

Struktur– und Funktionsanalyse
des membranaktiven
bakterientoxischen Peptids TisB
aus *Escherichia coli*

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

Dipl.–Chem. Benjamin Zimpfer

aus

Baden–Baden

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. apl. Dr. Wolfgang Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2015

DOI: 10.5445/IR/1000049239

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle aussprechen, die mich während der Zeit der Dissertation unterstützt haben und am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Ich danke Prof. Dr. Anne S. Ulrich für die Aufnahme in ihrem Arbeitskreis, ihr stetiges Interesse an diesem herausfordernden Projekt und die motivierenden und erfolgreichen Diskussionen und Ratschläge.

Ein besonderer Dank geht an meine Betreuer Dr. Johannes Reichert und Dr. Parvesh Wadhvani für die hervorragende Betreuung und ihre Geduld in zahlreichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Dr. Stephan Grage, Dr. Erik Strandberg und Markus Schmitt danke ich für die kompetente Beratung und stetige Hilfsbereitschaft bei Fragen und bei der Durchführung der NMR-Experimente.

Mein Dank geht auch an Dr. Jochen Bürck sowie Bianca Posselt und Sigmar Roth für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der CD-Experimente.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Pepsy-Labs Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck für ihre Unterstützung bei den Synthesen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Arbeitskollegen für die hervorragende Atmosphäre bei der Arbeit und im Büro.

Vielen Dank an Dr. Sabine Reisser, Papiya Sanyal und Dr. Thomas Steinbrecher für die Bereitstellung der Daten.

Mein Dank geht auch an alle, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren und hier nicht explizit erwähnt werden.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie für die jahrelange Unterstützung bedanken. Ohne sie wäre dies so nicht möglich gewesen.

Erklärung

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

Karlsruhe, 28. Mai 2015

Benjamin Zimpfer

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von März 2012 bis Mai 2015 am Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Organische Chemie – Lehrstuhl für Biochemie (Campus Süd) sowie am Institut für Biologische Grenzflächen IBG-2 (Campus Nord), unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich, angefertigt.

Die NMR-Abstandsmessungen (Abschnitt 5.3.3) wurden in Zusammenarbeit mit Xiaojun Xu (KIT) durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	X
Einheiten und Symbole	XIII
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XVII
1. Einleitung.....	1
1.1 Motivation	1
1.2 Das Toxin/Antitoxin-System TisB/IstR-1.....	2
1.3 Funktion und Eigenschaften von TisB.....	3
1.4 Bakterielle Membran und Wechselwirkungen mit Peptiden.....	5
1.5 Charge-Zipper-Hypothese	9
2. Zielsetzung	10
3. Theoretischer Hintergrund	11
3.1 Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	11
3.2 NMR-Spektroskopie	13
3.2.1 Allgemeines	13
3.2.2 Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	14
3.2.3 Abstandsmessungen mittels CPMG-Experiment	20
3.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	21
3.3.1 pH-Wert Bestimmung in Lipid-Vesikeln mit Pyranin.....	21
3.3.2 Resonanzenergietransfer nach Förster	22
4. Material und Methoden.....	26
4.1 Peptidsynthese	26
4.1.1 Automatisierte Peptidsynthese	26
4.1.2 Manuelle Peptidsynthese	27
4.1.3 Einführung der Fmoc-Schutzgruppe.....	27
4.1.4 Synthese der ¹⁵ N-markierten TisB.....	28
4.1.5 Synthese der ¹⁹ F-markierten TisB-Analoga	28
4.1.6 Synthese der Isotopenmarkierten Peptide für Abstandsmessungen	29
4.1.7 Weitere TisB-Mutationen	30
4.1.8 Abspaltung des Peptids vom Harz und der Seitenschutzgruppen.....	31
4.2 Aufreinigung und Charakterisierung.....	32
4.2.1 Umkehrphasen-HPLC	32
4.2.2 Charakterisierung mittels HPLC ESI-TOF-MS	32
4.3 Konzentrationsbestimmung.....	32
4.4 Verwendete Lipide	32
4.5 CD-Spektroskopie.....	33

4.5.1	CD-Messungen in Lösungsmittel.....	33
4.5.2	CD-Messungen in Lipid-Vesikeln.....	34
4.5.3	Thermische Denaturierungsexperimente.....	34
4.6	NMR-Spektroskopie	34
4.6.1	Präparation der Proben für Festkörper-NMR-Experimente	34
4.6.2	Durchführung der NMR-Experimente.....	35
4.6.3	Strukturanalyse	36
4.7	Fluoreszenzmessungen	37
4.7.1	Messung des Abbaus des pH-Gradienten.....	37
4.7.2	FRET-Experimente	38
5.	Ergebnisse	40
5.1	Peptidsynthese.....	40
5.2	CD-Spektroskopie.....	41
5.2.1	Messungen von TisB in verschiedenen Lösungsmittel	41
5.2.2	TisB in Lipid-Vesikeln	44
5.2.3	Sekundärstrukturanalysen	44
5.2.4	CD-Spektren der CF ₃ -Bpg-Analoga.....	45
5.2.5	TisB-Ladungsmutanten in Wasser und HPLC-Eluent.....	45
5.2.6	Glutamin-Mutanten und ¹⁵ N-isotopenmarkiertes TisB.....	46
5.2.7	CD-Spektren anderer TisB-Mutationen	46
5.3	NMR-Spektroskopie	49
5.3.1	Festkörper- ¹⁵ N-NMR-Experimente.....	49
5.3.2	Festkörper- ¹⁹ F-NMR-Experimente	56
5.3.3	NMR-Abstandsmessungen	67
5.4	Fluoreszenzspektroskopische Experimente.....	69
5.4.1	Messung der Equilibrierung des pH-Gradienten	69
5.4.2	FRET-Experimente	70
6.	Diskussion	72
6.1	Synthese und Aufreinigung.....	72
6.2	CD-Spektroskopie.....	73
6.3	NMR-Spektroskopie	75
6.3.1	Festkörper- ¹⁵ N-NMR-Experimente.....	75
6.3.2	Festkörper- ¹⁹ F-NMR-Experimente	78
6.3.3	NMR-Abstandsmessung mittels CPMG.....	91
6.4	Fluoreszenzexperimente	93
6.4.1	Messungen der Equilibrierung des pH-Gradienten.....	93
6.4.2	FRET-Experimente	96
6.5	<i>D</i> -TisB, TisB- <i>rev.</i> und TisB- <i>scr.</i>	99
6.6	Modell zum Wirkungsmechanismus von TisB	100

7. Zusammenfassung.....	103
8. Literaturverzeichnis.....	104
Anhang	111
A Materialien.....	111
B CD-Spektroskopie.....	116
C NMR-Spektroskopie	117
D Fluoreszenzspektroskopische Experimente	129
Publikationsliste	132

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMPs	<i>Antimicrobial peptides</i> , antimikrobielle Peptide
AN	Acetonitril
Äquiv.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
CD	<i>Circular dichroism</i> , Zirkulardichroismus
CF ₃ -Bpg	CF ₃ -Bicyclopentylglycin (<i>L</i> -Enantiomer)
CHCl ₃	Chloroform
CONTIN-LL	Auswertealgorithmus
CP	<i>Cross-polarisation</i> , Kreuzpolarisation
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CPPs	<i>Cell penetrating peptides</i> , zellpenetrierende Peptide
CSA	<i>Chemical shift anisotropy</i> , Anisotropie der chemischen Verschiebung
C _α	C-alpha Kohlenstoffatom
Dansyl	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl
DCM	Dichlormethan
DEiPC	1,2-Dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DErPC	1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLPC	1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMF	Dimethylformamid
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-racglycerol)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ESI-TOF-	<i>Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry</i> ,
MS	Elektrospray Flugzeit Massenspektrometrie
f.A.	für Analyse
f.Ps.	für Peptidsynthese
f.S.	für Synthese
FCCP	Carbonylcyanide- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon
Afhs	2-Amino-5-fluorhex-5-ensäure

Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
H ₂ O	Wasser
HBTU	O-(1H-benzotriazol-1-yl)N,N,N',N'-Tetramethyl-uronium hexafluorophosphate
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HPTS	8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäuretrinitriumsalz, Pyranin
HT	<i>High tension</i> , Hochspannung
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
LexA	Repressorprotein (EC 3.4.21.88)
max.	maximal
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min.	mindestens
MRE	<i>Mean residue ellipticity</i> , auf den mittleren Aminosäure bezogene molare Elliptizität
N ₂	Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC
O-Su	Oxy-succinimid
P:L	Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
PB	Phosphatpuffer
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac glycerol)
Pos.	Position
PS	Phosphatidylserin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RecA	Protein in <i>E.coli</i>
REDOR	<i>Rotational Echo Double Resonance</i> , Rotations-Echo Doppelresonanz
Rhod-PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonfyl)
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i> , Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure

RP-HPLC	<i>Reversed phase</i> -HPLC, Umkehrphasen-HPLC
RT	Retentionszeit
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
TA	Toxin-Antitoxin
TFA	Trifluoressigsäure
<i>tisAB/istr1</i>	Gen
TisB	<i>Toxicity-induced by SOS B</i>
UV/Vis	<i>Ultraviolet-visible</i> , Ultraviolett-sichtbar
Vgl.	Vergleich(e)

Einheiten und Symbole

%	Prozent
$[\theta]_{220}$	Elliptizität eines komplett helikalen Proteins bei 220 nm
$[\theta_{H1}]_{220}$	Elliptizität bei 220 nm
°	Grad
°C	Grad Celsius
A	Absorption
Å	Ångström
A_{280}	Absorption bei 280 nm
B_0	Magnetfeld
c	Konzentration
C_g	Proteinkonzentration
cm	Zentimeter
cos	Kosinus
C_r	molare Konzentration pro Peptidbindung
C_α	C-alpha
d	Schichtdicke der Küvette
deg	Grad
dmol	Dezimol
E	elektrischer Feldvektor, Emission, FRET-Effizienz
$E_{app,dq}$	<i>Apparent donor quenching</i> , Fluoreszenzlöschung des Donors
$E_{app,se}$	<i>Apparent sensitized emission</i> , ansteigende Emission des Akzeptors
E_L	elektrischer Feldvektor
E_R	elektrischer Feldvektor
exp	Exponentialfunktion
f_H	fraktionale Helizität
g	Gramm
h	Stunde(n)
\hbar	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum
I	Kernspinquantenzahl
k	Korrekturfaktor für Endeffekte
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Stoffmengeneinheit
M_W	Molekulargewicht des Proteins
n	Anzahl für etwas, Orbital, Hill Koeffizient
nm	Nanometer
ppm	<i>parts per million</i> , Teile pro Million (10^{-6})
r	Abstand zweier Kerne
s	Sekunde
S_{mol}	Ordnungsparameter
T	absolute Temperatur
Δ^0_{AB}	Proportionalitätskonstante
Δ_{AB}	Dipolare Kopplungskonstante
ΔE	Energiedifferenz
Ω	Frequenzbereich
α	alpha
β	beta
$\delta_{11}; \delta_{22}; \delta_{33}$	Resonanzfrequenzen der zugehörigen Tensorelemente
δ_{iso}	isotroper Wert chemischer Verschiebung
δ	chemische Verschiebung
ϵ_{280}	Extinktionskoeffizient bei 280 nm
γ	gamma; gyromagnetisches Verhältnis
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
μ_B	Magnetisches Moment
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μs	Mikrosekunden
π^*	Orbital
π	Kreiszahl (3.1415926...); Orbital
θ	Elliptizität; Winkel C_α - CF_3 -Vektor relativ zum Magnetfeld
ρ	azimutaler Rotationswinkel
$\sigma_{11}; \sigma_{22}; \sigma_{33}$	Tensorelemente
σ	Abweichung
τ	Pulslänge; Neigungswinkel der Helixachse
ν_{ref}	Referenzfrequenz
ν	Frequenz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Modell der <i>tisAB</i> Kontrolle durch <i>IstR</i> -Gene.	3
Abbildung 1.2: Modell der Wirkung von TisB auf Zellen.	4
Abbildung 1.3: Darstellung von TisB als helikales Rad.	4
Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau der Zellwand von Bakterien.	5
Abbildung 1.5: Mögliche Strukturen von Phospholipiden.	6
Abbildung 1.6: Darstellung der drei Mechanismen der Membranstörung.	7
Abbildung 3.1: CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturelemente.	12
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zweier Kerne A und B im Raum.	15
Abbildung 3.3: Ellipsoide Darstellung eines CSA-Tensors.	16
Abbildung 3.4: Darstellung der Aufspaltung einer CF ₃ -Gruppe im ¹⁹ F-NMR-Spektrum.	17
Abbildung 3.5: Strukturformel der Aminosäure CF ₃ -Bpg.	17
Abbildung 3.6: Ideale Helix in einer Modell-Lipidmembran.	18
Abbildung 3.7: Beispielspektren einer orientierten NMR-Probe.	19
Abbildung 3.8: ¹⁵ N-NMR-Pulverspektrum.	20
Abbildung 3.9: Die CPMG-Multipulssequenz.	20
Abbildung 3.10: Strukturformel der Aminosäure 2-Amino-5-fluorhex-5-ensäure.	21
Abbildung 3.11: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Pyranin.	21
Abbildung 3.12: Lipid-Vesikel mit Pyranin (grün) im Inneren.	22
Abbildung 3.13: Darstellung des spektralen Überlapps J.	22
Abbildung 3.14: Emissionsspektren des verwendeten FRET-Paares.	24
Abbildung 3.15: Darstellung der Fluoreszenzlöschung und der verstärkten Emission.	25
Abbildung 5.1: CD-Spektren von TisB in Wasser und organischen Lösungsmitteln.	42
Abbildung 5.2: CD-Spektren in SDS-Lösung und Guanidin*HCl.	42
Abbildung 5.3: CD-Spektren der thermischen Denaturierungsversuche in Wasser.	43
Abbildung 5.4: CD-Spektren der thermischen Denaturierungsversuche in SDS.	43
Abbildung 5.5: CD-Spektren in Lipid-Vesikeln.	44
Abbildung 5.6: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse.	44
Abbildung 5.7: CD-Spektren der CF ₃ -Bpg markierten TisB-Analoga.	45
Abbildung 5.8: CD-Spektren der Ladungsmutanten.	46
Abbildung 5.9: CD-Spektren der Glutamin-Mutationen und ¹⁵ N isotopenmarkierten TisB.	46
Abbildung 5.10: CD-Spektren der TisB-Mutationen.	47
Abbildung 5.11: Ergebnisse der Temperaturserien von TisB- <i>rev.</i> und TisB- <i>scr.</i>	47
Abbildung 5.12: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von TisB- <i>rev.</i> und TisB- <i>scr.</i>	48
Abbildung 5.13: Vergleich von TisB ¹⁵ N-A16 in Lipidmembranen unterschiedlicher Länge.	50
Abbildung 5.14: NMR-Spektren der an unterschiedlichen Positionen ¹⁵ N-markierten TisB.	51
Abbildung 5.15: Strukturanalyse der ¹⁵ N-markierten TisB.	52
Abbildung 5.16: NMR-Spektren in POPC/POPG (7:3).	52
Abbildung 5.17: NMR-Spektren in POPC bei einem P:L von 1:50 und 1:100.	53
Abbildung 5.18: NMR-Spektren der dialysierten Probe.	53
Abbildung 5.19: Ergebnisse der Temperaturserien in verschiedenen Lipiden.	54
Abbildung 5.20: Ergebnisse der NMR-Experimente der TisB-Ladungsmutanten.	55
Abbildung 5.21: NMR-Spektren der Glutamin-Mutanten.	56
Abbildung 5.22: NMR-Spektren der TisB-CF ₃ -Bpg-Analoga I6 bis L13 in DOPC.	58

Abbildung 5.23: NMR-Spektren der TisB-CF₃-Bpg-Analoga L14- bis L25-Bpg in DOPC. 59

Abbildung 5.24: Strukturanalyse (S_{mol}-Modell) der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DOPC. 61

Abbildung 5.25: Strukturanalyse mit dem σ_τ und σ_ρ -Modell. 61

Abbildung 5.26: ¹⁹F-NMR-Spektren (0°-Orientierung) der Konzentrationsserien in DMPC. 62

Abbildung 5.27: Auswahl an ¹⁹F-NMR-Spektren von entsäuerten NMR-Proben. 63

Abbildung 5.28: ¹⁹F-NMR-Spektren der neutralisierten und durch Dialyse entsalzten Proben. ... 63

Abbildung 5.29: Auswahl an ¹⁹F-NMR-Spektren der stark sauren DMPC-Proben. 64

Abbildung 5.30: Strukturanalysen mit den zusätzlichen Aufspaltungen in DMPC. 65

Abbildung 5.31: ¹⁹F-NMR-Spektren in DMPC bei 283 K. 67

Abbildung 5.32: ¹⁹F-NMR-Spektren in DLPC. 67

Abbildung 5.33: Ergebnisse der NMR-Abstandsmessung mittels CPMG. 68

Abbildung 5.34: Equilibrierung des Protonengradienten. 69

Abbildung 5.35: pH-Equilibrierung der Ladungs- und Glutamin-Mutanten. 70

Abbildung 5.36: Donor- und Akzeptor-Emission in Abhängigkeit des Molenbruchs. 71

Abbildung 6.1: Ladungsanordnung im Falle hypothetischer antiparalleler Dimere. 78

Abbildung 6.2: Partielle Strukturanalyse (S_{mol}-Modell). 80

Abbildung 6.3: Partielle Strukturanalyse (σ_τ/σ_ρ -Modell). 82

Abbildung 6.4: Strukturanalyse (S_{mol}-Modell) von Pos. 6 bis 13 und Pos. 14 bis 25. 85

Abbildung 6.5: Strukturanalyse (σ_τ/σ_ρ) von Pos. 6 bis 13 und Pos. 14 bis 25. 86

Abbildung 6.6: Strukturanalyse der extrahierten dipolaren Kopplungen aus der MD-Simulation. 88

Abbildung 6.7: Vergleich der NMR-Daten und der MD-Simulation. 90

Abbildung 6.8: Ergebnisse der Strukturanalyse. 90

Abbildung 6.9: Winkel-Abstandsabhängigkeit der homonuklearen dipolaren Kopplungen. 92

Abbildung 6.10: Aktivitätsbestimmung mittels Biofilminduktion. 96

Abbildung 6.11: Hypothetische antiparallele Dimere der FRET-Peptide. 97

Abbildung 6.12: Mögliche Anordnung der antiparallelen Dimere. 98

Abbildung 6.13: Aktivität von *D*-TisB, TisB-*rev.* sowie TisB-*scr.* bei der Biofilminduktion.100

Abbildung 6.14: Schematische Darstellung der Funktion von TisB in der Membran.102

Abbildung B.1: CD-Spektren der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC- und DOPC-Vesikeln.116

Abbildung C.2: NMR-Spektren der TisB-Analoga I6- bis L13-CF₃-Bpg in POPC.117

Abbildung C.3: NMR-Spektren der TisB-Analoga I14- bis L25-CF₃-Bpg in POPC.118

Abbildung C.4: Strukturanalyse (S_{mol}-Modell) der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC.119

Abbildung C.5: Strukturanalysen (σ_τ/σ_ρ -Modell) der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC.119

Abbildung C.6: NMR-Spektren der TisB-Analoga I6- bis L13-CF₃-Bpg in DMPC.120

Abbildung C.7: NMR-Spektren der TisB-Analoga I14- bis L25-CF₃-Bpg in DMPC.121

Abbildung C.8: Strukturanalysen (S_{mol}-Modell) der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DMPC.122

Abbildung C.9: Strukturanalysen (σ_τ/σ_ρ -Modell) der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DMPC.122

Abbildung C.10: NMR-Spektren der neutralisierten und dialysierten Proben.123

Abbildung C.11: NMR-Spektren der Konzentrationsreihe von TisB I10-CF₃-Bpg in DMPC.123

Abbildung C.12: NMR-Spektren der Konzentrationsreihe von TisB I10-CF₃-Bpg in POPC.124

Abbildung C.13: NMR-Spektren der Konzentrationsreihe von TisB I14-CF₃-Bpg in POPC.124

Abbildung C.14: NMR-Spektren der TisB-Analoga I6- bis L13-CF₃-Bpg in DMPC (sauer).125

Abbildung C.15: NMR-Spektren der TisB-Analoga I14- bis L25-CF₃-Bpg in DMPC (sauer). ..126

Abbildung C.16: NMR-Spektren der entsäuerten NMR-Proben.127

Abbildung C.17: NMR-Spektren einiger TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DMPC/DMPC (7:3).127

Abbildung C.18: NMR-Spektren einiger TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC/POPC (7:3).128

Abbildung D.19: Kalibrierung von HPTS.129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Bekannte Protonophore/Entkoppler [35–37].	8
Tabelle 3.1: Physikalische Eigenschaften zur Untersuchung von Biomolekülen geeigneter Kerne.	14
Tabelle 4.1: Übersicht der ^{15}N -markierten TisB-Peptide.	28
Tabelle 4.2: Übersicht der ^{15}N -A16 markierten TisB-Ladungs- und Glutamin-Mutanten.	28
Tabelle 4.3: Übersicht der ^{19}F -markierten TisB-Analoga.	29
Tabelle 4.4: Isotopenmarkierte TisB-Analoga für NMR-Abstandsmessungen.	30
Tabelle 4.5: Sonstige TisB-Mutationen für biologische Tests und FRET-Experimente.	30
Tabelle 4.6: Übersicht der verwendete Lipide und relevante physikalische Eigenschaften.	33
Tabelle 5.1: Ausbeuten und Retentionszeiten der synthetisierten TisB-Analoga und Mutanten.	40
Tabelle 5.2: Übersicht der chemischen Verschiebungen von TisB ^{15}N -A16.	49
Tabelle 5.3: Chemische Verschiebungen der an unterschiedlichen Positionen ^{15}N -markierten TisB.	51
Tabelle 5.4: Ermittelte dipolare Kopplungen der CF_3 -Bpg markierten TisB-Analoga.	60
Tabelle 5.5: Ergebnisse der Strukturanalyse (S_{mol} -Modell).	60
Tabelle 5.6: Ergebnisse der Strukturanalyse mit dem $\sigma_{\tau}/\sigma_{\rho}$ -Modell.	61
Tabelle 5.7: Übersicht der Aufspaltungen der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga bei saurem pH-Wert.	64
Tabelle 5.8: Übersicht der Aufspaltungen in DMPC/DMPG.	66
Tabelle 5.9: Übersicht der Aufspaltungen in POPC/POPG.	66
Tabelle 5.10: Ermittelte maximale Abstände in Abhängigkeit des Ordnungsparameters S_{mol} .	68
Tabelle 5.11: Ergebnisse der Anpassung der initialen Geschwindigkeit an die Gleichung (4.2).	70
Tabelle 5.12: Ergebnisse der FRET-Auswertung nach Gleichung (3.14) bzw. (3.15).	71
Tabelle 6.1: Ergebnisse der Strukturanalysen (S_{mol} -Modell) der Positionen 6 – 21 sowie 10 – 25.	79
Tabelle 6.2: Vergleich der Ergebnisse der Strukturanalysen ($\sigma_{\tau}/\sigma_{\rho}$ -Modell).	82
Tabelle 6.3: Vergleich der Ergebnisse der Strukturanalysen von TisB in DMPC.	85
Tabelle 6.4: Ergebnisse der Strukturanalysen der dipolaren Kopplungen aus der MD-Simulation.	88
Tabelle 6.5: Berechnete Abstände zwischen Donor und Akzeptor.	98
Tabelle B.1: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse mit dem Algorithmus CONTIN-LL.	116
Tabelle B.2: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von TisB- <i>rev.</i> und TisB- <i>scr.</i>	116
Tabelle D.3: Erhaltene Parameter der HPTS-Kalibrierung.	129
Tabelle D.4: Initiale Anfangsgeschwindigkeiten des Protonenflusses.	129
Tabelle D.5: Zugabetabelle zur Herstellung der Proben für die FRET-Experimente.	130
Tabelle D.6: Verwendete Absorptionskoeffizienten.	130

1. Einleitung

1.1 Motivation

Die immens steigende Anzahl von Infektionen mit resistenten Keimen und Erregern stellt ein zunehmendes Problem der modernen Medizin dar. Für die erfolgreiche Behandlung von Infektionen resistenter Keime bedarf es daher der stetigen Entwicklung von neuen antibiotischen Wirkstoffen. In diesem Zusammenhang wird in membranaktiven Substanzen ein großes Potenzial gesehen. Hierzu zählen beispielsweise antimikrobielle Peptide, die ein natürlicher Bestandteil der Immunabwehr aller komplexen Organismen sowie einigen Mikroben darstellen und eine breite Palette antimikrobieller Wirkung aufweisen [1–3]. Im Vergleich zu konventionellen Antibiotika zeichnen sie sich durch einen anderen Wirkmechanismus aus, indem sie unter anderem Schäden an der bakteriellen Membran verursachen. Allerdings wurde beobachtet, dass auch bei Verwendung antimikrobieller Peptide die Bildung bakterieller Resistenzen ausgelöst werden kann [4]. Somit ist die Kenntnis bzw. das Verständnis, wie es zur Entstehung antibiotikaresistenter Erreger kommt, ein entscheidender Aspekt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe, bei denen aufgrund ihres Wirkmechanismus die Ausbildung von Resistenzen nicht zu erwarten ist. Bereits im Jahr 1944 erkannte J.W. Bigger als erster, dass eine wachsende Bakterienkultur nicht mit dem von A. Flemming 1928 entdeckten Penicillin sterilisiert werden konnte [5]. Einige Zellen überlebten die Behandlung und er nannte diese Zellen „*persisters*“ [6]. Persistente Zellen zeigen in Anwesenheit von Antibiotika kein oder ein sehr langsames Wachstum, weshalb man sie als ruhende bzw. schlafende Zellen (*dormant cells*) bezeichnet [7]. Neben ihrer Fähigkeit, eine Behandlung mit Antibiotika zu tolerieren, bilden sie bakteriellen Biofilm, der als Ursache für die Widerspenstigkeit chronischer Infektionen angesehen wird [8,9]. Über den Mechanismus der Bildung resistenter Zellen dieses Typs ist gegenwärtig wenig bekannt. Da eine erhöhte Expression von chromosomalen Toxin/Antitoxin (TA) Genen beobachtet wurde [9], wird angenommen, dass TA-Module bei der Bildung persistenter Zellen involviert sind [10].

Toxin/Antitoxin-System

TA-Systeme sind ubiquitär in Chromosomen und Plasmiden von Bakterien und Archaea [11]. Sie bestehen aus mindestens zwei eng miteinander verbundenen Genen, welche ein stabiles Protein (Toxin) und ein instabiles Antitoxin codieren. Je nachdem wie das Antitoxin das Toxin neutralisiert, werden TA-Systeme in verschiedene Klassen unterteilt. In einem Typ I

TA-System ist das Antitoxin eine nicht-codierende RNA, welche durch Binden an die mRNA des Toxins die Translation inhibiert. Im anderen Fall (Typ II) ist das Antitoxin ebenfalls ein Protein und es kommt zur Komplexbildung [11–14]. Es gibt bisher ein Beispiel für ein TA-System des Typs III, bei welchem das Toxin direkt an RNA bindet [15,16]. Der grundlegende Mechanismus von TA-Systemen erscheint im Prinzip einfach: Solange das instabile Antitoxin im Überschuss vorliegt, kann es dem Toxin erfolgreich entgegenwirken. Wird aber in Folge diverser Einflüsse das Toxin überexprimiert, so kann es aufgrund mangelnder „Neutralisation“ seine Wirkung ungehindert entfalten.

SOS-Antwort

Eine Möglichkeit der Regulation der Transkription von TA-Genen ist die SOS-Antwort. Diese ist eine Reaktion von Zellen auf DNA-Schäden, welche beispielsweise durch Antibiotika ausgelöst werden kann [9,17]. Beteiligt an der SOS-Antwort sind die Proteine RecA und LexA. RecA ist in der Erhaltung und Reparatur von DNA involviert und wird durch DNA-Schäden aktiviert. Im aktivierten Zustand interagiert RecA mit dem an der DNA gebundenen LexA-Repressor. Durch diese Wechselwirkung kommt es zur autokatalytischen Abspaltung des Repressor-Proteins, die SOS-Antwort ist induziert und die Transkription der in der Promotorregion von LexA enthaltenen Gene kann stattfinden [10,18].

Das TA-Modul *tisAB/istr1*, welches im Folgenden vorgestellt wird, enthält die Lex-Kassette und ist das erste TA-System des Typs I, bei welchem gezeigt werden konnte, dass es über die SOS-Antwort reguliert wird [9]. Außerdem repräsentiert es den eindeutigsten Fall eines TA-Systems, welches einen bedeutenden Einfluss bei der Bildung persistenter Zellen zeigt [19].

1.2 Das Toxin/Antitoxin-System TisB/IstR-1

Das TisB/IstR1 TA-System in *E.coli* besteht aus dem toxischen Peptid TisB und einer sRNA als Antitoxin, der IstR-1. Die Expression des Peptids TisB unterliegt der Regulation der SOS-Antwort. Der Mechanismus dieses TA-Systems ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Das Antitoxin wird während des gesamten Zellwachstums transkribiert. Die *tisAB*-mRNA wird aufgrund von unvollständiger Repression des LexA-Proteins ebenfalls stetig, jedoch nur in sehr geringem Maße transkribiert. Bei ausgeschalteter SOS-Antwort ist daher ein ständiger Überschuss der sRNA gegenüber seinem Ziel, der *tisAB*-mRNA, vorhanden. Die Basenpaarung der IstR-1-RNA mit der *tisAB*-mRNA führt zu RNaseIII-abhängiger Abspaltung, was die Translation der *tisAB*-mRNA inaktiviert. Unter SOS Bedingungen ist der LexA-Repressor abgespalten und die Transkription von *tisAB*-mRNA kann in hohem Maße stattfinden. IstR-

1 ist nicht mehr im Überschuss vorhanden und die Translation aktiver *tisAB*-mRNA findet statt. Als Resultat wird das kleine Protein bzw. Peptid TisB exprimiert [11,17,20,21].

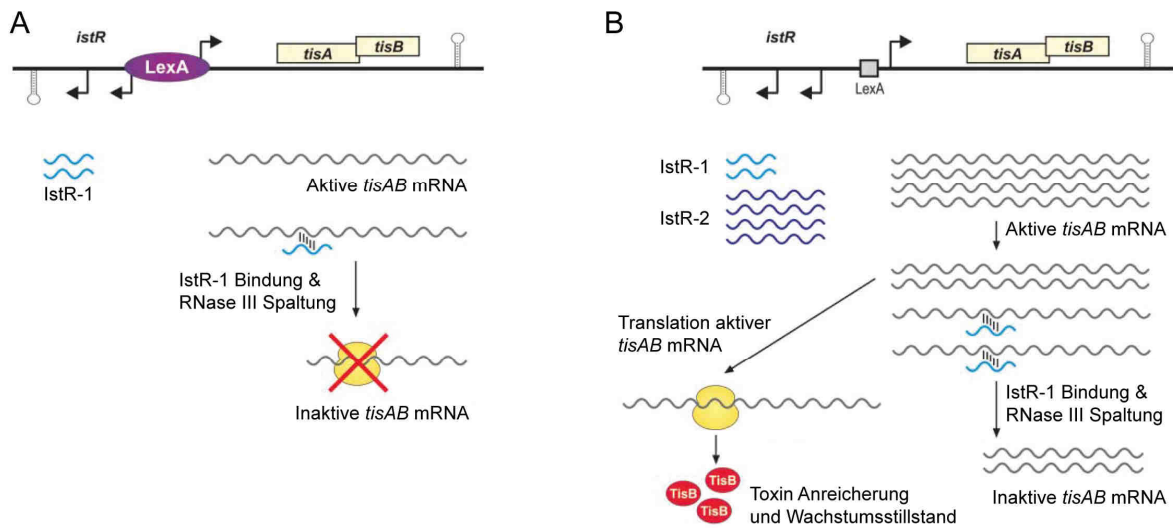


Abbildung 1.1: Modell der *tisAB* Kontrolle durch *IstR*-Gene. Unter normalen Bedingungen ist ein ständiger Überschuss an IstR-1-RNA vorhanden, welche an die *tisAB*-mRNA bindet und dadurch inaktiviert (A). Bei eingeschalteter SOS-Antwort ist das Repressorprotein LexA abgespalten und die Transkription des *tisAB*-Gens kann ungehindert stattfinden. Der vorhandene Überschuss an *tisAB*-mRNA kann erfolgreich transkribiert werden und die Expression von TisB findet statt. Modifiziert übernommen aus [20].

