl.</i> : stereospecific numbering
SUV	<i>engl.</i> : small unilamellar vesicle
TA	Thioanisol
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TIS	Triisopropylsilan
TOCI	1,1',2,2'-Tetraoleoyl-Cardiolipin, 1',3'-Bis[1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phospho]- <i>sn</i> -Glycerol
WT	Wildtyp
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1. Motivation

Seit der Entdeckung des Penicillins (1928) durch den schottischen Bakteriologen Alexander Flemming^[2] haben die uns heute als Antibiotika (*griech.* anti- gegen, bios - Leben) bekannten Stoffe einen einzigartigen Siegeszug in der modernen Medizin und Industrie erlebt. Innerhalb weniger als eines Jahrhunderts sind sie aus unserem Alltag nicht mehr fortzudenken. Ursprünglich handelte es sich um niedermolekulare Stoffe, welche von Pilzen und Bakterien gebildet wurden. Sie können das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder diese sogar abtöten. In einer wachsenden Gesellschaft, die zunehmend älter wird, werden vermehrt Antibiotika eingesetzt, um den Bedarf an Fleisch zu decken und die Gesundheit zu gewährleisten. Massentierhaltung ist im Grunde nur durch den Einsatz von Antibiotika möglich, da kranke Tiere den gesamten Bestand gefährden würden. Der vermehrte Einsatz von Antibiotika hat dazu geführt, dass Mikroorganismen Schutzmechanismen sog. Resistenzen entwickeln. Da der Lebenszyklus eines solchen Bakteriums sehr viel kürzer ist als der eines Menschen (z. B. *Escherichia coli* 30 Minuten), ist es nur natürlich, dass diese Mikroorganismen sich verändern. Auch hier gilt der Grundsatz „surviving of the fittest“. Es gibt mittlerweile nicht mehr nur ein paar resistente Stämme, sondern eine Vielzahl an Mikroorganismen, welche Resistenzen entwickelt haben. Betrachtet man die Neuzulassung an Antibiotika, so ist eine Stagnation bzw. Rückläufigkeit zu erkennen. Die Natur hat nicht nur Pilze und Bakterien mit Schutzsystemen gegen Mikroorganismen ausgestattet. Viele Tiere und auch der Mensch besitzen eigene Abwehrmechanismen. Eine Substanzklasse sind die Peptidantibiotika, welche auch antimikrobielle Peptide (AMPs) genannt werden. Diese sind Gegenstand dieser Arbeit und werden nun im Detail erläutert.

1.2. Antimikrobielle Peptide

Die ersten AMPs wurden 1939 entdeckt. In diesem Jahr wurden aus *Bacillus brevis* die sog. Gramicidine isoliert, welche Aktivität gegen eine große Bandbreite an Grampositiven Bakterien *in vitro* und *in vivo* aufweisen.^[3,4] Es konnte gezeigt werden, dass Gramicidine erfolgreich Wundinfektionen von Meerschweinchen heilen, was zur kommerziellen Produktion als Antibiotika führte.^[5] Es war lange bekannt, dass Menschen und andere Lebewesen durch ein adaptives Immunsystem gegen mikrobielle Infektionen geschützt sind. Dies ließ die Frage offen, warum Pflanzen und Insekten, welche kein adaptives Immunsystem besitzen, trotzdem Infektionen überstehen. Die Antwort auf diese Frage ist heute bekannt. Auch Pflanzen und Insekten produzieren AMPs. Seit ihrer Entdeckung ist die Zahl der bekannten AMPs auf über 2000 gestiegen, mit Vertretern in fast allen eukaryotischen Organismen.^[6] Bei einer so großen Molekülgröße ist es sinnvoll diese nach den Charakteristika zu unterteilen. Eine Unterteilung in verschiedene Unterklassen ist in Tabelle 1.1 gezeigt. Zudem wurden Vertreter jeder

Klasse aufgelistet. AMPs können eine Vielzahl von Sekundärstrukturen einnehmen. Sie können unter anderem als α -Helices, ungeordnete Strukturen oder β -Faltblätter vorliegen.^[7] Einige der Peptide enthalten sich wiederholende Sequenzabschnitte. Die Größe der Peptide variiert von sechs bis zu 59 Aminosäuren.^[7] Es wurden sogar Di- und Tripeptide gefunden die antimikrobielle Aktivität zeigen. Das Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Aminosäuren kann sich zwischen 1:1 und 2:1 bewegen.^[7] Es gibt sowohl anionische als auch kationische AMPs. Die anionischen Peptide sind reich an Asparaginsäure und Glutaminsäure. Ein Vertreter der negativ geladenen AMPs ist Maximin H5 aus Amphibien.^[8] Die kationischen Peptide enthalten Arginin und Lysin. Diese Peptide kann man auch weiter unterteilen. Es gibt lineare, α -helikale Peptide wie die Magainine aber auch zyklische Peptide die eine β -Faltblatt-Struktur annehmen, wie Gramacidin S.^[9,10] Des Weiteren gibt es kationische Peptide, die mit gewissen Aminosäuren angereichert sind. Zu diesen Peptiden zählt Indolicidin (Trp, Pro).^[11] Interessanterweise verwenden diese Peptide im Gegensatz zu anderen kationischen Peptiden einen nicht lytischen Weg um Bakterien zu töten.^[12] Hoch geladene kationische Peptide oder durch Zink komplexierte negativ geladene Peptide sind meist aktiver als ungeladene oder niedrig geladenene Peptide. Es gibt anionische und kationische Peptide, welche Cysteine enthalten, die sie zur Disulfidbrückenbildung befähigen.^[8] Ein typisches, durch Disulfidbrücke stabilisiertes β -Faltblatt ist Protegrin 1.^[13] Es gibt zudem antimikrobielle Peptide die Fragmente großer Proteinkomplexe sind, wie z. B. Lactoferricin (aus Lactoferrin).^[14] Viele Peptide haben einen amphipathischen Charakter, d.h. sie besitzen die Eigenschaft hydrophile und hydrophobe Aminosäuren auf gegenüberliegende Seiten ihrer Struktur zu positionieren. Oft wird die Amphipathizität als hydrophobes Moment ausgedrückt, welches die Vektorsumme der Hydrophobizitäts-Indices ist.^[15] Eine amphipathische Struktur hat die Fähigkeit an Membranen zu binden.

Tabelle 1.1: AMP-Klassen.

AMP-Klasse	Subklasse	Vertreter
Anionisch	-	Maximin H5 ^[8]
Kationisch	Linear, α-helikal	Magainine ^[9]
“	Zyklisch	Gramacidin S ^[10]
“	angereichert mit spezifischen Aminosäuren	Indolicidin (Pro, Trp) ^[11]
Anionisch & Kationisch	Cysteine enthaltend	Protegrin 1 ^[13]
“	Fragmente großer Moleküle	Lactoferricin (Lactoferrin) ^[14]

1.3. Biologische Membranen

α -helikale AMPs sind membranaktive Peptide und zerstören in vielen Fällen die cytoplasmatische Membran (CM) von Zellen. Die CM von Zellen ist ein komplexes Netzwerk von Proteinen und Lipiden. Sie besitzt eine molekulare Organisation welche einen

wichtigen Beitrag zur Aktivität der Proteine leistet. Durch die Einbettung der Proteine in die CM ist sie auch für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Zelle verantwortlich. Es handelt sich hierbei um eine Grenzfläche zwischen Zellinnerem und Zelläußerem. Die CM dient als Schutz, ist aber zeitgleich permeabel für verschiedene Stoffe und hat somit eine dynamische Struktur. Das Gewichtsverhältnis zwischen Lipiden und Proteinen kann zwischen 1:4 und 4:1 variieren.^[16] Die Vielschichtigkeit der Membran ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Das 1972 von Singer *et al.* veröffentlichte Flüssigmosaikmodell beschreibt die Organisation von Membranen. Hier sind die Membranproteine in einer zweidimensionalen Lösung gerichteter Lipide gelöst und können durch die Membran diffundieren, sofern sie nicht durch Wechselwirkungen gebunden sind.^[17]

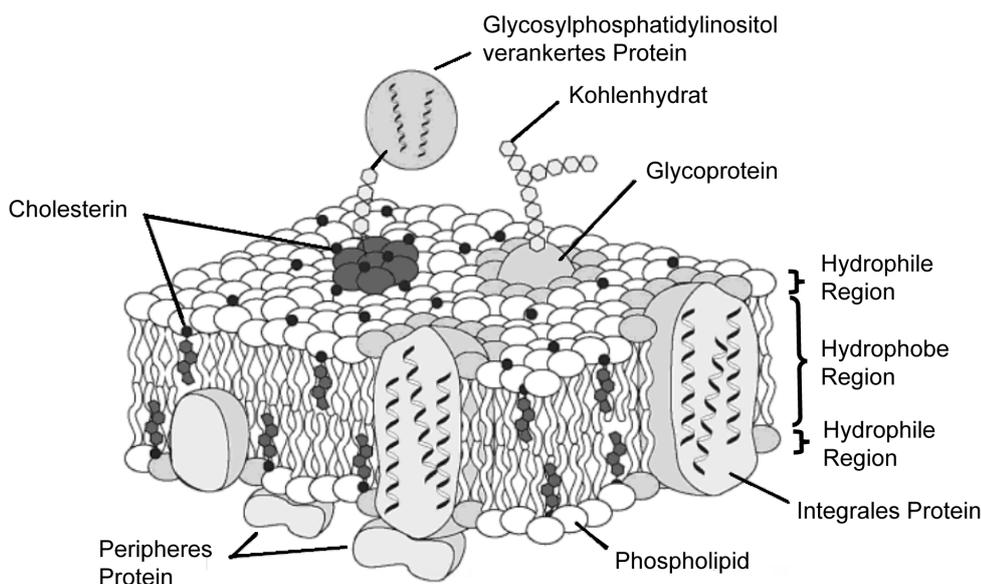


Abbildung 1.1: Aufbau einer biologischen Membran.^[18]

In der Natur gibt es unterschiedliche Bakterientypen, deren CM AMPs auf unterschiedlichen Wegen erreichen. In Abbildung 1.2 sind Ausschnitte aus den die verschiedenen Bakterientypen umgebenden Hüllen gezeigt. Im Falle von Gram-positiven Bakterien (z. B. *Staphylococcus aureus*) interagieren die Peptide zuerst mit den Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren, welche anionische Komponenten der bakteriellen Zellwand sind. Diese Wechselwirkung führt zu einer Migration der Peptide über die Peptidoglykanschicht zur CM.^[6] Im Falle von Gram-negativen Bakterien treffen die Peptide zuerst auf die äußere Membran, welche anionische Lipopolysaccharide (LPS) enthält, zu welchen die AMPs eine hohe Affinität haben. Diese erlaubt es den Peptiden mittels selbst-verstärkten Aufnahmepfaden die äußere Membran zu passieren. Hierbei können kleine Moleküle mit aufgenommen werden, welche die synergistische Wechselwirkung zwischen AMPs und anderen Antibiotika erklärt.^[19,20] Mittlerweile wird angenommen, dass die Lipidmoleküle nicht nur das Gerüst für Proteine und Peptide sind, sondern aktiv involviert sind in die Dynamik der Lipiddoppelschicht und an einer Vielzahl von biologischen Funktionen.^[6]

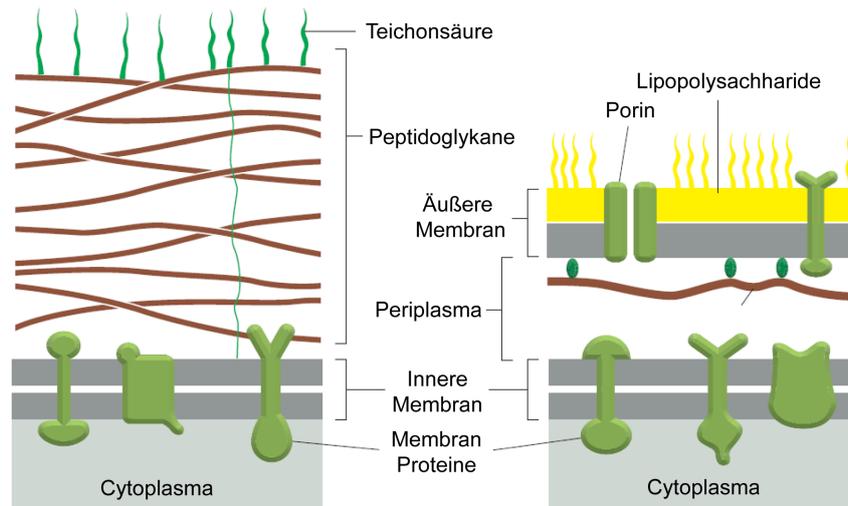


Abbildung 1.2: Aufbau der Zellwand von Gram-positiven (links) und Gram-negativen Bakterien (rechts) (Modifiziert aus [21])

1.4. Lipide

Die meisten Lipide bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und einer unterschiedlichen Anzahl an Alkylketten. Sie sind also amphipathische Moleküle. Einige Beispiele sind in Abbildung 1.3 gezeigt.

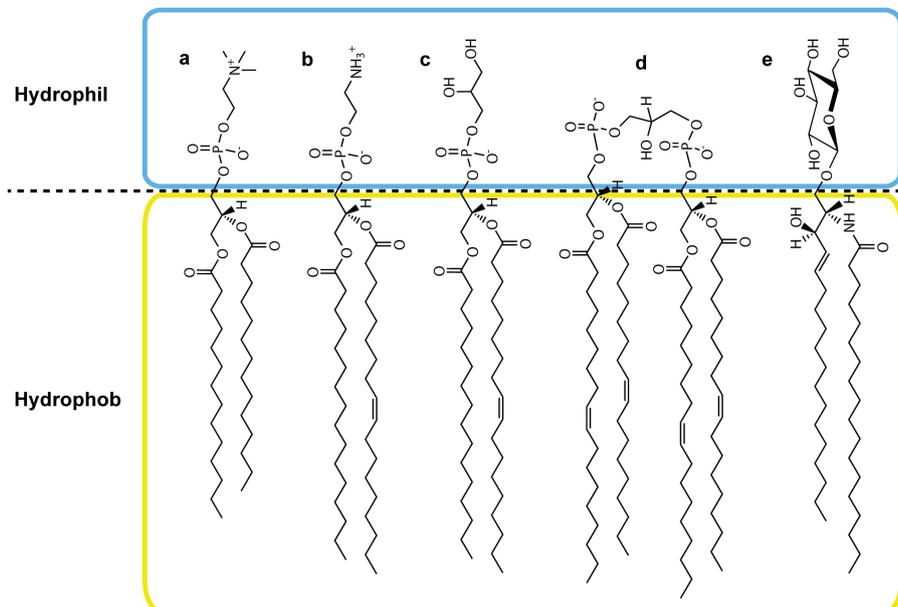


Abbildung 1.3: Verschiedene Lipide (DMPC (a), POPE (b), POPG (c), TOCL (d), Glycosphingolipid (e)).

Hier sind ein Phosphocholin (PC), ein Phosphoethanolamin (PE), ein Phosphoglycerol (PG), ein Cardiolipin (CL) und ein Glycosphingolipid zu sehen. Die hydrophoben und hydrophilen Bereiche sind gelb und blau umrandet. Generell unterteilt man die Lipide

nach Kopfgruppen, denn sie bilden die Außenseite der Membran. Die Kettenlänge spielt bei der Beschreibung von Mikroorganismen eine untergeordnete Rolle, ist aber in biophysikalischen Experimenten genau definiert.

Die CM von Gram-positiven Bakterien sind prinzipiell aus Lipiden aufgebaut, welche sich aus Phosphoglycerol (PG) ableiten lassen. *S. aureus* CM enthalten hauptsächlich PG und Cardiolipin (CL), welches ein PG Dimer ist. Die Kettenlänge variiert hierbei. Im Gegensatz dazu bestehen die CM von Gram-negativen Bakterien (z. B. *Escherichia coli* - *E. coli*) hauptsächlich aus Phosphoethanolamin (PE). *E. coli* CM sind hauptsächlich aus PE, PG und CL zusammengesetzt.^[22] Die genauen Zusammensetzungen sind in Tabelle 1.2 gezeigt.

Tabelle 1.2: Lipidzusammensetzung bakterieller Membranen.^[22]

Lipid	Gram positiv <i>S. aureus</i> [%]	Gram negativ <i>E. coli</i> [%]
PE	-	80
PG	58	15
CL	42	5

1.5. Form der Lipide

Lipide lassen sich darüber hinaus in ein wesentlich einfacheres Modell gliedern (Abbildung 1.4). Hierbei wird nur das Kopfgruppenvolumen und das Lipidgruppenvolumen betrachtet. Ist die Kopfgruppe kleiner als das Lipidgruppenvolumen so spricht man von einem invertierten Kegel (lyso-MPC)(a). Sind beide Bereiche etwa gleich groß, so spricht man von einem Zylinder (DMPC)(b). Bei einer Kopfgruppe welche größer ist als das Lipidkettenvolumen spricht man von einem Kegel (DOPE)(c). Die unterschiedlich geformten Lipide bilden unterschiedliche Strukturen aus. Die invertierten Kegel bilden Mizellen aus. Zylinderförmige Lipide neigen zur Bildung von Doppelschichten und kegelförmige Lipide bilden invertierte hexagonale Phasen aus.^[23,24] Die Form der Lipide ist Grundlage eines Konzeptes, das in einem der folgenden Kapitel

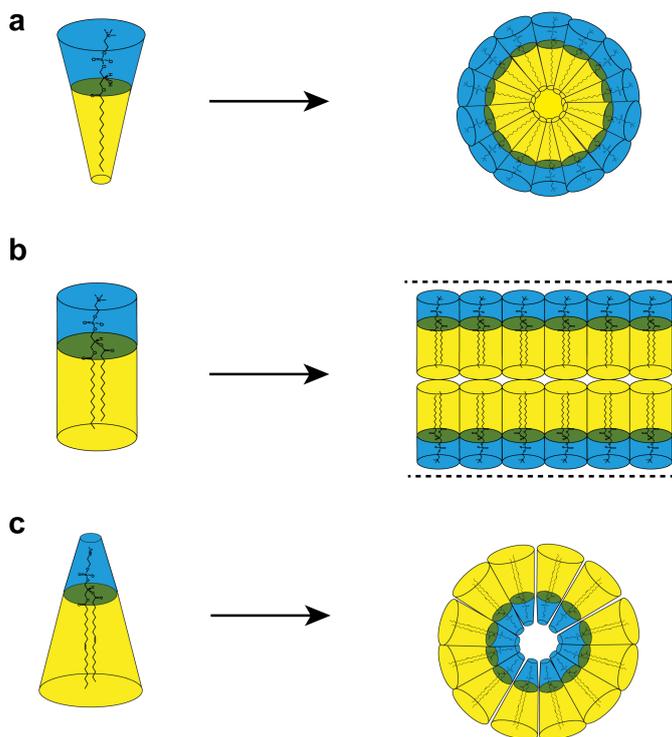


Abbildung 1.4: Übersicht über die Formmöglichkeiten und die daraus resultierenden Gruppenanordnungen von Lipiden.

Die Form der Lipide ist Grundlage eines Konzeptes, das in einem der folgenden Kapitel

dieser Arbeit die Grundlage für die durchgeführten Untersuchungen ist. Ist das Lipid kegelförmig so wird es Strukturen formen, welche eine negative Krümmung haben, d. h. die Ketten zeigen nach außen und die Kopfgruppen nach innen. Liegen diese Lipide als Doppelschicht vor, so resultiert das in potentielltem Freiraum in der Kopfgruppenregion. Bei invertierten Kegeln ist in der Lipiddoppelschicht der potentielle Freiraum in der Kettenregion.

Wenn Peptide zu diesen Lipiddoppelschichten gegeben werden, führt dies dazu, dass die Peptide sich an der Oberfläche der Membran befinden oder transmembrane Orientierungen einnehmen können.^[25,26] Dies ist in Abbildung 1.5 gezeigt. Die genauen mechanistischen Details von Peptid-Membran-Interaktionen werden im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

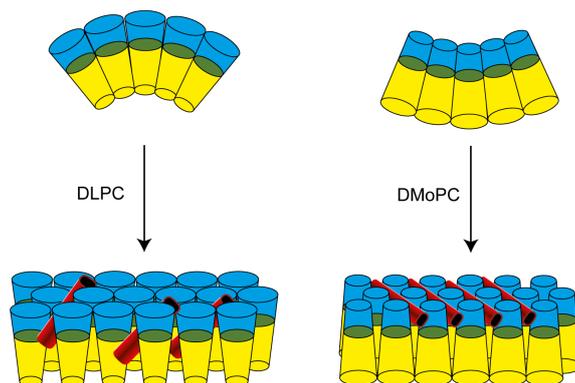


Abbildung 1.5: Durch die spontane Krümmung von Lipiden hervorgerufene Freiräume in Ketten- (links) oder Kopfgruppenregion (rechts) von Lipiden.

Die spontane Krümmung von Lipiden ist messbar. Kollmitzer *et al.* haben dies für verschiedene Lipidsysteme mittels kleinwinkliger Röntgenbeugung an invertierten hexagonalen Phasen durchgeführt.^[27]

1.6. Peptid-Membran-Interaktionen

Die Fähigkeit Mikroorganismen zu töten hängt hauptsächlich von der Fähigkeit der AMPs ab mit der cytoplasmatischen Membran (CM) dieser Organismen wechselzuwirken. Um mit dieser CM in Kontakt zu treten müssen diese Peptide die das Bakterium umgebenden Strukturen passieren. Dies schließt die äußere Membran Gram-negativer Bakterien und die Zellwände von Bakterien und Pilzen ein.

Die Wechselwirkung der Peptide mit diesen Membranen ist mit einer Vielzahl an Methoden untersucht worden. Es gibt einige Modelle, welche die Interaktion mit der Membran beschreiben. Für lytisch agierende Peptide gibt es drei Hauptmechanismen.

Das Fassdauben-Modell (Abbildung 1.6) wurde erstmals in den 1970ern postuliert.^[28]

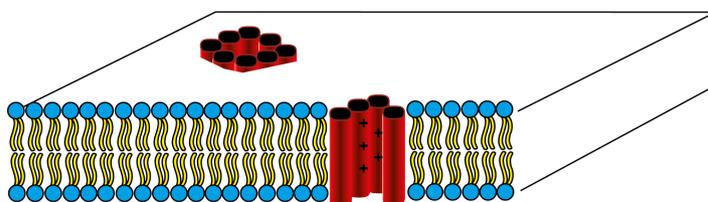


Abbildung 1.6: Das hauptsächlich für Alamethicin gültige Fassdauben-Modell der Porenbildung.

Diesem Modell zu Folge binden α -helikale AMPs elektrostatisch an die Kopfgruppen der Lipide der bakteriellen Membran in einer Orientierung parallel zur Membranoberfläche. Aggregation und Insertion führen zu einer transmembranen Orientierung, welche einen fassartigen Charakter hat. Die Pore ist so konstruiert, dass die hydrophoben Oberflächen der Peptide mit dem hydrophoben Inneren der Membran wechselwirken während die hydrophilen Reste das Innere der Pore auskleiden. Diese Art der Porenbildung ist akzeptiert für Alamethicin und andere Peptaibole aus der Pilzart *Trichoderma*.^[29,30]

Die ringförmige Pore, oder Wurmloch, ist ein Modell, das für die Magainine und Protegrine vorgeschlagen wurde.^[31-33] Das Modell verwendet ein initiales Membranbinden und Orientieren der Peptide, welches dem des Fassdauben-Modells recht ähnlich ist.

Die Aggregation der Peptide führt dann allerdings dazu, dass sich eine positive Krümmung ausbildet, welche mit einer größeren Distanz zwischen den Lipidkopfgruppen einhergeht. Sobald eine kritische Konzentration erreicht wird, reorientieren sich die Peptide in eine transmembrane Orientierung (Abbildung 1.7). Dies führt dazu, dass die Membran ausgehöhlt wird und sich schlussendlich eine Pore bildet. Im Gegensatz zum Fassdauben-Modell sind die Poren von polaren Kopfgruppen umgeben. Somit sind diese Poren von polaren Kopfgruppen und den hydrophilen Oberflächen der Peptide ausgekleidet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Poren kurzlebig sind und ihre Auflösung zu einer nicht-lytischen Membrantranslokation der Peptide führen kann.^[34]

Das dritte Modell wird Teppich-Modell genannt (Abbildung 1.8). Es wurde erstmals verwendet um die Membraninteraktionen von Dermaseptin zu beschreiben, welches aus dem Baumfrosch *Phyllomedusa sauvagii* isoliert wurde. Das Teppich-Modell ist eigentlich der Extremfall des Ringförmige-Poren-Modells.

Auch hier sind die Peptide zunächst parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Überschreitet die Konzentration ein kritisches Level, so reorientieren sich die Peptide und formen ringförmige Poren. Irgendwann werden diese Poren zu Inseln in der Membran, was schlussendlich zum Kollaps der Membran via Destabilisierung und Micellisierung führt.^[35,36]

Ein weiteres Modell ist das Shai-Huang-Matsuzaki-Modell (SHM).^[6,37] Dieses wurde erstmals von Zasloff *et al.* beschrieben und versucht die verschiedenen Modelle zu

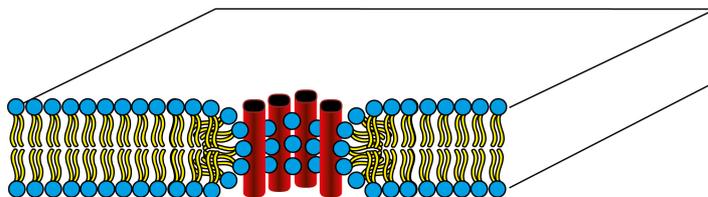


Abbildung 1.7: Ringförmige-Poren-Modell.

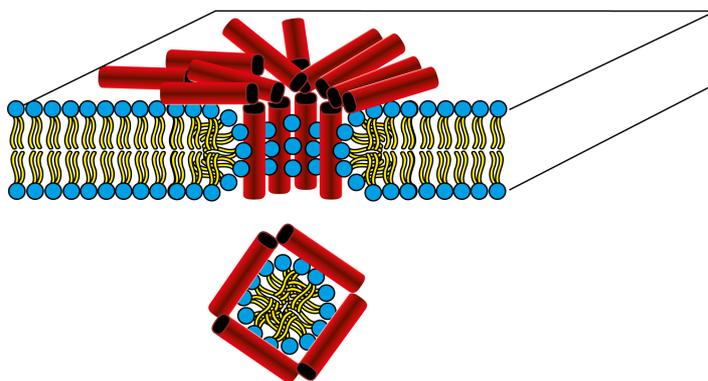


Abbildung 1.8: Teppich-Modell.

vereinen und in eine zeitliche Reihenfolge zu bringen. Das SHM-Modell ist in Abbildung 1.9 gezeigt.

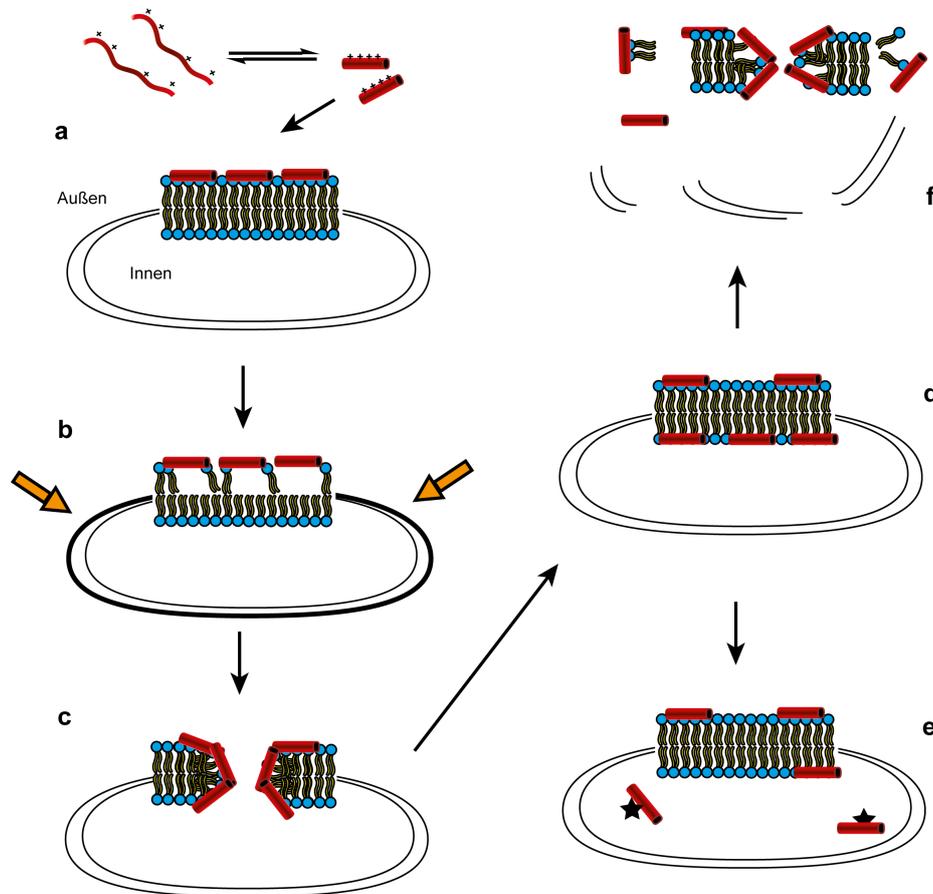


Abbildung 1.9: Shai-Huang-Matsuzaki-Modell.^[6,37]

Zuerst werden die α -helikalen AMPs von der negativ geladenen äußeren Oberfläche der Membran der Bakterien angezogen (a). Anschließend binden die Peptide an die geladenen Membranen und bedecken sie wie ein Teppich. Dann werden diese AMPs in die Membran inkorporiert, welches von einer Ausdünnung der äußeren Lipidschicht begleitet wird (b). Dies führt zu einer Flächenvergrößerung relativ zur inneren Lipidschicht und resultiert in einer Deformation der Doppelschicht (Orangene Pfeile)(c). Es treten "Wurmlöcher" und durchlässige Poren auf, welche die Translokation von Lipiden und AMPs ermöglichen (d). In einigen Fällen kommt es zur Diffusion der AMPs zu intrazellulären Zielen (e). In anderen Fällen tritt Fragmentierung auf und eine Zerstörung der Membran kann einsetzen (f).

1.7. Die Familie der Magainin-Peptide

Es hat sich gezeigt, dass die Haut von Amphibien eine reiche Quelle antimikrobiell aktiver Substanzen ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide der Magainin-Familie stammen aus dem afrikanischen Frosch *Xenopus laevis*. Dieser Frosch gehört zur Familie *Pipidae*, welche hauptsächlich in Afrika südlich der Sahara vorkommt.^[38] Verschiedene Varianten dieser Peptide kommen in den verschiedenen Spezies der Familie

Pipidae vor.^[38] Diese Peptide werden in den während der Metamorphose erstmals auftretenden Drüsen der Haut gefunden.^[39]

1.7.1. PGLa

Die Existenz von PGLa wurde 1983 durch Untersuchung einer cDNA-Bibliothek von Hautsekreten von Amphibien, auf der Suche nach Peptiden, welche verwandt sind mit Hormonen und Neurotransmittern von Säugetieren, von Kreil *et al.* vorhergesagt.^[40] Dieses aus 24 Aminosäuren bestehende Peptid wurde PYLa genannt: 2 Jahre später konnte ein sehr ähnliches Molekül tatsächlich isoliert werden, welches nun PGLa (Peptid von Glycin nach Leucinamid) genannt wurde und 21 Aminosäuren enthielt.^[41] Die Sequenz ist in Tabelle 1.3 gezeigt.

Tabelle 1.3: Sequenzen von PGLa und MSI-103.^[42]

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa	-	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
MSI-103	-	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-NH ₂

PGLa ist ein kationisches, lineares, α -helikales AMP. Es hat eine Gesamtladung von +5 und ist wasserlöslich.^[43] In wässriger Umgebung liegt es als ungeordnete Struktur vor. Sobald das Peptid an Lipiddoppelschichten bindet, formt es eine α -helikale Struktur. Diese Struktur ist amphipatisch, d. h. es gibt einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich. Dieser amphipatische Charakter wird durch die Helikale-Rad-Darstellung in Abbildung 1.11 verdeutlicht. Hier sind hydrophobe Aminosäuren in gelb, hydrophile Aminosäuren je nachdem ob geladen oder ungeladen verschiedenfarbig (blau - positiv geladen, hellblau - polar) und Glycine in grün gezeigt. PGLa ist aktiv gegen verschiedene Mikroorganismen und dient dem Frosch vermutlich als Verteidigungsmechanismus gegen eben jene. PGLa wurde oft eingesetzt um Peptid-Membran-Interaktionen zu untersuchen.^[38] In Untersuchungen von Glaser *et al.* mittels Festkörper-NMR konnte gezeigt werden, dass das Peptid die Fähigkeit besitzt sich in Lipiddoppelschichten zu neigen. Bei niedrigen Konzentrationen (P/L) liegt es flach auf der Membran (S-Zustand). Bei hohen Konzentrationen neigt es sich in die Membran (T-Zustand). Dies führt zu der Vermutung, dass dieses Peptid bei hohen Konzentrationen dimerisiert (Homodimer).^[44] Die Orientierungsmöglichkeiten eines AMPs sind in Abbildung 1.10 dargestellt.

Des Weiteren konnte von Afonin *et al.* gezeigt werden, dass PGLa bei hohen Konzentrationen, abhängig von der Temperatur, unterschiedliche Orientierungen in DMPC/DMPG einnimmt. Bei sehr hohen Temperaturen (> 45 °C) orientiert sich PGLa an der Oberfläche (S-Zustand). Zwischen 25 °C und 45 °C ist es in einem T-Zustand orientiert (Homodimer) und bei

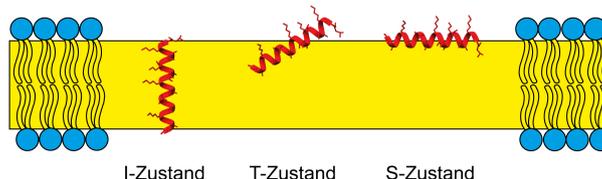


Abbildung 1.10: Orientierungsmöglichkeiten eines AMPs in Lipiddoppelschichten (I-, T-, S-Zustand).

bei

Temperaturen unter 25 °C (Subgelphase) orientiert es sich in einen transmembranen Zustand (I-Zustand).^[45] Es wurden Versuche unternommen PGLa zu optimieren, d. h. die biologische Aktivität zu steigern. Einige Vertreter wurden von Maloy *et al.* untersucht.^[42] Ein Vertreter, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist MSI-103. Die Sequenz von MSI-103 ist in Tabelle 1.3 gezeigt und besteht dreimal aus der gleichen Aminosäureabfolge ([KIAGKIA]₃). Es zeigt eine höhere Aktivität und ähnliche Orientierungseigenschaften wie PGLa auf Modellmembranen. Es ist in wässriger Umgebung auch ungeordnet und bildet eine α -helikale Struktur aus sobald es an Lipiddoppelschichten bindet.^[46] Die Sequenzen von MSI-103 und PGLa sind in der Helikalen-Rad-Darstellung in Abbildung 1.11 gezeigt.

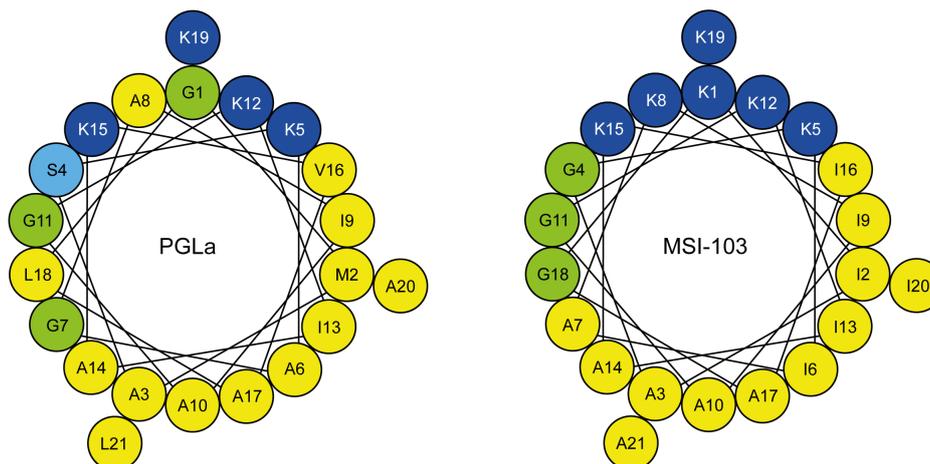


Abbildung 1.11: Sequenzen der Peptide PGLa (links) und MSI-103 (rechts) in der Helikalen-Rad-Darstellung. Die Aminosäuren sind farblich in Gruppen eingeteilt (Positiv geladen - dunkelblau, polar - hellblau, Glycin - hellgrün, hydrophob - gelb).

1.7.2. Magainin 2

Über die Isolation der Magainine wurde erstmals von M. Zasloff 1987 berichtet. Er beschrieb zwei Peptide, die 23 Aminosäuren enthielten, welche sich an zwei Positionen unterschieden, wasserlöslich waren und antimikrobielle Aktivität zeigten. Eine Analyse der cDNA zeigt, dass beide Moleküle vermutlich aus einem größeren Vorläuferprotein entstammen.^[9] Die Sequenzen der beiden Peptide sind in Tabelle 1.4 gezeigt.

Tabelle 1.4: Von M. Zasloff aus *X. laevis* isolierte Magainine.

Peptid	Sequenz
Magainin 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-OH
Magainin 2	GIGKFLHSA K KFGKAFVGEIM S -OH

Magainin 2 (Mag2) ist von den Magaininen das wesentlich intensiver untersuchte Peptid. Es gehört auch zur Klasse der linearen, kationischen α -helikalen AMPs und ist wasserlöslich. Die Gesamtladung des Peptids ist +3 und es ist im Gegensatz zu PGLa und MSI-103 kein Amid. Auch dieses Peptid ist in wässrigem Milieu ungeordnet und bildet bei Bindung an Lipiddoppelschichten eine α -helikale Struktur aus.^[47] Die Amphipathizität dieser Helix ist durch die Darstellung als helikales Rad in Abbildung 1.12

verdeutlicht. Auch Mag2 ist gegen Mikroorganismen aktiv und wurde daher mittels Festkörper-NMR untersucht. Es konnte von Bechinger *et al.* mit dem Mag2 amid und von Strandberg *et al.* mit Mag2 gezeigt werden, dass sich dieses Peptid an der Oberfläche der Membranen orientiert (S-, T-Zustand).^[26,48,49]

Mittels Röntgenbeugungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Mag2 Konzentrationen unterhalb einer kritischen, lytischen Konzentration zu einer Ausdünnung der Membran führen.^[50] Bei hohen Peptidkonzentrationen kommt es zur Porenbildung. Als Mechanismus wurde die ringförmige Pore vorgeschlagen. Mag2 ist somit auch eines der Modellpeptide für diese Art der Pore.^[51] Die Aktivität, die dieses Peptid gegen Mikroorganismen zeigt, ist eher mittelmäßig im Vergleich mit Vertretern seiner Klasse (z. B. PGLa). Aus diesem Grund wurde auch in diesem Fall der Versuch unternommen die Aktivität dieses Peptids durch Mutationen zu erhöhen und zeitgleich die hämolytische Aktivität zu senken.^[42,52-55] Vor allem Änderungen der Gesamtladung führen zu einer erhöhten Aktivität.^[42,54]

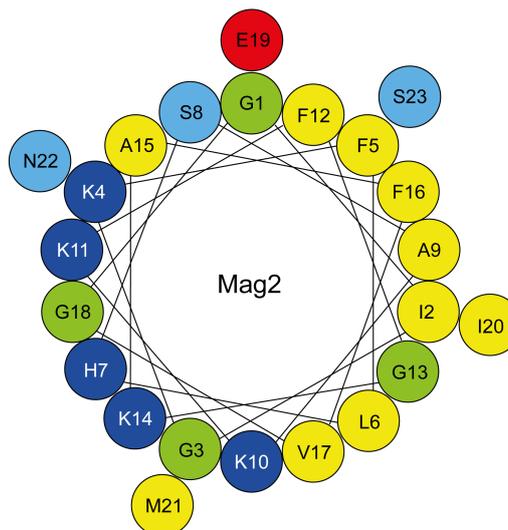


Abbildung 1.12: Mag2 in der Helikalen-Rad-Darstellung. Die Farbgebung der Aminosäuren ist wie in Abbildung 1.11 (Rot - negativ geladen).

1.7.3. Synergie zwischen PGLa und Magainin 2

Die zwei antimikrobiellen Peptide PGLa und Mag2 zeigen Synergie, d. h. die Peptide verstärken sich gegenseitig und sind in der Mischung wesentlich aktiver als die Einzelkomponenten. Dies konnte von Westerhoff *et al.* und Vaz Gomes *et al.* mit *E. coli* Bakterien, Tumorzellen und proteinfreien Liposomen gezeigt werden.^[56,57] In fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von Matsuzaki *et al.* konnte gezeigt werden, dass die höchste synergistische Interaktion in der 1:1-Mischung stattfindet (Abbildung 1.13).^[58] Hierbei wurden EYPG LUV's verwendet, da die Peptide unterschiedlich geladen sind und eine unterschiedlich starke Bindung ausgeschlossen werden sollte. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die zwei Peptide ein Heterodimer bilden. Festkörper-NMR spektroskopische Untersuchungen von Tremouilhac *et al.* haben gezeigt, dass sich PGLa in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in eine transmembrane Orientierung begibt.^[59] Die Orientierung von Mag2 wurde auch untersucht und es konnte von Salnikov *et al.*^[60] und Strandberg *et al.*^[26] gezeigt werden, dass sich Mag2 in Gegenwart einer equimolaren Menge an PGLa an der Membranoberfläche orientiert (T-Zustand).^[26,60]

Eine Querverknüpfungsstudie von Hara *et al.*, mit an den Termini um Cystein erweiterten Peptiden, zeigte, dass die über die gleichen Termini verknüpften Peptide eine höhere Aktivität als die über entgegengesetzte Termini verknüpfte Peptide zeigen.

Dies führte zur Vermutung, dass die Peptide ein paralleles Heterodimer bilden.^[61]

Auf Grund dieser Wechselwirkung sind diese zwei Peptide interessanter als gewöhnliche AMPs. Aus der Kenntnis des Mechanismus können neue Konzepte zur Wirkstoffverstärkung anderer antimikrobiell aktiver Moleküle entwickelt werden. Genauere mechanistische Details zu finden ist Ziel dieser Arbeit und wird in den nächsten Kapiteln näher behandelt.

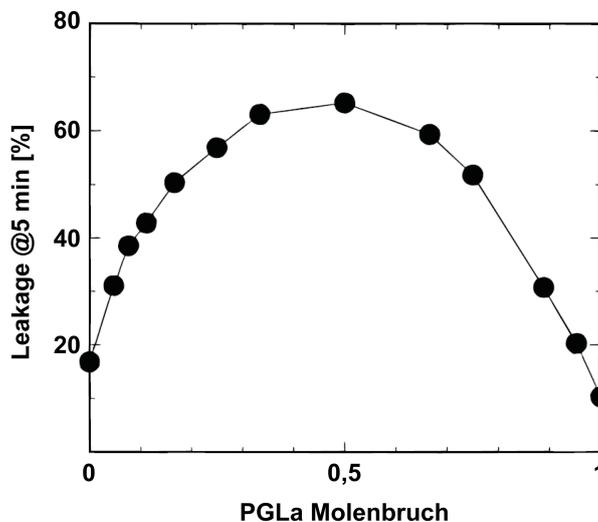


Abbildung 1.13: Durch verschiedene Peptid-zu-Peptid-Verhältnisse verursachtes Leakage aufgetragen gegen den PGLa Molenbruch.^[58]

2. Zielsetzung

- In Zuge dieser Arbeit sollte das Orientierungsverhalten der aus *X. laevis* isolierten Peptide PGLa und Mag2 alleine und in einer equimolaren Mischung in unterschiedlichen Lipidsystemen mittels ^{15}N - und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht werden. Die Lipide und Lipidsysteme sollten in Alkylkettenlänge, Sättigung der Alkylketten, Zahl der Alkylketten und der Art der Kopfgruppe variieren. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob AMPs eine von der spontanen Krümmung von Lipidsystemen abhängige Orientierung zeigen.
- Die aus der Literatur bekannte Hypothese, dass PGLa und Mag2 in der 1:1-Mischung am effektivsten sind, sollte für die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten, experimentellen Aufbauten untersucht werden. Ein weiteres Ziel der Untersuchungen war, wann PGLa und Mag2 in Wechselwirkung treten. Geschieht dies schon in Lösung oder sind die Lipide der cytoplasmatischen Membran mit involviert? Konzentrationsabhängige Untersuchungen in Gegenwart von Lipiden sollten Aufschluss über die Stärke der Wechselwirkung und die Kooperativität zwischen den Molekülen geben.
- Durch Einführen von auf Arbeitshypothesen basierenden Veränderungen in den Peptiden sollte Aufklärung über die Art der Wechselwirkung zwischen PGLa und Mag2 erlangt werden. Basierend auf verschiedenen Wechselwirkungstypen sollten Mutationsgruppen entwickelt werden, welche die Interaktion unterbinden. Dies sollte Aufschluss über die Natur der Wechselwirkung geben und Rückschluss auf involvierte Aminosäuren geben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Chemikalien

Während der Syntheseschritte, der Vorbereitung der Proben für die CD-, NMR-, Fluoreszenz-Spektroskopie und Mikrobiologie wurden die in Anhang A in Tabelle A.3 aufgelisteten Chemikalien eingesetzt. Es wurden Verbrauchsmaterialien von *Discardit*, *Eppendorf*, *VWR*, *American National Can* und *Falcon* eingesetzt.

3.1.2. Festphasenpeptidsynthese

Ein Teil der Sequenzabschnitte wurden an einem Mikrowellensyntheseautomat der Firma *CEM* und einem Syntheseautomaten der Firma *MultiSynTech* hergestellt. Die einzelnen Bauteile sind in Tabelle 3.1 angeführt.

Tabelle 3.1: Bei der Festphasenpeptidsynthese verwendete Geräte.

Material	Firma
Analysenwaage BP 301 S	<i>Sartorius</i> , Göttingen, Deutschland
Discover (Mikrowellenteil)	<i>CEM</i> , Kamp-Lintfort, Deutschland
Liberty (Syntheseautomat)	<i>CEM</i> , Kamp-Lintfort, Deutschland
Syro II (Syntheseautomat)	<i>MultiSynTech</i> , Witten, Deutschland
Manuelle Reaktoren mit Stempel und Fritten	<i>Biotage</i> , Uppsala, Schweden
Software: Pepdriver, Version 2.5.4	<i>CEM</i> , Kamp-Lintfort, Deutschland
Zentrifuge 3-18K	<i>Sigma</i> , Osterode, Deutschland

3.1.2.1. Peptide

In Tabelle 3.2 bis Tabelle 3.8 sind alle Peptide angeführt, die im Laufe dieser Doktorarbeit verwendet wurden. Die Reinigungsgradienten, Ausbeuten und molaren Massen sind in Anhang A in Tabelle A.1 und Tabelle A.2 angeführt.

Tabelle 3.2: Wildtypen und ^{15}N -markierte Wildtypen.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
Mag2-WT ^a	-	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH
Mag2- ^{15}N -L6	Leu6	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH
MSI-103 ^a	-	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-NH ₂
MSI-103- ^{15}N -A10	Ala10	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-NH ₂
PGLa-WT ^a	-	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PGLa- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂

^aSynthetisiert und gereinigt von Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck.

Tabelle 3.3: Im Zuge der Doktorarbeit verwendete CF₃-L-Bpg-markierte Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
Mag2- ^{19}F -L6	Leu6	GIGKF (CF ₃ -L-Bpg) HSAKKFGKAFVGEIMNS
Mag2- ^{19}F -G13	Gly13	GIGKFLHSAKKF (CF ₃ -L-Bpg) KAFVGEIMNS
Mag2- ^{19}F -A15 ^a	Ala15	GIGKFLHSAKKFGK (CF ₃ -L-Bpg) FVGEIMNS
Mag2- ^{19}F -F16	Phe16	GIGKFLHSAKKFGKA (CF ₃ -L-Bpg) VGEIMNS
Mag2- ^{19}F -V17	Val17	GIGKFLHSAKKFGKAF (CF ₃ -L-Bpg) GEIMNS
Mag2- ^{19}F -G18	Gly18	GIGKFLHSAKKFGKAFV (CF ₃ -L-Bpg) EIMNS

^aSynthetisiert und gereinigt von Günther Pritz.

Tabelle 3.4: Für die Untersuchungen der Ladungsinteraktion verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa-K5E	-	GMAS E AGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PGLa-K12E	-	GMASKAGAIAG E IAKVALKAL-NH ₂
PGLa-K15E	-	GMASKAGAIAGKIA E VALKAL-NH ₂
PGLa-K19E	-	GMASKAGAIAGKIAKVAL E AL-NH ₂
PGLa-K19E- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKAGAI A GKIAKVAL E AL-NH ₂
Mag2-amid	-	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS- NH₂
Mag2-E19Q	-	GIGKFLHSAKKFGKAFV Q IMNS-OH
Mag2-E19K	-	GIGKFLHSAKKFGKAFV K IMNS-OH
Mag2-E19K-amid	-	GIGKFLHSAKKFGKAFV K IMNS- NH₂

Tabelle 3.5: Für die Untersuchungen der PtM-Mutationen^a verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PtM-C1	-	GMASKAGAIAGKIAK I AGK I A-NH ₂
PtM-C1- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKAGAI A GKIAK I AGK I A-NH ₂
PtM-A1 ^b	-	KI AG KI AK I AGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A1- ^{15}N -A10 ^b	Ala10	KI AG KI AK I AGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A2 ^c	Ala10	KI AG K AGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A2- ^{15}N -A10 ^c	Ala10	KI AG K AGAI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A3- ^{15}N -A10 ^d	Ala10	GMASK I AK I AGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A6I- ^{15}N -A10	Ala10	GMASK I GAI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-G7A- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKA A AI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A8K- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKAG K I A GKIAKVALKAL-NH ₂

^aPtM bedeutet „from PGLa to MSI-103“.

^bPtM-A1 wurde im Zuge dieser Arbeit von PtM-N2 nach PtM-A1 umbenannt.

^cPtM-A2 wurde im Zuge dieser Arbeit von PtM-N1 nach PtM-A2 umbenannt.

^dPtM-A3 wurde im Zuge dieser Arbeit von PtM-N3 nach PtM-A3 umbenannt.

Tabelle 3.6: Für die Untersuchungen der MtP-Mutationen^a verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
MtP-I6A- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGK A AKI A GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKI G KI A GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-K8A- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIA A I A GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-G4S-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KI A S K I G KI A GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-I6A-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGK A GKI A GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-K8A-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKI G A I GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-A3- ¹⁵ N-A10 ^b	Ala10	KIAGK A G A I A GKI A KIAGKIA-NH ₂
MtP-A4- ¹⁵ N-A10 ^{c,d}	Ala10	KIAGK A G A I A GKI A KI L KIA-NH ₂
MtP-A7G-G18L- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKI G KI A GKI A KI L KIA-NH ₂

^aMtP bedeutet „from MSI to PGLa“.

^bMtP-A3 wurde im Zuge dieser Arbeit von MtP-Nx3 nach MtP-A3 umbenannt.

^cMtP-A4 wurde im Zuge dieser Arbeit von MtP-Nx4 nach MtP-A4 umbenannt.

^dSynthetisiert und gereinigt von Olga Kukhareno.^[62]

Tabelle 3.7: Für die Untersuchungen des GxxxG-Motivs verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa-G11I- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKAGAI I KI A KV A LKAL-NH ₂
PGLa-GS1- ¹⁵ N-A10 ^a	Ala10	GMASKA A I A GKI G KV A LKAL-NH ₂
PGLa-GS2- ¹⁵ N-A10 ^a	Ala10	GMASKA I A I K G A K V A LKAL-NH ₂

^aGS bedeutet „Gly-shift“.

Tabelle 3.8: Für die Untersuchungen der MtM-Mutationen^a verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
MtM-C1	-	KIAGKI A KIAGKI A KI A V G E I M N S-OH
MtM-C2	-	G IAGKI A KI A KI A KI A V G E I M N S-OH
MtM-C3	-	K FAG K F A KIAG K F A KI A V G E I M N S-OH
MtM-C4	-	K G AGKI A K S A K KI A K A V G E I M N S-OH
MtM-GIG	-	G I G KI A KIAGKI A KIAGKIA-NH ₂

^aMtM bedeutet „from MSI to Mag2“

3.1.2.2. Bei der Festphasenpeptidsynthese zur Abspaltung vom Harz verwendete Lösungen

Folgende Lösungen wurden zur Abspaltung der Peptide vom Harz verwendet:
Abspaltungslösung 1: TFA:TA:H₂O:EDT:TIS:Phenol (77,5:5:5:2,5:5:5% v/v).

Abspaltungslösung 2: TFA:TA:H₂O:EDT:Me₂S (82,5:5:5:2,5:5:5% v/v), 100 µL TIS, 50 mg NH₄I, 75 mg Phenol pro mL.^[63]

Abspaltungslösung 3: TFA:TIS:H₂O (92,5:5:2,5% v/v).

3.1.2.3. Blockierung durch Acetylierung von nicht reagierten Eduktmolekülen

Um das Weiterwachsen von unerwünschten Peptidfragmenten zu verhindern, wurden diese mittels Essigsäureanhydrid am N-Terminus *N*-Acetyl-geschützt (*engl.*: capping). Für diese Art von Reaktion wurde die folgende Lösung verwendet:

Acetylierungs-Lösung: 80 mg HOBt, 2,2 mL Essigsäureanhydrid, 1,0 mL DIPEA in 40 mL NMP.

3.1.3. Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC

Die Peptide wurden mittels RP-HPLC gereinigt. Die dafür verwendeten Geräte sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Material RP-HPLC.

Material	Firma
Lyophilisator	<i>Christ</i> , Osterode, Deutschland
MD-2087 Plus Intelligent Multiwavelength Detektor	<i>Jasco</i> , Tokyo, Japan
PU-2087 Plus Intelligent Pumpen	<i>Jasco</i> , Tokyo, Japan
Säulenofen	<i>Jasco</i> , Tokyo, Japan
Semipräparative Säule, C18 CAT.#218TP1010	<i>W.R. Grace & Co.</i> , USA
Software: Chrompass	<i>Jasco</i> , Tokyo, Japan
Varian Säule	<i>Varian</i> , USA

3.1.3.1. Verwendete Elutionsmittel in der RP-HPLC

Folgende Laufmittel wurden zur Aufreinigung der Rohpeptide verwendet:

Laufmittel A: 90 % H₂O, 10 % AN, 5 mM HCl

Laufmittel B: 10 % H₂O, 90 % AN, 5 mM HCl

3.1.4. Produktkontrolle

Die verschiedenen Synthese- und Reinigungsschritte wurden mittels LC-MS überprüft. Für die Flüssigchromatographie wurde ein Standardgradient von 10-90 % B über 32 min. bei 35 °C, 5 mM TFA und einer Flussrate von 0,35 mL/min verwendet. Die Bausatzelemente der LC-MS sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Tabelle 3.10: Material LC-MS.

Material	Firma
ESI.microTOF Massenspektrometer	<i>Bruker Daltonics</i> , Bremen, Deutschland
LC-System Agilent 1100 Series	<i>Agilent</i> , Santa Clara, USA
Software: Hystar	<i>Bruker Daltonics</i> , Bremen, Deutschland

3.1.5. Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Für die Untersuchung der Sekundärstruktur wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Die hierbei verwendeten Geräte sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.11: Material CD-Spektroskopie.

Material	Firma
CD-Spektropolarimeter J-815	<i>Jasco</i> , Tokyo, Japan
Küvetten	<i>Hellma</i> , Mühlheim, Deutschland
Software: Spectra Manager	<i>Jasco</i> , Tokyo, Japan
Ultraschallbad: UTR200	<i>Hielscher Ultrasonics GmbH</i> , Teltow, Deutschland

3.1.6. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 3.12 zu sehen.

Tabelle 3.12: Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendete Geräte und Materialien.

Material	Firma
Deckgläser: 7,5 mm x 15 mm, 7,5 mm x 9 mm	<i>Marienfeld GmbH & Co KG</i> , Lauda-Königshofen, Deutschland
Feinwaage	<i>Sartorius</i> , Göttingen, Deutschland
Hydratationsbox	<i>Tupperware</i> , Orlando, USA
Mikroliterspritze, 50 μ L	<i>Hamilton</i> , Brüttisellen, Schweiz
NMR-Spektrometer Bruker Avance 500 MHz	<i>Bruker</i> , Rheinstetten, Deutschland
NMR-Spektrometer Bruker Avance 600 MHz	<i>Bruker</i> , Rheinstetten, Deutschland
Ofen: Heraeus	<i>Kendro</i> , Hanau, Deutschland
Software: Topspin, Version 2.1 & Version 3.2	<i>Bruker</i> , Rheinstetten, Deutschland
Ultraschallbad: Ultrasonic cleaner	<i>VWR</i> , Darmstadt, Deutschland

3.1.7. Fluoreszenzspektroskopie

In Tabelle 3.13 sind die bei der Fluoreszenzspektroskopie verwendeten Geräte und Materialien aufgelistet.

Tabelle 3.13: Für die Fluoreszenzspektroskopie verwendete Geräte und Materialien.

Material	Firma
Spektrofluorimetersystem Fluoromax-2	<i>HORIBA Jobin Yvon</i> , Unterhaching, Deutschland
Laborzentrifuge 2-6	<i>Sigma Laborzentrifugen GmbH</i> , Osterode, Deutschland
Avanti Mini-Extruder	<i>Avanti Polar Lipids</i> , Alabama, USA
Filter 100 nm	<i>Avanti Polar Lipids</i> , Alabama, USA
Quarzküvetten, 2 ml: Hellma 101 QS	<i>Hellma Analytics</i> , Mühlheim, Deutschland
Datamax Std. v2.20 Software	<i>HORIBA Jobin Yvon</i> , Unterhaching, Deutschland

3.1.8. Hämolyse

Die für die Hämolyse verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 3.14 aufgelistet.

Tabelle 3.14: Verwendete Geräte und Materialien.

Material	Firma
6K15 Zentrifuge	<i>Sigma Laboratory Centrifuges</i> , Osterode, Deutschland
SmartSpecPlus Spectrophotometer	<i>Bio-Rad</i> , Hercules, USA

3.1.9. Biologische Tests

Die für die biologischen Test verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.15: Verwendete Geräte und Materialien.

Material	Firma
Unimax 1010	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG</i> , Schwabach, Deutschland
Inkubator 1000	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG</i> , Schwabach, Deutschland
Stammhaltung-Cryobank-System	<i>MAST Diagnostica GmbH</i> , Reinfeld, Deutschland
Systec VX 65 Autoklav	<i>Systec GmbH</i> , Wetztenberg, Deutschland
Tiefkühlagerschrank Herafreeze HFU 586 basic CB 150-CO ₂ -Inkubator	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland <i>Binder GmbH</i> , Tuttlingen, Deutschland
SmartSpecPlus Spectrophotometer	<i>Bio-Rad</i> , Kalifornien, USA

3.1.10. Peptidgrafiken

Alle grafischen Darstellungen der Peptide wurden mit der Software Chimera der Universität Kalifornien erstellt. Die Torsionswinkel der α -Helices waren $\varphi = -57,0^\circ$ und $\psi = -47,0^\circ$.

3.2. Methoden

3.2.1. Festphasenpeptidsynthese

Alle Peptide wurden mittels der von Nobelpreisträger Robert B. Merrifield entwickelten Festphasenpeptidsynthese hergestellt.^[64] Hierbei wird die erste Aminosäure auf einem Harz immobilisiert und Schritt für Schritt das Peptid synthetisiert. Dies vereinfacht die Wasch- und Reaktionsschritte stark, da das Molekül auf einer festen

Phase immobilisiert ist. Bei den Harzen handelt es sich meist um unlösliche Polymere, was den Einsatz von organischen Lösungsmitteln erlaubt. An dieses Harz ist ein Linker geknüpft, an den das Peptid geknüpft ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Linker sind in Abbildung 3.1 gezeigt. In allen Synthesen wurde eine Fmoc-Strategie verwendet. Diese Strategie arbeitet mit orthogonalen Schutzgruppen. Hierbei

ist Fmoc eine temporäre Schutzgruppe und wird vor jeder Aminosäurekupplung vom Peptid abgespalten. Eine schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Zudem gibt es, um die Seitenketten der Aminosäuren zu schützen, Schutzgruppen (SG), die unter zu Fmoc orthogonalen Reaktionsbedingungen abspaltbar sein müssen. Für alle Synthesen der markierten Mag2-Analoga wurde ein Wang-Harz verwendet,

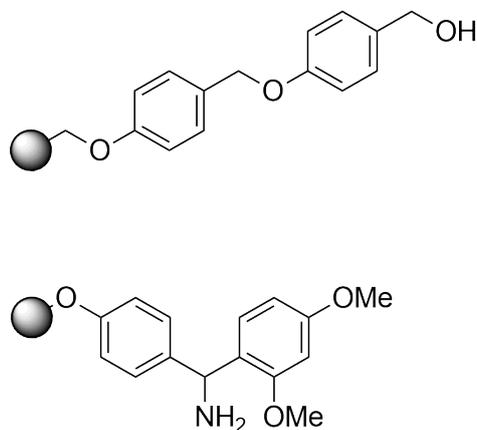


Abbildung 3.1: Unterschiedliche Linker (Wang - oben, Rink - unten).^[65,66]

auf welchem Fmoc-geschütztes Serin immobilisiert war. Die Beladung des Harzes mit Serin war 0,38 mmol/g. Auf diesem Harz fand die Synthese statt, welche in einer Ansatzgröße von 250 μmol durchgeführt wurde. Für alle Synthesen der PGLa-Analoga und allen anderen Peptide mit C-terminalen Carbonsäureamid wurde ein Rink-Harz verwendet. Auf diesem Harz war keine Aminosäure immobilisiert. Die Beladung des Harzes war 0,6 mmol/g und die Synthesen erfolgten in einer Ansatzgröße von 100 μmol .

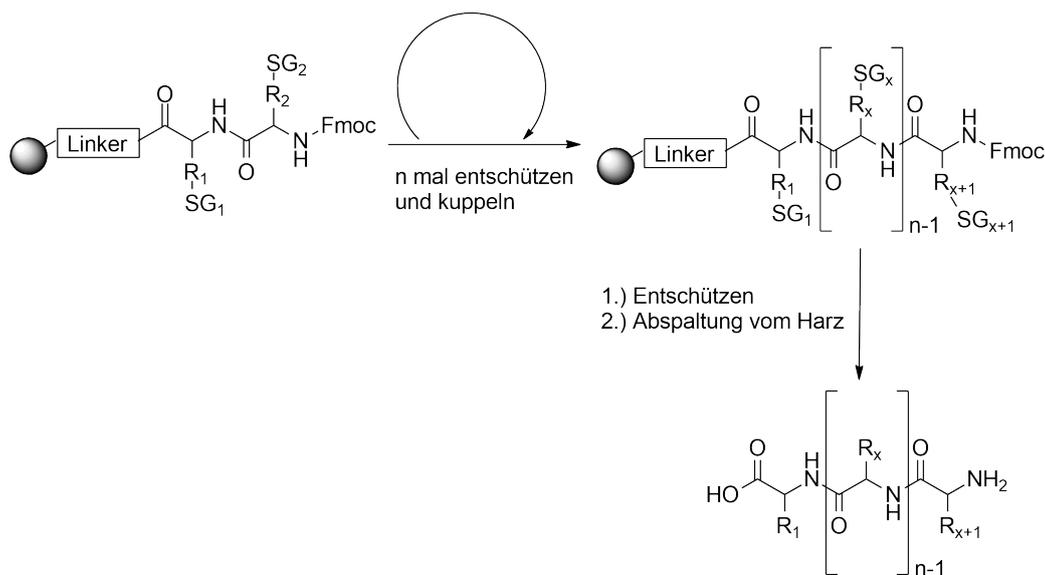


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese (R - Rest, SG - Schutzgruppe).

3.2.1.1. Synthese der ^{15}N -markierten-Magainin-Analoga

Der erste Abschnitt der Synthese, beginnend mit Aminosäure 22, da Aminosäure 23 schon auf dem Harz immobilisiert war, wurde am Mikrowellensyntheseautomat (*CEM*) durchgeführt. Dieser Sequenzabschnitt endete mit der Aminosäure (AS) vor der zu markierenden Position. Anschließend erfolgte eine Acetylierung (Abschnitt 3.2.1.6), um ein Weiterwachsen unvollständiger Peptidfragmente zu verhindern. Dann wurde eine manuelle Kupplung der ^{15}N -markierten Aminosäure (Abschnitt 3.2.1.4.1) durchgeführt. Die in der Sequenz folgende Aminosäure wurde auch manuell gekuppelt (Abschnitt 3.2.1.5). Der restliche Sequenzabschnitt wurde am Mikrowellensyntheseautomat mit dem in Abschnitt 3.2.1.3 beschriebenen Standardprogramm durchgeführt. Anschließend wurde das Peptid mit 2,5 mL einer 20 %igen Piperidin/DMF-Lösung eine halbe Stunde lang entschützt. Darauf folgte das Waschen mit DMF (3 x 10 mL) und MeOH (3 x 10 mL). Über Nacht erfolgte eine Trocknung des Harzes unter vermindertem Druck. Daraufhin wurde die Abspaltung vom Harz durchgeführt (Abschnitt 3.2.1.9), wobei Abspaltungs-Lösung 1 verwendet wurde (1 mL pro 100 mg Harz). Die Produktkontrolle erfolgte durch Testabspaltungen (Abschnitt 3.2.1.8). Die Produktkontrolle fand an vier Stellen statt: Nach dem ersten Teilstück der Sequenz, nach der markierten AS, nach der darauffolgenden AS und nach der vollständigen Synthese vor dem Entschützungs-schritt.

3.2.1.2. Synthese der ^{15}N -markierten-PGLa und MSI-103-Analoga

Die Synthese erfolgte analog zu 3.2.1.1 beginnend mit Aminosäure 21 (21 AS gesamt), da keine Aminosäure auf dem Harz immobilisiert war. Die Synthese dieser Peptide erfolgt nicht am Mikrowellensyntheseautomat, sondern am multiplen Syntheseautomat (Syro II) bei RT mit einem zu Abschnitt 3.2.1.3 analogen Syntheseprogramm in offenen Reaktionsgefäßen. Im Falle der MSI-103-Analoga wurde zum Teil Abspaltungslösung 3 verwendet.

3.2.1.3. Syntheseprogramm am Mikrowellensyntheseautomat

Teilstücke der Mag2-Analoga wurden am Mikrowellensyntheseautomat der Firma *CEM* mit Standard-Fmoc Protokollen synthetisiert. Vor jedem Schritt erfolgten vier Waschzyklen mit NMP. Zuerst wurde das Harz mit 10 mL DMF und DCM (50% v/v) in einem 50 mL Reaktionsgefäß gequollen. Anschließend wurde das Harz in die Reaktionskammer transferiert. Vor jedem Kupplungsschritt erfolgte ein Entschützungs-schritt, welcher zweimal mit 10 mL 20%iger Piperidin-Lösung über eine Dauer von 3 min durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Kupplungszyklen eingeleitet. Hierbei wurden 5 mL Aminosäure-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$, AS_{x+1} in DMF), 2 mL HOBt/HBTU-Lösung (jeweils $c = 0,4 \text{ mol/L}$, 1:1 in DMF) und 1 mL DIPEA-Lösung ($c = 2 \text{ mol/L}$ in NMP) in die Reaktionskammer transferiert. Damit ergab sich das folgende Stoffmengenverhältnis: Auf Wang-Harz immobilisierte $\text{AS}_x/\text{AS}_{x+1}/\text{HBTU}/\text{HOBt}/\text{DIPEA}$ 1 : 4 : 3,2 : 3,2 : 8. Die Kupplungen wurden über einen Zeitraum von 5 min bei 75 °C durchgeführt. Um eine vollständige Reaktion zu erreichen wurde nach einem weiteren Waschschrift die Kupplung mit den gleichen Parametern wiederholt. Ausnahmen von diesem Protokoll waren Histidin und Lysin. Histidin neigt zur Racemisierung, daher wurden Kupplungen à 5 min bei 50 °C und anschließend

à 30 min bei RT durchgeführt. Diese Kupplungszyklen erfolgten dreimal, jeweils mit unterschiedlichen Kupplungsreagenzien, je ein Zyklus mit HBTU/HOBt/DIPEA, PyBOP/HOBt/DIPEA und HATU/HOBt/DIPEA. Der Zyklus für Lysin erfolgte mit den gleichen Kupplungsreagenzien wie Histidin bei 75 °C und RT.

3.2.1.4. Manuelle Kupplung der markierten Aminosäuren

3.2.1.4.1 ¹⁵N- und ¹⁹F-markierte Aminosäuren

Das Reaktionsgefäß der manuellen Kupplungen war ein manueller Reaktor (Spritze) mit Fritte und Stempel. Vor dem Syntheseschritt wurde die auf dem Harz immobilisierte Teilsequenz entschützt. Dann wurden 2,2 eq. Fmoc-¹⁵N-markierte Aminosäure, 1,9 eq. HOBt und 1,8 eq. HBTU in einem Falcon in 3 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 4,0 eq. DIPEA hinzugegeben. Die gesamte Lösung wurde anschließend 30 Sekunden mit einem Vortexschüttler durchmischt. Diese Lösung wurde zum Harz in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktion lief über Nacht bei RT. Anschließend wurde mit DMF (3 x 10 mL) gewaschen und eine Reaktionskontrolle mittels Testabspaltung durchgeführt.

3.2.1.5. Manuelle Kupplung der unmarkierten Aminosäuren

Vor dem Syntheseschritt wurde die auf dem Harz immobilisierte Teilsequenz entschützt. Dann wurden 6 eq. Fmoc-geschützte Aminosäure, 6 eq. HBTU und 6 eq. HOBt in einem Falcon in 3 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 12 eq. DIPEA hinzugegeben. Die gesamte Lösung wurde anschließend 30 Sekunden mit einem Vortexschüttler durchmischt, zum Harz in das Reaktionsgefäß gegeben und eine Stunde bei RT reagieren gelassen. Diese Kupplung wurde zweimal durchgeführt. Bei Histidin und Lysin wurde die doppelte Reaktionszeit veranschlagt. Zudem waren es drei Kupplungszyklen, welche zusätzlich zu HBTU/HOBt/DIPEA noch mit PyBOP/HOBt/DIPEA und HATU/HOBt/DIPEA durchgeführt wurden. Die molaren Verhältnisse der Kupplungsreagenzien entsprachen den oben aufgeführten für HBTU/HOBt. Anschließend wurde mit DMF (3 x 10 mL) gewaschen und die Reaktion mittels Testabspaltung auf Vollständigkeit überprüft.

3.2.1.6. Blockierung durch Acetylierung von nicht-reagierten Eduktmolekülen

Zu der auf dem Harz immobilisierten Teilsequenz im Reaktionsgefäß wurden 2,5 mL Acetylierungs-Lösung gegeben. Die Suspension wurde 30 min bei RT auf einem Schüttler durchmischt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3 x 10 mL) gewaschen.

3.2.1.7. Entschützen

Zu der auf dem Harz immobilisierten Teilsequenz im Reaktionsgefäß wurden 2,5 mL 20%ige Piperidin-Lösung gegeben. Die Suspension wurde 30 min bei RT auf einem Schüttler durchmischt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (3 x 10 mL) gewaschen.

3.2.1.8. Reaktionskontrolle mittels Testabspaltung

Nach erfolgter Reaktion wurde die auf dem Harz immobilisierte Teilsequenz in der Spritze mit DMF (3 x 10 mL) und MeOH (3 x 10 mL) gewaschen. Anschließend wurden 10 mg Harz entnommen und eine Stunde unter vermindertem Druck getrocknet. Das in der Spritze verbliebene Harz wurde in einigen mL DMF suspendiert. Nach dem Trocknen wurde das entnommene Harz eine Stunde mit 200 μ L Abspaltungs-Lösung versetzt. Diese Lösung wurde durch Filtration vom verbliebenen Harz abgetrennt und im Argonstrom evaporiert. Der Rückstand wurde mit Diethylether versetzt und abzentrifugiert. Nach dem Abdekantieren des Ethers wurde das Rohpeptid in AN/H₂O, 1:1 gelöst und mittels LC-MS auf Vollständigkeit der Reaktion geprüft.

3.2.1.9. Abspaltung vom Harz

Nach erfolgter Reaktion wurde das Harz in der Spritze mit DMF (3 x 10 mL) und MeOH (3 x 10 mL) gewaschen. Das Harz wurde eine Stunde unter vermindertem Druck getrocknet und anschließend mit 1 mL Abspaltungs-Lösung pro 100 mg Harz versetzt. Die Reaktionszeit betrug vier Stunden. Die Reaktion wurde im Falle von Abspaltungs-Lösung 1 und 3 bei RT, im Falle von Abspaltungs-Lösung 2 bei 0 °C durchgeführt. Die Vorgehensweise war analog zu Abschnitt 3.2.1.8 bis zum Lösen des Peptids. Die Peptidlösung wurde bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

3.2.2. Reinigung der Peptide mittels RP-HPLC

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte mit den im Anhang angeführten Gradienten. Es wurden alle Peptide im semipräparativen und präparativen Maßstab gereinigt. Zum Teil wurde auf eine Vorsäule verzichtet, da die hohe Verunreinigung der Rohpeptide zu einem Verstopfen der Vorsäule führte. Die Temperatur des Säulenofens betrug 35 °C. Die Flussrate betrug zwischen 7 mL/min und 15 mL/min.

3.2.3. Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Grundlage für Funktionsuntersuchungen von Biomolekülen, speziell α -helikalen AMPs mittels Festkörper-NMR, ist die Kenntnis der Sekundärstruktur. Eine seit den 1960er Jahren etablierte Methode ist die Zirkulardichroismus-Spektroskopie, oftmals auch als CD-Spektroskopie bezeichnet (*engl.*: circular dichroism). Die Chiralität der Peptide, hauptsächlich verursacht durch die asymmetrischen C α -Atome nahe den Peptidchromophoren bzw. den aromatischen Seitenkettenchromophoren, erlaubt den Zugang zu differentiellen Absorptionsspektren, die durch Wechselwirkung dieser Strukturen mit rechts- oder links- zirkular polarisiertem Licht auftreten.^[67] Der hierfür verantwortliche Zirkulardichroismus-Effekt hat seine Ursache in der unterschiedlich starken Absorption von rechts- bzw. links- zirkular polarisiertem Licht. In Abbildung 3.3a und Abbildung 3.3b ist linear polarisiertes und zirkular polarisiertes Licht gezeigt. Im Falle des linear polarisierten Lichtes schwingt der E-Feld-Vektor in einer Ebene orthogonal zur Ausbreitungsrichtung. Bei zirkular polarisiertem Licht rotiert der E-Feld-Vektor links- oder rechtsgängig um die Achse der Ausbreitungsrichtung. Linear polarisiertes Licht lässt sich auch als Summe von rechts- (**R**) und linksgängigem (**L**) zirkular polarisiertem Licht gleicher Intensität beschreiben. Wird das rechts- (**R**) bzw. linksgängige

zirkular polarisierte Licht unterschiedlich stark absorbiert, so erhält man nach dem Probendurchgang elliptisch polarisiertes Licht (Abbildung 3.4).

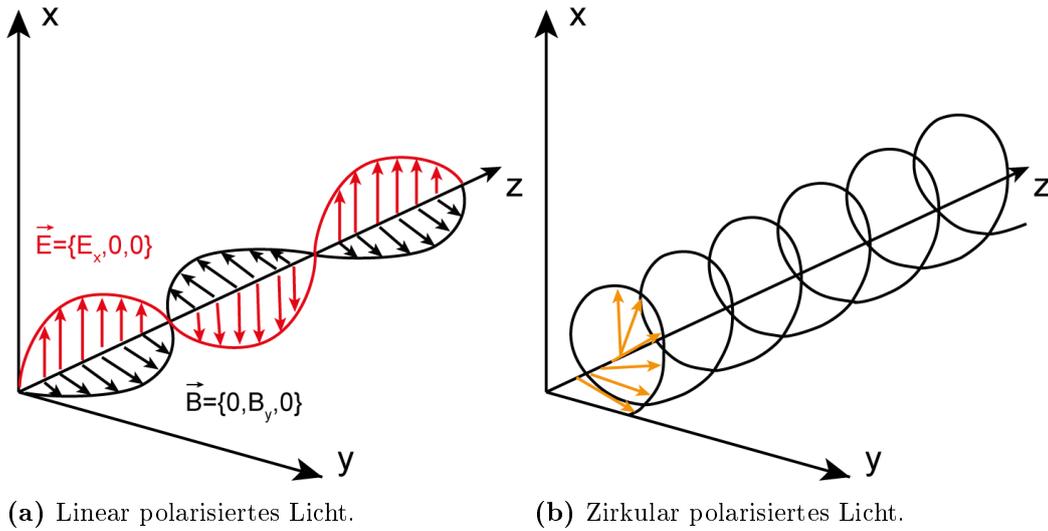


Abbildung 3.3: Gegenüberstellung von linear und zirkular polarisiertem Licht (\vec{E} : Vektor des elektrischen Feldes, \vec{B} : Vektor des magnetischen Feldes). Bearbeitet aus [68].

Das elliptisch polarisierte Licht lässt sich als Summe bzw. als Differenz der elektrischen Feldvektoren des links- und rechtsgängigen zirkular polarisierten Lichts darstellen. Der in Abbildung 3.4 gezeigte Winkel θ wird auch Elliptizität genannt. Bei einer gleich starken Absorption bzw. keiner Absorption ist die Strahlung nach dem Probendurchgang in der gleichen Ebene polarisiert. Die theoretischen Hintergründe der CD-Spektroskopie werden aus Übersichtlichkeitsgründen hier nicht angeführt und sind in Übersichtsartikeln und Lehrbüchern gut erklärt. In der Regel messen für die CD-Spektroskopie verwendete Spektropolarimeter die Absorptionsdifferenz (ΔA) der links- (A_L) und rechts- (A_R) zirkular polarisierten Komponente (Gleichung 3.1). Die in der Praxis ausgegebene Elliptizität θ ist durch Gleichung 3.2 gegeben.^[68]

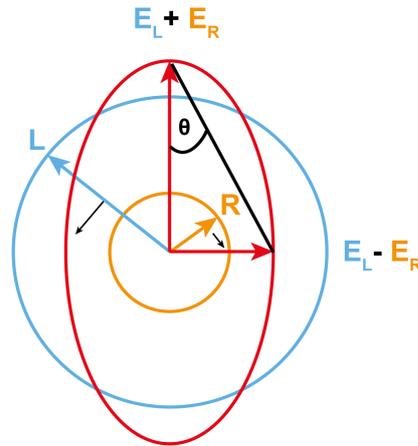


Abbildung 3.4: Durch unterschiedlich starke Absorption von rechts- und links polarisiertem Licht (orange und hellblau) entsteht elliptisch polarisiertes Licht (rot).

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3.1)$$

$$\tan(\theta) = \frac{E_L - E_R}{E_L + E_R} \quad (3.2)$$

Diese Berechnung beruht auf der trigonometrischen Funktion des Tangens. Verknüpft man diese Gleichung mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz^[69] (Gleichung 3.3, $I_L = E_L^2$, $I_R = E_R^2$), wobei I die Intensität des Lichts ist, so erhält man Gleichung 3.4.^[68] Hierbei ist I_0 die Intensität des eingestrahnten Lichts, I die Intensität des transmittierten Lichts, ϵ_λ der molare Extinktionskoeffizient, c_m die molare Konzentration, d die Schichtdicke der durchstrahlten Probe und θ_λ die wellenlängenabhängige Elliptizität.

$$I = I_0 \cdot \exp(-\epsilon_\lambda \cdot c_m \cdot d) \quad (3.3)$$

$$\theta_\lambda = \ln 10 \cdot \frac{180}{4\pi} (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c_m \cdot d \approx 33 \cdot \Delta\epsilon \cdot c_m \cdot d \quad (3.4)$$

Ist die Konzentration der Probe genau bestimmbar, wird die Absorption oftmals als mittlere residuale Elliptizität (MRE, *engl.*: Mean Residue Ellipticity) angegeben. Die mittlere residuale Elliptizität lässt sich aus der Elliptizität berechnen (Gleichung 3.5).^[70]

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta}{10 \cdot c_r \cdot d} \quad (3.5)$$

Hier ist c_r die molare Konzentration pro Peptidbindung und d die Schichtdicke. Das CD-Spektrum ist nichts anderes als der Dichroismus in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Die in Proteinen enthaltenen Chromophore absorbieren im nahen bzw. fernem UV-Bereich. Zu ihnen zählt die Peptidbindung, welche zwei charakteristische Absorptionsbanden hat. Sie sind in Abbildung 3.5 gezeigt. Durch Dekonvolution eines gemessenen CD-Spektrums in diese Basisspektren lassen sich

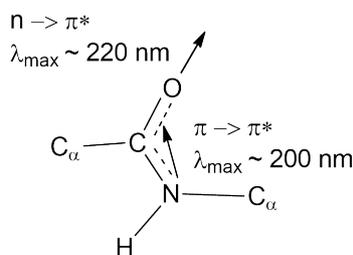


Abbildung 3.5: Möglichkeiten für elektronische Übergänge einer Peptidbindung.^[67]

die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen bestimmen. Die durch einen $n \rightarrow \pi^*$ Übergang hervorgerufene Bande bei 220 nm ist schwach und breit. Wesentlich intensiver ist die Absorptionsbande des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 200 nm.^[71] Ein Signal, das bei 175 nm als Schulter erscheint, wird Ladungstransfers zugeordnet. Die Sekundärstrukturen, die ein Protein bzw. Peptid annehmen kann, liefern unterschiedliche CD-Spektren und sind in Abbildung 3.6 gezeigt. Unterhalb von 185 nm ist der Dichroismus mit einer normalen Lichtquelle nicht messbar. Für diesen Wellenlängenbereich benötigt man Synchrotronstrahlung (SRCD).^[72] Die charakteristischen Banden von α -Helices sind Minima und liegen bei 222 nm und 208 nm. Sie besitzen zudem ein Maximum bei ca. 192 nm. β -Faltblätter haben ein kleines Minimum nahe bei 217 nm

($n \rightarrow \pi^*$) und eine positive Bande bei 197 nm mit ca. der halben Intensität des Signals einer α -Helix. Generell sind die Signalintensitäten von β -faltblattartigen Strukturen schwächer und strukturell vielfältiger. Polyprolin II-Helices haben eine stark negative Bande bei ca. 200 nm und eine variable positive Bande bei 215 - 230 nm. Ungeordnete Strukturen haben eine stark negative Bande bei ca. 198 nm.^[70,71]

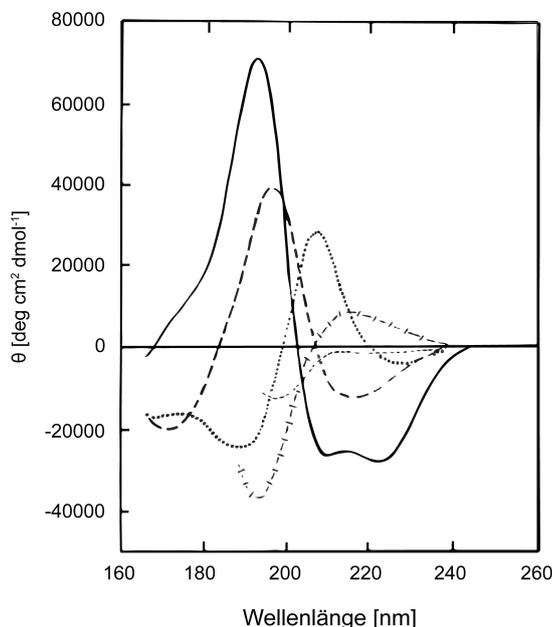


Abbildung 3.6: CD-Basispektren verschiedener Sekundärstrukturen. α -Helix - durchgezogene Linie, antiparalleles β -Faltblatt - lang gestrichelte Linie, Typ 1 β -Schleife - gepunktete Linie, Polyprolin II Helix - kreuz gestrichelte Linie, ungeordnete Struktur - kurz gestrichelte Linie (bearbeitet aus [71]).

3.2.3.1. Vesikelvorbereitung

Zuerst wurden die Lipide in MeOH und CHCl_3 (50:50% v/v) gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel im N_2 -Strom evaporiert. Der Rückstand wurde unter vermindertem Druck über Nacht getrocknet. Die Lipide wurden mit Phosphatpuffer versetzt, sodass sich eine Konzentration von 10 mg/mL bzw. 5 mg/mL ergab. Diese Lösung wurde nun zehn Gefrier-/Tauzyklen unterworfen (flüssiger N_2 ; H_2O , $T = 30^\circ\text{C}$). Anschließend wurde die Lösung einmal sonifiziert (12 min, $T = 30^\circ\text{C}$). Hierbei klarte die Suspension auf und wurde nahezu durchsichtig. In Abbildung 3.7 ist die Herstellung ohne Gefrier-/Tauzyklen dargestellt.^[73]

3.2.3.2. Proben in Phosphatpuffer

Die zu untersuchenden markierten Peptide und der Wildtyp wurden eingewogen und anschließend in Phosphatpuffer (10 mM) gelöst, sodass die Konzentration 1 mg/mL betrug. Anschließend wurde diese Stammlösung mit Phosphatpuffer (10 mM) auf eine Endkonzentration von 0,062 mg/mL bis 0,084 mg/mL verdünnt. Aus dieser verdünnten Lösung wurden 260 μL entnommen und im CD-Spektrometer gemessen.

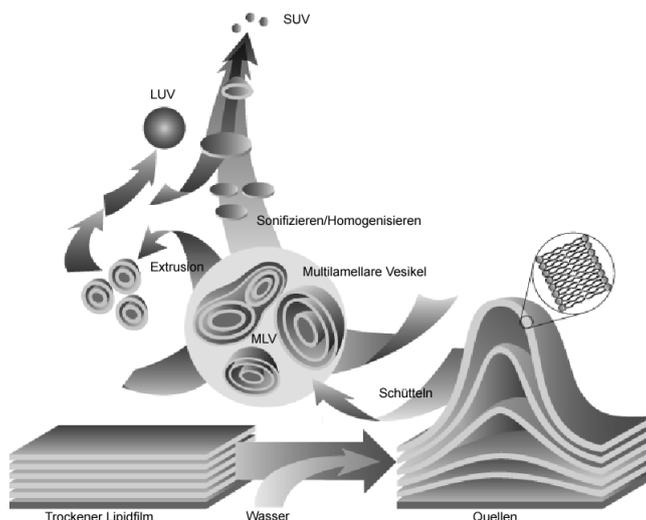


Abbildung 3.7: Vesikeldarstellung (modifiziert von [73])

3.2.3.3. Proben in 2,2,2-Trifluorethanol/Phosphatpuffer

Die Messungen und Vorbereitungen erfolgten analog zu Abschnitt 3.2.3.2.

3.2.3.4. Proben in Vesikeln

Zur Vorbereitung der Proben wurden die entsprechenden Volumina der Peptidstamm-
lösung ($c = 1,0 \text{ mg/ml}$) in Phosphatpuffer und der DMPC/DMPG-Lipidstamm-
suspension (10 mg/ml , 5 mg/mL) in den entsprechenden molaren Peptid-zu-Lipid Ver-
hältnissen (P/L, 1:50, 1:20) gemischt, sodass die Endkonzentration der Lipide in der Kü-
vette 1 mg/mL betrug. Diese Suspension wurde 30 Sekunden mittels Vortex-Schüttler
durchmischt und anschließend CD-spektroskopisch untersucht.

3.2.3.5. Messeinstellungen

Es wurden jeweils drei Messdurchläufe von 260 nm bis 180 nm durchgeführt, deren
arithmetisches Mittel das CD-Spektrum ergibt. Die Scangeschwindigkeit betrug 10
 nm/s . Die Empfindlichkeit wurde auf 100 mdeg , die spektrale Bandbreite auf 1 nm ,
der Scanmodus auf kontinuierlich, die Datenaufnahme auf 0.1 nm und die Response-
zeit des Detektors auf 8 Sekunden gestellt. Die Temperatur betrug $25 \text{ }^\circ\text{C}$, bei den
Messungen in Puffer bzw. Puffer/TFE und $30 \text{ }^\circ\text{C}$ bei den Messungen in Vesikeln, da
hierbei die Phasenübergangstemperatur von $23 \text{ }^\circ\text{C}$ für DMPC/DMPG beachtet werden
musste.^[73] Die Messungen fanden in Quarzglasküvetten mit 1 mm Schichtdicke statt.

3.2.3.6. Allgemeine Vorgehensweise

Zu Beginn jeder Messreihe wurde ein Referenzspektrum der Lösung ohne Peptid auf-
genommen (Puffer, Puffer/TFE, Vesikel in Puffer). Dieses wurde dann vom Spektrum
der Peptid-enthaltenden Probe abgezogen. Im Allgemeinen wurden $260 \text{ } \mu\text{L}$ Lösung in
die Küvetten gefüllt.

3.2.3.7. Berechnung MRE-Werte

Aus den erhaltenen Spektren, welche die Einheit mdeg hatten, wurden die MRE-Werte mit Gleichung 3.5 berechnet.^[70]

3.2.4. Festkörper-NMR-Spektroskopie

In diesem Kapitel soll nur auf die Besonderheiten der in dieser Arbeit verwendeten NMR-Spektroskopie eingegangen werden. Theoretische Hintergründe der NMR-Spektroskopie sind in verschiedenen Büchern und Übersichtsartikeln gut erläutert und aus Gründen der Übersicht hier nicht aufgeführt. Eine besondere Variante der NMR-Spektroskopie ist die Festkörper-NMR-Spektroskopie. Sie erlaubt im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse die Untersuchungen von Mischphasen (fest/flüssig). Hiermit lassen sich Lipide und Peptide in wässriger Umgebung gut untersuchen. Dies ist dem Zustand in der Realität sehr ähnlich, denn Zellen sind gut gefüllte Räume.

3.2.4.1. ³¹P-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Der meistgenutzte NMR-Kern um Lipide zu studieren ist der ³¹P-Kern. Dies liegt am hohen Anteil an Phospholipiden in Zellmembranen, welche eine Phosphatgruppe in ihrer polaren Kopfgruppe tragen. Der ³¹P-Kern hat einen Kernspin von $\frac{1}{2}$ und besitzt eine natürliche Häufigkeit von 100 %. Das gyromagnetische Verhältnis beträgt etwa 40 % des von Protonen. Es ist ein sensitiver Kern für NMR-Messungen. Verschiedene Lipidphasen nehmen charakteristische Linienformen an. Es ist nicht möglich mittels ³¹P-NMR normale und invertierte Phasen zu unterscheiden. Dennoch ist die ³¹P-NMR eine nützliche Methode um Peptid-Membran-Interaktionen zu studieren. Wenn Peptide stark mit den Lipiden der Membran wechselwirken, kann sich beispielsweise die Breite des Signals ändern. Eine der wichtigsten Messmethoden für diese Arbeit ist die statische ³¹P-NMR, welche routinemäßig genutzt wird um die Orientierung von makroskopisch orientierten Proben zu überprüfen.^[74] Um die Totzeit des Empfängers zu überbrücken und gute Basislinien zu erhalten werden oft Hahn-Echo-Experimente eingesetzt.^[75]

3.2.4.2. ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die meistverbreitete Methode um membrangebundene Peptide zu studieren ist die ¹⁵N-Festkörper-NMR. Die Moleküle werden hierbei im Rückgrat in der Peptidbindung markiert. Wenn das Peptid eine α -Helix ausbildet, liegt der Vektor der NH-Bindung nahezu parallel zur Helix-Achse. Das σ_{33} -Element des CSA Tensors ist grob entlang der NH-Bindung orientiert und mehr oder weniger parallel zur Helix-Achse. Es ist daher leicht möglich direkt aus der chemischen Verschiebung eines an einer Position markierten Peptids die Orientierung in einer makroskopisch orientierten Probe zu bestimmen. Die Linienbreite gibt Information darüber, ob das Peptid schnell rotiert oder statisch ausgerichtet ist. Ein scharfes Signal ist ein mobiles Peptid, wohingegen ein breites Signal für eine statische Ausrichtung spricht. Aus der chemischen Verschiebung lässt sich keine exakte Orientierung bestimmen. Der Neigungswinkel des Peptids kann bis zu 30° schwanken. Jedoch kann leicht zwischen einer transmembranen Orientierung und einem flach auf der Membran liegenden Peptid unterschieden werden.

Es ist möglich den Neigungswinkel genau zu bestimmen.^[74] Hierzu werden mehrere ^{15}N -Markierungen benötigt. Durch PISEMA Experimente sind genaue Orientierungsbestimmungen möglich.^[76] Der ^{15}N -Kern hat leider eine sehr niedrige Sensitivität. Aus diesem Grunde werden in dieser NMR-Spektroskopieart häufig Kreuzpolarisationsexperimente verwendet.^[77] Hierbei werden mit einem 90° Puls zuerst die Protonen angeregt. Hierauf folgt ein weiterer Puls auf dem ^1H - und ^{15}N -Kanal. Die zwei Amplituden müssen hierbei die Hartmann-Hahn-Bedingungen erfüllen, d. h. sie müssen so angepasst werden, dass sie die gleiche Rotationsgeschwindigkeit haben um einen effizienten Polarisationstransfer zu erhalten. Ein Pulverspektrum, welches alle möglichen Orientierungen eines Peptids darstellt, ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Die Orientierungsmöglichkeiten sind durch die Grafik darunter illustriert. Eine chemische Verschiebung um 200 ppm bedeutet somit eine transmembrane Orientierung (I-Zustand), eine chemische Verschiebung um 90 ppm bedeutet ein an der Oberfläche orientiertes Peptid (S-Zustand) und alle chemischen Verschiebungen dazwischen werden als in die Membran geneigt bezeichnet (T-Zustand).

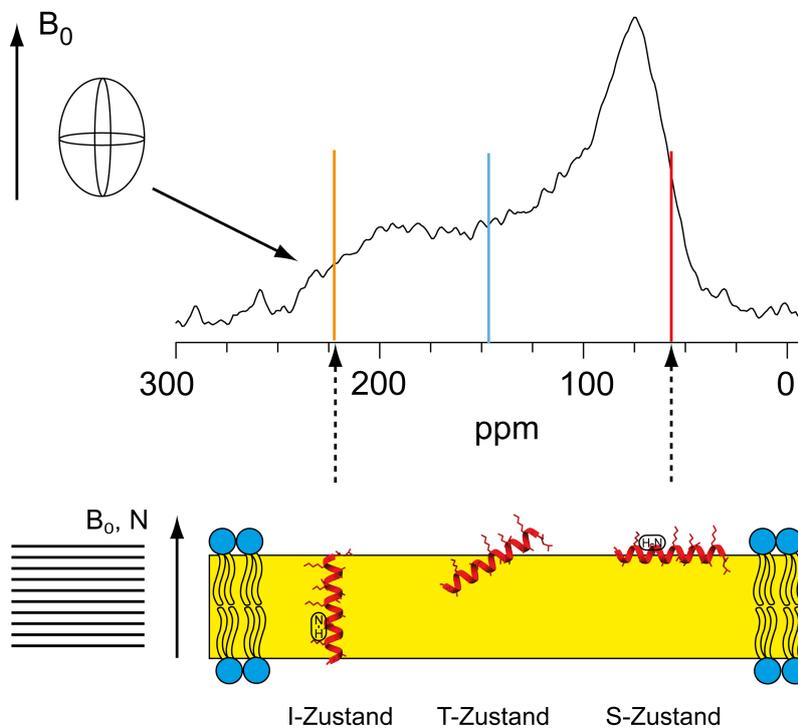


Abbildung 3.8: Erklärung eines Pulverspektrums eines ^{15}N -markierten Peptids.^[74]

3.2.4.3. ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Auch die ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie wird mit markierten Aminosäuren durchgeführt.

Dies wird mit speziellen, nicht in der Natur vorkommenden Aminosäuren bewerkstelligt. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.9 gezeigt.^[78] Diese Aminosäure ist mit drei Fluoratomen versehen. Das reine, dipolare Spektrum einer rotierenden CF_3 -Gruppe besteht aus einem Triplett. Die relativen Intensitäten sind 1:2:1. Der ^{19}F -Kern besitzt wie der ^{31}P -Kern einen Kernspin von $\frac{1}{2}$. Die CF_3 -Gruppe ergibt eine Aufspaltung, die vom Winkel α zwischen F-F-Vektor und B_0 abhängt. Diese Wechselwirkung wird auch als dipolare Kopplung bezeichnet. Man kann diese Kopplung bzw. die daraus resultierende Aufspaltung durch Gleichung 3.6 beschreiben.

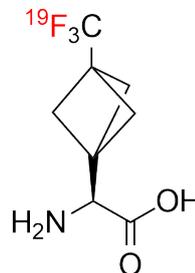


Abbildung 3.9: CF_3 -L-Bpg.^[78]

$$\Delta = \left| 3\hbar\gamma_1\gamma_2 \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{1}{r_{12}^3} \left\langle \frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} \right\rangle \right| \quad (3.6)$$

Hier ist Δ die Aufspaltung, r_{12} der Abstand zwischen den zwei Fluoratomen, γ das jeweilige gyromagnetische Moment und μ_0 die magnetische Feldkonstante. Da es sich hierbei um eine CF_3 -Gruppe handelt, findet eine Rotation um die dreizählige Symmetrieachse statt. Aus diesem Grund wird ein Ordnungsparameter $S_{rot} = -\frac{1}{2}$ eingeführt. Durch die schnelle Rotation wird die dipolare Kopplung der CF_3 -Gruppe um einen Faktor $\frac{3\cos^2\beta - 1}{2}$ verringert. Bei β handelt es sich um den Winkel zwischen F-F-Vektor und der Rotationsachse. Sobald der internukleare, dipolare Vektor orthogonal zur durchschnittlichen Rotationsachse ist, ist der Faktor $\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} = -\frac{1}{2}$. Diese Eigenschaft wird sich zu Nutze gemacht, indem man die Probe orthogonal (90°) zum Magnetfeld ausrichtet. Hierdurch wird die Mobilität des Peptids überprüft. Pulveranteile können somit identifiziert werden. Die maximal beobachtbare Aufspaltung ist nach Einsetzen aller Konstanten $\Delta_{\text{CF}_3}^0 = 15,8$ kHz. Stellt man die Aufspaltung einer Probe in Abhängigkeit des über die Zeit gemittelten Winkels θ dar, so erhält man Gleichung 3.7.

$$\Delta_{\text{CF}_3} = \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \Delta_{\text{CF}_3}^0 \quad (3.7)$$

θ ist der Winkel zwischen C- CF_3 -Achse und dem Magnetfeld B_0 . Da sich das gesamte Peptid bewegt und „wackelt“, wird $\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} = -\frac{1}{2}$ über die Zeit gemittelt. Zur Beschreibung dieser Bewegung wird ein Ordnungsparameter S_{mol} eingeführt. Für S_{mol} gilt: $1 \geq S_{mol} \geq 0$. Bei S_{mol} gleich 1 ist die Bewegung stark eingeschränkt und bei S_{mol} gleich 0 ist das Molekül komplett frei beweglich.

$$\Delta_{CF_3} = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} S_{mol} \cdot \Delta_{CF_3}^0 \quad (3.8)$$

θ ist eine bekannte Funktion von Neigungswinkel τ , Rotationswinkel ρ und der Orientierung der CF_3 -Gruppe im Peptid. Durch Markierung mehrerer Positionen in einem Peptid erhält man für jede Position unterschiedliche θ und daher verschiedene Aufspaltungen. Diese Daten können angepasst werden und man erhält dann τ , ρ und S_{mol} . Die Parameter sind in Abbildung 3.10 gezeigt. [44,74,79,80]

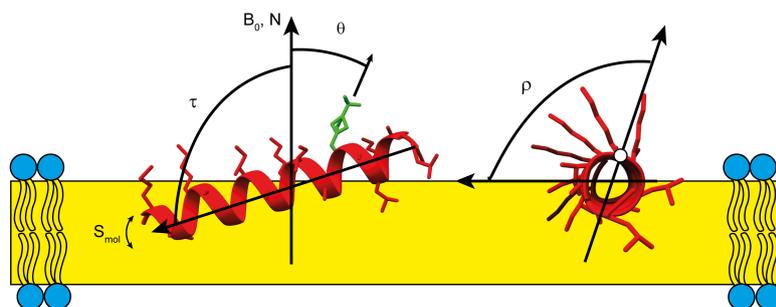


Abbildung 3.10: Darstellung von Neigungs- und Rotationswinkel τ und ρ die durch ^{19}F -NMR-Spektroskopie zugänglich sind.

3.2.4.4. Probenvorbereitung

3.2.4.4.1 Mag2 ^{19}F -Proben in DMPC/DMPG, 3:1

Zuerst wurden ca. 0,1 - 0,3 mg markiertes Peptid in 20 μL Wasser und 40 μL MeOH in einem antistatischen Eppendorfgefäß gelöst. In einem Standardpeppendorfgefäß wurden die Lipide DMPC/DMPG (3:1) (POPC/POPG, 9:1, DMPC/lyso-MPC, 3:1), im Falle hoher Peptidkonzentrationen (P/L, 1:50; $m(\text{Lipid}) \approx 4 \text{ mg}$) in 40 μL CHCl_3 und 60 μL MeOH, im Falle niedriger Peptidkonzentrationen (P/L, 1:500) in der dreifachen Solvensmenge, gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe der Lipidlösung zur Peptidlösung. Diese Reihenfolge ist wichtig, um nichts vom markiertem Peptid beim Transfer der Lösung zu verlieren. Anschließend wurde das Lipidgefäß mit 50 μL CHCl_3 gewaschen und die Waschlösung in das Peptidgefäß transferiert. Um die Probe zu homogenisieren wurde sie 30 Sekunden mit einem Vortex-Schüttler durchmischt und 5 min sonifiziert. Die klare Lösung wurde dann auf vorbereitete Glasplättchen (7,5 mm x 12 mm) aufgetragen, sodass die Gesamtmenge an Peptid-/Lipidgemisch zwischen 0,5 und 0,6 mg pro Glasplättchen betrug. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurden die Glasplättchen über Nacht im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Glasplättchen auf einer Styroporplatte gestapelt und mit Nadeln fixiert. Die gestapelten Glasplättchen wurden bei 96 % Luftfeuchtigkeit 24 h hydratisiert.^[81] Anschließend wurden die Stapel in Parafilm und Polyethylenfolie eingeschlagen, um die Probe während der NMR-Messung gegen Austrocknung zu schützen.

3.2.4.4.2 Mag2 und PGLa ^{19}F -Proben in DMPC/DMPG, 3:1

Im Falle der equimolaren Mischung von Mag2 und PGLa wurden ca. 0,3 mg Mag2 in 20 μL Wasser, ca. 0,2 mg PGLa in 40 μL MeOH und 5 μL Wasser gelöst. Zuerst wurde die PGLa-Lösung zur Mag2-Lösung gegeben und dann die Lipidlösung zum

Peptidgemisch. Der Rest der Probenvorbereitung erfolgte analog zur Probenvorbereitung, die in Kapitel 3.2.4.4.1 beschrieben wurde.

Im Falle der ^{15}N -Proben wurde die Probenvorbereitung für markierte Mag2-Analoga beschrieben (s. u.). Es wurden auch markierte PGLa-Analoga untersucht. Deren Probenvorbereitung erfolgte analog. Auch hier war das Endgefäß das des markierten Peptids.

3.2.4.4.3 Einsatz des Additivs Naphtalin

Die Probenvorbereitung erfolgte analog wie in 3.2.4.4.1 und 3.2.4.4.2 beschrieben. Zusätzlich wurde eine der Gesamtstoffmenge der Peptid/Lipid-Mischung entsprechende Menge an Naphtalin in das Gefäß der Lipide gegeben. Die Proben wurden nach dem Lösen auf Glasplättchen aufgetragen. Das Naphtalin wurde beim Trocknen im Vakuum durch Sublimation aus den Proben wieder entfernt. Durch den Einsatz dieses Additivs kann die Orientierung der Proben verbessert werden.^[82]

3.2.4.4.4 ^{15}N -Proben

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu den ^{19}F -Proben. Die Menge an markiertem Peptid war zwischen 0,6 und 1,0 mg. Im Fall der ^{15}N -Proben wurden kleinere Glasplättchen (7,5 mm x 9 mm) verwendet, da die Spule des ^{15}N -Probenkopfes kürzer, als die des ^{19}F -Probenkopfes ist. Da nur eine bestimmte Stapelhöhe der Glasplättchen in der Spule möglich ist, ergab sich eine Gesamtmenge an Peptid-/Lipidgemisch von 0,5 - 1,0 mg pro Glasplättchen.

3.2.4.5. Messeinstellungen

Alle Messungen wurden bei 308 K durchgeführt. Ausnahme war DPPC, welches eine höhere Temperatur von 323 K benötigte.

3.2.4.5.1 ^{31}P -Experimente

Die Spektren wurden mit 4096 Datenpunkten am 500 MHz und 600 MHz Spektrometer aufgenommen. Der 90° -Puls hatte eine Länge von $3,9 \mu\text{s}$ ($2,65 \mu\text{s}$). Es wurde eine ^1H -Entkopplung durchgeführt mit einem Puls der Länge von $35 \mu\text{s}$ (PCPD2) ($40 \mu\text{s}$). Die Hahn-Echo-Pulssequenz ist den Arbeiten von Rance *et al.* entnommen.^[75]

3.2.4.5.2 ^{19}F -Experimente

Die Spektren wurden mit 4096 Datenpunkten am 500 MHz Spektrometer aufgenommen. Der 90° -Puls hatte eine Länge von $3,1 \mu\text{s}$. Es wurde eine ^1H -Entkopplung durchgeführt mit einem Puls der Länge von $19,2 \mu\text{s}$. Wenn elektrische Entladungen auftraten, wurde die Leistung des Entkopplungspulses verringert. Die Anti-Ringing-Pulssequenz ist den Arbeiten von Zhang *et al.* entnommen.^[83]

3.2.4.5.3 ^{15}N -Experimente

Die Spektren wurden mit 1024 Datenpunkten am 500 MHz und 600 MHz Spektrometer aufgenommen. Der 90° -Puls (^1H) wurde zuerst optimiert. Die Mischzeiten wurden je nach Bedarf zwischen 250 und 1000 μs eingestellt. Die CP-MOIST- und die CP-RAMP-Pulssequenz ist den Arbeiten von Levitt *et al.* und Metz *et al.* entnommen.^[77,84]

3.2.4.5.4 NMR-Daten-Analyse

Aus den NMR-Daten wurde die Orientierung der Peptide in der Membran berechnet. Dies geschah mit von Erik Strandberg in der Arbeitsgruppe Ulrich entwickelten Programmen. Die Grundlagen der Berechnungen wurden im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Mehr Details sind in den Veröffentlichungen von Glaser, Strandberg und van der Wel *et al.* zu finden.^[44,46,80,85]

3.2.5. Hämolysen

Um den Einfluss der Fluormarkierung in Mag2 auf rote Blutkörperchen zu untersuchen wurden Hämolysetesten durchgeführt. Bei der Entwicklung von Medikamenten geht es immer darum möglichst hohe Aktivitäten gegen Mikroorganismen zu erreichen und Zerstörung roter Blutkörperchen zu vermeiden. Hierzu wurde Erythrozytenkonzentrat aus dem Städtischen Klinikum Karlsruhe verwendet.

3.2.5.1. Blutvorbereitung

5 mL Erythrozytenkonzentrat wurden bei RT mit 45 mL 172 mM Tris-HCl Puffer (pH = 7,6, RT) (Waschpuffer, W-Puffer) gewaschen. Diese Suspension wurde 10 min zentrifugiert (600 g). Der Überstand wurde vorsichtig von den sedimentierten Erythrozyten entfernt. Diese zwei Schritte wurden zweimal durchgeführt. 1 mL der sedimentierten Erythrozyten wurden in 9 mL W-Puffer resuspendiert. Um den Zielhämatokrit von 0,5 % zu erreichen wurden 500 μL dieser Suspension mit 9,5 mL 172 mM (pH = 7,6, 37 °C) Reaktionspuffer (R-Puffer) versetzt und anschließend für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

3.2.5.2. Experimentelle Durchführung

Um eine bessere Vergleichbarkeit von MIC und hämolytischer Aktivität zu erreichen wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen untersucht (8 $\mu\text{mol/L}$, 128 $\mu\text{mol/L}$). Um Aggregation zu verhindern wurden die Peptide in einer 10 % igen DMSO/R-Puffer Mischung gelöst (10:90% v/v). 200 μL Peptidlösung und 200 μL der Erythrozyten-suspension wurden durchgemischt. Dies ergab einen Hämatokritwert von 0,25 %. Als Positivkontrolle wurden 200 μL 0,2 % Triton X-100 verwendet (100 % Hämolysen). Zur Kontrolle der Autohämolysen wurden 200 μL R-Puffer verwendet (Negativkontrolle). Diese Suspensionen wurden für 30 min bei 37 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Die Suspensionen wurden für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde vom Erythrozytenpellet vorsichtig abdekantiert und in Plastikküvetten gefüllt. Die Proben wurden mit einem SmartSpecPlus Spectrophotometer (Biorad,

PA, USA) bei $\lambda = 540$ nm gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde Gleichung 3.9 verwendet.

$$HC = \left(\frac{E_P}{E_{TritonX-100}} \right) * 100\% \quad (3.9)$$

Hier ist E_P die gemessene Extinktion der Probe, $E_{TritonX-100}$ der 100%-Wert von Triton-X-100 und HC die Hämolyse in %.

3.2.6. Fluoreszenzspektroskopie

Bei der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzspektroskopischen Methode macht man sich die Fluoreszenzlöschung zu Nutze. Hierbei wird ein Fluorophor eingesetzt, dessen Fluoreszenz durch ein anderes Molekül gelöscht werden kann.^[86] Das sog. Quenching (Löschung) erfolgt hierbei bei dem eingesetzten Fluorophor-/Quencher-Paar (ANTS/DPX) statisch. Über die sog. Stern-Vollmer-Beziehung ist der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Quencherkonzentration gegeben (Gleichung 3.10).^[87]

$$\frac{\phi_{F,0}}{\phi_F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3.10)$$

Hierbei sind $\phi_{F,0}$ und ϕ_F die Fluoreszenzquantenausbeuten in Abwesenheit und Anwesenheit eines Quenchers. K_{SV} ist die Konstante der Quenching-Reaktion und $[Q]$ die Quencher-Konzentration. Der Quencher DPX bildet effizient ($K_{SV} = 490 \text{ M}^{-1}$) mit dem Fluorophor ANTS einen sehr stabilen, nicht fluoreszierenden Komplex. Aus obiger Beziehung kann man abschätzen, dass bei einer Quencherkonzentration von etwa 50 mM die Fluoreszenz nahezu vollständig gequenchet ist ($> 95\%$). Werden die Vesikel nun beschädigt, so können Fluorophor und Quencher austreten und die Quencherkonzentration verringert sich um den Faktor 2000. Dadurch kann ANTS nahezu frei fluoreszieren.^[87,88] Das durch Peptideinwirkung induzierte Auslaufen oder Ausströmen von in den Vesikeln eingeschlossenen Fluorophor- und Quencher-molekülen wird auch als Leakage (Ausfluss) bezeichnet.

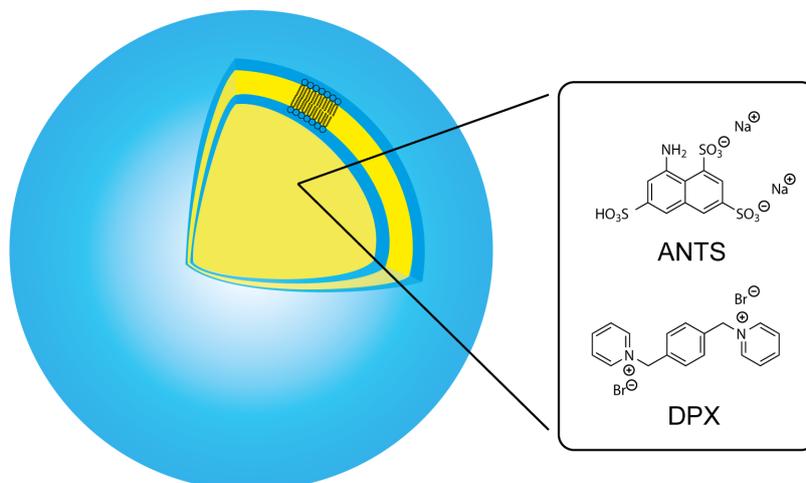


Abbildung 3.11: Mit ANTS und DPX befülltes Lipidvesikel.

3.2.6.1. Die Hill-Gleichung

Der Nobelpreisträger A. V. Hill ist im Kontext mit Kooperativität hauptsächlich bekannt für seine Arbeiten mit Hämoglobin. Die nach ihm benannte Gleichung basiert auf der aus der Enzymkinetik stammenden Michaelis-Menten-Gleichung und erlaubt Zugang zu dem sog. Hill-Koeffizienten, der ein Maß für Kooperativität bei enzymatischen Prozessen ist. Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Bindung eines Substrates an ein Enzym mit anschließender Produktbildung. In Abbildung 3.12 ist die Reaktionsgleichung gezeigt. Hierbei handelt es sich um eine Näherung, die den Reaktionsanfang voraussetzt, daher wird die Rückreaktion vom Produkt vernachlässigt.

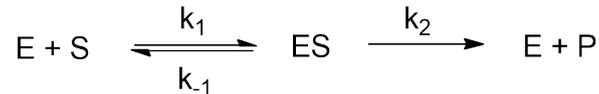


Abbildung 3.12: Reaktionsgleichung einer enzymkatalysierten Substratumsetzung.

Hier ist E das Enzym, S das Substrat, ES der Enzymsubstratkomplex und P das Produkt. Mit k werden die Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Teilschritte bezeichnet. Die eigentliche Michaelis-Menten-Gleichung^[86] ist in Gleichung 3.11 gezeigt und ermöglicht eine Beschreibung der Produktbildung.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (3.11)$$

v : Geschwindigkeit

v_{max} : Maximalgeschwindigkeit

$[S]$: Substratkonzentration

K_m : Michaelis-Menten-Konstante

Es ist klar zu erkennen, dass die in Gleichung 3.12 gezeigte Hill-Gleichung^[89] Gleichung 3.11 sehr ähnlich ist.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]^n}{[S]^n + K_{0,5}^n} \quad (3.12)$$

v : Geschwindigkeit

n : Hill-Koeffizient

v_{max} : Maximalgeschwindigkeit

$[S]$: Substratkonzentration

$K_{0,5}$: Konstante

$K_{0,5}$ definiert auch den Wert der Substratkonzentration, bei dem $v = 0,5 v_{max}$ ist, wird aber nicht Michaelis-Menten-Konstante genannt, da es sich hier um die Hill-Gleichung handelt. Die Hill-Gleichung ist nicht equivalent zur Michaelis-Menten-Gleichung (Ausnahme $n = 1$). Hill bezeichnete die nach ihm benannte Gleichung als rein empirisch. Es gibt keinen tieferen Sinn für den Hill-Koeffizienten. Es gibt Versuche den Hill-Koeffizienten wie in Abbildung 3.13 zu beschreiben.^[89] Da der Hill-Koeffizient meist keine ganze Zahl ist, ergibt diese Art von Modell keinen Sinn.

Es ist nicht korrekt den Hill-Koeffizienten als eine Näherung der Bindungsstellen zu nehmen. Jedoch liefert er in manchen Fällen einen unteren Grenzwert für die Anzahl der Bindungsstellen (Hämoglobin: 4 Bindungsstellen; $n = 2,7$).^[89] Der Hill-Koeffizient kann verschiedene Werte annehmen. Sie sind in Tabelle 3.16 aufgeführt.



Abbildung 3.13: Erklärungsversuch des Hill-Koeffizienten.

Tabelle 3.16: Einteilung der Werte, die der Hill-Koeffizient annehmen kann.^[89]

n	Kooperativität
0,5 - 0,9	Negativ
1,0	Keine
1,5 - 4,0	Positiv
5,0 - 8,0	Hoch
10 - 1000	Extrem

3.2.6.2. Herstellung Lipidvesikel

Die Lipide wurden in CHCl_3 gelöst. Zu der Lipidstammlösung wurden 0,02 mol% Rhodamin-PE gegeben. Die Lösungsmittel wurden im Gasstrom und unter vermindertem Druck entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde mit 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX in 10 mM HEPES Puffer hydratisiert ($\text{pH} = 7,5$). Die Osmolarität wurde mit 50 mM NaCl eingestellt. Diese Stammsuspension wurde 10 Gefrier-Tau Zyklen unterzogen. Dieser Stamm wurde eingefroren und bei Bedarf aufgetaut und weiterverarbeitet. Die Lipidsuspension wurde hierbei durch Membranen mit 100 nm Porendurchmesser extrudiert (41x) und anschließend über Nacht bei RT gelagert. Sich außerhalb der Vesikel befindliches Fluorophor und Quencher wurden mittels Größenausschlusschromatographie über Sephacryl-100 in Minisäulen durch Zentrifugation von den Vesikeln abgetrennt (2 min, 1500 x g).

3.2.6.3. Peptidstammlösungen

Die Peptide wurden in AN/Wasser (20:80% v/v) gelöst und als 300 $\mu\text{mol/L}$ Stammlösungen im Kühlschrank aufbewahrt. Die entsprechenden Verdünnungen wurden am Tag der Messung in 10 mM Puffer hergestellt.

3.2.6.4. Experimentdurchführung

Die Messungen wurden in 1,5 mL Gesamtvolumen in Quartzküvetten durchgeführt. Vor jeder Messreihe wurde ein Rhodaminspektrum der Lipidvesikel bei 540 nm Anregungswellenlänge aufgezeichnet. Als Referenz (100 %-Wert) gilt ein Wert, der mit Vesikeln, die mittels Sonifizierung und ohne Reinigung hergestellt wurden. Hierdurch sollte der Verlust durch Extrusion und Größenausschlusschromatographie bestimmt werden. Es wurde über eine Bandbreite von 560 nm - 700 nm aufgezeichnet. Das Absorptionsmaximum befindet sich bei ca. 586 nm. Das tatsächliche Experiment wurde mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 508

nm durchgeführt. Um Störungen durch die Anregungsstrahlung zu vermeiden wurde ein 395 nm Filter verwendet. Die Spaltbreiten betragen je 5 nm. Die Messdauer betrug 800 s (400 s). Die Peptide wurden in Puffer (155 mM NaCl, 10 mM HEPES) in einer Küvette vorgelegt. Bei 100 s erfolgte die Lipidzugabe und bei 700 s die Zugabe von Triton X-100 (0,3 %) um eine vollständige Zerstörung der Vesikel zu erreichen (Abbildung 3.14). Es wurden zudem je zwei Blindwerte der reinen Lipidvesikel aufgezeichnet.

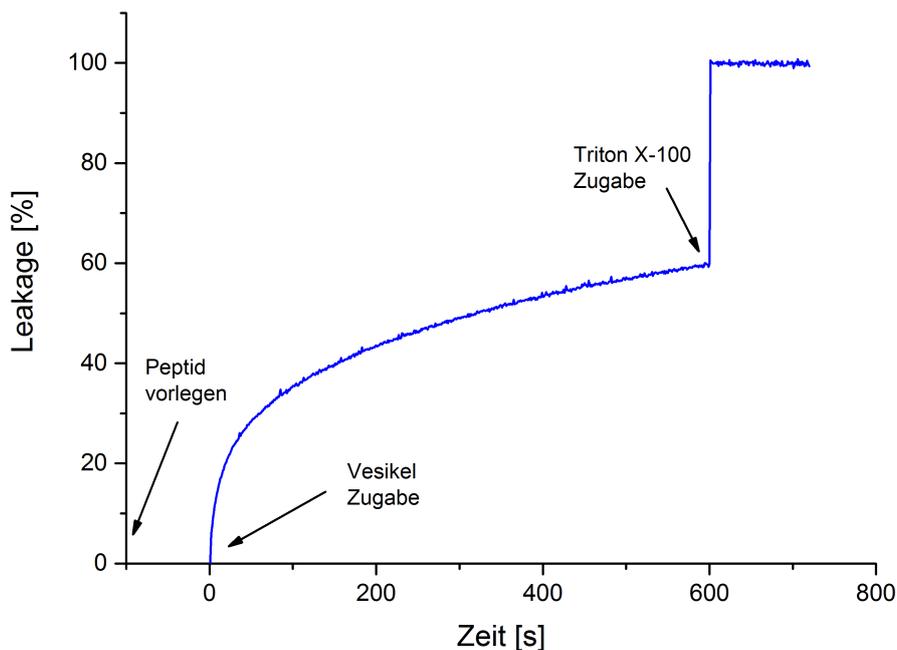


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

3.2.6.5. Datenanalyse

Die ermittelten Daten wurden nach Abzug der Eigenabsorption der Vesikel in die Einheit % Leakage umgerechnet. Als 100%-Wert wurde das durch Triton-X-100 verursachte Leakage verwendet. Aus den erhaltenen Kurven wurden die Leakagewerte 600 s nach Lipidzugabe bestimmt. Für die Bestimmung der Hill-Koeffizienten wurde eine der Reaktionsgeschwindigkeit (Gleichung 3.12) analoge Größe verwendet und zwar die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der das Leakage unmittelbar nach der Peptidzugabe erfolgte. Als Maß hierfür wurden die Anfangssteigungen (15 s - 20 s) des Leakage-Zeitverlaufs verwendet. Hier betrug die Messdauer bis zur Tritonzugabe nur 180 s. Die Hill-Kurven wurden mit dem Programm Origin an die Hill-Gleichung angepasst.

3.2.7. Biologische Tests

3.2.7.1. Minimale Hemmkonzentration [MHK]

Um die antibakterielle Aktivität der Peptide zu charakterisieren wurden zwei Qualitätskontrollstämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet: *Escherichia coli* (DSM 1103, Gram-negativ), *Staphylococcus aureus* (DSM 1104, Gram-positiv). Die zu testenden Peptide wurden in sterilem Wasser (bidest.) gelöst. Die Konzentrationen dieser Stammlösungen waren 4fach so hoch wie die gewünschte Zielkonzentration.

3.2.7.2. Herstellung der Zellkulturen

10 mL Müller-Hinton Medium (MH) wurden mit einem Kügelchen einer Cryokultur beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde mittels 13-Strich-Ausstrichverfahren auf LB-Agar ausplattiert. Diese Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten werden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (Verwendbarkeit: Max. 2 Wochen).

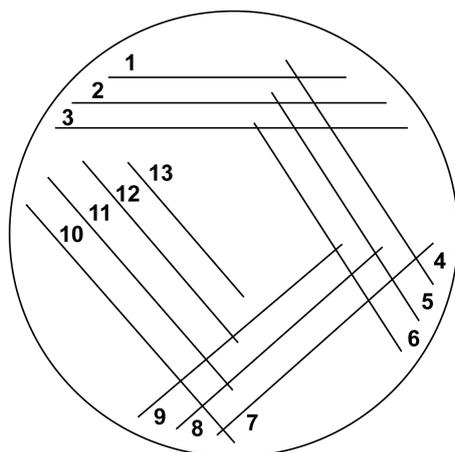


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung eines 13-Strich-Verdünnungsausstrichs.

Nach dem Sammeln von Einzelkolonien wurde eine Zellsuspension in 1 mL MH-Medium hergestellt. Um die Übernachtskultur zu beimpfen wurde das benötigte Volumen für 10 mL MH-Medium berechnet. Die initiale optische Dichte von $OD_{550} = 0,2$ sollte erreicht werden. Die Übernachtskulturen wurden für 18 Stunden inkubiert. Für die Animpfdosis der Testkulturen von 10 mL MH Medium wurde eine $OD_{550}=0,2$ eingestellt. Die Testkulturen wurden 3-4 Stunden inkubiert bei 37 °C und 200 rpm um die frühe exponentielle Wachstumsphase zu erreichen ($OD_{550}=1-2$). Die Testkulturen wurden auf $OD_{550}=0,2$ verdünnt. Eine $OD_{550}=0,125-0,250$ beinhaltet $1-2 \times 10^8$ KBE (Kolonien bildende Einheiten). Dieser Wert gilt nur für Gram-positive Bakterien. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für den MHK-Test 1/100 (Gram-positiv) und 1/1000 (Gram-negativ) bzw. 1/40 und 1/400 (Damebrett-Test) verdünnt. Jeder der Zellkulturschritte wurde unter dem Lichtmikroskop auf Reinheit überprüft.

3.2.7.3. Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Der Test wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Die erste Zeile A(1-11) wurde mit je 50 μL 2fach konzentriertem MH Medium befüllt, A12 mit 100 μL . Alle weiteren Zeilen B-H wurden in gleicher Weise mit 50 μL bzw. 100 μL MH-Medium befüllt. Je drei Spalten (z. B. A 1-3) wurden mit der gleichen Peptidlösung befüllt (4fache Verdünnung). Spalte 10 war die Positivkontrolle und Spalte 12 die Negativkontrolle. In Spalte 11 wurde meist der PGLa Wildtyp als Referenz verwendet. Die mit Peptid befüllten Spalten wurden einer Verdünnungsreihe unterzogen. Anschließend wurden Zeile A-H (1-11) mit je 50 μL der Bakteriensuspension beimpft und 22 h inkubiert. Die inkubierten Platten wurden mit je 20 μL einer Resazurin-Lösung (0,2 mg/mL) angefärbt und nach 2 h ausgewertet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 3.16: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen.

3.2.7.4. Damebrett-Test

3.2.7.4.1 Hilfsplatte

Dieser Test ist sehr gut geeignet um verschiedene Kombinationen zweier Peptide (1:1, 2:1, 1:2 usw.) zu untersuchen. In diesem Fall wurden die Wildtypen und unterschiedliche Mutationen der antimikrobiellen Peptide Mag2 und PGLa untersucht. Im Folgenden wird die Vorbereitung der Hilfsplatte beschrieben.^[90] Eine Hilfsplatte ist für zwei Hauptplatten vorgesehen.

1. Im ersten Schritt wurden 7x8 Vertiefungen (Reihe A-G, Spalte 1-8) einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit jeweils 100 μL MH-Medium befüllt, wobei die erste Reihe A mit doppelt konzentriertem MH-Medium, die restlichen Reihen mit einfach konzentriertem MH-Medium befüllt wurden.
2. In Reihe A von 1-8 wurden nun 100 μL der Stammlösung des Peptids 2 (z. B. Mag2) gegeben. Während des Versuchsablaufs erfährt die Stammlösung eine 5fache Verdünnung. Will man beispielsweise eine Startkonzentration von 256 $\mu\text{mol/L}$ in der ersten Reihe erreichen, so muss eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1280 $\mu\text{mol/L}$ hergestellt werden.

3. Nun wurde Reihe A 1-8 mit einer Mehrfachpipette mit 8 Spitzen durchmengt und aus jeder Vertiefung 100 μL entnommen und in Reihe B 1-8 überführt. Dies ist eine 1:1 Verdünnung. Nun erfolgte eine Durchmischung und eine Entnahme von jeweils 100 μL aus Reihe B mit anschließender Überführung in Reihe C. So wurde fortgefahren bis Reihe G (insgesamt 7 Reihen). Aus dieser Reihe können 100 μL entfernt und verworfen werden, was jedoch nicht zwingend notwendig ist.

3.2.7.4.2 Hauptplatte

1. In dieser Platte wurden in Reihe A bis H und Spalte 1-8 (8x7 Löcher) 40 μL MH-Medium gegeben. Auch hier ist Spalte 1 mit doppelt konzentriertem MH-Medium und Reihe 2-8 mit einfachem MH-Medium zu befüllen. Spalte neun wurde mit 80 μL MH-Medium befüllt (Positiv-Kontrolle). Spalte 12 wurde mit 100 μL Medium befüllt (Negativkontrolle).
2. In Spalte 1 A-H wurden nun je 40 μL Peptid 1 (z. B. PGLa) gegeben. Auch hier wurde darauf geachtet, dass die Peptidstammlösung im Laufe des Versuchs eine 5fache Verdünnung erfährt. Die Konzentration der Stammlösung muss 5 mal so hoch wie die Startkonzentration der ersten Spalte sein.
3. Nun wurde Spalte 1 A-H mit einer Mehrfachpipette mit 8 Spitzen durchmengt und aus jedem Loch 40 μL entnommen und in Spalte 2 A-H überführt. Dies ist eine 1:1 Verdünnung. Nun erfolgt eine Durchmischung und eine Entnahme von jeweils 40 μL aus Spalte 2 mit anschließender Überführung in Spalte 3. So wurde fortgefahren bis Spalte 7 (insgesamt 7 Spalten) Aus dieser Spalte wurden aus jeder Vertiefung 40 μL entnommen und verworfen.

3.2.7.4.3 Herstellen der finalen Platte und Inkubation

1. Nun wurden aus der Hilfsplatte jeweils 40 μL aus jeder Vertiefung der Reihen A-G, 1-8 entnommen und in die jeweilige Vertiefung auf der Hauptplatte überführt. Sprich A1 nach A1 usw...
2. Nun wurden Spalten 1-9 und 11 mit 20 μL der Zellsuspension versetzt.
3. Die fertigen Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank für ca. 22 h inkubiert.
4. Zu allen befüllten Löchern wurden 20 μL Resazurin-Lösung (0,1 mg/mL) gegeben. Diese Platten wurden erneut für ca. 2 h in den Brutschrank gestellt. Anschließend erfolgte die Auswertung.

4. Lipidabhängige Orientierung von antimikrobiellen Peptiden in orientierten Lipiddoppelschichten

Da eines der Hauptziele von AMPs die cytoplasmatische Membran (CM) von Mikroorganismen ist, werden häufig Modellmembranen verwendet um ihr Verhalten zu untersuchen. Diese werden in orientierten Proben untersucht. Hierbei können AMPs unterschiedliche Orientierungszustände einnehmen. Sie können auf der Oberfläche dieser Membranen liegen (S-Zustand), sich in die Membran neigen (T-Zustand) oder eine transmembrane Orientierung (I-Zustand) einnehmen. Die verschiedenen Orientierungsmöglichkeiten sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Lipide sind organische Moleküle und können somit auch anhand der funktionellen Gruppen unterschieden werden. Zum einen gibt es die sogenannten Kopfgruppen, die häufig Phosphatgruppen enthalten, zum anderen gibt es die Alkylketten. In diesem Kapitel

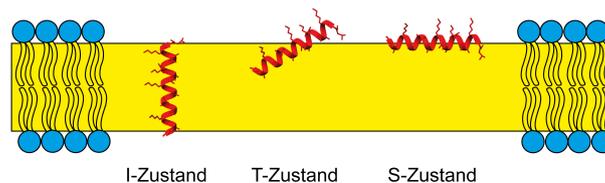


Abbildung 4.1: Orientierungsmöglichkeiten eines AMPs in Lipiddoppelschichten (I-, T-, S-Zustand).

soll auf eine weitere Eigenschaft eingegangen werden, die spontane Krümmung der Lipide. Um zu klären welchen Einfluss diese Eigenschaft auf die Orientierung von antimikrobiellen Peptiden hat, wurden verschiedenste Lipide und Lipidsysteme untersucht. Als Modellpeptide für diese Studie wurden die Peptide der Magainin-Familie, PGLa und Mag2, eingesetzt. Es wurden die einzelnen Peptide, sowie deren Mischung (1:1) untersucht. Diese Experimente wurden bis auf zwei Ausnahmen bei einem effektiven P/L von 1:50 durchgeführt. Einige Spektren sind im Zuge der Diplomarbeit aufgezeichnet worden, werden aber benötigt um ein vollständiges Bild zu zeichnen.^[49]

4.1. Ergebnisse

4.1.1. Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung

Für die Untergruppe der Lipide mit positiver spontaner Krümmung wurden die in Tabelle 4.1 aufgeführten Lipide und Lipidsysteme untersucht. Hierbei wurden Lipide unterschiedlicher Kettenlänge (DLPC; DMPC; DPPC) mit der gleichen Kopfgruppe, sowie Lipide mit geladenen Kopfgruppen (DMPG) und mit nur einer Alkylkette (lyso-MPC) eingesetzt. Die vollständigen Bezeichnungen der Lipide sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Die Variation der Kettenlänge führt zu unterschiedlichen

Schichtdicken der Lipidmembranen. In diesem Kapitel wurden nur Lipide mit positiver spontaner Krümmung untersucht. Von DLPC über DMPC nach DPPC vergrößert sich die Kettenlänge von 12 nach 16 Kohlenstoffatomen. Zusätzlich wurden im Fall von DMPC, welches eines der am häufigsten untersuchten Lipide in der Festkörper-NMR ist, negativ geladene Kopfgruppen (DMPG) und Lipide mit nur einer Alkylkette (lyso-MPC) eingesetzt. Die Lipide mit nur einer Alkylkette sollen die Neigung der Peptide in die Membran begünstigen. Sie besitzen eine sehr hohe positive spontane Krümmung.