1.3 Funktion und Eigenschaften von TisB

Effekt von TisB auf die Zelle

Wird unter SOS-Bedingungen TisB exprimiert, kommt es zu einer raschen Anlagerung in der inneren Zellmembran (Abbildung 1.2). Dieses Eindringen in die Membran beeinflusst deren Integrität, was eine Depolarisation zur Folge hat. Das Resultat ist die Abnahme des intrazellulären ATP-Spiegels, wodurch die Syntheseraten von DNA, RNA und Proteinen stark sinken. Das gesamte Zellwachstum ist stark verlangsamt oder kommt vollständig zum Erliegen [11].

Interessanter Weise hat das zelltoxisch wirkende Peptid TisB jedoch einen schützenden Effekt, da es durch seine Wirkung zum Überleben von Zellen maßgeblich beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TisB die Bildung von persistenten Zellen induziert [9]. Dabei wurde eine Population von *E. coli* mit dem DNA-schädigenden Antibiotikum Ciprofloxacin behandelt. Wie erwartet, wurden dabei die meisten Zellen schnell getötet. Es gab aber eine kleine Population, die diese Behandlung tolerierte und im Anschluss eine sehr hohe Toleranz gegenüber Antibiotika wie Ampicillin und Streptomycin sowie dem zuvor eingesetzten Ciprofloxacin zeigte. Die Ausbildung persistenter Zellen wird aufgrund dieser Beobachtungen direkt in Verbindung mit der Wirkung des Peptids TisB gebracht [9].

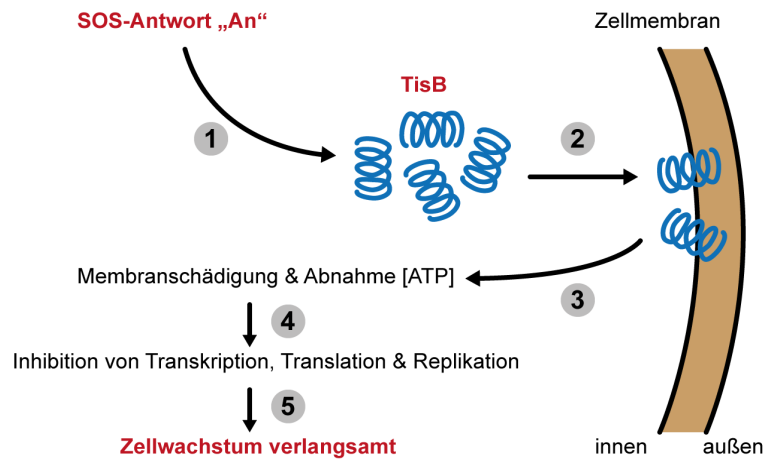


Abbildung 1.2: Modell der Wirkung von TisB auf Zellen: Unter SOS-Bedingungen exprimiert (1), reichert sich TisB in der inneren Membran an (2). Dies führt zum Verlust der Membranintegrität und in Folge dessen zu einem Abfall des Membranpotenzials. Der intrazelluläre ATP-Spiegel (3) und die Syntheseraten von DNA, RNA und Proteinen sinken (4). Das Zellwachstum ist eingeschränkt oder kommt vollständig zum Erliegen (5). Modifiziert übernommen aus [11].

Eigenschaften von TisB

TisB ist ein aus 29 Aminosäuren bestehendes Peptid mit der Sequenz:



Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren (schwarz) ist mit über 75% sehr hoch. TisB enthält zudem zwei polare (hellblau) und fünf geladene Aminosäuren, darunter drei positiv geladene Lysine (blau) und zweimal das negativ geladene Aspartat (rot). Die Nettoladung des Peptids beträgt +1. Die Darstellung als helikales Rad (Abbildung 1.3 A) impliziert eine amphiphile α -helikale Sekundärstruktur. Beim Betrachten der Anordnung der geladenen und polaren Seitenketten ist festzustellen, dass diese alle auf einem schmalen Streifen entlang der Helix liegen (Abbildung 1.3 B).

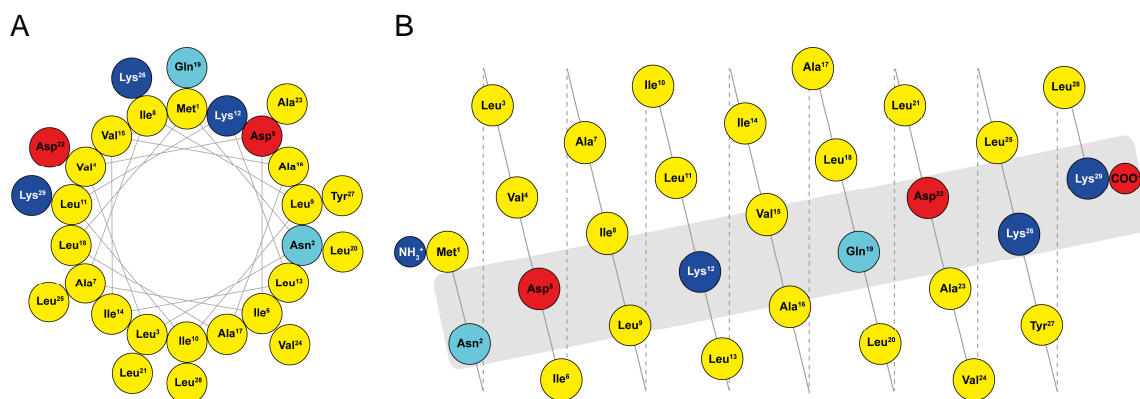


Abbildung 1.3: Die Darstellung von TisB als helikales Rad impliziert die Form einer amphiphilen α -Helix (A). So angeordnet, befinden sich geladene und polare Aminosäuren auf einem schmalen Streifen entlang der Helix (B).

Vergleicht man TisB mit anderen membranaktiven Peptiden wie zum Beispiel antimikrobiellen Peptiden, so lassen sich gewisse Ähnlichkeiten feststellen. Viele antimikrobielle Peptide bestehen aus 15–40 Aminosäuren, zeigen im membrangebundenen Zustand eine amphiphile α -helikale Struktur und sind ebenfalls positiv geladen. Unter Assemblierung in der Membran kommt es bei vielen membranaktiven Peptiden zur Bildung von transmembranen Poren und Ionenkanälen (Magainin [22], Alamethicin [23], Melittin [24]) oder zu unspezifischer Disruption der Membran (Aurein [25], Dermaseptin [26,27]). Letztendlich führt die Wirkung antimikrobieller Peptide durch unspezifischen Ausfluss essentieller Zellkomponenten zum Zelltod [28]. Da die Wirkung von TisB jedoch nicht den Zelltod induziert, ist eine andere Art der Wechselwirkung mit der Membran anzunehmen. Im Folgenden wird erläutert, wie bakterielle Membranen aufgebaut sind und es werden die einzelnen Möglichkeiten vorgestellt, wie Peptide mit einer Membran interagieren können.

1.4 Bakterielle Membran und Wechselwirkungen mit Peptiden

Bakterien werden anhand ihrer Gram-Färbung in zwei Gruppen unterteilt: Man unterscheidet zwischen grampositiven Bakterien wie zum Beispiel *S. aureus* sowie gramnegativen Bakterien wie beispielsweise *E. coli*. Die Gram-Färbung kommt durch den unterschiedlichen Aufbau und die Zusammensetzung der Zellwand zustande. Diese besteht bei grampositiven Bakterien aus mehreren Mureinschichten und enthält zusätzlich Lipoteichonsäuren. Die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht nur aus einer dünnen Mureinschicht, enthält aber eine zweite Lipidmembran und zudem Lipopolysaccharide [29,30]. Der prinzipielle Aufbau der Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterien ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

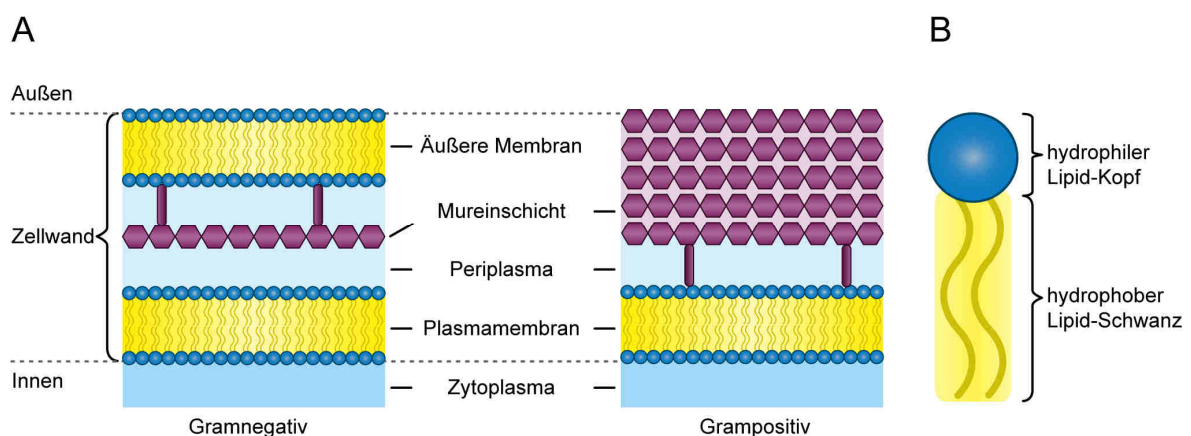


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau der Zellwand von gramnegativen und grampositiven Bakterien (A). Prinzipieller Aufbau von Phospholipiden.

Hauptbestandteil bakterieller Lipidmembranen sind Phospholipide. Diese sind aus einem hydrophoben Teil, dem Lipid-Schwanz und einem hydrophilen Teil, der Kopfgruppe, aufgebaut (Abbildung 1.4 B). Die Kopfgruppe kann aus negativ geladenen Molekülen (Phosphoglycerol, Cardiolipin) oder aus zwitterionischen Molekülen (Phosphoethanolamin, Phosphocholin) bestehen. Die einzelne Zusammensetzung variiert in grampositiven und gramnegativen Bakterien. Der Anteil an Phosphoglycerol und Cardiolipin bestimmt den negativ geladenen Charakter der Lipidmembran. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaft sind Lipide befähigt, in polarem Lösungsmittel wie zum Beispiel Wasser, Mizellen, Doppelschichten oder Liposome auszubilden [31,32]. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, indem die durchgeführten Struktur- und Funktionsuntersuchungen von TisB in Liposomen (Lipid-Vesikel) und in Lipid-Doppelschichten durchgeführt wurden.

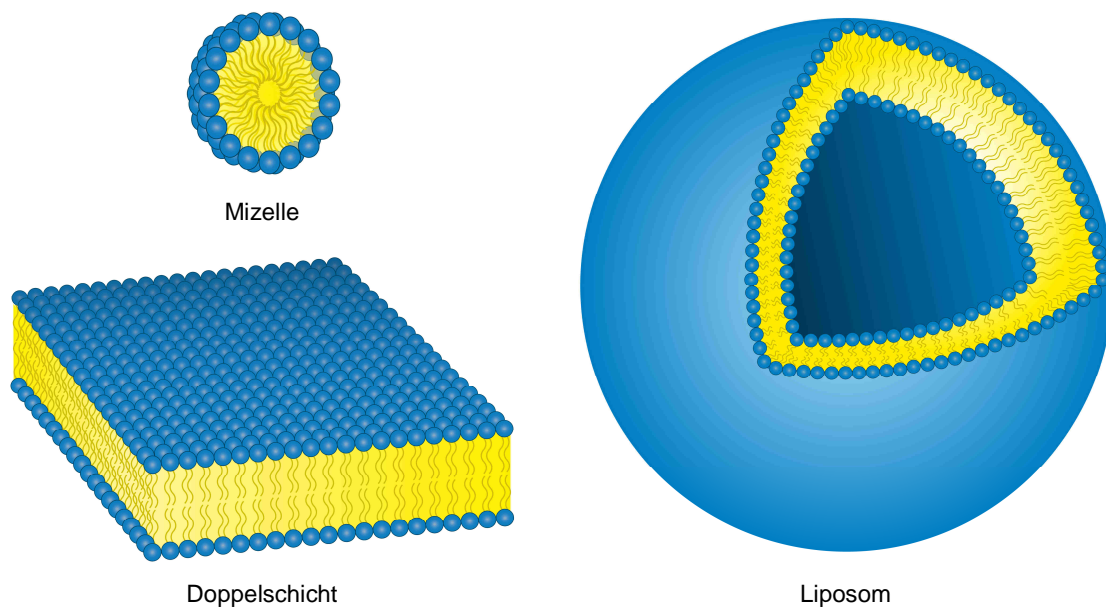


Abbildung 1.5: Mögliche Strukturen von Phospholipiden in polarem Medium wie Wasser. Es werden Mizellen, Doppelschichten oder Liposome gebildet. Diese wurden für die Struktur- und Funktionsuntersuchen im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

Wechselwirkungen mit membranaktiven Peptiden

Membranaktive Peptide können die Integrität einer Lipidmembran in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Lipidmembran und der meist positiv geladenen Peptiden kommt es unter Ausbildung einer amphiphilen Sekundärstruktur der Peptide zur Anlagerung an der Membranoberfläche. Wird eine bestimmte Konzentration an Peptid erreicht bzw. überschritten, so wird der folgende Verlauf der Mechanismen der Membranaktivität mit drei Modellen (in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt) beschrieben [27,28,33]:

- *barrel-stave model*
Bildung von membrandurchspannenden Poren nach dem Fassdauben-Modell
- *toroidal pore* oder *wormhole mechanism*
Ausbildung von toroidalen Poren, auch als Wurmloch-Mechanismus bezeichnet
- *carpet model*
Unspezifische Störung der Membran aufgrund hoher lokaler Anreicherung und Assemblierung von Peptiden an der Oberfläche

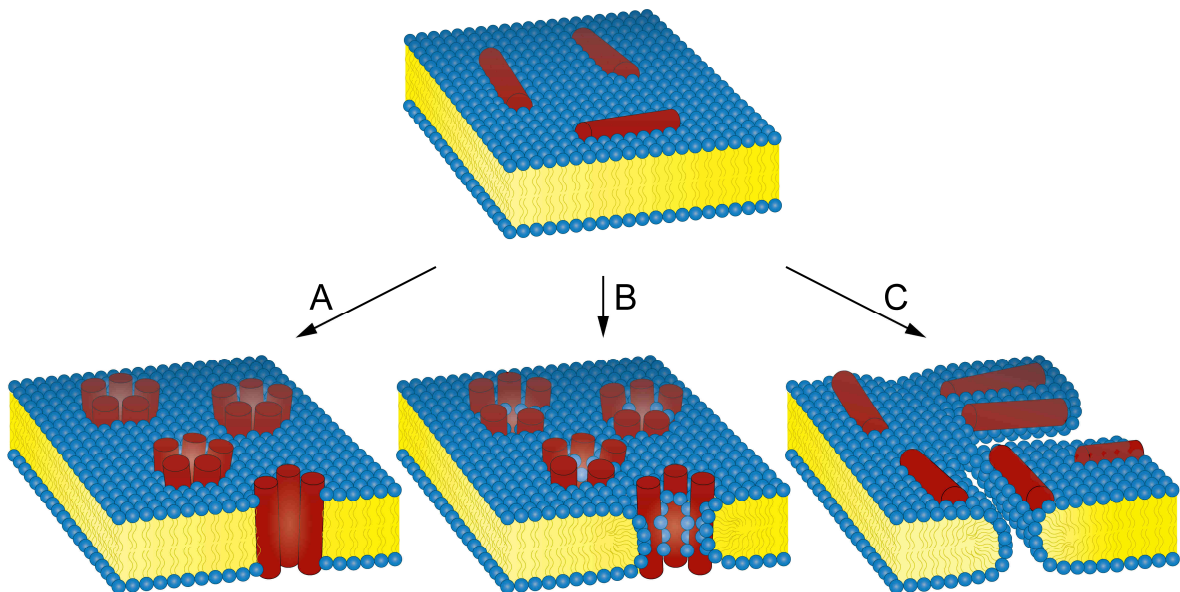
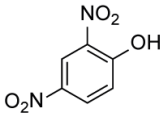
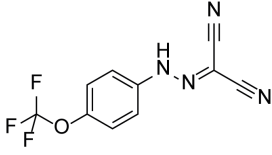
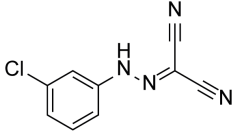


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der drei Mechanismen der Membranstörung von antimikrobiellen Peptiden: (A) Bildung von Poren nach dem Fassdauben-Modell. (B) Bildung von toroidalen Poren nach dem Wurmloch-Mechanismus. (C) Unspezifische Membranstörung der Membran nach dem Teppich-Mechanismus.

Ionophore und Entkoppler

Ionophore sind Moleküle, die Ionen durch Membrane transportieren. Hierbei wird zwischen Carrier-Ionophoren und kanalbildenden Ionophoren unterschieden. Letztere bilden analog zu den vorgestellten Modellen Ionenkanäle. Carrier-Ionophore hingegen binden Ionen und diffundieren durch die Lipidmembran. Auf der trans-Seite werden die gebundenen Ionen dann wieder freigesetzt. Die Membran wird dabei nicht merklich gestört. Werden Protonen auf diese Weise durch Membranen transportiert, spricht man von Protonophoren oder Entkopplern. Diese entkoppeln den Elektronentransport von der Atmungskette, indem sie Protonen den Einfluss in die Mitochondrien ermöglichen, ohne dabei ADP zu ATP mittels oxidativer Phosphorylierung zu regenerieren [34]. In Tabelle 1.1 sind bekannte Protonophore dargestellt.

Tabelle 1.1: Bekannte Protonophore/Entkoppler [35–37].

Protonophore/Entkoppler	
Dinitrophenol (DNP)	
Carbonylcyanide- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)	
Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon (CCCP)	

TisB in der Membran

Aufgrund der sinkenden ATP-Konzentration in der Zelle nach Anreicherung von TisB in der Membran geht man davon aus, dass dies als Folge der Depolarisierung bzw. des Zusammenbruchs des Protonengradienten geschieht. Der genaue Wirkmechanismus von TisB in der Membran ist bisher nicht bekannt. Es wird angenommen, dass es die Integrität der Membran beeinflusst [11]. Für den Wirkungsmechanismus ergeben sich mehrere Möglichkeiten:

- TisB bildet kleine spezifische Poren, die zum Abbau des pH-Gradienten führen.
- TisB löst sich im lipophilen Inneren der Membran und arbeitet als Protonophor.
- TisB bindet an Rezeptoren und wirkt inhibitorisch.

Unspezifische Membranschäden bzw. die Lyse der Membran sind eher unwahrscheinlich, da dies zum Ausfluss sämtlicher Ionen und Moleküle führt und den Tod der Zelle zur Folge hätte. Verglichen mit den oben vorgestellten Entkopplern ist TisB ein großes Molekül und trägt zudem fünf geladene Aminosäuren. Ein Lösen im hydrophoben Bereich einer Membran und die Diffusion durch die Membran erscheinen daher aufgrund der Anzahl an Ladungen als unwahrscheinlich. Die Bildung einer kleinen Pore, durch den der Durchfluss von Protonen oder Hydroxyl-Ionen möglich wird, könnte die Equilibrierung des Protonengradienten erklären. Auch nicht auszuschließen ist, dass TisB durch Wechselwirkung mit Membranproteinen diese inhibiert und es in Folge dessen zur Depolarisierung kommt.

1.5 Charge–Zipper–Hypothese

Für die Ausbildung eines Ionenkanals oder einer Pore ist die Assemblierung von Peptiden notwendig. Wie schon erwähnt, liegen im TisB die polaren und geladenen Seitenketten auf einem Streifen entlang der Helix. Beim Betrachten der Abfolge der Ladungen fällt auf, dass diese, gespiegelt an einer imaginären Spiegelebene in etwa der Mitte des Peptids, komplementär angeordnet sind:



Eine Möglichkeit zur Assemblierung von TisB wäre die Bildung eines antiparallelen Dimers, stabilisiert durch Salzbrücken zwischen den negativ geladenen Aspartaten (Pos. 5 und 22) und den positive geladenen Lysinen (Pos. 12 und 26). Darüber hinaus könnten die Seitenketten der Glutamine an Position 19 Wasserstoffbrücken bilden und zur Stabilisierung dieses Dimers beitragen:



Die Bildung dieses Strukturmotivs, in welchem komplementär geladene Aminosäuren inter- oder intramolekulare Salzbrücken ausbilden, wird als „Charge–Zipper“ bezeichnet [38]. Ein solches Dimer würde das Eintauchen in eine Membran erheblich begünstigen, da sich komplementäre Ladungen im TisB so gegenseitig neutralisieren. Ebenso ließe sich anhand dieses Modells, die Funktion von TisB in Form einer kleinen Pore erklären, welche die Equilibrierung des Protonengradienten ermöglicht.

2. Zielsetzung

Erste Strukturuntersuchungen an TisB wurden bereits mittels Zirkulardichroismus- und Festkörper-NMR-Spektroskopie anlässlich der Diplomarbeit durchgeführt. Diese sollen im Rahmen der Dissertation erweitert werden, um genauere Informationen über das Verhalten des Peptids in Lipidmembranen zu erhalten und seine Funktion modellhaft zu erklären. Des Weiteren soll die Hypothese des Charge-Zippers belegt werden. Hierzu wird wie folgt vorgegangen:

- Die Synthese von weiteren ^{15}N - und ^{19}F -markierten TisB-Analoga und deren Strukturuntersuchungen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie ist vorgesehen, um detaillierte Informationen über die dreidimensionale Struktur des Peptids zu erhalten. Durch Variation der Konzentration und Temperatur sowie durch Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten, sollen mögliche Einflüsse dieser Parameter auf die Orientierung von TisB untersucht werden.
- Mittels fluoreszenzspektroskopischer Experimente soll gezeigt werden, dass TisB einen an einer Lipidmembran angelegten pH-Gradienten zu equilibrieren vermag.
- Verschiedene Mutationen sollen die Charge-Zipper-Hypothese und somit die Bildung der postulierten Salzbrücken sowie die Assemblierung von TisB zu einem antiparallelen Dimer aufzeigen. Hierzu sind verschiedene Ladungsmutanten zu synthetisieren und gegebenenfalls auftretende Einflüsse auf die Funktion zu untersuchen.
- Die Oligomerisierung von TisB soll mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) untersucht werden und die Hypothese des antiparallelen Dimers belegen.
- NMR-spektroskopisch soll die Messung eines intermolekularen Abstands zwischen den vermuteten Dimeren die Charge-Zipper-Hypothese zusätzlich unterstützen.
- Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse soll ein Modell entwickelt werden, welches die Funktion von TisB in der Membran auf molekularer Ebene veranschaulicht und erklärt.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1 Zirkulardichroismus–Spektroskopie

Die Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen lässt sich mit Hilfe der Zirkulardichroismus–Spektroskopie (CD–Spektroskopie) bestimmen. Dabei wird die Chiralität von Molekülen ausgenutzt. Optisch aktive Moleküle absorbieren rechts und links zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark (CD–Effekt).

Zirkular und elliptisch polarisiertes Licht

Durch Überlagerung zweier linear polarisierter Lichtwellen mit gleicher Frequenz, welche um $\lambda/4$ in ihrer Phase verschoben sind und deren Schwingungsebenen senkrecht zueinander stehen, entsteht zirkular polarisiertes Licht (Abbildung 3.1 A). Die Spitzen der elektrischen Feldvektoren dieser Lichtwellen bewegen sich mit konstanter Winkelgeschwindigkeit auf einem Kreis senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Beim Durchgang durch optisch aktive Substanzen werden die rechts bzw. links zirkular polarisierten Komponenten des Lichts unterschiedlich stark absorbiert. Dies führt dazu, dass die elektrischen Feldvektoren \vec{E}_R und \vec{E}_L sich nun in ihrer Amplitude voneinander unterscheiden und es bei der Überlagerung von beiden zur Entstehung von elliptisch polarisiertem Licht kommt (Abbildung 3.1 B). Dieser Unterschied $\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R) * c * d$ ist die in der CD–Spektroskopie gemessene Größe und steht mit der Elliptizität θ in folgender Beziehung: $\theta = 32.98 * \Delta A$.

CD–Effekt in Peptiden und Proteinen

In Proteinen kommt die unterschiedlich starke Absorption der rechts bzw. links zirkular polarisierten Komponenten des Lichts im Wellenlängenbereich von 180 – 240 nm durch Anregung der Bindungselektronen der Peptidbindung im Rahmen von $n-\pi^*$ – (bei etwa 220 nm) und $\pi-\pi^*$ – (bei etwa 190 nm und 208 nm) Übergängen zustande, wodurch die charakteristischen Spektren der verschiedenen Sekundärstrukturelemente entstehen (Abbildung 3.1 C). Dabei sind die benachbarten C_α –Atome die Chiralitätszentren. Ein positives CD–Signal erhält man, wenn das links polarisierte Licht stärker absorbiert wird. Ist die Absorption des rechts polarisierten Lichts stärker, erhält man ein negatives CD–Signal. Eine α –helikale Struktur zeigt zum Beispiel drei ausgeprägte charakteristische Banden, bei 192 nm im positiven Bereich sowie zwei negative Banden bei 208 und 222 nm [39–41].

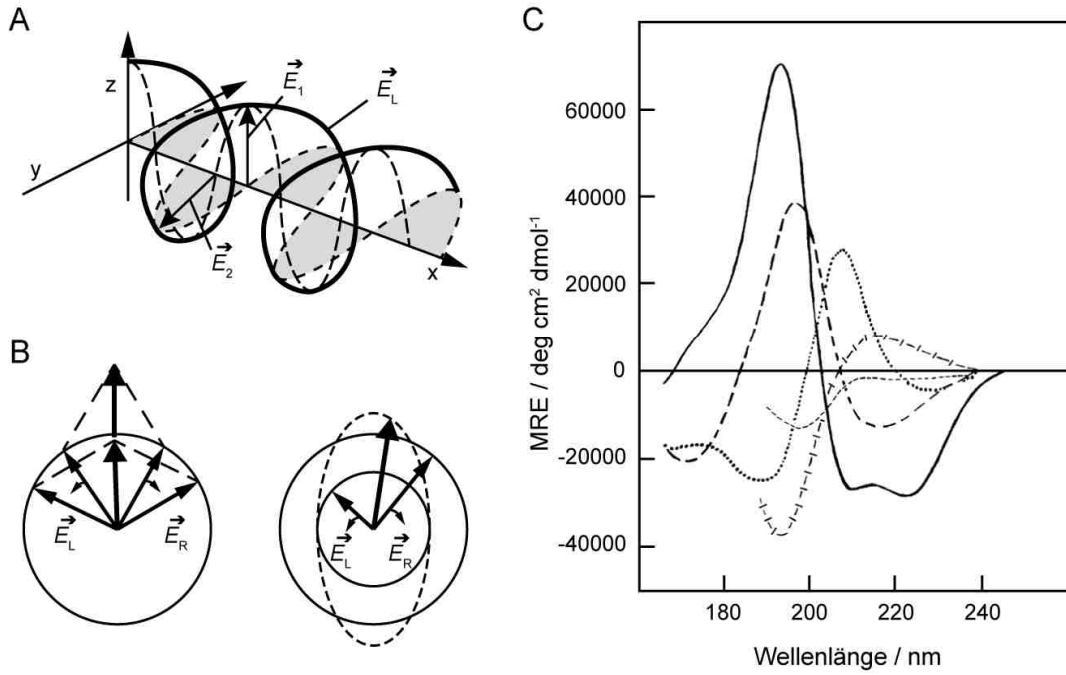


Abbildung 3.1: (A) Entstehung von zirkular polarisiertem Licht durch Kombination zweier linear polarisierter Komponenten \vec{E}_1 und \vec{E}_2 , welche orthogonal zueinanderstehen und um den Betrag $\lambda/4$ gegeneinander phasenverschoben sind. (B) Entstehung des CD-Effekts: Beide Komponenten haben die gleiche Amplitude (links), bei unterschiedlicher Amplitude entsteht elliptisch polarisiertes Licht (rechts). (C) CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturelemente: α -Helix (Linie), β -Faltblatt (lange Striche), β -Schleife (gepunktet), Polyprolin-II-Helix (gekreuzte Striche), unstrukturiert (kurze Striche). Modifiziert übernommen aus [39,40].

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer Peptidlösung kann durch Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums bestimmt werden, da im Bereich von 250 bis 290 nm die Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sowie Disulfidbrücken absorbieren. Mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration bestimmt werden:

$$c = \frac{A_{280}}{(\epsilon_{280} + \epsilon'_{280} + \dots) * d} \quad (3.1)$$

c = Konzentration [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

A_{280} = Absorption bei 280 nm

ϵ_{280} = Extinktions-/Absorptionskoeffizient bei 280 nm [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Berechnung von MRE-Werten

Für die Darstellung von CD-Spektren werden die gemessenen Elliptizitäten nach Gleichung (3.2) und (3.3) in die entsprechenden MRE-Werte $[\theta]_{\text{MRE}}$ (*mean residue ellipticity*) umgerechnet:

$$[\theta]_{MRE} = \frac{100 * \theta}{C_r * d} \quad (3.2)$$

$$C_r = \frac{n * c_g}{M_W} \quad (3.3)$$

θ = Elliptizität [deg]

C_r = molare Konzentration pro Peptidbindung [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

n = Anzahl der Peptidbindungen

c_g = Proteinkonzentration [$\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]

M_W = Molekulargewicht des Proteins [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

Sekundärstrukturanalyse

Die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente in einem Peptid lassen sich durch Dekonvolution der CD-Spektren quantifizieren. Unter der Annahme, dass ein CD-Spektrum aus den Beiträgen aller im Peptid vorhandenen Sekundärstrukturelemente (α -Helix, paralleles und antiparalleles β -Faltblatt, Zufallsknäuel, etc.) linear additiv zusammengesetzt ist, lässt sich mit Hilfe spezieller Algorithmen und Protein-Referenzdatensätze, welche die prozentualen Sekundärstrukturanteile bekannter Proteine enthalten (aus der Röntgenkristallografie ermittelt), der Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelemente eines unbekanntes Peptids berechnen [39].

3.2 NMR-Spektroskopie

Die in dieser Arbeit genutzten Methoden der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden im Folgenden etwas näher erläutert.