Tabelle 4.1: Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung. Die Daten sind aus [26] entnommen (D_h - hydrophobe Schichtdicke, T_m - Phasensprungtemperatur).

Lipidsystem	Alkylketten	D_h [Å]	T_m [°C]
DLPC	di-12:0-PC	21,0	-1
DMPC	di-14:0-PC	25,4	24
DMPC/DMPG (3:1)	di-14:0-PC/di-14:0-PG	25,4/25,4	24/23
DMPC/lyso-MPC (3:1)	di-14:0-PC/14:0-PC	25,4/n.b.	24/n.b.
DPPC	di-16:0-PC	29,8	41

4.1.1.1. ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie

In Abbildung 4.2 sind die für diese Lipide und Lipidsysteme gemessenen ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektren gezeigt. Um die Güte der Orientierung der Proben zu bestimmen wurden vor und nach der ^{15}N -Messung ^{31}P -Messungen durchgeführt. Dies ist notwendig, da eine gute Orientierung Grundvoraussetzung für die ^{15}N -Messungen

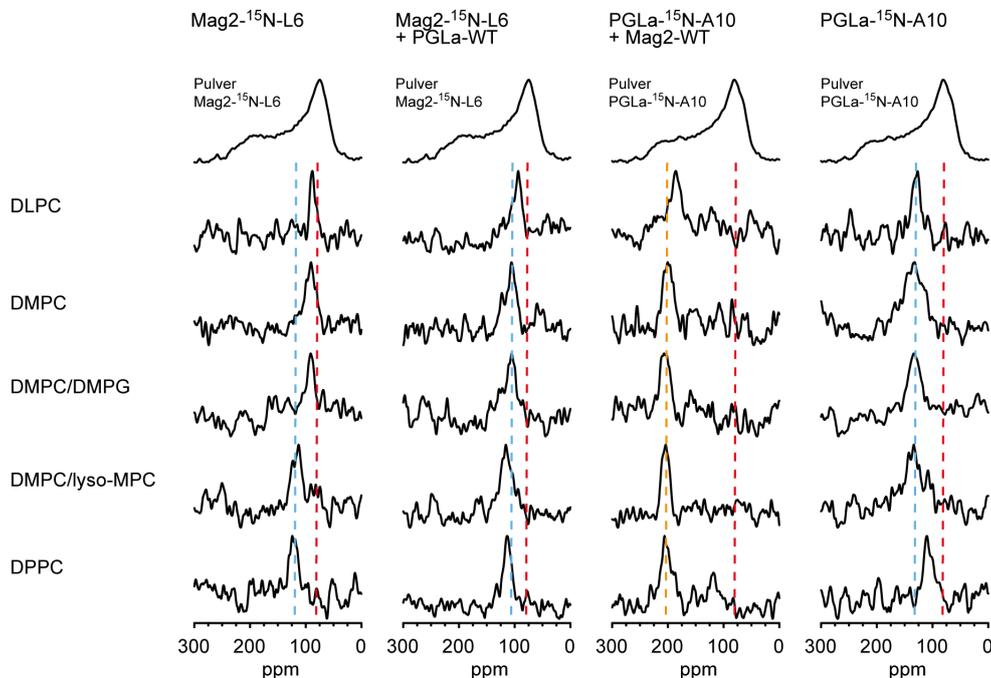


Abbildung 4.2: ^{15}N -NMR-Spektren von markierten Mag2- und PGLa-Analoga, alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa- bzw. Mag2-Wildtyps, in verschiedenen Lipiden und Lipidsystemen mit positiver spontaner Krümmung.

orientierter Doppelschichten ist. Der Übersichtlichkeit wegen sind diese Spektren im Anhang B aufgeführt. Die Orientierung der Proben betrug zwischen 50 % und 80 %. In der ersten Spalte in Abbildung 4.2 sind die Spektren von Mag2- ^{15}N -L6 gezeigt. In der zweiten Spalte sind die Spektren von Mag2- ^{15}N -L6 in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps zu sehen. In der dritten Spalte ist die markierte Spezies PGLa. Hier ist nun PGLa- ^{15}N -A10 in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps zu sehen. In der vierten und letzten Spalte sind die Spektren von PGLa- ^{15}N -A10 zu sehen. Betrachtet man Mag2, so ist es alleine als auch in Gegenwart von PGLa an der Oberfläche der Membran orientiert bzw. leicht in sie hineingeneigt. PGLa ist alleine meist leicht in die Membran geneigt. Sobald Mag2 anwesend ist, ist es jedoch in die Membran eingebunden im sogenannten I-Zustand. Die genauen chemischen Verschiebungen (δ) sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Chemische Verschiebungen der ^{15}N -NMR-Spektren in Lipidsystemen mit positiver spontaner Krümmung. Die Orientierung ist in Klammern durch S, T und I erläutert (S = S-Zustand, T = T-Zustand, I = I-Zustand).

Lipidsystem	Mag2 (^{15}N) [ppm]	Mag2 (^{15}N) PGLa-WT [ppm]	PGLa (^{15}N) Mag2-WT [ppm]	PGLa (^{15}N) [ppm]
DLPC	88 (S)	94 (S)	186 (I)	129 (T)
DMPC	91 (S)	106 (T)	200 (I)	133 (T)
DMPC/DMPG (3:1)	91 (S)	105 (T)	205 (I)	116 (T)
DMPC/lyso-MPC (3:1)	117 (T)	116 (T)	205 (I)	123 (T)
DPPC	129 (T)	114 (T)	205 (I)	110 (T)

4.1.1.2. ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Da die ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie nur eine qualitative Aussage über die Orientierung der Peptide erlaubt, wurde Mag2 in ausgesuchten Lipidsystemen mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie genauer untersucht. Das hierfür gewählte Lipidsystem war DMPC/lyso-MPC (3:1). Die Spektren sind in Abbildung 4.3 gezeigt. Die ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie erlaubt genauere Aussagen über den Neigungswinkel τ , den Rotationswinkel ρ , den Ordnungsparameter S_{mol} und den RMSD. Dieses Lipidsystem hat eine erhöhte positive spontane Krümmung im Vergleich mit reinem DMPC. Lyso-Lipide haben nur eine Kette, aber die gleiche Kopfgruppe. Somit sollte es der Theorie zu Folge leichter für das Peptid sein, in die Membran einzudringen. In Abbildung 4.3 sind in der ersten und letzten Spalte die Phosphorspektren vor und nach der ^{19}F -Messung zu sehen. In der zweiten und dritten Spalte sind die ^{19}F -Spektren mit der Membrannormalen parallel (0°) und orthogonal (90°) zum angelegten Magnetfeld B_0 gezeigt. Die 90° -Messungen dienen der Überprüfung der Mobilität des Peptids. Rotiert es um die eigene Achse, erhält man bei den 90° -Messungen die halbe Aufspaltung auf der gegenüberliegenden Seite von -72 ppm. Auch hier wurde zuerst Mag2 alleine untersucht (siehe Abbildung 4.3). Es konnten für die meisten markierten Positionen gute Spektren, welche klare Triplets mit messbaren Aufspaltungen zeigten, aufgenommen werden. Diese sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die Ausnahme bildet Mag2- ^{19}F -G18, welches zu aggregieren scheint.

Dies erkennt man an dem Pulveranteil (alle möglichen Orientierung, ca. -7,2 kHz),

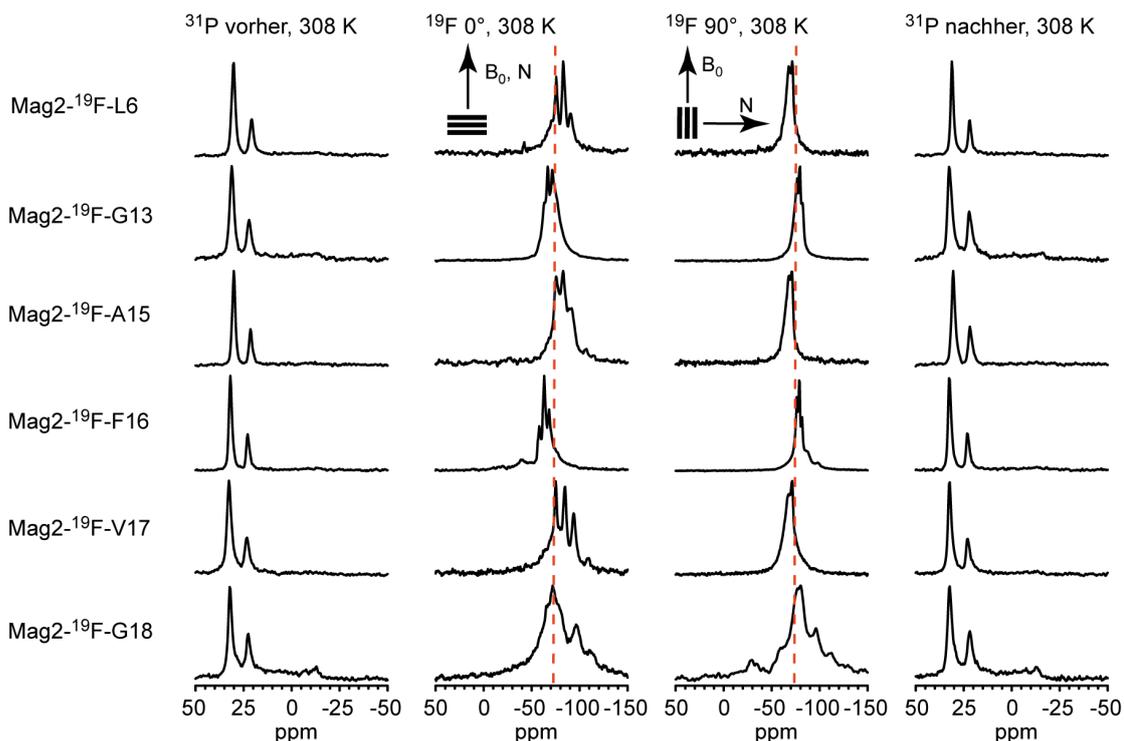


Abbildung 4.3: NMR-Spektren der ^{19}F -markierten Mag2-Analoga in DMPC/lyso-MPC (3:1).

der auf der rechten Seite von -72 ppm zu sehen ist. Diese Markierung zeigte bei den Untersuchungen im Zuge der Diplomarbeit im Lipidsystem DMPC/DMPG (3:1) das gleiche Verhalten.^[49]

Tabelle 4.3: Aus den ^{19}F -Spektren in DMPC/lyso-MPC (3:1) ermittelte Aufspaltungen der verschiedenen in Mag2 markierten Positionen.

Peptid	0° [kHz]	90° [kHz]
Mag2- ^{19}F -L6	-3,4	1,8
Mag2- ^{19}F -G13	2,1	-1,4
Mag2- ^{19}F -A15	-3,4	1,5
Mag2- ^{19}F -F16	2,4	-1,4
Mag2- ^{19}F -V17	-4,5	1,9
Mag2- ^{19}F -G18	(3,0)	-

Aus diesen Aufspaltungen wurde anschließend der Neigungswinkel τ , der Rotationswinkel ρ und der Ordnungsparameter S_{mol} berechnet. Die entsprechenden Wellen- und RMSD-Darstellungen sind in Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5 gezeigt. Da die Aufspaltung von Mag2- ^{19}F -G18 nicht eindeutig ist, wurden zwei Berechnungen angefertigt. Eine unter Einbeziehung der Aufspaltung von Mag2- ^{19}F -G18 und eine ohne. Die Berechnungen ohne Mag2- ^{19}F -G18, welche in Abbildung 4.5 gezeigt sind, scheinen realistischer, da der Ordnungsparameter S_{mol} den in den anderen Lipidsystemen ermittelten Werten ähnlicher ist. Um Änderungen im Orientierungsverhalten durch Wechselwirkung mit PGLa zu detektieren wurde ein weiterer Datensatz von Mag2 in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps aufgenommen (Abbil-

dung 4.6).

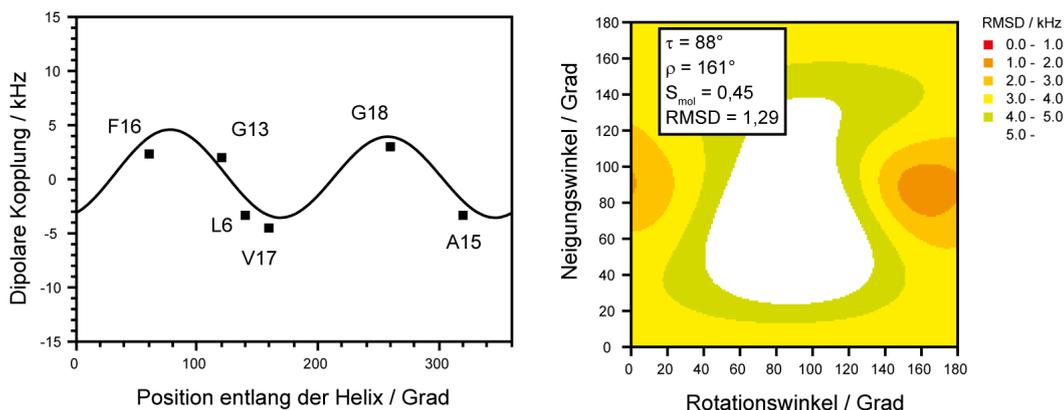


Abbildung 4.4: Aus den Aufspaltungen der ^{19}F -NMR-Spektren erstellte Wellen- und RMSD-Darstellungen für Mag2 alleine in DMPC/lyso-MPC (3:1).

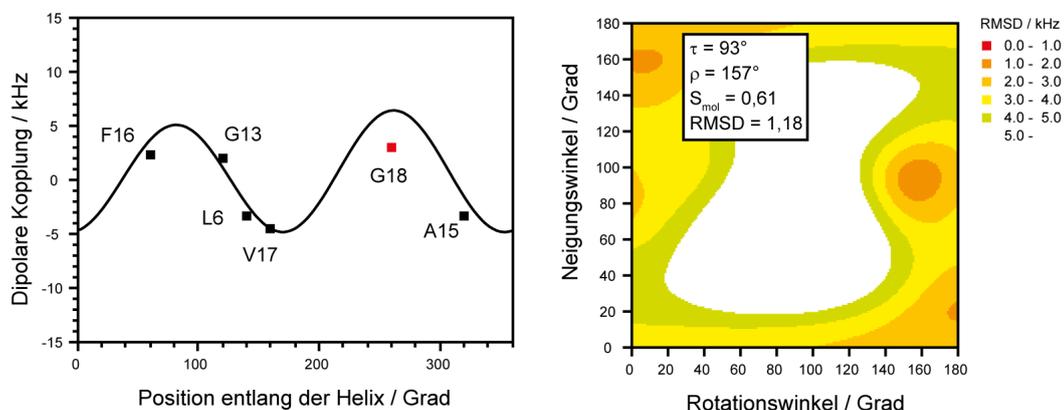


Abbildung 4.5: Aus den Aufspaltungen der ^{19}F -NMR-Spektren erstellte Wellen- und RMSD-Darstellungen für Mag2 alleine in DMPC/lyso-MPC (3:1) ohne die Aufspaltung von Mag2- ^{19}F -G18 einzubeziehen.

Die Aufspaltungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Die Spektren sind wie in Abbildung 4.3 angeordnet. Das effektive Peptid-zu-Lipid-Verhältnis (P/L) wurde analog zu den Messungen ohne PGLa (P/L, 1:50) gewählt. Auch hier konnten für die meisten markierten Positionen gute Spektren, welche klare Triplets mit messbaren Aufspaltungen zeigten, aufgenommen werden. Auffallend ist hier Mag2- ^{19}F -G18, welches in Gegenwart von PGLa eine klare Aufspaltung zeigt (grau hinterlegt). Diese Spezies ist mobil und zeigt die halbe Aufspaltung bei 90° . Der Pulveranteil ist wesentlich kleiner als bei den Einzelmessungen von

Tabelle 4.4: Aus den ^{19}F -Spektren in DMPC/lyso-MPC (3:1) ermittelte Aufspaltungen der verschiedenen in Mag2 markierten Positionen in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps.

Peptid	0° [kHz]	90° [kHz]
Mag2- ^{19}F -L6	-4,0	1,8
Mag2- ^{19}F -G13	2,3	-1,1
Mag2- ^{19}F -A15	-3,4	1,7
Mag2- ^{19}F -F16	2,3	-1,2
Mag2- ^{19}F -V17	-4,5	1,9
Mag2- ^{19}F -G18	13,1	-6,2

Mag2.

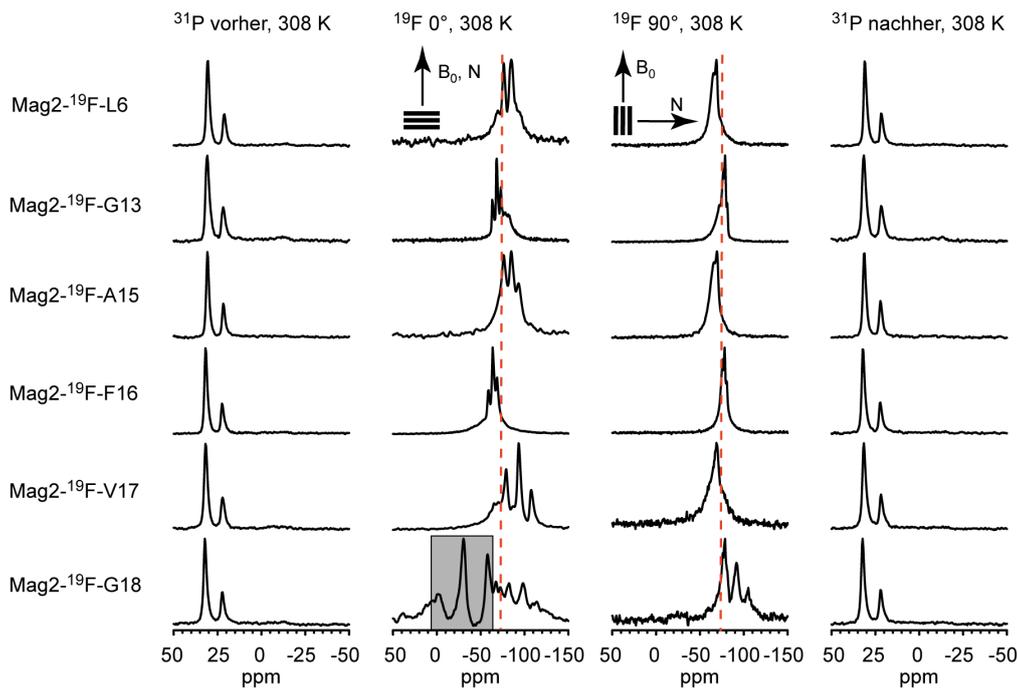


Abbildung 4.6: NMR-Spektren der ^{19}F -markierten Mag2-Analoga in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps in DMPC/lyso-MPC (3:1). Die neue Aufspaltung von Mag2- ^{19}F -G18 ist grau markiert.

Aus diesen Aufspaltungen wurden erneut Neigungswinkel τ , Rotationswinkel ρ und Ordnungsparameter S_{mol} berechnet und die entsprechenden Wellen- und RMSD-Darstellungen erstellt. Diese Darstellungen sind in Abbildung 4.7 gezeigt.

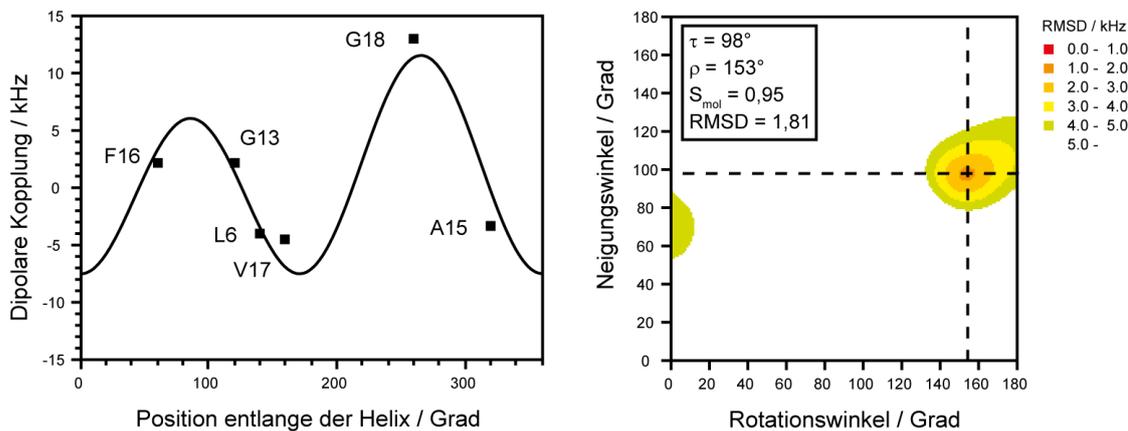


Abbildung 4.7: Aus den Aufspaltungen der ^{19}F -NMR-Spektren erstellte Wellen- und RMSD-Darstellungen für Mag2 in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps in DMPC/lyso-MPC (3:1).

4.1.2. Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung gezeigt. Hierzu wurden wie schon im vorangegangenen Kapitel verschiedene Lipidsystemen mit unterschiedlichen Schichtdicken untersucht. Diese sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5: Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung. Die Daten sind aus [26] entnommen (D_h - hydrophobe Schichtdicke, T_m - Phasensprungtemperatur).

Lipidsystem	Alkylketten	D_h [Å]	T_m [°C]
DMoPC	di-14:1c9-PC	19,2	< -20
POPC/POPG (9:1)	16:0-18:1c9-PC/16:0-18:1c9-PG	28,3	-2
POPE/POPG/TOCL (72:23:5)	16:0-18:1c9-PE/16:0-18:1c9-PG/tetra-18:1c9-CL	28,3/28,3/26,8	-2/-2/ca.-15
DEPC/DEPG (3:1)	di-22:1c13-PC/di-22:1c13-PG	34,4 ^[91]	13,2

Zum einen wäre da DMoPC zu nennen, welches das Analogon von DMPC ist. Im Gegensatz zu DMPC enthält es ungesättigte Alkylketten und hat somit eine negative spontane Krümmung. Des Weiteren wären POPC/POPG (9:1) und POPE/POPG/TOCL (72/23/5), welches ein Imitat der *E.coli* Membran darstellt und die stärkste negative Krümmung besitzt, zu nennen, deren Auswahl auf Vorexperimenten von J. Roll im Zuge von Fluoreszenzexperimenten seiner Doktorarbeit, erfolgte.^[92] Das Lipidsystem mit dem dicksten hydrophoben Bereich ist DEPC/DEPG (3:1).

4.1.2.1. ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Aus Übersichtlichkeitsgründen sind auch hier in Abbildung 4.8 nur die ^{15}N -Spektren

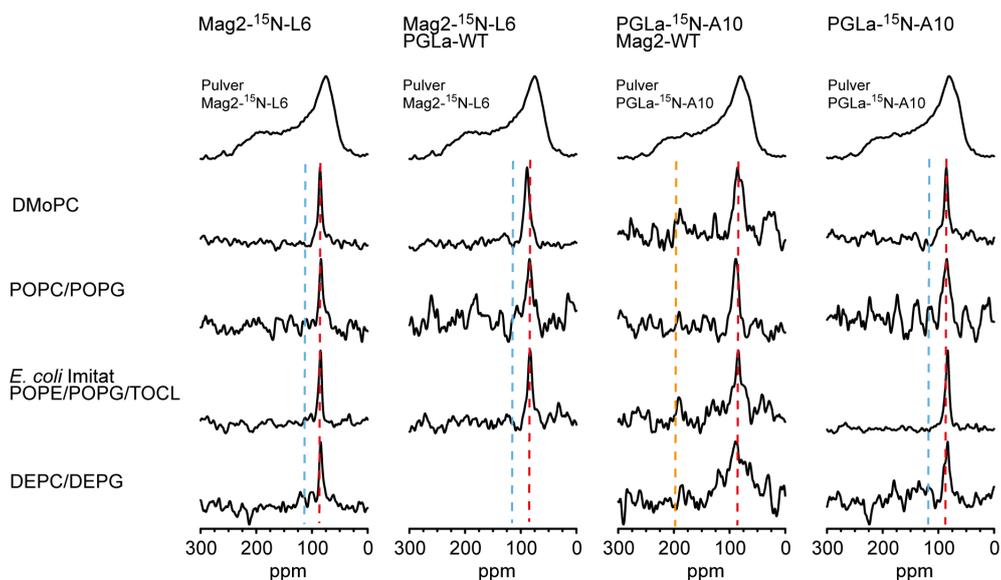


Abbildung 4.8: ^{15}N -NMR-Spektren von markierten Mag2- und PGLa-Analoga in verschiedenen Lipidsystemen mit negativer spontaner Krümmung.

gezeigt. Die Phosphorspektren befinden sich im Anhang B. Die Orientierung der Proben bewegte sich zwischen 50 % und 80 %. Die Spektren sind analog zu den in Unterabschnitt 4.1.1 aufgeführten Spektren angeordnet. Wie aus Abbildung 4.8 klar ersichtlich, zeigen alle Spektren mehr oder weniger die gleiche chemische Verschiebung und somit auch die gleiche Orientierung. Sie sind in all diesen Lipidsystemen an der Oberfläche orientiert (S-Zustand). Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: Chemische Verschiebungen der ^{15}N -NMR-Spektren in Lipidsystemen mit negativer spontaner Krümmung.

Lipidsystem	Mag2 (^{15}N) [ppm]	Mag2 (^{15}N) PGLa-WT [ppm]	PGLa (^{15}N) Mag2-WT [ppm]	PGLa (^{15}N) [ppm]
DMoPC	85 (S)	89 (S)	85 (S)	86 (S)
POPC/POPG (9:1)	84 ^a (S)	84 (S)	85 (S)	89 ^a (S)
POPE/POPG/TOCL (72:23:5)	84 (S)	83 (S)	84 (S)	83 (S)
DEPC/DEPG (3:1)	84 (S)	-	88 (S)	83 (S)

^aDiese Messungen wurden bei einem P/L von 1:100 durchgeführt.

4.1.2.2. ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Da bis dato nur Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung (DMPC/lyso-MPC (3:1), DMPC/DMPG (3:1)^[49]) genauer mittels ^{19}F -Festkörper-NMR untersucht worden sind, wurden ^{19}F -Messungen in einem Lipidsystem mit negativer spontaner Krümmung durchgeführt um in diesem genauere Parameter zu erhalten.

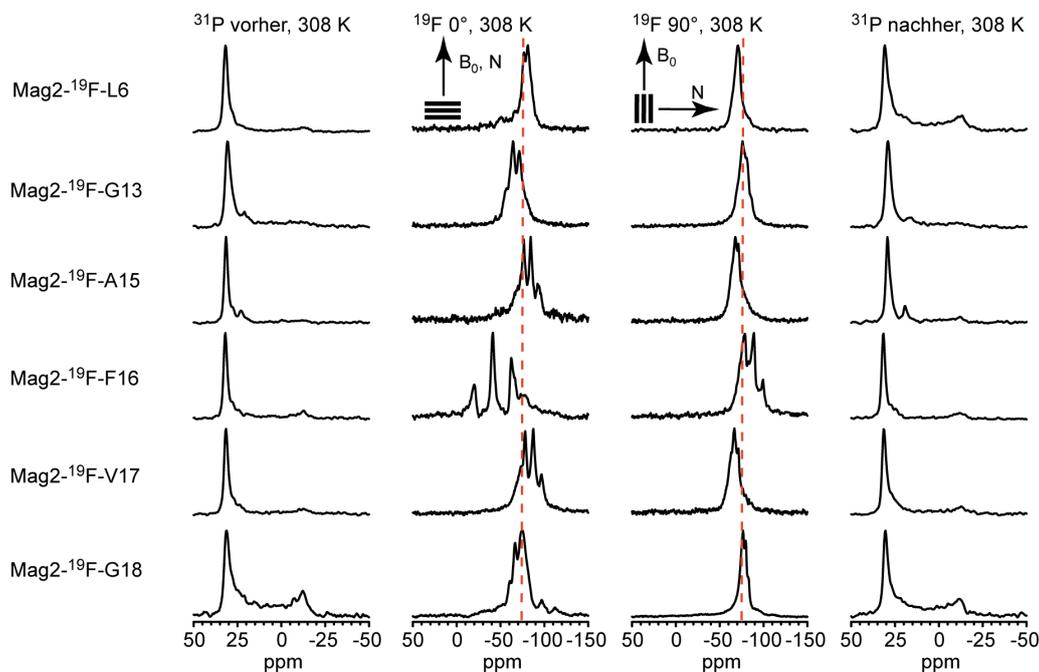


Abbildung 4.9: NMR-Spektren der ^{19}F -markierten Mag2-Analoga in POPC/POPG (9:1).

Für diesen Zweck wurde POPC/POPG (9:1) aus den bereits untersuchten Lipidsystemen ausgewählt (Abbildung 4.9). Für einige Proben wurde eine andere Vorbereitungsmethode verwendet, die ein sublimierbares Additiv einsetzt (Naphtalin), welches die Orientierung der Proben verbessern kann.^[82] Diese Proben wurden nicht eingefroren, da sich das Lipidsystem somit immer überhalb der Phasensprungtemperatur befindet. Auffallend ist in diesem Fall, dass in diesem Lipidsystem Mag2-¹⁹F-G18 nicht so stark aggregieren zu scheint, da es eine mobile Aufspaltung zeigt und nur einen kleinen Pulveranteil. Die aus den in Abbildung 4.9 ermittelten Aufspaltungen sind in Tabelle 4.7 gezeigt.

Tabelle 4.7: ¹⁹F-Aufspaltungen der verschiedenen Mag2-Analoga in POPC/POPG (9:1).

Peptid	0° [kHz]	90° [kHz]
Mag2- ¹⁹ F-L6	-3,6	1,7
Mag2- ¹⁹ F-G13	3,4	nicht aufgelöst (richtige Seite) ^a
Mag2- ¹⁹ F-A15	-3,7	1,7
Mag2- ¹⁹ F-F16	9,9	-4,8
Mag2- ¹⁹ F-V17	-4,3	2,2
Mag2- ¹⁹ F-G18	3,5	-1,5

^aDies bedeutet, dass das Signal auf der gegenüberliegenden Seite von -72 ppm erscheint, aber auf Grund der Signalqualität keine Aufspaltung ausgelesen werden kann.

Aus den in Tabelle 4.7 aufgeführten Aufspaltungen wurden erneut Wellen- und RMSD-Darstellungen erstellt um Zugang zu Neigungswinkel τ , Rotationswinkel ρ und Ordnungsparameter S_{mol} zu erhalten. Diese sind in Abbildung 4.10 gezeigt.

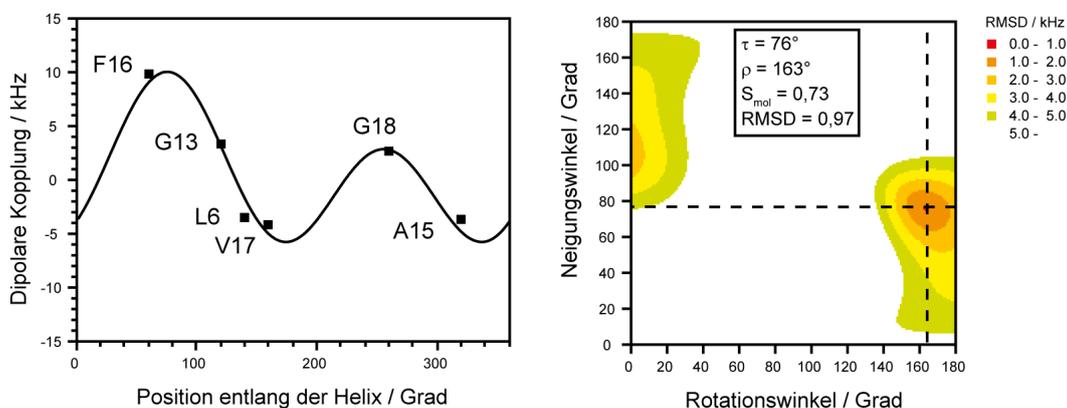


Abbildung 4.10: Aus den Aufspaltungen der ¹⁹F-NMR-Spektren erstellte RMSD- und Wellen-Darstellungen für Mag2 alleine in POPC/POPG (9:1).

In Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps verändert sich die Orientierung von Mag2 nicht wesentlich. Die Spektren sind weitestgehend gleich und in Abbildung 4.11 gezeigt.

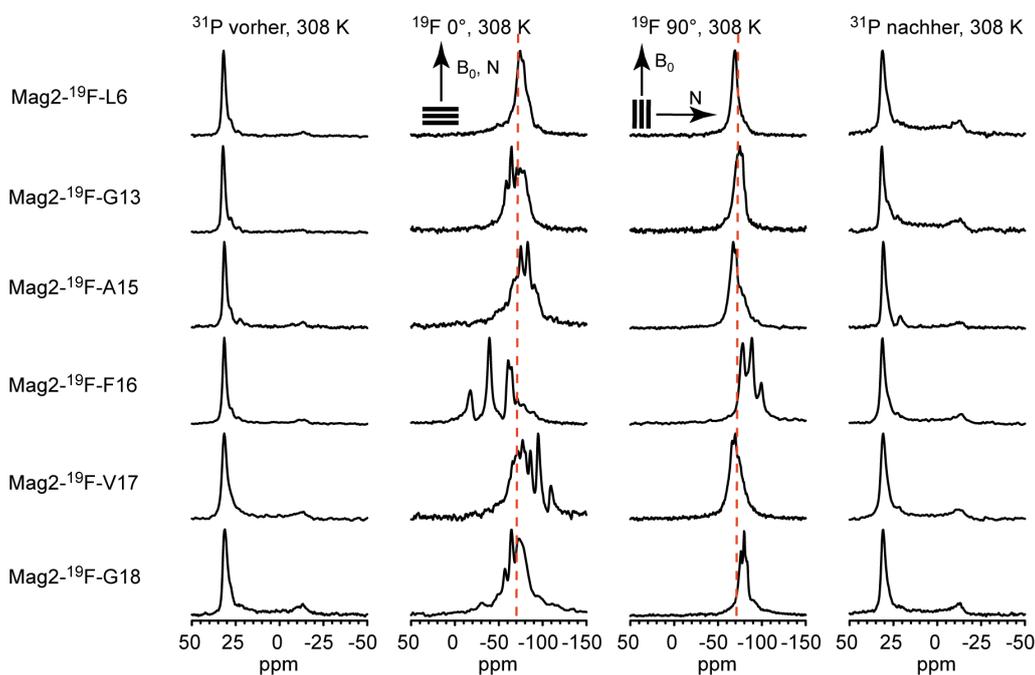


Abbildung 4.11: NMR-Spektren der ^{19}F -markierten Mag2-Analoga in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa Wildtyps in POPC/POPG (9:1).

Auch hier ist Mag2- ^{19}F -G18 gut orientiert und scheint nicht zu aggregieren. Die Aufspaltungen der Spektren sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tabelle 4.8: ^{19}F -Aufspaltungen der verschiedenen markierten Positionen in Gegenwart von PGLa in POPC/POPG (9:1).

Peptid	0° [kHz]	90° [kHz]
Mag2- ^{19}F -L6	-1,7	nicht aufgelöst (richtige Seite) ^a
Mag2- ^{19}F -G13	2,9	nicht aufgelöst (richtige Seite) ^a
Mag2- ^{19}F -A15	-3,6	1,4
Mag2- ^{19}F -F16	10,2	-5,0
Mag2- ^{19}F -V17	-4,2	1,7
Mag2- ^{19}F -G18	3,5	-1,7

^aDies bedeutet, dass das Signal auf der gegenüberliegenden Seite von -72 ppm erscheint, aber auf Grund der Signalqualität keine Aufspaltung ausgelesen werden kann.

Die aus den Aufspaltungen erstellte Wellen- und RMSD-Darstellung ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Die errechneten Werte für den Neigungs- und Rotationswinkel sind nahezu identisch mit denen, die in den Messungen ohne PGLa ermittelt wurden.

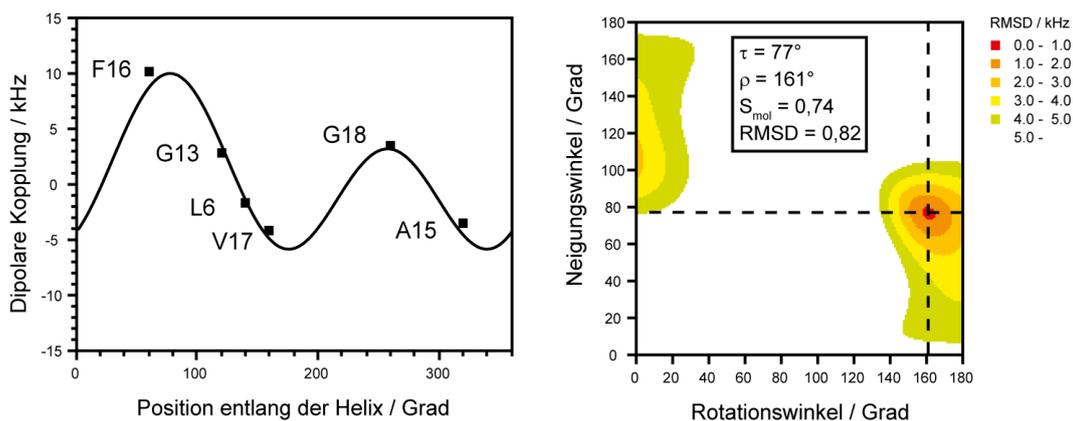


Abbildung 4.12: Aus den Aufspaltungen der ^{19}F -NMR-Spektren berechnete RMSD- und Wellen-Darstellung für Mag2 in Gegenwart von PGLa in POPC/POPG (9:1).

4.2. Diskussion

4.2.1. Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind graphisch vereinfacht in Abbildung 4.13 dargestellt. Hierbei sind die Peptide als Zylinder dargestellt (Mag2 - grün, PGLa - rot, MSI-103 - blau). Der hydrophobe Bereich ist in gelb gezeigt. Der im Zuge dieser Arbeit erstellte Datensatz wurde um die Daten von MSI-103 erweitert. Diese Daten sind zum einen aus Strandberg *et al.* entnommen und zum Teil selbst erstellt worden, allerdings in einem anderen Zusammenhang, welcher in den folgenden Kapiteln näher erläutert wird.^[25]

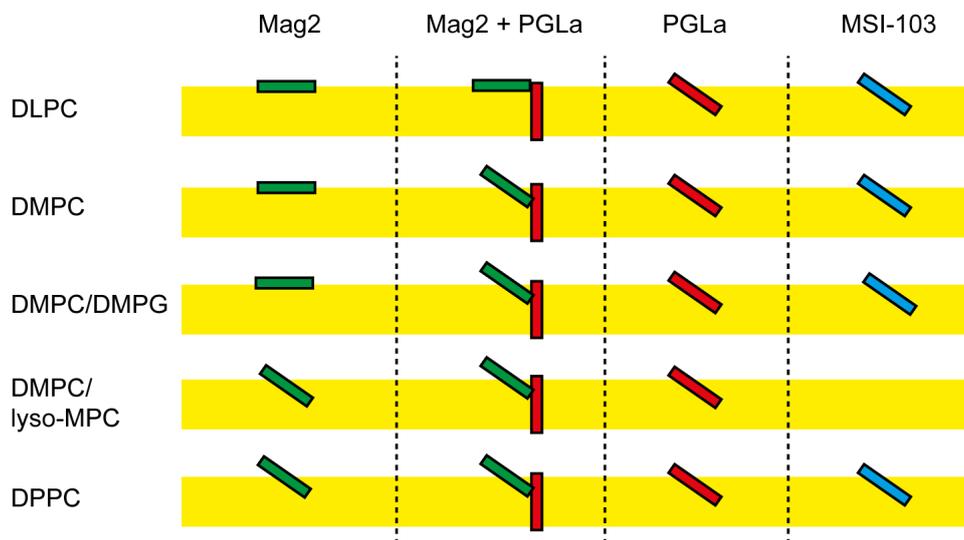


Abbildung 4.13: Zusammenfassung der aus den ^{15}N -Spektren bestimmten Orientierungen für die Lipide mit positiver spontaner Krümmung im Vergleich mit Daten von MSI-103.^[25]

Auffallend ist, dass es sich zwar um unterschiedliche Peptide handelt, sie sich jedoch

recht ähnlich verhalten. Betrachtet man nur Mag2 (grün), so ist es, meist an der Oberfläche orientiert. In DLPC, DMPC, DMPC/DMPG (3:1) ist es in einem S-Zustand orientiert, in DMPC/lyso-MPC (3:1) und DPPC hingegen ist es leicht in die Membran geneigt. Im Falle von DMPC/lyso-MPC ist das ein erwarteter Effekt, da die Lysolipide das Eindringen in die Membran erleichtern sollen. Bei DPPC hätte man eher ein Verhalten wie in DLPC und DMPC erwartet. PGLa alleine hingegen (rot) verhält sich immer gleich. Es ist immer in allen untersuchten Lipidsystemen leicht in die Membran geneigt. In der Gegenüberstellung mit MSI-103 (blau) ist leicht ersichtlich, dass es sich in den untersuchten Lipidsystemen genau so wie PGLa verhält und sich leicht in die Membran neigt (T-Zustand). Betrachtet man nun die Mischung der zwei Peptide PGLa und Mag2, so lässt sich ein anderes Verhalten beobachten. Mag2 ist, bis auf DLPC, leicht in die Membran geneigt (T-Zustand). PGLa hingegen ist in allen Lipidsystemen in der Lage eine transmembrane Orientierung einzunehmen (I-Zustand). Dies ist eine besondere Eigenschaft, da dies ein Zeichen für Porenbildung sein kann. Fasst man nun das Verhalten der Peptide in den Lipidsystemen mit positiver spontaner Krümmung zusammen, so lässt sich sagen, dass PGLa und MSI-103 sich analog verhalten. Sie sind in der Lage sich in die Membranen zu neigen. PGLa ist zudem in der Lage in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 eine transmembrane Orientierung einzunehmen. Mag2 hingegen verhält sich nicht immer gleich. Es nimmt sowohl S- als auch T-Zustände ein, scheint aber nicht in der Lage, eine transmembrane Orientierung im hydrophoben Teil der Membran einzunehmen.

4.2.1.1. Orientierung unter Einbezug der ^{19}F -Daten

Bislang wurden die unterschiedlichen Lipidsysteme nur mittels ^{15}N -Festkörper-NMR untersucht. Diese Methode erlaubt den Zugang zu der ungefähren Orientierung der Peptide. Genauere Information erhält man durch die ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Hierbei wird die Orientierung durch Einbringung mehrerer Markierungen aufgeklärt und gewährt Zugang zu weiteren Parametern, wie dem Rotationswinkel ρ und dem Ordnungsparameter S_{mol} . Die in DMPC/lyso-MPC bestimmten Parameter wurden mit bereits bestimmten Parametern in DMPC/DMPG (3:1) verglichen (Tabelle 4.9). Vergleicht man nun die ermittelten Werte des Neigungswinkels τ miteinander, so fällt auf, dass sich die zwei Lipidsysteme in der Neigung leicht unterscheiden. Mag2 alleine scheint in DMPC/lyso-MPC (3:1) weniger stark geneigt zu sein als in DMPC/DMPG (3:1). Dies ist das Gegenteil der ^{15}N -Ergebnisse. In Gegenwart von PGLa ist die Orientierung nahezu analog: Leicht in die Membran geneigt (DMPC/lyso-MPC) und S-Zustand (DMPC/DMPG). Wobei dazwischen nur ein paar Grad liegen. Interessant ist der Rotationswinkel ρ , welcher sich kaum zu ändern scheint, egal ob PGLa anwesend ist oder um welches Lipidsystem es sich handelt. Sowohl der Rotations- als auch der Neigungswinkel erfahren im Falle von Mag2 keine große Änderung. Obwohl die ^{15}N -Ergebnisse leicht andere Orientierungen zeigen, führen sie dennoch zur gleichen Aussage. Die Orientierung von Mag2 ändert sich nur geringfügig in Gegenwart von PGLa. Betrachtet man jedoch den Ordnungsparameter, so ist eine merkliche Änderung festzustellen. Im Falle von Mag2 alleine, sei es in DMPC/lyso-MPC oder auch DMPC/DMPG, ist der Ordnungsparameter S_{mol} 0,61 bzw. 0,76. Dies bedeutet, dass Mag2 um die eigene Achse rotiert. Sobald PGLa in einer equimolaren Menge vorhanden ist, ändert sich der Ordnungsparameter nach ca. 1. Dies bedeutet, dass die Mobilität des Peptids eingeschränkt ist. Die Menge an Peptid (Teilchenzahl) in Relation zur Menge an Lipid ist in allen Messungen gleich und kann somit nicht der Grund

für die Änderung der Mobilität sein. Dies spricht für eine Interaktion zwischen PGLa und Mag2. Die Zusammenfassung der Parameter und Ergebnisse ist in Abbildung 4.14 gezeigt.

Tabelle 4.9: Aus den Wellen- und RMSD-Darstellungen ermittelte Neigungswinkel τ , Rotationswinkel ρ , Ordnungsparameter S_{mol} und RMSD-Werte für DMPC/lyso-MPC (3:1) im Vergleich mit DMPC/DMPG (3:1).

Zusammensetzung	τ [°]	ρ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
Mag2/DMPC/lyso-MPC (2:75:25)	88	161	0,45	1,29
Mag2/DMPC/lyso-MPC (-G18) (2:75:25)	93	157	0,61	1,18
Mag2/DMPC/DMPG ^a (2:75:25)	74	163	0,76	0,86
Mag2/PGLa/DMPC/lyso-MPC (1:1:75:25)	98	153	0,95	1,81
Mag2/PGLa/DMPC/DMPG ^a (1:1:75:25)	92	158	1,0	1,0

^aDie Daten sind aus der Diplomarbeit entnommen. Die Wellen- und RMSD-Darstellungen sind im Anhang aufgeführt.^[49]

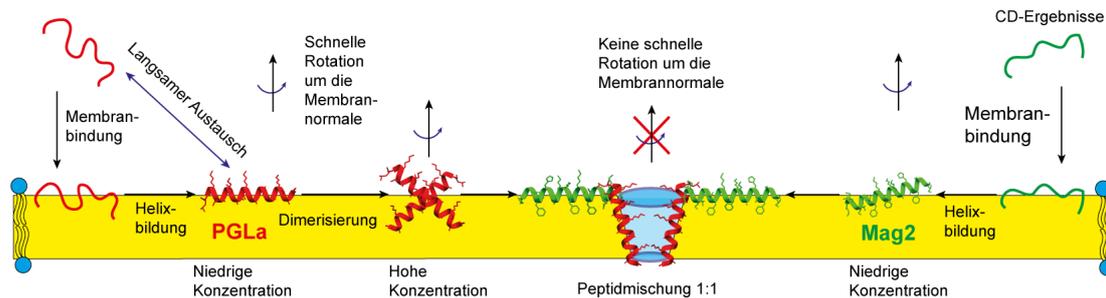


Abbildung 4.14: Veranschaulichung der Reorientierung von Mag2 und PGLa durch das Binden an Membranen in DMPC/DMPG (3:1).

4.2.2. Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung

Auch im Falle der Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung wurden die Ergebnisse zur Vereinfachung in einem Schaubild zusammengefasst (Abbildung 4.15). Auch hier sind die Peptide wieder als Zylinder dargestellt (Mag2 = grün, PGLa = rot, MSI-103 = blau). Der hydrophobe Bereich ist erneut in gelb gezeigt. Das Verhalten der Peptide ist in allen Lipidsystemen gleich. Sie sind sowohl alleine als auch in der Mischung immer an der Oberfläche der Membranen orientiert (S-Zustand).

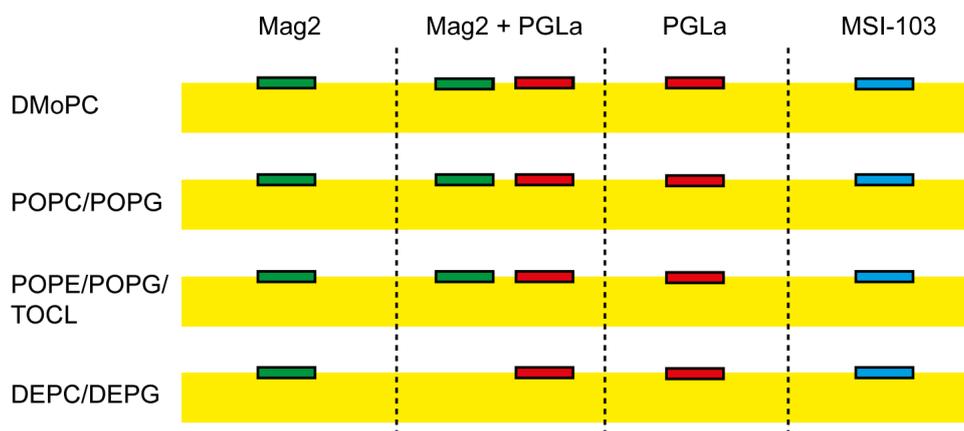


Abbildung 4.15: Zusammenfassung der aus den ^{15}N -Spektren bestimmten Orientierungen für die Lipide mit negativer spontaner Krümmung im Vergleich mit Daten von MSI-103.^[25]

4.2.2.1. Orientierung unter Einbezug der ^{19}F -Daten

Auch im Fall der Lipide mit negativer spontaner Krümmung wurden Messungen mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Das gewählte Lipidsystem war POPC/POPG (9:1). In Tabelle 4.10 sind die zugehörigen Neigungswinkel, Rotationswinkel und Ordnungsparameter zu sehen.

Tabelle 4.10: Aus den Wellen- und RMSD-Darstellungen ermittelte Neigungswinkel τ , Rotationswinkel ρ , Ordnungsparameter S_{mol} und RMSD-Werte für POPC/POPG (9:1) im Vergleich mit DMPC/DMPG (3:1).

Zusammensetzung	τ [°]	ρ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
Mag2/POPC/POPG (2:90:10)	76	163	0,73	0,97
Mag2/DMPC/DMPG ^a (2:75:25)	74	163	0,76	0,86
Mag2/PGLa/POPC/POPG (1:1:90:10)	77	161	0,74	0,82
Mag2/PGLa/DMPC/DMPG (1:1:75:25)	92	158	1,0	1,0

^aDie Daten sind aus der Diplomarbeit entnommen. Die Wellen- und RMSD-Darstellungen sind im Anhang aufgeführt.^[49]

Diese Daten sind erneut im Vergleich mit den Daten in DMPC/DMPG (3:1) dargestellt. Vergleicht man nun das Lipidsystem mit positiver spontaner Krümmung und negativer spontaner Krümmung, so erhält man bei den Messungen mit Mag2 alleine nahezu identische Werte für den Neigungs-, Rotationswinkel und Ordnungsparameter. Der Neigungswinkel ist mehr ein T-Zustand, welcher eigentlich ein S-Zustand sein sollte (^{15}N), aber trotz dieser Tatsache sind die Werte nahezu identisch. In Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps ist nun ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Im Lipidsystem mit positiver spontaner Krümmung ändert sich die Orientierung des Peptids. Der wichtigste Faktor der sich ändert ist der Ordnungsparameter. Dieser ist in diesem Falle 1, was auf eine eingeschränkte Mobilität schließen lässt. In POPC/POPG (9:1) ist dies nicht der Fall. Hier ändert sich keiner der Parameter merklich im Vergleich zu den Messungen ohne PGLa. Auch der Ordnungsparameter bleibt gleich. D. h. die Mobilität von Mag2 wird nicht eingeschränkt durch die Gegenwart von PGLa. Die Zusammenfassung der ^{19}F -NMR Ergebnisse ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

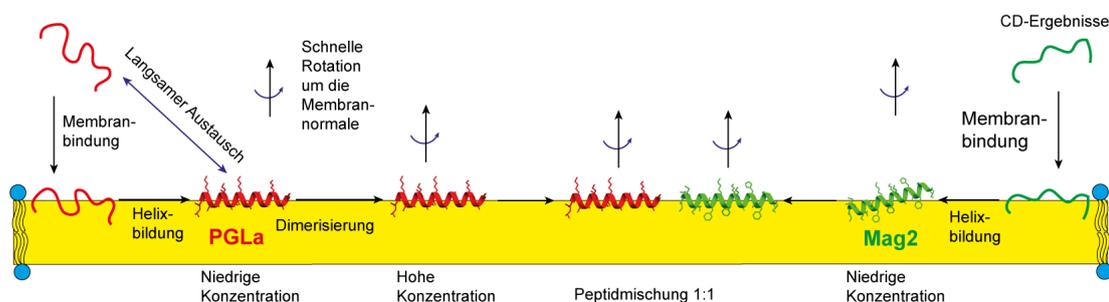


Abbildung 4.16: Veranschaulichung der Orientierung von Mag2 und PGLa in POPC/POPG (9:1).

4.2.3. Zusammenfassung

Die AMPs PGLa, Mag2 und MSI-103 zeigen ein von der spontanen Krümmung abhängiges Orientierungsverhalten. In Lipiden mit negativer spontaner Krümmung orientieren sie sich nur an der Oberfläche der Membranen (S-Zustand). Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung erlauben es allen drei Peptiden sich in die Membran zu neigen. Im Falle von PGLa in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 ist das Peptid sogar in die Membran eingebettet (I-Zustand). Da der I-Zustand von PGLa in Gegenwart von Mag2 mit der Synergie korreliert wird und ein Anzeichen für Porenbildung sein kann, soll dies nun diskutiert werden. Die Argumentation ist einfach geführt:

- In allen Lipidsystemen mit positiver spontaner Krümmung wurde der I-Zustand für PGLa gefunden. Somit zeigen PGLa und Mag2 in all diesen Lipidsystemen Synergie.
- In allen Lipidsystemen mit negativer spontaner Krümmung wurde kein I-Zustand für PGLa gefunden. Somit zeigen diese Peptide in all diesen Lipidsystemen keine Synergie.
- Das *E. coli* Lipidsystem besitzt eine negative spontane Krümmung. Die Peptide sind nur an der Oberfläche orientiert. Die Peptide zeigen keine Synergie.

- PGLa und Mag2 zeigen synergistisches Verhalten gegen *E. coli* Bakterien.

Aus dieser einfach geführten Argumentation ist klar ersichtlich, dass es vermutlich doch nicht trivial ist synergistisches Verhalten gegen Bakterien mit der Orientierung in der Festkörper-NMR zu korrelieren. Die Lipidwahl scheint hier entscheidend zu sein. Es ist nicht ausreichend das *E. coli* Lipidsystem zu untersuchen, keine Orientierungsänderung zu finden und daraus zu schließen, dass keine Interaktion stattfindet. Viel mehr muss die Frage gestellt werden: Ist die Interaktion in orientierten Doppelschichten in einem Lipidsystem mit negativer spontaner Krümmung möglich? Vielleicht müssen die zwei Peptide die richtige Orientierung zueinander haben (PGLa - I-Zustand, Mag2 - T-Zustand), damit sie interagieren können (DMPC/DMPG, $S_{mol} = 1$). In Lipiden mit negativer spontaner Krümmung ist es für diese Peptide nicht möglich eine andere Orientierung als den S-Zustand einzunehmen (orientierte Doppelschichten). Falls die Peptide nicht die richtige Orientierung zueinander haben, kann keine Interaktion stattfinden und somit auch keine Interaktion festgestellt werden (POPC/POPG, $S_{mol} = 0,74$). Die Feststellung, dass keine Interaktion stattfindet, liefert noch nicht die Begründung warum keine Interaktion stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass eine Interaktion stattfindet, aber nicht sichtbar ist. Die Festkörper-NMR liefert nur Zugang zur am stärksten vertretenen Orientierung. Falls nur ein geringer Teil eine transmembrane Orientierung einnimmt, kann das im Falle von Bakterien ausreichend sein, ist aber mittels ^{15}N -Festkörper-NMR nicht sichtbar.

In den kommenden Kapiteln wird klar werden, dass die Festkörper-NMR bei richtiger Lipidwahl ein hilfreiches Werkzeug sein kann, um die Auswirkung von Peptidmodifikationen auf die Interaktion zwischen PGLa und Mag2 zu untersuchen.

4.2.4. Hydrophobe Schichtdicke versus spontane Krümmung

In einer 2011 veröffentlichten Studie von Salnikov *et al.* wurden unterschiedliche Lipidsysteme mit Mag2, PGLa und deren Mischungen untersucht. Sie verwendeten unter anderem DMPC/DMPG (3:1), POPC, POPC/POPG (3:1), di-C20:1-PC, di-C12:0-PC und di-C10:0-PC. Die Eigenschaften der Lipide sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Tabelle 4.11: Lipidsysteme, die von Salnikov *et al.* untersucht wurden.^[60] Die Daten sind aus [26] entnommen und mit Hilfe von [91] berechnet (D_h - hydrophobe Schichtdicke, T_m - Phasensprungtemperatur).

Lipidsystem	Alkylketten	D_h [Å]	T_m [°C]
di-10:0-PC	di-10:0-PC	16,6	-
DLPC	di-12:0-PC	21,0	-1
DMPC/DMPG (3:1)	di-14:0-PC/di-14:0-PG	25,4/25,4	24/23
POPC	16:0-18:1c9-PC	28,3	-2
POPC/POPG (3:1)	16:0-18:1c9-PC/16:0-18:1c9-PG	28,3/28,3	-2/-2
di-20:1-PC	di-20:1-PC	30,6	-4 ^[73]

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 zusammengefasst. Die Mischungen der beiden Peptide wurden in POPC (S), POPC/POPG (S) und DMPC/DMPG (I/S) unter-

sucht. In dieser Studie wurden für Mag2 alleine oder in Mischung mit PGLa nur an der Oberfläche orientierte Zustände aufgefunden. PGLa hingegen reorientiert sich in Gegenwart von Mag2 in DMPC/DMPG transmembran (I-Zustand). In Lipiden unterschiedlicher Schichtdicken ist PGLa unterschiedlich stark geneigt, was hier mit der Länge der Helix korreliert wurde.

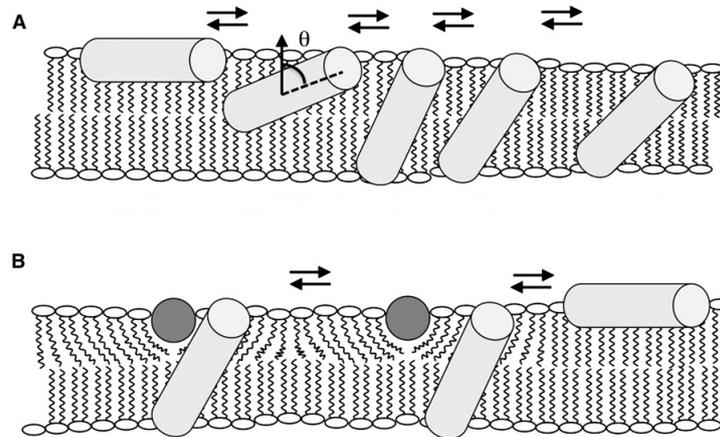


Abbildung 4.17: Darstellung der Orientierungsabhängigkeit PGLa's von der hydrophoben Schichtdicke (A) und die Wechselwirkung zwischen PGLa und Mag2 in DMPC/DMPG (B).^[60]

Unter Anbetracht der Dicke der hydrophoben Schicht der untersuchten Lipidsysteme sind die Annahmen von Salnikov *et al.* richtig. Daher wurden die in den vorangegangenen Kapiteln untersuchten Lipide auch nach diesem Kriterium betrachtet. Der Anschaulichkeit halber wurden hierfür vier Lipidsysteme ausgewählt und in Abbildung 4.18 dargestellt.

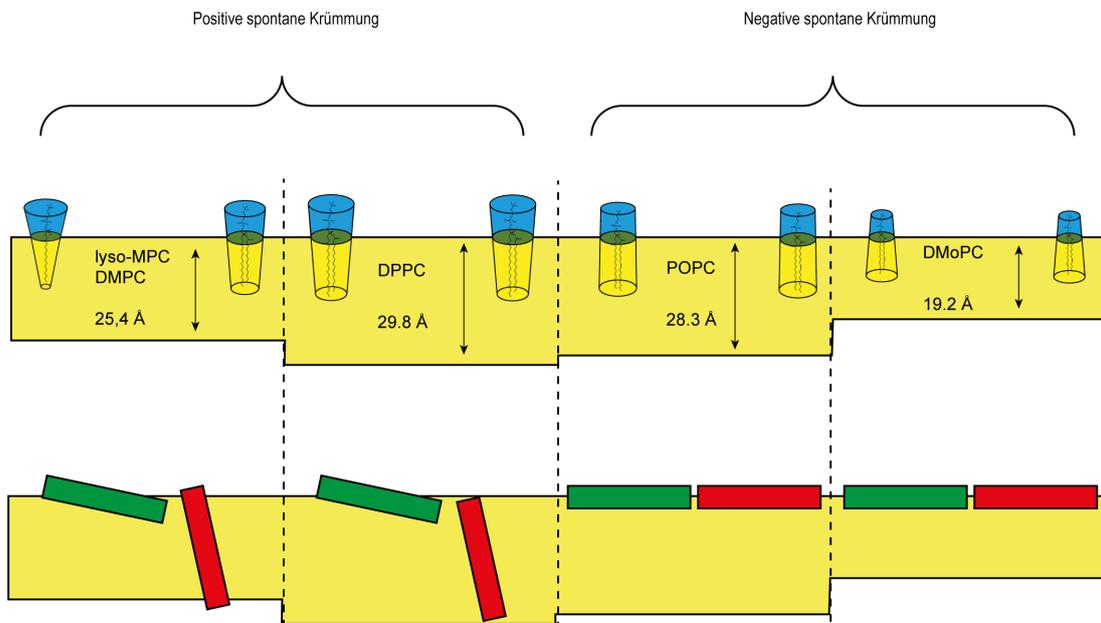


Abbildung 4.18: Hydrophobe Schichtdicke *versus* spontane Krümmung.

Auf der linken Seite sind zwei Lipidsysteme mit positiver spontaner Krümmung und auf der rechten Seite zwei Lipidsysteme mit negativer spontaner Krümmung darge-

stellt. In DPPC, welches ein wenig dicker ist als POPC, ist PGLa transmembran und Mag2 in einem T-Zustand orientiert. Auf der anderen Seite ist DMOPC zu sehen, welches dünner ist als DMPC. Hier sind alle Peptide nur an der Oberfläche orientiert. In den in dieser Arbeit untersuchten Lipidsystemen ist somit keine Abhängigkeit der Peptidorientierung von der Dicke der Lipide zu finden. Unterteilt man die von Salnikov *et al* untersuchten Lipidsystem nach spontaner Krümmung, so erhält man auch nach der Hypothese der spontanen Krümmung richtige Ergebnisse. Die Aufteilung ist in Tabelle 4.12 zu sehen. Alle Messungen in Lipidsystemen mit negativer spontaner Krümmung zeigen an der Oberfläche orientierte Zustände. Die Messungen in Lipidsystemen mit positiver spontaner Krümmung zeigen größtenteils in die Membran geneigte Zustände.

Tabelle 4.12: Chemische Verschiebungen der ^{15}N -NMR-Spektren in Lipidsysteme mit positiver (P) und negativer (N) spontaner Krümmung.

Lipid Lipidsystem	Mag2 (^{15}N) [ppm]	Mag2 (^{15}N) PGLa-WT [ppm]	PGLa (^{15}N) Mag2-WT [ppm]	PGLa (^{15}N) [ppm]	Spontane Krüm- mung
di-10:0-PC	(S)	-	-	132 (T)	P
DLPC	-	-	-	155 (T)	P
DMPC/DMPG (3:1)	-	82 (S)	178 (I)	108 (T)	P
POPC	-	84 (S)	89 (S)	-	N
POPC/POPG (3:1)	-	84 (S)	89 (S)	-	N
di-20:1-PC	-	-	-	78 (S)	N

Somit liegt Salnikov nicht richtig mit der Annahme, dass die Orientierung von der Dicke der hydrophoben Schicht abhängt. Da die Wahl der Lipidsysteme den Aspekt der spontanen Krümmung nicht berücksichtigt, ist dies aus den Messungen nicht ersichtlich und führte zu dieser Annahme. Erfreulich ist, dass diese Ergebnisse die Hypothese bekräftigen, dass die Orientierung von AMPs von der spontanen Krümmung von Lipiden abhängt.

5. Interaktionsstudien mit Peptiden der Mag2-Familie zur Bestimmung der reaktiven Untereinheit, Lokalisation und Stärke der Interaktion

Das Augenmerk dieses Kapitels gilt sowohl den Randbedingungen der Interaktion von PGLa und Mag2, als auch der Überprüfung des equimolaren Verhältnisses von PGLa zu Mag2 für die in dieser Arbeit verwendeten Experimente. In diesem Kapitel soll der Zeitpunkt der Interaktion bestimmt werden. Wechselwirken PGLa und Mag2 schon in Lösung oder passiert dies erst, wenn sie an Lipidmembranen, welche die CM imitieren, binden? Des Weiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass PGLa und Mag2 in der 1:1-Mischung die höchste Wechselwirkungsstärke erreichen.^[58] Dies sollte für die Untersuchungsmethoden Festkörper-NMR und Fluoreszenzspektroskopie überprüft werden. Um Auskunft über die Stabilität des PGLa/Mag2-Komplexes zu erhalten wurden Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen an orientierten Lipiddoppelschichten mit variierendem Peptidgehalt, sprich unterschiedlichem P/L, durchgeführt. Der Grundgedanke ist in Abbildung 5.1 gezeigt. Die Peptide sind als rote und grüne Zylinder dargestellt. Ein stabiler Komplex sollte sich auch schon bei niedrigem Peptid-Gehalt auf der Membran ausbilden. Ein labiler Komplex sollte bei unterschiedlichen Konzentrationen ein unterschiedliches Verhalten zeigen. Aufschluss über die Kooperativität der Moleküle sollte eine weitere konzentrationsabhängige Untersuchung mittels Fluoreszenzspektroskopie in Form des Hill-Koeffizienten geben.