3.2.1 Allgemeines

Zur Untersuchung von Biomolekülen haben sich die in Tabelle 3.1 aufgeführten Kerne als besonders geeignet erwiesen. Die Sensitivität der genannten Kerne unterscheidet sich allerdings deutlich voneinander, wobei sich Fluor aufgrund seines hohen gyromagnetischen Verhältnisses und 100% relativer Häufigkeit als nutzbare NMR-Sonde besonders hervorhebt. Mit 83.3% der Empfindlichkeit gegenüber ^1H eignet es sich hervorragend für die Markierung von unempfindlichen biologischen Proben. Störende Hintergrundsignale sind nicht zu erwarten, da von Natur aus Fluor in Peptiden und Proteinen nicht vorkommt. Für Untersuchungen, in

welchen die Struktur eines Moleküls nicht verändert werden soll, eignet sich vor allem der ^{15}N -Kern, da in einer Peptidbindung bereits ein Stickstoffatom vorhanden ist. Die Empfindlichkeit dieses Kerns ist jedoch deutlich geringer, wodurch der Einsatz von größeren Peptidmengen notwendig ist.

Tabelle 3.1: Physikalische Eigenschaften zur Untersuchung von Biomolekülen geeigneter Kerne [42].

Isotop	^1H	^2H	^{13}C	^{15}N	^{19}F	^{31}P
Kernspin I	1/2	1	1/2	1/2	1/2	1/2
Gyromagnetisches Verhältnis $\gamma/2\pi$ [MHz · T ⁻¹]	42.58	6.53	10.70	-4.31	40.03	17.23
Natürliche Häufigkeit [%]	99.985	0.015	1.1	3.7	100	100
Relative Empfindlichkeit [%]	100	0.96	1.59	0.10	83.3	6.63

Für die Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen in Lipidmembranen hat sich die Festkörper-NMR-Spektroskopie als eine bestens geeignete Methode erwiesen, da sie gegenüber anderen Methoden den Vorteil hat, dass Peptide und Proteine in einer flüssig-kristallinen Lipidmembran in voll hydratisiertem Zustand und unter physiologischen Bedingungen untersucht werden können.

3.2.2 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Während in der NMR-Spektroskopie in flüssiger Phase die J-Kopplung und die isotrope chemische Verschiebung von Bedeutung sind, sind bei der Festkörper-NMR vor allem dipolare Wechselwirkungen, die anisotrope chemische Verschiebung und für Kerne mit einem Kernspin größer 1/2 auch quadrupolare Wechselwirkungen von Bedeutung.

Die dipolare Kopplung

Zwei Kerne, welche sich in unmittelbarer Nähe befinden, können durch ihr magnetisches Dipolmoment über den Raum miteinander wechselwirken. Diese im Festkörper für Kerne mit Spin größer 1/2 vorherrschender Wechselwirkung, der dipolaren Kopplung, führt zu einer Aufspaltung des NMR-Signals. Die dipolare Kopplungskonstante Δ_{AB} zweier Spins A und B im Abstand r ist proportional zu r^{-3}

$$\Delta_{AB} \sim \frac{\gamma_A \gamma_B}{r^3} \quad (3.4)$$

Die Größe der Aufspaltung ist also abhängig vom Abstand r der beiden Kerne zueinander (Abbildung 3.2). Aufgrund der axialen Symmetrie des dipolaren Tensors variiert die Aufspaltung Δ_{AB} mit dem Winkel θ des Vektors der Verbindungsachse der Kerne zum äußeren Magnetfeld folgendermaßen:

$$\Delta_{AB}(\theta) = \Delta_{AB}^0 \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{2} \quad (3.5)$$

Die maximal möglich Aufspaltung für $\theta = 0$ ist dabei gegeben durch die Proportionalitätskonstante Δ_{AB}^0 .

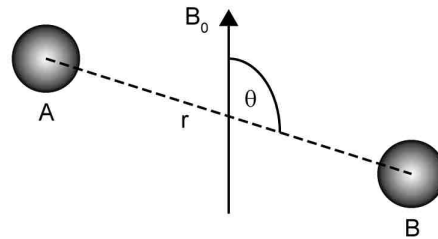


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zweier Kerne A und B im Raum: Die Aufspaltung im NMR-Spektrum ist nach Formel (3.4) und (3.5) abhängig vom Abstand r und dem Winkel θ .

Die Anisotropie der chemischen Verschiebung

Die chemische Verschiebung eines Kerns hängt unter anderem von der Orientierung des gesamten Moleküls ab. Man spricht bei diesem Effekt von der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA), welcher sich vor allem in der Festkörper-NMR bemerkbar macht, da hier nicht wie in Lösung, die Orientierungsabhängigkeit durch schnelle Molekülbewegungen ausgeglichen wird. Beschrieben wird diese Anisotropie mathematisch durch einen CSA-Tensor, einer 3×3 -Matrix, welche sich als Ellipsoid mit drei Hauptachsen σ_{11} , σ_{22} und σ_{33} darstellen lässt (Abbildung 3.3 A). σ_{33} ist dabei das am meisten abgeschirmte, σ_{11} das am wenigsten abgeschirmte CSA-Tensor-Element und besitzt damit die höchste Resonanzfrequenz. Die zugehörigen Resonanzfrequenzen sind δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} . Der isotrope Wert der chemischen Verschiebung ist gegeben durch $\delta_{\text{iso}} = (\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33})/3$. Die Überlagerung aller im Raum möglichen Orientierungen ergibt ein Pulverspektrum im Frequenzbereich Ω (Abbildung 3.3 B). Die Intensität einer bestimmten Frequenz steht dabei für die Anzahl der Tensoren mit gleicher Orientierung zum externen Magnetfeld.

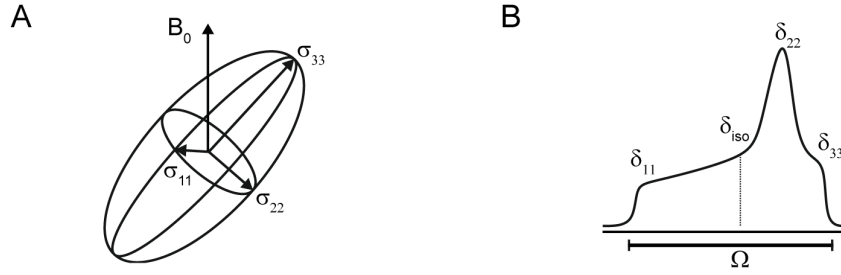


Abbildung 3.3: (A) Ellipsoide Darstellung eines CSA-Tensors mit den drei Hauptachsen σ_{11} , σ_{22} und σ_{33} . (B) Linienform eines Pulverspektrums, hervorgerufen durch die Anisotropie der chemischen Verschiebung.

Moleküldynamik

Bei der Strukturanalyse von Peptiden und Proteinen muss die Molekülbewegung berücksichtigt werden. Dies ist zum einen die Rotation des gesamten Peptids um die Membrannormale sowie der eigenen Rotation der NMR-Sonde. Der winkelabhängige Term der dipolaren Kopplung wird beschrieben durch:

$$\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle = \frac{(3\cos^2\alpha - 1)}{2} * \frac{\langle 3\cos^2\beta - 1 \rangle}{2} \quad (3.6)$$

α = Winkel zwischen der Rotationsachse und B_0

β = Winkel zwischen dem Kernverbindungsvektor und der Rotationsachse

Im Falle einer schnell rotierenden CF_3 -Gruppe ist β orthogonal zur Rotationsachse, wodurch die dipolare Kopplung um den Faktor $-1/2$ reduziert wird.

Beim Betrachten der Rotation des gesamten Moleküls um die Membrannormale gilt:

$$\Delta_{CF_3} = \Delta_{CF_3}^0 \frac{\langle 3\cos^2\gamma - 1 \rangle}{2} * \frac{\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle}{2} \quad (3.7)$$

Hierbei beschreibt γ den Winkel zwischen Membrannormale N und B_0 , θ ist der Winkel zwischen der CF_3 -Methylachse und der Membrannormalen N . Für eine orientierte Probe in welcher die Membrannormale N parallel zum Magnetfeld B_0 ist (also $\gamma = 0$), folgt somit:

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

Wird diese Probe um 90° gedreht, so wird die dipolare Kopplung um den Faktor $-1/2$ vermindert, da dann die Membrannormale N orthogonal zum Magnetfeld ist (Abbildung 3.4).

Eine zusätzliche Bewegung des Moleküls, welche die dipolare Kopplung ebenfalls beeinflusst, wird durch die Einführung des Ordnungsparameters S_{mol} beschrieben, der Werte zwischen 0 (maximale Mobilität) und 1 (eingeschränkte Mobilität) annehmen kann. Es folgt letztendlich:

$$\Delta_{CF_3} = \Delta_{CF_3}^0 \frac{\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle}{2} * S_{mol} \quad (3.9)$$

wobei θ hier den zeitlich gemittelten Winkel zwischen dem betrachteten Spinwechselwirkungstensor und der Membrannormalen N beschreibt [42].

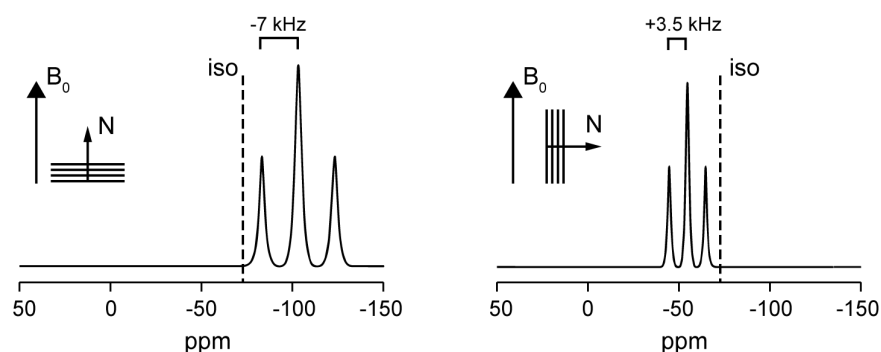


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Aufspaltung (dipolare Kopplung) einer CF_3 -Gruppe im ^{19}F -NMR-Spektrum: Bei paralleler Orientierung der Membrannormalen N zum Magnetfeld B_0 beträgt die dipolare Kopplung -7 kHz (links). Durch Drehen der Probe um 90° wird die Kopplung um den Faktor $-1/2$ reduziert und das Signal aufgrund des negativen Vorzeichens an der isotropen Linie gespiegelt (rechts).

Festkörper- ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Die für die Festkörper- ^{19}F -NMR-Spektroskopie benötigten Peptide werden mit einer speziellen Aminosäure, dem 3-(Trifluoromethyl)-bicyclopent-[1.1.1]-1-ylglycin (CF_3 -Bpg), welches in Abbildung 3.5 dargestellt ist, markiert. Diese Aminosäure enthält die notwendige NMR-Sonde in Form einer CF_3 -Gruppe und erfüllt alle anderen notwendigen Kriterien: Zum einen muss die Sonde starr am Peptidrückgrad gebunden sein, damit die globale Peptidstruktur wiedergegeben wird. Ebenso darf die Seitenkette die lokale Konformation des Peptids nicht stören. Aufgrund ähnlicher Größe eignet sich diese Aminosäure im Besonderen zur Substitution der ebenfalls hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin. Außerdem ist die Einführung in ein Peptid mittels Festphasenpeptidsynthese nach konventionellem Fmoc-Protokoll problemlos möglich.

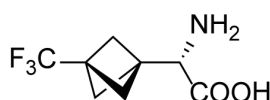


Abbildung 3.5: Strukturformel der Aminosäure 3-(Trifluoromethyl)-bicyclopent-[1.1.1]-1-ylglycin (CF_3 -Bpg), welche als NMR-Sonde eingesetzt wird. Die Synthese wird in [43,44] beschrieben.

Um Informationen über die Struktur und Dynamik eines mit dieser Aminosäure markierten α -helikalen Peptids in einer Lipidmembran zu erhalten, müssen insgesamt drei verschiedene Parameter bestimmt werden (Abbildung 3.6). Diese sind:

- Neigungswinkel τ der Helixachse relativ zur Membrannormalen,
- Azimutale Rotationswinkel ρ um die Helixachse,
- Ordnungsparameter S_{mol} , der ein Maß für das unspezifische Wackeln der Helix darstellt.

Der Winkel θ spiegelt die lokale Orientierung der CF_3 -Gruppe relativ zum angelegten Magnetfeld B_0 wieder und kann aus den gemessenen dipolaren Kopplungen nach Gleichung (3.6) berechnet werden. Aus mehreren Werten von θ an unterschiedlich markierten Positionen ist es dann möglich, die drei anderen der oben genannten Parameter zu bestimmen. Es müssen mindestens vier verschiedene Positionen eines Peptids markiert sein, um genaue Informationen über die strukturelle Orientierung zu erhalten [43,45].

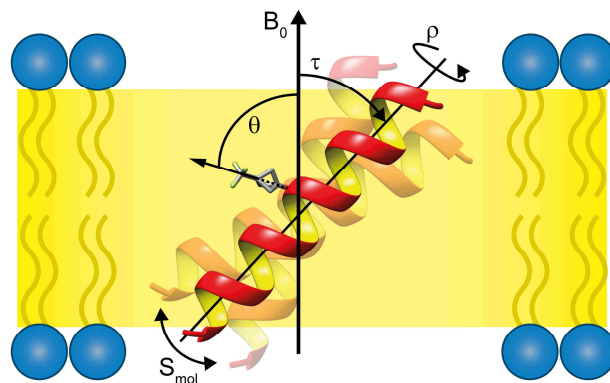


Abbildung 3.6: Ideale Helix in einer Modell-Lipidmembran. Zur Berechnung der Peptidkonformation, welche durch den Neigungswinkel τ , dem azimutalen Rotationswinkel ρ und dem Ordnungsparameter S_{mol} gegeben ist, müssen mindestens vier lokale Winkel θ von Peptiden, welche an unterschiedlichen Positionen markiert sind, bestimmt werden.

Festkörper- ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Die Qualität der Lipidmembran einer orientierten Probe lässt sich durch Aufnahme von ^{31}P -NMR-Spektren, vor und nach den ^{19}F - oder ^{15}N -NMR-Experimenten, schnell und einfach überprüfen. Der Phosphorkern besitzt eine ausreichend hohe NMR-Empfindlichkeit (etwa 40% gegenüber ^1H) und aufgrund seines natürlichen Vorkommens von 100% ist er Bestandteil in allen Phospholipiden, wodurch eine Markierung mit einem bestimmten Isotop nicht notwendig ist. Die chemische Verschiebung des Phosphors der Phosphatgruppen in Lipiden ist abhängig von deren Orientierung zum äußeren Magnetfeld. Sind die Lipide einer Doppelschicht parallel zum angelegten Magnetfeld ausgerichtet, kommt es zur Tieffeldverschiebung.

Bei einer zum Magnetfeld orthogonalen Orientierung kommt es zur Hochfeldverschiebung (Abbildung 3.7 A). Sind die Lipide nicht in eine bestimmte Vorzugsrichtung ausgerichtet, so erhält man ein Pulverspektrum (Abbildung 3.7 B) [33].

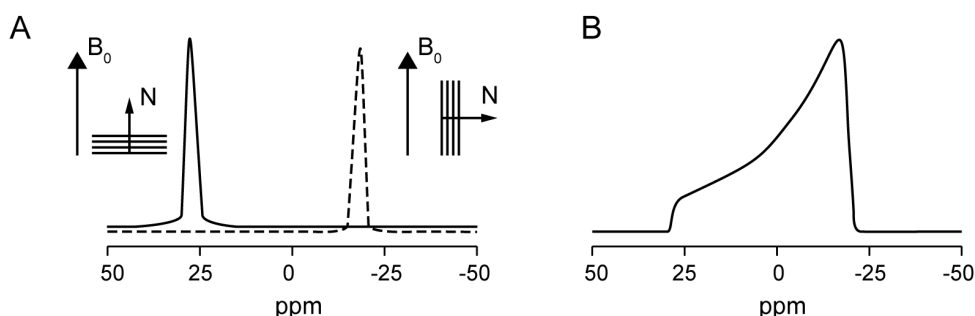


Abbildung 3.7: (A) Beispielspektren einer orientierten NMR-Probe. Das hochfeldverschobene linke Signal zeigt, dass die Lipiddoppelschichten orthogonal zum angelegten Magnetfeld ausgerichtet sind. Das rechte Signal (Tiefelfeldverschiebung) kommt durch parallele Ausrichtung zustande. (B) Pulverspektrum einer Vesikelprobe, in welcher die Lipide alle Orientierungen annehmen (Abbildungen schematisch).

Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektroskopie

Ein alternativer und auch bekannter Kern, welcher in der Strukturuntersuchung von membrangebundenen Peptiden und Proteinen häufig genutzt wird, ist der ^{15}N -Kern. Aus einem Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektrum eines an einer Position selektiv isotoopenmarkierten Peptids können qualitative Ergebnisse über die Peptidkonformation gewonnen werden. Markiert wird dabei ein Stickstoff der Peptidbindung im Peptidrückgrad, wodurch die Struktur des Moleküls nicht verändert wird. Das σ_{33} -Element des CSA-Tensors ist ungefähr entlang der N-H-Bindung ausgerichtet. In α -helikalen Peptiden ist der N-H-Bindungsvektor nahezu parallel zur Helixachse und somit ist auch der Tensor parallel zu dieser. Aufgrund dieser Gegebenheiten lässt sich anhand der chemischen Verschiebung des ^{15}N -Signals, die Orientierung des Peptids qualitativ bestimmen. Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, erstreckt sich ein ^{15}N -Pulverspektrum über einen Bereich von etwa 50 bis 230 ppm. Ein Signal um 210 ppm steht für eine transmembrane Orientierung. Eine parallel zu den Membranschichten ausgerichtete bzw. auf der Membranoberfläche liegende Orientierung wird durch ein Signal bei etwa 70 ppm wiedergegeben [33,42].

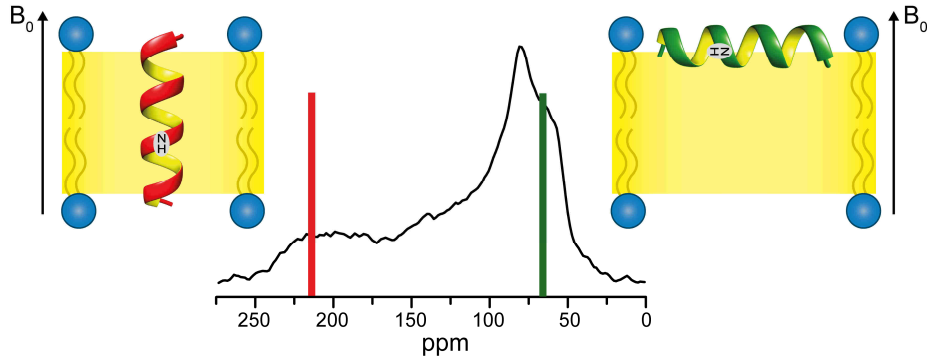


Abbildung 3.8: Das ^{15}N -NMR-Pulverspektrum erstreckt sich über einen Bereich von etwa 50 bis 230 ppm. Ein Signal bei ungefähr 210 ppm zeigt eine transmembrane Orientierung (rote Linie, Bild links), den oberflächlich gebundenen Zustand eines Peptids zeigt ein Signal bei etwa 70 ppm (grüne Linie, Bild rechts).

3.2.3 Abstandsmessungen mittels CPMG-Experiment

Strukturelle Informationen können aus der homonuklearen dipolaren Kopplung gewonnen werden. Diese ist, wie bereits erwähnt, abhängig vom Abstand r und der internuklearen Orientierung θ des Kernverbindungsvektors relativ zum äußeren Magnetfeld. Die Aufspaltung in einem rein dipolaren Spektrum ist gegeben durch:

$$\Delta = \frac{3\gamma^2 \hbar}{2\pi r^3} \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) \quad (3.10)$$

Ein solches Spektrum erhält man durch Verwendung einer speziellen CPMG-Multipulssequenz. Wie in Abbildung 3.9 besteht diese aus einer Abfolge von vielen aufeinanderfolgenden 90° und 180° Pulsen. Die Verzögerung von der Mitte eines π -Pulses zur Mitte des nächsten π -Pulses beträgt 2τ . Zu beachten ist, dass die beobachtete Aufspaltung um einen Faktor $(1 - (9/8) \cdot D)$ reduziert wird. D wird als „Duty-cycle“ bezeichnet und ist gegeben durch $D = t_w/2\tau$ ist. t_w ist hierbei die Dauer des Initialpulses [42,46].

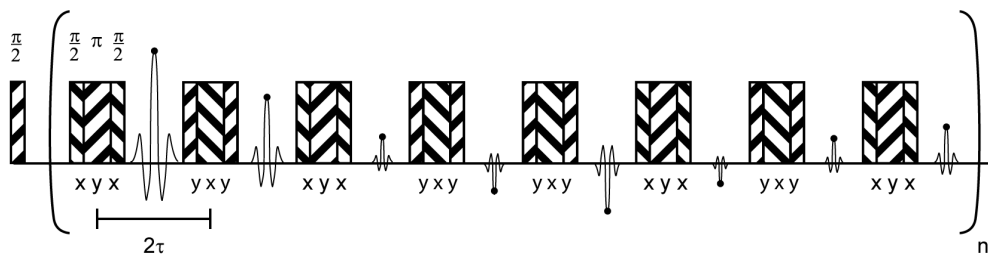


Abbildung 3.9: Die CPMG-Multipulssequenz (hier dargestellt ein xy8-Phasenzklus) wird benutzt, um aus einem statischen Experiment die dipolare Kopplung zu entfernen. Die chemische Verschiebung, heteronukleare dipolare Kopplungen und Feldinhomogenität sind refokussiert, während sich die homonuklearen dipolaren Wechselwirkungen während des „Echo-Zugs“ entwickeln. Das reine dipolare Spektrum erhält man durch Fourier-Transformation der oszillierenden Echo-Amplituden. [46]

Als ^{19}F -NMR-Sonde für die Abstandsmessung mittels CPMG wird die in Abbildung 3.10 dargestellte Aminosäure verwendet. Sie eignet sich aufgrund ähnlicher Größe und Struktur besonders zur Substitution von Glutamin.

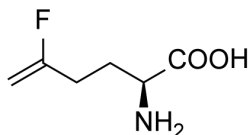


Abbildung 3.10: Strukturformel der Aminosäure 2-Amino-5-fluorhex-5-ensäure¹, welche als NMR-Sonde für die Abstandsmessung im CPMG-Experiment eingesetzt wird.

3.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Fluoreszenzspektroskopie werden im Folgenden kurz dargestellt.

3.3.1 pH-Wert Bestimmung in Lipid-Vesikeln mit Pyranin

Der Farbstoff Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonat, HPTS) eignet sich aufgrund seiner pH-abhängigen Fluoreszenzeigenschaften zur Bestimmung des pH-Wertes innerhalb von Lipid-Vesikeln [47–49]. Pyranin besitzt drei Anregungsbanden bei etwa 380, 400 und 450 nm. Im sauren Milieu liegt das Anregungsmaximum bei 400 nm, da die 8-Hydroxygruppe protoniert ist. Im Basischen liegt das Molekül im deprotonierten Zustand vor und das Anregungsmaximum liegt bei 450 nm (Abbildung 3.11). Das Maximum der Emissionsbande liegt dabei immer bei 510 nm.

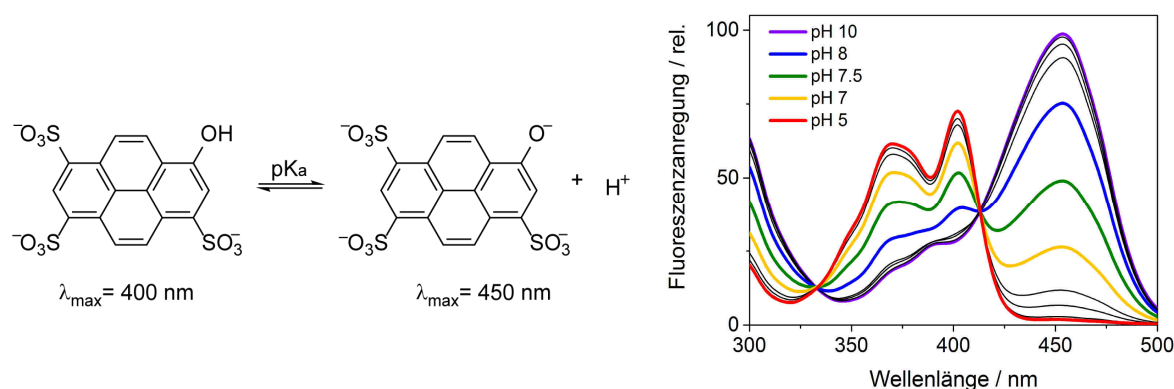


Abbildung 3.11: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonat, HPTS) in protoniertem und deprotoniertem und die pH-Abhängigkeit seiner Fluoreszenzanregung.

¹ Wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Haufe (Westfälischen Wilhelms-Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Werden Lipid-Vesikel mit einem definierten pH-Wert präpariert, die den oben gezeigten Farbstoff im Inneren enthalten, so kann durch Aufnahme seiner Fluoreszenzspektren der pH-Wert im Inneren bestimmt werden. Dazu wird der Farbstoff bei 404 und 454 nm angeregt und das Verhältnis der Emissionen ($E_{m_{Exc.454}}/E_{m_{Exc.404}}$) gemessen. Wenn nun beispielsweise membranaktive Peptide die Integrität der Membran beeinflussen (Abbildung 3.12) und dadurch ein angelegter Protonengradient zwischen dem Inneren und Äußeren der Vesikel zusammenbricht, kann dieser Abfall des Gradienten auch zeitlich aufgelöst verfolgt werden.

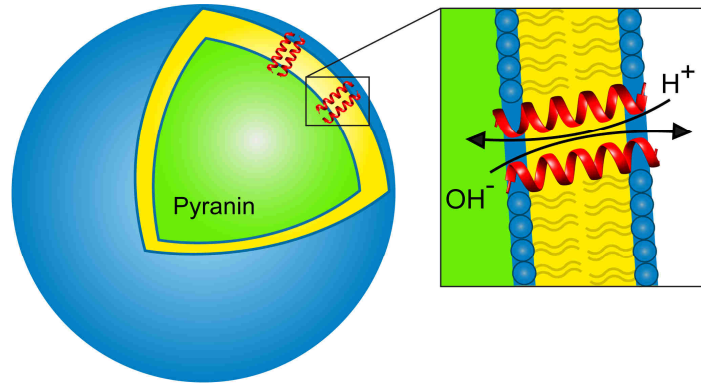


Abbildung 3.12: Lipid-Vesikel mit Pyranin (grün) im Inneren. Kommt es zum Beispiel durch membranaktive Peptide zu einem Ausgleich des pH-Wertes zwischen dem Vesikel-Inneren und -Äußeren, so kann dieser Vorgang zeitaufgelöst verfolgt werden.

3.3.2 Resonanzenergietransfer nach Förster

Der sogenannte Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beruht auf elektrischen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen einem angeregten Donormolekül und einem Akzeptor. Damit ein Energietransfer stattfinden kann, müssen Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe lokalisiert sein und das Absorptionsspektrum des Akzeptors A (wie in Abbildung 3.13 gezeigt) mit dem Emissionsspektrum des Donors D überlappen [39].

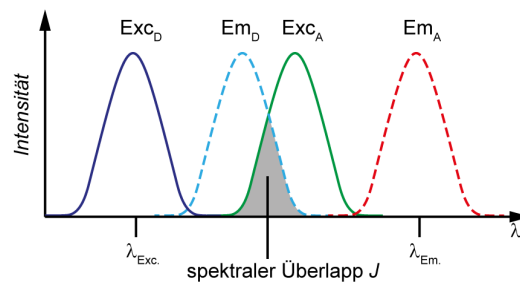


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung von Excitations- (durchgezogene Linien) und Emissionsspektren (gestrichelte Linien) eines Donor-Akzeptor-Paares. Ein Förster-Resonanzenergietransfer kann aufgrund des spektralen Überlapps J stattfinden.

Der Energietransfer E ist unter anderem abhängig von dem Förster-Abstand r_0 des FRET-Paares und nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes r zwischen Donor und Akzeptor ab. Es gilt:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{r_0}\right)^6} \quad (3.11)$$

Der Förster-Abstand r_0 ist der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül, bei dem die Effizienz des Energietransfers 50% beträgt. Er ist für jedes FRET-Paar spezifisch und kann bis zu 8 nm betragen. Es sind daher Abstände bis 8 nm detektierbar. [50,51]

In dieser Arbeit wurde Tryptophan als Donor und Dansyl als Akzeptor verwendet. Der Förster-Abstand dieses FRET-Paares liegt im Bereich von 2.1 bis 2.4 nm [52]. Der Vorteil bei der Verwendung von Tryptophan ist, dass diese Aminosäure zum einen in vielen Peptiden und Proteinen von Natur aus vorkommt, oder je nach Bedarf an die gewünschte Position mit Standardmethoden der Peptidsynthese eingebaut werden kann. Dansyl eignet sich ebenfalls gut für den Einbau in Peptide, da es im Vergleich zu anderen Akzeptoren ein relativ kleines Molekül ist und daher kein Einfluss auf die Struktur zu erwarten ist. Weiterhin ist die Einführung von Dansyl in ein Peptid ebenfalls durch einfache chemische Methoden möglich.

FRET zur Untersuchung von Assemblierung

Neben der Bestimmung von räumlicher Nähe bzw. von Molekülabständen kann durch FRET-Experimente auch die Assemblierung von Peptiden oder Proteinen bzw. die Oligomerisierung von Molekülen bestimmt werden. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen kann dies durch die Fluoreszenzlöschung des Donors (Donor-Quenching) geschehen [53] oder als Alternative kann man auch anhand der Akzeptor-Emission die Anzahl der Untereinheiten bestimmen [54]. In Abbildung 3.14 sind beide Möglichkeiten schematisch dargestellt. Beim Quenchen ist die Intensität der Donor-Emission I_D bei Anwesenheit des Akzeptors vermindert, im anderen Fall ist die Akzeptor-Emission I_A erhöht. Es gilt folgender Bezug:

$$E_{app,dq} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (3.12)$$

$$E_{app,se} = \left(\frac{I_{AD}}{I_A} - 1\right) * \frac{\varepsilon_A(\lambda)}{\varepsilon_D(\lambda)} \quad (3.13)$$

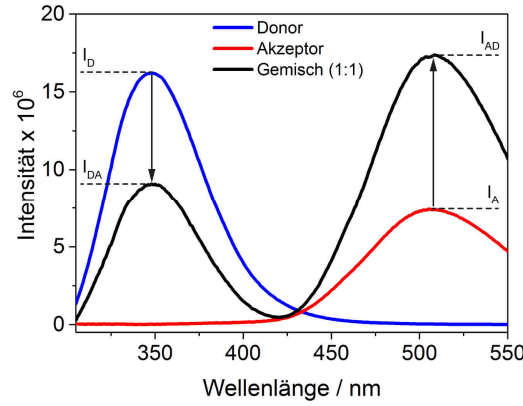


Abbildung 3.14: Emissionsspektren des verwendeten FRET-Paares: Die Einzelspektren des Donors (blau) und Akzeptors (rot) zeigen die Intensitäten I_D bzw. I_A , das Spektrum des Gemisches aus Donor und Akzeptor (schwarz) zeigt eine schwächere Donor-Intensität I_{DA} sowie eine erhöhte Intensität I_{AD} der Akzeptor-Emission.

Um die Anzahl der an der Oligomerisierung beteiligten Untereinheiten zu bestimmen, wird beim Quenchen des Donors die Fluoreszenzlöschung $E_{app,dq}$ als Funktion des Molenbruchs des Akzeptors x_A aufgetragen und an die Funktion

$$E_{app,dq} = E * (1 - (1 - x_A)^{n-1}) \quad (3.14)$$

angepasst. E ist dabei die FRET-Effizienz und n die Anzahl der Untereinheiten im Oligomer. Die durch den Donor verstärkte Emission des Akzeptors $E_{app,se}$ wird in Abhängigkeit des Donor Molenbruchs x_D durch die Funktion

$$E_{app,se} = E * \frac{x_D}{1 - x_D} (1 - x_D^{n-1}) \quad (3.15)$$

beschrieben. Diese beiden Funktionen sind in Abbildung 3.15 in Abhängigkeit der Anzahl an Untereinheiten n im Oligomer dargestellt, wobei dabei die folgenden Annahmen vorausgesetzt werden: Zum einen wird davon ausgegangen, dass die Einführung der Fluoreszenzfarbstoffe keinen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten des Peptids hat und alle Wechselwirkungen zufälliger Natur sind. Außerdem geht man davon aus, dass alle Peptide assemblieren und dass die Anzahl an Peptiden in den einzelnen Vesikeln groß genug ist, um die Gesamtverteilung der Peptide im Ganzen präzise widerzuspiegeln [53–55].

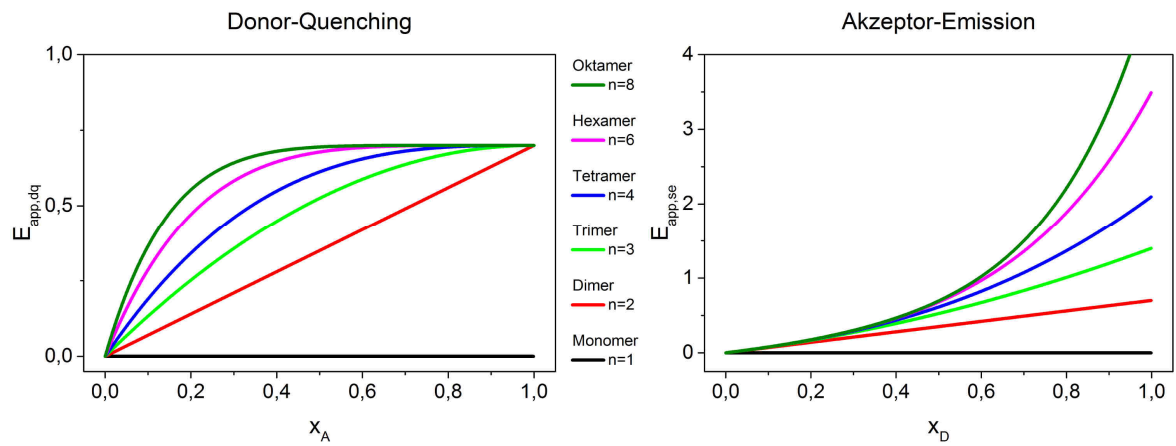


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung des Donors und der verstärkten Emission des Akzeptors in Abhängigkeit des Molenbruchs x_A bzw. x_D und der Anzahl n an Untereinheiten im Oligomer (hier dargestellt für einen Energietransfer mit $E=0.7$).

4. Material und Methoden

Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Anhang A aufgelistet.

4.1 Peptidsynthese

Die Synthesen wurden im 100 μ M Ansatz durchgeführt. Als Harz wurde Fmoc-Lys(Boc)-Wang Harz (Beladung: 0.66 mmol/mg, 0.70 mmol/mg und 0.34 mmol/mg) verwendet. Zu der entsprechenden Menge Harz wurden vor Beginn der Synthese 5 ml DMF und 5 ml NMP gegeben und 1 h gewartet. Danach wurde die Synthese automatisiert begonnen und nach Bedarf manuell fortgesetzt. Nach vollständiger Synthese des Peptids und Abspaltung der letzten temporären Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz mehrfach mit DCM sowie Methanol gewaschen und anschließend unter vermindertem Druck für mehrere Stunden getrocknet.

4.1.1 Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierten Peptidsynthesen wurden an einem Mikrowellenpeptidsynthesizer der Firma CEM, Modell Liberty, durchgeführt.

Kupplung der Aminosäuren

Alle Aminosäuren wurden durch sogenannte Doppelkupplung in zwei Schritten angefügt. Im ersten Kupplungsschritt wurden 5 Äquiv. Aminosäure mit je 5 Äquiv. HBTU/HOBt und 10 Äquiv. DIPEA in NMP zum Harz gegeben. Im zweiten Kupplungsschritt wurde anstelle von HBTU das Kupplungsreagenz PyBOP verwendet. Die Reaktionszeit betrug jeweils 5 min bei 75 °C unter Verwendung von Mikrowellen. Ab Pos. 11 wurde die Reaktionszeit zusätzlich um 30 min bei Raumtemperatur verlängert. Zwischen den einzelnen Kupplungen wurde jeweils dreimal mit NMP gewaschen. Die Konzentrationen der Aminosäurelösungen betragen 0.57 mol/l, DIPEA wurde zu 2.0 mol/l mit NMP gemischt und die Kupplungsreagenzien hatten eine Konzentration von 0.49 mol/l.

Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 20% Piperidin in DMF für 3 min bei 75 °C, ebenfalls unter Verwendung von Mikrowellen. Dieser Schritt wurde jeweils zweimal, direkt aufeinanderfolgend, durchgeführt.

4.1.2 Manuelle Peptidsynthese

Die manuelle Peptidsynthese wurde bei Raumtemperatur mittels Doppelkupplung durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde dreimal mit DMF gewaschen. Für die manuelle Peptidkupplung der Aminosäuren wurden 10 Äquiv. Aminosäure (1.0 mmol) mit 10 Äquiv. Kupplungsreagenz (1.0 mmol, zuerst HBTU/HOBt danach PyBOP/HOBt) und 20 Äquiv. DIPEA (2.0 mmol) in 2 ml DMF umgesetzt. Die Reaktionsdauer betrug pro Kupplungsschritt 2 h. Zur Entschützung der temporären Schutzgruppe wurden 2 ml Piperidin (20% in DMF) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 30 min.

4.1.3 Einführung der Fmoc-Schutzgruppe

Die verwendeten ^{15}N -markierten Aminosäuren wurden käuflich erworben. Vor ihrer Verwendung in der Peptidsynthese wurde der freie N-Terminus mit der Fmoc-Schutzgruppe versehen.

Einführung mit Fmoc-Cl

Es wurde 1 Äquiv. ^{15}N -Alanin (11.1 mmol) in 23 ml 2.2 Äquiv. Na_2CO_3 -Lösung (13.3 mmol) gelöst. Bei 0 °C wurden tropfenweise 1.2 Äquiv. Fmoc-Cl (12.3 mmol), gelöst in 15 ml Dioxan, hinzugegeben. Nach der Zugabe wurde zuerst für 15 min bei 0 °C und danach bei Raumtemperatur für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurden 300 ml Wasser hinzugeben, dreimal mit jeweils 100 ml Diethylether gewaschen und bei 0 °C mit 20%iger HCl ein pH-Wert von 2 eingestellt. Es wurde viermal mit jeweils 100 ml Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, etwas n-Hexan hinzugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1) gelöst, bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Erhalten wurden 3.3 g.

Einführung mit Fmoc-OSu

1 Äquiv. ^{15}N -Leucin (7.56 mmol) wurden in 30 ml 2.5 Äquiv. Na_2CO_3 -Lösung (18.9 mmol). Bei 0 °C wurden tropfenweise 1.5 Äquiv. Fmoc-OSu (11.3 mmol), gelöst in 30 ml Dioxan, zugegeben. Es wurde über Nacht gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei der Einführung mit Fmoc-Cl beschrieben. Erhalten wurden 2.5 g.

Einführung von Fmoc an 2-Amino-5-fluorhex-5-ensäure (Afhs)

1 Äquiv. 2-Amino-5-fluorhex-5-ensäure (0.42 mmol), im Folgenden als Afhs bezeichnet, wurden in 2 ml Na_2CO_3 -Lösung (2.1 Äquiv.) gelöst. Bei 0 °C wurden 1.1 Äquiv. Fmoc-Cl (0.47 mmol), gelöst in 200 μl Dioxan, hinzugegeben. Über Nacht wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Zugabe von 25 ml H_2O wurde dreimal mit je 20 ml Diethylether ausgeschüttelt. Bei 0 °C wurde mit Salzsäure (1 M) pH 2 eingestellt, anschließend dreimal mit je 25 ml

Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bereits zuvor beschrieben. Erhalten wurden 94.6 mg.

4.1.4 Synthese der ^{15}N -markierten TisB

Die Synthese der ^{15}N -markierten TisB-Peptide erfolgte von Pos. 29 bis zur Position der Markierung automatisiert am Mikrowellenpeptidsyntheseautomaten. Die ^{15}N -markierte Aminosäure wurde manuell gekuppelt. Hierfür wurden 2 Äquiv. der ^{15}N -markierten Aminosäure (Alanin oder Leucin, 0.2 mmol) mit je 2 Äquiv. HBTU/HOBt (0.2 mmol) in 2 ml DMF und 4 Äquiv. DIPEA (0.4 mmol) zum Harz gegeben. Die Reaktionszeit betrug mindestens 12 h. Die Kupplungen der folgenden Aminosäuren wurden automatisiert fortgesetzt. In Tabelle 4.1 sind alle ^{15}N -markierten TisB aufgelistet. Eine Übersicht der ^{15}N -markierten TisB-Ladungs- und Glutamin-Mutanten ist in Tabelle 4.2 zu sehen.

Tabelle 4.1: Übersicht der ^{15}N -markierten TisB-Peptide. Isotopenmarkierte Positionen sind rot hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz	Molare Masse [g/mol]
TisB ^{15}N -A7	MNLVDIAILILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3223
TisB ^{15}N -A16	MNLVDIAILILKLIVAAALQLLDAVLKYLK	3223
TisB ^{15}N -L21	MNLVDIAILILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3223
TisB ^{15}N -L25	MNLVDIAILILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3223

Tabelle 4.2: Übersicht der ^{15}N -A16 markierten TisB-Ladungs- und Glutamin-Mutanten. Die isotopenmarkierte Aminosäure ist rot, mutierte Positionen sind grün hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz	Molare Masse [g/mol]
TisB D5K/K12D	MNLV ^K IAILILDLIVAAALQLLDAVLKYLK	3223
TisB K12D/D22K	MNLVDIAILILDLIVAAALQLLKAVLKYLK	3223
TisB D22K/K26D	MNLVDIAILILKLIVAAALQLLKAVLDYLK	3223
TisB D5K/K12D/ D22K/K26D	MNLV ^K IAILILDLIVAAALQLLKAVLDYLK	3223
TisB Q19A	MNLVDIAILILKLIVAAALLLDAVLKYLK	3166
TisB Q19N	MNLVDIAILILKLIVAAALNLLDAVLKYLK	3209

4.1.5 Synthese der ^{19}F -markierten TisB-Analoga

Die Synthese der ^{19}F -markieren TisB-Analoga erfolgte vom C-Terminus bis zur Position der CF_3 -Bpg Markierung automatisiert. Die fluormarkierte Aminosäure sowie alle darauf folgenden wurden zur Vermeidung von Racemisierung manuell angefügt.

Kupplung der Aminosäuren CF₃-Bpg

2 Äquiv. Fmoc-CF₃-Bpg (0.2 mmol) und 2 Äquiv. HOBt (0.2 mmol) wurden vorgelegt und mit 2 ml DMF versetzt. Anschließend wurden 5 Äquiv. DIC (0.5 mmol) hinzugeben und diese Lösung zum Harz gegeben. Die Reaktionszeit betrug mindestens 12 h. Mittels Testabspaltung wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Bei unvollständiger Reaktion wurde die Kupplung nochmals unter gleichen Bedingungen wiederholt. Eine Übersicht aller fluormarkierten TisB-Analoga ist in Tabelle 4.3 zu sehen.

Tabelle 4.3: Übersicht der ¹⁹F-markierten TisB-Analoga. Die CF₃-markierten Positionen sind gelb unterlegt.

Bezeichnung	Sequenz	Molare Masse [g/mol]
TisB I6-CF ₃ -Bpg	MNLVD CF₃-Bpg AAILILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB A7-CF ₃ -Bpg	MNLVDI CF₃-Bpg ILILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3342
TisB I8-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAC CF₃-Bpg LILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB L9-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAI CF₃-Bpg ILKLIVAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB I10-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAIL CF₃-Bpg LKLIVAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB L11-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILI CF₃-Bpg KLIVAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB L13-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILK CF₃-Bpg IVAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB I14-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKL CF₃-Bpg VAALQLLDAVLKYLK	3300
TisB A17-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKLIVA CF₃-Bpg LQLLDAVLKYLK	3342
TisB L20-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKLIVAALQ CF₃-Bpg LDAVLKYLK	3300
TisB L21-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKLIVAALQL CF₃-Bpg DAVLKYLK	3300
TisB A23-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKLIVAALQLLD CF₃-Bpg VLKYLK	3342
TisB V24-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKLIVAALQLLDA CF₃-Bpg LKYLK	3314
TisB L25-CF ₃ -Bpg	MNLVDIAILILKLIVAALQLLDAV CF₃-Bpg KYLK	3300

4.1.6 Synthese der Isotopenmarkierten Peptide für Abstandsmessungen

Andere isotopenmarkierte TisB-Analoga, welche für NMR-Abstandsmessungen synthetisiert wurden, sind in Tabelle 4.4 gezeigt. Die Synthese von TisB Q19-Afhs erfolgte bis Position 20 automatisiert. Für die Kupplung der Aminosäure „Afhs“ wurden je 1.1 Äquiv. Fmoc-Afhs und HOBt (0.11 mmol) in 1 ml DMF gelöst, 2.2 Äquiv. DIC (0.22 mmol) hinzugegeben und über Nacht umgesetzt. Alle weiteren Kupplungen wurden manuell, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 und 4.1.4 beschrieben, durchgeführt. Die Synthese von TisB REDOR erfolgte bis auf die isotopenmarkierten Aminosäuren automatisiert. Für die Kupplung der Pos. 12 und 22 wurde 1.1 Äquiv. (0.11 mmol) der entsprechenden Aminosäure mit 1.1 Äquiv. (0.11 mmol)

HBTU/HOBt in 1 ml DMF gelöst, 2.2 Äquiv. (0.22 mmol) DIPEA hinzugegeben und für min. 12 h umgesetzt.

Tabelle 4.4: Isotopenmarkierte TisB-Analoga für NMR-Abstandsmessungen.

Bezeichnung	Sequenz	Molare Masse [g/mol]
TisB Q19-Afhs	MNLVDIAILILKLI ^A AL - Afhs - LLDAVLKYLK	3223
TisB REDOR ²	MNLVDIAILILK [*] LIVAALQLD [*] AVLKYLK	3229

4.1.7 Weitere TisB-Mutationen

In Tabelle 4.5 sind weitere TisB-Mutationen aufgelistet, welche für FRET-Experimente und biologische Experimente synthetisiert wurden. Beim *D*-TisB handelt es sich um ein Spiegelbild von TisB, welches vollständig aus *D*-Aminosäuren besteht. TisB-*rev.* ist die umgekehrte TisB-Sequenz. Im TisB-*scr.* wurde die Anordnung der geladenen Aminosäuren verändert und damit der polare Streifen „zerstört“ (Abbildung 1.3).

Tabelle 4.5: Sonstige TisB-Mutationen für biologische Tests und FRET-Experimente.

Bezeichnung	Sequenz	Molare Masse [g/mol]
<i>D</i> -TisB	mnlvdiaaililkli ^a vaalqll ^a davlky ^a lk	3222
TisB- <i>rev.</i>	KLYKLVADLLQLAAVILKLI ^a LIAIDV ^a LNM	3222
TisB- <i>scr.</i>	MNLVDIAIL ^a DLV ^a L ^a IK ^a AA ^a LQLL ^a IAK ^a LV ^a YLK	3222
Dansyl-TisB ³	Dans - MNLVDIAILILKLI ^a VAALQLLDAVLKYLK	3456
TisB Y27W ³	MNLVDIAILILKLI ^A ALQLLDAVLK ^W LK	3246
W-TisB ³	WMNLVDIAILILKLI ^a VAALQLLDAVLKYLK	3408

Synthese von *D*-TisB

D-TisB wurde vollständig manuell synthetisiert. Dafür wurde Fmoc-lys(Boc)-Wang Harz mit einer Beladung von 0.34 mmol/mg verwendet. Die Kupplungen der Aminosäuren wurde mit je 5 Äquiv. Aminosäure und Kupplungsreagenz (0.5 mmol, zuerst HBTU/HOBt dann Py-BOP/HOBt) und 10 Äquiv. DIPEA (1.0 mmol) in etwa 2 ml DMF durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug pro Kupplungsschritt 1 h.

Dansylierung von TisB am N-Terminus

3 Äquiv. Dansylchlorid (0.3 mmol) wurden in 8 ml DMF gelöst und ungelöste Bestandteile abzentrifugiert. TisB beladenes Harz (0.1 mmol) wurde in 4 ml DMF und 10 Äquiv. DIPEA

² Wurde für zukünftige NMR-Abstandsmessungen mittels REDOR synthetisiert.

³ Wurde unter Betreuung einer Bachelorarbeit von Anna Schleicher synthetisiert und aufgereinigt.

(1.0 mmol) vorgelegt und die Dansylchlorid-Lösung langsam unter Schutzgas hinzugegossen. Die Reaktion erfolgte lichtgeschützt für 12 h bei Raumtemperatur. Aufgrund unvollständiger Reaktion wurde diese Reaktion nochmals mit 5 Äquiv. Dansylchlorid durchgeführt.

4.1.8 Abspaltung des Peptids vom Harz und der Seitenschutzgruppen

Scharfes Cleavage

Das vollständig getrocknete Harz wurde mit 1 ml pro 100 mg eines Gemisches aus Trifluoressigsäure (77.5%), Triisopropylsilan (5%), Phenol (5%), Thioanisol (5%), H₂O (5%) und Ethandithiol (2.5%) versetzt und für etwa 4 h geschüttelt. Nach Abfiltrieren wurde das Lösungsmittel bis auf maximal 0.5 ml im N₂-Strom abgedampft, der Rückstand zum Ausfällen des Produkts mit kaltem Diethylether versetzt und abzentrifugiert. Der Diethylether wurde abdekantiert und der Rückstand in etwa 25 ml Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst, bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Reduktives Cleavage

Zur Vermeidung der Oxidation des in der Methionin-Seitenkette enthaltenen Schwefels wurde auch ein reduktives Cleavage verwendet [56]. Hierzu wurden zwei verschiedene Lösungen angesetzt:

Lösung 1: (Gesamtmenge 5375 µl) Trifluoressigsäure (76.7%), Phenol (7%), Triisopropylsilan (4.65%), Thioanisol (4.65%), Dimethylsulfid (4.65%) und Ethandithiol (2.35%).

Lösung 2: Ammoniumiodid (250 mg) in H₂O 250 µl.

Nach Ansetzen beider Lösungen wurde Lösung 2 zu 1 gegeben. Von diesem Gemisch wurde dann pro 100 mg Harz 1 ml Suspension verwendet und für 4 h bei 0 °C inkubiert. Der restliche Ablauf entsprach dem des scharfen Cleavages.

Testcleavage zur Kontrolle

Zur Überprüfung auf Vollständigkeit der Reaktion wurde bei Bedarf eine kleine Menge Harz entnommen, mit Methanol gewaschen, getrocknet und für etwa 30 min mit einer Lösung aus Trifluoressigsäure (92.5%), Triisopropylsilan (5%) und Wasser (2.5%) behandelt. Nach Abfiltrieren und Versetzen mit Diethylether wurde der dabei entstandene Niederschlag in Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst und mittels HPLC ESI-TOF-MS charakterisiert.

4.2 Aufreinigung und Charakterisierung

4.2.1 Umkehrphasen-HPLC

Alle synthetisierten Peptide wurden an einer HPLC-Anlage der Firma Jasco mit einer RP-C4-Säule der Firma Vydac im semi-präparativen Maßstab aufgereinigt. Als Eluenten wurden dabei ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 9:1 mit 5 mM HCl (Eluent A) sowie Methanol (Eluent B) verwendet. Die gewünschte Trennung bzw. Reinheit wurde durch entsprechende Anpassung des Gradienten an das jeweilige Peptid erzielt (Standardmethode 0–58% B nach 16 min, Durchfluss 7 ml/min). Die Aufreinigung wurde stets bei einer Temperatur von 35 °C durchgeführt. Dabei wurden pro Lauf zwischen 5 und 7 mg eingesetzt.

4.2.2 Charakterisierung mittels HPLC ESI-TOF-MS

Charakterisiert wurden die gereinigten Peptide im analytischen Maßstab mit einer HPLC-Anlage der Firma Agilent und angegliedertem ESI-TOF Massenspektrometer der Firma Bruker. Hierbei wurde eine RP-C18-Säule der Firma Vydac verwendet. Als Eluenten wurden dabei ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (9:1) sowie Methanol genommen. Zum Ansäuern des Eluenten A wurde 0.1% TFA hinzugefügt. Der Gehalt an Methanol betrug zu Beginn immer 5% und stieg innerhalb von 25 min auf 95%.

4.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der für die CD- und Fluoreszenzspektroskopie angesetzten Stammlösungen der Peptide wurden alle durch Aufnahmen von UV/Vis-Spektren bestimmt. Hierzu wurde ein UV/Vis-Spektrometer der Firma Shimadzu, Modell UV-2100, verwendet. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 600 nm, in 0.5 nm Schritten, bei einer Bandbreite von 2 nm aufgenommen.

4.4 Verwendete Lipide

Die für die Struktur- und Funktionsuntersuchungen von TisB verwendeten Lipide sowie ihre relevanten Eigenschaften sind in Tabelle 4.6 aufgelistete.

Tabelle 4.6: Übersicht der verwendete Lipide und relevante physikalische Eigenschaften [57,58].

Bezeichnung		T_m [°C]	Hydroph. Dicke [Å]	Molare Masse [g/mol]
DLPC	Di-12:0-PC	-2	21.0	621.8
DMPC	Di-14:0-PC	24	25.4	677.9
DPPC	Di-16:0-PC	41	29.8	734.0
DOPC	Di-18:1c9-PC	-17	26.8	786.1
POPC	16:0-18:1c9-PC	-2	28.3	760.1
DEiPC	Di-20:1c11-PC	-4	30.6	842.2
DErPC	Di-22:1c13-PC	13	34.4	898.3
DMPG	Di-14:0-PG	23	23.9	688.9
POPG	16:0-18:1c9-PC	-2	28.3	771.0
Rhod-PE	Di-18:1-Liss Rhod-PE	-	26.8	1301.7

4.5 CD-Spektroskopie

Alle CD-Messungen wurden an einem Jasco J-815 Spektropolarimeter aufgenommen. Vor jeder Messung wurde vom entsprechenden Medium (Lösungsmittel oder Vesikelsuspension) ein Referenzspektrum aufgenommen und bei den folgenden Messungen vom jeweiligen Probespektrum automatisch subtrahiert. Die erhaltenen Spektren wurden geglättet und die Basislinien korrigiert, indem die gemessenen Elliptizitäten bei 260 nm auf den Wert 0 gesetzt wurden. Die Elliptizitäten wurden dann nach Gleichung (3.2) und (3.3) in die mittleren molaren Elliptizitätswerte pro Peptidbindung (MRE) umgerechnet. Die erhaltenen Spektren wurden im Anschluss nach Bedarf mit Hilfe des Algorithmus CONTIN-LL mit Referenzdatensatz 7 [59,60] auf dem DICHROWEB-Server ausgewertet.

Aufgenommen wurden die CD-Spektren im Bereich von 180 – 260 nm, bei einer Scangeschwindigkeit von 10 bzw. 20 nm/min und einer spektralen Bandbreite von 1 nm. Aufgenommen wurden jeweils drei Einzelspektren, die automatisch gemittelt wurden.

4.5.1 CD-Messungen in Lösungsmittel

Von den verschiedenen Peptiden wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von etwa 1 mg/ml im entsprechenden Lösungsmittel angefertigt. Für die wässrige Lösung wurde das Peptid in Wasser aufgenommen, über Nacht geschüttelt und anschließend nicht gelöstes Peptid abzentrifugiert. Die Konzentrationen dieser Stammlösungen wurden durch Bestimmung der Absorption des in den Peptiden enthaltenen Tyrosins bei 280 nm bestimmt. Für die CD-Messungen wurden die Lösungen auf etwa 0.05 mg/ml verdünnt und in einer Quarzglas-

Küvette mit einer Schichtdicke von $d = 0.1$ cm gemessen. Die Temperatur betrug während der Messung sofern nicht anders angegeben 20 °C.

4.5.2 CD-Messungen in Lipid-Vesikeln

Für die Messungen in Lipid-Vesikeln mussten Peptid und Lipid aus organischem Lösungsmittel rekonstituiert werden. Hierzu wurden methanolische Stammlösungen ($c = 1$ mg/ml) der Peptide hergestellt und nach Konzentrationsbestimmung die entsprechenden Mengen an Peptid und Lipid ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) zusammengegeben (P:L = 1:100). Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im N_2 -Strom abgedampft und für 12 h unter vermindertem Druck getrocknet. Der Rückstand wurde in 10 mM Phosphatpuffer aufgenommen und nach 10 Gefrier-/Tau-Zyklen für 10 min mit Ultraschall behandelt, um SUVs (*small unilamellar vesicles*) herzustellen. Die Temperatur betrug während den Messungen 20 °C, mit Ausnahme in DMPC. Aufgrund der höheren Phasenübergangstemperatur des Lipids von 23° wurde hier bei 30 °C gemessen.

4.5.3 Thermische Denaturierungsexperimente

Zur Ermittlung der thermischen Stabilität der gefalteten Peptide wurden Denaturierungsexperimente im Temperaturbereich von 20 bis 90 °C in 5 °C Schritten durchgeführt. Nach Messung bei der höchsten Temperatur wurde nochmals ein Spektrum bei 20 °C aufgenommen, um zu vergleichen, inwiefern sich die Sekundärstruktur gegebenenfalls verändert hat.

4.6 NMR-Spektroskopie

4.6.1 Präparation der Proben für Festkörper-NMR-Experimente

Die gewünschte Peptidmenge jeder Probe wurde in $20 - 50$ μl Methanol gelöst, die entsprechende Lipidmenge in $100 - 200$ μl eines Gemischs aus Chloroform/Methanol, welches je nach Probe, zwischen 1:1 und 3:1 variierte. Das gelöste Lipid wurde zur Peptidlösung gegeben, nach Durchmischen für $1 - 5$ min im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend wurde diese Lösung auf die gewünschte Anzahl Glasplättchen ($10 - 24$), der Dimension $15 \times 7.5 \times 0.08$ mm für ^{19}F -Proben bzw. $9 \times 7.5 \times 0.08$ mm für ^{15}N -Proben gleichmäßig verteilt (etwa $5 - 12$ μl pro Plättchen). Nach etwa $15 - 30$ min wurden diese dann im Exsikkator unter vermindertem Druck für mindestens 4 h getrocknet. Danach kamen die übereinandergestapelten Plättchen neben eine gesättigte Kaliumsulfatlösung in eine Box, in der sie bei 48 °C und einer relativen

Luftfeuchtigkeit von über 96% für mindestens 12 hydratisiert wurden. Zum Schutze vor Austrocknung der Proben wurden diese zuerst in Parafilm und dann in Plastikfolie eingewickelt.

4.6.1.1 Entsalzen und Kontrolle des pH-Werts mittels Dialyse

Hierzu wurden die gewünschten Mengen an Peptid und Lipid zusammen in etwa 200 μ l Methanol gelöst und mit etwa 1.5 ml 0.5% Octylglucosid-Lösung versetzt. Diese Suspension wurde daraufhin bei 4 °C für vier Tage dialysiert. Die entstandene Vesikel-Dispersion wurde gleichmäßig auf Glasplättchen verteilt, getrocknet und hydratisiert.

4.6.1.2 Entsäuern der NMR-Proben

Zum Entsäuern der NMR-Proben wurden nach Zugabe der Lipid- zur Peptidlösung 4 Äquiv. einer 100 mM NaHCO₃-Lösung hinzugegeben (die Peptidmenge entspricht dabei einem Äquivalent).

4.6.1.3 Herstellung von angesäuerten NMR-Proben

Die angesäuerten Proben (DMPC, P:L = 1:100) wurden durch Zugabe von 5 μ l einer 0.1 M HCl-Lösung zur Peptid/Lipidlösung hergestellt.

4.6.2 Durchführung der NMR-Experimente

Für die Festkörper-NMR-Experimente standen drei Spektrometer der Firma Bruker, Avance III WB (500 MHz), Avance III HD (500 MHz) sowie Avance II WB (600MHz) zur Verfügung. Alle Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 35 °C durchgeführt.

Festkörper-³¹P-NMR-Messungen

Die Qualität der Orientierung der Lipidmembran jeder NMR-Probe wurde durch Aufnahme von ³¹P-NMR-Spektren (202.3 MHz bzw. 242.8 MHz) vor und nach der jeweiligen Messung bestimmt. Hierzu wurde ein Flachspulen-Doppelresonanz-Probenkopf (¹H/X) sowie eine Hahn-Echo-Pulssequenz [61] mit einer 90°-Pulslänge von 5 – 7 μ s und ¹H-Entkopplung (TPPM20) verwendet. Je nach Lipidmenge wurden 128, 256 oder 512 Scans aufgenommen. Als Referenz wurde Phosphorsäure mit einer chemischen Verschiebung von 0 ppm verwendet. Alternativ dazu wurde indirekt auf das Protonensignal (4.65 ppm, bei 35 °C) des in den Proben enthaltenen Wassers referenziert [62,63]. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 100 – 200 Hz prozessiert.

Festkörper- ^{15}N -NMR-Messungen

Die ^{15}N -NMR-Experimente wurden mit einem Doppelresonanz-*LowE*-Flachspulen-Resonator ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) an einem 500 oder 600 MHz-Spektrometer (50.6 bzw. 60.7 MHz für ^{15}N) unter Verwendung von MOIST [64] oder RAMP [65] Kreuzpolarisation (*CP*) und anschließender ^1H -Entkopplung (SPINAL64) durchgeführt. Die Dauer des Mischpulses variierte von 0.5 – 1 ms. Die Aquisitionszeit betrug 10 ms. Referenziert und optimiert wurde mit ^{15}N -Ammoniumsulfat mit einer chemische Verschiebung von 26.8 ppm [66]. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 200 – 300 Hz prozessiert.

Sofern nicht anders angegeben, wurde ein P:L von 1:50 verwendet. Die eingesetzte Peptidmenge für eine Messung betrug 1.5 – 2.0 mg, mit Ausnahme bei der Aufnahme des Pulverspektrums. Je nach Signalstärke wurden zwischen 5 000 und 30 000 Scans aufgenommen.