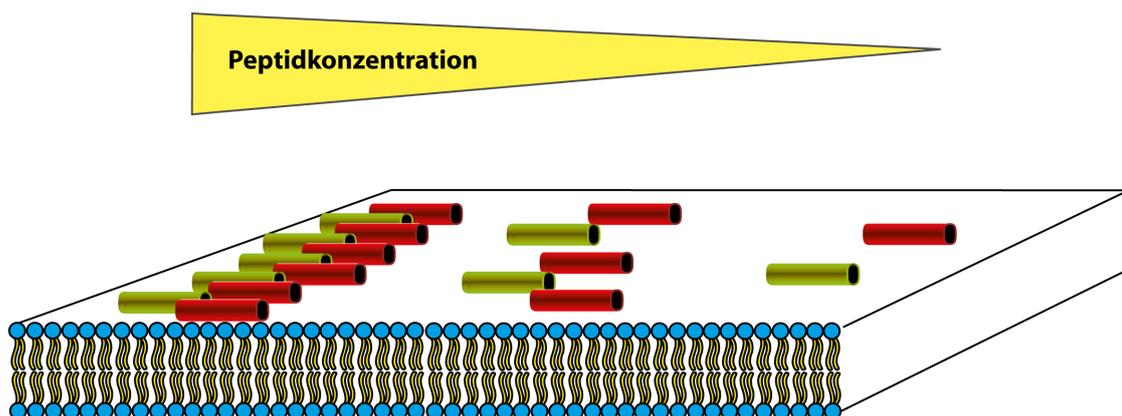


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Peptidkonzentrationen auf einer Lipiddoppelschicht.

5.1. Bestimmung des molaren PGLa-Mag2-Verhältnisses

5.1.1. Methode der kontinuierlichen Veränderung

Zu den in dieser Arbeit verwendeten Methoden gehört die Fluoreszenzspektroskopie. Es konnte in vorangegangenen Arbeiten von Matsuzaki *et al.* mittels fluoreszenzspektroskopischen Methoden mit Calcein gefüllten EYPG-Vesikeln gezeigt werden, dass die equimolare PGLa/Mag2-Mischung das maximale Leakage verursacht (Abbildung 1.13).^[58] In dieser Arbeit wurde das ANTS/DPX-Leakage aus POPC/POPG-Lipidvesikeln (3:1) untersucht. Auf Grund der hohen Anzahl an Messungen ist es nicht möglich alle an einem Tag durchzuführen. Um trotzdem eine Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten wurde an jedem Messtag ein Standard gemessen. Als Standard wurde PGLa, Mag2 und die 1:1-Mischung gewählt. Die Fluoreszenzspektroskopie bedient sich einer relativen Skala, in der das vom Peptid verursachte Leakage, ins Verhältnis zu einem 100%-Wert gesetzt wird. Als 100%-Wert wurde der durch eine Triton X-100 Lösung (0,3 %) verursachte Wert genommen. Als Lipidsystem wurde POPC/POPG (3:1) gewählt. Eigentlich wäre es sinnvoll gewesen DMPC/DMPG (3:1) als Lipidsystem zu verwenden, da es für die NMR-Messungen und die CD-Messungen verwendet wurde. Der Effekt in der NMR war nur in DMPC detektiert worden, nicht aber in POPC. Die hieraus hergestellten Vesikel sind jedoch sehr instabil und es kommt ohne Peptid schon zu Leakage. POPC/POPG (3:1) bildet Vesikel, die über einen Messtag stabil sind und wurde aus diesem Grund gewählt.

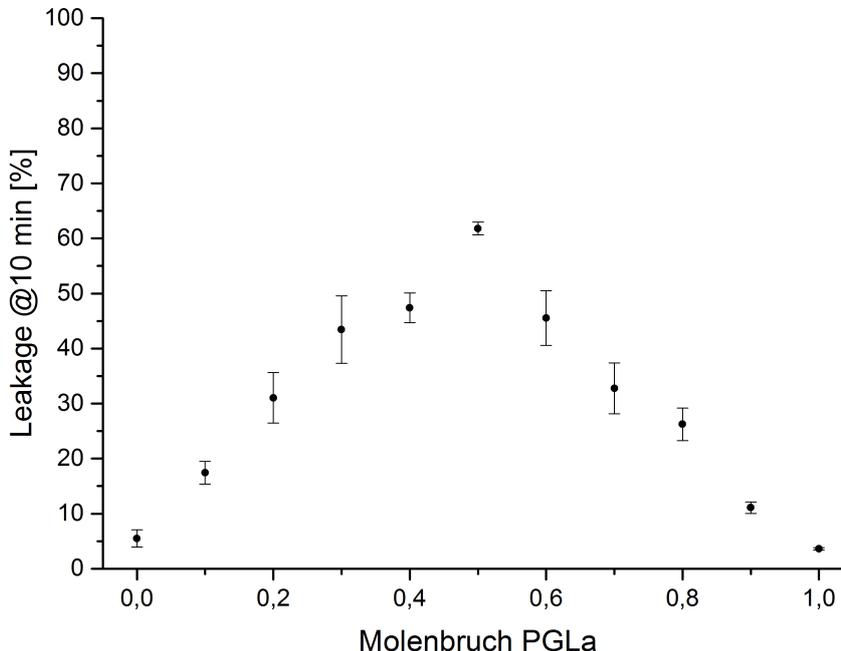


Abbildung 5.2: Job-Darstellung der durch verschiedene PGLa/Mag2-Verhältnisse verursachten Leakagewerte gegen den PGLa-Molenbruch bei einem P/L von 1:161. Es wurde der Mittelwert aus je drei Messungen berechnet. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist als Fehlerbalken gezeigt.

Es enthält die gleiche Anzahl an Ladungsträgern wie DMPC/DMPG (3:1). Die Messprozedur lief wie folgt ab: Das Peptid wurde in Puffer vorgelegt. Nach 100 s erfolgte die Vesikelzugabe. Triton X-100 wurde nach 700 s, sprich 10 min nach Vesikelzugabe zugegeben. Der Wert nach 10 min ist der Leakagewert, welcher nach Blindwertkorrektur (Messung der Vesikelsuspension ohne Peptid) in den folgenden Kapiteln als Leakagewert angegeben wird. Da dieses Lipidsystem sehr sensitiv für die PGLa/Mag2-Mischung ist, wurde das Peptid-zu-Lipid-Verhältnis so eingestellt, dass das durch die equimolare Mischung verursachte Leakage ca. 60 % betrug. In Abbildung 5.2 ist die Überprüfung des equimolaren Verhältnisses von PGLa und Mag2 gezeigt. Hier wurde die Methode der kontinuierlichen Veränderung, auch Job's Methode genannt, angewendet (nach P. Job benannt) und eine Job-Darstellung angefertigt.^[93,94] Hierbei wird bei einem festen Peptid-zu-Lipidverhältnis der Molenbruch einer Komponente variiert. In diesem Falle wurde der PGLa-Molenbruch in Schritten von $\Delta x = 0,1$ von $x = 0$ nach $x = 1$ gemessen.

In allen Fällen wurden drei Messwerte an drei unterschiedlichen Tagen ermittelt. Aus den drei Einzelwerten (Leakage und Synergiefaktor) wurde ein Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung vom Mittelwert mit Gleichung 5.1 bestimmt.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (5.1)$$

Hierbei ist σ_x die Standardabweichung, x der Einzelwert und \bar{x} der Mittelwert. Die Anzahl der Messungen bzw. Werte wird durch n beschrieben. Die für unterschiedlichen PGLa-Molenbrüche erhaltenen Leakagewerte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Die Job-Darstellung der Mittelwerte ist in Abbildung 5.2 zu sehen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Das P/L war an allen drei Messtagen 1:161. Das höchste Leakage verursachte die equimolare Mischung von PGLa und Mag2 bei einem PGLa-Molenbruch von 0,5. Das Leakage betrug ca. 62 %.

Tabelle 5.1: Leakagewerte verschiedener Mag2/PGLa Stoffmengenverhältnisse (P/L, 1:161).

Molenbruch PGLa	Leakage [%]
0	5,5 ± 1,6
0,1	17,4 ± 2,1
0,2	31,0 ± 4,6
0,3	43,4 ± 6,1
0,4	47,4 ± 2,7
0,5	61,8 ± 1,2
0,6	45,5 ± 5,0
0,7	32,8 ± 4,6
0,8	26,2 ± 3,0
0,9	11,1 ± 1,0
1	3,6 ± 0,2

5.1.2. ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Im Zuge dieser Arbeit und vieler vorangegangener Arbeiten und Veröffentlichungen wurden basierend auf den Arbeiten von Matsuzaki *et al.* viele Messungen mit der 1:1-Mischung durchgeführt.^[58] Um zu überprüfen, ob dies auch für die Festkörper-NMR-Spektroskopie gültig ist, wurden Messungen durchgeführt, die ein anderes Peptid-zu-Peptid-Verhältnis hatten. In diesem Fall wurden Messungen mit PGLa-¹⁵N-A10 durchgeführt, da nur hier eine gravierende Änderung in der Orientierung in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 beobachtbar ist. Die Spektren sind in Abbildung 5.3 gezeigt. Hier sind PGLa allein, in einer 2:1-Mischung mit dem Mag2-Wildtyp

und in einer 1:1-Mischung mit dem Mag2-Wildtyp zu sehen. Diese Messungen wurden in DMPC/DMPG (3:1) durchgeführt. PGLa alleine ist, wie schon aus dem vorangegangenen Kapiteln bekannt, in einem T-Zustand orientiert. In der 1:1-Mischung nimmt es eine transmembrane Orientierung ein (I-Zustand). In Spektrum zwei und drei (^{15}N), ist nun klar zu erkennen, dass zusätzlich zu dem I-Zustand von PGLa eine weitere Orientierung vorhanden ist in Form eines T-Zustands.

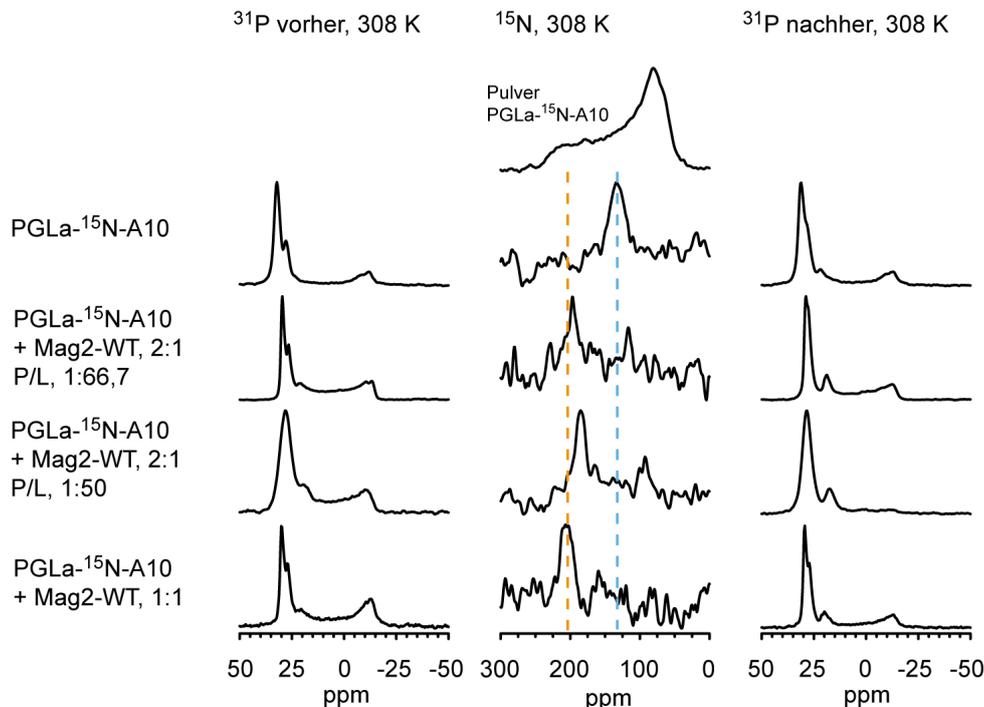


Abbildung 5.3: Gegenüberstellung von PGLa alleine, in einem 2:1-molaren Verhältnis mit dem Mag2-Wildtyp und in equimolarer Mischung mit dem Mag2-Wildtyp (P/L, 1:50, 1:66,7).

Die Signalintensitäten der beiden Zustände in diesem Spektrum sind nicht gleich. Signale sind bei Kreuzpolarisationsexperimenten nicht quantitativ. Die Intensität von I-Zustand und T-Zustand hängt von der Dynamik der Peptide und der N-H Bindungsorientierung zum Magnetfeld ab. Die optimale Kontaktzeit kann sich unterscheiden. Aus diesem Grund können Populationen der Peptide in I- und T-Zuständen aus diesem Spektrum nicht genau determiniert werden. In Tabelle 5.2 sind alle chemischen Verschiebungen und Probenzusammensetzungen aufgeführt.

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der aus den NMR-Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen von PGLa- ^{15}N -A10 alleine, in einem 2:1-molaren Verhältnis zum Mag2-Wildtyp und in equimolarer Mischung mit dem Mag2-Wildtyp.

Peptidmischung	Chemische Verschiebung [ppm]	P/L
PGLa- ^{15}N -A10	133 (T)	1:50
PGLa- ^{15}N -A10, Mag2-WT, 2:1	197 (I), 117 (T)	1:66,7
PGLa- ^{15}N -A10, Mag2-WT, 2:1	186 (I), 95 (S)	1:50
PGLa- ^{15}N -A10, Mag2-WT, 1:1	205 (I)	1:50

5.2. CD-spektroskopische Interaktionstudien

Ziel dieser Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie war es herauszufinden ob PGLa und Mag2 schon in Lösung wechselwirken, oder ein dritter Faktor in Form von Lipiden notwendig ist. Hierzu wurden Versuche mit einer sog. Doppelkammerküvette durchgeführt. Hierbei befinden sich die Lösungen der beiden Peptide in unterschiedlichen Kammern der Küvette. Es werden hierbei die Spektren der Peptide allein

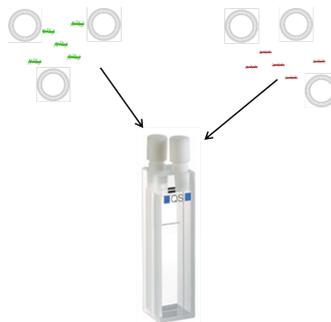


Abbildung 5.4: Darstellung einer Doppelkammerküvette. Die Peptide PGLa (rot) und Mag2 (grün) werden in Gegenwart von Lipidvesikeln in unterschiedliche Kammern gefüllt.

und mit beiden Kammern befüllt gemessen. Anschließend wird die Küvette geschüttelt, was zu einer Durchmischung der beiden Lösungen in den zwei Kammern führt. Daraufhin wird erneut ein CD-Spektrum aufgenommen um etwaige Veränderungen zu detektieren. Eine Doppelküvette ist in Abbildung 5.4 gezeigt. Hier sind zusätzlich zu den Peptiden auch noch Lipidvesikel anwesend. Da beide Peptide in wässrigem Milieu ungeordnete Strukturen einnehmen wurden zuerst Untersuchungen in 10 mM Phosphatpuffer durchgeführt. Diese Spektren sind in Abbildung 5.5 aufgeführt.

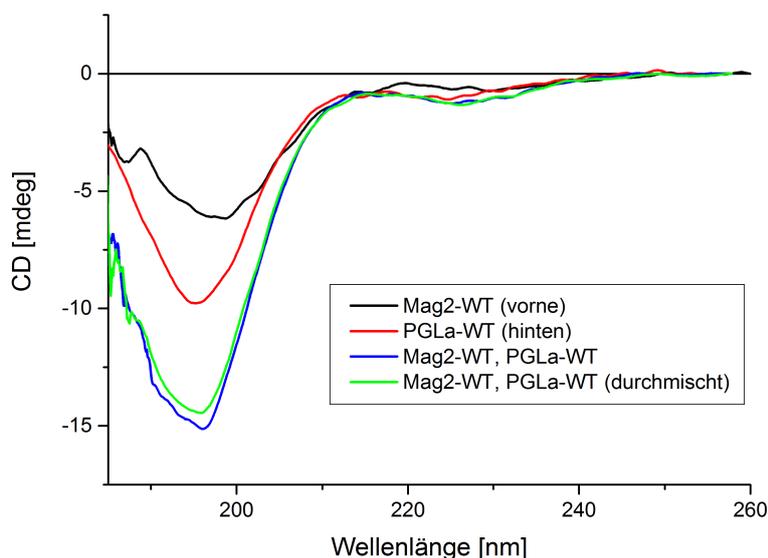


Abbildung 5.5: CD-Spektren in Phosphatpuffer in einer Doppelkammerküvette.

Die Spektren sind in mdeg angegeben. MRE Werte sind im Falle der Mischung unvoreteilhaft. Im ersten Schritt wurden Spektren für die einzelnen Peptide aufgezeichnet. Hier war jeweils nur eine Kammer der Küvette befüllt. Anschließend wurden beide

Kammern mit den beiden Peptidlösungen befüllt und ein Spektrum aufgenommen. Danach wurden die beiden Kammern durchmischt und erneut ein Spektrum aufgenommen. Im Zuge der Interaktion sollte so eine Konformationsänderung detektiert werden. Die Spektren der mit beiden Kammern befüllten Küvette in Phosphatpuffer unterscheiden sich im undurchmischten und durchmischten Zustand kaum. Da die Küvette eine Schichtdicke von 8,75 mm (2 x 4,375 mm) hat, ist die messbare Peptidkonzentration limitiert. Vergleicht man die Spektren mit CD-Spektren, die mit dünneren Schichtdicken gemessen wurden, so ist die gemessene Intensität geringer und der niedrige Wellenlängenbereich ist schlechter aufgelöst. Meist werden CD-Messungen in Küvetten mit 1 mm Schichtdicke oder sogar kleiner durchgeführt. Die Konzentrations- bzw. Weglängenabhängigkeit ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz gegeben (Gleichung 3.3).^[69] Da die Peptide sobald sie an Lipidmembranen binden α -helikale Strukturen ausbilden, sollte die Wechselwirkung in Lösung in α -helikalem Zustand untersucht werden. Hierzu wurde das Additiv TFE eingesetzt, da es α -Helizität induziert (Abbildung 5.6).

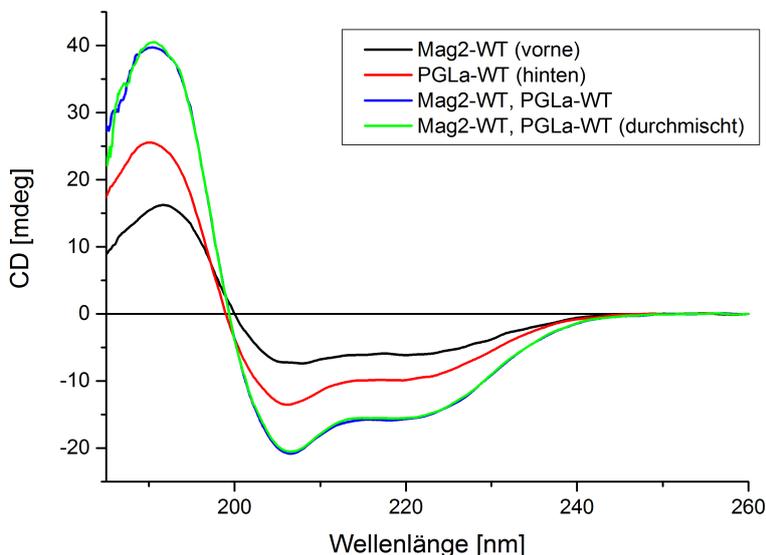


Abbildung 5.6: CD-Spektren in Phosphatpuffer und 30 % TFE.

Die Messungen wurden analog zu denen in Phosphatpuffer durchgeführt. Die Messungen wurden in 30 %iger TFE/Phosphatpuffermischung durchgeführt. Hier ist deutlich die gewünschte α -helikale Struktur zu sehen. Aber auch hier sind die Spektren der undurchmischten und durchmischten Peptidlösungen nahezu identisch. Da nahezu alle Messungen in dieser Arbeit in Gegenwart von Lipiden durchgeführt wurden, sollten auch die Interaktionsmessungen mit Lipidvesikeln durchgeführt werden. Die Wahl des Lipids ist in diesem Fall nicht trivial. Die hier verwendeten Peptide bilden in Gegenwart von negativ geladenen Lipiden α -helikale Strukturen aus. Der Nachteil an dieser Tatsache ist, dass diese Peptide dann an die Lipid-Vesikel gebunden sind. Die Annahme dies geschehe in den zwei Kammern mit jeweils PGLa und Mag2 führt zu dem Schluss, dass ein Großteil der Peptide nach Durchmischung nicht in Wechselwirkung treten kann, da sie auf unterschiedlichen Vesikeln lokalisiert sind. Das zweite Problem ist, dass die α -helikale Struktur sehr prominent ist, d. h. Änderungen in der Sekundär-

struktur sind schwer zu erkennen. Aus diesen zwei Gründen wurde ein Lipid gewählt bei dem zunächst keine Bindung erfolgt und die Peptide ungeordnet vorliegen. Die Idee dahinter ist, dass PGLa und Mag2 stark miteinander wechselwirken und zusammen an die Membran binden und ein helikales Signal detektiert werden kann. Als Lipid wurde DMPC gewählt. Die Spektren sind in Abbildung 5.7 gezeigt und wurden bei einem P/L von 1:20 aufgenommen. Hier ist nun ein weiteres Spektrum gezeigt. Dies ist die berechnete Summe der Einzelspektren von PGLa und Mag2. Dieses Spektrum entspricht ungefähr dem gemessenen Spektrum der undurchmischten Einzellösungen in unterschiedlichen Küvettenkammern. Interessant ist die durchmischte Messung, denn sie unterscheidet sich von dem Spektrum der undurchmischten Messung. Allerdings ist auch hier keine klare neue Sekundärstruktur zu erkennen. Hieraus folgt, dass es keine eindeutige Interaktion in Lösung gibt.

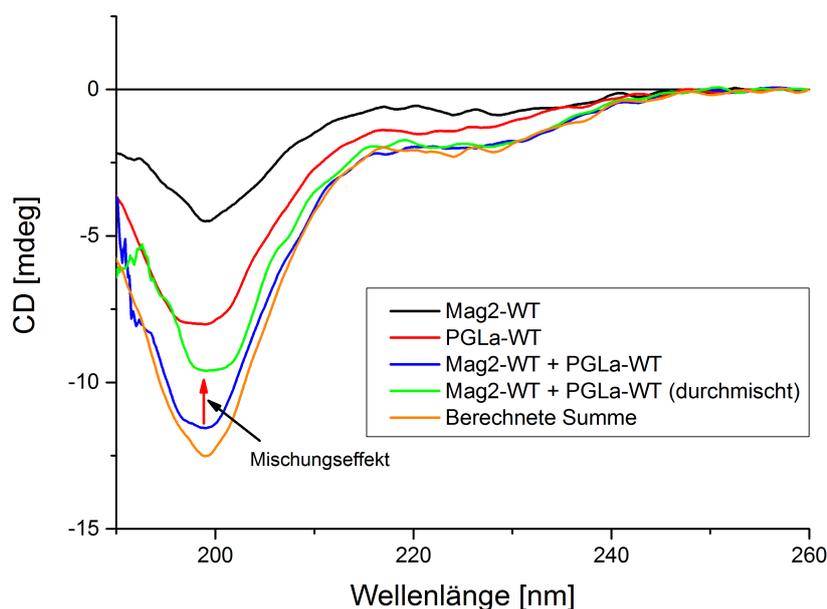


Abbildung 5.7: CD-Spektren in Phosphatpuffer und DMPC-Vesikeln bei einem P/L von 1:20.

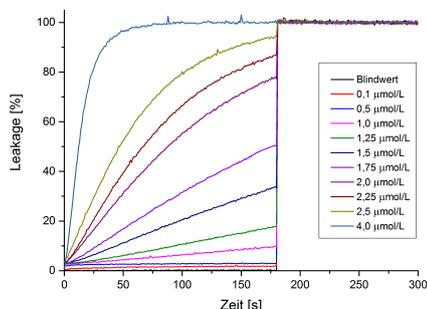
5.3. Konzentrationsabhängige Interaktionsuntersuchungen

5.3.1. Kooperativität

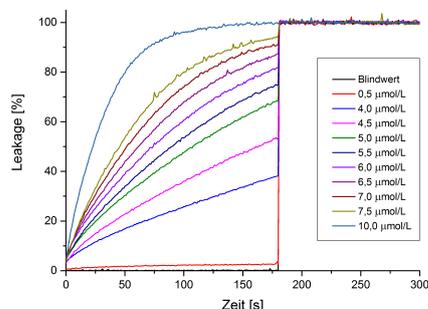
5.3.1.1. Ergebnisse

Da die Mischung von PGLa und Mag2 deutlich aktiver ist als die Einzelkomponenten, kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Peptide miteinander wechselwirken. In diesem Abschnitt bedienen wir uns einer Methodik aus der Enzymkinetik, um die Interaktion zwischen den Molekülen zu untersuchen. Sie wurde ursprünglich für Hämoglobin entwickelt und ist nach ihrem Erfinder Hill benannt. Durch sie erlangt man Auskunft über die Kooperativität von Untereinheiten in Enzymen. In diesem Fall

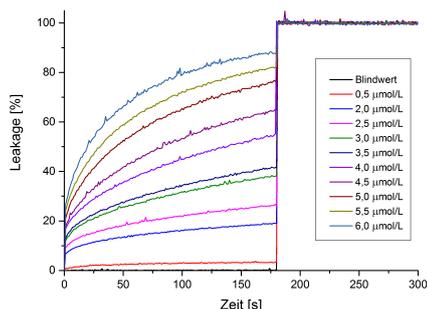
wird sie auf die Kooperativität zwischen Peptidmolekülen angewendet. Um die Kooperativität zu messen wurden erneut Fluoreszenzmessungen im POPC/POPG (3:1) Lipidsystem durchgeführt. Hierbei wurde auch wie in den anderen Messungen die Lipidkonzentration konstant gehalten ($100 \mu\text{mol/l}$) und die Peptidkonzentration variiert. Bei den Fluoreszenzmessungen kann man die Anfangsgeschwindigkeiten ($\%/s$) für verschiedenen Konzentrationen bestimmen. Hierbei wird das Leakage pro Sekunde gemessen. Die Anfangssteigungen (15-20 s) für die verschiedenen Konzentrationen wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Anschließend erfolgte die Anpassung an die sog. Hill-Gleichung (Gleichung 3.12) aus der der Hill-Koeffizient n , die halbmaximale Geschwindigkeit v_{max} und die Konstante $K_{0,5}$ bestimmt wurden.^[95] Der Hill-Koeffizient gibt Aufschluss darüber wie stark die Moleküle miteinander kooperieren. Dies wurde für PGLa, Mag2, MSI-103 und die PGLa/Mag2-Mischung (1:1) durchgeführt. In Abbildung 5.8a, Abbildung 5.8b, Abbildung 5.9a und Abbildung 5.9b sind die Kurven für verschiedene Peptidkonzentrationen gezeigt. In Abbildung 5.10 sind die Steigungen des durch verschiedene Konzentrationen der PGLa/Mag2-Mischung verursachten Leakage aufgetragen (1). Sie wurden an die Hill-Gleichung angepasst.



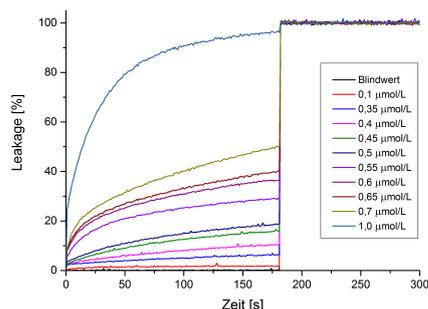
(a) PGLa-Konzentrationsserie (II).



(b) MSI-103-Konzentrationsserie (III).

Abbildung 5.8: Ermittelte Kurven für verschiedene PGLa- und MSI-103-Konzentrationen.

(a) Mag2-Konzentrationsserie (I).



(b) PGLa/Mag2-Konzentrationsserie (II).

Abbildung 5.9: Für verschiedene Konzentrationen von Mag2 und der PGLa/Mag2-Mischung (1:1) ermittelte Kurven.

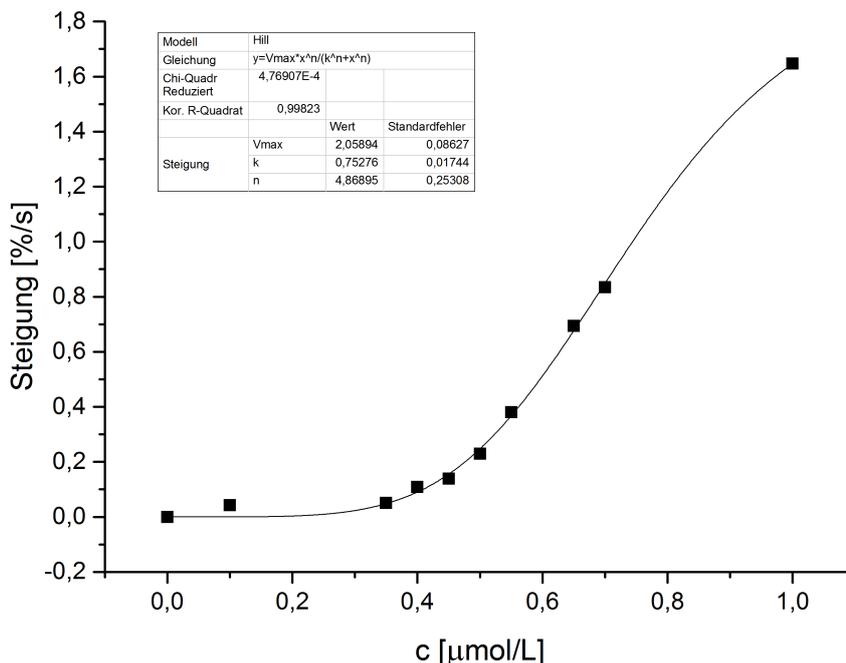


Abbildung 5.10: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der PGLa/Mag2-Mischung (1) ermittelte Anfangssteigungen aufgetragen gegen die Peptidkonzentration mit anschließender Anpassung an die Hillgleichung.

5.3.1.2. Diskussion

In Tabelle 5.3 sind die für die verschiedenen Konzentrationsserien ermittelten Parameter aufgelistet. Im Falle von Mag2 sind die Anpassungen der Kurven in Tabelle 5.4 aufgelistet. Alle für die Hill-Anpassungen verwendeten Steigungen sind im Anhang C in Tabelle C.5 bis Tabelle C.8 aufgelistet. Im Falle der PGLa/Mag2-Mischung konnte in zwei Fällen nur durch nicht Einbeziehen eines bzw. zweier Datenpunkte ein Konvergieren der Kurve erreicht werden. Die Punkte folgten offensichtlich nicht dem Trend und sind im Anhang entsprechend markiert. Im Falle von MSI-103 wurde eine Kurvenkonvergenz nur in einem Fall erreicht. Das hieraus ermittelte v_{max} wurde in den anderen beiden Anpassungen fest gesetzt wodurch auch hier eine Kurvenkonvergenz und eine gute Anpassung erreicht werden konnte.

Dies ist nach entsprechenden Datenanpassungen auch für Mag2 der Fall. Hier wurde um ein Konvergieren zu erreichen ein Wert fest gesetzt. In diesem Fall wurde v_{max} verwendet, da dies als einzige Größe abgeschätzt werden kann. Es wurden ein eher niedriger und ein hoher Wert für v_{max} verwendet (siehe Tabelle 5.4). Eine Konvergenz ohne Wert fest zu setzen konnte nur durch das Auslassen von vier Datenpunkten erreicht werden. Dies waren die Datenpunkte bei niedrigeren Konzentrationen. Diese Anpassungen sind nur unter Vorbehalt zu verwenden. In diesem Fall konnten nur zwei verwertbare Datensätze ermittelt werden.

Es ist klar ersichtlich, dass man hier unterschiedlich starke Kooperativität zwischen den Peptiden selbst und der Mischung von PGLa und Mag2 sieht (Tabelle 5.3).

MSI-103, das biologisch aktivste Peptid, hat einen Hill-Koeffizienten von ca. 2. Der PGLa-Wildtyp scheint deutlich stärker mit sich selbst wechselzuwirken. Der Hill-Koeffizient bewegt sich zwischen drei und vier. Noch höhere Kooperativität erreicht die PGLa/Mag2-Mischung mit einem Hill-Koeffizienten von 4,4 bis 5. Dies erscheint logisch, da die Mischung bei gleicher Gesamtpeptidkonzentration aktiver ist. Da in den Fluoreszenzmessungen nur Lipide involviert sind, können die zwei Peptide nicht zwei unterschiedliche Mechanismen bedienen wie z. B. Membranaktivität und Kanalblockierung. Aus diesem Grund kann die höhere Aktivität nur durch Kooperation der beteiligten Moleküle zustande kommen. Der Unterschied zwischen MSI-103 und PGLa kann verschiedene Gründe haben. Eine Grund ist struktureller Natur und wird im nächsten Kapitel näher erläutert werden.

Tabelle 5.3: Aus den verschiedenen Konzentrationsserien durch entsprechende Kurvenanpassungen berechnete Hill-Koeffizienten n , Maximalgeschwindigkeiten v_{max} und Konstanten $K_{0,5}$.

Peptid	n	$K_{0,5}$ [$\mu\text{mol/L}$]	v_{max} [%/s]
PGLa-WT (I)	$3,3 \pm 0,4$	$5,6 \pm 2,4$	$20,1 \pm 19,0$
PGLa-WT (II)	$4,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,4$	$8,2 \pm 1,5$
PGLa-WT (III)	$3,9 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$	$6,9 \pm 1,0$
MSI-103 (I) ^a	$1,9 \pm 0,1$	$29,1 \pm 1,6$	10,7
MSI-103 (II) ^a	$1,9 \pm 0,1$	$31,6 \pm 2,8$	10,7
MSI-103 (III)	$2,0 \pm 0,2$	$20,5 \pm 10,4$	$10,7 \pm 7,8$
PGLa-WT/Mag2-WT (I)	$4,9 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,1$
PGLa-WT/Mag2-WT (II)	$5,0 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,2$
PGLa-WT/Mag2-WT (III)	$4,4 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,2$

^aHier wurde v_{max} auf einen festen Wert gesetzt, der in (III) ermittelt wurde, da beim Anpassen wechselseitige Abhängigkeiten entstanden und die Kurve nicht konvergiert ist.

Tabelle 5.4: Aus den verschiedenen Konzentrationsserien von Mag2 durch entsprechende Kurvenanpassungen berechnete Hill-Koeffizienten n , Maximalgeschwindigkeiten v_{max} und Konstanten $K_{0,5}$.

Peptid	n	$K_{0,5}$ [$\mu\text{mol/L}$]	v_{max} [%/s]
Mag2-WT (I) ^b	$2,7 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,0$
Mag2-WT (I) ^b	$1,9 \pm 0,1$	$17,1 \pm 1,2$	$10,0 \pm 0,0$
Mag2-WT (I) ^a	$2,2 \pm 0,5$	$13,5 \pm 18,8$	$8,6 \pm 20,1$
Mag2-WT (II) ^b	$2,0 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,0$
Mag2-WT (II) ^b	$1,4 \pm 0,1$	$26,5 \pm 2,6$	$10,0 \pm 0,0$
Mag2-WT (II) ^a	$2,2 \pm ,4$	$6,2 \pm 1,8$	$2,2 \pm 0,7$

^aHier wurden vier Datenpunkte nicht in die Anpassung mit einbezogen.

^bHier wurden je zwei Werte für v_{max} gesetzt (2 %/s, 10 %/s). Der Hill-Koeffizient verändert sich in beiden Fällen kaum. Der niedrigere Wert scheint realistischer, da in keiner Messung ein höherer Wert als 1,2 erreicht wurde.

Matsuzaki *et al.* führten Studien zur Komplexbildung zwischen PGLa und Mag2 durch. Sie fanden mittels fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen Unterschiede in der Verhaltensweise der Peptide. Dieser Studie zu Folge ist die Porenbildungsgeschwindigkeit folgendermaßen abgestuft: 1:1-Komplex \geq PGLa \geq Mag2. Die Le-

Lebensdauer der Poren ist $\text{Mag2} \geq 1:1\text{-Komplex} \geq \text{PGLa}$.^[58] Hieraus folgt der Schluss, dass die Bildung eines supramolekularen Komplexes zur Synergie führt, welche durch schnelle Porenbildung und moderate Porenstabilität geprägt ist.

Betrachtet man nun die Form der in dieser Arbeit ermittelten Leakagekurven, so ergibt sich ein anderes Bild. In Abbildung 5.11 sind für PGLa, MSI-103, Mag2 und die PGLa/Mag2 Mischung verschiedener Konzentrationen, die ca. das gleiche Leakage verursachen, die Kurven aufgetragen.

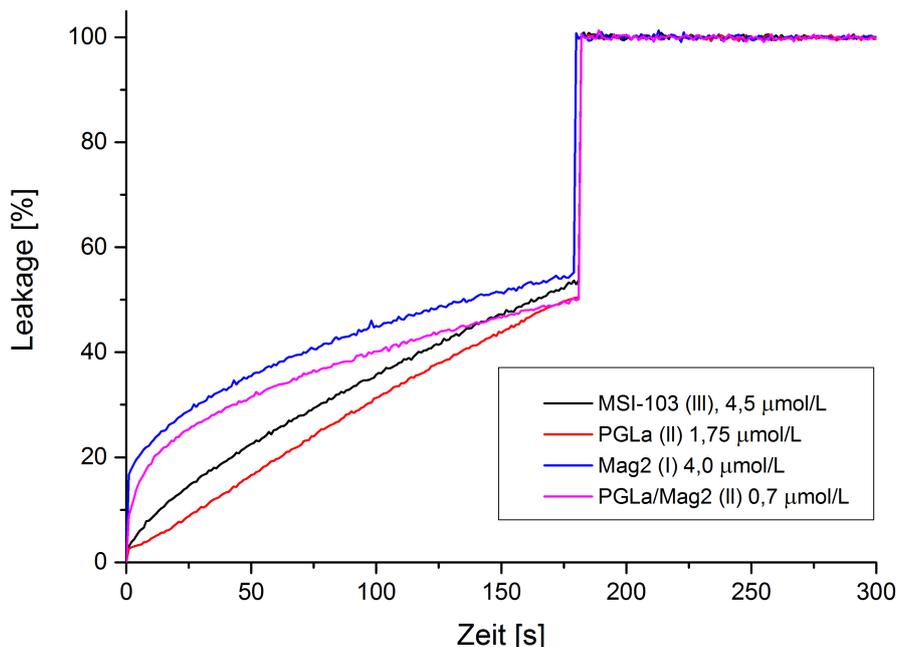


Abbildung 5.11: Kurvenvergleich von PGLa, MSI-103, Mag2 und der PGLa/Mag2-Mischung bei verschiedenen Konzentrationen.

Hier erkennt man deutlich, dass sich PGLa und MSI-103 ähnlich verhalten. Hier ist ein nahezu linearer Zusammenhang zu erkennen, das heißt es findet ein permanentes Leakage statt. Das heißt aber auch, dass die Poren relativ stabil und permanent durchlässig sind. Mag2 und die PGLa/Mag2-Mischung haben Kurven, die relativ schnell ansteigen und dann beginnen abzufallen. Dies spricht für eine schnelle Porenbildung. Diese Poren scheinen aber nicht sonderlich stabil zu sein. Im Falle der PGLa/Mag2-Mischung scheinen diese Poren schneller gebildet zu werden, da sie schon bei geringeren Konzentrationen auftreten. Somit ergibt sich, wenn man das von Matsuzaki *et al.* veröffentlichte Schema verwendet, ein anderer Zusammenhang. Die Stabilität der Poren bzw. deren Lebensdauer verhält sich wie folgt: $\text{PGLa} > \text{Mag2} \geq \text{Komplex}$. Zur Bildungsgeschwindigkeit lässt sich aus diesen Experimenten keine genaue Aussage treffen, da die zeitliche Auflösung (1 s) zu gering ist.

5.3.2. Konzentrationsabhängigkeit der Orientierung von PGLa

Da die Interaktion der Peptide PGLa und Mag2 eine Konzentrationsabhängigkeit zeigt, soll in diesem Abschnitt ausgeschlossen werden, dass PGLa auch alleine bei sehr hohen Konzentrationen auf der Membran in eine transmembrane Orientierung übergeht. Im Zuge der Diplomarbeit wurde gezeigt, dass Mag2 auch bei sehr hohen Peptidkonzentrationen (P/L, 1:10) nur in die Membran geneigt ist (T-Zustand).^[26,49] Es konnte von Tremouilhac *et al.* mittels ^2H -NMR gezeigt werden, dass bei einem P/L von 1:20 das Peptid nur in die Membran geneigt ist (T-Zustand).^[96] In diesem Abschnitt wird das Orientierungsverhalten von PGLa mittels ^{15}N -NMR untersucht. Analog zu den Messungen mit Mag2 werden sehr hohe Konzentrationen auf der Membran verwendet. Es wurden P/L von 1:50, 1:25 und 1:10 untersucht. Sie sind im Vergleich mit der 1:1-Mischung in Abbildung 5.12 gezeigt.

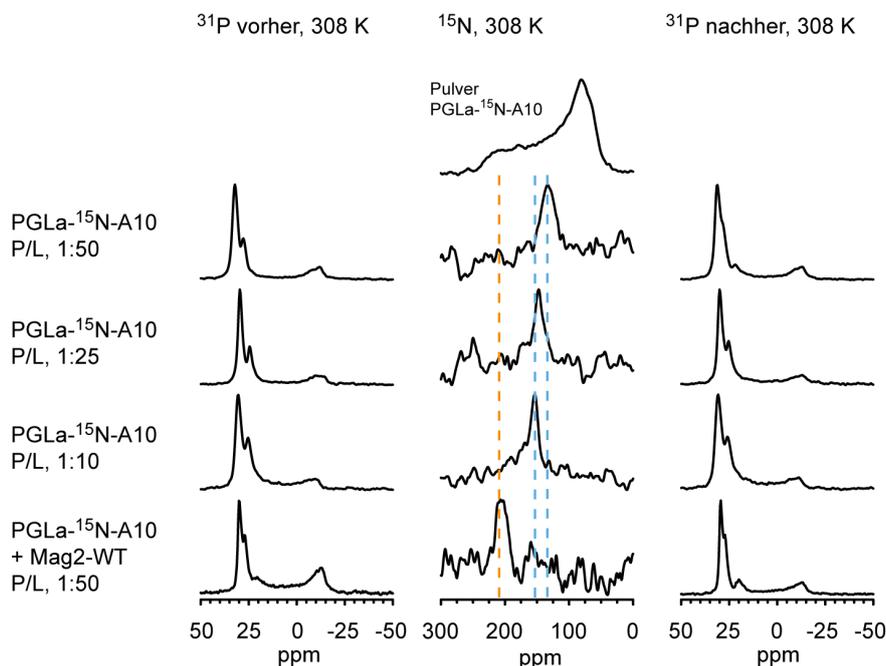


Abbildung 5.12: NMR-Spektren von PGLa- ^{15}N -A10 bei verschiedenen P/L und in Gegenwart des Mag2-Wildtyps.

Es ist zu erkennen, dass sich bei einer Konzentrationserhöhung die Orientierung von PGLa ändert. Jedoch ist das bei fünffacher Konzentration nur eine Änderung von 20 ppm. Alle chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tabelle 5.5: Chemische Verschiebungen von PGLa- ^{15}N -A10 in DMPC/DMPG (3:1) bei verschiedenen P/L.

P/L	Chemische Verschiebung [ppm]
1:50	133 (T)
1:25	147 (T)
1:10	153 (T)

5.3.3. ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

5.3.3.1. Ergebnisse

Da bislang noch keine Aussage über die Stärke des von PGLa und Mag2 gebildeten Komplexes gemacht wurde, wurden konzentrationsabhängige Untersuchungen an Mag2 mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Die grundlegende Fragestellung war: Bildet sich der PGLa-Mag2-Komplex, sobald beide Peptide auf einer Lipidmembran zusammenkommen, oder bedarf es einer bestimmten Konzentration beider Peptide, damit die Wechselwirkung stattfindet? Eine starke Wechselwirkung würde auch bei niedrigen Konzentrationen zustande kommen. Bei einer eher schwachen Wechselwirkung benötigt es eine ausreichende Peptiddichte auf der Membran, um die beiden Peptide in ausreichende Nähe zu bringen. Bisher wurden die Peptide mittels Festkörper-NMR in DMPC/DMPG bei einem P/L von 1:50 untersucht. Hier kann eine Interaktion in der Mischung festgestellt werden. Es findet hauptsächlich eine Änderung des Ordnungsparameter S_{mol} statt, sobald eine equimolare Menge an PGLa vorhanden ist. Dies äußert sich in einer Änderung der durch die verschiedenen Markierungen erzeugten Aufspaltungen. Am stärksten ist dies im Falle von Mag2- ^{19}F -G18 zu beobachten. In Abbildung 5.13 sind die Spektren von an verschiedenen Positionen markierten Mag2-Peptiden bei einer niedrigen Peptidkonzentration auf der Membran gezeigt (P/L, 1:500).

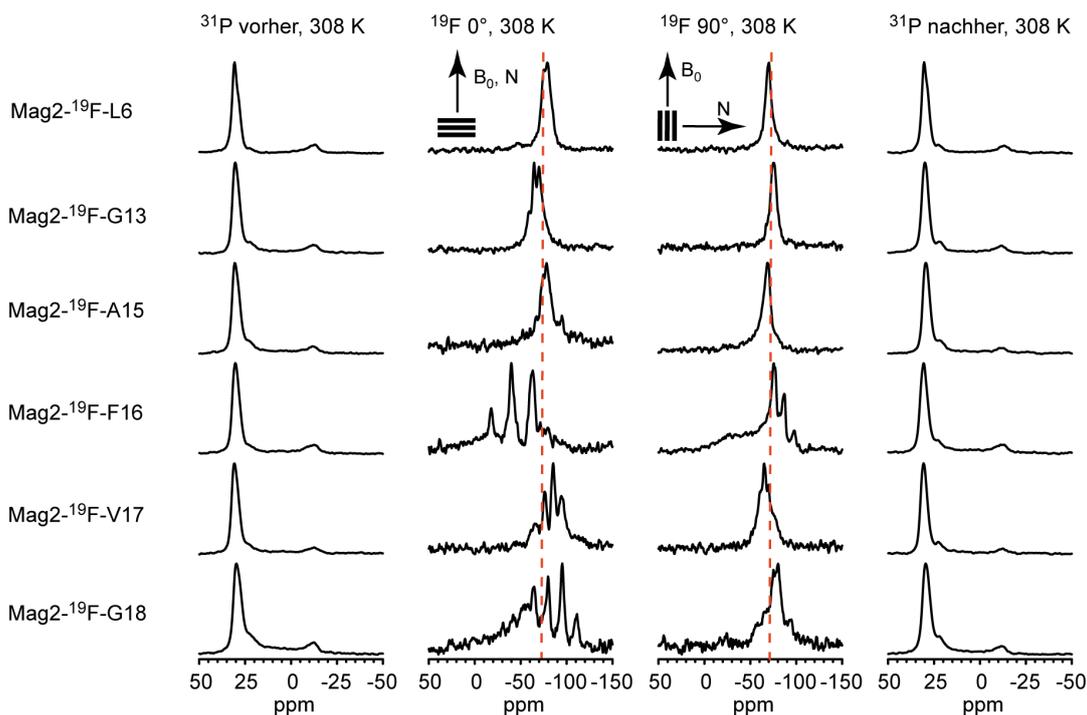


Abbildung 5.13: NMR-Spektren der ^{19}F -markierten Mag2-Analoga in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:500.

Die Aufspaltungen sind denen bei einem P/L von 1:50 aufgenommenen Spektren ähnlich. Auch hier scheint das an Position 18 markierte Peptid zu aggregieren. Dies hat jedoch keinerlei Einfluss auf seine Wechselwirkung mit PGLa. In mikrobiologischen Untersuchungen (Anhang C in Tabelle C.2) von Günther Pritz^[97] und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen (Anhang C in Tabelle C.4) im Zuge dieser Arbeit

konnte gezeigt werden, dass sich Mag2- ^{19}F -G18 wie der Wildtyp verhält, d.h. mit dem PGLa-Wildtyp synergistisch interagiert. Aus den in DMPC/DMPG gemessenen NMR-Spektren wurden die in Tabelle 5.6 aufgelisteten Aufspaltungen ermittelt. Nicht aufgelöst bedeutet, dass das Peptid mobil war, aber die Aufspaltung nicht ausgelesen werden konnte. In Abbildung 5.14 sind nun die Spektren für Mag2 in Gegenwart einer equimolaren Menge an PGLa-Wildtyp bei einem P/L von 1:500 gezeigt.

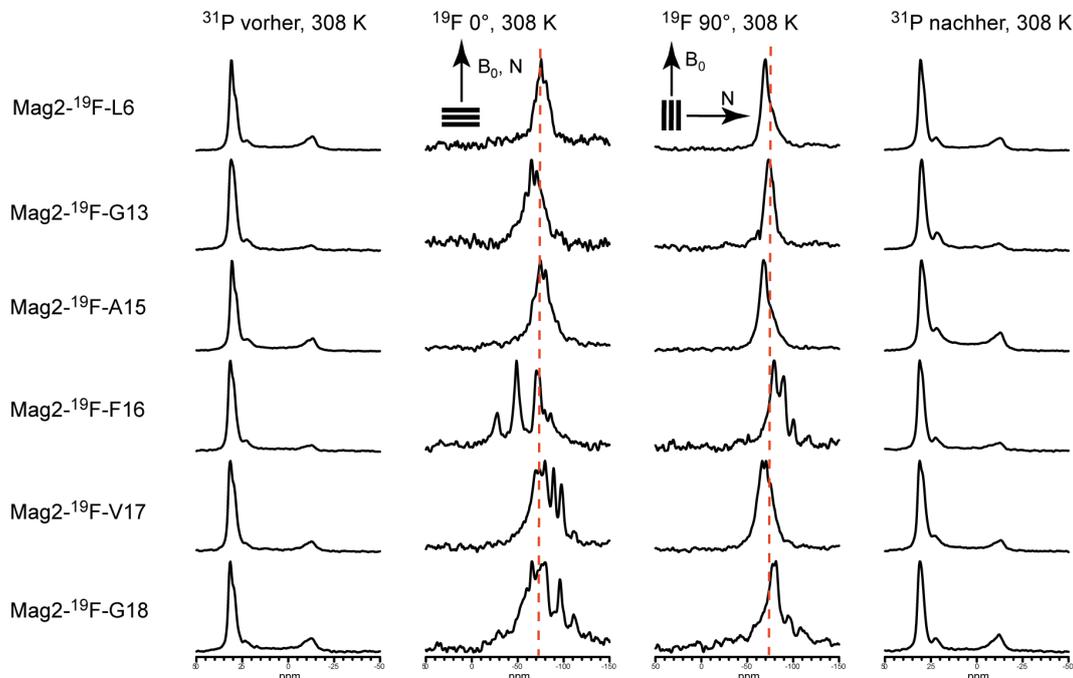


Abbildung 5.14: NMR-Spektren der ^{19}F -markierten Mag2-Analoga in Gegenwart einer equimolaren Menge an PGLa-Wildtyp in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:500.

Die aus den in Abbildung 5.14 gezeigten NMR-Spektren ausgelesenen Aufspaltungen sind in Tabelle 5.6 aufgelistet. Sie sind den aus Abbildung 5.13 ermittelten Aufspaltungen sehr ähnlich.

Tabelle 5.6: ^{19}F -Aufspaltungen der verschiedenen in Mag2 markierten Positionen allein und in Gegenwart einer equimolaren Menge an PGLa-Wildtyp in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:500.

Peptid	^{19}F -Mag2		^{19}F -Mag2 + PGLa-WT	
	0° [kHz]	90° [kHz]	0° [kHz]	90° [kHz]
Mag2- ^{19}F -L6	-1,9	0,8	-1,6	nicht aufgelöst
Mag2- ^{19}F -G13	2,5	nicht aufgelöst	2,7	-1,5
Mag2- ^{19}F -A15	-1,8	nicht aufgelöst	-2,7	1,3
Mag2- ^{19}F -F16	10,4	-5,2	10,1	-5
Mag2- ^{19}F -V17	-4,3	2,2	-4,3	2
Mag2- ^{19}F -G18	5	-2,2	2,6	-1,7

Zwei der markierten Peptiden wurden auch noch bei anderen Konzentrationen untersucht: Das oben wegen seinem Aggregationsverhalten schon erwähnte Mag2- ^{19}F -G18 und Mag2- ^{19}F -V17. Die Spektren von Mag2- ^{19}F -G18 sind in Abbildung 5.15 gezeigt.

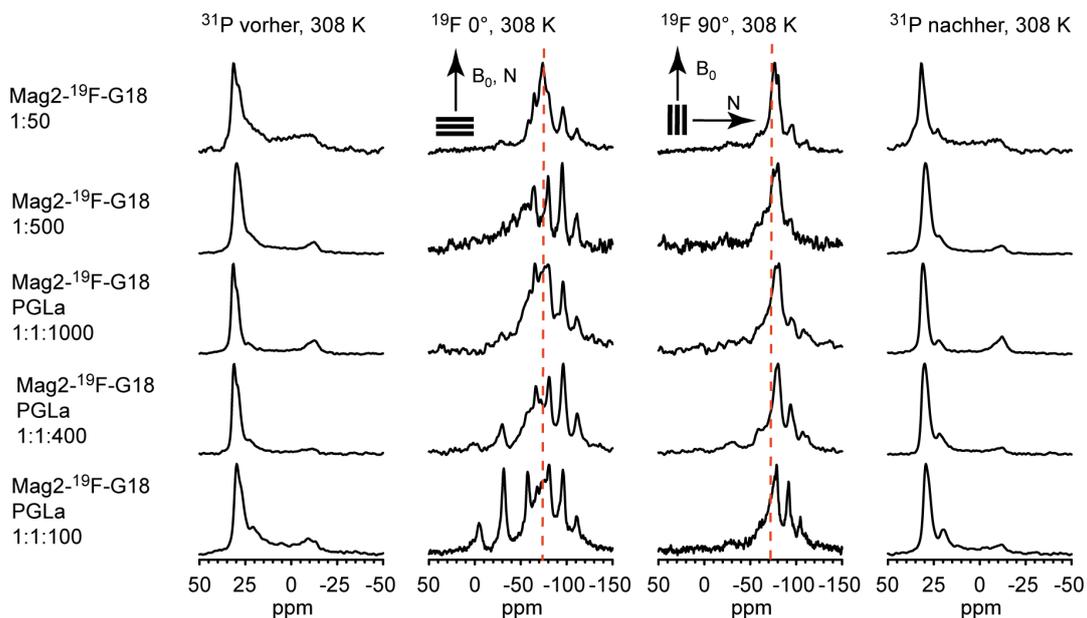


Abbildung 5.15: NMR-Spektren von Mag2- ^{19}F -G18 in DMPC/DMPG (3:1) bei unterschiedlichen P/L sowohl in Gegenwart des PGLa-Wildtyps als auch ohne.

In Gegenwart von PGLa bildet sich eine große Aufspaltung zusätzlich zum Pulveranteil. Dies ist in der letzten Zeile zu sehen. Verfolgt man die verschiedenen Konzentrationen stufenweise so ist erkennbar wie trotz Gegenwart des PGLa-Wildtyps diese Aufspaltung bei geringeren Konzentrationen verschwindet und nur noch die Aufspaltung bleibt, welche der von Mag2 alleine bei hohen Konzentrationen entspricht. Wie bereits oben erwähnt hat das Aggregationsverhalten keinen Einfluss auf die Aktivität und die Interaktion mit dem PGLa-Wildtyp.

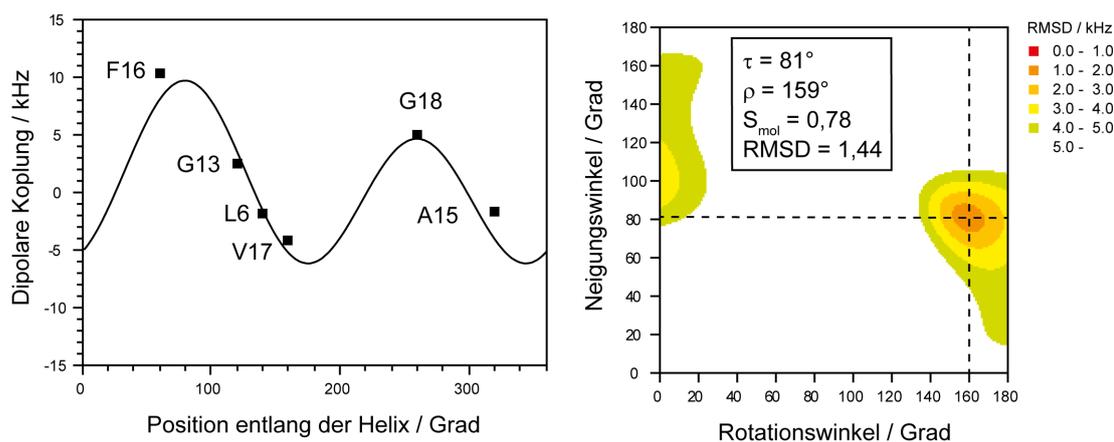


Abbildung 5.16: Aus den Aufspaltungen der ^{19}F -NMR-Spektren erstellte Wellen- und RMSD-Darstellung für Mag2 alleine in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:500.

Aus den in Tabelle 5.6 aufgeführten Aufspaltungen wurde der Neigungswinkel τ , der

Rotationswinkel ρ , der Ordnungsparameter S_{mol} sowie der RMSD-Wert berechnet. Die entsprechenden Wellen- und RMSD-Darstellungen sind in Abbildung 5.16 und Abbildung 5.17 gezeigt.

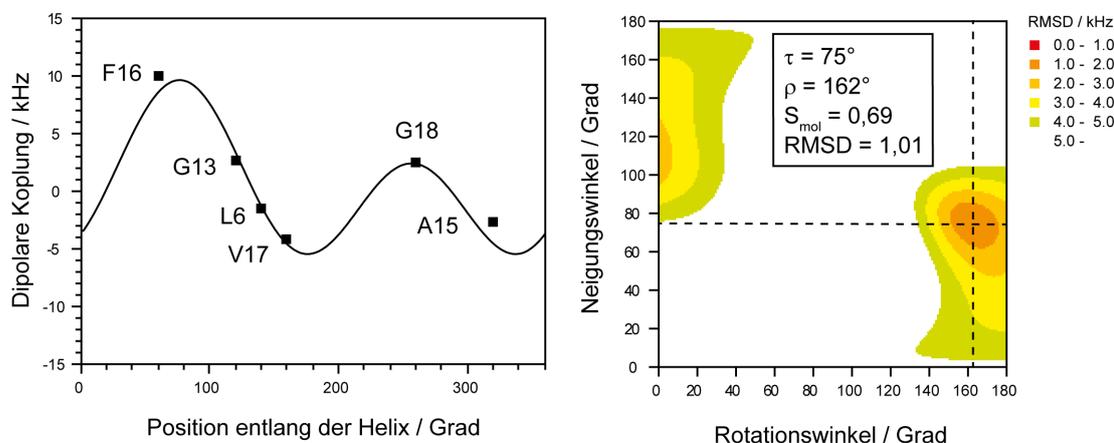


Abbildung 5.17: Aus den Aufspaltungen der ^{19}F -NMR-Spektren erstellte Wellen- und RMSD-Darstellung für Mag2 in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa-Wildtyps in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:500.

In Abbildung 5.18 sind die NMR-Spektren von Mag2- ^{19}F -V17 zu sehen.

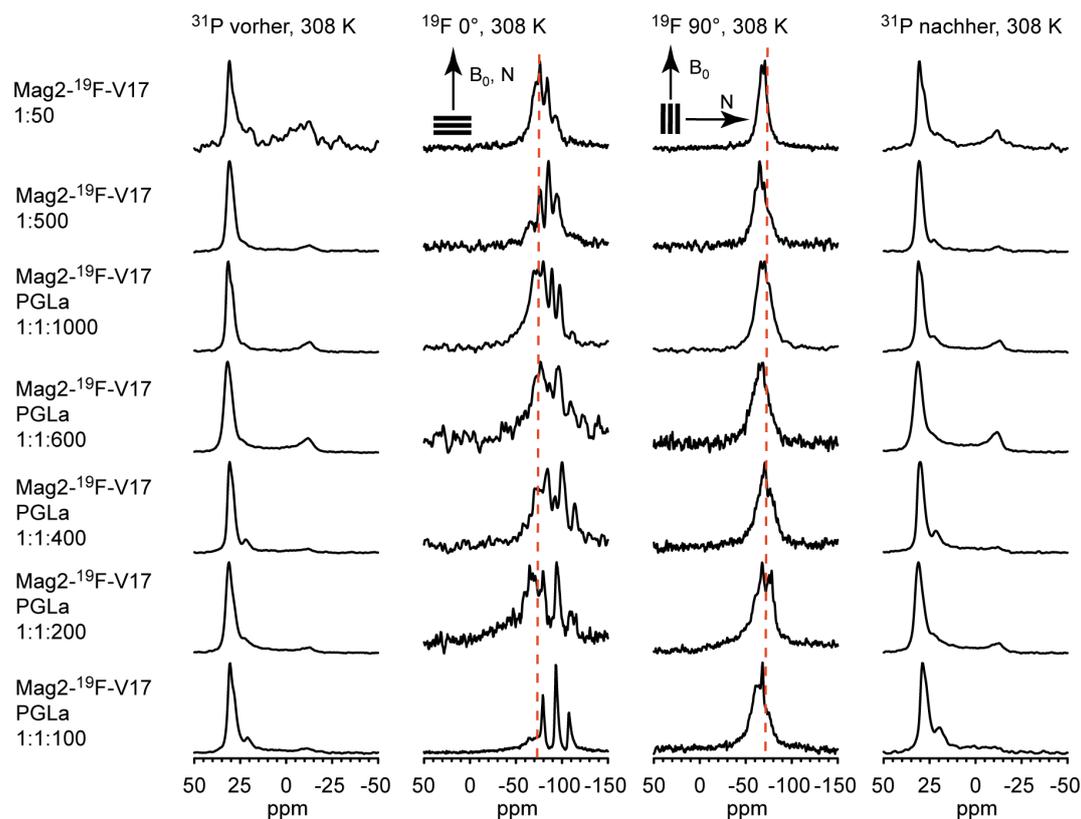


Abbildung 5.18: NMR-Spektren von Mag2- ^{19}F -V17 in DMPC/DMPG (3:1) bei unterschiedlichen P/L alleine und in Gegenwart des PGLa-Wildtyps.

Hier ist der Unterschied zwischen den Aufspaltungen nicht so groß. Dennoch kann man erkennen, dass sich bei hohen Konzentrationen die Aufspaltung ändert. Zwischenzeit-

lich sind sogar zwei Spezies vorhanden. Die aus den Aufspaltungen ermittelten Daten sind in Tabelle 5.7 aufgelistet.

5.3.3.2. Diskussion

Aus den Ergebnissen von Mag2-¹⁹F-V17 und Mag2-¹⁹F-G18 lässt sich schließen, dass sich der Komplex zwischen PGLa und Mag2 zwischen einem P/L von 1:500 und 1:300 zu bilden beginnt bzw. sich das Gleichgewicht von den einzelnen Peptiden von der Seite der Monomere auf die Seite des Komplexes verlagert. Vollständig ausgebildet ist er dann zwischen einem P/L von 1:200 und 1:100.

Tabelle 5.7: Aus den Wellen und RMSD-Darstellungen ermittelte Neigungswinkel τ , Rotationswinkel ρ , Ordnungsparameter S_{mol} und RMSD-Werte für DMPC/DMPG (3:1).

Zusammensetzung	τ [°]	ρ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
Mag2/DMPC/DMPG ^a (2:75:25)	74	163	0,76	0,87
Mag2/DMPC/DMPG (2:750:250)	81	159	0,78	1,44
Mag2/PGLa/DMPC/DMPG (1:1:750:250)	75	162	0,69	1,01
Mag2/PGLa/DMPC/DMPG ^a (1:1:75:25)	92	158	1,0	1,0

^aDie Daten sind aus der Diplomarbeit entnommen. Die Wellen- und RMSD-Darstellungen sind im Anhang aufgeführt.^[49]

Aus Tabelle 5.7 wird deutlich, dass sich Mag2 trotz Gegenwart von PGLa bei niedrigen Peptidkonzentrationen auf der Membran so verhält, als wäre PGLa nicht anwesend. Besonderes Augenmerk sollte man hier auf den Ordnungsparameter legen. Er gibt Information über die Mobilität eines Peptids. Ein Ordnungsparameter von eins bedeutet dass die Mobilität des Peptids eingeschränkt ist. Dies ist nur der Fall bei einem P/L von 1:50 in Gegenwart von PGLa. Aus den Ergebnissen folgt, dass die Interaktion nur stattfindet bzw. seine volle Wirkung entfaltet, wenn eine Grenzkonzentration auf der Membran überschritten wird, d.h. der Komplex ist eher instabil.

5.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der Peptide PGLa und Mag2 nicht in Lösung stattfindet, sondern auf bzw. in Gegenwart von Lipidmembranen. Des Weiteren bilden die zwei Peptide in den experimentellen Rahmenbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten biophysikalischen Methoden die stärkste Wechselwirkung in der equimolaren Mischung aus. Dies lässt darauf schließen, dass die zwei Peptide ein Hetero-2n-mer bilden ($n = 1, 2, 3, \dots$). In Abbildung 5.19 ist die Komplexbildung durch PGLa und Mag2 als Reaktionsgleichung dargestellt. Bei niedrigen Konzentrationen ist die Lage des Gleichgewichts auf der Seite der Monomere, bei hohen Konzentrationen auf der Seite des Hetero-2n-mers. Die Kooperativität zwischen PGLa und Mag2 ist höher als zwischen den einzelnen Peptiden. Die Interaktion ist

auch in Gegenwart von Lipidmembranen nicht sonderlich stark. In DMPC/DMPG (3:1) bedarf es, um den Komplex zu beobachten, eines P/L von ca. 1:200.

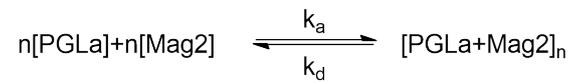


Abbildung 5.19: Reaktionsgleichung der Bildung des PGLa/Mag2-Komplexes aus den Monomeren.

Trotzdem hat diese schwache Wechselwirkung einen dramatischen Effekt auf die Aktivität, welcher in den Leakage-Experimenten gezeigt werden konnte (Abbildung 5.2). Im nächsten Kapitel wird die Interaktion genauer untersucht werden.

6. Von PGLa nach MSI-103 und zurück oder der Einfluss von geladenen Aminosäuren und Glycinen auf die Wechselwirkung zwischen PGLa und Mag2

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen PGLa und Mag2 von den gewählten Randbedingungen der Experimente abhängt. Die beobachtbaren Ergebnisse in der Festkörper-NMR hängen vom gewählten Lipidsystem und dem P/L bzw. der Peptidkonzentration auf den Modellmembranen ab. Des Weiteren ist es sinnvoll das richtige Peptid-zu-Peptid-Verhältnis für die Untersuchungen zu wählen (1:1). All die Ergebnisse sprechen für eine orientierungsabhängige Interaktion zwischen PGLa und Mag2. Grundlage für das folgende Kapitel sind verschiedene Arbeitshypothesen, die auf verschiedenen Wechselwirkungstypen basieren. Generell können Peptide und Proteine durch Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken, Salzbrücken und Van-der-Waals-Kräfte in Wechselwirkung treten. Für Disulfidbrücken fehlen den zwei Peptiden die benötigten Cysteine. Diese Art der Wechselwirkung ist somit auszuschließen. Die im folgenden Kapitel beschriebenen Mutationen an PGLa und an Mag2 basieren auf Salzbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Diese beiden Wechselwirkungstypen hängen stark vom Abstand der beteiligten Moleküle ab. Die elektrostatischen Wechselwirkungen werden über das Dipolmoment $\mu = q \cdot r$ (q - Ladung, r - Abstand) definiert. Die Van-der-Waals-Wechselwirkung hängt sogar mit der sechsten Potenz vom Abstand ab (r^{-6}).^[98]

6.1. Salzbrückenmutationen

Da es sich bei PGLa und Mag2 um geladene Moleküle handelt und die Vermutung nahe liegt, dass zwischen den beiden Molekülen eine Interaktion stattfindet, lag das Augenmerk bei der Selektion der Mutationen dieses Abschnittes auf Ladungswechselwirkungen (Abbildung 6.1).

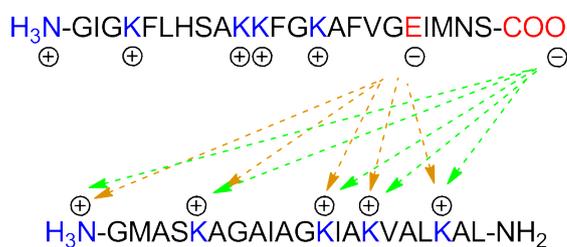


Abbildung 6.1: Durch geladene Aminosäuren hervorgerufene Ladungswechselwirkungsmöglichkeiten zwischen PGLa und Mag2.

Beide Moleküle tragen positiv geladene Lysine in sich, aber nur Mag2 hat zwei negativ geladene Reste in Form des C-Terminus und einer Glutaminsäure. Aus diesen möglichen Salzbrücken wurden Ideen entwickelt, um deren Existenz oder Nichtexistenz zu beweisen. Alle hieraus entwickelten Mutationen sind in Tabelle 6.1 gezeigt.

Tabelle 6.1: Für die Untersuchungen der Ladungsinteraktion verwendeten Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa- ¹⁵ N-A10	-	GMASKAGAI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PGLa-K5E	-	GMAS E AGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PGLa-K12E	-	GMASKAGAIAG E IAKVALKAL-NH ₂
PGLa-K15E	-	GMASKAGAIAGKIA E VALKAL-NH ₂
PGLa-K19E	-	GMASKAGAIAGKIAKVAL E AL-NH ₂
PGLa-K19E- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKAGAI A GKIAKVAL E AL-NH ₂
Mag2-WT	-	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH
Mag2-amid	-	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS- NH₂
Mag2-E19Q	-	GIGKFLHSAKKFGKAFV Q IMNS-OH
Mag2-E19K	-	GIGKFLHSAKKFGKAFV K IMNS-OH
Mag2-E19K-amid	-	GIGKFLHSAKKFGKAFV K IMNS- NH₂

In PGLa wurden nach und nach alle Lysine durch je eine Glutaminsäure ersetzt. In Abbildung 6.2 sind die PGLa-Mutationen in der Helikalen-Netz-Darstellung gezeigt. Dies würde bei der richtigen Aminosäure zur Blockierung der Salzbrücke führen.

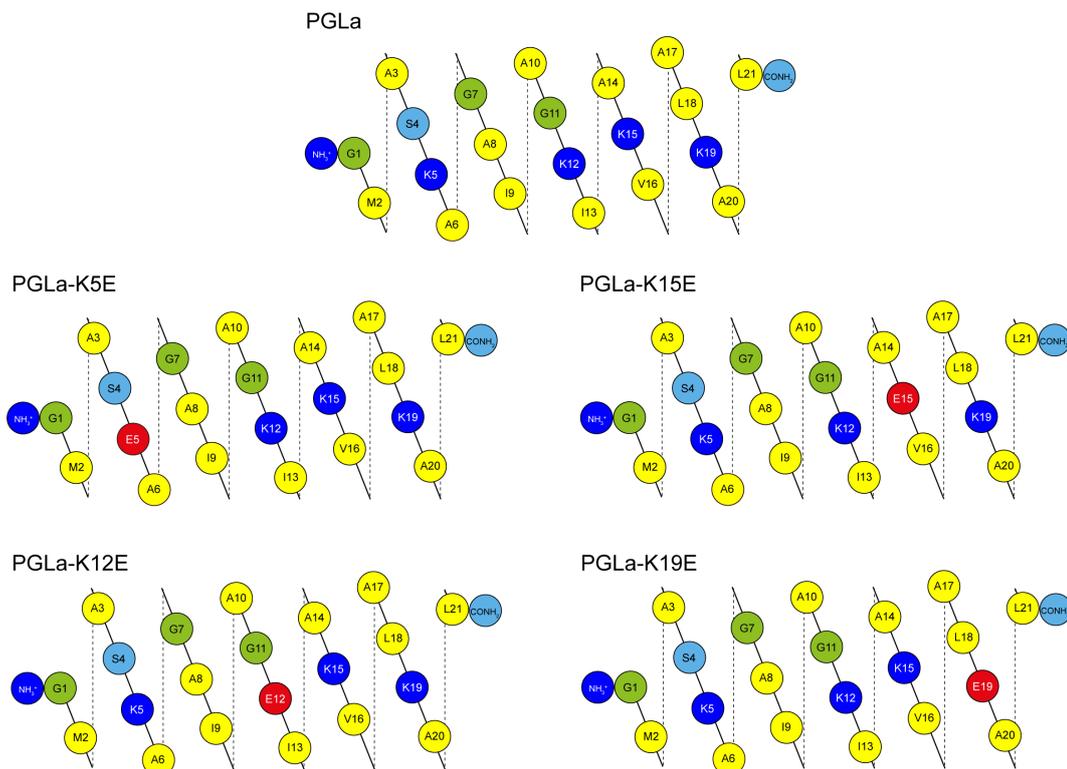


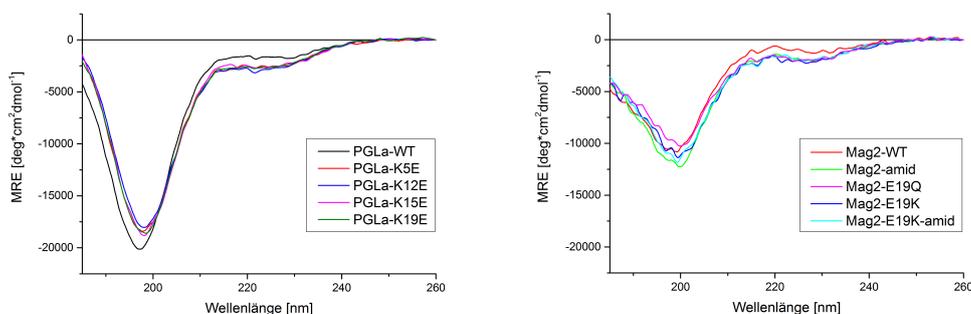
Abbildung 6.2: PGLa-Ladungsmutationen in der Helikalen-Netz-Darstellung.

In Mag2 wurde anstatt der Glutaminsäure ein Lysin eingeführt. Dies würde, sollte diese Aminosäure für die Salzbrücke verantwortlich sein, zu einer Blockierung der Salzbrücke führen. Untersucht man in diesem Zusammenhang eine der PGLa K/E

Austauschmutationen, sollten diese, bei der richtigen Partnerwahl, nun mit ausgetauschter Salzbrücke, erneut Synergie zeigen. Die Glutaminsäure wurde auch noch durch Glutamin blockiert, welches ungeladen ist. Die negative Ladung in Mag2 am C-Terminus wurde durch Amidierung blockiert. Beide negativen Ladungen wurden in Form des Mag2-E19K-amids blockiert. Dies ist auch ein Ladungsaustauschmutant.

6.1.1. CD-Spektroskopie

Da die Einführung von Aminosäuren in Peptide immer das Risiko birgt ungewollt strukturelle Änderungen hervorzurufen, muss überprüft werden, ob die Sekundärstruktur der Moleküle sich analog zum Wildtyp verhält. Die Methode der Wahl ist die CD-Spektroskopie. Sie gibt Aufschluss darüber ob und welche charakteristischen Sekundärstrukturmerkmale vorhanden sind. Zuerst wurden die Peptide in 10 mM Phosphatpuffer untersucht. In Abbildung 6.3a sind die CD-Spektren der PGLa-Mutationen in Phosphatpuffer im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp gezeigt. Analoge Spektren sind für den Mag2-Wildtyp und seine Mutationen in Abbildung 6.3b gezeigt.

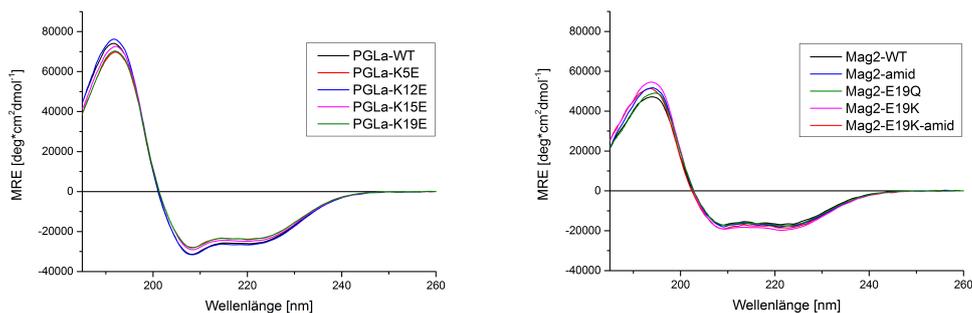


(a) Mag2-Mutationen in Phosphatpuffer. (b) PGLa-Mutationen in Phosphatpuffer.

Abbildung 6.3: CD-Spektren der Salzbrückenmutationen in Phosphatpuffer im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und dem Mag2-Wildtyp.

In beiden Abbildungen ist durch das charakteristische Minimum bei ca. 200 nm klar ersichtlich, dass es sich in allen Fällen um ungeordnete Strukturen handelt. Die Mutationen verhalten sich sowohl im Falle von PGLa als auch von Mag2 wie die Wildtypen. Die unterschiedlich starke Elliptizität ist auf unterschiedliche Löslichkeit und Salzgehalt der Peptide zurückzuführen. Hinzu kommen Wäge- und Pipettierfehler. Auf Grund des Fehlens von Trp oder Tyr lässt sich die Konzentration für die Berechnung der MRE-Werte nur rechnerisch aus der Peptideinwaage und dem Volumen der Messlösung ermitteln. In allen Messungen, sowohl in Phosphatpuffer, als auch in Gegenwart der Vesikel, wurde die gleiche Stoffmenge an Peptid verwendet. Ein wichtiges Charakteristikum dieser Peptide ist die Eigenschaft α -Helices auszubilden, sobald sie an Lipiddoppelschichten binden. Auf Grund des amphipathischen Charakters bildet sich ein polarer, hydrophiler Bereich und ein hydrophober Bereich aus. Der hydrophobe Bereich lagert sich in die Lipiddoppelschicht ein. Der hydrophile Bereich ist der wässrigen Phase zugewandt. Da PGLa sowie Mag2 positiv geladene Peptide sind, werden für die Bindung an Lipidvesikel negativ geladene Lipidkopfgruppen benötigt. Für die Vesikel wurde das auch in der Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendete Lipidsystem DMPC/DMPG (3:1) gewählt. Dies enthält eine ausreichende Menge an Ladungsträgern. Die Messungen wurden bei einem P/L von 1:50 durchgeführt. Dieses P/L wurde

auch in den meisten Proben bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendet. Die α -Helizität ist Grundvoraussetzung für die Annahmen die bei der Festkörper-NMR gemacht werden. Ist dies nicht gegeben können die Spektren nicht ausgewertet werden. Die Spektren des PGLa-Wildtyps und dessen Mutationen sind in Abbildung 6.4a gezeigt. Analoges ist in Abbildung 6.4b für den Mag2-Wildtyp und dessen Mutationen zu sehen. Hier ist klar erkennbar, dass sich in allen Fällen α -Helices ausbilden. Die Mutationen verhalten sich in allen Fällen so wie die Wildtypen. Auch hier zeigt Mag2 eine geringere Elliptizität als PGLa. Hieraus lässt sich schließen, dass die Veränderung der Gesamtladung wenig Einfluss auf die Sekundärstruktur der Moleküle hat.



(a) PGLa-Mutationen in Gegenwart von (b) Mag2-Mutationen in Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln.

Abbildung 6.4: CD-Spektren der Salzbrückenmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und dem Mag2-Wildtyp in Gegenwart von DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:50.

Da nur gebundene Moleküle α -helikal sind, scheint die Bindungsaffinität trotz beträchtlicher Ladungsveränderung kaum bzw. nicht abzunehmen.

schiebung wird durch Mag2-E19K-amid verursacht. Da die Umorientierung nur bei PGLa beobachtet werden kann (Mag2 verändert die Orientierung kaum), wurde nach einer Ladungsmutante bei PGLa gesucht, die mit anderen Untersuchungsmethoden keine Synergie zeigte. Eine vielversprechende Mutante war PGLa-K19E. Diese Mutante wurde analog zu PGLa an Position 10 markiert und mittels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Die Spektren sind in Abbildung 6.6 zu sehen und analog zu Abbildung 6.5 angeordnet.

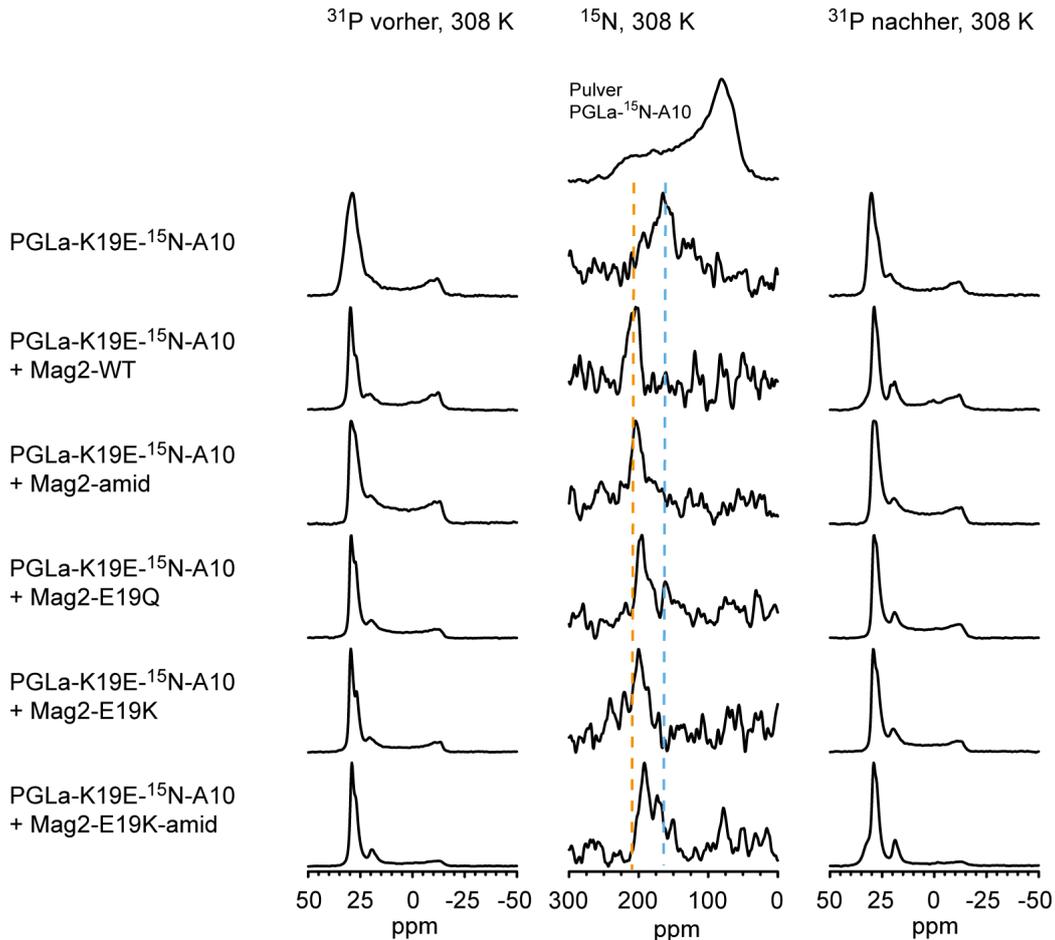


Abbildung 6.6: NMR-Spektren von PGLa-K19E- ^{15}N -A10 alleine und in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp und seinen Salzbrückenmutationen in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:50.

Auch in diesem Fall führten alle Ladungsmutationen von Mag2 zu einer Reorientierung von PGLa. Allerdings ist PGLa-K19E- ^{15}N -A10 alleine schon stärker als der PGLa-Wildtyp in die Membran geneigt. Alle aus den in Abbildung 6.5 und Abbildung 6.6 gezeigten Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen sind in Anhang D in Tabelle D.1 gezeigt.

6.1.3. Biologische Untersuchungen

Da die Peptide als Antibiotikaersatz eingesetzt werden sollen, müssen sie auch an Mikroorganismen untersucht werden. Da hier der Einfluss auf die Interaktion zweier Moleküle untersucht werden soll, wurde ein spezieller Test verwendet. Er wird Damebrett-Test genannt und ist in Material und Methoden beschrieben. Er ist eine Abwandlung des Minimale-Hemm-Konzentrationstests (MHK, *engl.* MIC). Der MHK-Test ist eine Verdünnungsreihe des Peptids in 96 Vertiefungsplatten, bei dem untersucht wird was die minimale Konzentration des Peptids ist, bei dem das Bakterienwachstum inhibiert wird. Der Damebrett-Test ist ähnlich. Er enthält die Verdünnungsreihen zweier Peptide, die orthogonal zueinander verlaufen. In jeder Vertiefung ist ein unterschiedliches Peptid-zu-Peptid-Verhältnis. Mit einer entsprechenden Formel kann man ein Maß für die synergistische Interaktion bestimmen. Dieser Wert wird als FIC-Index (*engl.* Fractional Inhibitory Concentration) bezeichnet und ist in Gleichung 6.1 gezeigt.^[90,99]

$$FIC = \frac{MIC(A+B)}{MIC(A)} + \frac{MIC(B+A)}{MIC(B)} \quad (6.1)$$

Hierbei gibt es nun drei Fälle^[90]:

FIC < 0,5: Synergie

FIC ≈ 1: Additiver Effekt

FIC > 2: Antagonistischer Effekt

MIC(A) und MIC(B) sind hierbei die niedrigsten Konzentrationen der Komponente A bzw. B, die das Bakteriumwachstum inhibieren. Hierbei ist der MIC(A+B) die minimal inhibierende Konzentration der Komponente A in der Mischung mit B (analog für MIC(B+A)). Nicht etwa die Gesamtkonzentration beider Komponenten. Man erhält also ein Maß dafür, wie stark die Komponente B die Komponente A verstärkt bzw. dies eben nicht macht. Ein kleiner FIC-Index bedeutet synergistische Interaktion. Große FIC-Indices bedeuten keine Synergie bzw. Antagonismus, d. h. Wirkungsabschwächung. Die für die Untersuchungen verwendeten Bakterienstämme sind sog. Kontrollstämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Es handelt sich hierbei um *Escherichia coli* (DSM 1103), ein Gram-negatives Bakterium und um *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), ein Gram-positives Bakterium. Alle für die Ladungsmutationen von PGLa und Mag2 und deren Wildtyp ermittelten FIC-Indices sind in Anhang D Tabelle D.2 gezeigt. Um diese Ergebnisse anschaulicher zu gestalten, wurden für diese Werte Mittelwerte errechnet und in Balkendiagrammen dargestellt. Die Menge, die an Peptid benötigt wird um einen solchen mikrobiologischen Test durchzuführen, ist enorm im Vergleich zu allen in dieser Arbeit verwendeten biophysikalischen Tests. Auf Grund dieser Tatsache wurden pro Bakterienstamm nur zwei Messungen durchgeführt und daher ist die Aussagekraft dieses Tests nur qualitativer Natur.^[100] In Abbildung 6.7 sind die PGLa-Ladungsmutationen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Die gestrichelte Linie bei einem FIC-Index von 0,5 stellt die Grenze zu synergistischen Interaktion dar. Unterhalb von 0,5 wird von Synergie gesprochen. Bei der Betrachtung dieser Grafik wird schnell klar, dass alle PGLa-Ladungsmutationen analog zum PGLa-Wildtyp Synergie mit dem Mag2-Wildtyp zeigen. Dies ist sowohl bei dem Gram-negativen als auch bei dem Gram-positiven Bakterium der Fall. Es ist ein leichter Trend zu erahnen von PGLa-K5E nach PGLa-K19E.

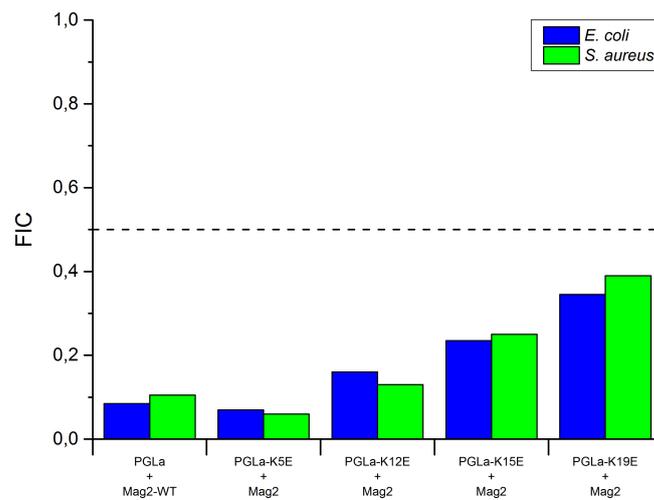


Abbildung 6.7: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die PGLa-Ladungsmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp.

In Abbildung 6.8 sind die Mag2-Ladungsmutationen im Vergleich mit dem Mag2-Wildtyp zu sehen.

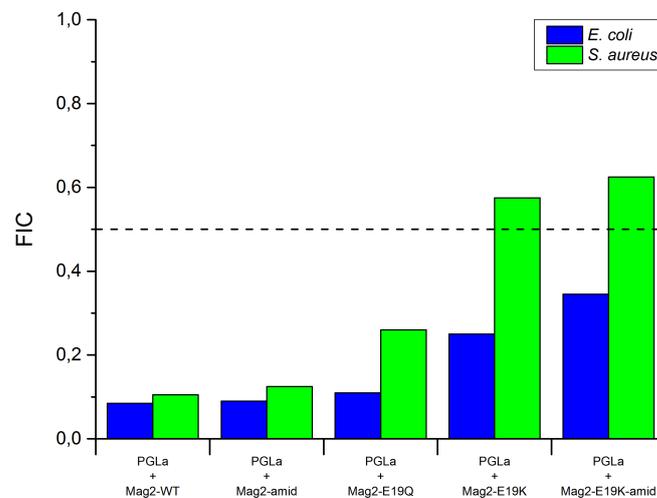


Abbildung 6.8: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die Mag2-Ladungsmutationen im Vergleich mit dem Mag2-Wildtyp.

Für alle Mag2-Mutationen konnte eine synergistische Interaktion mit dem PGLa-Wildtyp gegen *E. coli* gezeigt werden. Für das Gram-positive Bakterium *S. aureus* hingegen zeigten zwei Mag2-Mutationen Synergie und zwei zeigten keine Synergie. Die Mutationen Mag2-E19Q und Mag2-amid, bei denen nur eine Ladung blockiert wurde, zeigten Synergie. Mag2-E19K und Mag2-E19K-amid zeigten keine Synergie. Somit scheint die Interaktion hier vom Bakterienstamm abhängig zu sein.

6.1.4. Fluoreszenzspektroskopie

Eine weitere, bereits in Kapitel 5 beschriebene Methode um die Interaktion genauer zu untersuchen, ist die Fluoreszenzspektroskopie. Die Messungen wurden analog zur in Material und Methoden und der Methode der kontinuierlichen Veränderung beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. In den meisten Fällen wurden drei Messwerte an drei unterschiedlichen Tagen ermittelt. Für jeden dieser Werte wurde ein Synergiefaktor ermittelt, der sich nach folgender Formel bestimmen lässt. Dies ist am Beispiel von PGLa und Mag2 durch Gleichung 6.2 gezeigt.

$$\text{Synergiefaktor} = \frac{\text{Leakage}(PGLa + Mag2)}{\text{Leakage}(PGLa) + \text{Leakage}(Mag2)} \quad (6.2)$$

Hier beschreibt $\text{Leakage}(PGLa + Mag2)$ das durch die Mischung verursachte Leakage aus den Lipidvesikeln. $\text{Leakage}(PGLa)$ und $\text{Leakage}(Mag2)$ ist das durch die einzelnen Peptide verursachte Leakage. Ein Synergiefaktor von eins bedeutet additives Verhalten, sprich die Summe der Einzelleakagewerte entspricht dem Leakagewert der Mischung. Ab einem Wert von 2 spricht man von Synergie, da die Mischung doppelt so viel oder mehr Leakage verursacht als die Summe der Einzelkomponenten. Im Gegensatz zur Mikrobiologie (FIC-Index $< 0,5$ entspricht Synergie) sind hohe Synergiefaktoren (Synergiefaktor > 2) Ausdruck für die synergistische Interaktion. Aus den drei Einzelwerten (Ausfluss und Synergiefaktor) wurden ein Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung vom Mittelwert mit Gleichung 6.3 bestimmt.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (6.3)$$

Der jeweilige Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung vom Mittelwert sind in Tabelle D.3 aufgelistet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel berechnet, welches Gleichung 6.3 verwendet. Hierbei ist σ_x die Standardabweichung, x der Einzelwert und \bar{x} der Mittelwert. Die Anzahl der Messungen bzw. Werte wird durch n beschrieben. Für die Untersuchungen der Salzbrückenmutationen betrug das P/L der Peptid-Mischung zwischen 1:153 und 1:160 und für die einzelnen Peptide zwischen 1:306 und 1:319. Alle ermittelten Werte sind in Anhang D in Tabelle D.3 aufgelistet. Zur Verdeutlichung sind die Fluoreszenzerggebnisse als Balkendiagramme dargestellt, welche in Abbildung 6.9 und Abbildung 6.10 gezeigt sind. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet. Auf Grund der Übersichtlichkeit sind auch hier, wie schon im Abschnitt 6.1.1 die Ergebnisse der Mag2-Mutationen und der PGLa-Mutationen getrennt aufgeführt. In Abbildung 6.9 sind die PGLa-Ladungsmutationen im Vergleich mit dem Wildtyp gezeigt. Auch hier gibt es zwei Mutationen, die Synergie zeigen. Dies sind PGLa-K5E und PGLa-K12E. PGLa-K15E und PGLa-K19E zeigen hingegen keine Synergie mit dem Mag2-Wildtyp. Da in diesem Teil der Arbeit nicht nur das Ausschalten der Ladungsinteraktion, sondern auch der Austausch der Ladungsinteraktion (z. B. Glu - Lys, Lys - Glu) geplant war, wurden die PGLa-Mutationen, die keine Synergie zeigten, mit den Mag2-Mutationen die keine Synergie zeigten (Mag2-E19K, Mag2-E19K-amid), untersucht. Da diese keine Wiederherstellung der synergistischen Interaktion zeigten, wurden nur zwei Messungen durchgeführt. Die in Abbildung 6.10 gezeigten Mag2-Mutationen zeigen ein unterschiedliches Verhalten.

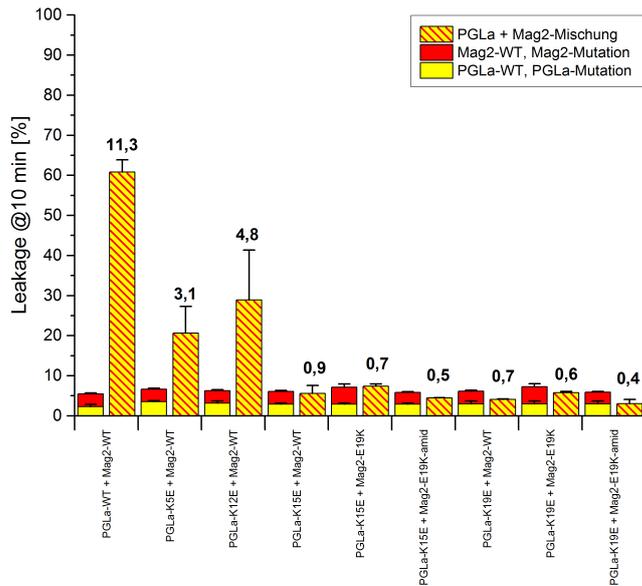


Abbildung 6.9: Die durch die PGLa-Ladungsmutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp.

Mag2-amid und Mag2-E19Q zeigen Synergie in Kombination mit dem PGLa-Wildtyp, wobei sie im Fall des Mag2-amids stärker ausgeprägt ist als im Falle des Wildtyps. Die zwei Mutationen Mag2-E19K und Mag2-E19K-amid zeigen keine Synergie.

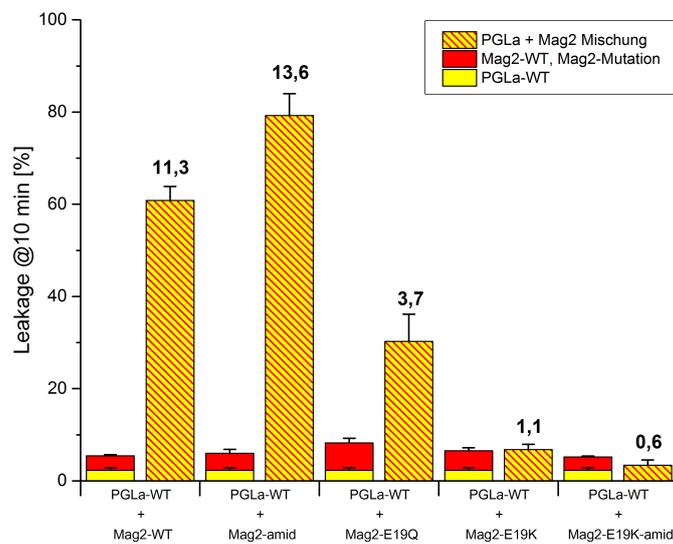


Abbildung 6.10: Die durch die Mag2-Ladungsmutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem PGLa-Wildtyp.

6.1.5. Diskussion

Es gibt in diesem Abschnitt nun einige Dinge, die diskutiert werden müssen. Vier der hier aufgeführten Mutationen scheinen einen Einfluss auf die synergistische Interaktion zu haben. Dies wurde nur mittels Fluoreszenzspektroskopie und zum Teil mittels Damebrett-Test bei *S. aureus* detektiert. Die Fluoreszenzspektroskopie scheint somit die sensitivste Methode für strukturelle Änderungen zu sein. Vergleicht man die Bedingungen der drei Methoden, so lässt sich die unterschiedliche Sensitivität leicht erklären. In der NMR-Spektroskopie werden hohe Konzentrationen eingesetzt (P/L, 1:50), welches die Chance der Interaktion der Peptide erhöht. Außerdem setzt sie DMPC/DMPG ein, welches eine positive spontane Krümmung besitzt und es den Peptiden erleichtert, sich in die Membran zu neigen. Zudem sind alle Peptide an die Membran gebunden, da es keine Wasserphase gibt.

Vergleicht man die Mikrobiologie mit den anderen zwei Methoden, so ist sie auch eher unsensitiv. Hier werden sogar noch höhere Peptidkonzentrationen eingesetzt (Zellkonzentration/mL = 10^6 ; P/L, 100:1).^[101] Andererseits enthalten die bakteriellen Membranen hauptsächlich Lipide mit starker negativer spontaner Krümmung. *E. coli* und *S. aureus* haben zudem eine unterschiedliche Membranzusammensetzung und können unterschiedlich sensitiv sein. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen im Zuge einer Vertiefungsarbeit in einem *E. coli* mimetischen Lipidsystem von Olga Kukharenko haben die geringe Sensitivität dieses Lipidsystems bestätigt. Im Gegensatz zu POPC/POPG (3:1, P/L, 1:160) wurden hier Peptid-zu-Lipid-Verhältnisse von 1:25 - 1:35 verwendet um mit der Peptidmischung 60 % Leakage zu erreichen.^[62]

Die Fluoreszenzspektroskopie arbeitet bei niedrigeren Konzentrationen (P/L, von ca. 1:160) mit einem Lipidsystem mit negativer spontaner Krümmung, welches das Eintauchen in die Membran erschwert. Zudem wird hier in einer wässrigen Umgebung gemessen, in der nicht alle Peptide gebunden sind. Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass man eine Interaktion in der NMR sieht, zum Teil mittels Mikrobiologie, aber nicht mittels Fluoreszenzspektroskopie.

Aus dem Vergleich der Randbedingungen lässt sich schlussfolgern, dass die Fluoreszenzspektroskopie eine Abschwächung und auch den Verlust der Interaktion zeigen kann. Die NMR-Spektroskopie kann zeigen, dass die Interaktion verschwunden ist. Die Mikrobiologie liefert zum Teil zwiespältige Ergebnisse, die jedoch auf die Komplexität des betrachteten Systems zurückzuführen sind. In den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PGLa-K15E und PGLa-K19E keine synergistische Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp zeigen. Doch vermutlich ist nur eine der Aminosäuren für eine Wechselwirkung mit Mag2 verantwortlich. Wie aus Abbildung 6.11 ersichtlich, sind beide Mutationen in der Lage intramolekulare Salzbrücken zwischen Lys und Glu auszubilden. In PGLa-K19E kann Glu-19 eine Salzbrücke zu Lys-15 ausbilden. In PGLa-K15E kann Glu-15 zu Lys-12 und Lys-19 je eine Salzbrücke ausbilden. In der dritten Helikalen-Netz-Darstellung ist PGLa-K12E gezeigt. Hier kann eine Salzbrücke zwischen Glu-12 und Lys-15 entstehen. Aus diesen intramolekularen Salzbrücken lassen sich die zwei Interaktionsszenarien genauer diskutieren.

1. Lys-19: Blockierung kann durch Glu-19 (PGLa-K19E) oder intramolekulare Salzbrücke zu Glu-15 (PGLa-K15E) erreicht werden.
2. Lys-15: Blockierung kann durch Glu-15 (PGLa-K15E) oder intramolekulare Salz-

brücke zu Glu-12 (PGLa-K12E) erreicht werden.

3. Lys-12: Blockierung kann durch Glu-12 (PGLa-K15E) oder intramolekulare Salzbrücke zu Glu-15 (PGLa-K15E) erreicht werden.

Da PGLa-K12E Synergie zeigt und PGLa-K15E keine Synergie zeigt spricht dies für Fall 1. Es ist wahrscheinlicher, dass Lys-19 die Aminosäure ist, die für die Wechselwirkung verantwortlich ist. Die Blockierung beider negativer Ladungen in Mag2 führt zum Synergieverlust (Mag2-E19K-amid). Mag2-E19K zeigt jedoch auch keine Synergie (Abbildung 6.12). Dies ist wiederum durch eine intramolekulare Salzbrücke erklärbar, die zwischen C-Terminus und Lys-19 entstehen kann. Da hier eine Wechselwirkung der Ladungsträger stattzufinden scheint, sollte der Austausch der Salzbrücke auch funktionieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass Mag2 sich an der Oberfläche der Membran befindet, wo negative Ladungen lokalisiert sind. Ein weiteres Lys (Lys-19) wird vermutlich zuerst mit den näher lokalisierten Ladungsträgern der Membran wechselwirken.

Das sich in der Membran befindende Glu ist weiter entfernt und schlechter zur Wechselwirkung geeignet. Es wird vermutlich durch intramolekulare Salzbrücken kompensiert. Beim Wildtypen ist das Glu in der Membran bei Ladungsträgern gleicher Ladung und es ist wesentlich wahrscheinlicher, dass es mit einem Lys von PGLa wechselwirkt. Aus den Ladungsmutationen lässt sich

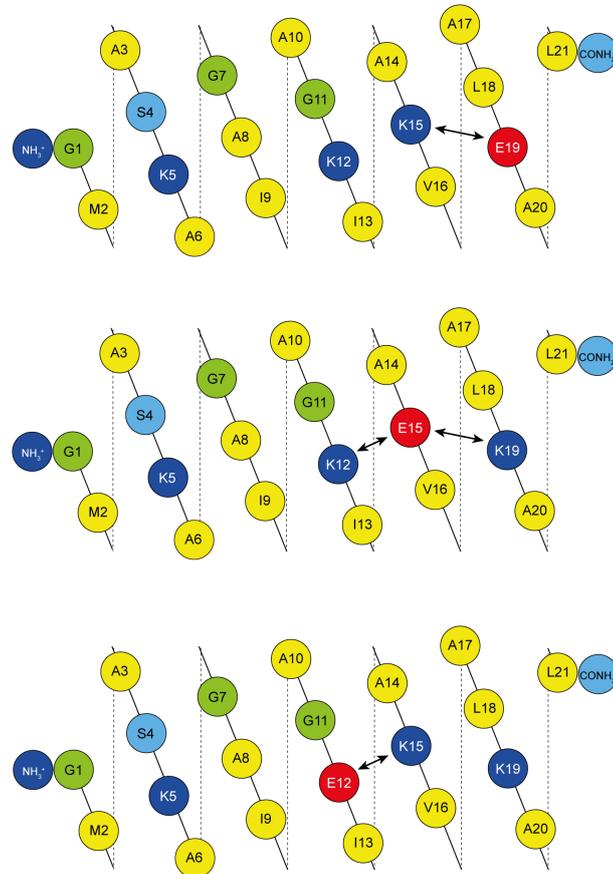


Abbildung 6.11: Gegenüberstellung der möglichen intramolekularen Salzbrücken bei Mutation von Lys-19, Lys-15 und Lys-12.

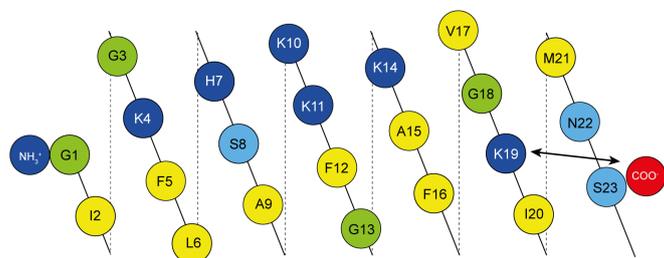


Abbildung 6.12: Intramolekulare Salzbrücke in Mag2-E19K.

schlussfolgern, dass die Salzbrücken nur einen kleinen Einfluss haben. Dieser reicht jedoch für die fluoreszenzspektroskopischen Bedingungen aus. Es ist wichtig auch schwache Interaktionen zu lokalisieren um die Orientierung der Peptide zueinander zu determinieren. Die Unterbindung der Ladungsinteraktion reicht nicht aus um die synergistische Interaktion vollständig zu unterbinden. Aus diesem Grund sind vermutlich andere Interaktionen involviert. Dies wird in den folgenden Abschnitten genauer erörtert werden.

6.2. Einschub: PGLa versus MSI-103

Vergleicht man das einer Optimierungsstudie entstammende MSI-103 mit dem aus dem afrikanischen Frosch *X. laevis* entstammenden Mutterpeptid PGLa, so fällt auf, dass diese zwei Peptide sich sehr ähnlich sind. Die Sequenzen sind in Tabelle 6.2 gezeigt. Aminosäuren, die in beiden Peptiden gleich sind, sind hellblau markiert und die ^{15}N -markierte Aminosäure ist fett markiert. Es handelt sich in beiden Fällen um α -helikale, antimikrobiell aktive Peptide, welche aus je 21 Aminosäuren bestehen. Da MSI-103 mehr Lysine enthält ist es stärker positiv geladen (+7). Es enthält jedoch alle Lysine, die auch in PGLa gegenwärtig sind.

Tabelle 6.2: Gegenüberstellung der ^{15}N -markierten Sequenzen von PGLa und MSI-103.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz	Ladung
PGLa- ^{15}N -A10	Ala10	GM ASK AGAT IAGK IAK VAL KAL-NH ₂	+5
MSI-103- ^{15}N -A10	Ala10	K IAGK IAK IAGK IAK IAGK IA-NH ₂	+7

Betrachtet man nun die Verteilung der Aminosäuren in der Helikalen-Rad-Darstellung, so sind sich auch die amphiphilen Profile recht ähnlich. Diese Darstellung ist in Abbildung 6.13 gezeigt.

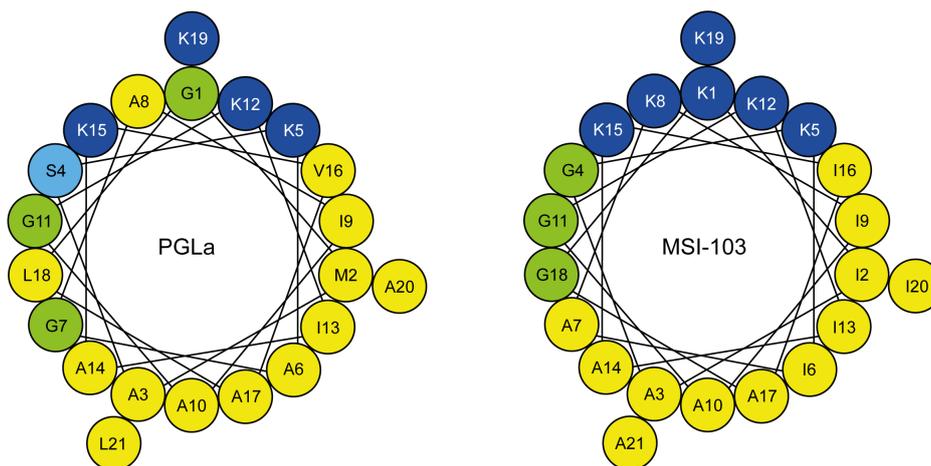


Abbildung 6.13: Sequenzen der Peptide PGLa (links) und MSI-103 (rechts) in der Helikalen-Rad-Darstellung. Die Aminosäuren sind farblich in Gruppen eingeteilt (Positiv geladen - dunkelblau, polar - hellblau, Glycin - hellgrün, hydrophob - gelb).

Wirft man einen genaueren Blick auf die Helikale-Rad-Darstellung so fällt auf, dass

die Moleküle zwar relativ ähnlich sind, die Aminosäurenverteilung jedoch im Falle von MSI-103 wesentlich symmetrischer ist. Dies ist nicht verwunderlich, da man die Sequenz von MSI-103 auch als (KIAGKIA)₃ schreiben kann. PGLa hat eine unregelmäßige Sequenz. Bei Betrachtung aus einem anderen Blickwinkel wird klar, dass vor allem die Glycine anders verteilt sind. Im Falle von PGLa sind sie im vorderen Teil des Moleküls lokalisiert. In MSI-103 sind sie über das ganze Molekül verteilt. Zusammengefasst kann man sagen, die Moleküle sind sich trotz Optimierung immer noch recht ähnlich.

Die biologische Aktivität ist für MSI-103 höher als für PGLa, was man nach einer Optimierungsstudie auch erwarten kann. Die biologischen Aktivitäten für *S. aureus* (DSM 1104) und *E. coli* (DSM 1103) sind in Tabelle 6.3 aufgelistet. Sie sind in Form von MHK-Werten (Minimale-

Tabelle 6.3: MHK-Werte von PGLa und MSI-103.

Peptid	MHK-Wert <i>S. aureus</i> [$\mu\text{mol/L}$]	MHK-Wert <i>E. coli</i> [$\mu\text{mol/L}$]
PGLa-WT	32-64	16-32
MSI-103	2-8	1-2

Hemm-Konzentration) gezeigt. Bei zwei strukturell so ähnlichen Molekülen könnte man sich vorstellen, dass beide Peptide zur Interaktion mit Mag2 befähigt sind, besonders, da alle durch PGLa gebildeten Salzbrücken auch von MSI-103 gebildet werden können. Aber MSI-103 zeigt keine synergistische Interaktion mit Mag2. In Abbildung 6.14 sind die ¹⁵N-NMR-Spektren von ¹⁵N-markiertem PGLa und MSI-103 alleine und in Gegenwart des Mag2-Wildtyps in DMPC/DMPG (3:1) zu sehen.

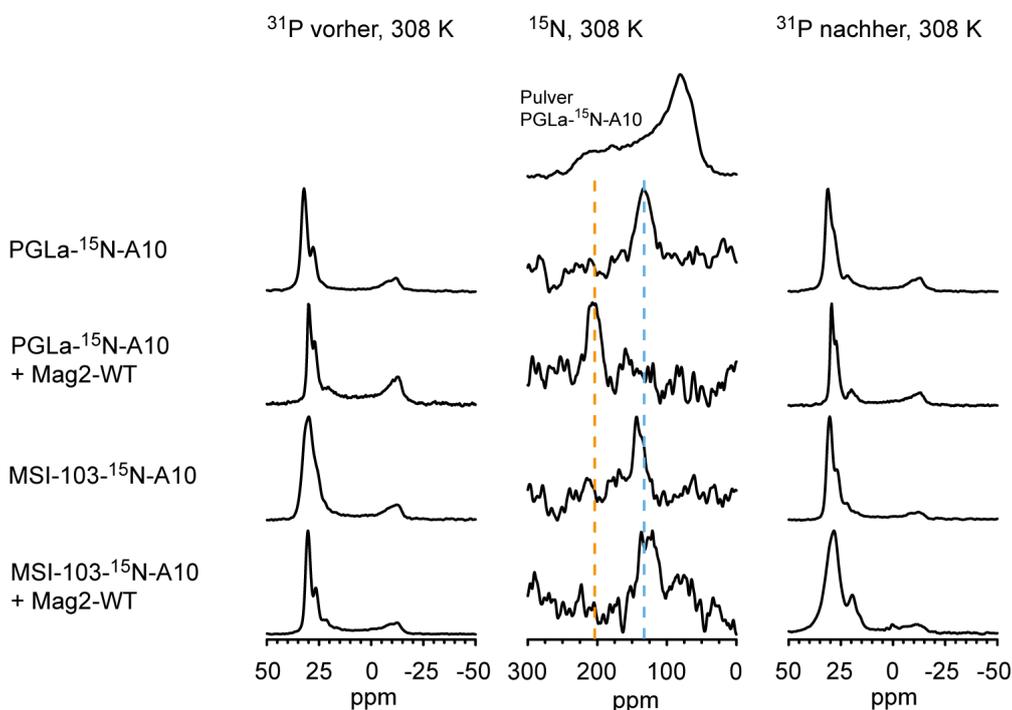
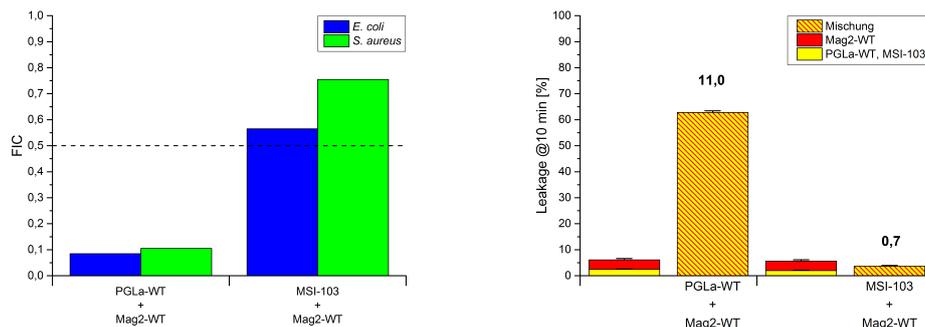


Abbildung 6.14: NMR-Spektren von PGLa-¹⁵N-A10 und MSI-103-¹⁵N-A10 alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps (DMPC/DMPG (3:1), P/L = 1:50).

Die Orientierung der beiden Peptide ohne Mag2 ist relativ ähnlich (T-Zustand), aber

mit Mag2 reorientiert sich PGLa in eine transmembrane Orientierung (I-Zustand) während MSI-103 seine Orientierung nicht ändert (T-Zustand). Die chemischen Verschiebungen der Spektren sind im Anhang D in Tabelle D.4 aufgeführt. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen mittels Damebrett-Test sind in Abbildung 6.15a gezeigt. MSI-103 zeigt in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp keine synergistische Interaktion gegen diese beiden Bakterienstämme. Auch die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen, deren Ergebnisse in Abbildung 6.15b gezeigt sind, zeigten, dass auch hier MSI-103 keine Synergie zeigt. Der Synergiefaktor ist ca. 1, somit zeigen diese beiden Peptide additives Verhalten.



(a) Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices. (b) Fluoreszenzspektroskopisch ermittelte Leakagewerte.

Abbildung 6.15: FIC-Indices und Leakagewerte für PGLa und MSI-103 in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp.

Alle Daten für die in Abbildung 6.15a und Abbildung 6.15b gezeigten Balkendiagramme sind in Anhang D in Tabelle D.5 und Tabelle D.6 aufgelistet. Hier soll nun vermerkt werden, dass MSI-103 alle Salzbrücken ausbilden kann, die PGLa auch ausbilden kann. Ihre Wichtigkeit für die synergistische Interaktion konnte im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden. Dies scheint MSI-103 jedoch nicht dazu zu befähigen mit dem Mag2-Wildtyp Synergie zu zeigen. Aus diesem Grund muss es andere Aminosäuren geben, die wichtig für die Interaktion sind. Sie werden im Folgenden genauer untersucht (Abschnitt 6.3).

6.3. Von PGLa nach MSI-103

6.3.1. Mehrfachmutationen

In Tabelle 6.4 sind die PGLa-Mutationen aufgeführt, die im Zuge dieses Abschnittes untersucht wurden. Bei der Planung der Mutationen wurden die beiden Sequenzen der Peptide verglichen. Sie sind in Abbildung 6.16 gegenübergestellt. In beiden Molekülen identische Aminosäuren sind hellblau markiert. Die Aminosäuren die sich in den beiden Peptiden unterscheiden, sind schwarz. Zuerst wurden drei Bereiche definiert (A, B, C). Hierbei sind A und C die Bereiche, in denen sich die Moleküle unterscheiden. Da im Kapitel über Ladungsinteraktionen Lys-19 als wichtige Aminosäure identifiziert wurde, ist Bereich C vermutlich wichtig und der Bereich in dem mögliche Kontakte stattfinden. Durch sukzessives Austauschen von Aminosäuren in PGLa durch an dieser Stelle in MSI-103 vorhandene Aminosäuren, sollten die Aminosäuren

bzw. Aminosäure gefunden werden, die PGLa zur Interaktion mit Mag2 befähigen, bzw. dazu führen, dass MSI-103 nicht mehr dazu in der Lage ist.

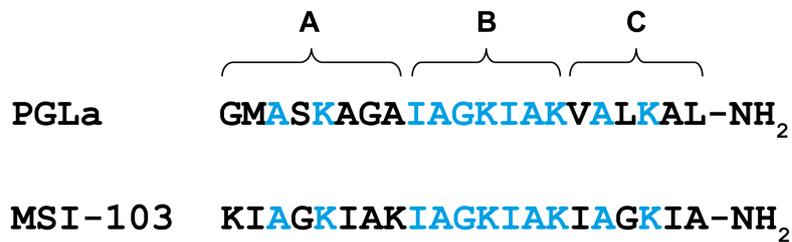


Abbildung 6.16: Gegenüberstellung der Sequenzen des PGLa-Wildtyps und MSI-103 (hellblau - gleiche Aminosäuren).

Die Aminosäuren, die ersetzt wurden, sind in Tabelle 6.4 rot markiert. Dies war der Versuch PGLa nach und nach der Sequenz von MSI-103 ähnlicher zu machen. Daher wurden die Peptide mit dem Namen „from PGLa to MSI“ (PtM, deutsch: von PGLa nach MSI-103) benannt. Im ersten Mutationszyklus wurden mehrere Aminosäuren in PGLa durch in MSI-103 vorhandene, Aminosäuren ersetzt. In PtM-A1 und PtM-C1 ist das vollständige Segment ersetzt.

Tabelle 6.4: Für die Untersuchungen der PtM-Mutationen verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-C1- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKAGAIAGKIAKIAGKIA-NH ₂
PtM-A1- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIAKIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A2- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A3- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKIAKIAGKIAKVALKAL-NH ₂
MSI-103- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-NH ₂

6.3.1.1. CD-Spektroskopie

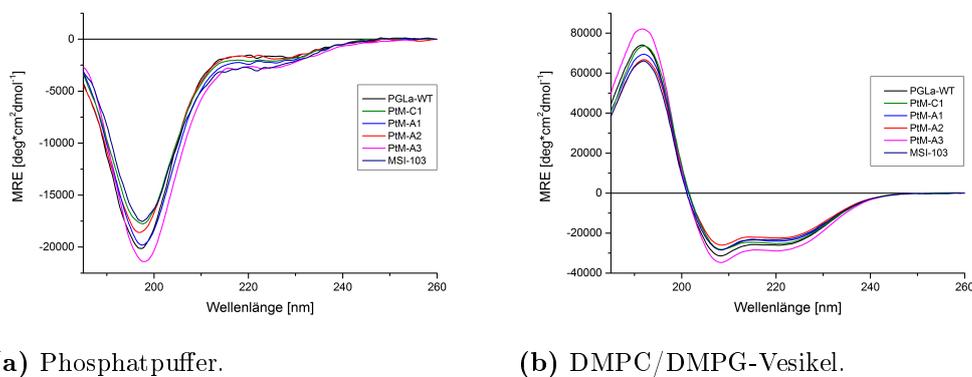


Abbildung 6.17: CD-Spektren der PtM-Mehrfachmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

Die Sekundärstruktur der Peptide wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht und mit der des PGLa-Wildtyps und MSI-103 verglichen (Abbildung 6.17a und Abbildung 6.17b). Es wurden Spektren der Peptide in Phosphatpuffer und in Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln (3:1) aufgenommen. Das P/L war 1:50. In Phosphatpuffer sind alle Peptide ungeordnet und zeigen ein Minimum bei ca. 200 nm. Die Spektren in Gegenwart der DMPC/DMPG-Vesikel zeigen eine α -helikale Struktur. Die charakteristischen Minima sind bei ca. 210 und 220 nm. Die Maxima liegen bei ca. 190 nm.

6.3.1.2. NMR-Spektroskopie

Alle Peptide wurden mittels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Zuerst wurden Messungen des Peptids alleine in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:50 durchgeführt. In Abbildung 6.18 sind die Spektren im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103 gezeigt.

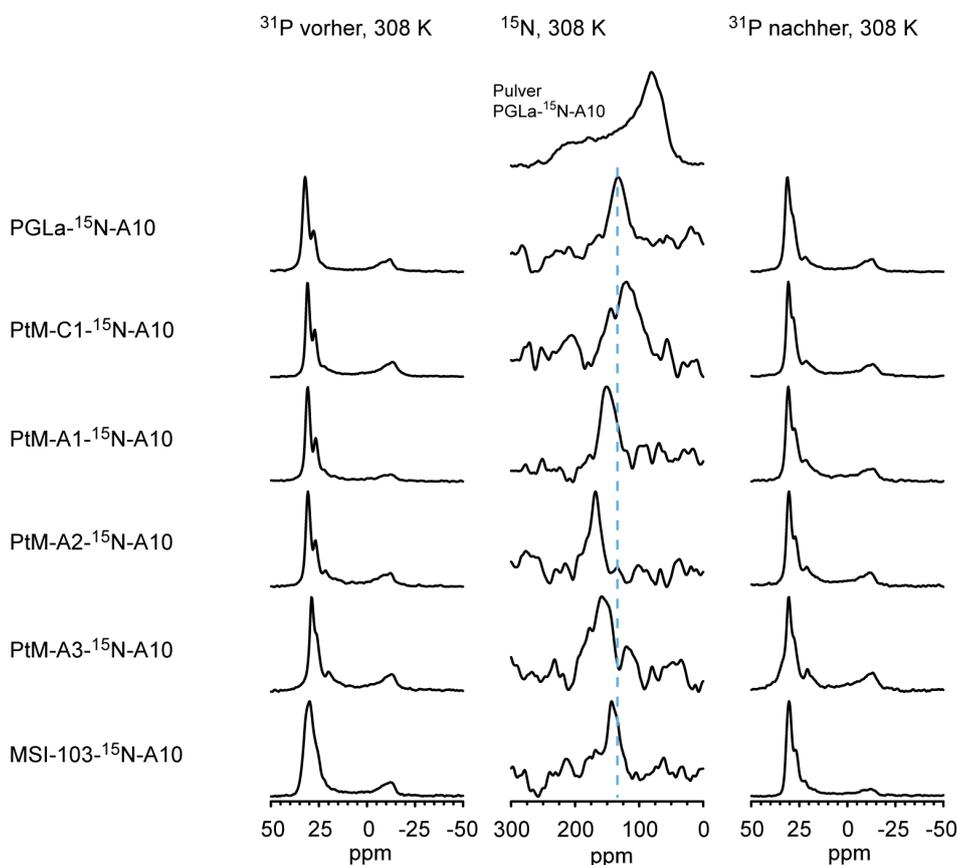


Abbildung 6.18: NMR-Spektren der PtM-Mehrfachmutationen in DMPC/PG (3:1) bei einem P/L von 1:50.

Alle Peptide zeigen einen in die Membran geneigten Zustand mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen. PtM-C1 ist schwächer geneigt als PGLa. Die Spektren von PtM-A1, PtM-A2 und PtM-A3 sind stärker geneigt als PGLa. Um Orientierungsänderungen zu detektieren wurden Spektren in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 6.19 zu sehen. In Gegenwart von Mag2 ist nun ein unterschiedliches Verhalten der vier Peptide zu be-

obachten. PtM-C1 nimmt wie PGLa eine transmembrane Orientierung (I-Zustand) ein. Hierbei durchläuft PtM-C1 eine ähnlich starke Orientierungsänderung wie PGLa. PtM-A1 hingegen verändert die Orientierung kaum und scheint somit nicht zur Interaktion fähig zu sein. In PtM-A1 sind sechs Aminosäuren im Vergleich zum PGLa-Wildtyp geändert und somit wurden kleinere Mutationen (3 Aminosäuren) in Form von PtM-A2 und PtM-A3 synthetisiert und untersucht. PtM-A2 ist in Gegenwart von Mag2 fast so stark in die Membran geneigt wie PGLa und scheint somit zur synergistischen Interaktion befähigt zu sein. PtM-A3 besitzt die gleiche Anzahl an mutierten Aminosäuren, verhält sich aber analog zu PtM-A1 und zeigt keine Interaktion.

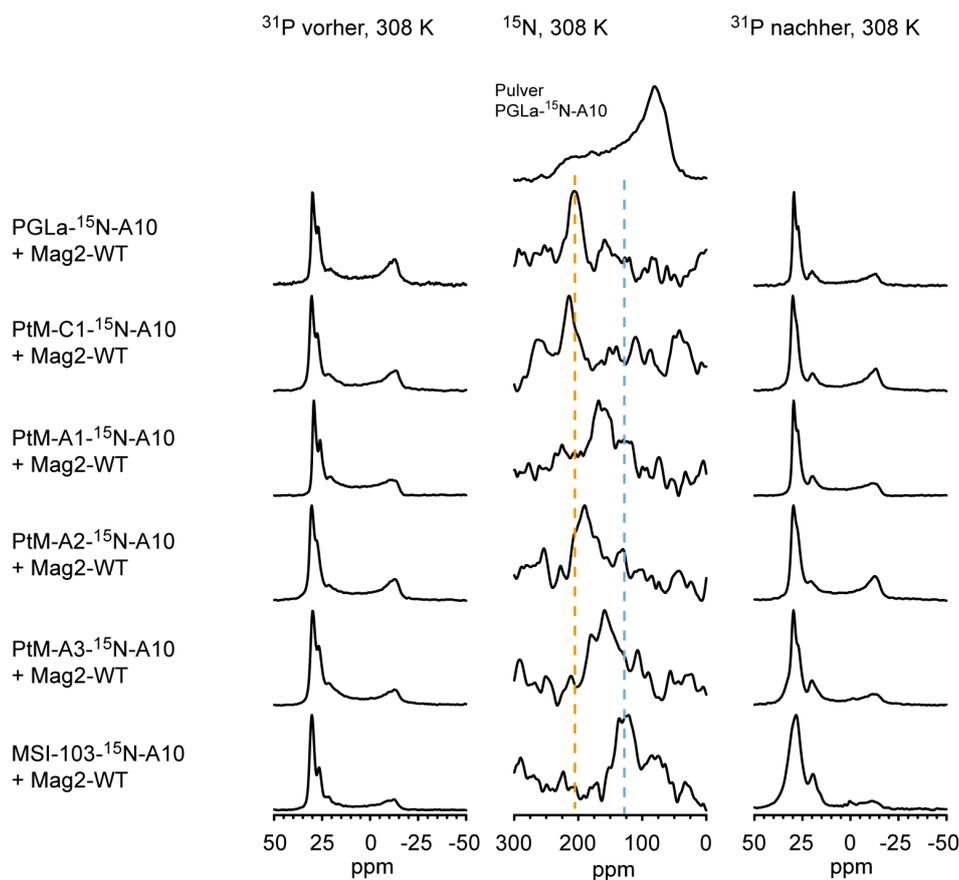


Abbildung 6.19: NMR-Spektren der PtM-Mehrfachmutationen in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps in DMPC/PG (3:1) bei einem P/L von 1:50.

Alle für diese Peptidklasse bestimmten chemischen Verschiebungen sind in Anhang D in Tabelle D.7 zu sehen.

6.3.1.3. Biologische Untersuchungen

Alle Peptide wurden in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp mittels Damebrett-Test untersucht. Die berechneten FIC-Indices sind in Anhang D in Tabelle D.8 gezeigt. Die FIC-Indices sind in einem Balkendiagramm in Abbildung 6.20 zu sehen. In diesem Fall zeigt PtM-C1 in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp Synergie. Es verhält sich somit wie der PGLa-Wildtyp. Das Peptid PtM-A1 zeigt hingegen keine synergistische Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp. Auch hier verhalten sich die Peptide mit drei mutierten Aminosäuren unterschiedlich. PtM-A2 zeigt Synergie und PtM-A3 zeigt keine Synergie.

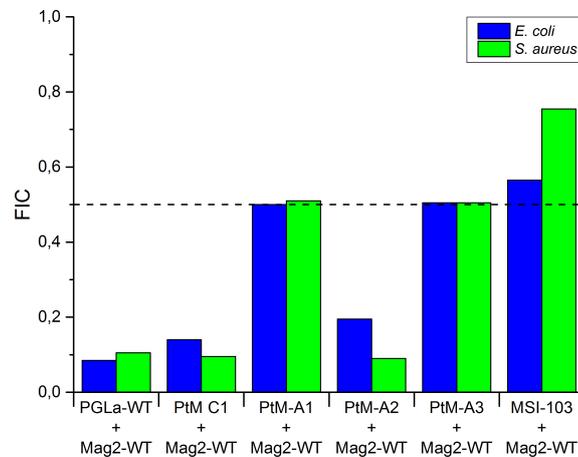


Abbildung 6.20: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die PtM-Mehrfachmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

6.3.1.4. Fluoreszenzspektroskopie

Alle für dieses Kapitel synthetisierten Peptide wurden mittels ANTS/DPX-Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht (Anhang D in Tabelle D.9). Hierbei wurden die Leakage-werte für das Peptid selbst und dessen Mischung mit dem Mag2-Wildtyp ermittelt. Die Leakage-werte sind in Abbildung 6.21 gezeigt. Aus diesem Balkendiagramm ist schnell ersichtlich, dass PtM-A2 sich wie der PGLa-Wildtyp verhält und Synergie in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp zeigt. Die anderen drei Peptide PtM-A1, PtM-A3 und PtM-C1 hingegen zeigen keine Synergie und verhalten sich somit wie MSI-103.