Festkörper- ^{19}F -NMR-Messungen

Die ^{19}F -NMR-Spektren (470.1 MHz) wurden an einem 500 MHz-Spektrometer mit einem Doppelresonanz-Flachspulen-Resonator ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$) mit Spulen für 0° - und 90° -Orientierung und einem Flachspulen Goniometer unter Verwendung einer *anti-ringing*-Pulssequenz [67] mit einem 90° -Puls von 3.125 μs und ^1H -Entkopplung (SPINAL64) aufgenommen. Als Referenz wurde eine wässrige Natriumfluorid-Lösung (100 mM) mit einer chemischen Verschiebung von -119.5 ppm (35°C) verwendet. Alternativ dazu wurde indirekt auf das Protonensignal (4.65 ppm, bei 35°C) des in den Proben enthaltenen Wassers referenziert [62,63]. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 500 Hz prozessiert.

4.6.3 Strukturanalyse

Die Bestimmung der gesuchten Strukturparameter, des Neigungswinkels τ der Helix, des azimutalen Rotationswinkels ρ um die Helixachse sowie des Ordnungsparameters S_{mol} bzw. die Verteilungsbreiten des Neigungswinkels σ_τ und des Rotationswinkels σ_ρ , erfolgte mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*least-square-fit*). Dabei wurden die ermittelten dipolaren Kopplungen mit denen eines Modells einer idealen α -Helix verglichen und unter Ermittlung des Minimums für den RMSD (*root-mean-square deviation*), zwischen den experimentellen und berechneten Werten die Parameter bestimmt [68,69]. Hierfür wurden von Dr. Erik Strandberg (KIT) entwickelte Computer-Programme verwendet.

4.7 Fluoreszenzmessungen

Die Messungen der Equilibrierung des Protonengradienten wurden an einem Fluoreszenzspektrometer der Firma HORIBA Jobin Yvon Spex Fluoromax 2 durchgeführt. Für die FRET-Experimente wurde ein HORIBA Jobin Yvon Fluorolog FL 1065 verwendet. Alle Messungen fanden in 1 cm Quarzglasküvetten bei einer Temperatur von 22 °C statt.

4.7.1 Messung des Abbaus des pH-Gradienten

Kalibrierung der HPTS-Fluoreszenz

Vor den Messungen wurde zur Aufnahme einer Kalibrierkurve die HPTS-Fluoreszenz bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Hierzu wurden MES-Puffer (5 mM) mit pH-Werten von 5.5, 6 und 6.5 sowie HEPES-Puffer (5 mM) mit pH-Werten von 7.0, 7.5, 7.8, 7.9, 8.0 und 8.6 verwendet. Wie in Abschnitt 3.3.1 bereits erwähnt, wurden hierbei die Verhältnisse der Fluoreszenz bei einer Anregung bei 454 und 404 nm bei unterschiedlichen pH-Werten gebildet. Durch Anpassung an einen Henderson-Hasselbalch-Ansatz der Form

$$R([H^+]) = R_{Max} * \left(1 - \frac{[H^+]}{[H^+] + K_S}\right) \quad (4.1)$$

wurden die gesuchten Parameter, der Maximalwert des Quotienten R_{Max} und die Säurekonstante K_S erhalten. Analog wurde eine zweite Kalibrierkurve zur Umrechnung der Fluoreszenzamplituden (Anregungen bei 454 nm) in die entsprechenden pH-Werte erstellt. Hierbei erhält man den Maximalwert der Amplitude A_{Max} und ebenfalls wieder die Säurekonstante K_S .

Herstellung der Lipid-Vesikel

Die benötigten Lipidmengen wurden in Chloroform/Methanol (3:1) gelöst, einen Anteil von 0.01 mol% an Rhodamin B-PE aus einer Stammlösung hinzugegeben und anschließend wurde das Lösungsmittel im N_2 -Strom abgedampft und der Rückstand unter vermindertem Druck für etwa 4 Stunden getrocknet. Dieser wurde daraufhin in 1 mM HPTS-Lösung pH 7.1 aufgenommen, sodass die Lipidkonzentration bei 10 mM lag. Nach 10 Gefrier-/Tau-Zyklen wurde die Suspension bei -20 °C gelagert. Für die Herstellung der Vesikel wurden jeweils 250 μ l dieser Suspension 41-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert. Die erhaltene Vesikel-Suspension wurde im Anschluss über Säulen mit Sephacryl-100HR bei 3000 rpm zentrifugiert. Diese wurden zuvor viermal mit HEPES-Puffer (5 mM, pH 7.2) gewaschen. Der Farbstoff außerhalb der Vesikel verbleibt dabei auf den Säulen und die Vesikel befinden sich im Anschluss in dem verwendeten HEPES-Puffer.

Durchführung der Messungen

Von jeder hergestellten Vesikel-Charge wurden die tatsächliche Lipidkonzentration durch Aufnahme von Emissionsspektren des im Lipid enthaltenen Rhodamins (Anregung bei 560 nm, Emission bei 587 nm) bestimmt und in Bezug zur Lipidkonzentration vor dem Extrudieren bestimmten Fluoreszenzwert gesetzt. Somit konnte immer die gleiche Lipidkonzentration bei allen Messungen gewährleistet werden. Für die eigentlichen Messungen wurden die bei pH 7.1 hergestellten Vesikel in MES-Puffer mit pH 6 vorgelegt, der pH-Wert im Vesikel-Inneren durch Aufnahme der beiden Emissionsspektren (Anregung bei 404 und 454 nm) bestimmt und anschließend der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz, mit Anregung bei 454 nm, aufgenommen. Über die Kalibrierung der Amplitude konnte dieses Signal in den entsprechenden pH-Wert umgerechnet werden. Beim gewünschten pH-Wert erfolgte die Zugabe des Peptids aus einer 1 mM wässrigen Stammlösung. Um bei allen Messungen den gleichen Verdünnungseffekt zu erhalten, betrug das Volumen der Zugabe stets 100 μ l, wobei die zugegebenen Peptidkonzentrationen durch entsprechendes Verdünnen der Stammlösung variiert wurden. Zur Bestimmung der initialen Geschwindigkeiten des Protonenausgleichs zwischen dem Vesikel-Inneren und -Äußeren wurde der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz in die pH-Skala bzw. in die Protonenkonzentration umgerechnet. Die in den ersten 7 Sekunden nach Peptidzugabe erfolgten Änderungen wurden linear angepasst und entsprechen den Anfangsgeschwindigkeiten des Protonenausgleichs. Durch die Auftragung dieser ermittelten Geschwindigkeiten v in Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration c und Anpassung an eine erweiterte Form der Michaelis-Menten-Gleichung [70]

$$v = v_{Max} * \left(\frac{c^{n_H}}{K_D^{n_H} + c^{n_H}} \right) \quad (4.2)$$

wurde der Hill-Koeffizient n_H , der ein Maß für die Kooperativität darstellt, bestimmt.

4.7.2 FRET-Experimente

Herstellung der Proben

Für die FRET-Experimente wurden Lipid und Peptid in den gewünschten Mengen (P:L = 1:400) aus organischem Lösungsmittel rekonstituiert. Hierzu wurde von dem verwendeten Lipidgemisch POPC/POPG (7:3) eine Stammlösung (10 mM) in Chloroform/Methanol (1:1) hergestellt und mit Rhod-PE (1 μ M) versetzt. Von den verwendeten Peptiden wurden methanolische Stammlösungen (0.1 mM) angesetzt und aus diesen Lösungen wurden die entsprechenden Mengen in 2 ml Reaktionsgefäße zusammengegeben. Eine tabellarische Auflistung

der einzelnen Mengen ist in Anhang D in Tabelle D.5 zu finden. Es wurden zuerst die Peptidlösungen vorgelegt und dann die Lipidlösung hinzugegeben. Hierfür wurden Gasdichte Hamilton-Spritzen verwendet. Im Anschluss darauf wurde das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand für etwa 4 h unter vermindertem Druck getrocknet und in 200 μ l Phosphatpuffer (10 mM) aufgenommen. Nach drei Gefrier-/Tau-Zyklen wurden die Lipidsuspensionen 11-mal durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porengröße extrudiert.

Durchführung der Messungen

Für eine Messung wurden 50 μ l der entsprechenden Vesikelsuspension in 1950 μ l Phosphatpuffer (10 mM) gegeben. Es wurden jeweils drei Emissionsspektren jeder Probe aufgenommen:

- Anregung des Rhodamins bei 560 nm (Emission 587 nm)
zur Bestimmung der Lipidkonzentration.
- Anregung des Dansyls bei 344 nm (Emission bei 510 nm)
zur Bestimmung der Peptidkonzentration.
- Anregung des Tryptophans bei 291 nm (Emission bei 345 nm)
für die eigentliche FRET-Messung.

Aus den erhaltenen Emissionsspektren wurden die Werte der Tryptophanfluoreszenz bei 345 nm und der Dansylfluoreszenz bei 510 nm ermittelt und durch den entsprechen Faktor aus der Rhodaminemission korrigiert. Die Messungen wurden bei 22 °C durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Peptidsynthese

Alle synthetisierten und aufgereinigten TisB-Analoga und Mutationen, welche in den Struktur- und Funktionsuntersuchungen verwendet wurden, sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Ausbeuten und Retentionszeiten (analytische HPLC) der synthetisierten TisB-Analoga und Mutanten. Mit Ausnahme von W-TisB (50 μ M Ansatz) wurden alle Peptide in 100 μ M-Ansätzen synthetisiert. Bei den Berechnungen der Ausbeuten wurde für jede positive Ladung jeweils ein HCl zusätzlich berücksichtigt.

Bezeichnung	Molare Masse [g/mol]	RT [min]	Erhaltene Menge [mg]	Ausbeute [%]
¹⁵N-markierte Analoga				
TisB ¹⁵ N-A7	3223	19.2	44.7	13.3
TisB ¹⁵ N-A16 ⁴	3223	19.3	35.4	10.5
TisB ¹⁵ N-L21	3223	19.4	16.4	4.9
TisB ¹⁵ N-L25	3223	19.3	32.4	9.6
Ladungs-Mutanten				
TisB D5K/K12D	3223	19.8	24.7	7.3
TisB K12D/D22K	3223	19.3	30.5	9.1
TisB D22K/K26D	3223	19.6	34.3	10.2
TisB D5K/K12D /D22K/K26D	3223	20.1	37.8	11.2
Glutamin-Mutanten				
TisB Q19A	3166	19.5	26.0	7.9
TisB Q19N	3209	19.4	28.8	8.6
CF₃-Bpg-Analoga				
TisB I6-CF ₃ -Bpg ⁵	3300	18.9	27.7	8.0
TisB A7-CF ₃ -Bpg ⁵	3342	20.3	20.8	6.0
TisB I8-CF ₃ -Bpg ⁶	3300	17.7	19.5	5.7
TisB L9-CF ₃ -Bpg ⁵	3300	20.1	25.6	7.4
TisB I10-CF ₃ -Bpg ⁴	3300	16.6	22.4	6.5
TisB L11-CF ₃ -Bpg ⁴	3300	18.4	63.7	18.5

⁴ Wurde von Mitarbeitern des Instituts synthetisiert und im Rahmen der Diplomarbeit aufgereinigt.

⁵ Wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit synthetisiert und teilweise aufgereinigt.

⁶ Wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit synthetisiert.

TisB L13-CF ₃ -Bpg ⁴	3300	18.6	22.7	6.6
TisB I14-CF ₃ -Bpg ⁴	3300	16.9	30.3	8.8
TisB A17-CF ₃ -Bpg	3342	19.1	6.7	1.9
TisB L20-CF ₃ -Bpg	3300	19.4	18.0	5.2
TisB L21-CF ₃ -Bpg	3300	17.9	40.4	11.7
TisB A23-CF ₃ -Bpg	3342	19.7	13.2	3.8
TisB V24-CF ₃ -Bpg	3314	18.9	15.6	4.5
TisB L25-CF ₃ -Bpg	3300	18.6	22.8	6.6
Andere Mutationen				
TisB- <i>rev.</i>	3222	19.3	30.4	9.0
TisB- <i>scr.</i>	3222	2.3	15.8	4.7
D-TisB	3222	19.3	64.4	19.1
FRET-Mutationen				
Dansyl-TisB ³	3456	23.0	91.4	25.6
TisB Y27W ³	3246	20.3	149.3	44.0
W-TisB ³	3408	18.3	55.7	31.3
NMR-Abstandsmessung				
TisB Q19-Afhs	3223	19.0	17.8	5.3
TisB REDOR	3229	19.3	104.2	30.9

5.2 CD-Spektroskopie

5.2.1 Messungen von TisB in verschiedenen Lösungsmitteln

5.2.1.1 Wässrige Umgebung und organische Lösungsmittel

Die CD-Spektren von TisB in wässriger Umgebung und organischen Lösungsmitteln sind in Abbildung 5.1 zu sehen. Alle Spektren zeigen die charakteristische Form einer α -helikalen Struktur mit zwei negativen Banden im Bereich um 222 und 208 nm und einer positiven Bande bei etwa 193 nm. In Phosphatpuffer ist das Maximum bei 194 nm sowie das Minimum bei 210 nm weniger stark ausgeprägt. Dafür ist die Bande bei 223 nm etwas intensiver. Die CD-Banden sind hier leicht in Richtung höherer Wellenlängen hin verschoben. In den verwendeten organischen Lösungsmitteln ist die Bande bei 208 nm sehr stark ausgeprägt.

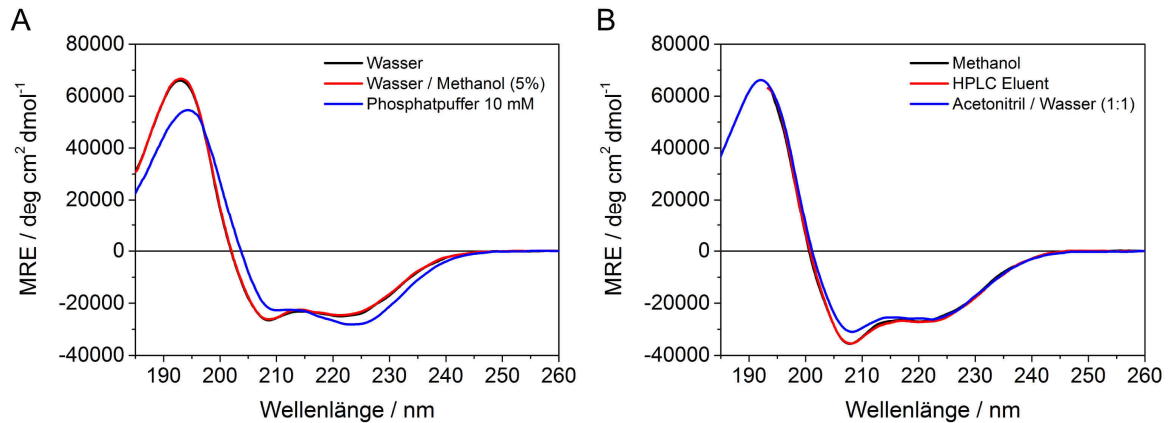


Abbildung 5.1: (A) CD-Spektren von TisB in Wasser (schwarze Linie), Wasser mit 5% Methanol (rote Linie) und in 10 mM Phosphatpuffer (blaue Linie). (B) CD-Spektren von TisB in Methanol (schwarze Linie), dem HPLC-Eluent (rote Linie) sowie Acetonitril/Wasser (1:1). Der HPLC-Eluent ist ein Gemisch aus Methanol/Acetonitril/Wasser im Verhältnis 10:9:1. Die Spektren von TisB in Methanol und dem HPLC-Eluent sind ab etwa 195 nm aufgrund der Absorption von Methanol nicht mehr verlässlich (Hochspannung am Photomultiplier-Detektor höher als 550 V) und daher werden die Messwerte nur bis 195 nm dargestellt. Alle Spektren zeigen eine α -helikale Sekundärstruktur von TisB.

5.2.1.2 TisB in Detergenz und chaotropem Reagenz

Die Spektren von TisB in SDS- und Guanidinhydrochloridlösung sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Auch hier ist die α -helikale Struktur von TisB sowohl in 5 mM (unterhalb der kritischen Mizellen Konzentration) als auch in 50 mM SDS-Lösung zu sehen. Das Minimum bei 208 nm ist in 50 mM SDS stärker ausgeprägt. Allerdings ist aufgrund der hohen Absorption des Detergenz das Spektrum nur bis etwa 198 nm verwertbar. Das Spektrum von TisB in Guanidin-HCl-Lösung zeigt ebenfalls zwei negative Banden bei 222 und 208 nm, jedoch ist die positive Bande bei 192 nm nicht messbar. Hier steigt die Absorption wegen der hohen Konzentration an Chlorid-Ionen ab etwa 210 nm sehr stark an, sodass kein CD-Signal mehr erhalten wird.

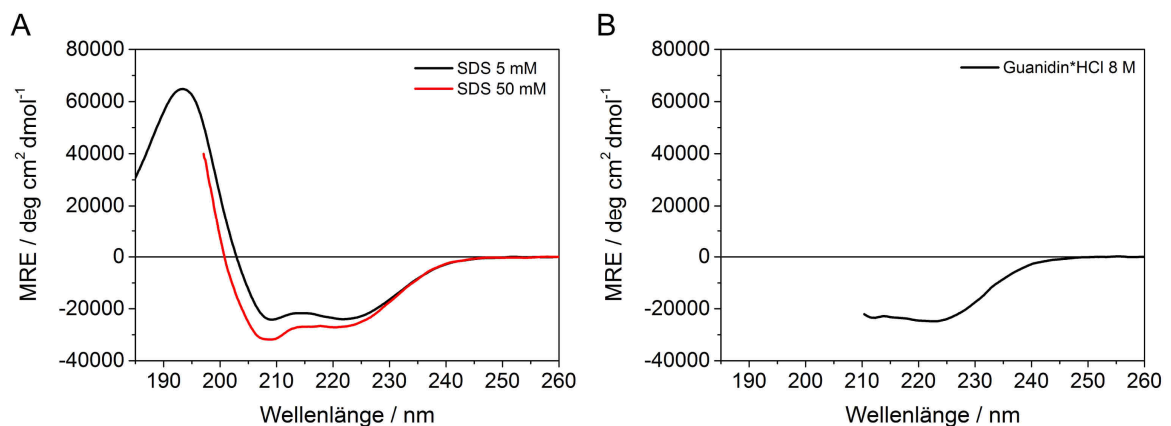


Abbildung 5.2: (A) CD-Spektren von TisB gelöst in 5 mM (schwarz) und 50 mM (rot) SDS-Lösung. (B) TisB gelöst in 8 M Guanidinhydrochlorid-Lösung. Auch in SDS und Guanidin*HCl ist TisB α -helikal.

5.2.1.3 Thermische Denaturierungsexperimente in Wasser und SDS

Die bei einer thermischen Denaturierung von TisB in Wasser erhaltenen Spektren sind in Abbildung 5.3 A gezeigt. Selbst bei einer Temperatur von 90 °C ist die charakteristische Form einer α -helikalen Struktur zu beobachten. Das Maximum bei 193 nm ist im Verlauf der Temperaturerhöhung etwas schwächer ausgeprägt. Die Spektren bei 20 °C vor und nach den thermischen Denaturierungsexperimenten (Abbildung 5.3 B) sind identisch. Die Sekundärstruktur hat sich somit im Laufe des Experiments nicht irreversibel verändert.

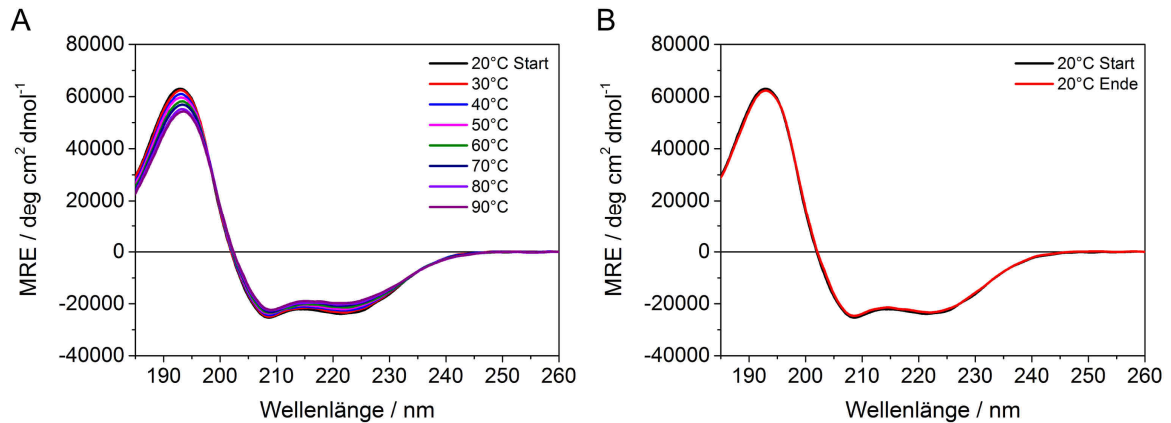


Abbildung 5.3: CD-Spektren der thermischen Denaturierungsversuche von TisB in Wasser (A) sowie der Vergleich der Spektren bei 20 °C vor und nach der Temperaturerhöhung (B). Alle Spektren zeigen eine α -helikale Struktur, welche sich durch Erhöhung der Temperatur nur geringfügig und reversibel ändert.

In SDS (5 mM) zeigt TisB ebenfalls nur eine marginale bzw. keine Veränderung der Sekundärstruktur bei Erhöhung der Temperatur, wie auch schon zuvor in reinem Wasser. Die erhaltenen Spektren dieses thermischen Denaturierungsexperiments sind in Abbildung 5.4 gezeigt. Die Messungen bei 20 °C vor und nach der Temperaturerhöhung zeigen nahezu das gleiche Spektrum.

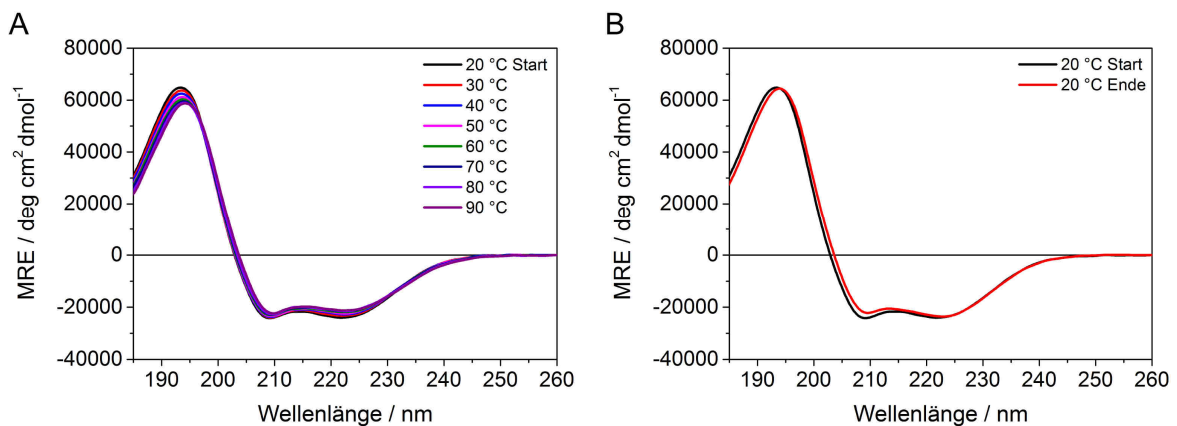


Abbildung 5.4: Die thermischen Denaturierungsversuche in SDS (5mM) zeigt ebenfalls nur eine marginale bzw. keine Veränderung (A) der α -helikalen Sekundärstruktur. Die Spektren bei 20 °C vor und nach der Temperaturerhöhung sind auch hier nahezu identisch (B).

5.2.2 TisB in Lipid-Vesikeln

Für die CD-Untersuchung von TisB in Lipid-Vesikeln wurde das Peptid in verschiedenen Lipiden aus organischem Lösungsmittel rekonstituiert. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 5.5 zu sehen. Auch hier sind die charakteristischen Banden einer α -Helix klar erkennbar. In POPC ist eine leichte Abschwächung des Signals zu sehen. Eine klare POPC Vesikel-Dispersion, welche mittels Dialyse hergestellt wurde, zeigt diese Artefakte nicht.

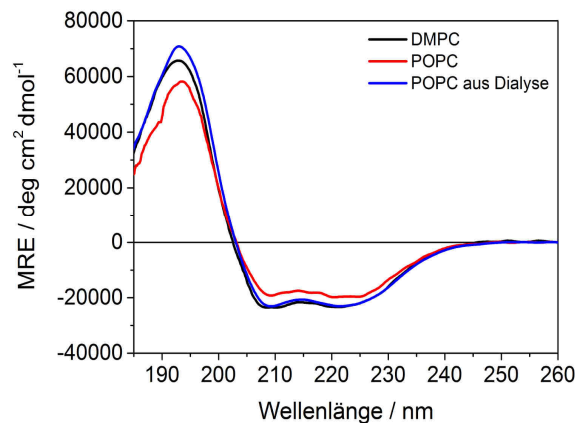


Abbildung 5.5: Die CD-Spektren von TisB in Lipid-Vesikeln zeigen ebenfalls eine α -helikale Struktur, sowohl in DMPC- als auch in POPC-Vesikeln.

5.2.3 Sekundärstrukturanalysen

Mit den in den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.2 erhaltenen Spektren wurden Sekundärstrukturanalysen durch Dekonvolution der einzelnen Spektren mit Hilfe des CONTIN-LL-Algorithmus auf dem DICHROWEB-Server durchgeführt [59,60]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

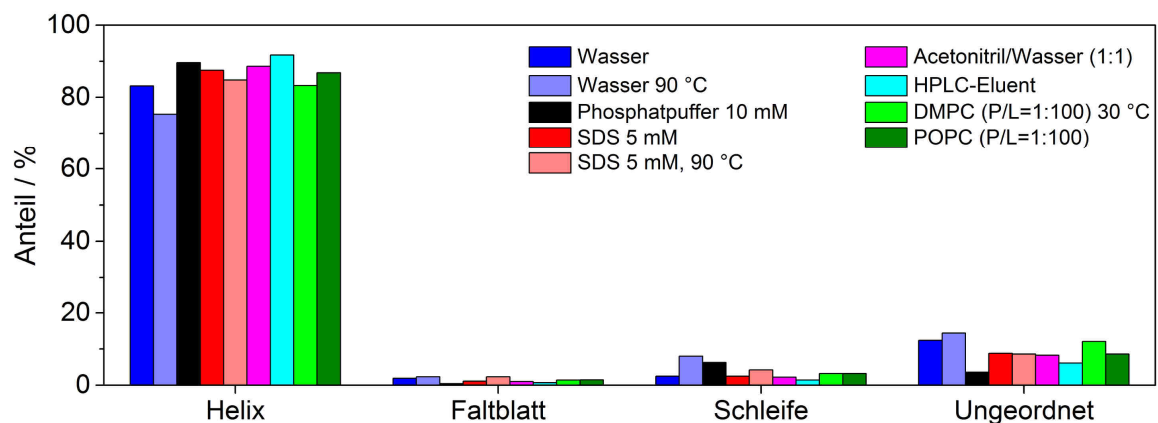


Abbildung 5.6: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse mit CONTIN-LL. Der α -helikale Anteil von TisB in der Sekundärstruktur ist in allen untersuchten Medien sehr hoch. Die dazugehörigen Werte sind in Anhang B in Tabelle B.1 zu finden.

Klar zu erkennen ist ein sehr hoher helikaler Anteil in der Sekundärstruktur des Peptids, je nach Lösungsmittel zwischen 83% und 92%. Lediglich in Wasser bei einer Temperatur von 90 °C ist der helikale Anteil etwas geringer, liegt aber immer noch bei etwa 75%. Der Anteil an β -Faltblattstruktur ist immer sehr gering zwischen 0.4 und 2.3%, gefolgt von β -Schleifen mit 1.4 bis 8.0% und ungeordneter Struktur mit einem Anteil von 3.6 bis 14.4%. In dem Gemisch aus Methanol, Acetonitril und Wasser (10:9:1), was in etwa den Bedingungen entspricht, bei welchen TisB während der Aufreinigung mittels HPLC eluiert, zeigt das Peptid den größten helikalen Anteil mit knapp 92%. Die NRMSD-Werte sind bei allen Analysen im Bereich von 0.026 und 0.053, was für zuverlässige Dekonvolution der Spektren spricht.

5.2.4 CD-Spektren der CF₃-Bpg-Analoga

Um einen möglichen Einfluss der fluormarkierten Aminosäure CF₃-Bpg auf die Sekundärstruktur von TisB zu untersuchen, wurden mit den synthetisierten CF₃-Bpg-Analoga ebenfalls CD-Messungen durchgeführt. Aus den erhaltenen Spektren der Peptide im HPLC-Eluent (Abbildung 5.7 A) sind keine Unterschiede in ihrer α -helikalen Struktur festzustellen. Die Intensitäten der drei Banden sind nahezu identisch. In DMPC-Vesikeln (Abbildung 5.7 B) sind unterschiedlich starke Signale zu sehen. Die Ergebnisse der Messungen in POPC- und DOPC-Vesikeln sind in Anhang B in Abbildung B.1 dargestellt.

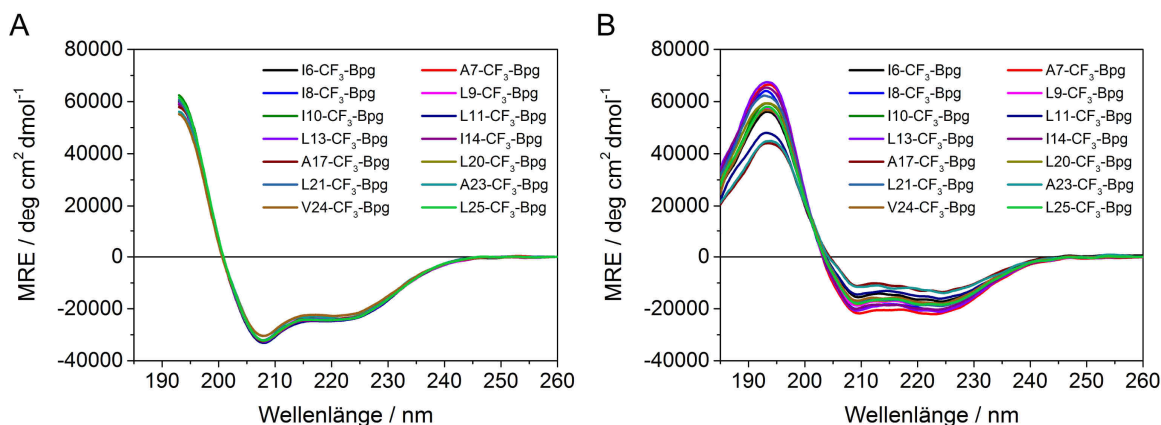


Abbildung 5.7: CD-Spektren der CF₃-Bpg markierten TisB-Analoga im HPLC-Eluent (A) und in DMPC-Vesikeln (B). Alle Peptide zeigen eine nahezu identische α -helikale Sekundärstruktur.

5.2.5 TisB-Ladungsmutanten in Wasser und HPLC-Eluent

Die CD-Spektren der TisB-Ladungsmutanten (Abbildung 5.8) zeigen sowohl in Wasser als auch im HPLC-Eluent ebenfalls eine α -helikale Struktur und keine strukturellen Unterschiede.