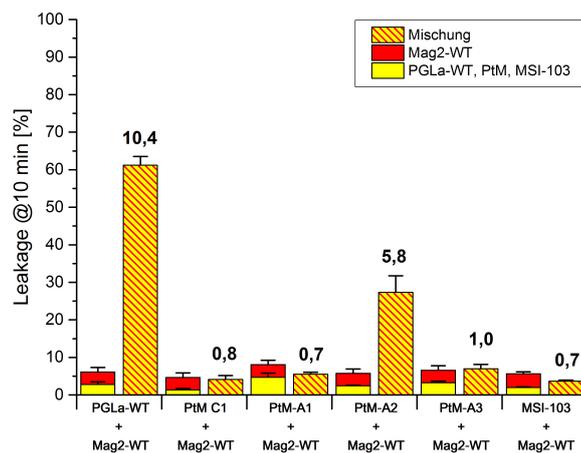


Abbildung 6.21: Balkendiagramm der Leakage-werte die durch die PtM-Mehrfachmutationen verursacht wurden im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

6.3.1.5. Zusammenfassung

In Abbildung 6.22 ist eine grafische Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 6.3.1 gezeigt.

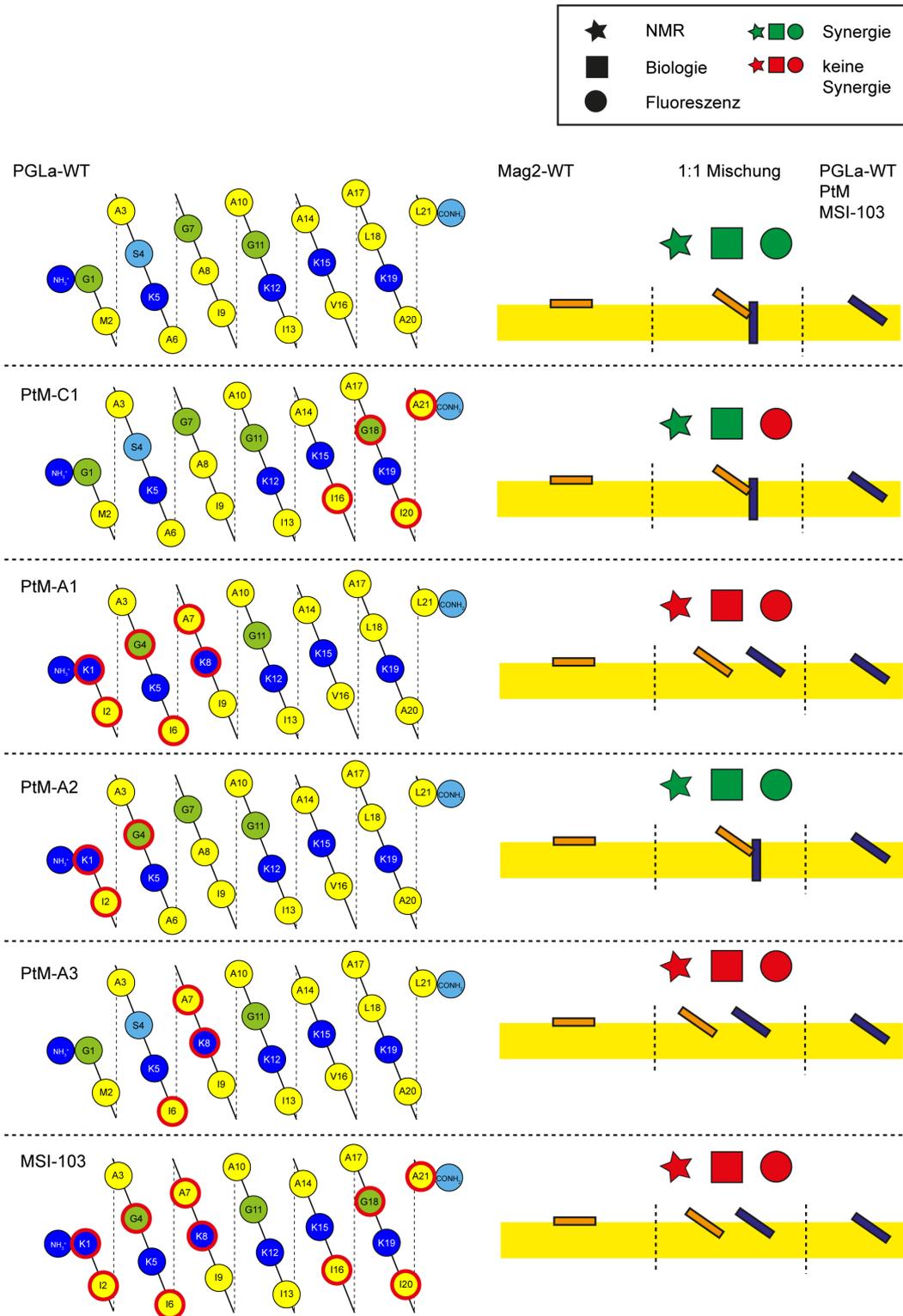


Abbildung 6.22: Zusammenfassung der Ergebnisse der PtM-Mehrfachmutationen.

Auf der linken Seite ist das Peptid in der Helikalen-Netz-Darstellung zu sehen. Veränderte Aminosäurereste im Vergleich zum PGLa-Wildtyp sind mit einem roten Kreis umrandet. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse in Symbolform zusammengefasst. Der Stern symbolisiert die NMR-Spektroskopie. Das Quadrat steht für die Biologie und stellt eine 96 Vertiefungsplatte dar. Der Kreis symbolisiert einen Vesikel und steht für die Fluoreszenzspektroskopie. Ist eines der Symbole grün gefärbt, so findet eine synergistische Interaktion statt. Ein rotes Symbol bedeutet, dass keine synergistische Interaktion stattgefunden hat. Zudem wurde die Orientierung der Peptide, wie schon in Kapitel 4 durch Balken (orange - Mag2-WT, blau - PGLa-WT/PtM/MSI-103) verdeutlicht. Der gelbe Quader stellt den hydrophoben Teil der Membran dar.

Durch die Mehrfachmutationen konnte somit ein Bereich von drei Aminosäuren im N-terminalen Bereich ausgemacht werden, der starken Einfluss auf die synergistische Interaktion zu haben scheint (Position 6-8). Im Falle von PtM-C1 wurde ein abweichendes Ergebnis für die Fluoreszenz-Spektroskopie gefunden. Dies scheint, wie schon bei den Ladungsmutationen angemerkt, die sensitivste Methode für molekulare Änderungen zu sein. Dieses Peptid zeigt nur bei dieser Methodik keine synergistische Interaktion. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass zusätzlich zu der im vorangegangenen Abschnitt gefundenen Ladungsinteraktion für Lys-19, eine weitere schwache Interaktion in Segment C vorhanden ist. Der Bereich mit starkem Einfluss ist in Abbildung 6.23 rot, der mit schwachem Einfluss grau, hinterlegt.

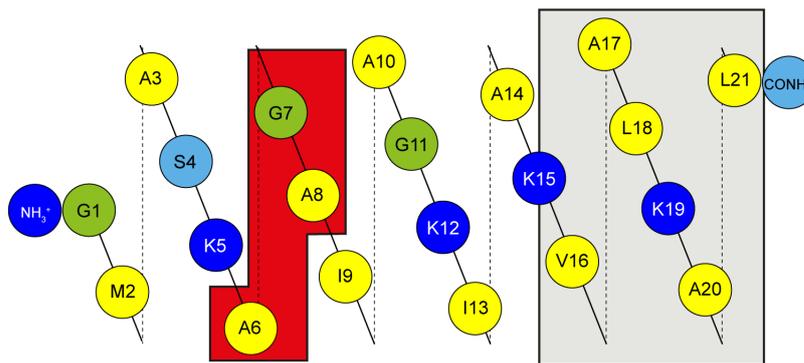


Abbildung 6.23: Markierung der Bereiche in PGLa, die Einfluss auf die Interaktion zu haben scheinen.

Der Bereich mit dem starken Einfluss wird in Abschnitt 6.3.2 näher behandelt. Welche Aminosäure für den schwachen Einfluss verantwortlich ist wird in Abschnitt 6.4 aufgeklärt.

6.3.2. Einzelmutationen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte der Bereich der Aminosäuren, die für die Interaktion bzw. das Auftreten von Synergie zwischen PGLa und Mag2 verantwortlich ist, stark eingegrenzt werden. In diesem Abschnitt wird auf die Aminosäuren eingegangen, die einen starken Einfluss zu haben scheinen. Die Aminosäuren sind in Abbildung 6.24 rot markiert. Für die weiteren Untersuchungen wurde jede einzelne dieser Aminosäuren gegen die Aminosäure ausgetauscht, die an dieser Position in MSI-103 ist. Alle Mutationen sind in Tabelle 6.5 aufgeführt. Ausgetauschte Aminosäuren sind rot markiert. Alle Peptide wurden mit ^{15}N -Ala markiert. Die Markierung ist wie in

allen anderen Mutationen an Position 10. In der Tabelle sind diese Aminosäuren blau markiert.

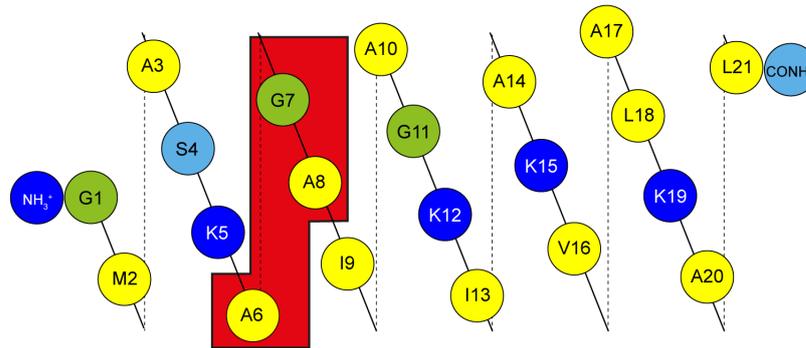


Abbildung 6.24: Markierung des Bereichs in PGLa, der starken Einfluss auf die Interaktion zu haben scheint.

Tabelle 6.5: Für die Untersuchungen der PtM-Einzelmutationen verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKAGAI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A6I- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASK I GAI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-G7A- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKA A AI A GKIAKVALKAL-NH ₂
PtM-A8K- ¹⁵ N-A10	Ala10	GMASKAG K I A GKIAKVALKAL-NH ₂
MSI-103- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIAKI A GKIAKIAGKIA-NH ₂

6.3.2.1. Ergebnisse

Wie auch im vorangegangenen Abschnitt wurde der Einfluss der Mutation auf die Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Spektren in Phosphatpuffer und in Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln sind in Abbildung 6.25a und Abbildung 6.25b gezeigt. Alle Peptide zeigen die gleiche Sekundärstruktur wie der Wildtyp.

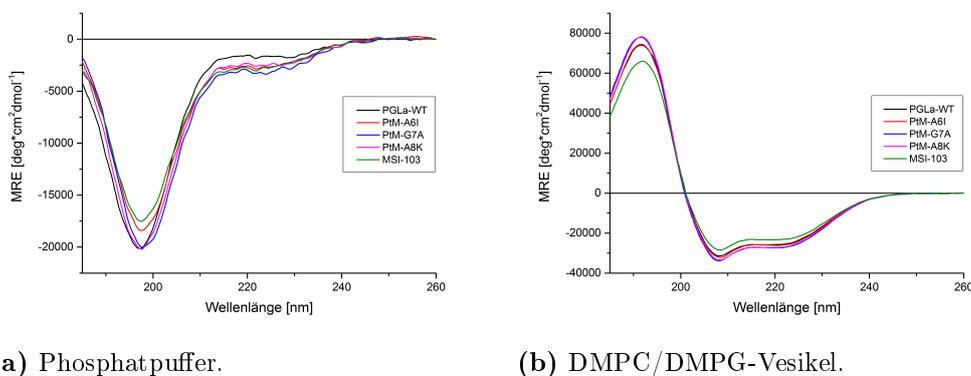


Abbildung 6.25: CD-Spektren der PtM-Einzelmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigen ein relativ deutliches Bild. Alle Peptide haben nahezu die gleiche chemische Verschiebung wie der PGLa-Wildtyp und somit auch die gleiche Orientierung in DMPC/DMPG (3:1). Es handelt sich hierbei um einen T-Zustand, d. h. die Peptide sind leicht in die Membran geneigt. Die Spektren sind in Abbildung 6.26 gezeigt. Die Spektren sind wie in den vorigen Abschnitten angeordnet.

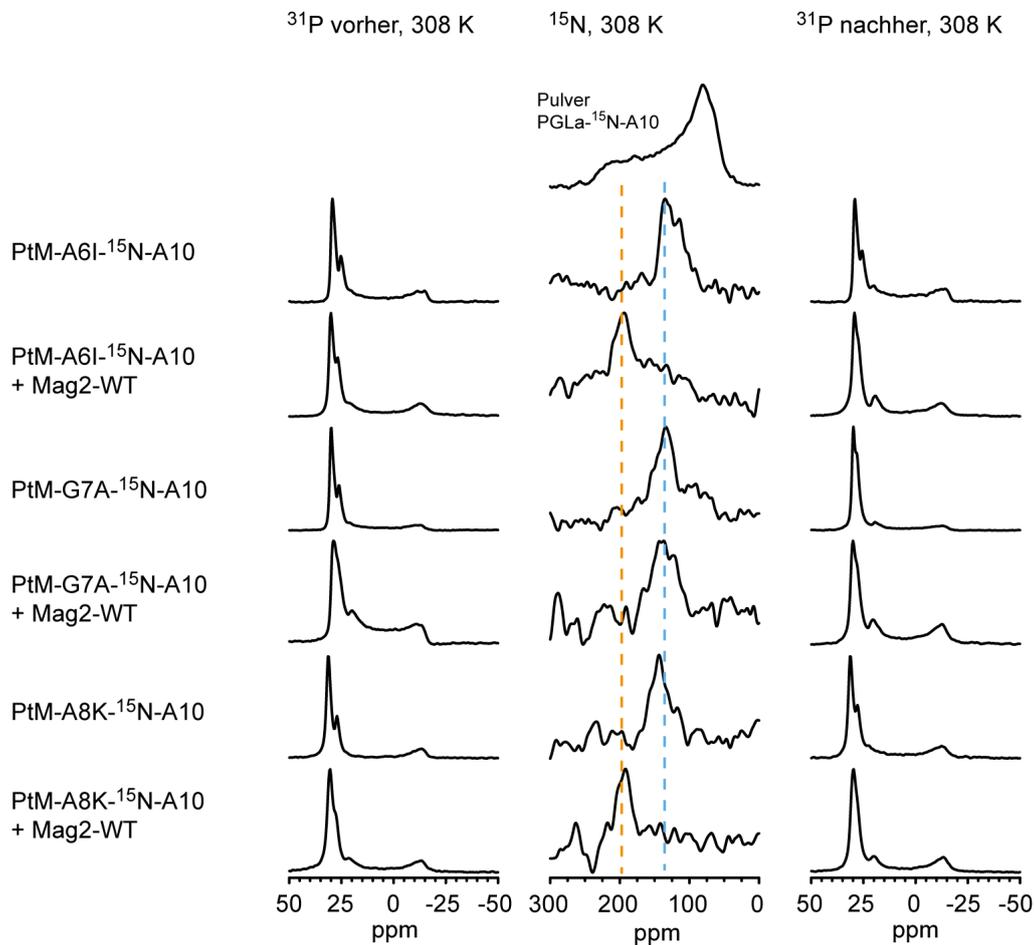


Abbildung 6.26: NMR-Spektren der PtM-Einzelmutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in DMPC/PG (3:1) bei eine P/L von 1:50.

In Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps verändert sich die Orientierung von PtM-A6I und PtM-A8K. Sie sind transmembran orientiert (I-Zustand). PtM-G7A hingegen ist genauso orientiert wie ohne den Mag2-Wildtyp. Es ist nur in die Membran geneigt. Alle chemischen Verschiebungen inklusive der Orientierung sind in Anhang D Tabelle D.10 aufgeführt. Die Aktivität gegen Mikroorganismen wurde auch bei dieser Mutationsgruppe mittels Damebrett-Test untersucht. Die hieraus ermittelten FIC-Indices sind in Anhang D in Tabelle D.11 gezeigt. Aus diesen FIC-Indices wurden Mittelwerte errechnet und Balkendiagramme erstellt. Diese Balkendiagramme sind in Abbildung 6.27 zu sehen. Die *E. coli*-Werte sind in blau und die *S. aureus*-Werte in grün gezeigt. PtM-A8K und PtM-A6I zeigen beide Synergie mit dem Mag2-Wildtyp gegen beide Stämme. PtM-G7A hingegen zeigt nur gegen *E. coli* Synergie. Gegen *S. aureus* zeigt es keine Synergie. Die Interaktion scheint hier stammbabhängig zu sein. Bei *S. aureus* ist ein Effekt jedoch klar zu erkennen.

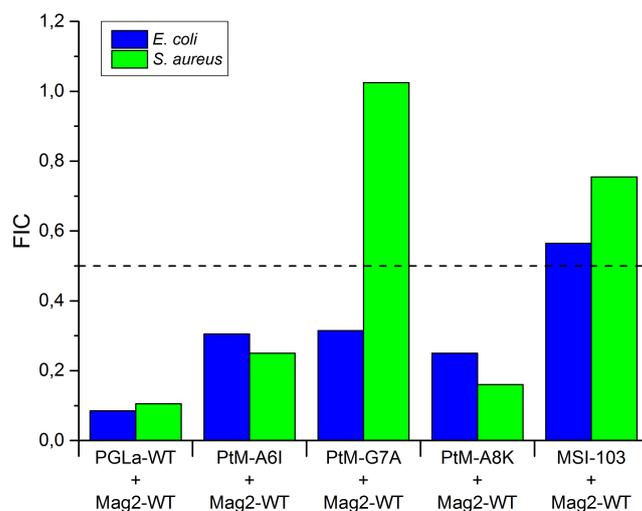


Abbildung 6.27: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die PtM-Einzelmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

Die Peptide wurden wie bereits zuvor beschrieben mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Alle Daten sind in Anhang D in Tabelle D.12 gezeigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.28 zu sehen.

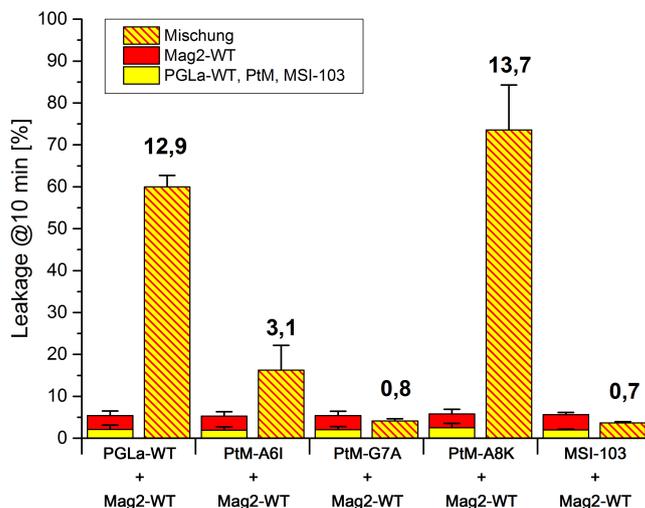


Abbildung 6.28: Balkendiagramm der Leakagewerte die durch die PtM-Einzelmutationen verursacht wurden im Vergleich mit PGLa-Wildtyp und MSI-103.

Aus diesem Diagramm ist schnell ersichtlich, dass nur die Mutante PtM-G7A keine synergistische Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp zeigt. Die beiden anderen Mutationen zeigen Synergie, wobei diese bei PtM-A8K stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei PtM-A6I. Da diese Untersuchungsmethode sehr sensitiv für Veränderungen zu sein scheint, wird hier nur zwischen Synergie und keiner Synergie unterschieden.

6.3.2.2. Zusammenfassung

In Abbildung 6.29 ist wie schon bei den Mehrfachmutationen die vereinfachte Darstellungsweise gezeigt.

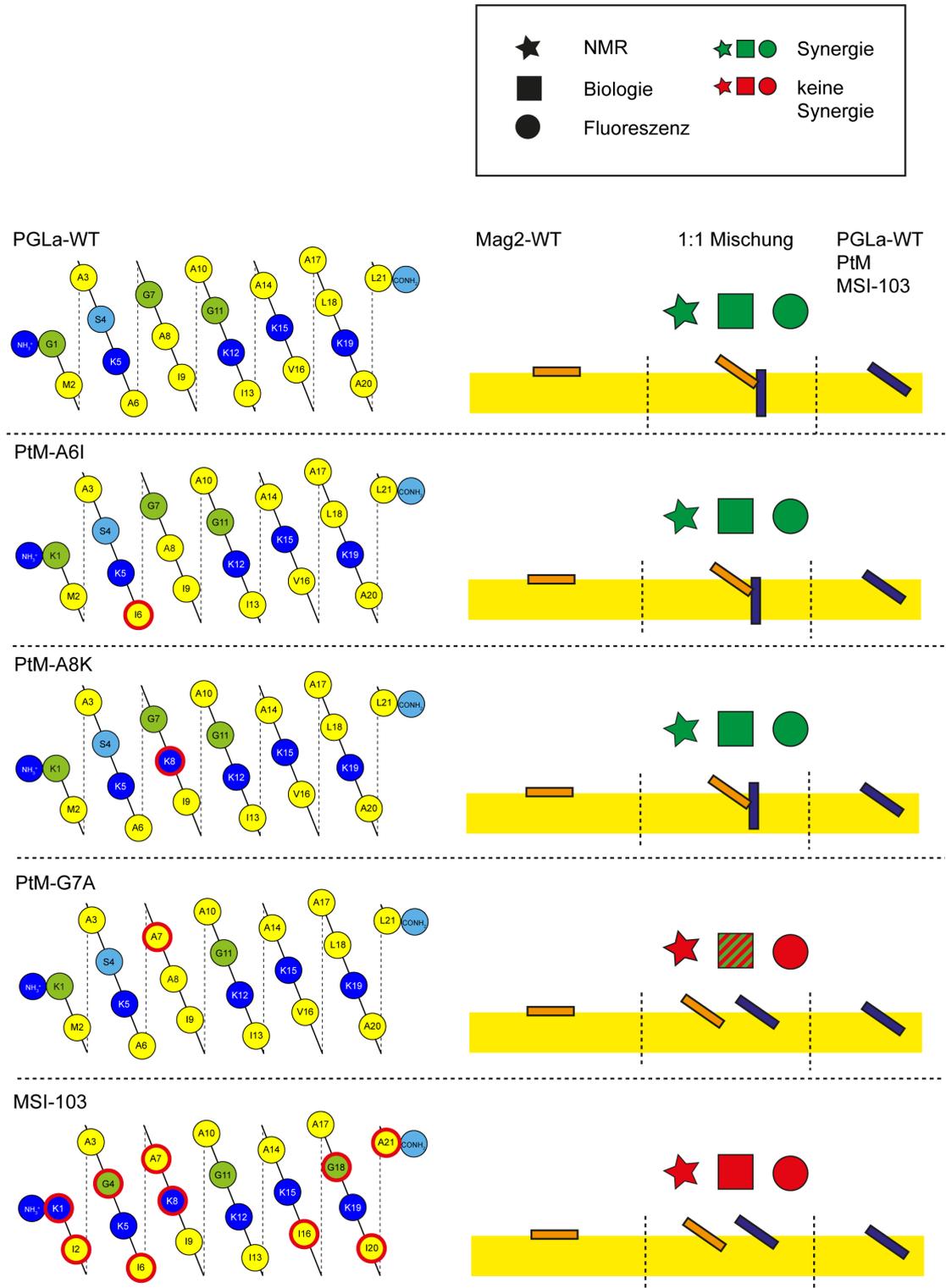
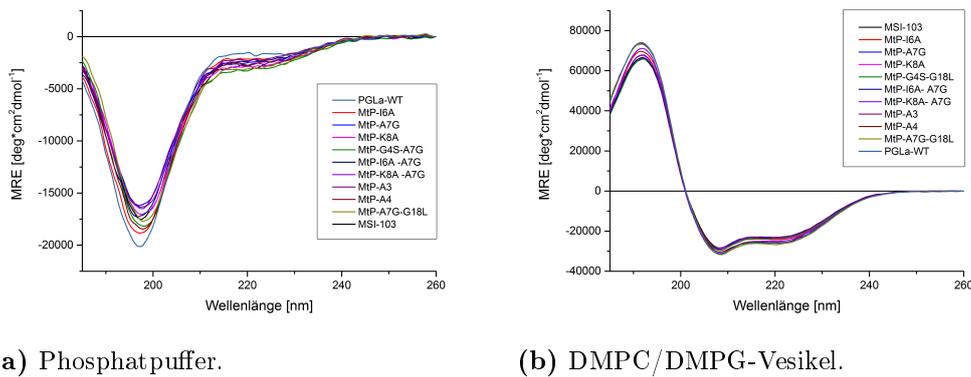


Abbildung 6.29: Zusammenfassung der Ergebnisse der PtM-Einzelmutationen.

Es ist klar ersichtlich, dass PtM-A6I und PtM-A8K bei allen drei verwendeten Techniken Synergie zeigen. PtM-G7A hingegen zeigt keine Synergie. Die Ausnahme bildet der Bakterienstamm *E. coli*. Jedoch sind die mikrobiologischen Untersuchungen ein sehr komplexes System und es können jede Menge Faktoren eine Rolle spielen, die in einem Lipid-Modellsystem nicht gegeben sind. Gly-7 scheint eine wesentliche Rolle bei der synergistischen Interaktion zu spielen.

6.4. Von MSI-103 nach PGLa

Um zu zeigen, dass das Verschwinden der synergistischen Interaktion in PtM-G7A tatsächlich an dieser Aminosäure in PGLa lag, wurde der Versuch unternommen, diese in MSI-103 wieder herzustellen. Dies sollte als Umkehrbeweis dienen. Die Peptide sind hier „from MSI to PGLa“ benannt (deutsch: von MSI-103 nach PGLa). Alle in diesem Abschnitt untersuchten Peptide wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht. In Puffer zeigen alle Peptide wie der PGLa-Wildtyp und MSI-103 eine ungeordnete Struktur (Abbildung 6.30a). In Gegenwart von geladenen DMPC/DMPG-Vesikeln (3:1) bei einem P/L von 1:50 nehmen sie eine α -helikale Struktur an (Abbildung 6.30b).



(a) Phosphatpuffer.

(b) DMPC/DMPG-Vesikel.

Abbildung 6.30: CD-Spektren der MtP-Mutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

6.4.1. Einzelmutationen

Im ersten Schritt wurden die Positionen 6, 7 und 8 in MSI-103 mit ihren Gegenstücken aus PGLa ersetzt. Der in MSI-103 betroffene Bereich ist in der Helikalen-Netz-Darstellung in Abbildung 6.31 gezeigt. Alle Peptide mit Einzelmutationen sind in Tabelle 6.6 aufgelistet. Veränderte Aminosäuren sind in rot und ^{15}N -markierte Positionen sind in blau gezeigt.

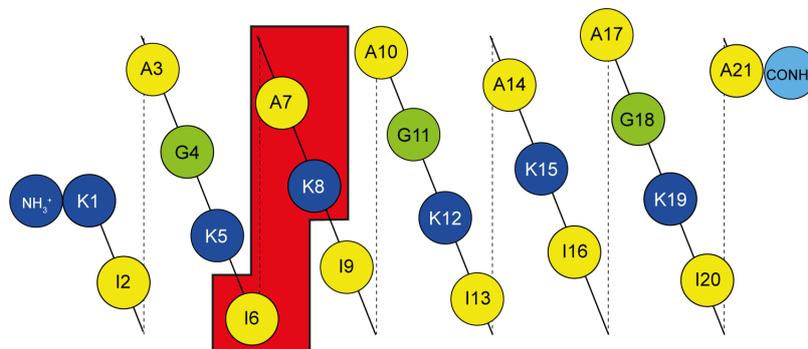


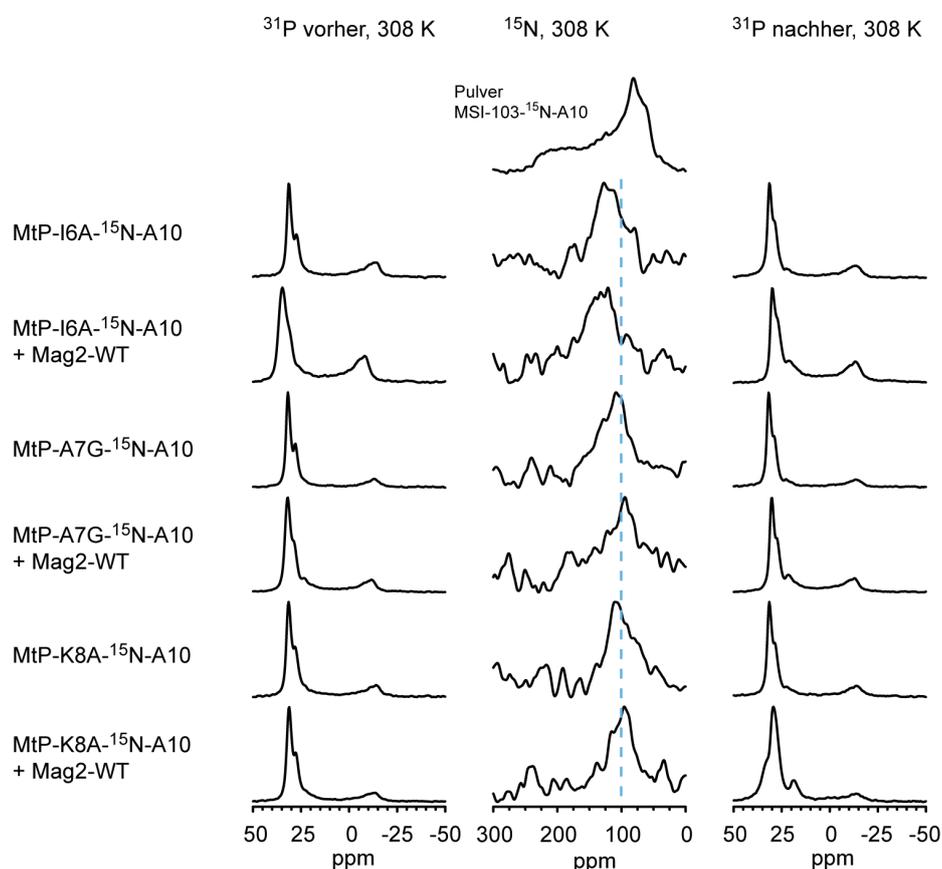
Abbildung 6.31: Markierung des durch Mutationen veränderten Bereichs in MSI-103.

Tabelle 6.6: Für die Untersuchungen der MtP-Einzelmutationen verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
MSI-103- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIAKI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-I6A- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGK A AKI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKI G KI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-K8A- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIA A I A GKIAKIAGKIA-NH ₂
PGLa- ¹⁵ N-A10	Ala10	G M ASKAGAI A GKIAK V ALKAL-NH ₂

6.4.1.1. NMR-Spektroskopie

Alle für diese Mutationsgruppe gemessenen Festkörper-NMR-Spektren sind in Abbildung 6.32 gezeigt. Die Signalqualität ist deutlich schlechter als bei den entsprechenden PtM-Mutationen.

**Abbildung 6.32:** NMR-Spektren der MtP-Einzelmutationen in DMPC/DMPG (3:1).

Alle Peptide zeigen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 die gleiche Orientierung (T-Zustand). Alle aus den Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen inklusive Orientierung sind in Anhang D in Tabelle D.13 gezeigt.

6.4.1.2. Biologie

Alle Peptide wurden auf ihre antimikrobielle Wirkung und Interaktion mittels Damebrett-Test untersucht. Die aus diesen Tests ermittelten FIC-Indices sind in Anhang D in Tabelle D.14 aufgelistet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.33 zu sehen. Die Daten sind wie auch in den vorangegangenen Abschnitten im Vergleich mit MSI-103 und dem PGLa-Wildtyp gezeigt. Der FIC-Index von 0,5 ab dem von Synergie gesprochen wird, ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die Werte sprechen eine deutliche Sprache. Zwei Peptide, MtP-I6A und MtP-K8A, zeigen keine Synergie. MtP-A7G hingegen zeigt Synergie. In diesem Fall war die Wiederherstellung der synergistischen Interaktion erfolgreich.

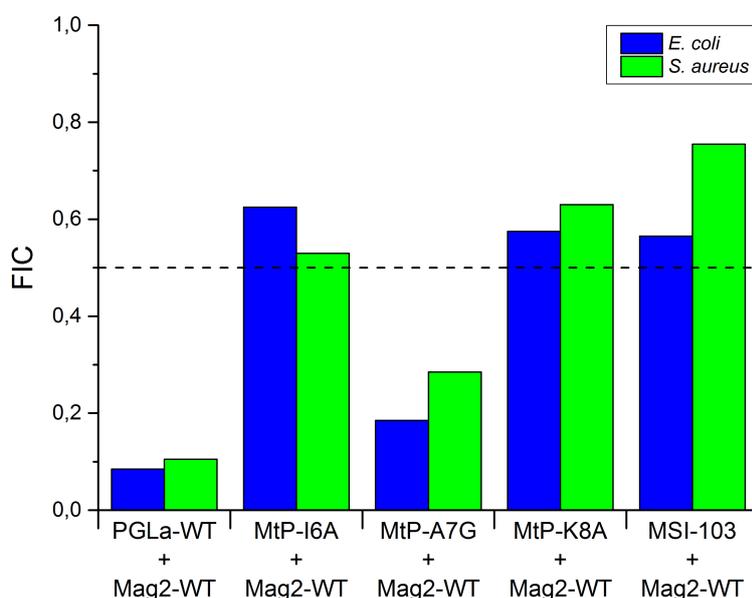


Abbildung 6.33: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die MtP-Einzelmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp und MSI-103.

6.4.1.3. Fluoreszenzspektroskopie

Die drei Mutationen wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Hierbei wurde das ANTS/DPX-Leakage aus POPC/POPG-Vesikeln gemessen. Alle Messungen wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Alle gemessenen und berechneten Werte sind in Anhang D in Tabelle D.15 aufgelistet und in Abbildung 6.34 zu sehen. Alle Peptide verhalten sich gleich. Sie zeigen in Kombination mit einer equimolaren Menge an Mag2-Wildtyp keine Synergie. Die Wiederherstellung der synergistischen Interaktion ist also in diesem Fall durch Austausch einer einzelnen Aminosäure nicht möglich.

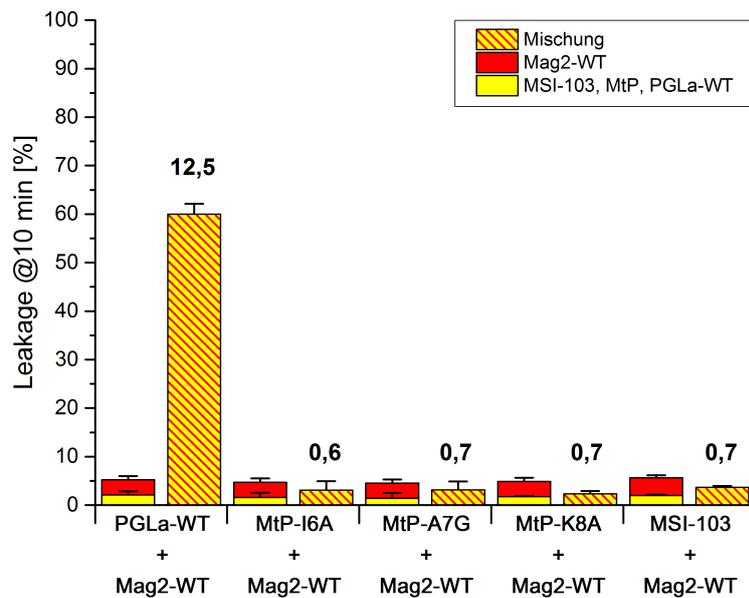


Abbildung 6.34: Die durch die MtP-Einzelmutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp.

6.4.1.4. Zusammenfassung

Die Peptide MtP-I6A und MtP-K8A zeigen in allen drei Untersuchungsmethoden keine synergistische Interaktion. Dies war auch zu erwarten, da Position 6 und 8 auch in der PtM-Studie nennenswerten Einfluss zu haben schienen. MtP-A7G hingegen zeigte in den biologischen Tests synergistische Interaktion, in den anderen zwei Kategorien jedoch keine synergistische Interaktion. Aus diesem Grund wurden weitere Mutationen synthetisiert und untersucht.

6.4.2. Doppelmutationen

Als nächstgrößere Einheit wurden Doppelmutationen vorgenommen. Die synthetisierten und untersuchten Peptide sind in Tabelle 6.7 gezeigt.

Tabelle 6.7: Für die Untersuchungen der MtP-Doppelmutationen verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
MSI-103- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIAKIA A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-G4S-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIA S KI G KI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-I6A-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGK A GKIA A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-K8A-A7G- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGK I A KI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
PGLa- ¹⁵ N-A10	Ala10	G M ASKAGAI A GKIAK V ALKAL-NH ₂

Allen drei Peptiden ist die Mutation A7G gemein, da diese Position einen Einfluss zu haben scheint. Die zweite Position war variabel. Zum einen wurden I6A und K8A,

die zuvor nur Einzelmutationen waren, verändert. Zusätzlich dazu wurde G4S in einer Mutation eingeführt.

6.4.2.1. NMR-Spektroskopie

Alle drei Peptide wurden mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Im Falle der Mischung war es nicht möglich ein Signal zu detektieren. Es wurden mehrere Proben hergestellt und unterschiedliche Kontaktzeiten verwendet. Die chemischen Verschiebungen der Peptide alleine sind im Anhang D in Tabelle D.16 aufgeführt.

6.4.2.2. Biologie

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen mittels Damebrett-Test sind in Anhang D in Tabelle D.17 aufgelistet. Hier ist kein eindeutiges Verhalten erkennbar. Im Falle von MtP-G4S-A7G konnte im Falle von *E. coli* keine und im Falle von *S. aureus* Synergie festgestellt werden. MtP-I6A-A7G zeigt sowohl gegen *E. coli* als auch gegen *S. aureus* Synergie. Bei MtP-K8A-A7G konnte bei *E. coli* Synergie und bei *S. aureus* keine Synergie gezeigt werden. Da in allen drei Molekülen A7G enthalten war, war die Erwartung bei den mikrobiologischen Untersuchungen, dass alle drei Peptide zur synergistischen Interaktion mit Mag2 befähigt sind. Dies scheint nicht der Fall zu sein bzw. es gibt eine Abhängigkeit vom Bakterienstamm.

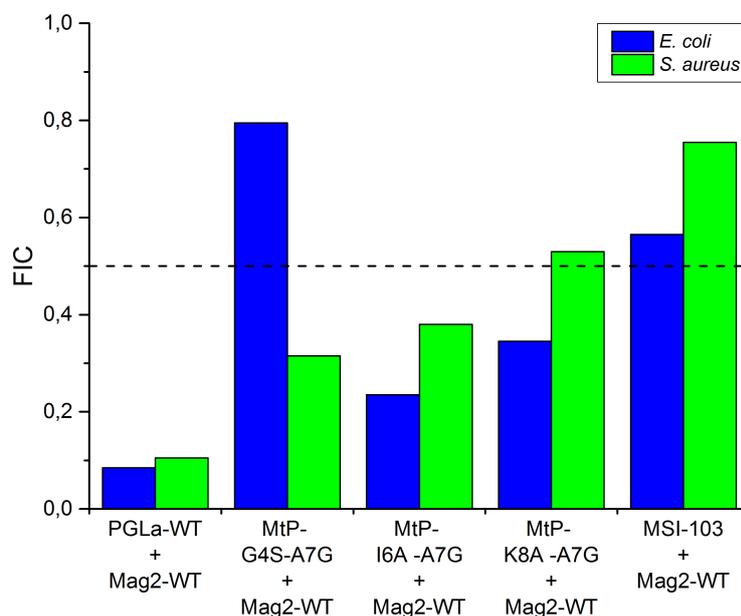


Abbildung 6.35: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die MtP-Doppelmutationen im Vergleich mit den Wildtypen.

6.4.2.3. Fluoreszenzspektroskopie

Alle Peptide wurden analog zu den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Peptiden mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (Anhang D in Tabelle D.18). Alle

Mittelwerte und deren Standardabweichung sind erneut in einem Balkendiagramm in Abbildung 6.36 aufgetragen.

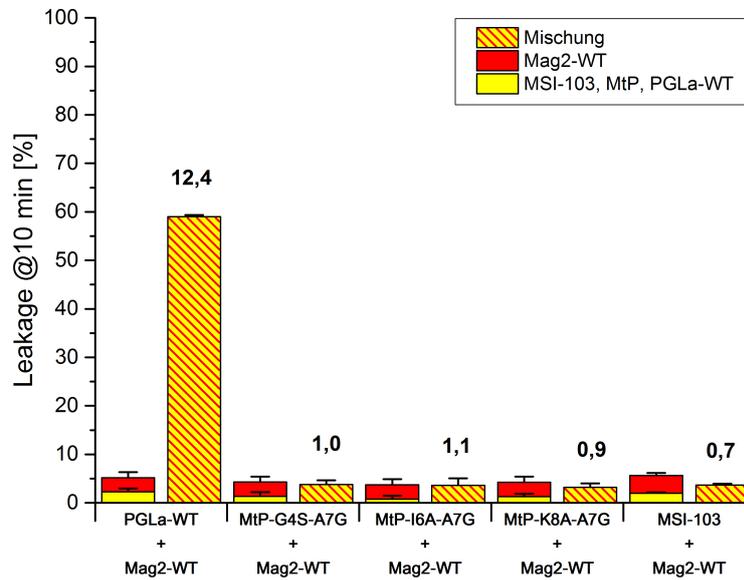


Abbildung 6.36: Die durch die MtP-Doppelmutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp.

Auch diese drei Peptide verhalten sich gleich. Sie zeigen keine synergistische Interaktion.

6.4.2.4. Zusammenfassung

Die Veränderung von zwei Aminosäuren hat zu keinen eindeutigen Ergebnissen geführt. Die Ergebnisse sind wesentlich unklarer als im vorangegangenen Abschnitt mit Einzelmutationen. Vollständige Wiederherstellung der Synergie konnte auch mit zwei Mutationen nicht erreicht werden.

6.4.3. Mehrfachmutationen

Da es nicht gelang mit Doppelmutationen die Synergie wiederherzustellen, wurden größere Mutationen ins Auge gefasst. Die erste Mutation war MtP-A3 und enthielt drei Mutationen. Hier wurden die Positionen 6-8 durch die an dieser Position in PGLa enthaltenen Aminosäuren ersetzt. Das Pendant der von PGLa nach MSI-103 Mutationen ist PtM-A3. MtP-A3 und zwei weitere, in diesem Kapitel besprochene Mutationen sind in Tabelle 6.8 gezeigt. Alle veränderten Aminosäuren sind rot und die ^{15}N -Markierung ist in blau gezeigt.

Tabelle 6.8: Für die Untersuchungen der MtP-Mehrfachmutationen verwendeten Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
MSI-103- ^{15}N -A10	Ala10	KIAGKIAKI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-A3- ^{15}N -A10	Ala10	KIAGK AGA I A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtP-A4- ^{15}N -A10	Ala10	KIAGK AGA I A GKIAK I AL K IA-NH ₂
MtP-A7G-G18L- ^{15}N -A10	Ala10	KIAGK I G K I A GKIAK I AL K IA-NH ₂
PGLa- ^{15}N -A10	Ala10	G M ASKAG A I A GKIAK V AL K AL-NH ₂

Alle im Folgenden verwendeten Techniken wurden so durchgeführt wie zuvor beschrieben. In Abbildung 6.37 sind die NMR-Spektren der drei Peptide alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps gezeigt.

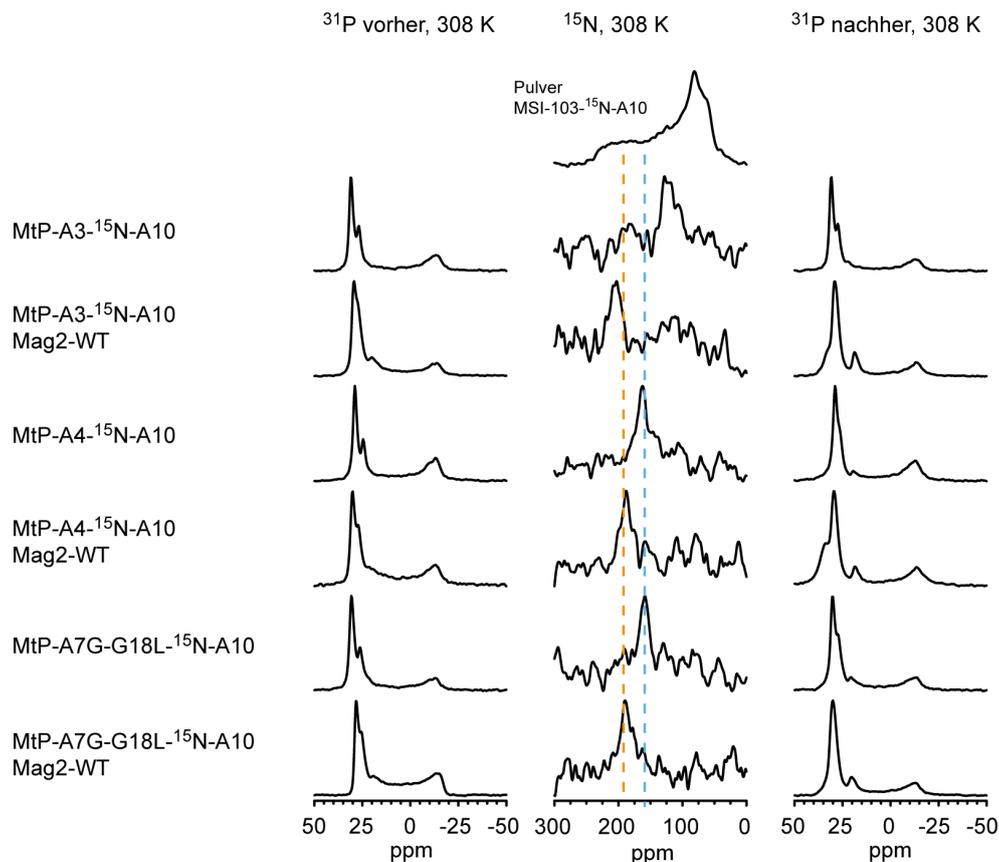


Abbildung 6.37: NMR-Spektren der MtP-Mehrfachmutationen in DMPC/PG (3:1).

MtP-A3 ist alleine in einem T-Zustand orientiert. In Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2-Wildtyp reorientiert es sich in eine transmembrane Orientierung (I-Zustand). Es verhält sich somit analog zum PGLa-Wildtyp. In Anhang D in Tabelle D.19 sind die chemischen Verschiebungen aller MtP-Mehrfachmutationen allein und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 im Vergleich mit MSI-103 und dem PGLa-Wildtyp aufgelistet.

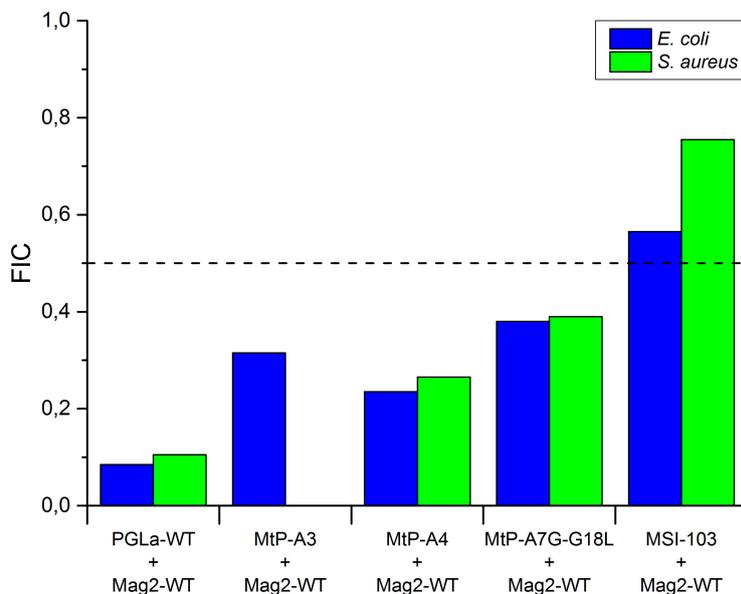


Abbildung 6.38: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices der MtP-Mehrfachmutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp.

Die mikrobiologischen Untersuchungen mittels Damebrett zeigten, dass auch MtP-A3 auch hier eine synergistische Interaktion zeigt. Die FIC-Indices aller MtP-Mehrfachmutationen sind in Abbildung 6.38 gezeigt. Die FIC-Indices für *S. aureus* konnten nicht ermittelt werden, da der MHK-Wert für MtP-A3 auf diesen Platten nicht bestimmt werden konnte. Er wird hier als $> 1024 \mu\text{mol/L}$ angenommen. Vermutlich ist er noch größer, was zu niedrigeren FIC-Indices führen würde. Das Peptid hat jedoch eine biologische Aktivität für *E. coli*. Hier konnte ein FIC-Index bestimmt werden. Die aus den Damebrett-Tests der MtP-Mehrfachmutationen ermittelten FIC-Indices sind in Anhang D in Tabelle D.20 aufgelistet. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen kommen zu einem anderen Ergebnis. Hier zeigt MtP-A3 keine synergistische Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp. Die für alle MtP-Mehrfachmutationen ermittelten Leakagewerte und Synergiefaktoren sind in Abbildung 6.40 als Balkendiagramm dargestellt. Alle mittels ANTS/DPX Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Leakagemittelwerte, Synergiefaktoren und Standardabweichungen vom Mittelwert sind in Anhang D in Tabelle D.21 aufgelistet. Da nur zwei von drei Techniken synergistische Interaktion zeigten wurden weitere Mutationen ins Auge gefasst. Im Falle der PtM-Mutationen gab es bei PtM-C1 im Falle der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen keine synergistische Interaktion (Abschnitt 6.3). In Abbildung 6.39 sind die Bereiche, die in PGLa (links) und MSI-103 (rechts) hiervon betroffen sind, mit einem grauen Kasten hervorgehoben. Die Aminosäure, die den gravierendsten Unterschied zwischen MSI-103 und dem PGLa-Wildtyp darstellt, ist Gly18. Hier ist in PGLa ein

Alanin. MtP-A3 wurde um eine Mutation erweitert (G18L) und MtP-A4 getauft. Die Sequenz ist in Tabelle 6.8 gezeigt. Es gibt in dem grau hinterlegten Bereich weitere Aminosäuren, die sich in beiden Peptiden unterscheiden, aber Glycin und Leucin ist der mit Abstand größte und vielversprechendste Unterschied. Zudem ist Gly-18 direkt neben Lys-19, welches auch einen Einfluss auf die synergistische Interaktion zu haben scheint (Abschnitt 6.1). Die Festkörper-NMR-Untersuchungen (Abbildung 6.37) von MtP-A4 zeigen, dass die Mutante allein schon sehr stark in die Membran geneigt ist (T-Zustand).

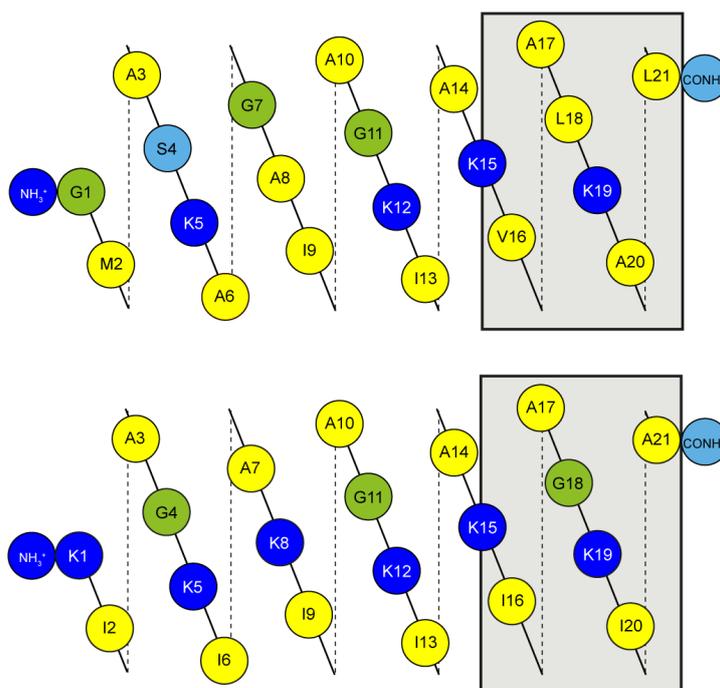


Abbildung 6.39: Bereiche die in PGLa (oben) und MSI-103 (unten) Einfluss auf die Synergie hatten.

In Gegenwart von einer equimolaren Menge an Mag2-Wildtyp verändert sich die Orientierung jedoch noch einmal (I-Zustand). Der Unterschied zwischen den zwei Zuständen beträgt nur 30 ppm. Bei PGLa ist dies ca. 70 ppm. 30 ppm sind jedoch deutlich genug um von einer Reorientierung zu sprechen. Erfreulicherweise ist die biologische Aktivität von MtP-A4 höher als von MtP-A3. Die Mischung von MtP-A4 mit dem Mag2-Wildtyp zeigt sowohl bei dem Gram-negativen als auch bei dem Gram-positiven Bakterium Synergie (Abbildung 6.38). Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zeigen, dass die Veränderung der vierten Aminosäure dazu führt, dass in MtP-A4 die Fähigkeit zur Interaktion mit Mag2 wiederhergestellt ist (Abbildung 6.40).

Da das Ziel der Mutationen an MSI-103 war, mit möglichst wenigen Veränderungen die synergistische Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp wiederherzustellen, wurde der Versuch unternommen, die Zahl der modifizierten Aminosäuren zu verringern. Nur die schwerwiegenden Mutationen sollten hierbei beibehalten werden. Zu diesen gehören G18L und A7G. I6A und A8K wurden als weniger schwerwiegend erachtet. Die hieraus geborene Mutation ist in Tabelle 6.8 gezeigt. Die Reduzierung der Mutationen hat scheinbar keinen Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem Mag2-Wildtyp. MtP-A7G-G18L zeigt in allen drei Techniken synergistische Aktivität mit dem Mag2-Wildtyp (Abbildung 6.37, Abbildung 6.38, Abbildung 6.40).

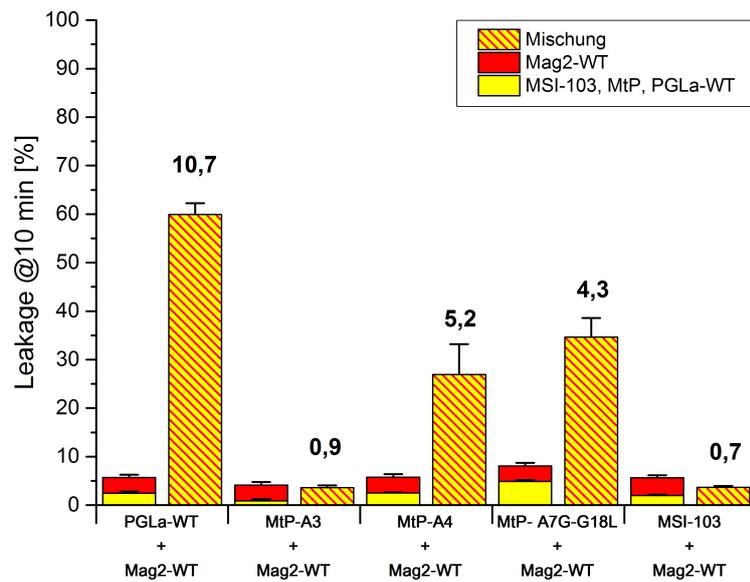


Abbildung 6.40: Die durch die Mtp-Mehrfachmutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp.

Es ist somit möglich die in MSI-103 nicht vorhandene Fähigkeit zur Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp durch Änderung zweier Aminosäuren herzustellen.

6.4.3.1. Zusammenfassung

In Abbildung 6.41 sind die Peptide und die Zusammenfassung der Ergebnisse in der Helikalen-Netz-Darstellung und Symboldarstellung gezeigt. Sie ist analog zu der bei den PtM-Mutationen verwendeten Darstellungsweise aufgebaut.

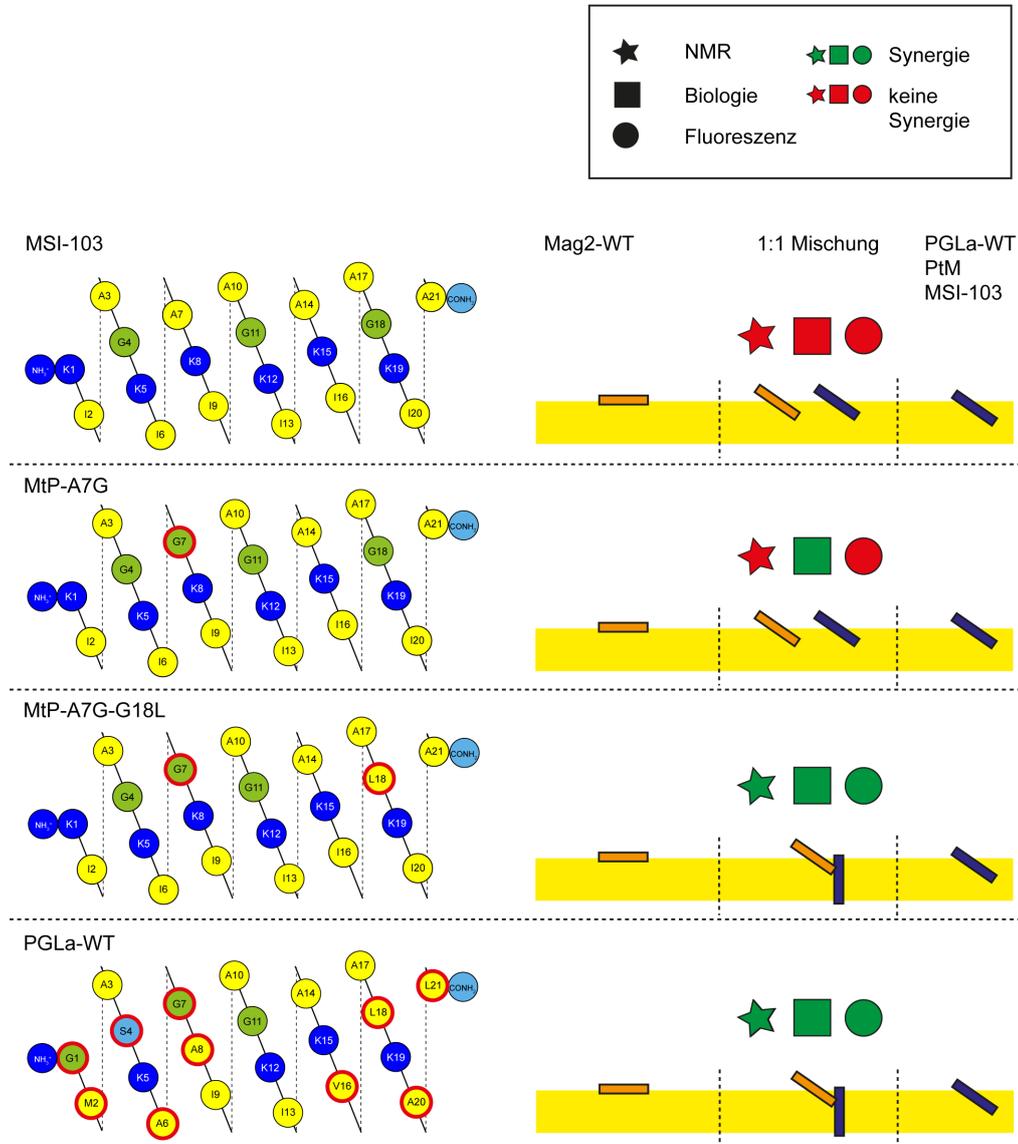


Abbildung 6.41: Zusammenfassung der Ergebnisse der MtP-Mutationen.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Interaktion zwischen MSI-103 und dem Mag2-Wildtyp herzustellen indem man zwei Aminosäuren austauscht. Es bedurfte einiger Mutationen bis klar war welche Aminosäuren betroffen sind. Hier sind nur zwei der Mutationen gezeigt. Die Wiederherstellung hat zum Teil schon in MtP-A7G funktioniert und wurde mit MtP-A7G-G18L vervollständigt. Der genaue Einfluss der Aminosäuren auf die Struktur ist schwer vorherzusagen. Die Funktion dieser Aminosäuren ist vermutlich unterschiedlich (Abbildung 6.42). Gly-18 ist in unmittelbarer Nähe von Lys-19. Bei Glycin handelt es sich um eine sehr kleine, flexible Aminosäure, die oftmals auch als Helixbrecher bezeichnet wird. Es könnte

auch sein, dass das stark hydrophobe Leu tiefer in die Membran taucht als das kleine Gly und dadurch Lys-19 verschiebt.

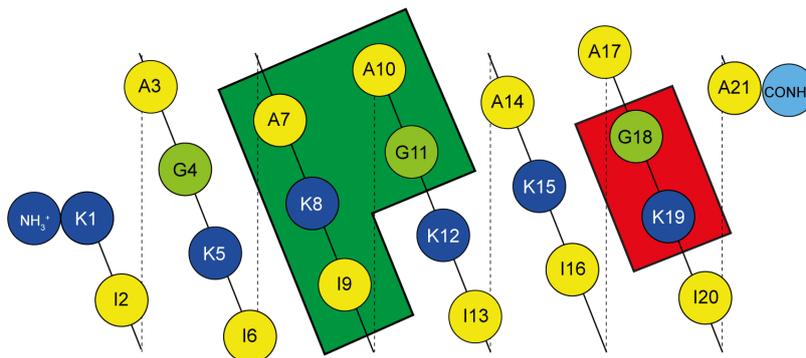


Abbildung 6.42: Verschiedene Bereiche, die Einfluss auf das Interaktionsverhalten von MSI-103 haben (Grün - Aminosäuren die am GxxxG-Motiv beteiligt sind; rot - Gly in unmittelbarer Nähe von Lys-19).

Da Lys-19, wie im Kapitel mit den Ladungsmutationen (Abschnitt 6.3) gezeigt, an der Interaktion beteiligt zu sein scheint, führt ein Gly anstatt Leu an Position 18 vermutlich dazu, dass Lys-19 sich nicht in der richtigen Orientierung befindet um eine Salzbrücke mit Mag2 auszubilden. Die Mutation an Position 7 führt dazu, dass ein sog. GxxxG-Motiv entsteht. Dieses ist ein charakteristisches Motiv in transmembranen Segmenten von Proteinen.^[102,103] Man kann sich dies als Einbuchtungen in der Helix vorstellen, die dazu führen, dass zwei Helices sich aneinander anlagern können. Im Abschnitt 6.5 wird der Einfluss dieses Motivs genauer untersucht.

6.5. Der Einfluss des GxxxG-Motivs

Wie schon beschrieben ist Gly-7 in PGLa Teil eines sog. GxxxG-Motivs, das in transmembranen Helixsegmenten von Proteinen vorkommt. Aus diesem Grunde wurde eine weitere Mutation untersucht, PGLa-G11I. Dieses Peptid war Teil einer Mutationsstudie von Sarah Flade, welche das Ziel hatte die Aktivität von Mag2 zu erhöhen.^[104] Diese Aminosäure ist in PGLa und MSI-103 gleich und konnte daher in den vorangegangenen Abschnitten nicht als wichtig identifiziert werden. Sollte das GxxxG-Motiv einen Einfluss auf die Interaktion haben, so sollte diese Mutation keine synergistische Interaktion mehr zulassen. Zudem wurde untersucht, ob die Lage des GxxxG-Motivs, bzw. der Abstand zwischen den Glycinen wichtig ist. Die Peptide wurden als PGLa-GS1 und PGLa-GS2 (*engl.* GS - Gly shift, Gly-Verschiebung) bezeichnet und sind in Abbildung 6.43 im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp in der Helikalen-Netz-Darstellung gezeigt. In beiden Fällen handelt es sich um die gleichen Aminosäuren wie im PGLa-Wildtyp, jedoch ist die Reihenfolge eine andere. Im Falle von PGLa-GS1 wird das GxxxG-Motiv durch Verschieben eines Gly (Position 7) an Position 14 in ein GxxG-Motiv umgewandelt. Betrachtet man die Helikale-Rad-Darstellung, so sieht man, dass dennoch mehr Raum zwischen den zwei Aminosäuren geschaffen wird. Im Falle von PGLa-GS2 wurde das GxxxG-Motiv erhalten. Es wurde auf die andere Seite der Helix, durch Verschieben beider Glycine um zwei Aminosäuren (G7 → G9, G11 → G13), transferiert. Bei diesem Peptid ist das GxxxG-Motiv auf die andere Seite des hydrophoben Bereichs der Helix gespiegelt. Dieses Peptid sollte, da die Interaktionsstelle vorhanden ist, genauso agieren wie der Wildtyp.

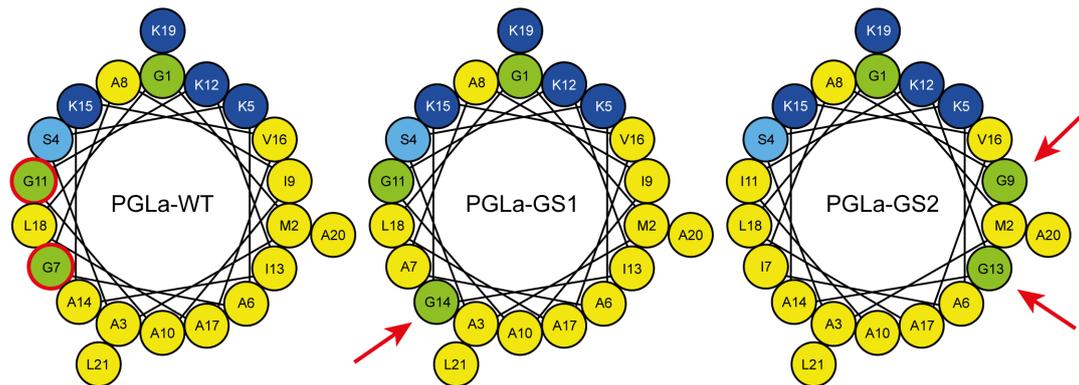


Abbildung 6.43: Die neuen durch Gly-Verschiebung entstandenen Mutationen PGLa-GS1 (Mitte) und PGLa-GS2 (rechts) im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp (links).