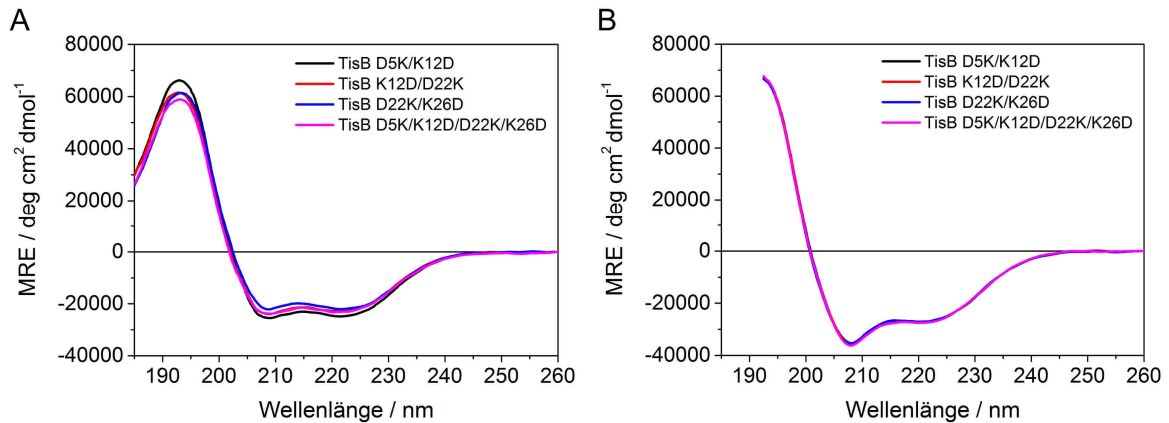


Abbildung 5.8: CD-Spektren der Ladungsmutanten in Wasser (A) und im HPLC-Eluent (B). Alle Peptide zeigen eine α -helikale Struktur und keine strukturellen Unterschiede.

5.2.6 Glutamin-Mutanten und ^{15}N -isotopenmarkiertes TisB

Die CD-Spektren der Glutamin-Mutanten und auch die von ^{15}N -isotopenmarkiertem TisB (Abbildung 5.9) zeigen alle eine α -helikale Sekundärstruktur und keine strukturellen Unterschiede.

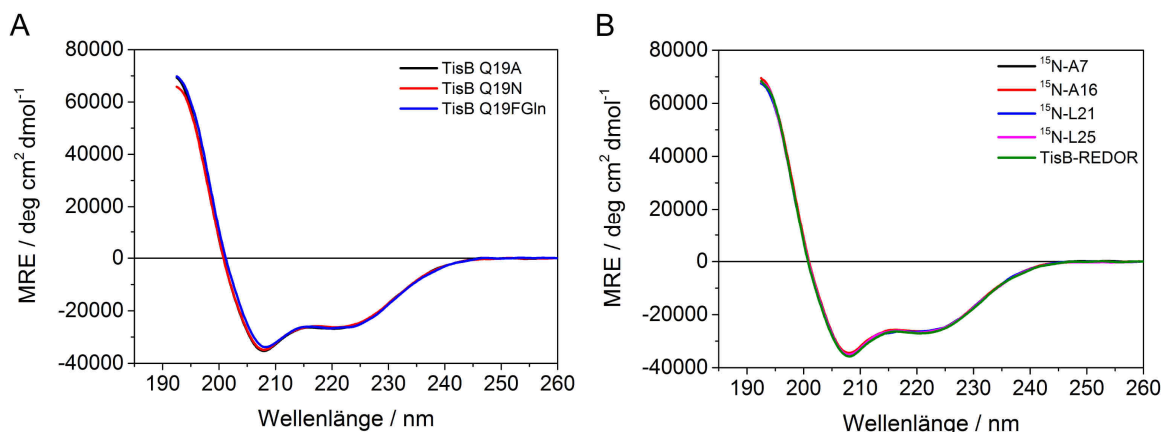


Abbildung 5.9: Sowohl die Glutamin-Mutationen (A) als auch die ^{15}N isotopenmarkierte TisB (B) zeigen im HPLC-Eluenten α -helikale Struktur und keine strukturellen Unterschiede.

5.2.7 CD-Spektren anderer TisB-Mutationen

In Abbildung 5.10 A sind die CD-Spektren von *D*-TisB, TisB-*rev.* und TisB-*scr.* zu sehen. Letzteres zeigt in Wasser ein etwas schwächeres Signal. Die drei Banden sind nicht so stark ausgeprägt als bei den anderen Peptiden. Die Helizität dieser Mutation ist in Wasser etwas geringer, jedoch nicht im HPLC-Eluent. Zum besseren Vergleich wurde das Spektrum von *D*-TisB an der x-Achse gespiegelt.

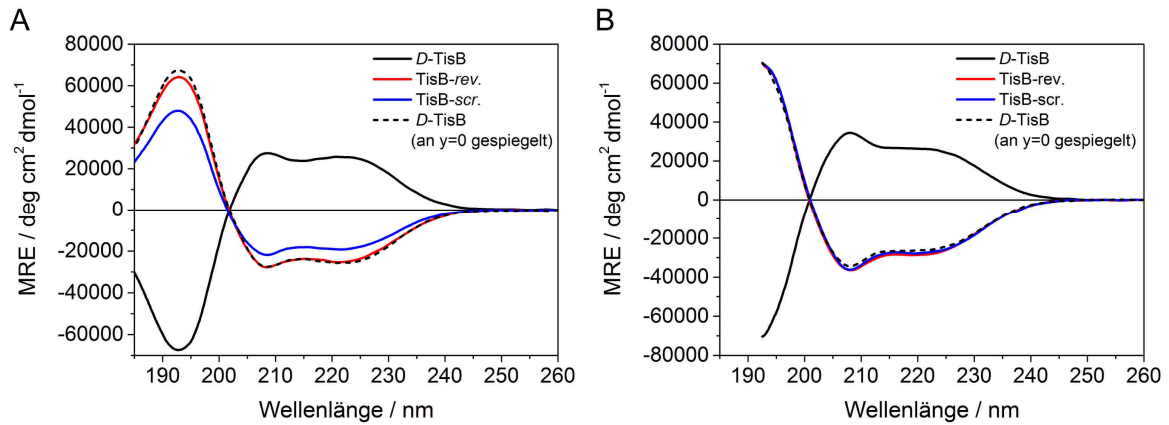


Abbildung 5.10: Die CD-Spektren der TisB-Mutationen zeigen sowohl in Wasser (A) als auch im HPLC-Eluent (B) eine α -helikale Struktur.

5.2.7.1 Thermische Denaturierungsexperimente von TisB-rev. und TisB-scr.

Von TisB-rev. und TisB-scr. wurden ebenfalls thermische Denaturierungsexperimente in Wasser durchgeführt. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 5.11 dargestellt.

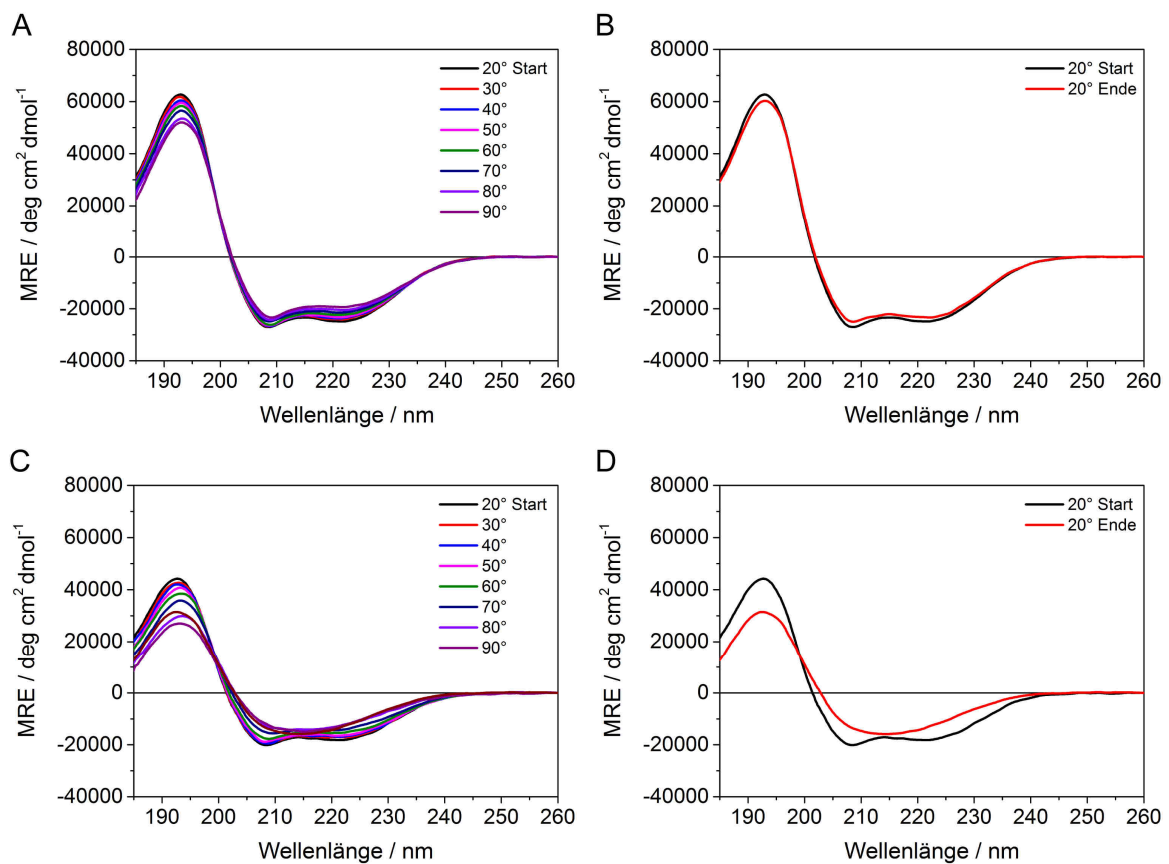


Abbildung 5.11: Ergebnisse der Temperaturserien von TisB-rev. (A und B) sowie TisB-scr. (C und D). Die CD-Spektren zeigen, dass TisB-rev. seine Struktur beibehält, wohingegen TisB-scr. seine Sekundärstruktur durch erhöhte Temperatur irreversibel ändert.

Während TisB-*rev.* das bereits bekannte Verhalten, also keine Veränderung der Sekundärstruktur zeigt, ist hingegen beim TisB-*scr.* eine deutliche, irreversible Veränderung zu erkennen. Das Maximum bei 193 nm nimmt um rund 40% ab und die negativen Banden bei 208 und 222 nm sind nicht mehr zu sehen. Dafür ist nur noch eine negative Bande bei 215 nm vorhanden. Dies spricht für eine deutliche Abnahme des Helixanteils und einen erhöhten Anteil an β -Faltblattstruktur und anderen Strukturelementen. Dies wird durch die Strukturanalyse bestätigt.

Sekundärstrukturanalyse

Die Ergebnisse der Strukturanalysen von TisB-*rev.* und TisB-*scr.* sind in Abbildung 5.12 zu sehen. Diese zeigen, dass die Anteile an Strukturelementen von TisB-*rev.* etwa die dem Wildtyp des Peptids entsprechen. TisB-*scr.* zeigt hingegen einen deutlichen Unterschied in den Spektren bei 20 °C vor und nach dem thermischen Denaturierungsexperiment. Zuvor beträgt der Helixanteil etwa 61%, was verglichen mit dem Wildtyp etwa 20% weniger sind. Der unstrukturierte Anteil ist dabei etwa doppelt so hoch, der Anteil an β -Faltblatt und β -Schleifen beträgt etwa das Dreifache. Im Verlauf der Temperaturerhöhung nimmt die Helizität nochmals deutlich ab, sodass der Anteil bei 90 °C nur noch knapp 40% beträgt. Der unstrukturierte Anteil hat sich dabei auf 30% erhöht, der Anteil an β -Faltblatt und β -Schleifen liegt jeweils bei rund 15%. Es ist somit eine deutliche und irreversible Veränderung der Sekundärstruktur von TisB-*scr.* durch Temperaturerhöhung zu beobachten.

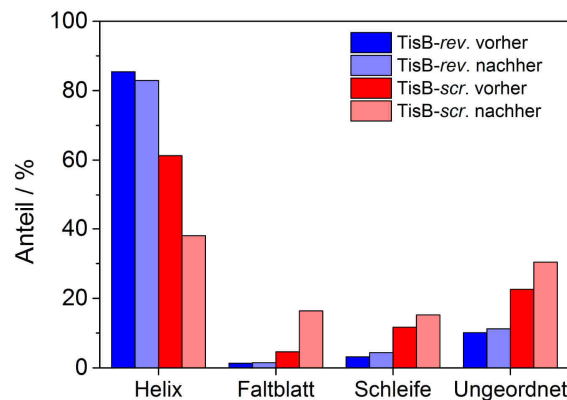


Abbildung 5.12: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse mit CONTIN-LL von TisB-*rev.* und TisB-*scr.* bei 20 °C, jeweils vor und nach der thermischen Denaturierung. Die dazugehörigen Werte sind in Anhang B in Tabelle B.2 zu finden.

5.3 NMR–Spektroskopie

5.3.1 Festkörper– ^{15}N –NMR–Experimente

5.3.1.1 Lipidreihe

Um den Einfluss der Membrandicke auf die Orientierung von TisB zu untersuchen, wurden Messungen an TisB ^{15}N –A16 in Lipiden unterschiedlicher Membrandicke durchgeführt. Die erhaltenen Spektren sowie das Pulverspektrum des verwendeten Peptids sind in Abbildung 5.13 zu sehen. Mit Ausnahme der DLPC–Probe zeigen alle Phosphorspektren eine gute bis sehr gute Orientierung der Lipidmembranen, sowohl vor, als auch nach den ^{15}N –Messungen. In dem sehr kurzen Lipid DLPC zeigt TisB ein Pulverspektrum, was darauf hindeutet, dass das Peptid sich in diesem Lipid nicht orientiert. Das Signal bei 77 ppm, welches im Spektrum von DErPC, einem sehr langen Lipid, zu sehen ist, deutet auf eine zur Membranoberfläche parallele Orientierung hin. In allen anderen Lipiden zeigt TisB ein deutliches Signal zwischen 180 und 190 ppm (siehe Tabelle 5.2) und somit eine transmembrane Orientierung. Damit auch in DPPC oberhalb des Phasenübergangs des Lipids gemessen wurde, fand diese Messung bei 45 °C statt. Alle anderen Messungen wurden bei einer Temperatur von 35 °C durchgeführt. In DMPC ist zusätzlich zu dem Signal bei 183 ppm noch weiteres, kleines Signal bei 84 ppm zu sehen. Dies zeigt, dass das Peptid in diesem Lipid zwei Zustände bzw. Orientierungen annimmt. Der größte Anteil ist dabei transmembran orientiert und zusätzlich ist noch ein geringer Anteil oberflächlich gebunden vorhanden.

Tabelle 5.2: Übersicht der chemischen Verschiebungen von TisB ^{15}N –A16 in den Lipiden unterschiedlicher Membrandicke. In dem sehr kurzen Lipid DLPC ist TisB nicht orientiert, im sehr langen DErPC orientiert sich TisB parallel zur Membranoberfläche.

	Hydroph. Dicke [\AA]	Chemische Verschiebung [ppm]
DLPC	21.0	–
DMPC	25.4	183/84
DOPC	26.8	184
POPC	28.3	186
DPPC	29.8	186
DEiPC	30.6	180
DErPC	34.4	77

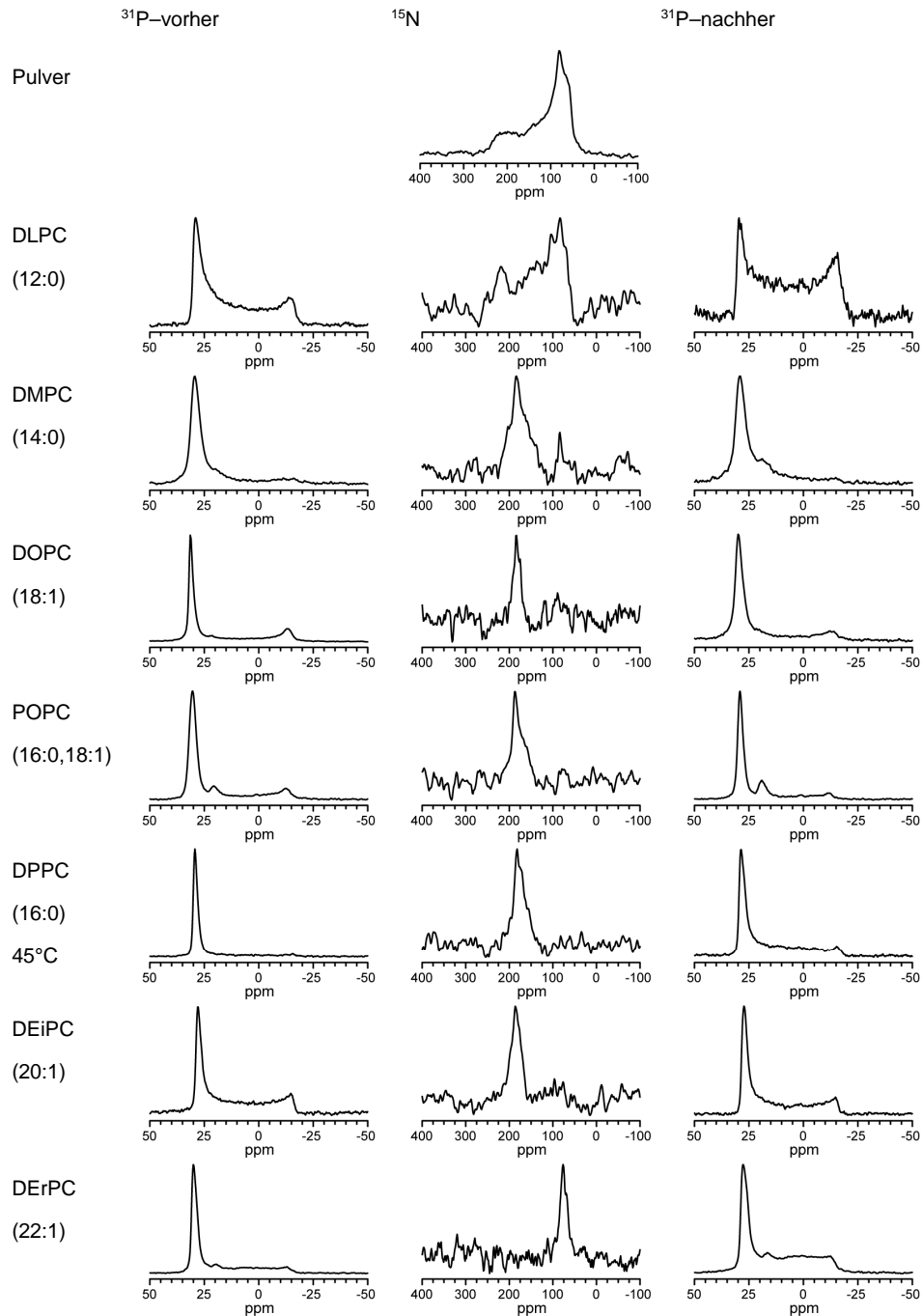


Abbildung 5.13: Vergleich von TisB ^{15}N -A16 in Lipidmembranen unterschiedlicher Länge. Im sehr kurzen (C12:0) DLPC hat sich TisB nicht orientiert. Im langen (C22:1) DErPC liegt es auf der Membran, in alle anderen Lipiden zeigt TisB eine transmembrane Orientierung.

5.3.1.2 ^{15}N -Markierung an unterschiedlichen Positionen

Für die Untersuchung weiterer Teile der Helix wurden noch Spektren zusätzlicher Peptide aufgenommen, welche an anderen Positionen ^{15}N -markiert sind. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.14 zu sehen. Die Phosphorspektren zeigen auch hier, dass alle

Proben vor der ^{15}N -NMR-Messung gut orientiert waren. Die Orientierungen der Lipidmembranen von ^{15}N -L21 und ^{15}N -L25 haben sich während der Messung verändert. Dennoch ist in allen ^{15}N -NMR-Spektren im Bereich von 185 – 210 ppm ein deutliches Signal zu erkennen. Dies zeigt, dass alle vier Peptide transmembran orientiert sind. Eine Übersicht der chemischen Verschiebungen ist in Tabelle 5.3 zu sehen.

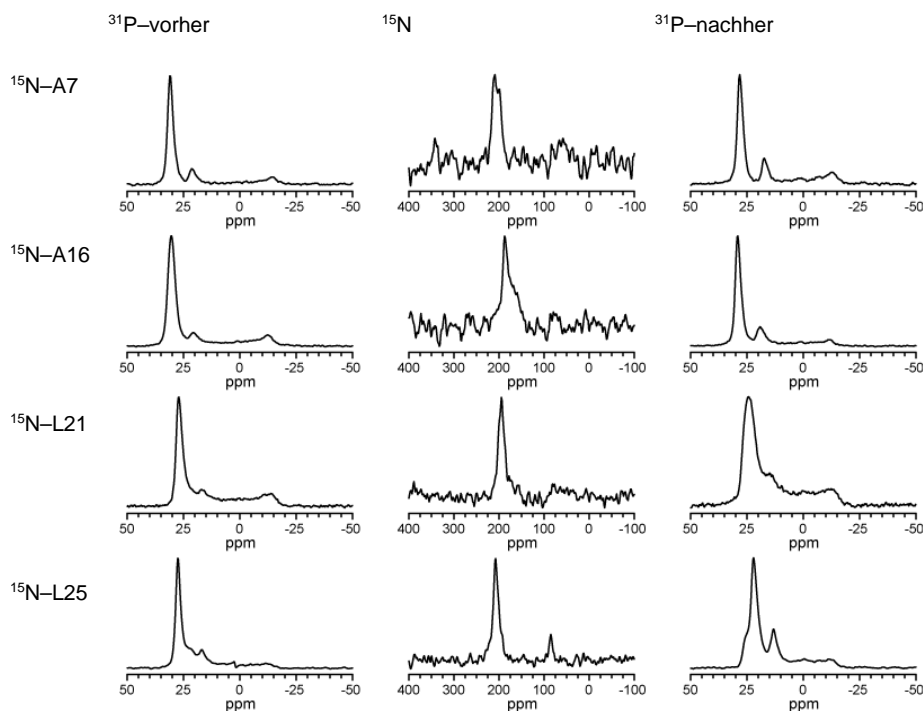


Abbildung 5.14: NMR-Spektren der an unterschiedlichen Positionen ^{15}N -markierten TisB in POPC. Alle Peptide zeigen ein Signal zwischen 185 und 210 ppm und somit eine transmembrane Orientierung.

Tabelle 5.3: Chemische Verschiebungen der an unterschiedlichen Positionen ^{15}N -markierten TisB.

Chemische Verschiebung [ppm]	
^{15}N -A7	205
^{15}N -A16	186
^{15}N -L21	194
^{15}N -L25	207

Ergebnis der Strukturanalyse

Mit den erhaltenen chemischen Verschiebungen von vier an unterschiedlichen Positionen ^{15}N -markierten TisB wurde eine Strukturanalyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.15 zu sehen. Der Neigungswinkel τ der Helix in der Membran beträgt 19° , der azimutale Rotationswinkel ρ ist 165° und der Ordnungsparameter liegt bei 0.92. Der RMSD dieser Berechnung beträgt 0.41 ppm.

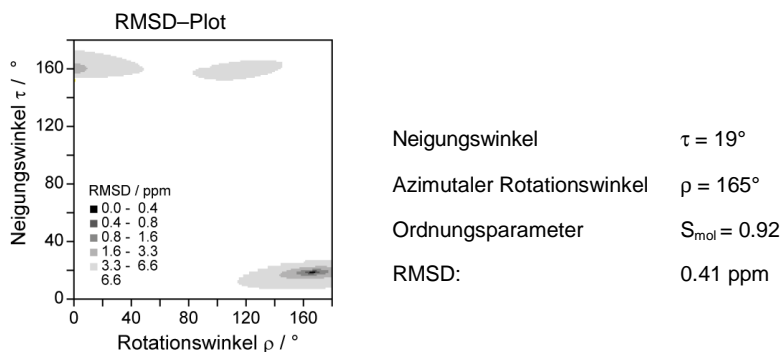


Abbildung 5.15: Ergebnis der Strukturanalyse mit den chemischen Verschiebungen der ^{15}N -markierten TisB.

5.3.1.3 TisB in negativ geladener Lipidmembran

Um den Einfluss von negativ geladenen Lipiden in der Membran zu untersuchen, wurden Proben von TisB ^{15}N -A16 und TisB ^{15}N -21 in POPC und POPG im Verhältnis 7:3 angefertigt. In beiden Fällen ist in den ^{15}N -NMR-Spektren ein deutliches Signal um 190 ppm zu sehen, dass auch schon in POPC beobachtet wurde. Einen Einfluss negativ geladener Lipide bzw. von POPG auf die Orientierung des Peptids ist somit nicht festzustellen.

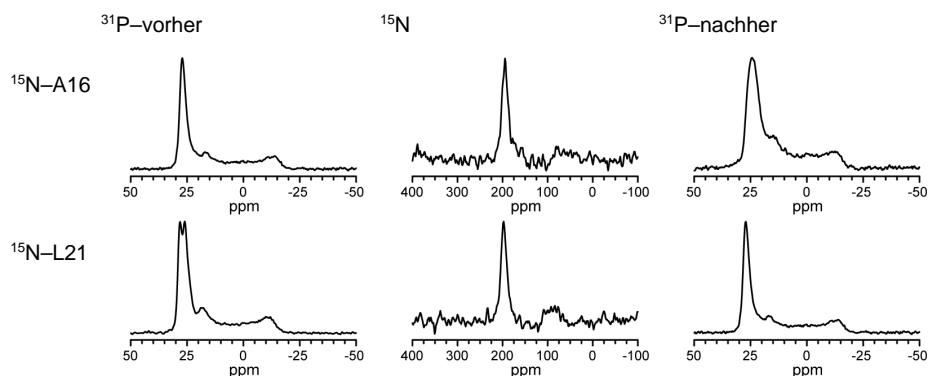


Abbildung 5.16: NMR-Spektren von TisB ^{15}N -A16 und ^{15}N -L21 in POPC/POPG (7:3). Beide Peptide zeigen ein Signal bei etwa 186 ppm (A16) bzw. 194 ppm (L21).

5.3.1.4 Unterschiedliches Peptid-zu-Lipid-Verhältnis

Ein möglicher Einfluss des Peptid-zu-Lipid-Verhältnisses wurde in einem Versuch mit einem höheren Anteil an Lipid (P:L = 1:100) untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.17 zu sehen. Auch hier sind die Lipidmembranen vor Beginn der Messung sehr gut orientiert. Das ^{15}N -NMR-Experiment zeigt ein sehr ähnliches Signal bei 187 ppm. Somit hat ein höheres P:L von 1:100 keinen Einfluss auf die Orientierung des Peptids.

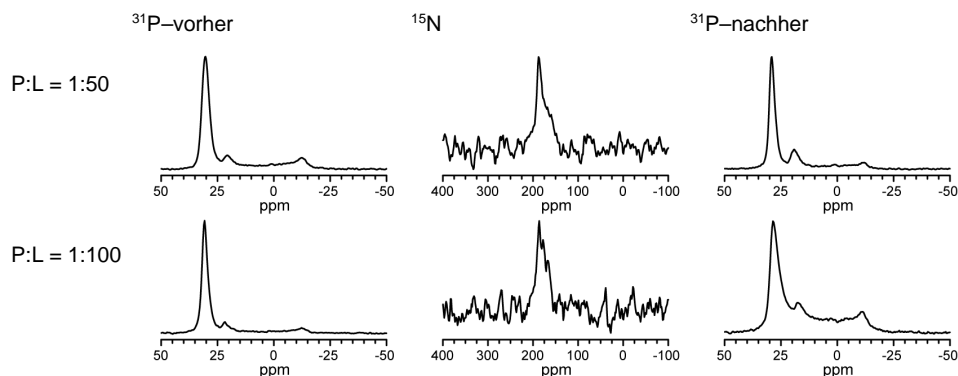


Abbildung 5.17: NMR-Spektren von TisB ^{15}N -A16 in POPC bei einem P:L von 1:50 und 1:100⁷. Auch bei einem P:L von 1:100 zeigt TisB eine transmembrane Orientierung.

5.3.1.5 Neutralisierte und dialysierte POPC-Probe

Einen Einfluss der nach der Aufreinigung in den Peptiden enthaltenen Säure wurde durch Neutralisieren und Entsalzen mittels Dialyse einer Probe untersucht. Das Spektrum von TisB ^{15}N -L21 in POPC (P:L = 1:50) ist in Abbildung 5.18 zu sehen. Hier ist ein Signal bei etwa 193 ppm zu sehen. Dieses wurde auch bei der nicht neutralisierten Probe beobachtet. Die enthaltene Säure scheint hier keinen Einfluss auf die Orientierung zu haben.

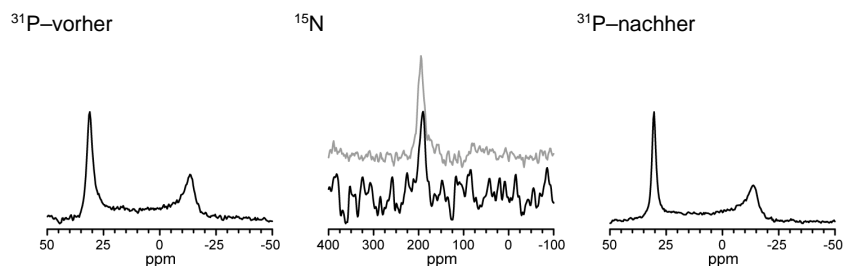


Abbildung 5.18: NMR-Spektren der dialysierten Probe von TisB ^{15}N -L21 in POPC (P:L = 1:50). Das ^{15}N -NMR-Spektrum der nicht dialysierten Probe ist zum Vergleich in grau dargestellt.

5.3.1.6 Temperaturserien von TisB

Der Einfluss der Temperatur auf die Orientierung von TisB wurde in Temperaturserien in vier verschiedenen Lipiden untersucht. Dazu wurden sowohl oberhalb als auch unterhalb der entsprechenden Phasenübergangstemperatur des jeweiligen Lipids Spektren aufgenommen. Die erhaltenen Spektren von TisB ^{15}N -A16 sind in Abbildung 5.19 dargestellt. In DMPC wurde bei 10 °C, dann bei 35 °C und wiederum bei 10 °C gemessen. Unterhalb des Phasenübergangs zeigt TisB hier eine zur Membranoberfläche parallele Orientierung (Signal bei

⁷ Wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit aufgenommen.

82 ppm), oberhalb ist es größtenteils transmembran orientiert. Dieser Prozess der Reorientierung ist reversibel. In DPPC zeigt TisB oberhalb des Phasenübergangs ausschließlich eine transmembrane Orientierung (180 ppm), unterhalb bei 35 °C und 10 °C ein sehr breites Signal von 190 ± 30 ppm sowie ein zusätzliches Signal bei etwa 90 ppm. Dies zeigt, dass auch in DPPC ein Teil der Peptide auf der Membran orientiert vorliegen. In DEiPC ist unterhalb des Phasenübergangs nur ein sehr kleines Signal bei etwa 80 ppm zu sehen, was bedeutet, dass hier der Hauptteil der Peptide transmembran orientiert ist. Bei 35 °C gibt es hier nur ein Signal, welches für eine transmembrane Orientierung (186 ppm) der Peptide spricht. In der Lipidmischung POPC/POPG (7:3) ist sowohl oberhalb als auch unterhalb des Phasenübergangs nur ein Signal bei etwa 197 ppm zu sehen. Folglich ist TisB in diesem Lipidsystem nur transmembran orientiert.

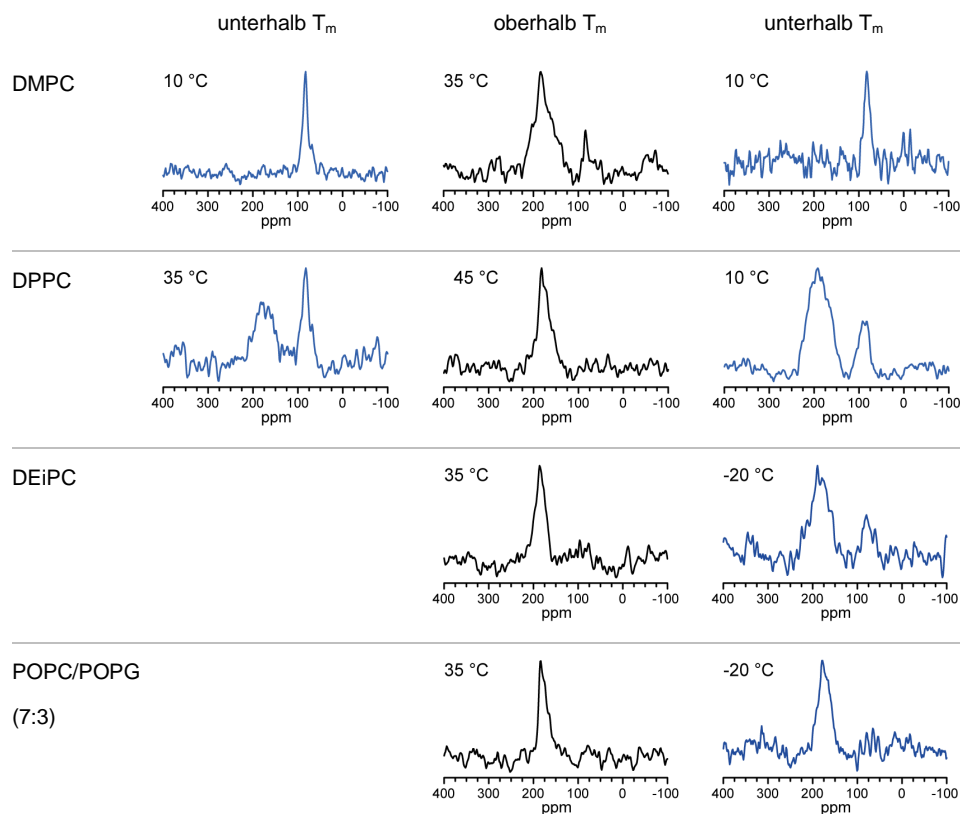


Abbildung 5.19: Ergebnisse der Temperaturserien von TisB ^{15}N -A16 in vier verschiedenen Lipiden. Mit Ausnahme von POPC/POPG zeigen alle anderen Messungen unterhalb der Phasenübergangs-Temperatur der Lipide jeweils zwei Signale, welche zwei unterschiedlichen Orientierungen des Peptids zuzuordnen sind. Nur in POPC/POPG ist TisB sowohl oberhalb als auch unterhalb des Phasenübergangs ausschließlich transmembran orientiert.

5.3.1.7 ^{15}N -NMR-Spektren der Ladungs-Mutanten

Die für die Funktionsanalysen verwendeten Ladungsmutanten von TisB wurden für NMR-Untersuchungen ebenfalls ^{15}N -A16 markiert. Alle Proben zeigen eine hervorragende Orientierung der POPC-Membran vor Beginn der Messungen. Auch hier ist in allen ^{15}N -NMR-Spektren ein deutliches Signal bei 185 – 190 ppm und demnach eine transmembrane Orientierung, wie auch beim TisB-Wildtyp, zu beobachten. Die Mutante D5K/K12D/D22K/K26D zeigt zusätzlich noch ein sehr kleines Signal zwischen 80 und 100 ppm. Bei dieser hat sich allerdings auch die Orientierung der Lipidmembran während der Messung geringfügig verändert. Einen messbaren Einfluss der Mutation auf die Orientierung der Peptide ist nicht festzustellen.

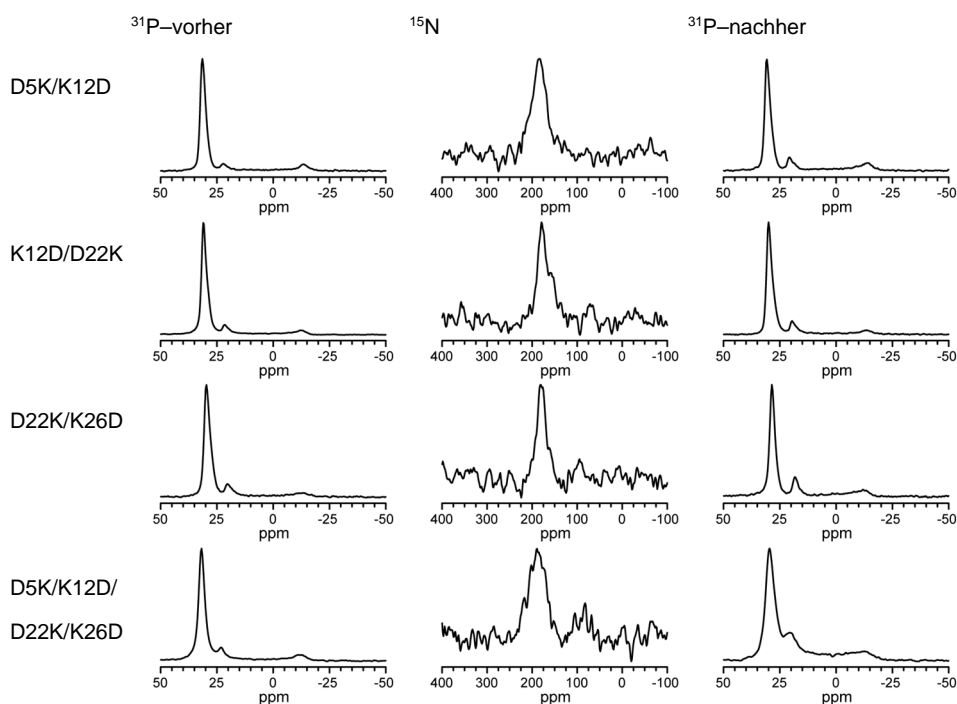


Abbildung 5.20: Ergebnisse der NMR-Experimente der TisB-Ladungsmutanten in POPC. Diese zeigen alle ein Signal zwischen 185 bis 190 ppm, also eine transmembrane Orientierung. Die Mutationen haben somit keinen Einfluss auf die Orientierung des Peptids.

5.3.1.8 ^{15}N -NMR-Spektren der Glutamin-Mutanten

Alle Glutamin-Mutationen zeigen eine transmembrane Orientierung des Peptids. Die ^{15}N -Signale von TisB Q19N und Q19-Afhs sind sehr schmal, Q19A zeigt entweder ein recht breites Signal oder möglicherweise auch zwei sehr schmale, nahe bei einander liegende Signale. Die neutralisierte und durch Dialyse entsalzte Probe von TisB Q19-Afhs zeigt sowohl vor als auch nach den Messungen eine ausgezeichnete Orientierung. Die Veränderung der Orientierung der Membranen der Probe von TisB Q19-Afhs hat keinen erkennbaren Einfluss auf das ^{15}N -Spektrum.

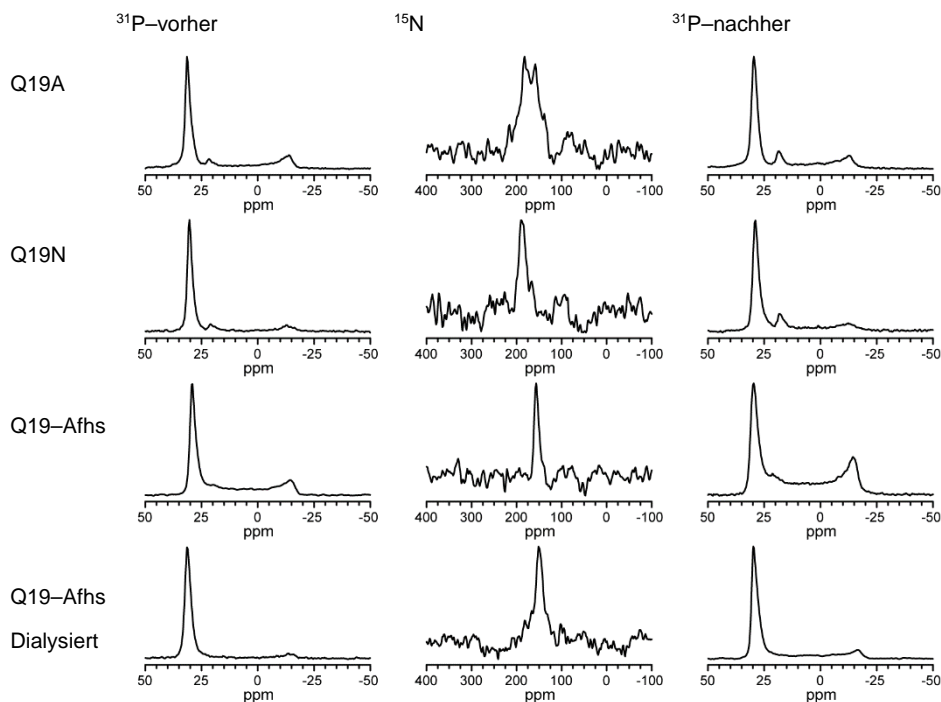


Abbildung 5.21: NMR-Spektren der Glutamin-Mutanten. Alle Peptide zeigen eine transmembrane Orientierung. Die ^{15}N -NMR-Signale von Q19N und Q19-Afhs sind sehr schmal, Q19A zeigt ein breites, möglicherweise auch zwei Signale. Die Probenpräparation mittels Dialyse verbesserte die Orientierung der Membranen in diesem Fall sichtbar.

5.3.2 Festkörper- ^{19}F -NMR-Experimente

Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, wird für die CF_3 -Gruppe im Festkörper- ^{19}F -NMR-Spektrum ein Triplet mit der Intensitätsverteilung 1:2:1 erwartet. Im Falle einer kleinen oder keiner Aufspaltung ist nur ein Peak im Spektrum zu beobachten. Durch Artefakte kann ein Triplet auch nicht vollständig sein bzw. von der Intensitätsverteilung 1:2:1 abweichen. Die in den folgenden Spektren als Triplett gesehenen Peaks sind als solches markiert. Ein Triplet wird hier auch als Signal bezeichnet.

5.3.2.1 Messungen der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in DOPC, DMPC und POPC

Die erhaltenen NMR-Spektren der CF_3 -Bpg markierten TisB-Analoga in DOPC (P:L = 1:50) sind in Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23 zu sehen. Die Überprüfung der Lipidorientierung zeigt bei den meisten Proben eine gute bis sehr gute Orientierung. Lediglich Pos. 9, 23 und 24 sind schon vor den ^{19}F -NMR-Messungen nur mäßig orientiert. In den ^{19}F -NMR-Spektren von Pos. 7, 10, 11, 13, 14, 17, 21, und 25 sind eindeutige Aufspaltungen zu sehen, welche sich beim Drehen der Proben um 90° etwa halbieren. Die Aufspaltungen von Pos. 6, 20 und 24 sind sehr klein, aber dennoch sichtbar. Pos. 8 zeigt zwei Triplets, von denen eins nicht ganz

vollständig aufgelöst ist. Die Aufspaltung von Pos. 9 ist nicht eindeutig, Pos. 23 zeigt vermutlich auch Pulveranteile. Diese zwei Proben zeigen auch, verglichen mit den anderen, eine deutlich schlechtere Orientierung. Die ermittelten dipolaren Kopplungen dieser Spektren sind in Tabelle 5.4 aufgelistet. Die erhaltenen Spektren der CF₃-Bpg markierten TisB-Analoga in POPC und DMPC sind in Anhang C in Abbildung C.2, Abbildung C.3 sowie Abbildung C.6 und Abbildung C.7 zu finden.

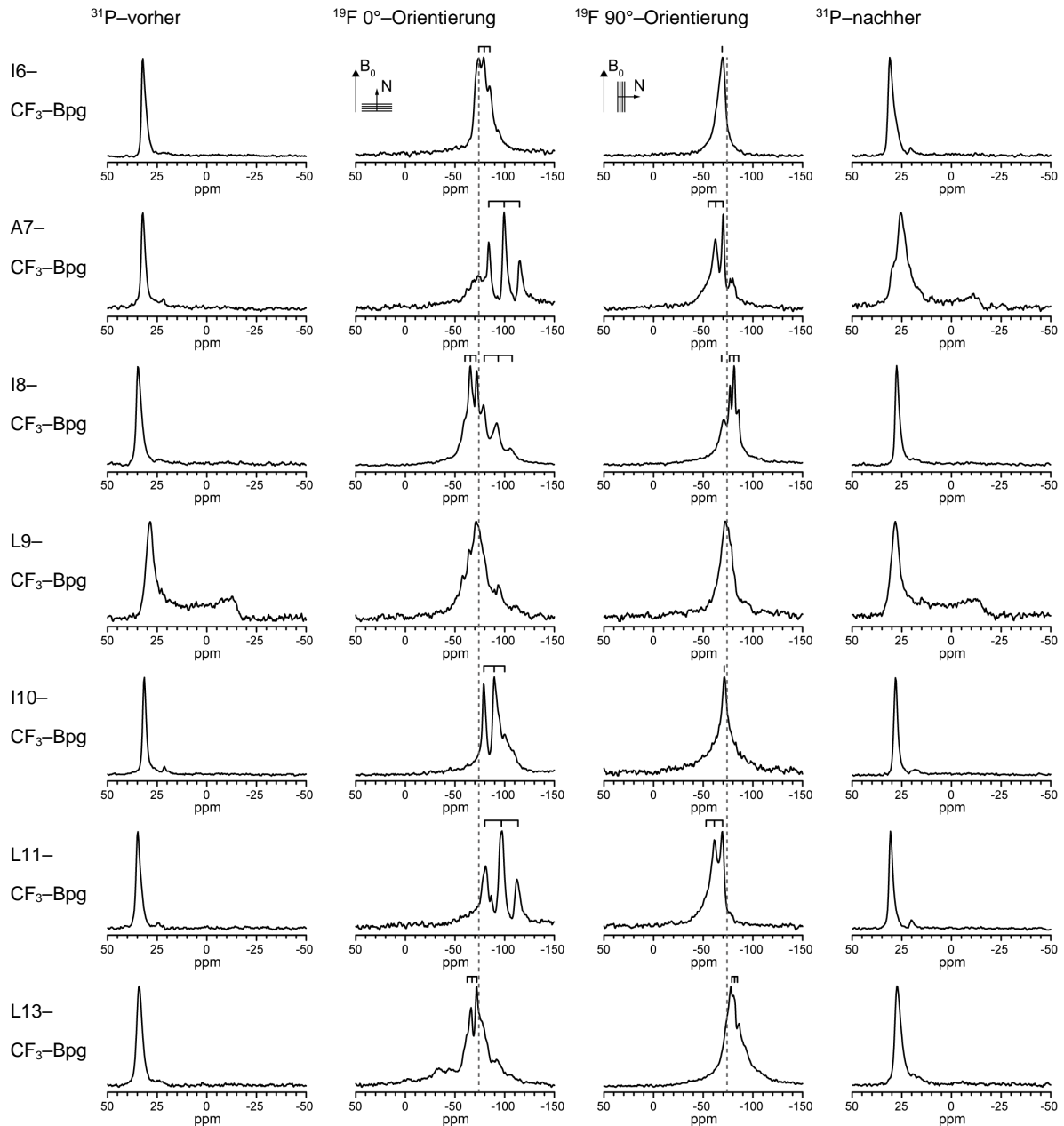


Abbildung 5.22: NMR-Spektren der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga I6 bis L13 in DOPC bei einem P:L von 1:50. Bis auf Pos. 9 zeigen alle Proben eine sehr gute Orientierung der Membran. Die Aufspaltungen in den Spektren von Pos. 7, 10, 11 und 13 sind eindeutig. Pos. 6 zeigt eine sehr kleine Aufspaltung, Pos. 8 zwei Triplets, von denen eins nicht ganz vollständig aufgelöst ist. Aus dem Spektrum von Pos. 9 ist keine eindeutige Aufspaltung zu entnehmen. Die Orientierungen der Proben haben sich während der Messungen mit Ausnahme von Pos. 7 nicht bedeutend verändert.

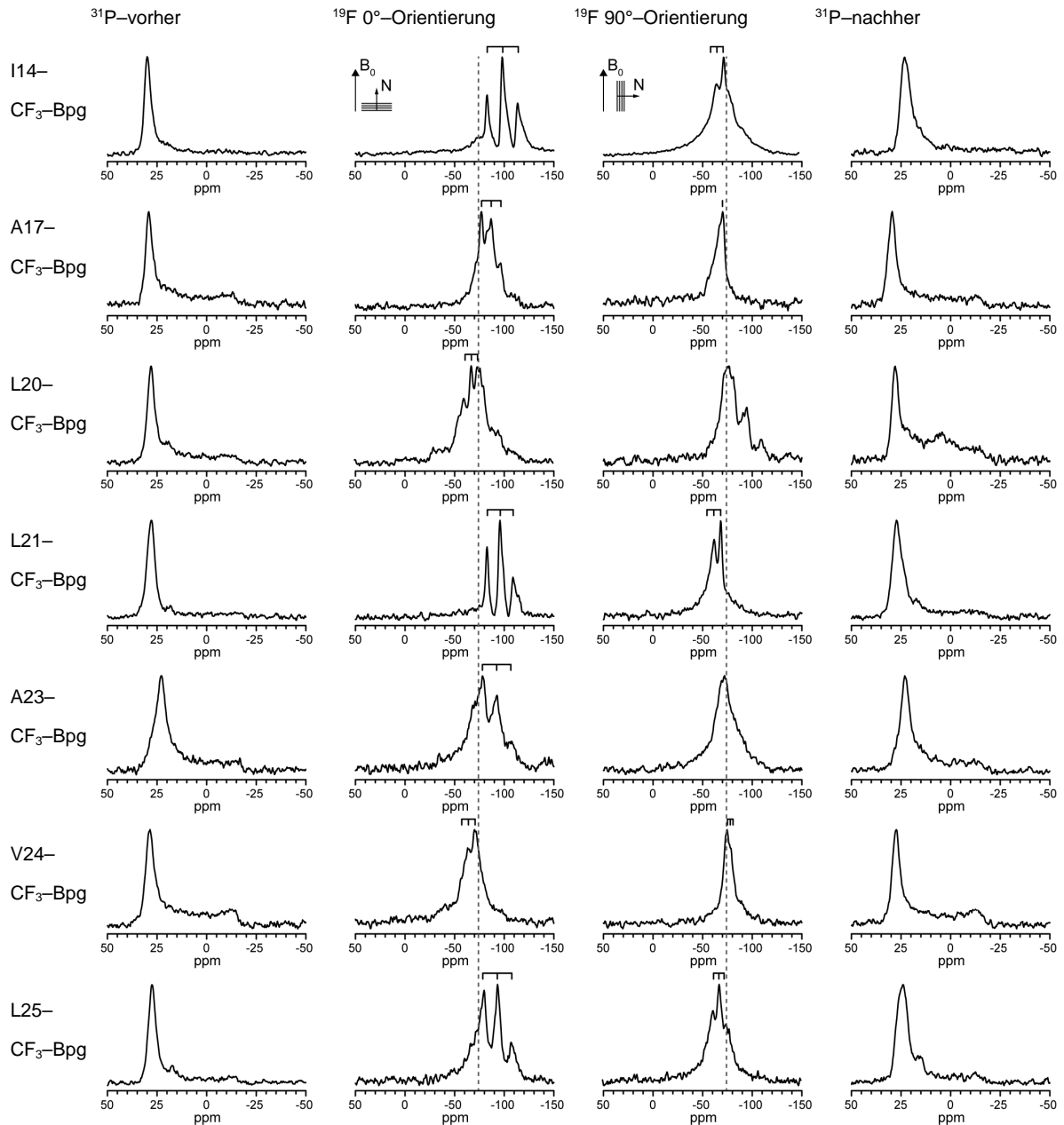


Abbildung 5.23: NMR-Spektren der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga L14- bis L25-Bpg in DOPC bei einem P:L von 1:50. Die Membranen der Proben sind ausreichend gut orientiert. Die Aufspaltungen von Pos. 14, 17, 21 und 25 sind klar zu sehen. Pos. 20 und 24 zeigen sehr kleine Aufspaltungen und zudem noch ein Hintergrundsignal, vermutlich Pulveranteile. Das Phosphorspektrum dieser Probe deutet erfahrungsgemäß auf eine schlechte Hydratisierung hin.

Tabelle 5.4: Ermittelte dipolare Kopplungen der CF₃-Bpg markierten TisB-Analoga in den Phospholipiden DOPC, DMPC und POPC. Es wurden jeweils Spektren in 0° und 90° Orientierung der Membrannormalen relativ zum Magnetfeld aufgenommen. Die Aufspaltungen in Klammern werden in den folgenden Strukturanalysen nicht verwendet (Erläuterung siehe Diskussion). Die Spektren der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC und DMPC sind in Anhang C in Abbildung C.2 und Abbildung C.3 sowie Abbildung C.6 und Abbildung C.7 zu finden.

	DOPC		DMPC		POPC	
	0°	90°	0°	90°	0°	90°
I6-CF ₃ -Bpg	-2.8	-/0	-2.5	-2.0	-2.5	0
A7-CF ₃ -Bpg	-7.3	+3.6	-6.9	-3.0	-7.2	+3.5
I8-CF ₃ -Bpg	+2.0/-5.6	-1.0/+2.5	+1.4/-6.0	0.6/+2.5	+1.2/-5.8	+2.5
L9-CF ₃ -Bpg	(+3.1)	(-1.4)	+6.1	-3.1	(+3.3)	(0)
I10-CF ₃ -Bpg	-5.0	0	-6.8	-3.9	-6.4	+3.0
L11-CF ₃ -Bpg	-7.4	+3.6	-7.0	+3.4	-7.3	+3.5
L13-CF ₃ -Bpg	+2.6	-1.2	0	0	0	0
I14-CF ₃ -Bpg	-7.3	+3.5	-7.0	+3.3	-7.2	+3.4
A17-CF ₃ -Bpg	-4.6	0	-4.7	-	-4.5	+1.5
L20-CF ₃ -Bpg	+3.5	-/0	+5.5	-2.4	+3.4	0
L21-CF ₃ -Bpg	-6.3	+3.2	-6.7	+3.2	-6.9	+3.2
A23-CF ₃ -Bpg	(-6.4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
V24-CF ₃ -Bpg	+3.4	0	+1.5	0	+2.8	-1.5
L25-CF ₃ -Bpg	-6.5	+3.0	-7.0	+3.0	-6.0	+3.1

5.3.2.2 Ergebnisse der Strukturanalyse

Analyse mit dem Ordnungsparameter S_{mol}

Mit den ermittelten dipolaren Kopplungen aus Tabelle 5.4 wurde die Strukturanalyse durchgeführt, wobei die Aufspaltungen der Positionen 9 und 23 nicht verwendet wurden (Erläuterung siehe Diskussion). Das Ergebnis ist in Abbildung 5.24 zu sehen. Die Analyse ermittelt einen Neigungswinkel τ von 22°, einen azimutalen Rotationswinkel ρ von 178° und einen Ordnungsparameter S_{mol} von 0.90. Der RMSD dieser Berechnung liegt bei 1.75 kHz. Die Ergebnisse der Strukturanalysen von TisB in den unterschiedlichen Lipiden sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Strukturanalyse (S_{mol} -Modell) mit den ermittelten dipolaren Kopplungen aus den ¹⁹F-NMR-Spektren der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DOPC (P:L = 1:50), DMPC und POPC (P:L = 1:100).

	DOPC	DMPC	POPC
Neigungswinkel τ [°]	22	25	21
Azimutaler Rotationswinkel ρ [°]	178	178	179
Ordnungsparameter S_{mol}	0.90	0.87	0.92
RMSD [kHz]	1.75	1.23	1.54

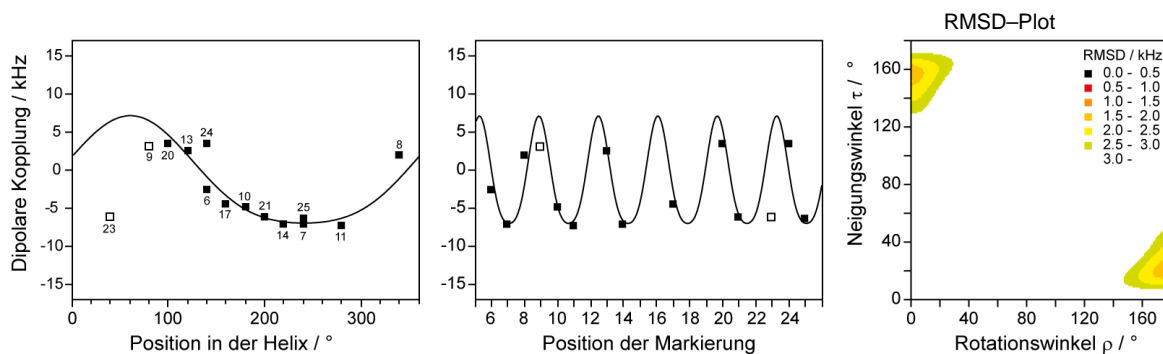


Abbildung 5.24: Strukturanalyse (S_{mol} -Modell) der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in DOPC. Der Neigungswinkel der Helix relativ zur Membrannormalen beträgt $\tau = 22^\circ$, der azimutale Rotationswinkel $\rho = 178^\circ$ und der Ordnungsparameter $S_{\text{mol}} = 0.90$. Der RMSD dieser Berechnung liegt bei 1.75 kHz. Die Aufspaltungen von Pos. 9 und 23 (als leeres Quadrat dargestellt) wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Die Grafiken der Strukturanalysen in POPC und DMPC sind in Anhang C in Abbildung C.4 und Abbildung C.8 zu finden.

Analyse mit dem σ_τ/σ_ρ -Modell

Eine weitere Analyse, die nicht auf dem Modell mit dem Ordnungsparameter S_{mol} beruht, sondern eine Verteilung von τ und ρ ermittelt, zwischen denen sich das Molekül bewegt und die Breite der Verteilung des Neigungs- und azimutalen Rotationswinkels durch σ_τ und σ_ρ wiedergibt, bestimmt einen Neigungswinkel τ von 41° mit $\sigma_\tau = 0^\circ$ und einen azimutalen Rotationswinkel ρ von 178° mit $\sigma_\rho = 50^\circ$. Der RMSD beträgt 1.58 kHz.

Tabelle 5.6: Ergebnisse der Strukturanalyse mit dem σ_τ/σ_ρ -Modell der CF_3 -Bpg-Analoga in DOPC, DMPC und POPC. Die Grafiken für POPC und DMPC sind in Anhang C in Abbildung C.5 und Abbildung C.9 zu finden.

	DOPC	DMPC	POPC
Neigungswinkel τ [°]	41	38	32
Verteilungsbreite σ_τ [°]	0	3	1
Azimutaler Rotationswinkel ρ [°]	178	175	176
Verteilungsbreite σ_ρ [°]	50	46	47
RMSD [kHz]	1.58	1.15	1.49

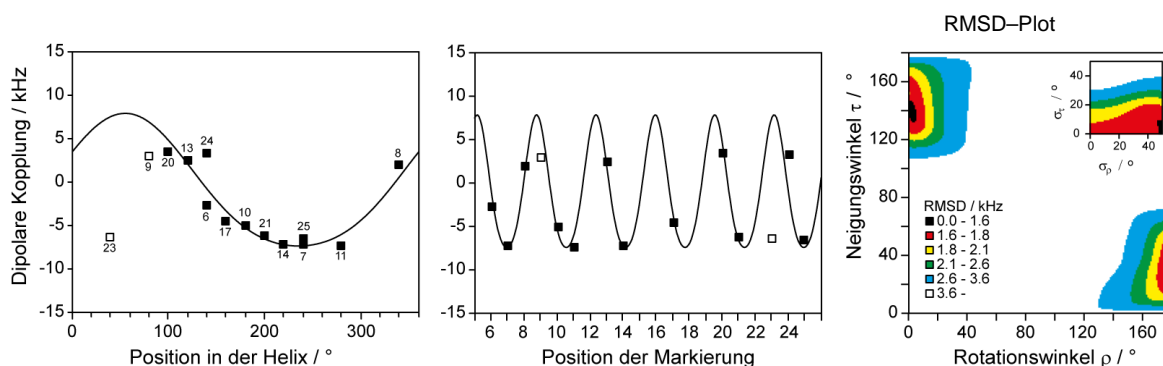


Abbildung 5.25: Strukturanalyse mit dem σ_τ und σ_ρ -Modell: Der Neigungswinkel der Helix ist $\tau = 41^\circ$ mit einer Breite der Verteilung von $\sigma_\tau = 0^\circ$. Der azimutale Rotationswinkel beträgt $\rho = 178^\circ$ mit $\sigma_\rho = 50^\circ$. Der RMSD liegt hier bei 1.58 kHz.

Konzentrationsserien in DMPC und POPC

Um zu untersuchen, ob TisB ähnlich wie andere membranaktive Peptide eine konzentrationsabhängige Orientierung zeigt [68], wurden Spektren von Proben mit einem P:L von 1:50, 1:100 und 1:500 aufgenommen. In DMPC wurde dafür TisB I10-CF₃-Bpg verwendet, in POPC die Messungen mit TisB I10-CF₃-Bpg und TisB I14-CF₃-Bpg durchgeführt. Diese sind in Abbildung 5.26 zu sehen. In DMPC zeigt die Position 10 zwei unterschiedliche Aufspaltungen (+7.6 und -6.8 kHz). Bei einem niedrigen P:L-Verhältnis von 1:50 ist die Intensität des Triplets mit +7.6 kHz Aufspaltung sehr gering, hingegen die der -6.8 kHz Aufspaltung sehr groß. Bei einem P:L von 1:100 und 1:500 sind die Intensitäten beider Triplets etwa gleich groß. In POPC zeigen sowohl Pos. 10 als auch Pos. 14 sehr ähnliche Spektren mit gleich großen Aufspaltungen von -6.4 und -7.2 kHz, unabhängig vom verwendeten P:L-Verhältnis.