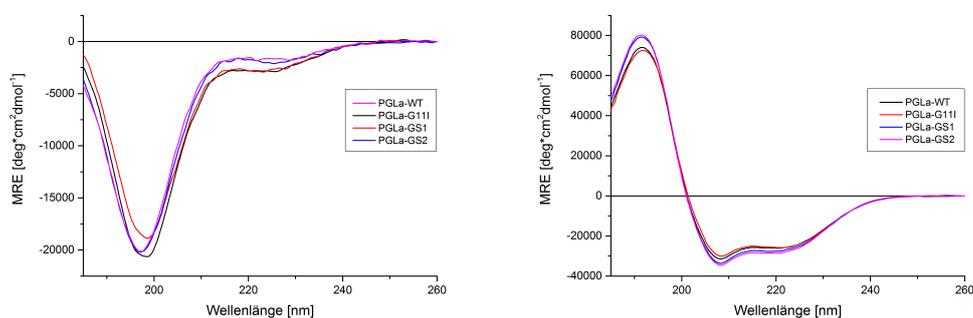
Die Sequenzen sind in Tabelle 6.9 gezeigt. Die Mutationen sind rot markiert und die ^{15}N -Markierungen blau. Das GxxxG-Motiv (GxxG) ist außerdem unterstrichen.

Tabelle 6.9: Für die Untersuchungen des GxxxG-Motivs verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
PGLa-WT	Ala10	GMASKAGAI <u>AG</u> KI A KV A LKAL-NH ₂
PGLa-G11I- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKAGAI I KI A KV A LKAL-NH ₂
PGLa-GS1- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKA A I AG KI G KV A LKAL-NH ₂
PGLa-GS2- ^{15}N -A10	Ala10	GMASKA I AG I K G A K V A LKAL-NH ₂

6.5.1. Ergebnisse

In Abbildung 6.44a sind die CD-Spektren der in diesem Kapitel untersuchten Peptide in 10 mM Phosphatpuffer gezeigt. Alle Peptide zeigen ein ungeordnete Struktur.



(a) Phosphatpuffer.

(b) DMPC/DMPG-Vesikel.

Abbildung 6.44: CD-Spektren der GxxxG-Mutationen im Vergleich mit dem PGLa-WT.

In Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln (3:1) bei einem P/L von 1:50 nehmen alle Peptide eine α -helikale Struktur ein (Abbildung 6.44b). Alle drei Peptide wurden mit-

tels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 6.45 sind die Spektren der Peptide alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2-Wildtyp gezeigt. Die Anordnung der Spektren ist analog zu den in den vorangegangenen Abschnitten.

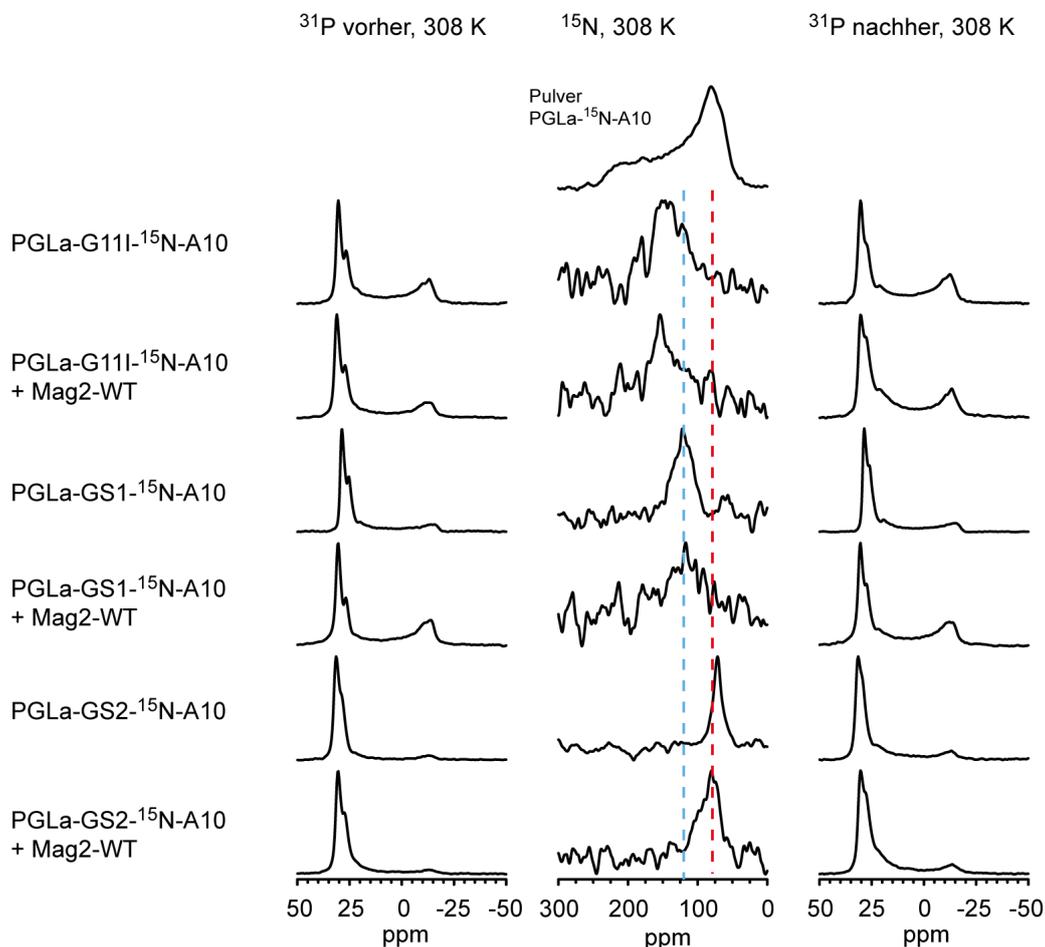


Abbildung 6.45: NMR-Spektren der GxxxG-Mutationsgruppe alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps (DMPC/DMPG (3:1), P/L, 1:50).

Alle Spektren sind bei einem P/L von 1:50 aufgenommen worden. Die drei Peptide sind unterschiedlich orientiert. PGLa-G11I alleine ist stärker in die Membran geneigt als die anderen zwei Peptide (T-Zustand). PGLa-GS1 ist schwächer in die Membran geneigt und PGLa-GS2 neigt sich gar nicht in die Membran (S-Zustand). Keines der drei Peptide verändert merklich die Orientierung in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2-Wildtyp. Es findet keine Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp statt. Interessanterweise ist PGLa-GS2 nicht mehr in der Lage sich in einen T-Zustand zu orientieren. Das Spektrum von PGLa-GS1 in Gegenwart des Mag2-Wildtyps weist eine sehr geringe Signalqualität auf. Alle aus diesen Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen sind in Anhang D in Tabelle D.22 zu sehen. In Anhang D in Tabelle D.23 sind die aus den Damebrett-Tests ermittelten FIC-Indices für diese drei Peptide zu sehen. Aus je zwei FIC-Indices wurden Mittelwerte gebildet und in Abbildung 6.46 aufgetragen. Alle drei Peptide zeigen auch in den mikrobiologischen Untersuchungen sowohl gegen *E. coli* als auch gegen *S. aureus* keine Synergie mit dem Mag2-Wildtyp.

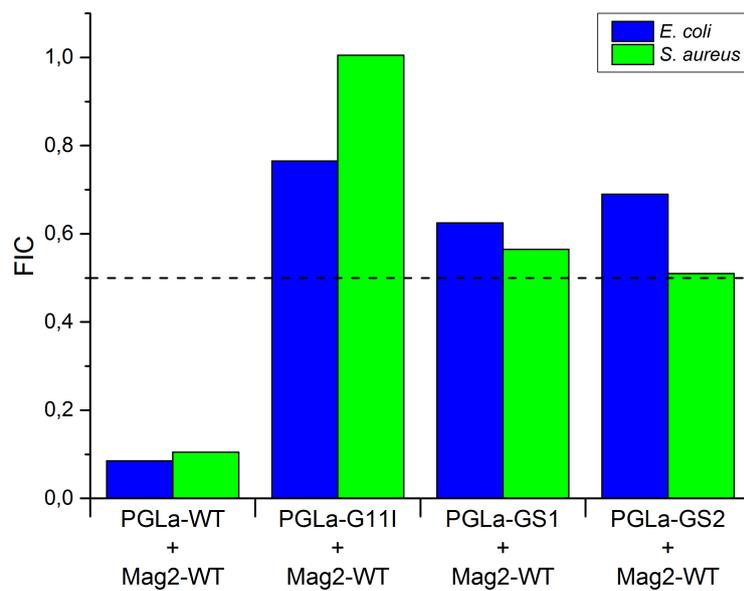


Abbildung 6.46: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die GxxxG-Mutationen im Vergleich mit dem PGLa-Wildtyp.

Die aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der GxxxG-Mutationen ermittelten Leakagewerte und Synergiefaktoren sind in Abbildung 6.47 als Balkendiagramm dargestellt.

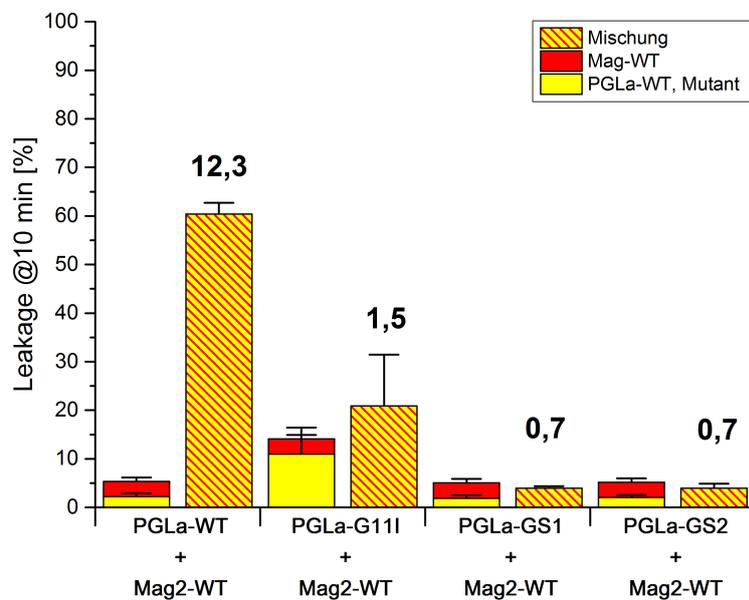


Abbildung 6.47: Die durch die verschiedenen GxxxG-Mutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem Mag2-WT.

Das *Procedere* der Experimente und Auswertung war analog wie in den vorange-

gangenen Abschnitten. Interessanterweise ist PGLa G11I wesentlich aktiver als der PGLa-Wildtyp. Dies liegt vermutlich an der erhöhten Hydrophobizität. Die Gly-Verschiebungen verhalten sich alleine ungefähr wie der Wildtyp und verursachen ein Leakage von ca. 2 %. Keines der drei hier untersuchten Peptide zeigt jedoch eine synergistische Interaktion mit dem Mag2-Wildtyp. Die Daten der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der GxxxG-Mutationen sind in Anhang D in Tabelle D.24 gezeigt. Alle Daten führen zu dem Schluss, dass auch der Austausch von Gly-11 zum Verlust der Interaktion führt und somit tatsächlich das GxxxG-Motiv ein Interaktionsgrenzfläche zu sein scheint. Die beiden Gly-Verschiebungen zeigen ebenso keine Synergie, somit scheint auch die Lage dieser Aminosäuren von Belang zu sein und vor allem die Abfolge der Aminosäuren in PGLa nicht trivial.

6.5.2. Diskussion

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass auch Gly-11 einen großen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit von PGLa mit dem Mag2-Wildtyp hat. Es ist somit weder möglich Gly-7 oder Gly-11 durch eine hydrophobe Aminosäure zu ersetzen. Im Falle von Gly-7 wurde Ala verwendet, welches eine kleine hydrophobe Aminosäure ist. Desweiteren wurden der Abstand (i, i+3) zwischen diesen Aminosäuren und ihre Position bei gleichbleibendem Abstand (i, i+4) variiert um herauszufinden, ob dies einen Einfluss auf die Interaktion hat. Es konnte gezeigt werden, dass diese zwei Maßnahmen dazu führen, dass es keine synergistische Interaktion zwischen diesen Peptiden und dem Mag2-Wildtyp gibt. Hierbei muss zwischen den zwei Peptiden unterschieden werden. PGLa-GS1 ist zu vergleichen mit PGLa-G7A und PGLa-G11I. In diesem Peptid ist nur ein Gly verschoben. In PGLa-GS2 wurden beide Glycine verschoben. Dies führt nicht nur zu Verlust der Interaktion mit Mag2, sondern, erkennbar an der chemischen Verschiebung der NMR-Spektren, auch zum Verlust der Eigenschaft von PGLa sich in Membranen zu neigen. Dies lässt darauf schließen, dass die Lokalisation des GxxxG-Motivs verantwortlich für eine PGLa-Interaktion ist. Vermutlich bildet dieses Motiv eine Grenzfläche für ein Dimer, welches PGLa dazu befähigt in Membranen zu tauchen, bzw. sich in Gegenwart von Mag2 transmembran zu orientieren. Ein Glycin ist somit genug für einen T-Zustand, aber um die Synergie zwischen PGLa und Mag2 zu gewährleisten bedarf es beider Glycine.

Die ersten Arbeiten zu GxxxG-Motiven wurden von Lemmon *et al.* an Glycophorin A (GpA) durchgeführt, dessen Homodimerisierung durch sieben Aminosäuren der transmembranen Domäne vermittelt wird (LlxxGVxxGVxxT), welches ein rechtshändiges Überkreuzen der transmembranen Domänen definiert.^[105] Das Dimer wird in diesem Fall durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen entlang des Dimers stabilisiert. Die Interaktionsgrenzfläche setzt sich zusammen aus zwei Erhebungen und den dazugehörigen Vertiefungen. Im Dimer ist eine Erhebung eines Monomers in die Vertiefung des gegenüberliegenden Monomers gepackt.^[106] Betrachtet man PGLa, so ist dieses Motiv auch hier erkennbar. Die hydrophoben Erhebungen sind in diesem Falle kleiner (Ala6 und Ala10, GM_AxxAGxxAGxxAKVALKAL-NH₂) und es sind vermutlich nur vier oder sogar nur zwei Aminosäuren beteiligt. In Abbildung 6.48 sind die vier Aminosäuren in einer helikalen Darstellung von PGLa als Monomer gezeigt. Hierbei gibt es natürlich die Möglichkeit eines parallelen und eines antiparallelen Dimers. Die Peptide sind in rot, Gly in grün und Ala in gelb dargestellt. Es gibt zwei Möglichkeiten der Dimerisierung. Zum einen kann PGLa parallel dimerisieren. Hierbei liegen

sich N-Terminus und C-Terminus der beiden Peptide gegenüber.

Zum anderen kann das Peptid antiparallel orientiert sein. Hierbei liegen sich je N- und C-Terminus der zwei Peptide gegenüber. In Abbildung 6.49 sind beide Möglichkeiten dargestellt. Hierbei sind die Möglichkeiten des Andockens von Ala an Gly durch Pfeile symbolisiert. Im Falle des parallelen Dimers gibt es vier Möglichkeiten. Im Falle des antiparallelen Dimers nur zwei Möglichkeiten. Es gibt natürlich auch noch die Möglichkeit des Gly-Gly-Kontakts. In diesem Fall stehen nur die vier Glycine als Kontaktpunkte in Form von Einbuchtungen im Molekül zur Verfügung. Die Frage welches Dimer wohl favorisiert wird, wird in Abschnitt 6.8 genauer diskutiert. Mag2 enthält kein solches Motiv. D. h. die Dimerisierung über diesen Kontakt ist eher unwahrscheinlich. Zudem liegt Mag2 an der Oberfläche der Membran, während PGLa transmembran orientiert ist. Da Mag2 mit Lys-19 wechselzuwirken scheint, welches am anderen Ende von PGLa liegt, scheint das GxxxG-Motiv kein PGLa-Mag2-Interaktionsmotiv zu sein.

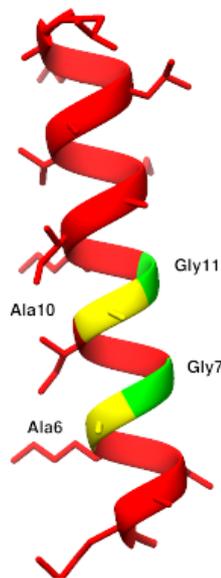


Abbildung 6.48: Darstellung des PGLa-Wildtyps in rot. Die Aminosäuren Gly7 und Gly11 sind grün, Ala6 und Ala10 sind gelb markiert.

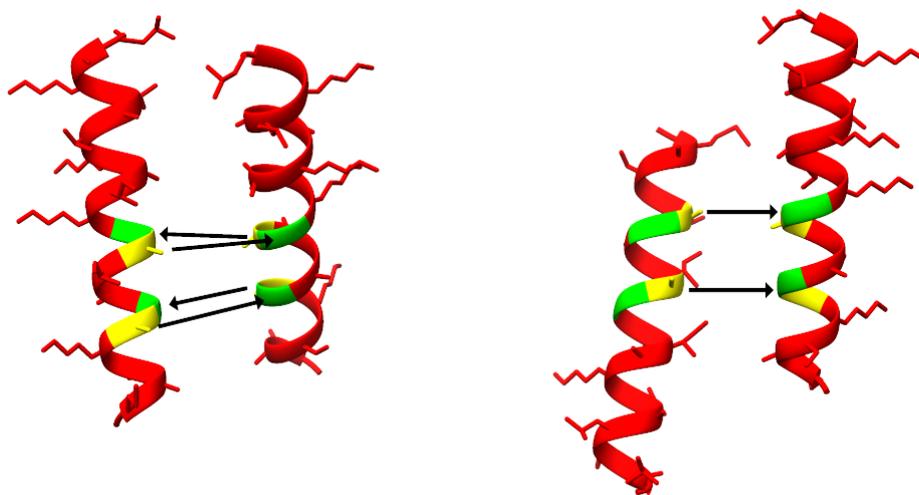


Abbildung 6.49: Modelle für eine mögliche GxxxG-Interaktionsfläche.

Da wir nicht genau wissen, welcher Teil von Mag2 noch involviert ist, wurden weitere Mutationsversuche unternommen, die im nächsten Abschnitt beschrieben sind.

6.6. Einschub: MSI-103 versus Mag2

Im Falle von PGLa war es recht einfach durch MSI-103 auf die für die Interaktion wichtigen Aminosäuren zu kommen. Vergleicht man MSI-103 mit Mag2 so unterscheiden sich schon deutlich mehr Aminosäuren in den zwei Peptiden. In Abbildung 6.50 sind die beiden Peptide in der Helikalen-Rad-Darstellung gegenübergestellt.

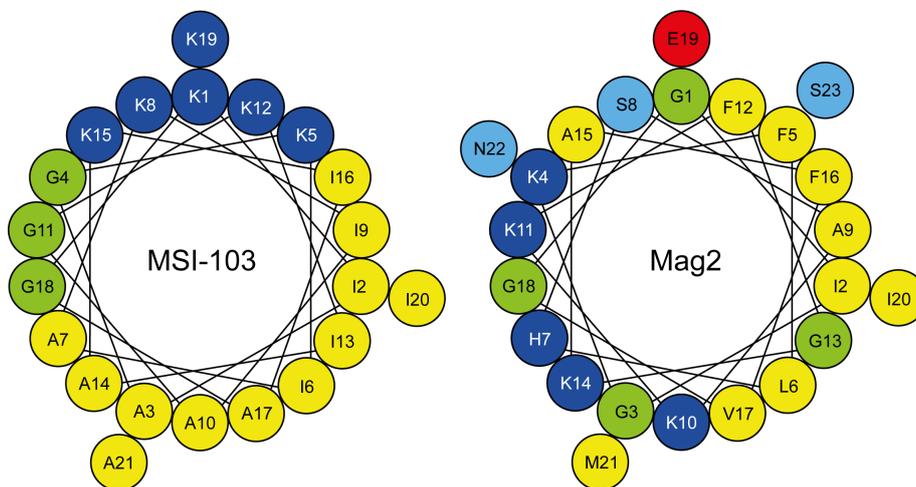


Abbildung 6.50: Gegenüberstellung von MSI-103 und Mag2 in der Helikalen-Rad-Darstellung.

Diese zwei Peptide sind sich von der Aminosäurenverteilung nicht so ähnlich wie PGLa und MSI-103. Jedoch sind es beides AMPs und sie haben beide einen hydrophilen und einen hydrophoben Bereich. Sie bilden beide α -Helices, wenn sie an Lipiddoppelschichten binden. Als Modellsystem für grundlegende Mutationsgedanken ist MSI-103 vielleicht auch im Falle von Mag2 geeignet. Die CD-Spektren der zwei Peptide wurden schon in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, daher wird hier darauf verzichtet. Da hier MSI-103 mit Mag2 verglichen wird, wurde der PGLa-Wildtyp mit MSI-103 mittels ^{15}N -Festkörper-NMR untersucht (Abbildung 6.51).

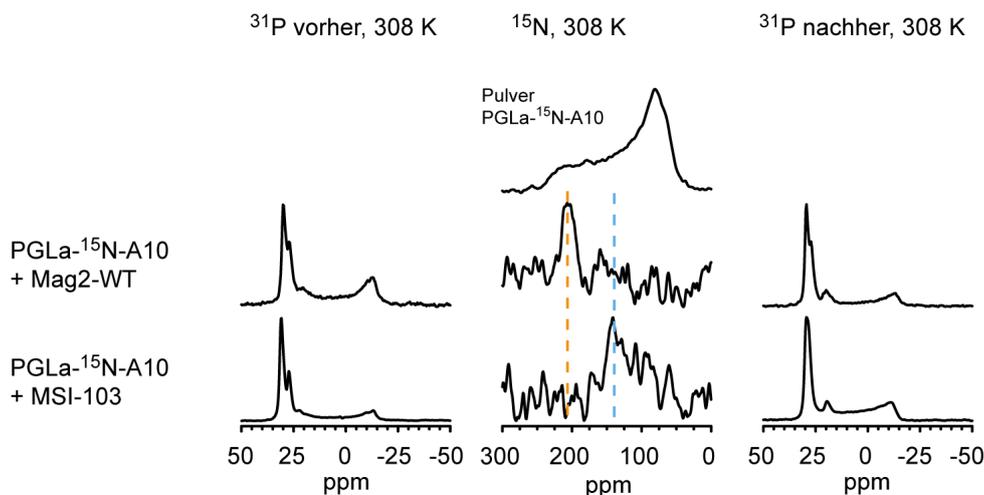
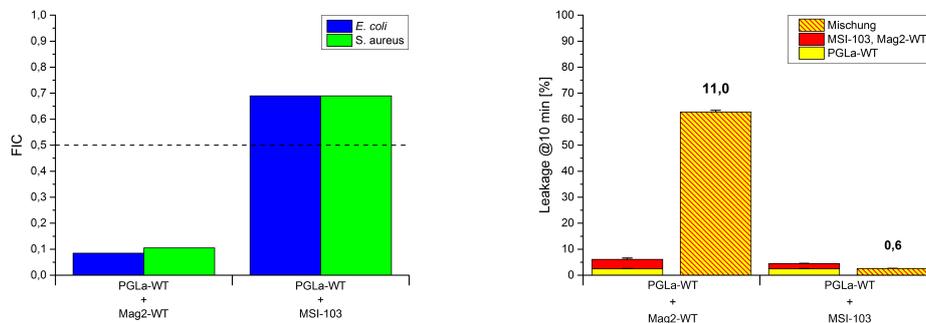


Abbildung 6.51: NMR-Spektren von PGLa- ^{15}N -A10 in Gegenwart des Mag2-Wildtyps und MSI-103 in DMPC/DMPG (3:1).

In Gegenwart von MSI-103 ist PGLa in einem T-Zustand (142 ppm) orientiert und zeigt somit keine Synergie. Die aus den mikrobiologischen Tests bestimmten FIC-Indices für *E. coli* und *S. aureus* und die fluoreszenzspektroskopischen Ergebnisse sind in Abbildung 6.52a und Abbildung 6.52b gezeigt.



(a) Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices. (b) Fluoreszenzspektroskopische Ergebnisse.

Abbildung 6.52: Balkendiagramme der FIC-Indices und der Leakagewerte von PGLa in Gegenwart des Mag2-Wildtyps und MSI-103.

MSI-103 zeigt sowohl in den mikrobiologischen Untersuchungsmethoden als auch mittels Fluoreszenzspektroskopie keine Synergie. Die mittels Damebrett-Test ermittelten FIC-Indices für *E. coli* und *S. aureus* sind in Anhang D in Tabelle D.25 aufgeführt. Auch hier wurden Mittelwerte berechnet und in einem Balkendiagramm aufgetragen. In Anhang D in Tabelle D.26 sind die Leakagewerte, Synergiefaktoren und deren Standardabweichungen vom Mittelwert aufgelistet. Auch hier zeigt der PGLa-Wildtyp keine synergistische Interaktion mit MSI-103. Somit zeigt PGLa in Gegenwart von MSI-103 mit keiner der drei verwendeten Techniken Synergie. Die Grundvoraussetzung für weitere Untersuchungen ist somit gegeben.

6.7. Von MSI-103 nach Mag2

Basierend auf den Ergebnissen des vorangegangenen Abschnitts wurden neue Mutationen von MSI-103 entwickelt. Diese dienten dem Zweck herauszufinden, ob die Ladungswechselwirkung tatsächlich eine entscheidende Rolle spielt. Im vorangegangenen Abschnitt wurden die zwei Peptide in der Helikalen-Rad-Darstellung gezeigt.

In Abbildung 6.53 sind die verschiedenen Mutationen in Helikalen-Rad-Darstellungen gezeigt. Mag2 ist um 100 Grad gedreht, damit der polare Sektor deckungsgleich mit dem polaren Sektor von MSI-103 ist. Im Falle von MtM-C1 wurde der C-terminale Teil von Mag2 an den C-Terminus bzw. den verkürzten C-Terminus angehängt. Wichtig hierbei war, dass die negativ geladene Aminosäure und der negativ geladene C-Terminus an der richtigen Position landen. Im Falle von MtM-C2 wurde zusätzlich Lys-1 mit Gly-11 getauscht. MtM-C3 enthielt zusätzlich drei Phenylalanine (Position I2F, I6F, I13F). Diese Aminosäure kommt in PGLa und MSI-103 nicht vor. Die drei Phenylalanine bilden ein Cluster, da sie wie in Abbildung 6.53 gut zu erkennen in nahezu die gleiche Richtung zeigen. Phenylalanine haben eine Art Ankerfunktion bei membrangebundenen Peptiden und Proteinen. In MtM-C4 wurde versucht einige der Aminosäuren, die sich unterscheiden, zu ersetzen und das Molekül weniger hydrophob zu machen (I2G, I9S, G11K, I16A, G18I). Zudem wurde auch der negativ geladenen C-Terminus angehängt. Alle Sequenzen sind in Tabelle 6.10 aufgelistet. Zusätzlich wurde eine weitere Mutante

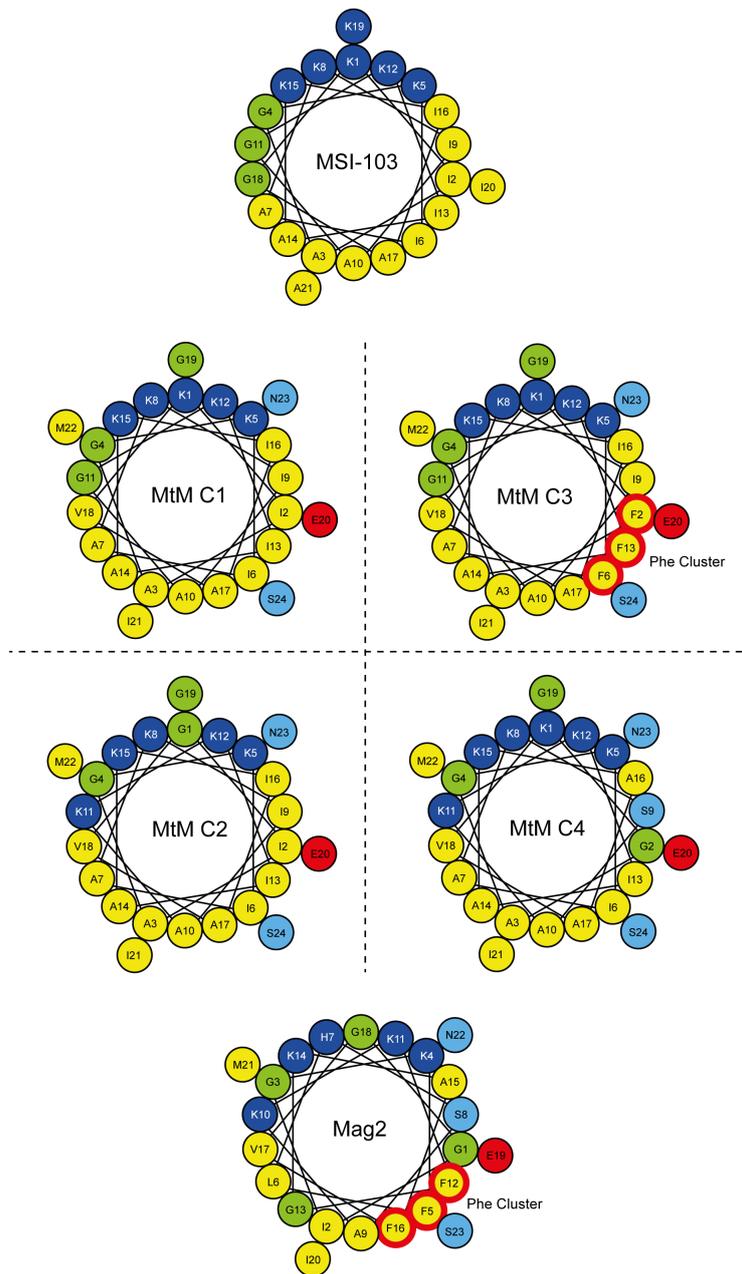


Abbildung 6.53: MSI-103, Mag2-Wildtyp und MtM-Mutationen in der Helikalen-Rad-Darstellung.

synthetisiert, welche nur einen veränderten N-Terminus hat (MtM-GIG). Die am C-Terminus modifizierten Peptide enthalten 24 Aminosäuren (Mag2, 23 Aminosäuren) und das am N-Terminus modifizierte Peptid nur 20 Aminosäuren. Die Benennung der Peptide kommt wie in den vorigen Abschnitten aus dem Englischen (MtM: „from MSI to Mag2“).

Tabelle 6.10: Für die Untersuchungen der MtM-Mutationen verwendete Peptide.

Peptid	Substituierte Position	Sequenz
MSI-103- ¹⁵ N-A10	Ala10	KIAGKIAKI A GKIAKIAGKIA-NH ₂
MtM-C1	-	KIAGKIAKIAGKIAKI A VGEIMNS-OH
MtM-C2	-	G IAGKIAKIA K KIAKI A VGEIMNS-OH
MtM-C3	-	K FAG K FAK I AG K FAK I A V GEIMNS-OH
MtM-C4	-	K GAGKIA S AK K IA A VGEIMNS-OH
MtM-GIG	-	G I G KIAKIAGKIAKIAGKIA-NH ₂
Mag2-WT	-	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH

Alle MtM-Peptide wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Spektren in Phosphatpuffer sind in Abbildung 6.54a gezeigt. Die Spektren in Gegenwart von DMPC/DMPG-Vesikeln (3:1) bei einem P/L von 1:50 sind in Abbildung 6.54b gezeigt.

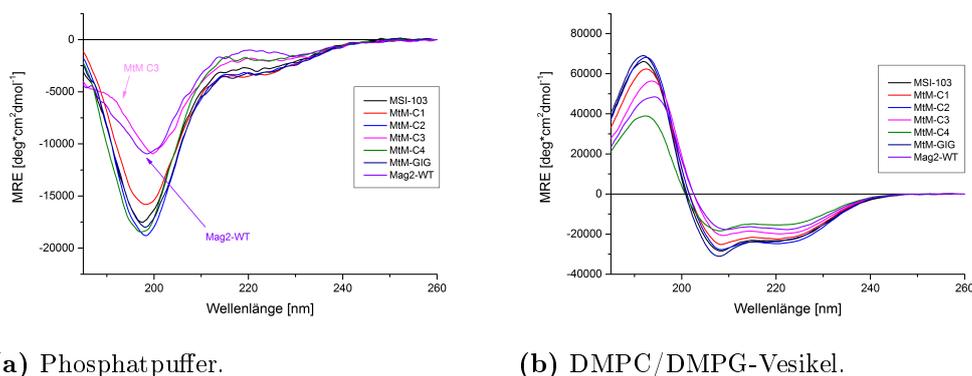


Abbildung 6.54: CD-Spektren der MtM-Mutationen im Vergleich mit MSI-103 und dem Mag2-Wildtyp.

Man kann in Phosphatpuffer zwei Gruppen ausmachen. Der Mag2-Wildtyp zeigt, sowie MtM-C3, welches auch Phenylalanin enthält, die schwächste Elliptizität.^[107] Die anderen Peptide zeigen alle eine recht ähnliche Elliptizität. Durch die Einführung von Phenylalaninen kommt es zu einer konformellen Änderung und das Minimum verschiebt sich von 198 nm nach 200 nm. Phenylalanin hat eine Absorptionsbande die bei ca. 260 nm liegt.^[107] Die Absorptionsbande erstreckt sich von ca. 230 nm bis 270 nm. In Gegenwart von Vesikeln ist keine klare Gruppierung mehr festzustellen. Bei allen Peptiden liegt das linke Minimum (bei ca. 210 nm) tiefer als das rechte Minimum. Bei MtM-C3 und Mag2 liegt es ungefähr auf gleicher Höhe. MtM-C4 zeigt die geringste Elliptizität. Dieses Peptid zeigt auch die geringste biologische Aktivität. Aus den ermittelten FIC-Indices wurden Mittelwerte errechnet und in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abbildung 6.55). Keines der Peptide zeigt synergistische Interaktion mit dem PGLa-Wildtyp. In Anhang D in Tabelle D.27 sind die aus den Damebrett-Tests

ermittelten FIC-Indices für *S. aureus* und *E. coli* gezeigt.

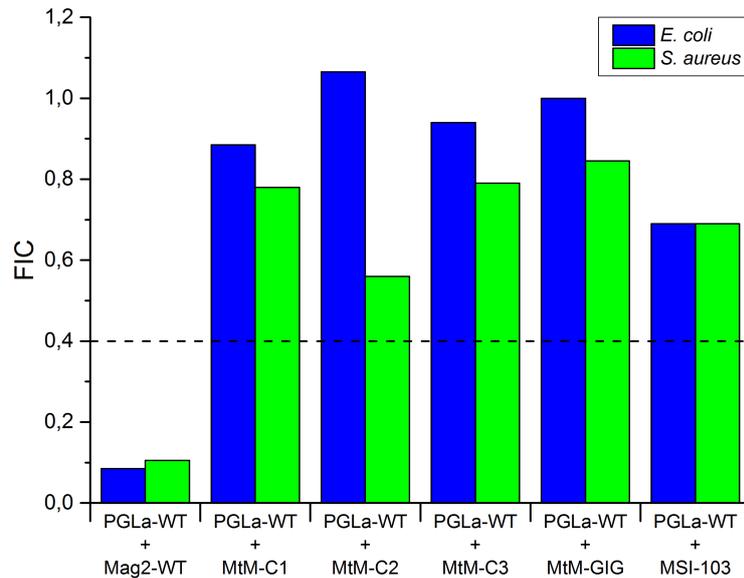


Abbildung 6.55: Aus den Damebrett-Tests ermittelte FIC-Indices für die MtM-Mutationen im Vergleich mit dem Wildtyp.

Die Werte für MtM-C4 können nicht berechnet werden, da dieses Peptid keinen gemessenen MHK-Wert besitzt. Alle Peptide wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie mit Fluorophor-gefüllten Vesikeln untersucht (Abbildung 6.56).

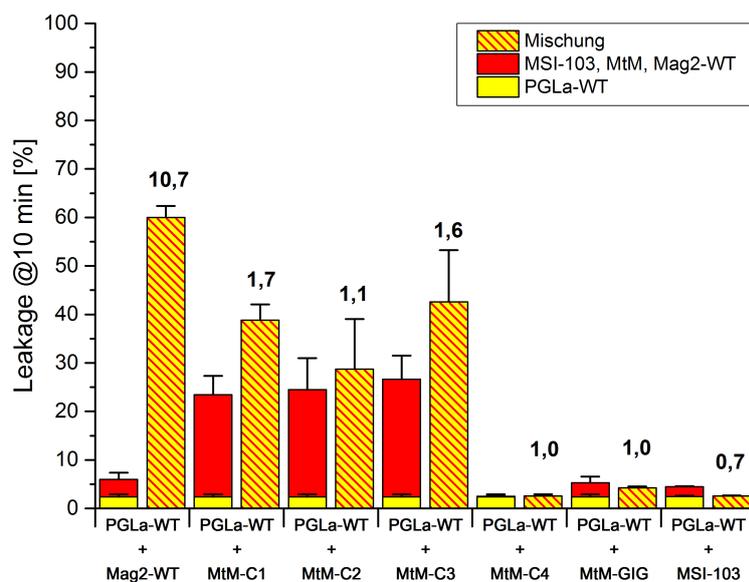


Abbildung 6.56: Die durch MtM-Mutationen verursachten Leakagewerte alleine und in Kombination mit dem Mag2-Wildtyp.

Die Leakagewerte und Synergiefaktoren sind in Anhang D in Tabelle D.28 aufgeführt. MtM-C1, MtM-C2 und MtM-C3 sind deutlich aktiver als MSI-103. Dies ist vermutlich auf die größere Aminosäurezahl (24) zurückzuführen. Im Falle von MtM-C2 musste die halbe Konzentration (sehr niedriges P/L) verwendet werden, da sonst nicht ausreichend Spielraum für die synergistische Interaktion gewesen wäre. Im Falle von MtM-C4 scheint das Peptid vollständig inaktiviert zu sein, denn es erzeugt nahezu kein Leakage. MtM-GIG verhält sich ähnlich wie MSI-103. Keines der Peptide zeigt eine synergistische Interaktion mit dem PGLa-Wildtyp, d. h. die Umwandlung von MSI-103 in Mag2 war in keinem Fall erfolgreich. Dies heißt im Umkehrschluss nicht, dass es keine Ladungswechselwirkung zwischen PGLa und Mag2 gibt, sondern nur, dass andere Interaktionen zusätzlich zu den elektrostatischen benötigt werden. MSI-103 und Mag2 sind sich weniger ähnlich als MSI-103 und PGLa und die oben angeführten Mutationen waren nicht genug um die Synergie herzustellen.

6.8. Interaktionsmodelle

Auf Grund der in Kapitel 5 und Kapitel 6 gezeigten Ergebnisse können nun verschiedene Interaktionsmodelle entwickelt werden. Die Wechselwirkungen zwischen PGLa und Mag2 scheinen von eher schwacher Natur zu sein, da es eine konzentrationsabhängige Interaktion gibt. D. h. die Peptide müssen erst in räumliche Nähe auf der Membran kommen, damit eine Wechselwirkung stattfindet. Daraus folgt, dass es keine sonderlich starke Wechselwirkung ist. Dies erschwert die Identifikation von beteiligten Aminosäuren und das Aufstellen eines Modells merklich. Sobald eine Grenzkonzentration auf der Membran erreicht ist, beginnen die Peptide miteinander wechselzuwirken. In Kapitel 5 konnte gezeigt werden, dass die 1:1-Mischung am effektivsten ist. Daraus folgt, dass je ein PGLa mit je einem Mag2 wechselwirkt. D. h. nicht, dass es sich um ein Heterodimer handelt. Die funktionale Untereinheit kann aus zwei, vier, sechs usw. Peptiden bestehen. Nur das Verhältnis muss aus n PGLa und n Mag2 Peptiden bestehen. Man kann hier von einem Hetero- $2n$ -mer sprechen ($n = 1, 2, 3, \dots$).

Bezieht man die Orientierung der beiden Peptide in DMPC/DMPG (3:1) mit ein, so können weitere Rückschlüsse getroffen werden. In einer Veröffentlichung von Tremouilhac *et al.* wurde ein hypothetisches Modell eines Heterodimers veröffentlicht, bei dem PGLa und Mag2 einen transmembrane Orientierung einnehmen.^[59] Dies ist in Abbildung 6.57 gezeigt und nicht richtig. Zu diesem Zeitpunkt war die Orientierung von Mag2 nicht bekannt. Heute wissen wir, dass nur PGLa transmembran orientiert und Mag2 immer an der Oberfläche der Membran orientiert ist.^[26,60]

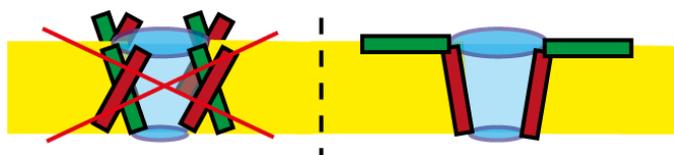


Abbildung 6.57: Hypothetisches Modell^[59] versus aktuelle Information aus ¹⁵N- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie (Mag2 - grün, PGLa - rot-braun).

Im Zuge der Mutationen konnte festgestellt werden, dass unterschiedliche Mutationstypen einen unterschiedlich starken Einfluss haben. Die Sensitivität der drei Untersuchungsmethoden scheint sich hierbei auch zu unterscheiden. Die Sensitivität nimmt

von Fluoreszenzspektroskopie > Mikrobiologie > Festkörper-NMR ab. Um ein verständliches Modell aufstellen zu können werden dennoch die Orientierungsbilder der Festkörper-NMR verwendet um schlussendlich ein Modell aufzustellen. In Schritt **A** wurden verschiedene Ladungswchselwirkungen ins Auge gefasst. Basierend auf dieser Arbeitshypothese wurden verschiedene Mutationen synthetisiert und untersucht. Alle möglichen Ladungswchselwirkungen zwischen PGLa und Mag2 sind in Abbildung 6.58 gezeigt. Die Wechselwirkungen, die keinen Einfluss zu haben scheinen, sind rot durchgestrichen.

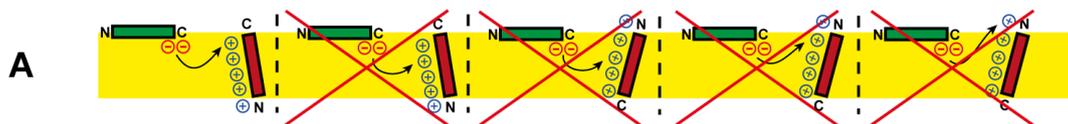


Abbildung 6.58: Verschiedene Ladungswchselwirkungsmöglichkeiten zwischen PGLa und Mag2.

Die Ladungsmutationen scheinen auf die Orientierung, die mittels Festkörper-NMR bestimmt wurde, kaum einen Einfluss zu haben. Mittels Fluoreszenzspektroskopie und zum Teil Mikrobiologie konnten für die Wechselwirkung wichtige Ladungsträger ausgemacht werden. Es können allerdings einige Wechselwirkungen ausgeschlossen werden. In PGLa scheinen Lys-5 und Lys-12 keinen Einfluss zu haben. Lys-15 und Lys-19 jedoch scheinen einen Einfluss auf die Interaktion zu haben. Auf Grund der Möglichkeiten zur intramolekularen Salzbrückenbildung ist es jedoch am Wahrscheinlichsten, dass die Interaktion über Lys-19 stattfindet.

Die Salzbrücken können sowohl zum C-Terminus, als auch zu Glu-19 in Mag2 ausgebildet werden. Glu19 scheint jedoch favorisiert zu sein. Somit bleiben nur zwei Möglichkeiten übrig, die in Abbildung 6.59 gezeigt sind. In einer Querverknüpfungsstudie, in der die Peptide via Disulfidbrücken verknüpft wurden, konnte von Hara *et al.* gezeigt werden, dass die Dimere, die parallel verknüpft wurden (CC, NN), die höchste Aktivität zeigten.^[61] Dies unterstützt die Ladungswchselwirkung zwischen Lys-19 in PGLa und Glu-19 in Mag2 bzw. des C-Terminus. In Schritt **B** wurde MSI-103 untersucht, welches ein in einer Optimierungsstudie von PGLa entstammendes Peptid ist (Abbildung 6.60). Dieses Peptid enthält alle notwendigen Ladungsträger, die PGLa auch enthält plus einige zusätzliche. Trotz dieser Tatsache scheint es nicht dazu in der Lage zu sein mit dem Mag2-Wildtyp synergistisch in Wechselwirkung zu treten. Aus diesem Grund wurden neue Moleküle synthetisiert, die den Unterschied zwischen PGLa und MSI-103 herauskristallisieren sollten. Hierbei wurden zuerst größere Abschnitte in PGLa (rotbraun) durch an dieser Position in MSI-103 (orange) lokalisierte Aminosäuren ersetzt um den Bereich einzugrenzen (**B1**). Nachdem ein Bereich von drei Aminosäuren eingegrenzt werden konnte, der starken Einfluss auf die Interaktion zu haben scheint, wurden die drei Aminosäuren einzeln ausgetauscht. In Schritt **B2** konnte Gly-7 als verantwortliche Aminosäure identifiziert werden. Gly-7 ist Teil eines GxxxG-Motivs, welches als eine Interaktionsfläche für transmembrane Helices bekannt ist. Auf Grund dieser Tatsache, wurde PGLa-G11I (**B3**), welches Teil

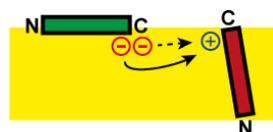


Abbildung 6.59: Mögliche Ladungswchselwirkung zwischen PGLa und Mag2.

einer Aktivitätsstudie von Sarah Flade war, untersucht (Abbildung 6.60). Diese Aminosäure konnte bis dato nicht identifiziert werden, da sie auch in MSI-103 existiert.

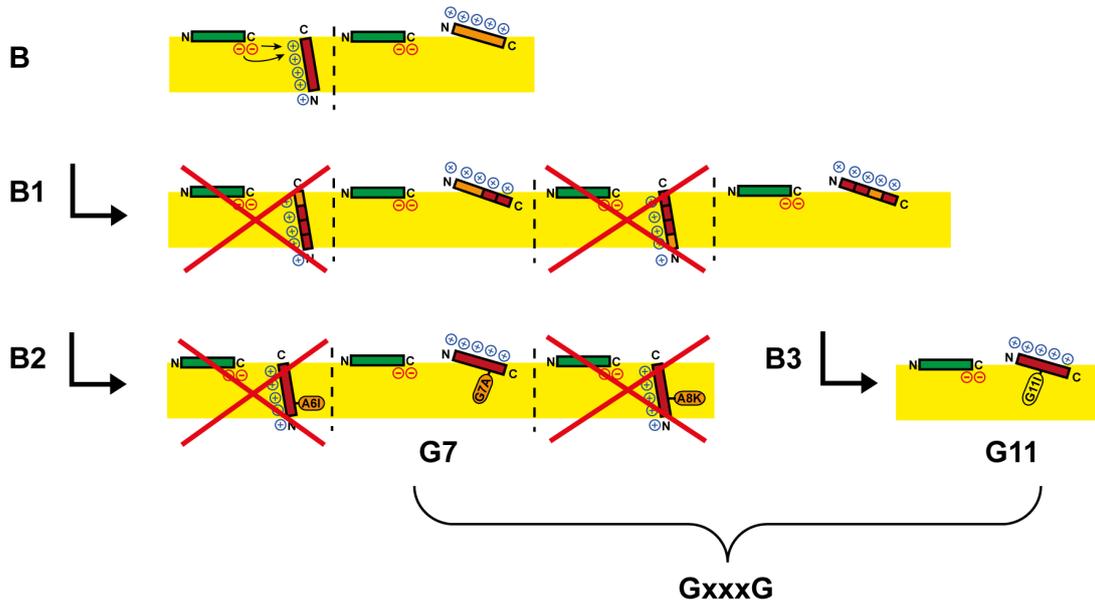


Abbildung 6.60: PGLa versus MSI-103.

Auch diese Aminosäure unterbindet die Interaktion zwischen PGLa und Mag2, was zu dem Schluss führte, dass tatsächlich das GxxxG-Motiv eine tragende Rolle bei der Interaktion dieser zwei Moleküle spielt.

In Schritt C wurde der schlussendlich erfolgreiche Versuch unternommen MSI-103 die Fähigkeit zu geben synergistisch mit Mag2 in Wechselwirkung zu treten (Abbildung 6.61).

Es bedurfte einiger Mutationen bis schlussendlich zwei Aminosäuren identifiziert werden konnten. Zu Beginn wurde vermutet, dass nur Gly-7 ausreicht, doch dies hatte nur begrenzten Erfolg bei den mikrobiologischen Untersuchungen.

Es musste noch Gly-18 gegen Leucin ausgetauscht werden. Diese Aminosäure hat vermutlich Einfluss auf die Lokalisation von Lys-19. In Schritt D wurde untersucht, ob die Lage des GxxxG-Motivs in PGLa eine Rolle auf die Interaktion hat (Abbildung 6.62). Hierbei wurden Gly-7 und Gly-11 im Molekül verschoben. Es gab zwei Mutationen. In der einen Mutation wurde nur Gly-7 verschoben, wodurch ein GxxG-Motiv entstand. In der zweiten Mutation wurden beide Aminosäuren verschoben. Das GxxxG-Motiv war in dieser Mutation auf der gegenüberliegenden Seite der Helix lokalisiert. Beide Peptide waren nicht mehr in der Lage zur Interaktion mit dem

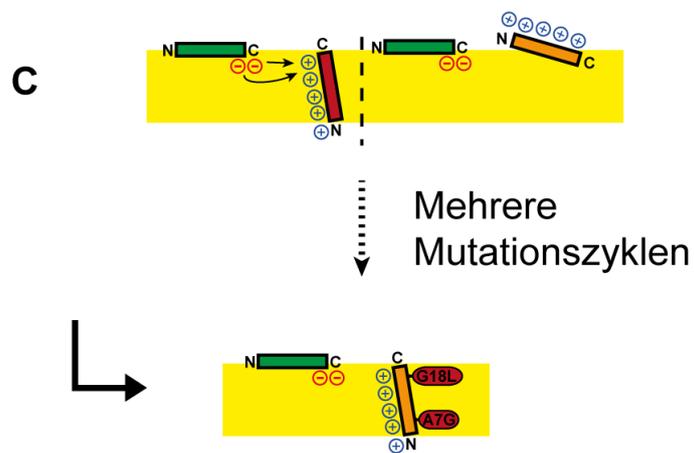


Abbildung 6.61: MSI-103 versus PGLa.

Mag2-Wildtyp. Im Falle der Verschiebung beider Glycine war das Peptid zudem nicht mehr in der Lage dazu, sich in Membranen zu neigen. In vorangegangenen Arbeiten von Glaser *et al.* wurde auf Grund der konzentrationsabhängigen Orientierung von PGLa (Niedrige Konzentration - S-Zustand, hohe Konzentration - T-Zustand) die Hypothese aufgestellt, dass PGLa dimerisiert. Damit eine Dimerisierung graphisch realisiert werden kann, muss eines der Moleküle gespiegelt sein. Dies ist in Abbildung 6.61 gezeigt und soll durch die spiegelverkehrten Buchstaben gezeigt werden.

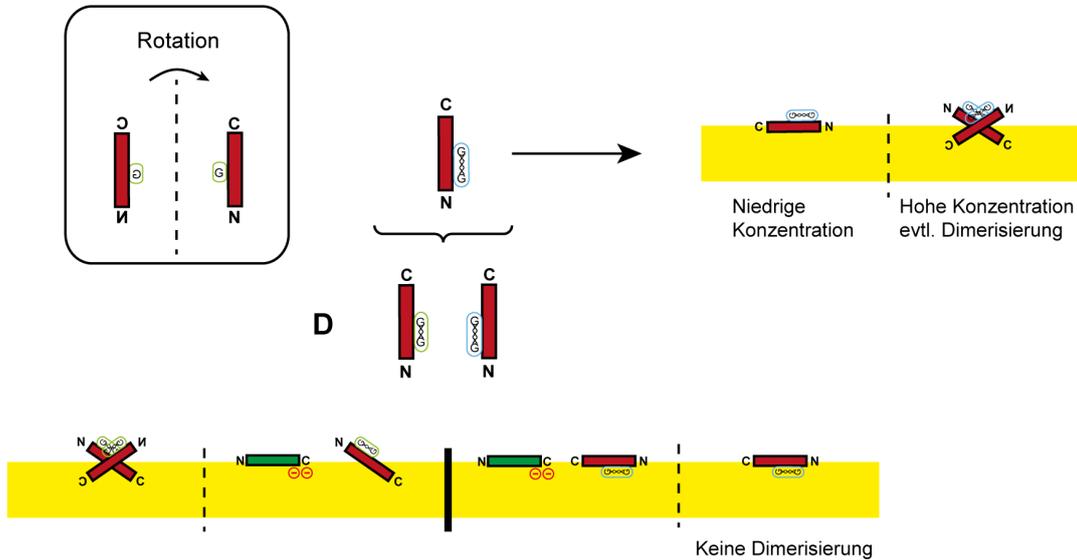


Abbildung 6.62: Auf dem GxxxG-Motiv beruhende Mutationen.

In der Realität ist das natürlich auch notwendig. Die Schlussfolgerung aus allen NMR-Ergebnissen ist, dass PGLa mindestens ein Gly an Position 7 oder 11 braucht um bei einem P/L von 1:50 T-Zustände einzunehmen. Es werden jedoch zwei Glycine benötigt, damit PGLa eine transmembrane Orientierung einnimmt. Da das GxxxG Motiv nur in PGLa vorkommt und zumindest Gly-11 sich bei einer transmembranen Orientierung in der Mitte der Membran befindet, ist dieses Motiv vermutlich keine Interaktionsfläche zwischen PGLa und Mag2, sondern zwischen PGLa und PGLa.

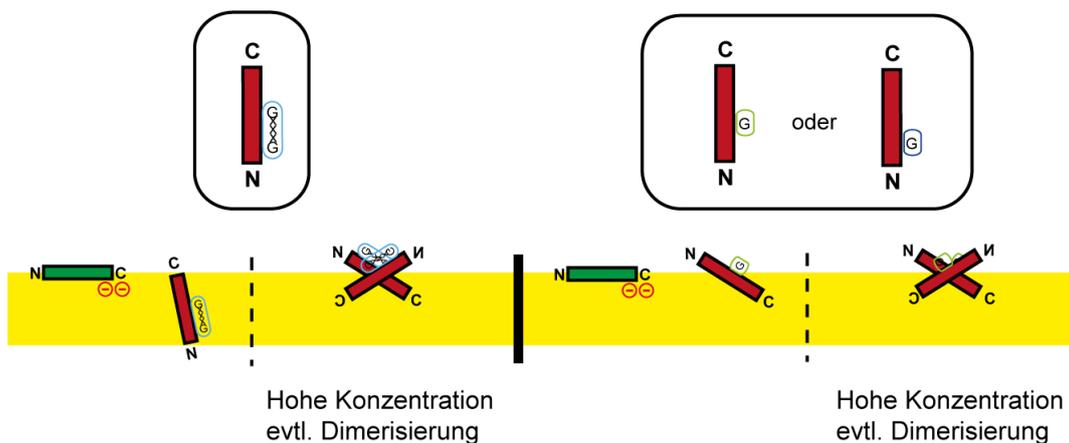


Abbildung 6.63: Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Dimerisierung und die transmembrane Orientierung von PGLa.

Da trotzdem das Stoffmengenverhältnis 1:1 ist, besteht die reaktive Untereinheit ver-

mutlich aus zwei PGLa-Molekülen und zwei Mag2-Molekülen. PGLa kann als paralleles Dimer oder antiparalleles Dimer vorliegen. Das parallele Dimer ist jedoch unwahrscheinlich. Zieht man eine Pore in Betracht, so zeigen bei einem parallelen Dimer bei einem PGLa die positiv geladenen Lysin-Seitenketten in den hydrophoben Teil der Membran. Dies ist sehr unwahrscheinlich (Abbildung 6.64).

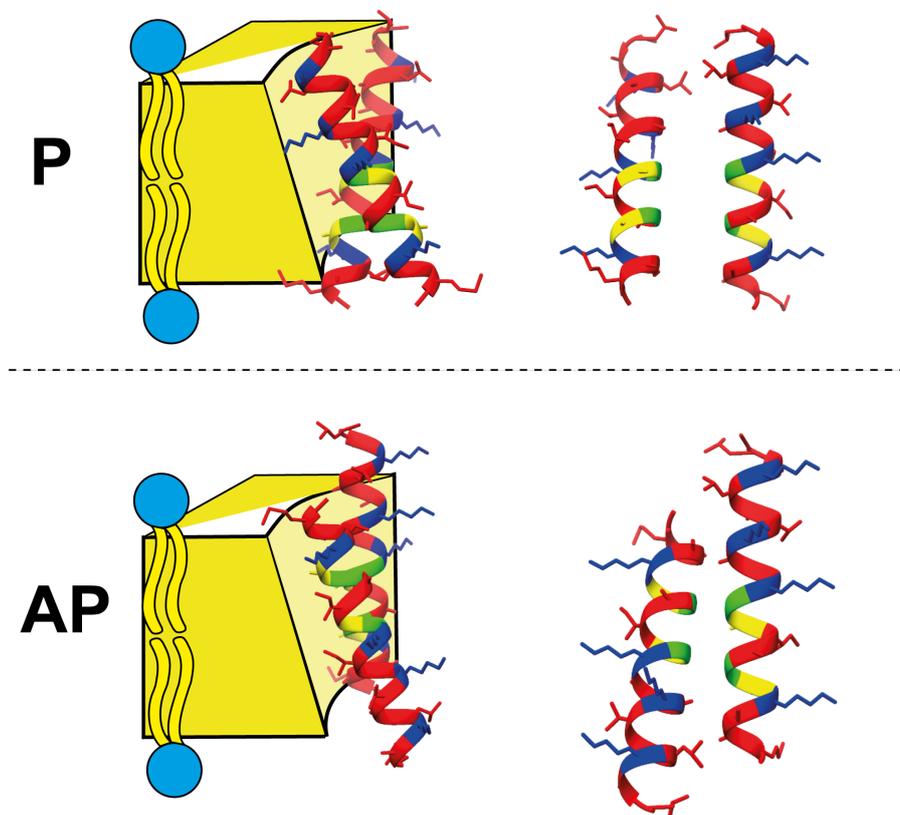


Abbildung 6.64: Paralleles Dimer **P** versus antiparalleles Dimer **AP** (blau - Lys, grün - Gly-7, Gly-11, gelb - Ala-6, Ala-10).

Betrachtet man nun die Situation in der Realität, so ist Mag2 für Symmetriezwecke auf beiden Seiten des PGLa-Dimers benötigt (Hetero-2n-mer). Daher stellt sich bei einem antiparallelen Dimer die Frage, wie Mag2 auf die andere Seite der Membran kommt. Zu Beginn sind beide Peptide auf der einen Seite der cytoplasmatischen Membran. Zieht man das SHM-Modell in Betracht (Abschnitt 1.6) so bildet Mag2 wahrscheinliche, ringförmige, nicht stabile Poren aus und gelangt so auf die andere Seite der Membran.^[31-33] Diese Mag2-Moleküle können nun das PGLa-Dimer mit auf der anderen Seite der Membran befindlichen Mag2-Molekülen stabilisieren (Abbildung 6.65). Für dieses Modell spricht wiederum die Kurvenform der Fluoreszenzmessungen. Hier haben die Mag2- und PGLa/Mag2-Kurven eine ähnliche Form. Die Mag2-Kurven sprechen für eine instabile Pore, da die Steigung stetig abnimmt. Die PGLa-Poren hingegen sind stabil über einen längeren Zeitraum.

In einer Studie von Carlier *et al.* wurden α -helikale AMPs, sog. Plasticine, die das GxxxG-Motiv mehrfach in sich tragen, untersucht.^[108] Hier konnte kein Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und diesem Motiv gefunden werden und die Vermutung aufgestellt, dass die Oligomerisierung in transmembranen Proteinen über dieses

Motiv anders funktioniert.^[108] In der Kombination von PGLa und Mag2 scheint eine einzigartige Situation für die PGLa-Moleküle geschaffen zu sein, die es ihnen erlaubt die Membran zu durchspannen.

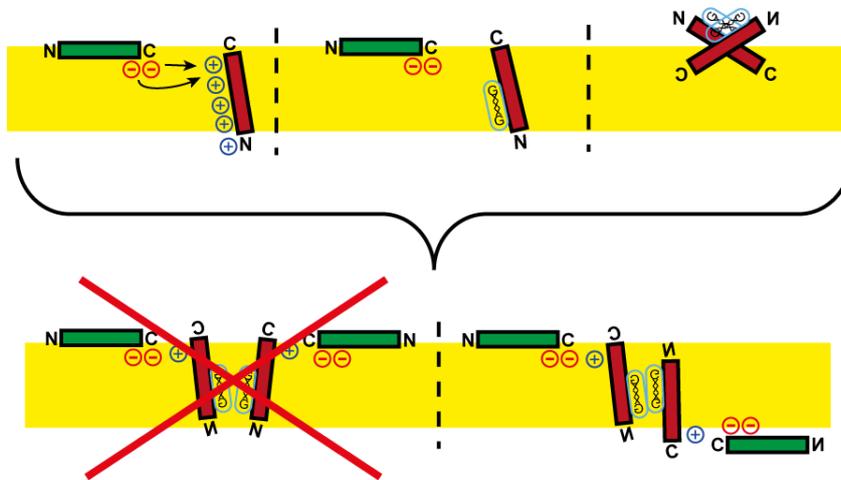


Abbildung 6.65: Paralleles Dimer *versus* antiparalleles Dimer in vereinfachter Ansicht.

Es konnte durch Punktmodifikationen mit NMR-Markierungen ein starker Einfluss der drei Phenylalanine (Phe-Cluster) festgestellt werden. Bezieht man diese Information in das Modell mit ein, so ist es leicht vorstellbar, dass die in die Membran ragenden Phenylalanine (Anker) ein PGLa-Dimer stabilisieren könnten.^[55,109]

In einem Übersichtsartikel von Conlon *et al.* wurden die Magainine (Mag1 & Mag2) und PGLa-Moleküle verschiedener Frösche der Familie *Pipidae* verglichen und Aminosäuren identifiziert, die in allen Organismen in diesen zwei Peptiden vorkommen bzw. fast allen.^[38] Diese Peptide und Organismen sind in Tabelle 6.11 und Tabelle 6.12 gezeigt.

Tabelle 6.11: Aus verschiedenen Vertretern der Familie *Pipidae* isolierte Mag2-Varianten (* bedeutet: Hier ist keine Aminosäure).^[38]

Peptid	Sequenz
<i>X. laevis</i>	G I G K F L H S A K K F G K A F V G E I M N S
<i>S. tropicalis</i> -ST1	GLKEVAHSAKKFAKGFISGLTGS
<i>S. epitropicalis</i> -SE1	GLKEVLHSTKKFAKGFITGLTGQ
<i>X. petersii</i> -P1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
<i>X. borealis</i> -B1	G**KFLHSAGKFGKAFVGEVMIG
<i>X. borealis</i> -B2	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEVMKS
<i>X. muelleri</i> West-MW1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEVMKS
<i>X. laevis</i> × <i>X. muelleri</i> – LM1	GIGKFLHSAKKFAKAFVGEIMNS
<i>X. pygmaeus</i> -PG1	GVGKFLHAAGKFGKALMGEMMKS
<i>X. lenduensis</i> -L1	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEVMKS
<i>X. lenduensis</i> -L2	GISQFLHSAKKFGKAFAGEIMKS
<i>X. amieta</i> -AM1	GIKEFAHSLGKFGKAFVGGILNQ
<i>X. amieta</i> -AM2	GVSKILHSAGKFGKAFVGEIMKS
<i>X. andrei</i> -AN1	GIKEFAHSLGKFGKAFVGGILNQ
<i>X. andrei</i> -AN2	GVSKILHSAGKFGKAFVGEIMKS

Die Aminosäuren, die sehr häufig vorkommen sind blau und diejenigen, welche überall vorkommen, rot markiert. In *X. laevis* wurde nur Mag2 gezeigt. Es wurden die

Organismen ausgewählt, in denen beide Peptide vorkommen. Von den in dieser Arbeit in Mag2 identifizierten Aminosäuren ist Glu-19 eine der Aminosäuren die in fast allen Organismen vorkommt. Zudem werden die Phenylalanine in Form von Phe-5 und Phe-12 auch in fast allen Fröschen bewahrt. In den PGLa-Vertretern ist das GxxxG-Motiv in **allen** Vertretern vorhanden. Hieraus folgt, dass die identifizierten Aminosäuren in allen Organismen eine Rolle spielen und für die Funktion relevant sind.

Tabelle 6.12: Aus verschiedenen Vertretern der Familie *Pipidae* isolierte PGLa-Varianten (* bedeutet: Hier ist keine Aminosäure).^[38]

Peptid	Sequenz
<i>X. laevis</i>	GMASKAGAIAGKIAKVALK*AL-NH ₂
<i>S. tropicalis</i> -ST1	GMATKAGTALGKVAKAVIGAAL-NH ₂
<i>S. epitropicalis</i> -SE1	GMATKAGTALGKVAKAVIGAAL-NH ₂
<i>X. petersii</i> -P1	GMASTAGSIAGKIAKVALK*AL-NH ₂
<i>X. borealis</i> -B1	GMASKAGTIAGKIAKTAIKLAL-NH ₂
<i>X. borealis</i> -B2	GMASKAGSIVGKIAKIAL*GAL-NH ₂
<i>X. muelleri</i> West-MW1	GMASKAGSVLGKITKIAL*GAL-NH ₂
<i>X. laevis</i> × <i>X. muelleri</i> – LM1	GMASKAGSVAGKIAKFAL*GAL-NH ₂
<i>X. pygmaeus</i> -PG1	GMASKAGTIVGKIAKVAL*NAL-NH ₂
<i>X. lenduensis</i> -L1	GMASTAGSIFGKLAKTAL*GAL-NH ₂
<i>X. lenduensis</i> -L2	GMASTAGSVLGKLAQVAIKAAL-NH ₂
<i>X. amieti</i> -AM1	GMASKAGSVLGKVAKVALKAAL-NH ₂
<i>X. amieti</i> -AM2	GMASTAGSVLGKLAQVAIGAL-NH ₂
<i>X. andrei</i> -AN1	GMASKAGSVLGKVAKVALKAAL-NH ₂
<i>X. andrei</i> -AN2	GMASKAGSVLGKLAQVAI*GAL-NH ₂

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peptide der Mag2-Familie ein lipidabhängiges Orientierungsverhalten zeigen. Die Peptide sind in Lipiden mit positiver spontaner Krümmung in der Lage sich in die Membran zu neigen. PGLa ist in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 sogar in der Lage transmembrane Orientierungen einzunehmen. In Lipidsystemen mit negativer spontaner Krümmung hingegen verbleiben beide Peptide an der Oberfläche. Schließt man MSI-103 ein, so sind dies drei AMPs die sich gleich verhalten. Aus diesem Grund könnte dies ein generelles Orientierungsverhalten von AMPs sein. Es konnte für Festkörper-NMR-Experimente und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass ein 1:1-Verhältnis von PGLa zu Mag2 die stärkste Synergie zeigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die zwei Peptide in Lösung nicht in Wechselwirkung treten. Dies lässt darauf schließen, dass die Wechselwirkung zwischen PGLa und Mag2 erst auf der cytoplasmatischen Membran stattfindet. Durch konzentrationsabhängige Untersuchungen mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die PGLa/Mag2-Komplexbildung konzentrationsabhängig ist und das Gleichgewicht zwischen Komplex und Monomeren erst bei hohen Konzentrationen vollständig auf der Seite des Komplexes liegt. In konzentrationsabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Moleküle (MSI-103, Mag2, PGLa, PGLa/Mag2) kooperatives Verhalten zeigen. Die Stärke der Kooperativität lässt sich wie folgt gliedern: Mag2, MSI-103 < PGLa < PGLa/Mag2 (Trotz hoher struktureller Ähnlichkeit ist MSI-103 weniger kooperativ als PGLa). Die hohe Kooperativität in der Mischung ist nicht verwunderlich, da die zwei Peptide synergistisch miteinander interagieren. Um an der Interaktion beteiligte Aminosäuren zu identifizieren, wurden basierend auf verschiedenen Interaktionskonzepten, Mutationen in den zwei Molekülen eingeführt. Es konnten unterschiedlich starke Wechselwirkungen ausgemacht werden. Zum einen scheint es eine schwache Ladungswchselwirkung zu geben. Diese findet vermutlich zwischen Glu-19 oder dem C-Terminus von Mag2 und Lys-19 von PGLa statt. Einen starken Einfluss auf die Interaktion hat das in der Mitte von PGLa lokalisierte GxxxG-Motiv (Gly-7, Gly-11). Dieses ist oftmals in transmembranen Segmenten von großen Proteinen anzutreffen. Auf Grund der Lokalisation des Motivs wurde ein neues Interaktionskonzept entworfen. Dieses hat vier Moleküle als Grundeinheit bestehend aus zwei PGLa- und zwei Mag2-Molekülen. Hierbei bilden zwei PGLa-Moleküle ein antiparalleles Dimer, welches an beiden Enden durch ein Mag2-Molekül stabilisiert wird.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Himmelfarb, P. Stenvinkel, T. A. Ikizler, R. M. Hakim, The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia, *Kidney Int.* **2002**, *62*(5), 1524–1538.
- [2] A. Fleming, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929, *Bull. World Health Organ.* **2001**, *79*(8), 780–790.
- [3] R. J. Dubos, Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice, *J. Exp. Med.* **1939**, *70*(1), 11–17.
- [4] R. J. Dubos, Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*, *J. Exp. Med.* **1939**, *70*(1), 1–10.
- [5] H. L. Van Epps, René Dubos: unearthing antibiotics, *J. Exp. Med.* **2006**, *203*(2), 259.
- [6] D. A. Phoenix, S. R. Dennison, F. Harris, *Antimicrobial peptides*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [7] K. A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*(3), 238–250.
- [8] K. A. Brogden, A. J. De Lucca, J. Bland, S. Elliott, Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*(1), 412–416.
- [9] M. Zasloff, Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*(15), 5449–5453.
- [10] G. F. Gause, M. G. Brazhnikova, Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds, *Nature* **1944**, *154*, 703.
- [11] M. E. Selsted, M. J. Novotny, W. L. Morris, Y. Q. Tang, W. Smith, J. S. Cullor, Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*(7), 4292–4295.
- [12] M. Scocchi, A. Tossi, R. Gennaro, Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*(13), 2317–2330.
- [13] V. N. Kokryakov, S. S. Harwig, E. A. Panyutich, A. A. Shevchenko, G. M. Aleshina, O. V. Shamova, H. A. Korneva, R. I. Lehrer, Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins, *FEBS Lett.* **1993**, *327*(2), 231–236.

-
- [14] H. Kuwata, T. T. Yip, C. L. Yip, M. Tomita, T. W. Hutchens, Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation, and characterization of lactoferricin in serum by SELDI affinity mass spectrometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*(3), 764–773.
- [15] S. Reißer, E. Strandberg, T. Steinbrecher, A. S. Ulrich, 3D hydrophobic moment vectors as a tool to characterize the surface polarity of amphiphilic peptides, *Biophys. J.* **2014**, *106*(11), 2385–2394.
- [16] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 4. Aufl., Spektrum, Heidelberg, **1999**.
- [17] S. J. Singer, G. L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* **1972**, *175*(23), 720–731.
- [18] D. E. Vance *et al.*, *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 5. Aufl., (Hrsg.: D. E. Vance), Elsevier, Amsterdam, **2008**.
- [19] A. Giacometti, O. Cirioni, W. Kamysz, G. D’Amato, C. Silvestri, A. Licci, P. Naldowski, A. Riva, J. Lukasiak, G. Scalise, In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26*(3), 235–240.
- [20] Y. Jiang, X. Yi, M. Li, T. Wang, T. Qi, X. She, Antimicrobial activities of recombinant mouse β -defensin 3 and its synergy with antibiotics, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*(7), 1723–1728.
- [21] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the cell*, 5. Aufl., (Hrsg.: B. Alberts), Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [22] R. M. Epand, R. F. Epand, Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*(5), 298–305.
- [23] B. de Kruijff, Lipid polymorphism and biomembrane function, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*(4), 564–569.
- [24] R. M. Epand, Lipid polymorphism and protein-lipid interactions, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*(3), 353–368.
- [25] E. Strandberg, D. Tiltak, S. Ehni, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Lipid shape is a key factor for membrane interactions of amphipathic helical peptides, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*(7), 1764–1776.
- [26] E. Strandberg, J. Zerweck, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Synergistic insertion of antimicrobial magainin-family peptides in membranes depends on the lipid spontaneous curvature, *Biophys. J.* **2013**, *104*(6), L9–11.
- [27] B. Kollmitzer, P. Heftberger, M. Rappolt, G. Pabst, Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids, *Soft Matter* **2013**, *9*(45), 10877–10884.
- [28] G. Ehrenstein, H. Lecar, Electrically gated ionic channels in lipid bilayers, *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*(1), 1–34.
- [29] K. He, S. J. Ludtke, W. T. Heller, H. W. Huang, Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers, *Biophys. J.* **1996**, *71*(5), 2669–2679.
-

-
- [30] D. Maisch, P. Wadhvani, S. Afonin, C. Böttcher, B. Koks, A. S. Ulrich, Chemical labeling strategy with (*R*)- and (*S*)-trifluoromethylalanine for solid state ^{19}F NMR analysis of peptaibols in membranes, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(43), 15596–15597.
- [31] L. Yang, T. M. Weiss, R. I. Lehrer, H. W. Huang, Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin, *Biophys. J.* **2000**, *79*(4), 2002–2009.
- [32] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, H. W. Huang, Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys. J.* **2001**, *81*(3), 1475–1485.
- [33] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, An antimicrobial peptide, Magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation, *Biochemistry* **1996**, *35*(35), 11361–11368.
- [34] Y. Shai, Z. Oren, From carpet mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides, *Peptides* **2001**, *22*(10), 1629–1641.
- [35] Y. Shai, Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*(1-2), 55–70.
- [36] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, Y. Shai, Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes, *Biochemistry* **1992**, *31*(49), 12416–12423.
- [37] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* **2002**, *415*(6870), 389–395.
- [38] J. M. Conlon, M. Mechkarska, Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family *Pipidae*, *Pharmaceuticals (Basel)* **2014**, *7*(1), 58–77.
- [39] D. S. Reilly, N. Tomassini, M. Zasloff, Expression of magainin antimicrobial peptide genes in the developing granular glands of *Xenopus* skin and induction by thyroid hormone, *Dev. Biol.* **1994**, *162*(1), 123–133.
- [40] W. Hoffmann, K. Richter, G. Kreil, A novel peptide designated PYLa and its precursor as predicted from cloned mRNA of *Xenopus laevis* skin, *EMBO J.* **1983**, *2*(5), 711–714.
- [41] D. Andreu, H. Aschauer, G. Kreil, R. B. Merrifield, Solid-phase synthesis of PYLa and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4-24)] from skin secretion of *Xenopus laevis*, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*(3), 531–535.
- [42] W. L. Maloy, U. P. Kari, Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides, *Biopolymers* **1995**, *37*(2), 105–122.
- [43] K. Lohner, F. Prossnigg, Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 1656–1666.
- [44] R. W. Glaser, C. Sachse, U. H. N. Dürr, P. Wadhvani, S. Afonin, E. Strandberg, A. S. Ulrich, Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide
-

- PGLa in lipid membranes observed by solid-state ^{19}F -NMR, *Biophys. J.* **2005**, *88*(5), 3392–3397.
- [45] S. Afonin, S. L. Grage, M. Ieronimo, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Temperature-dependent transmembrane insertion of the amphiphilic peptide PGLa in lipid bilayers observed by solid state ^{19}F NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(49), 16512–16514.
- [46] E. Strandberg, N. Kanithasen, D. Tiltak, J. Bürck, P. Wadhvani, O. Zwer-nemann, A. S. Ulrich, Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its parent peptide PGLa in lipid bilayers, *Biochemistry* **2008**, *47*(8), 2601–2616.
- [47] J. Gesell, M. Zasloff, S. J. Opella, Two-dimensional ^1H NMR experiments show that the 23-residue Magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*(2), 127–135.
- [48] B. Bechinger, M. Zasloff, S. J. Opella, Structure and interactions of magainin antibiotic peptides in lipid bilayers: a solid-state nuclear magnetic resonance investigation, *Biophys. J.* **1992**, *62*(1), 12–14.
- [49] J. Zerweck, Untersuchung der synergistischen Reorientierung der antimikrobiellen Peptide Magainin 2 und PGLa in Lipidmembranen mittels ^{15}N - und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie, Diplomarbeit, KIT, **2011**.
- [50] S. Ludtke, K. He, H. Huang, Membrane thinning caused by Magainin 2, *Biochemistry* **1995**, *34*(51), 16764–16769.
- [51] S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, H. W. Huang, Membrane pores induced by Magainin, *Biochemistry* **1996**, *35*(43), 13723–13728.
- [52] M. Zasloff, B. Martin, H. C. Chen, Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*(3), 910–913.
- [53] J. H. Cuervo, B. Rodriguez, R. A. Houghten, The Magainins: sequence factors relevant to increased antimicrobial activity and decreased hemolytic activity, *Pept. Res.* **1988**, *1*(2), 81–86.
- [54] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett.* **2001**, *501*(2-3), 146–150.
- [55] E. Strandberg, J. Zerweck, D. Horn, G. Pritz, M. Berditsch, J. Bürck, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Influence of hydrophobic residues on the activity of the antimicrobial peptide Magainin 2 and its synergy with PGLa, *J. Pept. Sci.* **2014**, übermittelt.
- [56] H. V. Westerhoff, M. Zasloff, J. L. Rosner, R. W. Hendler, A. De Waal, A. Vaz Gomes, P. M. Jongsma, A. Riethorst, D. Juretic, Functional synergism of the magainins PGLa and Magainin 2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*(2), 257–264.
- [57] A. Vaz Gomes, A. de Waal, J. A. Berden, H. V. Westerhoff, Electric potentiation,

- cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes, *Biochemistry* **1993**, *32*(20), 5365–5372.
- [58] K. Matsuzaki, Y. Mitani, K. Y. Akada, O. Murase, S. Yoneyama, M. Zasloff, K. Miyajima, Mechanism of synergism between antimicrobial peptides Magainin 2 and PGLa, *Biochemistry* **1998**, *37*(43), 15144–15153.
- [59] P. Tremouilhac, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Synergistic trans-membrane alignment of the antimicrobial heterodimer PGLa/Magainin, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*(43), 32089–32094.
- [60] E. S. Salnikov, B. Bechinger, Lipid-controlled peptide topology and interactions in bilayers: structural insights into the synergistic enhancement of the antimicrobial activities of PGLa and Magainin 2, *Biophys. J.* **2011**, *100*(6), 1473–1480.
- [61] T. Hara, Y. Mitani, K. Tanaka, N. Uematsu, A. Takakura, T. Tachi, H. Kodama, M. Kondo, H. Mori, A. Otaka, F. Nobutaka, K. Matsuzaki, Heterodimer formation between the antimicrobial peptides Magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study, *Biochemistry* **2001**, *40*(41), 12395–12399.
- [62] O. Kukhareno, Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des synergistischen Verhaltens von Peptiden der Magainin-Familie im *E. coli* Lipidsystem, Vertieferbericht, KIT, **2014**.
- [63] C. P. R. Hackenberger, The reduction of oxidized methionine residues in peptide thioesters with $\text{NH}_4\text{I} - \text{Me}_2\text{S}$, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2291–2295.
- [64] R. B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*(14), 2149–2154.
- [65] H. Rink, Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787–3790.
- [66] S. Wang, *p*-Alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328–1333.
- [67] L. Whitmore, B. A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* **2007**, *89*(5), 392–400.
- [68] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, 2. Aufl., Vieweg+Teubner, Wiesbaden, **2011**.
- [69] U. Harten, *Physik: Einführung für Ingenieure und Naturwissenschaftler*, 4. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, **2009**.
- [70] A. J. Miles, B. A. Wallace, Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 39–51.
- [71] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- [72] B. A. Wallace, Protein characterisation by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy, *Q. Rev. Biophys.* **2009**, *42*(4), 317–370.

-
- [73] Avanti Polar Lipids, URL: <http://www.avantilipids.com> [Stand: 4.11.14].
- [74] E. Strandberg, A. S. Ulrich, NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concepts Magn. Reson. A* **2004**, *23A*, 89–120.
- [75] M. Rance, R. A. Byrd, Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: phase-cycled Hahn echo spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 221–240.
- [76] J. K. Denny, J. Wang, T. A. Cross, J. R. Quine, PISEMA powder patterns and PISA wheels, *J. Magn. Reson.* **2001**, *152*(2), 217–226.
- [77] M. H. Levitt, D. Suter, R. R. Ernst, Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization, *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4243–4255.
- [78] P. K. Mikhailiuk, S. Afonin, A. N. Chernega, E. B. Rusanov, M. O. Platonov, G. G. Dubinina, M. Berditsch, A. S. Ulrich, I. V. Komarov, Conformationally rigid trifluoromethyl-substituted α -amino acid designed for peptide structure analysis by solid-state ^{19}F NMR spectroscopy., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*(34), 5659–5661.
- [79] A. S. Ulrich, Solid state ^{19}F -NMR methods for studying biomembranes, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 1–21.
- [80] R. W. Glaser, C. Sachse, U. H. N. Dürr, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Orientation of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes determined from ^{19}F -NMR dipolar couplings of 4- CF_3 -phenylglycine labels, *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 153–163.
- [81] L. Greenspan, Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **1976**, *81A*, 89–96.
- [82] K. J. Hallock, K. Henzler Wildman, D.-K. Lee, A. Ramamoorthy, An innovative procedure using a sublimable solid to align lipid bilayers for solid-state NMR studies, *Biophys. J.* **2002**, *82*(5), 2499–2503.
- [83] S. Zhang, X. Wu, M. Mehring, Elimination of ringing effects in multiple-pulse sequences, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *173*, 481–484.
- [84] G. Metz, X. Wu, S. O. Smith, Ramped-amplitude cross polarisation in magic-angle-spinning NMR, *J. Magn. Reson. Series A* **1994**, *110*, 219–227.
- [85] P. C. A. van der Wel, E. Strandberg, J. A. Killian, R. E. Koeppe, 2nd, Geometry and intrinsic tilt of a tryptophan-anchored transmembrane α -helix determined by ^2H -NMR, *Biophys. J.* **2002**, *83*(3), 1479–1488.
- [86] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4. Aufl., Wiley VCH, Weinheim, **2006**.
- [87] A. S. Ladokhin, W. C. Wimley, S. H. White, Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence reuquenching, *Biophys. J.* **1995**, *69*(5), 1964–1971.
- [88] H. Ellens, J. Bentz, F. C. Szoka, pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact, *Biochemistry* **1984**, *23*(7), 1532–1538.
-

-
- [89] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4. Aufl., Wiley-Blackwell, Hoboken, **2012**.
- [90] S. Ruden, K. Hilpert, M. Berditsch, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*(8), 3538–3540.
- [91] D. Marsh, Energetics of hydrophobic matching in lipid-protein interactions, *Biophys. J.* **2008**, *94*(10), 3996–4013.
- [92] J. Roll, Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Interaktion von antimikrobiellen und zellpenetrierenden Peptiden mit Biomembranen, Doktorarbeit, KIT, **2011**.
- [93] P. Job, Formation and stability of inorganic complexes in solution, *Annali di Chimica Applicata* **1928**, *9*, 113–203.
- [94] C. Y. Huang, Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the Job plot, *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 509–525.
- [95] T. Steinbrecher, S. Prock, J. Reichert, P. Wadhvani, B. Zimpfer, J. Bürck, M. Berditsch, M. Elstner, A. S. Ulrich, Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence, *Biophys. J.* **2012**, *103*(7), 1460–1469.
- [96] P. Tremouilhac, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state ^2H -NMR., *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*(9), 1330–1342.
- [97] G. Pritz, Untersuchung der synergistischen Aktivität der antimikrobiellen Peptide PGLa und Magainin 2 mittels ^{15}N - und ^{19}F -Festphasen-NMR-Spektroskopie, Diplomarbeit, KIT, **2010**.
- [98] J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter, *Anorganische Chemie: Prinzipien von Struktur und Reaktivität*, 3. Aufl., (Hrsg.: R. B. Steudel), de Gruyter, Berlin [u.a.], **2003**.
- [99] J. Sühnel, Evaluation of synergism or antagonism for the combined action of antiviral agents, *Antiviral Res.* **1990**, *13*(1), 23–39.
- [100] K. H. Rand, H. J. Houck, P. Brown, D. Bennett, Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*(3), 613–615.
- [101] W. C. Wimley, K. Hristova, Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions, *J. Membr. Biol.* **2011**, *239*(1-2), 27–34.
- [102] A. Senes, D. E. Engel, W. F. DeGrado, Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*(4), 465–479.
- [103] W. P. Russ, D. M. Engelman, The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association, *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*(3), 911–919.
- [104] S. Flade, Struktur-Aktivitäts-Beziehung der antimikrobiellen Peptide PGLa und Magainin 2, Masterarbeit, KIT, **2013**.
-

- [105] M. A. Lemmon, H. R. Treutlein, P. D. Adams, A. T. Brünger, D. M. Engelman, A dimerization motif for transmembrane α -helices, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1* (3), 157–163.
- [106] K. R. MacKenzie, J. H. Prestegard, D. M. Engelman, A transmembrane helix dimer: structure and implications, *Science* **1997**, *276*(5309), 131–133.
- [107] E. Yeagers, L. Augenstein, UV spectral properties of phenylalanine powder, *Biophys. J.* **1965**, *5*(5), 687–696.
- [108] L. Carlier, P. Joanne, L. Khemtémourian, C. Lacombe, P. Nicolas, C. El Amri, O. Lequin, Investigating the role of GxxxG motifs in helical folding and self-association of plasticins, Gly/Leu-rich antimicrobial peptides, *Biophys. Chem.* **2014**, *196C*, 40–52.
- [109] J. Wang, G. Vernier, A. Fischer, R. J. Collier, Functions of phenylalanine residues within the β -barrel stem of the anthrax toxin pore, *PLoS One* **2009**, *4* (7), e6280.
- [110] G. B. Elion, S. Singer, G. H. Hitchings, Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites, *J. Biol. Chem.* **1954**, *208*(2), 477–488.

(7.1)

A. Anhang Material und Methoden

Tabelle A.1: Molare Massen, Rohprodukt, gereinigtes Produkt und Ausbeute der in dieser Arbeit synthetisierten Peptide.

Peptid	M [g/mol]	Roh [mg]	Rein [mg]	Ausbeute [%]
Mag2-amid	2465	240	27,7	11,5
Mag2-E19Q	2465	571/160 ^a	21,2	13,3
Mag2-E19K	2466	150	12,9	8,6
Mag2-E19K-amid	2465	734/300 ^a	25,9	8,6
PGLa-K5E	1969	160	66,9	41,8
PGLa-K12E	1969	168,2	72	42,8
PGLa-K15E	1969	167,3	67,3	40,2
PGLa-K19E	1969	172	67,8	39,4
PGLa-K19E- ¹⁵ N-A10	1970	163,3	49,3	30,2
PGLa- ¹⁵ N-A10	1970	161	68,9	42,8
MSI-103- ¹⁵ N-A10	2063	195,9	57,9	29,6
PtM-C1	1926	143	73	51,0
PtM-C1- ¹⁵ N-A10	1927	164	46,8	28,5
PtM-A1	2105	192	93,5	48,7
PtM-A1- ¹⁵ N-A10	2106	92	49	53,3
PtM-A2	1991	182	80,4	44,2
PtM-A2- ¹⁵ N-A10	1992	152	38	25,0
PtM-A3- ¹⁵ N-A10	2082	172	41,5	24,1
PtM-A6I- ¹⁵ N-A10	2011	187	55	29,4
PtM-G7A- ¹⁵ N-A10	1983	128	41,1	32,1
PtM-A8K- ¹⁵ N-A10	2026	200	86,6	43,3
MtP-I6A- ¹⁵ N-A10	2021	189	55,8	29,5
MtP-A7G- ¹⁵ N-A10	2049	191	50,2	26,3
MtP-K8A- ¹⁵ N-A10	2006	194	35,3	18,2
MtP-G4S-A7G- ¹⁵ N-A10	2079	187	75,5	40,4
MtP-I6A-A7G- ¹⁵ N-A10	2007	180	76,8	42,7
MtP-K8A-A7G- ¹⁵ N-A10	1992	166	82	49,4
MtP-A3- ¹⁵ N-A10	1950	171	60	35,1
MtP-A4- ¹⁵ N-A10	2006	169	74,7	44,2
MtP-A7G-G18L- ¹⁵ N-A10	2105	165	82	49,7
PGLa-G11I- ¹⁵ N-A10	2025	200	78	39,0
PGLa-GS1- ¹⁵ N-A10	1970	176	73	41,5
PGLa-GS2- ¹⁵ N-A10	1970	180	62,2	34,6
MtM-C1	2425	235	66	28,1
MtM-C2	2425	230	44	19,1
MtM-C3	2527	240	72,5	30,2
MtM-C4	2372	236	45	19,1
MtM-GIG	1920	170	92,3	54,3

^aHier wurde nur ein Teil gereinigt.

Tabelle A.2: Im Zuge der Doktorarbeit verwendete Reinigungsgradienten.

Peptid	Reinigungsgradient
Mag2-amid	SP_7,5-20%B_26min_10mL/min, 35 °C
Mag2-E19Q	SP_7,5-20%B_24min_10mL/min, 35 °C
Mag2-E19K	SP_10-25%B_20min_10mL/min, 35 °C
Mag2-E19K-amid	SP_10-25%B_20min_7mL/min, 35 °C
PGLa-K5E	P_20-60%B_20min_16mL/min, 35 °C
PGLa-K12E	P_25-50%B_20min_12mL/min, 35 °C
PGLa-K15E	P_30-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
PGLa-K19E	P_20-55%B_20min_10mL/min, 35 °C
PGLa-K19E- ¹⁵ N-A10	P_20-55%B_20min_10mL/min, 35 °C
PGLa- ¹⁵ N-A10	P_22,5-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
MSI-103- ¹⁵ N-A10	P_20-45%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-C1	P_15-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-C1- ¹⁵ N-A10	P_25-55%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-A1	P_20-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-A1- ¹⁵ N-A10	P_25-36%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-A2	P_5-40%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-A2- ¹⁵ N-A10	P_15-40%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-A3- ¹⁵ N-A10	P_20-60%B_20min_10mL/min, 35 °C
PtM-A6I- ¹⁵ N-A10	P_30-40%B_20min_14mL/min, 35 °C
PtM-G7A- ¹⁵ N-A10	P_20-40%B_20min_15mL/min, 35 °C
PtM-A8K- ¹⁵ N-A10	P_15-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-I6A- ¹⁵ N-A10	P_10-35%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-A7G- ¹⁵ N-A10	P_15-40%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-K8A- ¹⁵ N-A10	P_20-35%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-G4S-A7G- ¹⁵ N-A10	P_10-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-I6A-A7G- ¹⁵ N-A10	P_10-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-K8A-A7G- ¹⁵ N-A10	P_10-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-A3- ¹⁵ N-A10	P_15-35%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-A4- ¹⁵ N-A10	P_15-35%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtP-A7G-G18L- ¹⁵ N-A10	P_10-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
PGLa-G11I- ¹⁵ N-A10	P_25-50%B_20min_10mL/min, 35 °C
PGLa-GS1- ¹⁵ N-A10	P_25-40%B_20min_10mL/min, 35 °C
PGLa-GS2- ¹⁵ N-A10	P_25-40%B_20min_10mL/min, 35 °C
MtM-C1	P_10-50%B_20min_15mL/min, 35 °C
MtM-C2	P_20-50%B_20min_15mL/min, 35 °C
MtM-C3	P_10-50%B_20min_15mL/min, 35 °C
MtM-C4	P_0-20%B_20min_9mL/min, 35 °C
MtM-GIG	P_10-50%B_20min_10mL/min, 35 °C

Tabelle A.3: Im Zuge der Doktorarbeit eingesetzte Chemikalien

Material	Firma
Ac ₂ O	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Acetonitril	<i>Fischer Chemicals</i> , Loughborough, UK
Aceton	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Acetylchlorid	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
ANTS	<i>Invitrogen</i> , Eugene, USA
CHCl ₃ : spectroscopy grade	<i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland
DMF	<i>Biosolve</i> Valkenswaard, Niederlande
DCM	<i>Biosolve</i> , Valkenswaard, Niederlande
DIPEA	<i>Iris Biotech GmbH</i> , Marktredwitz, Deutschland
DMSO	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
DPX	<i>Invitrogen</i> , Eugene, USA
Et ₂ O	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Ethandithiol	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Ethanol	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Fmoc geschützte Aminosäuren	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland, <i>Iris Biotech GmbH</i> , Marktredwitz, Deutschland
HATU	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
HBTU	<i>Biosolve</i> , Valkenswaard, Niederlande
HCl 1M	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, Deutschland
HEPES	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
HOBt	<i>Biosolve</i> , Valkenswaard, Niederlande
K ₂ SO ₄	<i>VWR International</i> , West Chester, USA
LB-Agar	<i>Carl Roth GmbH</i> , Karlsruhe, Deutschland
Lipide	<i>Avanti Polar Lipids</i> , Alabama, USA
Me ₂ S	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
MeOH	<i>Fischer Chemicals</i> , Loughborough, UK
MeOH: spectroscopy grade	<i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland
Müller Hinton-Medium	<i>Mast Group Ltd.</i> , Merseyside, UK, <i>Beckton, Dickinson and Company</i> , Sparks, USA
NH ₄ I	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
NMP	<i>Biosolve</i> , Valkenswaard, Niederlande
Phenol	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
PyBOP	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Piperidin	<i>Biosolve</i> , Valkenswaard, Niederlande
Resazurin	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
Sulfurylchlorid	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
TFA	<i>Biosolve</i> Valkenswaard, Niederlande
Thioanisol	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
Triisopropylsilan	<i>Merck Schuchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland
Tris-Puffer	<i>VWR</i> , Leuven, Belgien
TritonX-100	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim, Deutschland
Wasser (Milli-Q)	<i>Millipore</i> , Billerica, USA

B. Anhang Lipidabhängige Orientierung

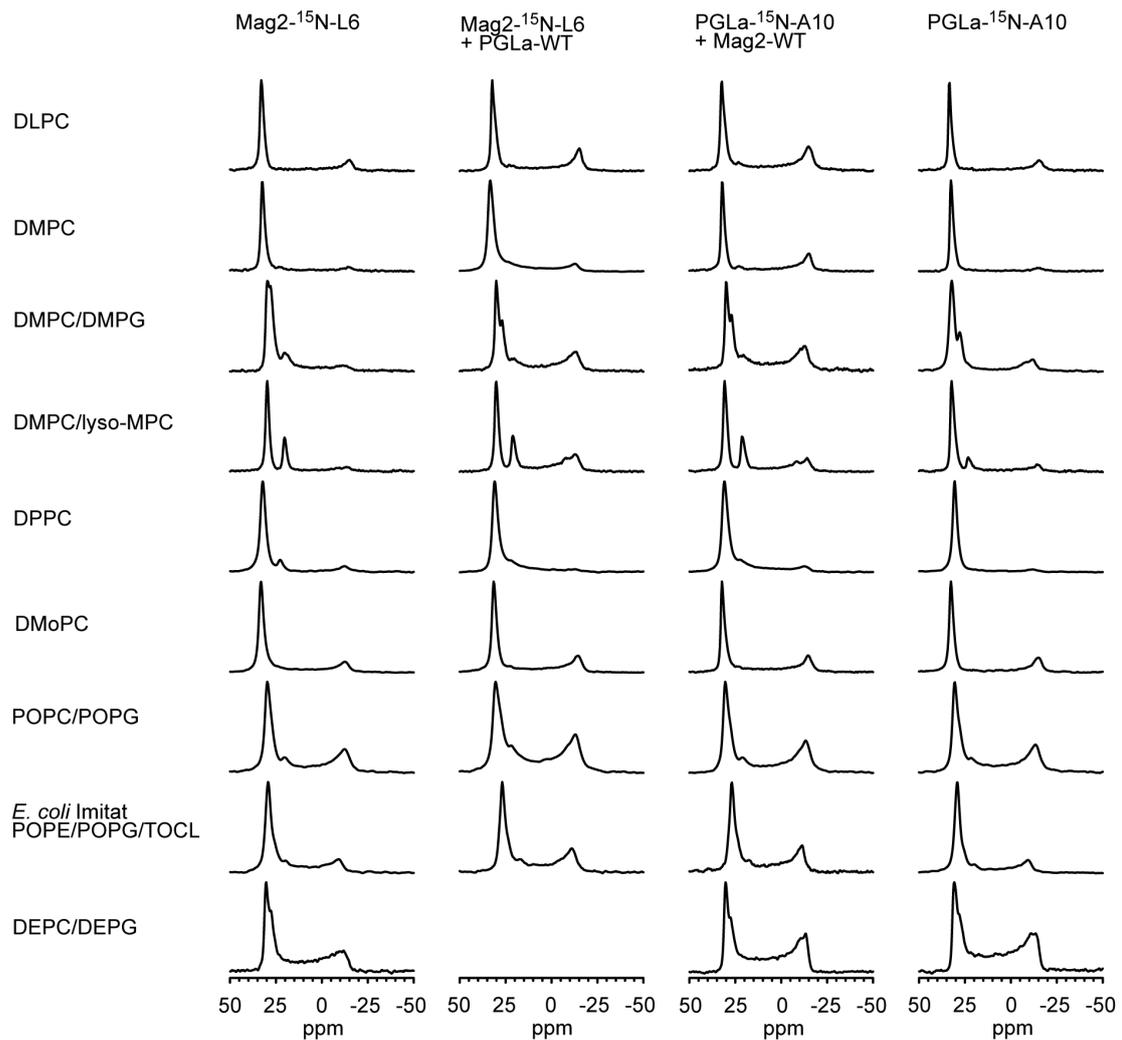


Abbildung B.1: ^{31}P -NMR-Spektren von markierten Mag2- und PGLa-Analoga, alleine oder in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa- bzw. Mag2-Wildtyps, in verschiedenen Lipiden und Lipidsystemen mit positiver und negativer spontaner Krümmung vor der ^{15}N -Messung.

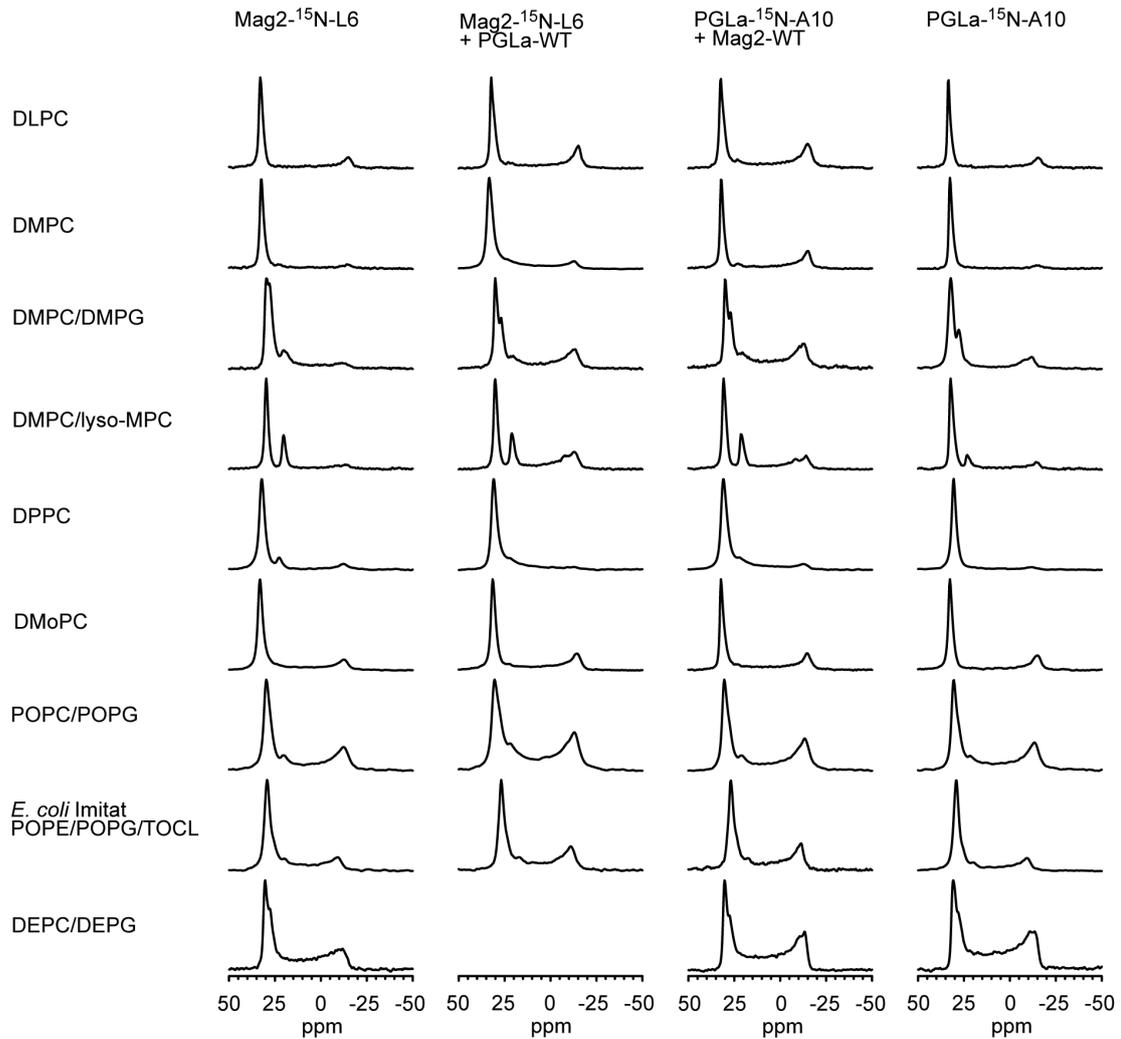


Abbildung B.2: ^{31}P -NMR-Spektren von markierten Mag2- und PGLa-Analoga, alleine oder in Gegenwart einer equimolaren Menge des PGLa- bzw. Mag2-Wildtyps, in verschiedenen Lipiden und Lipidsystemen mit positiver und negativer spontaner Krümmung nach der ^{15}N -Messung.

C. Anhang Interaktionsstudien

In Tabelle C.1 sind die MIC-Werte der CF₃-L-Bpg-markierten Peptide aufgeführt. Diese Daten und die FIC-Indices stammen aus der Diplomarbeit von Günther Pritz.^[97]

Tabelle C.1: Biologische Aktivität der CF₃-L-Bpg-markierten Peptide.

Peptid	<i>E. coli</i> DH5 α		<i>E. helveticus</i>		<i>K. rhizophila</i>		<i>B. subtilis</i>	
	+ PGLa		+ PGLa		+ PGLa		+ PGLa	
Mag2- ¹⁹ F-L6	32	1	32	1	128	1	4	1
Mag2- ¹⁹ F-G13	2	1	4	0,5	4	1	2	0,5
Mag2- ¹⁹ F-A15	16	2	16	2	16	2	2	0,5
Mag2- ¹⁹ F-F16	8	1	8	1	16	1	2	0,5
Mag2- ¹⁹ F-V17	8	1	8	0,5	8	1	2	0,5
Mag2- ¹⁹ F-G18	32	1	32	1	64	1	8	0,5
Mag2-WT	16	1	16	1	64	1	4	1
PGLa WT	2	-	4	-	1	-	1	-

Mit Gleichung C.1 wurden die FIC-Indices berechnet.^[110]

$$FIC = 0,5 \cdot \left\{ \frac{MIC(\text{Mag2} + \text{PGLa})}{MIC(\text{PGLa})} + \frac{MIC(\text{Mag2} + \text{PGLa})}{MIC(\text{Mag2})} \right\} \quad (\text{C.1})$$

In Tabelle C.2 sind die Ergebnisse der FIC-Berechnungen aufgelistet.

Tabelle C.2: Aus den MIC-Werten berechnete FIC-Indices der mit CF₃-L-Bpg-markierten Peptide.

Peptide	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. helveticus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>B. subtilis</i>
Mag2- ¹⁹ F-L6	0,27	0,14	0,50	0,63
Mag2- ¹⁹ F-G13	0,50	0,13	0,63	0,38
Mag2- ¹⁹ F-A15	0,56	0,31	1,06	0,38
Mag2- ¹⁹ F-F16	0,63	0,19	0,53	0,38
Mag2- ¹⁹ F-V17	0,63	0,19	0,56	0,38
Mag2- ¹⁹ F-G18	0,27	0,14	0,51	0,28
Mag2-WT	0,28	0,16	0,51	0,63

Tabelle C.3: Hämolysewerte der CF₃-L-Bpg markierten-Peptide.^[55]

Peptid	<i>Hämolyse</i>	
	8 $\mu\text{mol/L}$	128 $\mu\text{mol/L}$
Mag2- ¹⁹ F-L6	17 \pm 11	35 \pm 8
Mag2- ¹⁹ F-G13	77 \pm 15	100 \pm 0
Mag2- ¹⁹ F-A15	14 \pm 3	72 \pm 13
Mag2- ¹⁹ F-F16	27 \pm 4	84 \pm 20
Mag2- ¹⁹ F-V17	20 \pm 5	95 \pm 9
Mag2- ¹⁹ F-G18	12 \pm 6	24 \pm 10
Mag2-WT	7 \pm 4	35 \pm 6

Tabelle C.4: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen für Mag2-¹⁹F-G18 ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert.

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa	2,6 \pm 0,2	
Mag2	3,7 \pm 0,3	
PGLa/Mag2	58,5 \pm 1,0	9,4 \pm 0,8
Mag2- ¹⁹ F-G18	4,6 \pm 0,6	
Mag2- ¹⁹ F-G18/PGLa	64,9 \pm 9,8	9,2 \pm 1,7

Kooperativität

Tabelle C.5: Für die Bestimmung der Hill-Koeffizienten verwendete Steigungen für verschiedene PGLa-Konzentrationen.

Konzentrationen $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right]$	Steigungen (I) $\left[\frac{\%}{\text{s}}\right]$	Steigungen (II) $\left[\frac{\%}{\text{s}}\right]$	Steigungen (III) $\left[\frac{\%}{\text{s}}\right]$
0,1	0,00861	0,02529	0,02166
0,5	0,03177	0,03090	0,03273
1	0,03430	0,04418	0,03481
1,25	0,07846	0,06172	0,07652
1,5	0,24006	0,13788	0,14395
1,75	0,37439	0,24774	0,47756
2	0,77141	0,54837	0,60947
2,25	1,08583	0,71932	0,90893
2,5	1,22632	1,06759	1,29092
4	4,99449	4,08373	4,04195

Tabelle C.6: Für die Bestimmung der Hill-Koeffizienten verwendete Steigungen für verschiedene MSI-103-Konzentrationen.

Konzentrationen $\left[\frac{\mu\text{mol}}{L}\right]$	Steigungen (I) $\left[\frac{\%}{s}\right]$	Steigungen (II) $\left[\frac{\%}{s}\right]$	Steigungen (III) $\left[\frac{\%}{s}\right]$
0,5	0,03808	0,04830	0,03460
4	0,28581	0,25253	0,32298
4,5	0,27308	0,26840	0,48987
5	0,33528	0,28069	0,62798
5,5	0,43120	0,39215	0,71971
6	0,43479	0,41745	0,80528
6,5	0,51798	0,41048	0,93263
7	0,61136	0,48992	1,09347
7,5	0,70073	0,59220	1,23590
10	1,20749	1,07088	2,02925

Tabelle C.7: Für die Bestimmung der Hill-Koeffizienten verwendete Steigungen für verschiedene Mag2-Konzentrationen.

Konzentrationen $\left[\frac{\mu\text{mol}}{L}\right]$	Steigungen (I) $\left[\frac{\%}{s}\right]$	Steigungen (II) $\left[\frac{\%}{s}\right]$
0,5	0,05053 ^a	0,07076 ^a
2	0,19504 ^a	0,29426 ^a
2,5	0,25889 ^a	0,32046 ^a
3	0,38541 ^a	0,36858
3,5	0,40175	0,46729
4	0,50271	0,61621
4,5	0,65936	0,73661
5	0,86181	0,76914 ^a
5,5	0,97505	0,92830
6	1,19542	1,07352

^aDiese Werte wurden beim Anpassen nicht verwendet.**Tabelle C.8:** Für die Bestimmung der Hill-Koeffizienten verwendete Steigungen für verschiedene Konzentrationen der PGLa/Mag2-Mischung (1:1).

Konzentrationen $\left[\frac{\mu\text{mol}}{L}\right]$	Steigungen (I) $\left[\frac{\%}{s}\right]$	Steigungen (II) $\left[\frac{\%}{s}\right]$	Steigungen (III) $\left[\frac{\%}{s}\right]$
0,1	0,04204	0,03369	0,04565
0,35	0,05025	0,03267	0,06869
0,4	0,10868	0,07973	0,18266
0,45	0,13875	0,16052	0,30980
0,5	0,22965	0,17994	0,44405
0,55	0,37980	0,55035	0,49001
0,6	0,75130 ^a	0,63699	0,77576
0,65	0,69349	0,69886	0,45091 ^a
0,7	0,83463	0,92444	0,60199 ^a
1	1,64689	1,72891	1,75431

^aDiese Werte wurden beim Anpassen nicht verwendet.

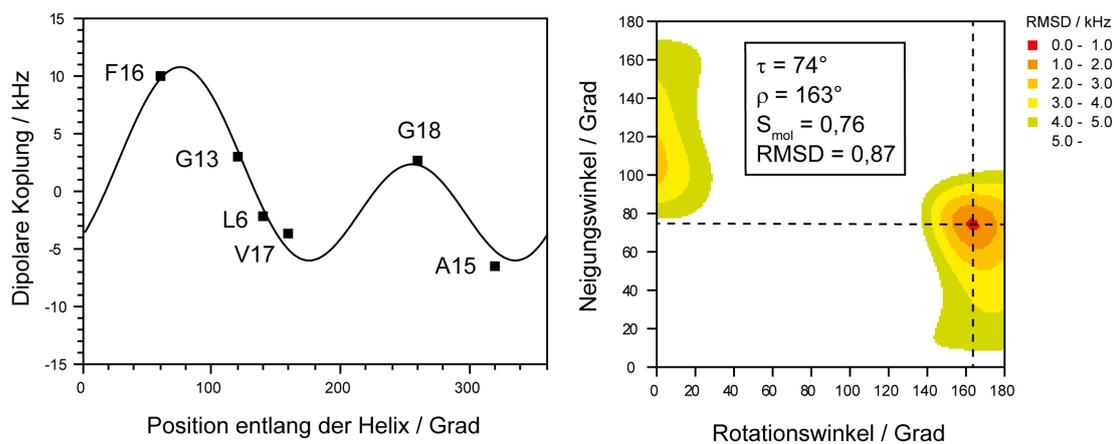
¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Abbildung C.1: Aus den Aufspaltungen der ¹⁹F-Spektren berechnete Wellen- und RMSD-Darstellung für Mag2 in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:50.

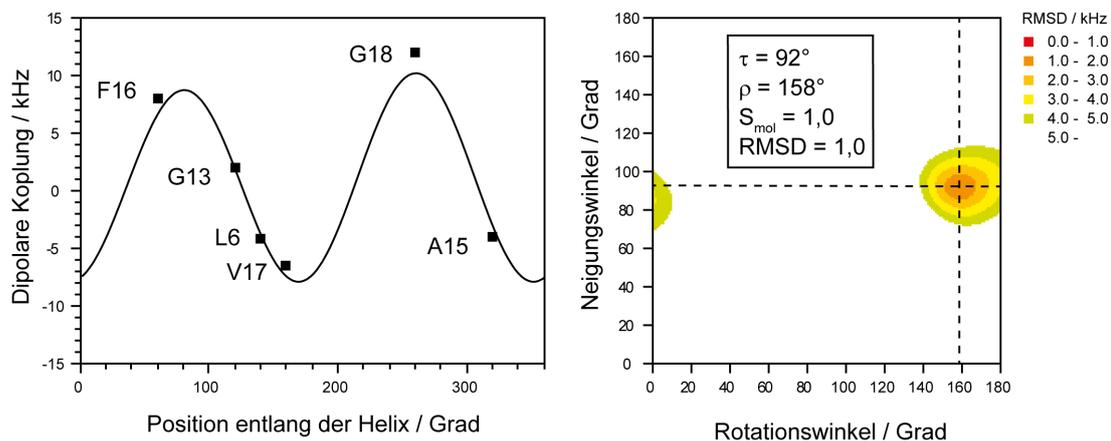


Abbildung C.2: Aus den Aufspaltungen der ¹⁹F-Spektren berechnete Wellen- und RMSD-Darstellung für Mag2 in Gegenwart einer equimolaren Menge an PGLa in DMPC/DMPG (3:1) bei einem P/L von 1:50.

D. Anhang Mutationsstudien

Salzbrückenmutationen

Tabelle D.1: Aus den ^{15}N -NMR-Spektren ermittelte chemische Verschiebungen δ von PGLa- ^{15}N -A10 und PGLa-K19E- ^{15}N -A10 alleine und in Kombination mit verschiedenen Mag2-Mutationen und dem Wildtyp (DMPC/DMPG (3:1), P/L = 1:50).

Peptid	PGLa- ^{15}N -A10 [ppm]	PGLa-K19E- ^{15}N -A10 [ppm]
PGLa- ^{15}N -A10	133 (T)	-
PGLa-K19E- ^{15}N -A10	-	165 (T)
Mag2-WT	205 (I)	207 (I)
Mag2-amid	193 (I)	205 (I)
Mag2-E19Q	192 (I)	197 (I)
Mag2-E19K	191 (I)	200 (I)
Mag2-E19K-amid	185 (I)	193 (I)

Tabelle D.2: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen für die Ladungsmutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* (DSM 1103) und *S. aureus* (DSM 1104).

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PGLa-WT/Mag2-WT	0,09	0,08	0,05	0,16
PGLa-K5E/Mag2-WT	0,08	0,06	0,06	0,06
PGLa-K12E/Mag2-WT	0,13	0,19	0,13	0,13
PGLa-K15E/Mag2-WT	0,28	0,19	0,25	0,25
PGLa-K19E/Mag2-WT	0,5	0,19	0,53	0,25
PGLa-WT/Mag2-amid	0,13	0,05	0,06	0,19
PGLa-WT/Mag2-E19Q	0,09	0,13	0,14	0,38
PGLa-WT/Mag2-E19K	0,31	0,19	0,52	0,63
PGLa-WT/Mag2-E19K-amid	0,38	0,31	0,5	0,75

Tabelle D.3: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Ladungsmutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:153-1:160; 1:306-1:319).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,3 ± 0,6	
Mag2-WT	3,1 ± 0,3	
PGLa-WT + Mag2-WT	60,8 ± 3,0	11,3 ± 1,2
PGLa-K5E	3,5 ± 0,3	
PGLa-K5E + Mag2-WT	20,7 ± 6,6	3,1 ± 1,1
PGLa-K12E	3,1 ± 0,6	
PGLa-K12E + Mag2-WT	28,9 ± 12,5	4,8 ± 2,5
PGLa-K15E	2,9 ± 0,3	
PGLa-K15E + Mag2-WT	5,6 ± 2,0	0,9 ± 0,4
PGLa-K15E + Mag2-E19K ^a	7,4 ± 0,6	0,7 ± 0,0
PGLa-K15E + Mag2-E19K-amid ^a	4,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0
PGLa-K19E	3,0 ± 0,7	
PGLa-K19E + Mag2-WT	4,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1
PGLa-K19E + Mag2-E19K ^a	5,8 ± 0,3	0,6 ± 0,2
PGLa-K19E + Mag2-E19K-amid ^a	3,1 ± 1,1	0,4 ± 0,3
Mag2-amid	3,7 ± 1,0	
PGLa-WT + Mag2-amid	79,2 ± 4,8	13,6 ± 2,5
Mag2-E19Q	5,9 ± 1,2	
PGLa-WT + Mag2-E19Q	30,2 ± 5,9	3,7 ± 0,2
Mag2-E19K	4,2 ± 0,8	
PGLa + Mag2-E19K	6,8 ± 1,2	1,1 ± 0,2
Mag2-E19K-amid	2,9 ± 0,2	
PGLa-WT + Mag2-E19K-amid	3,4 ± 1,2	0,6 ± 0,1

^aIn diesem Falle wurden nur zwei Messungen durchgeführt.

PGLa *versus* MSI-103

Tabelle D.4: Chemische Verschiebungen δ der Spektren von PGLa-¹⁵N-A10 und MSI-103-¹⁵N-A10 alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2-Wildtyp in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	PGLa- ¹⁵ N-A10 [ppm]	MSI-103- ¹⁵ N-A10 [ppm]
PGLa- ¹⁵ N-A10	133 (T)	-
MSI-103- ¹⁵ N-A10	-	144 (T)
Mag2-WT	205 (I)	128 (T)

Tabelle D.5: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PGLa-WT/Mag2-WT	0,09	0,08	0,05	0,16
MSI-103/Mag2-WT	0,38	0,75	1,01	0,5

Tabelle D.6: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von PGLa, MSI-103, Mag2 und deren Kombinationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:161-1:167; 1:323-1:333).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,5 ± 0,1	
Mag2-WT	3,6 ± 0,5	
PGLa-WT + Mag2-WT	62,8 ± 0,6	11,0 ± 3,6
MSI-103	2,0 ± 0,2	
MSI-103 + Mag2-WT	3,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2

Von PGLa nach MSI-103

Mehrfachmutationen

Tabelle D.7: Chemische Verschiebungen δ der PtM-Mehrfachmutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	Peptid alleine [ppm]	+ Mag2-WT [ppm]
PtM-C1- ¹⁵ N-A10	119 (T)	215 (I)
PtM-A1- ¹⁵ N-A10	152 (T)	165 (T)
PtM-A2- ¹⁵ N-A10	167 (T)	191 (I)
PtM-A3- ¹⁵ N-A10	159 (T)	160 (T)

Tabelle D.8: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen für die PtM-Mehrfachmutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PtM-C1/Mag2-WT	0,09	0,19	0,06	0,13
PtM-A1/Mag2-WT	0,50	0,50	0,50	0,52
PtM-A2/Mag2-WT	0,25	0,14	0,09	0,09
PtM-A3/Mag2-WT	0,51	0,50	0,5	0,51

Tabelle D.9: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen für die PtM-Mehrfachmutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:160-1:167; 1:319-1:333).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,8 ± 0,7	
Mag2-WT	3,3 ± 1,2	
PGLa-WT + Mag2-WT	61,2 ± 2,3	10,4 ± 0,4
PtM-C1	1,4 ± 0,4	
PtM-C1 + Mag2-WT	4,1 ± 1,0	0,8 ± 0,0
PtM-A1	4,7 ± 1,1	
PtM-A1 + Mag2-WT	5,5 ± 0,5	0,7 ± 0,0
PtM-A2	2,4 ± 0,2	
PtM-A2 + Mag2-WT	27,3 ± 4,4	5,8 ± 0,2
PtM-A3	3,3 ± 0,4	
PtM-A3 + Mag2-WT	7,0 ± 1,2	1,0 ± 0,0

Einzelmutationen

Tabelle D.10: Chemische Verschiebungen δ der PtM-Einzelmutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	Peptid alleine [ppm]	+ Mag2-WT [ppm]
PtM-A6I- ¹⁵ N-A10	135 (T)	194 (I)
PtM-G7A- ¹⁵ N-A10	134 (T)	138 (T)
PtM-A8K- ¹⁵ N-A10	143 (T)	193 (I)

Tabelle D.11: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen der PtM-Einzelmutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PtM-A6I/Mag2-WT	0,53	0,08	0,19	0,31
PtM-G7A/Mag2-WT	0,38	0,25	1,03	1,02
PtM-A8K/Mag2-WT	0,25	0,25	0,25	0,07

Tabelle D.12: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der PtM-Einzelmutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:150-1:161; 1:300-1:323).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,1 ± 1,1	
Mag2-WT	3,3 ± 1,1	
PGLa-WT + Mag2-WT	60,0 ± 2,7	12,9 ± 7,0
PtM-A6I ^a	2,0 ± 0,8	
PtM-A6I + Mag2-WT ^a	16,3 ± 5,9	3,1 ± 2,3
PtM-G7A	2,1 ± 0,7	
PtM-G7A + Mag2-WT	4,1 ± 0,5	0,8 ± 0,3
PtM-A8K	2,5 ± 1,1	
PtM-A8K + Mag2-WT	73,6 ± 10,7	13,7 ± 4,1

^aIn diesem Falle wurden nur zwei Messungen durchgeführt.

Von MSI-103 nach PGLa

Einzelmutationen

Tabelle D.13: Chemische Verschiebungen δ der MtP-Einzelmutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	Peptid alleine [ppm]	+ Mag2-WT [ppm]
MtP-I6A- ¹⁵ N-A10	121 (T)	124 (T)
MtP-A7G- ¹⁵ N-A10	105 (T)	95 (S)
MtP-K8A- ¹⁵ N-A10	106 (T)	96 (S)

Tabelle D.14: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen der MtP-Einzelmutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
MtP-I6A/Mag2-WT	0,50	0,75	0,56	0,50
MtP-A7G/Mag2-WT	0,28	0,09	0,19	0,38
MtP-K8A/Mag2-WT	0,52	0,63	0,63	0,63

Tabelle D.15: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der MtP-Einzelmutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:150-1:161; 1:300-1:323).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,1 ± 0,8	
Mag2-WT	3,1 ± 0,8	
PGLa-WT + Mag2-WT	60,0 ± 2,1	12,5 ± 5,0
MtP-I6A	1,6 ± 0,9	
MtP-I6A + Mag2-WT	3,1 ± 1,9	0,6 ± 0,1
MtP-A7G	1,4 ± 1,1	
MtP-A7G + Mag2-WT	3,2 ± 1,7	0,7 ± 0,2
MtP-K8A	1,7 ± 0,2	
MtP-K8A + Mag2-WT	2,3 ± 0,6	0,7 ± 0,2

Doppelmutationen

Tabelle D.16: Chemische Verschiebungen δ der MtP-Doppelmutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	Peptid alleine [ppm]	+ Mag2 [ppm]
MtP-G4S-A7G- ¹⁵ N-A10	102 (T)	- ^a
MtP-I6A-A7G- ¹⁵ N-A10	115 (T)	- ^a
MtP-K8A-A7G- ¹⁵ N-A10	93 (T)	- ^a

^aEs konnte in mehreren Versuchen kein Signal detektiert werden.

Tabelle D.17: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen der MtP-Doppelmutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
MtP-G4S-A7G/Mag2-WT	0,53	1,06	0,38	0,25
MtP-I6A-A7G/Mag2-WT	0,16	0,31	0,38	0,38
MtP-K8A-A7G/Mag2-WT	0,38	0,31	0,56	0,50

Tabelle D.18: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der MtP-Doppelmutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:115-1:167; 1:231-1:333).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,3 ± 0,7	
Mag2-WT	3,0 ± 1,1	
PGLa-WT + Mag2-WT	59,0 ± 0,3	12,4 ± 4,5
MtP-G4S-A7G	1,4 ± 0,9	
MtP-G4S-A7G + Mag2-WT	3,8 ± 0,9	1,0 ± 0,3
MtP-I6A-A7G	0,8 ± 0,7	
MtP-I6A-A7G + Mag2-WT	3,6 ± 1,5	1,1 ± 0,3
MtP-K8A-A7G	1,3 ± 0,5	
MtP-K8A-A7G + Mag2-WT	3,2 ± 0,8	0,9 ± 0,0

Mehrfachmutationen

Tabelle D.19: Chemische Verschiebungen δ der MtP-Mehrfachmutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge an Mag2 in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	Peptid alleine [ppm]	+ Mag2-WT [ppm]
MtP-A3- ¹⁵ N-A10	125 (T)	206 (I)
MtP-A4- ¹⁵ N-A10	163 (T)	188 (I)
MtP-A7G-G18L- ¹⁵ N-A10	159 (T)	190 (I)

Tabelle D.20: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen der MtP-Mehrfachmutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
MtP-A3/Mag2-WT	0,38	0,25	- ^a	- ^a
MtP-A4/Mag2-WT	0,28	0,19	0,28	0,25
MtP-A7G-G18L/Mag2-WT	0,38	0,38	0,28	0,50

^aDiese Werte sind nicht berechenbar da nur ein hypothetischer MIC existiert (MIC > 1024 μ mol/L).

Tabelle D.21: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der MtP-Mehrfachmutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:115-1:163, 1:231-1:326).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,5 \pm 0,3	
Mag2-WT	3,2 \pm 0,6	
PGLa-WT + Mag2-WT	59,9 \pm 2,3	10,7 \pm 1,7
MtP-A3	0,9 \pm 0,4	
MtP-A3 + Mag2-WT	3,6 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2
MtP-A4	2,5 \pm 0,1	
MtP-A4 + Mag2-WT	26,9 \pm 6,3	5,2 \pm 1,1
MtP-A7G-G18L	4,9 \pm 0,3	
MtP-A7G-G18L + Mag2-WT	34,7 \pm 3,9	4,3 \pm 0,5

Der Einfluss des GxxxG-Motivs

Tabelle D.22: Aus den ^{15}N -Spektren entnommene chemische Verschiebungen δ der GxxxG-Mutationen alleine und in Gegenwart einer equimolaren Menge des Mag2-Wildtyps in DMPC/DMPG (3:1) bei einem effektiven P/L von 1:50.

Peptid	Peptid alleine [ppm]	+ Mag2-WT [ppm]
PGLa-G11I- ^{15}N -A10	143 (T)	154 (T)
PGLa-GS1- ^{15}N -A10	122 (T)	118 (T)
PGLa-GS2- ^{15}N -A10	72 (S)	80 (S)

Tabelle D.23: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen der GxxxG-Mutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PGLa-G11I/Mag2-WT	0,50	1,03	1,00	1,01
PGLa-GS1/Mag2-WT	0,75	0,50	0,63	0,50
PGLa-GS2/Mag2-WT	0,75	0,63	0,51	0,51

Tabelle D.24: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der GxxxG-Mutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:150-1:169, 1:300-1-337).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,2 ± 0,7	
Mag2-WT	3,2 ± 0,8	
PGLa-WT + Mag2-WT	60,4 ± 2,3	12,3 ± 4,8
PGLa-G11I	11,0 ± 5,5	
PGLa-G11I + Mag2-WT	20,9 ± 10,5	1,5 ± 0,0
PGLa-GS1	1,9 ± 0,6	
PGLa-GS1 + Mag2-WT	4,0 ± 0,4	0,7 ± 0,1
PGLa-GS2	2,0 ± 0,6	
PGLa-GS2 + Mag2-WT	4,0 ± 0,9	0,7 ± 0,2

Einschub: MSI-103 *versus* Mag2

Tabelle D.25: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PGLa-WT/MSI-103	0,75	0,63	0,63	0,75

Tabelle D.26: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:161-1:167, 1:323-1:333).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,5 ± 0,1	
Mag2-WT	3,6 ± 0,5	
PGLa-WT + Mag2-WT	62,8 ± 0,6	11,0 ± 3,6
MSI-103	2,0 ± 0,2	
PGLa-WT + MSI-103	2,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1

Von MSI-103 nach Mag2

Tabelle D.27: Aus den mikrobiologischen Untersuchungen der MtM-Mutationen ermittelte FIC-Indices für die Bakterien *E. coli* und *S. aureus*.

Peptidkombination	<i>E. coli</i> DSM 1103		<i>S. aureus</i> DSM 1104	
	1. FIC	2. FIC	1. FIC	2. FIC
PGLa-WT/MtM-C1	0,75	1,02	0,53	1,03
PGLa-WT/MtM-C2	1,5	0,63	0,56	0,56
PGLa-WT/MtM-C3	0,75	1,13	0,56	1,02
PGLa-WT/MtM-C4 ^a	-	-	-	-
PGLa-WT/MtM-GIG	0,75	1,25	1,13	0,56

^aDiese Werte sind nicht berechenbar da nur ein hypothetischer MIC existiert (MIC > 1024 $\mu\text{mol/L}$).

Tabelle D.28: Aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der MtM-Mutationen ermittelte Leakagewerte und Synergiefaktoren mit Standardabweichung vom Mittelwert (P/L, 1:115-1:169, 1:231-1:337).

Peptid/Peptidmischung	Mittelwert Leakage [%]	Synergiefaktor
PGLa-WT	2,4 \pm 0,5	
Mag2-WT	3,6 \pm 1,4	
PGLa-WT + Mag2-WT	60,0 \pm 2,4	10,7 \pm 3,3
MtM-C1	21,0 \pm 3,9	
PGLa-WT + MtM-C1	38,8 \pm 3,3	1,7 \pm 0,2
MtM-C2 ^a	22,1 \pm 6,4	
PGLa-WT + MtM-C2	28,7 \pm 10,3	1,1 \pm 0,2
MtM-C3	24,2 \pm 4,9	
PGLa-WT + MtM-C3	42,6 \pm 10,7	1,6 \pm 0,3
MtM-C4	0,1 \pm 0,1	
PGLa-WT + MtM-C4	2,6 \pm 0,4	1,0 \pm 0,1
MtM-GIG	2,9 \pm 1,3	
PGLa-WT + MtM-GIG	4,3 \pm 0,3	1,0 \pm 0,6

^aAuf Grund der hohen Aktivität dieses Peptids wurde nur die halbe Peptidkonzentration eingesetzt. Bei der Mischung ebenso. Das 1:1-Verhältnis wurde durch Anpassung der PGLa-Konzentration bewahrt.

Lebenslauf

JONATHAN ZERWECK

*16.09.1984

Rüppurrerstraße 33
76137 Karlsruhe

AUSBILDUNG

Promotion , Karlsruher Institut für Technologie,	01/2012-12/2014
Studium , Chemie, Karlsruher Institut für Technologie Vertiefungsfach: Organische Chemie Diplomarbeit (Biochemie): „Untersuchung der synergistischen Reorientierung der antimikrobiellen Peptide Magainin 2 und PGLa in Lipidmembranen mittels ¹⁵ N- und ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektroskopie“	10/2006-11/2011
Studium , Humanmedizin, Medizinische Universität Graz	10/2005-03/2006
Zivildienst , Individualhilfe e.V., Heidelberg	09/2004-05/2005
Abitur , Elisabeth von Thadden Gymnasium, Heidelberg	09/1995-07/2004

PUBLIKATIONEN

Zeitschriften

1. Influence of hydrophobic residues on the activity of the antimicrobial peptide Magainin 2 and its synergy with PGLa, E. Strandberg, J. Zerweck, D. Horn, G. Pritz, M. Berditsch, J. Bürck, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *J. Pept. Sci.* **2014**, übermittelt.
2. Synergistic insertion of antimicrobial Magainin-family peptides in membranes depends on the lipid spontaneous curvature, E. Strandberg, J. Zerweck, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Biophys. J.* **2013**, *104*, L09 - L011.

Abstracts

1. Structure activity relationship for a synergistic pair of antimicrobial peptides from the magainin family, J. Zerweck, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Biophys. J.* **2014**, *106*, Supplement, 294a-294a.

2. Synergistic insertion of antimicrobial peptides into membranes. E. Strandberg, P. Wadhvani, J. Zerweck, D. Horn, G. Pritz, A. S. Ulrich, *Biophys. J.* **2012** *102*, Supplement, 88a-88a.

Konferenzbeiträge

1. Interaction studies on magainin family peptides, J. Zerweck, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides, 2014, Lorient, Frankreich.
2. Structure activity relationship for a synergistic pair of antimicrobial peptides from the magainin family, J. Zerweck, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, 58th Biophysical Society Meeting, 2014, San Franzisko, USA.
3. Lipid shape is a key factor in the synergistic reorientation of membrane-bound PGLa and Magainin 2, J. Zerweck, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, 11th German peptide symposium, 2013, München, Deutschland.
4. Lipid shape is a key factor in the synergistic reorientation of membrane-bound PGLa and Magainin 2, J. Zerweck, E. Strandberg, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, International school of magnetic resonance, 11th Course: Frontiers of Biophysics and Structural Biology, 2012, Erice, Italien.

AUSZEICHNUNGEN

1. Student Research Achievement Award (SRAA), 58th Biophysical Society Meeting, 2014, San Franzisko, USA.
2. Posterpreis (Wiley VCH), 11th German peptide symposium, 2013, München, Deutschland.