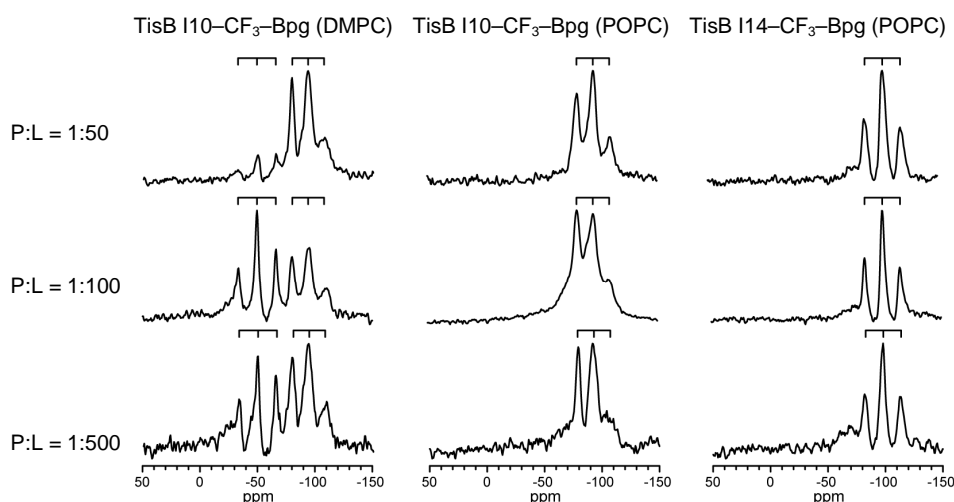


Abbildung 5.26: ¹⁹F-NMR-Spektren (0°-Orientierung) der Konzentrationsserien in DMPC und POPC. Die vollständigen Spektren sind in Anhang C in Abbildung C.11, Abbildung C.12 und Abbildung C.13 zu sehen.

5.3.2.3 Proben entsäuert mit Natriumhydrogencarbonat

Durch Zugabe von 4 Äquiv. NaHCO₃-Lösung bei der Probenvorbereitung konnte das Auftreten eines zusätzlichen Triplets im NMR-Spektrum einiger CF₃-Bpg-Analoga verhindert werden. In Abbildung 5.27 sind die Spektren der entsäuerten Proben von Pos. 6, 10 und 17 zu sehen. Die Triplets mit Aufspaltungen +4.6 kHz bei TisB 6-CF₃-Bpg, +7.6 kHz bei TisB 10-CF₃-Bpg und +10.9 kHz bei TisB 17-CF₃-Bpg sind nicht mehr vorhanden. Es werden nur die Aufspaltungen beobachtet, die der transmembranen Orientierung zugeordnet werden können.

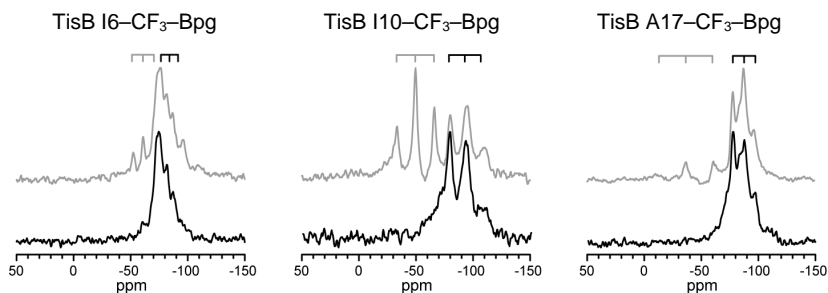


Abbildung 5.27: Auswahl an ^{19}F -NMR-Spektren (0° -Orientierung) von entsäuerten NMR-Proben (schwarz). Durch Zugabe von 4 Äquiv. NaHCO_3 -Lösung konnte das Auftreten zusätzlicher Triplets unterdrückt werden. Zum Vergleich sind die Spektren der nicht entsäuerten Proben in grau dargestellt. Die vollständigen Spektren sind in Anhang C in Abbildung C.16 zu finden.

5.3.2.4 Neutralisierte und dialysierte Proben

Ein möglicher Einfluss der nach der Aufreinigung mittels HPLC enthaltenen Säure auf die Orientierung des Peptids wurde mit Proben von TisB-Analoga I10- und I14- CF_3 -Bpg untersucht. Diese wurden, wie in Abschnitt 4.6.1.1 beschrieben, mittels Dialyse hergestellt. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 5.28 zu sehen. Das Neutralisieren und Entsalzen konnte bei TisB I10- CF_3 -Bpg in DMPC das Auftreten des Triplets mit der Aufspaltung $+7.6$ kHz verhindern. Die Spektren von TisB I10- und I14- CF_3 -Bpg zeigen in beiden Fällen nur ein Triplett mit den bereits zuvor ermittelten Aufspaltungen -6.4 kHz bzw. -7.2 kHz.

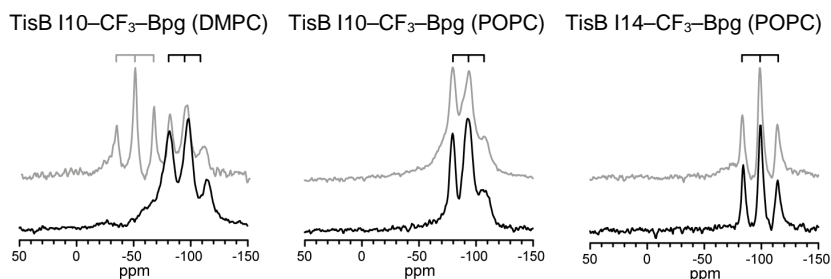


Abbildung 5.28: ^{19}F -NMR-Spektren (0° -Orientierung) der neutralisierten und durch Dialyse entsalzten Proben von TisB I10- CF_3 -Bpg in DMPC und TisB I10- und I14- CF_3 -Bpg in POPC (schwarz). Die Vergleichsspektren sind in grau gezeigt. Die vollständigen Spektren sind in Anhang C in Abbildung C.10 dargestellt.

5.3.2.5 DMPC-Proben mit hinzugefügter Säure

Eine Auswahl der erhaltenen Spektren unter sauren Bedingungen ist in Abbildung 5.29 zu sehen. In allen hier gezeigten Spektren ist ein zusätzliches Triplett oder eine deutliche Intensitätszunahme eines Triplets zu beobachten. Die ermittelten Aufspaltungen sind in Tabelle 5.7 aufgelistet. Demnach wird durch die zusätzliche Zugabe von Säure das Auftreten einer anderen Orientierung begünstigt bzw. verursacht.

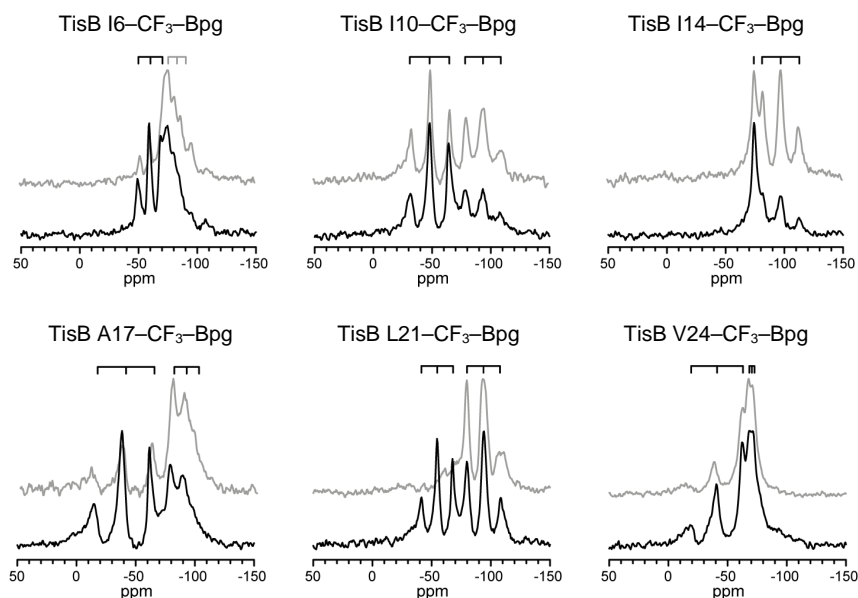


Abbildung 5.29: Auswahl an ^{19}F -NMR-Spektren (0° -Orientierung) der stark sauren DMPC-Proben (P:L = 1:100). Zum Vergleich sind die pH-unkontrollierten Proben in grau dargestellt. Die vollständigen Spektren und die der restlichen Positionen sind in Anhang C in Abbildung C.14 und Abbildung C.15 zu finden.

Tabelle 5.7 Übersicht der ermittelten Aufspaltungen der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in DMPC bei stark saurem pH-Wert. Die aus Tabelle 5.4 bereits bekannten, der transmembranen Orientierung zugeordneten Aufspaltungen, sind grau dargestellt.

	0° -Orientierung		90° -Orientierung	
	Neu auftretende bzw. zusätzliche Aufspaltung [kHz]	Bekannte Aufspaltung (transm. Orient.) [kHz]	Neu auftretende bzw. zusätzliche Aufspaltung [kHz]	Bekannte Aufspaltung (transm. Orient.) [kHz]
I6- CF_3 -Bpg	+4.6		-2.0	0
A7- CF_3 -Bpg		-6.9		+3.1
I8- CF_3 -Bpg	+7.5	-5.8	-3.8	+2.2
L9- CF_3 -Bpg	-5.9		+3.0	
I10- CF_3 -Bpg	+7.6	-7.0	-3.8	+3.7
L11- CF_3 -Bpg		-6.8		+3.0
L13- CF_3 -Bpg		0		-1.2
I14- CF_3 -Bpg	0	-7.2	0	+3.2
A17- CF_3 -Bpg	+10.9	-5.0	-5.6	0
L20- CF_3 -Bpg	-1.0	+5.8	0	-3.1
L21- CF_3 -Bpg	+6.1	-6.7	-1.9	+2.6
A23- CF_3 -Bpg		-6.0		+3.0
V24- CF_3 -Bpg	+10.2	+1.0	-5.6	0
L25- CF_3 -Bpg		-6.8		+2.7

Strukturanalyse der zusätzlichen bzw. anderen Kopplungen

Die Ergebnisse der Strukturanalysen mit den zusätzlichen Aufspaltungen (sofern vorhanden) der angesäuerten DMPC Proben ($P:L = 1:100$) sind in Abbildung 5.30 zu sehen. Die Analysen ergeben einen Neigungswinkel von $\tau = 84^\circ$ (S_{mol} -Modell) bzw. 80° (σ_τ/σ_ρ -Modell), der azimutale Rotationswinkel ρ beträgt in beiden Fällen 73° . Der Ordnungsparameter S_{mol} dieser Orientierung ist 0.86, die Breite der Verteilungen im Falle der Analyse mit dem σ_τ/σ_ρ -Modell sind $\sigma_\tau = 27^\circ$ und $\sigma_\rho = 1^\circ$. Die RMSD-Werte dieser Berechnungen sind mit 1.84 und 1.81 kHz sehr ähnlich. Diese Analysen zeigen, dass sich TisB unter stark sauren Bedingungen hauptsächlich in einer oberflächlich auf der Membran gebundenen Orientierung befindet, also nahezu parallel mit der Membranoberfläche orientiert ist.

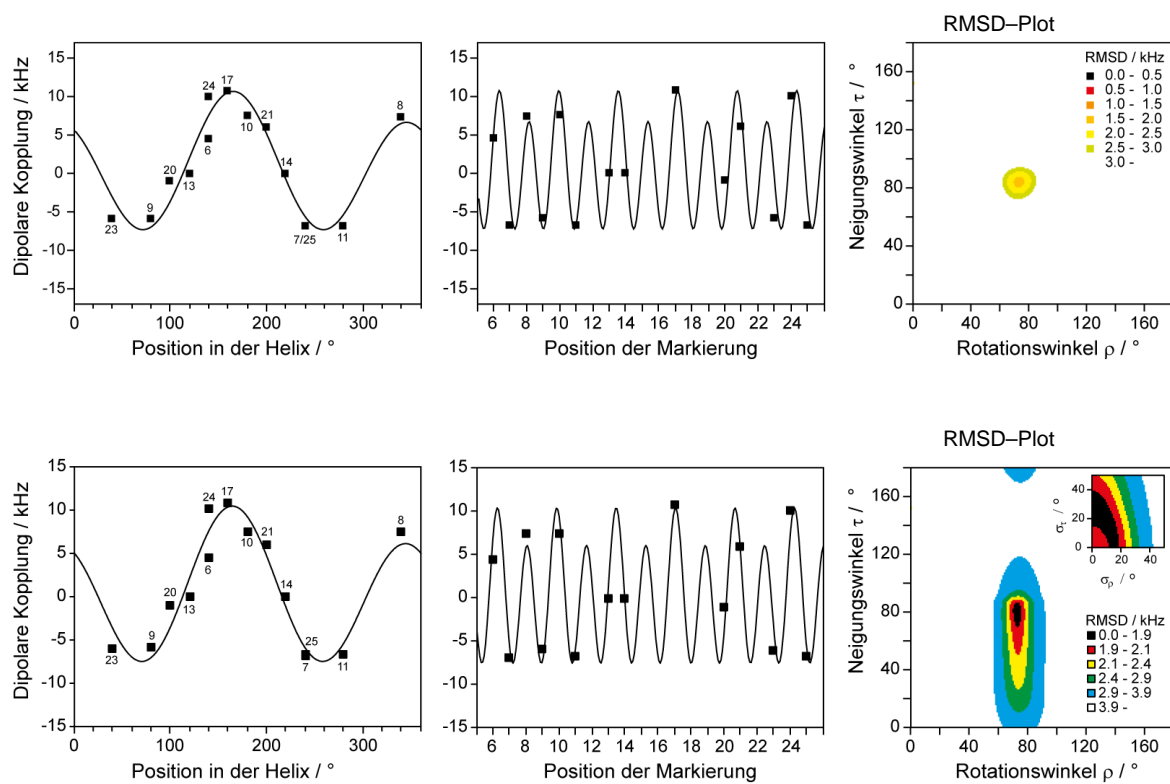


Abbildung 5.30: Strukturanalysen nach dem S_{mol} - und dem σ_τ/σ_ρ -Modell mit den zusätzlichen Aufspaltungen in DMPC: Die S_{mol} -Analyse liefert einen Neigungswinkel von $\tau = 84^\circ$, der azimutalen Rotationswinkel ist $\rho = 73^\circ$ und der Ordnungsparameter S_{mol} beträgt 0.86. Der RMSD ist 1.84 kHz. Die Auswertung mit dem σ_τ/σ_ρ -Modell bestimmt einen Neigungswinkel von $\tau = 80^\circ$ mit $\sigma_\tau = 27^\circ$ und einen azimutale Rotationswinkel von $\rho = 73^\circ$ mit $\sigma_\rho = 1^\circ$. Der RMSD dieser Berechnung beträgt 1.81 kHz.

5.3.2.6 Einfluss negativ geladener Lipide

Um einen möglichen Einfluss von Phosphoglycerol in der Membran auf die Orientierung von TisB zu untersuchen, wurden von einzelnen Positionen ebenfalls NMR-Spektren in den Gemischen DMPC/DMPG (7:3) und POPC/POPG (7:3) aufgenommen. Die ermittelten Auf-

spaltungen sind in Tabelle 5.8 und Tabelle 5.9 zusammengestellt. Die Spektren sind im Anhang in Abbildung C.17 und Abbildung C.18 zu finden. Verglichen mit den Spektren der CF₃-Bpg-Analoga in DMPC oder POPC, sind keine Unterschiede in den Aufspaltungen festzustellen. Demnach hat ein 30%iger Anteil von DMPG bzw. POPG in der Membran keinen Einfluss auf die Orientierung von TisB.

Tabelle 5.8 Übersicht der Aufspaltungen in DMPC/DMPG.

	Aufspaltung [kHz]	
	0°-Orientierung	90°-Orientierung
A7-CF ₃ -Bpg	-6.9	+3.4
I10-CF ₃ -Bpg	-6.8	3.4
L11-CF ₃ -Bpg	-7.1	+3.4
L13-CF ₃ -Bpg	+2.5	0
I14-CF ₃ -Bpg	-7.0	+3.2

Tabelle 5.9 Übersicht der Aufspaltungen in POPC/POPG.

	Aufspaltung [kHz]	
	0°-Orientierung	90°-Orientierung
I6-CF ₃ -Bpg	-2.0	0
A7-CF ₃ -Bpg	-7.3	3.6
I10-CF ₃ -Bpg	-6.1	2.8
L13-CF ₃ -Bpg	0	0
I14-CF ₃ -Bpg	7.2	+3.6
A17-CF ₃ -Bpg	-4.4	0
L21-CF ₃ -Bpg	-6.7	+3.2
V24-CF ₃ -Bpg	+3.0	+1.5

5.3.2.7 Messungen unterhalb des Phasenübergangs von DMPC

Die ¹⁹F-NMR-Spektren unterhalb des Phasenübergangs von DMPC zeigen, dass sich die Orientierung von TisB unter diesen Bedingungen ändert. Die Pos. 8 zeigt ein zusätzliches Triplett, bei Pos. 10 und 14 ist jeweils nur noch eine Aufspaltung sichtbar. Alle hier zusätzlich beobachteten Aufspaltungen können, wie in Abschnitt 5.3.2.3 gezeigt, der zur Membranoberfläche parallelen Orientierung von TisB zugeordnet werden.

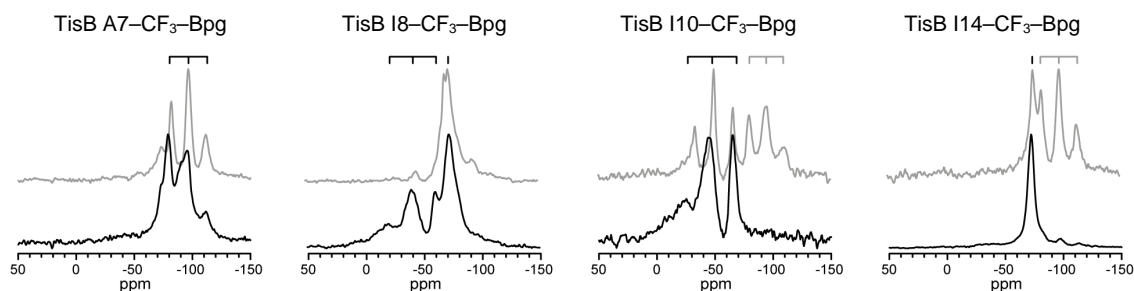


Abbildung 5.31: ^{19}F -NMR-Spektren (0° -Orientierung) vier verschiedener TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DMPC bei einer Temperatur von 283 K (schwarz). Die Aufspaltungen der einzelnen Position unter diesen Bedingungen können der oberflächlichen Orientierung zugeordnet werden. Zum Vergleich sind die Spektren bei 35 °C in grau dargestellt.

5.3.2.8 Messungen in DLPC

Von TisB L11-, I14- und A17-CF₃-Bpg wurden Messungen in DLPC durchgeführt. Diese zeigen, dass sich TisB in diesem Lipid nicht orientiert. Die erhaltenen Spektren zeigen überwiegend Pulveranteile.

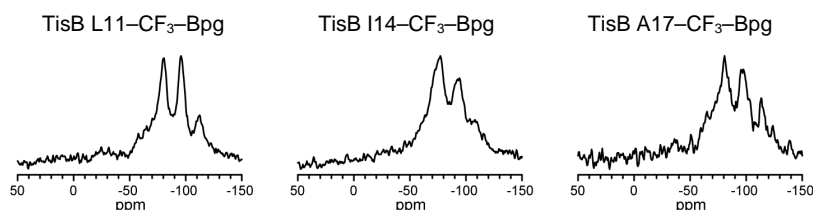


Abbildung 5.32: ^{19}F -NMR-Spektren (0° -Orientierung) verschiedener TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DLPC. Die Signale zeigen fast ausschließlich nicht-orientiertes Peptid.

5.3.3 NMR-Abstandsmessungen

CMPG-Experiment⁸

Die NMR-Spektren der Versuche zur Abstandsmessung mittels CPMG-Pulssequenz sind in Abbildung 5.33 zu sehen. Vor den eigentlichen Messungen wurden sowohl ein ^{15}N -NMR-Spektrum zur Überprüfung der Orientierung des Peptids, als auch ^{19}F -NMR-Spektren mit einer *aring*-Pulssequenz und mittels ^1H - ^{19}F -Kreuzpolarisierung (*CP*) aufgenommen. Als Lipid wurde POPC bei einem P:L von 1:100 verwendet. Die Messungen fanden alle bei einer Temperatur von 10 °C statt. Es wurden Proben nach zwei verschiedenen Methoden hergestellt: Probe V1 wurde durch Rekonstitution aus organischen Lösungsmitteln erhalten. Probe V2 wurde als wässrige Lipid-Suspension neutralisiert und im Anschluss durch Dialyse entsalzt. Hierdurch konnte das Auftreten mehrerer Signale im ^{19}F -*aring* und *CP*-Spektrum unterdrückt

⁸ Die NMR-Abstandsmessungen wurden in Zusammenarbeit mit Xiaojun Xu (KIT) durchgeführt.

werden. Dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf das CP -CPMG-Signal. In beiden Fällen ist im CP -CPMG-Spektrum ein Dublett mit einer Aufspaltung von 316 Hz bzw. 286 Hz zu sehen.

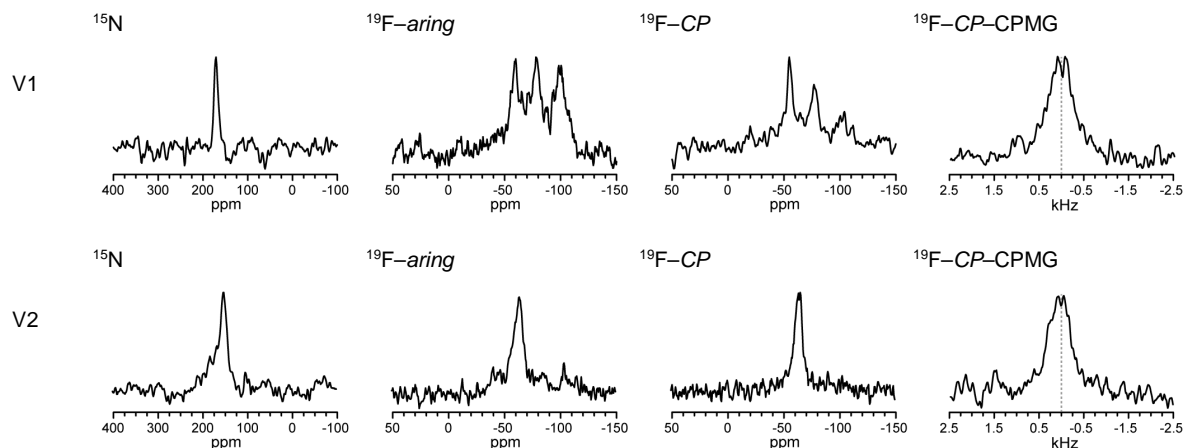


Abbildung 5.33: Ergebnisse der Versuche V1 und V2 der NMR-Abstandsmessung mittels CPMG. Vor dem eigentlichen Experiment (CP -CPMG) wurde die Orientierung des Peptids mittels ^{15}N -NMR überprüft.

Aus den ermittelten dipolaren Kopplungen wird der intermolekulare Abstand zwischen den beiden Fluoratomen nach Gleichung (3.10) berechnet. Die Ergebnisse sind in Abhängigkeit des Ordnungsparameters S_{mol} in Tabelle 5.10 zusammengefasst. Unter Annahme eines Winkels von 0° zwischen dem F-F-Verbindungsvektor und dem äußeren Magnetfeld liegt der maximale Abstand zwischen den beiden F-Atomen im Bereich von 9.5 Å und 10.4 Å, je nach Ordnungsparameter von 0.85 bzw. 1.00.

Tabelle 5.10: Aus den homonuklearen dipolaren Kopplungen ermittelten maximale Abstände in Abhängigkeit des Ordnungsparameters S_{mol} . Der maximale Abstand liegt im Bereich von 9.5 bis 10.4 Å.

Ordnungsparameter	Maximaler F-F-Abstand [Å]	
	V1	V2
0.85	9.5	9.8
0.90	9.7	10.0
0.95	9.9	10.2
1.00	10.0	10.4

5.4 Fluoreszenzspektroskopische Experimente

5.4.1 Messung der Equilibrierung des pH-Gradienten

5.4.1.1 TisB-Wildtyp

Der Zeitverlauf der Fluoreszenz der Messungen mit dem pH-Indikator Pyranin im Vesikel-Inneren wurde in die entsprechenden pH-Werte umgerechnet und ist in Abbildung 5.34 A abgebildet. Ein pH-Gradient wurde angelegt, indem bei einem pH etwas oberhalb von 7 equilibrierte Vesikel in einen Puffer mit pH 6 gegeben wurden. Nach Peptidzugabe bei pH 7 ist der Abfall des pH-Wertes im Vesikel-Inneren zu beobachten. Bei hohen TisB Konzentrationen (24 μM) findet die pH-Equilibrierung innerhalb einer Minute statt, bei 1 μM TisB ist ebenfalls ein Sinken des pH-Wertes zu sehen, jedoch deutlich verlangsamt. Die in den ersten 7 s nach Peptidzugabe erfolgten pH-Änderungen wurden in den entsprechenden Protonenfluss umgerechnet und in Abhängigkeit der eingesetzten TisB-Konzentration, wie in Abbildung 5.34 B dargestellt, aufgetragen. Die so erhaltenen Werte des initialen Protonenflusses wurden an Gleichung (4.2) zur Bestimmung des Hill-Koeffizienten angepasst. Die Ergebnisse dieser Anpassung sind in Tabelle 5.11 zu sehen. Der ermittelte Hill-Koeffizient von $n_{\text{H}} = 2.11 (\pm 0.19)$ zeigt eindeutig positive Kooperativität bei der pH-Equilibrierung.

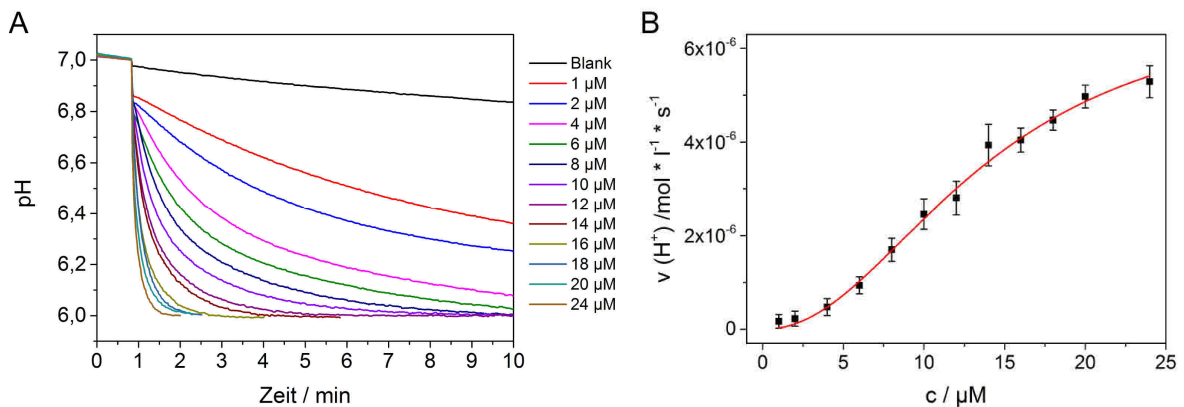


Abbildung 5.34: Equilibrierung des Protonengradienten in Abhängigkeit der TisB Konzentration. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Versuchsreihen dargestellt (A). Auftragung der initialen Geschwindigkeiten des Protonenflusses in Abhängigkeit der eingesetzten TisB Konzentration und Anpassung an die Hill-Gleichung (B). Der ermittelte Hill-Koeffizient $n_{\text{H}} = 2.11$ zeigt einen kooperativen Effekt bei der pH-Equilibrierung.

Tabelle 5.11 Ergebnisse der Anpassung der initialen Geschwindigkeit an die Gleichung (4.2).

	Wert	Fehler
Hill-Koeffizient n_H	2.11	0.19
Maximalgeschwindigkeit V_{\max} [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	$7.1 \cdot 10^{-4}$	$7.4 \cdot 10^{-7}$
Dissoziationskonstante K_D [μM]	13.9	1.6
Regressionskoeffizient R^2	0.9955	

5.4.1.2 Ladungs- und Glutamin-Mutanten

Mit den Ladungs- und Glutamin-Mutanten wurden analoge Messungen bei einer festen Peptidkonzentration von $5 \mu\text{M}$ durchgeführt. Die erhaltenen pH-Signale sind in Abbildung 5.35 zu sehen. Bei den Ladungsmutanten zeigen die beiden Peptide D5K/K12D und D22K/K26D einen deutlich verlangsamten pH-Ausgleich, verglichen mit dem TisB-Wildtyp. Die pH-Equilibration nach Zugabe von K12D/D22K ist etwas langsamer, nach Zugabe von D5K/K12D/D22K/K26D etwas schneller. Die Mutante bei dem Glutamin an Pos. 19 durch ein Asparagin ausgetauscht wurde, zeigt einen etwas schnelleren pH-Ausgleich. Bei der Alanin-Mutation an Pos. 19 ist der pH-Ausgleich langsamer.

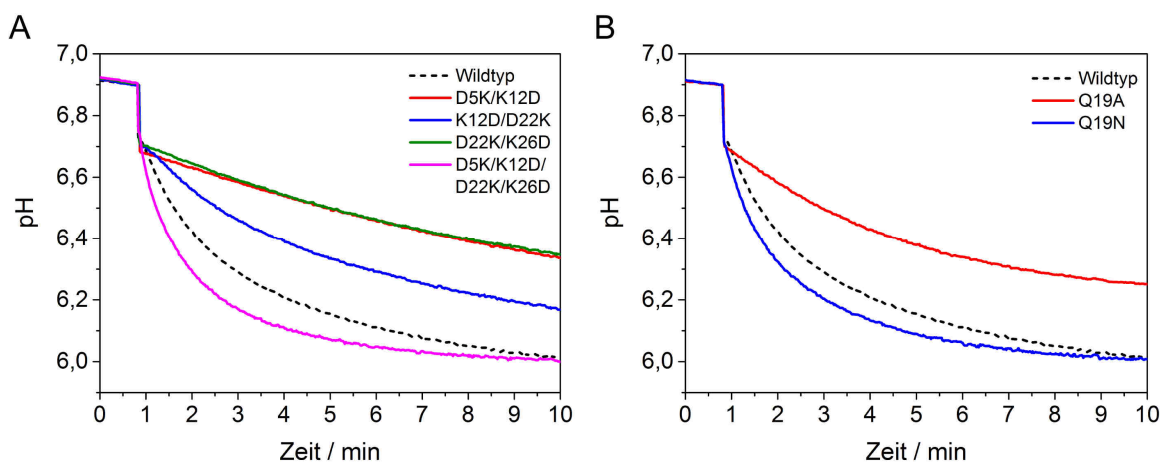


Abbildung 5.35: Equilibration des Protonengradienten der Ladungs-Mutanten (A) und der Glutamin-Mutanten (B) bei einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$.

5.4.2 FRET-Experimente

Aus den Fluoreszenzspektren der Kombinationen aus Dans-TisB + TisB Y27W und Dans-TisB + W-TisB wurden die Werte des Donor-Quenchings und der Akzeptor-Emission nach Gleichung (3.12) und (3.13) ermittelt und gegen den entsprechenden Molenbruch X_A bzw. X_D aufgetragen. Für das Verhältnis der Absorptionen ϵ_A / ϵ_D bei der Anregungswellenlänge (291 nm) wurde ein Wert von 0.34 ermittelt (Tabelle D.6). Die Anpassungen an Gleichung (3.14) beim Donor-Quenching sowie an Gleichung (3.15) bei der Akzeptor-Emission liefern

in beiden Fällen den gesuchten Parameter n , der die Anzahl der Untereinheiten des TisB-Oligomers wiedergibt. Zudem erhält man den zugehörigen Energietransfer E . Die Auftragungen der Werte gegen den Molenbruch X_A bzw. X_D und die Anpassung an die entsprechende Gleichung ist in Abbildung 5.36 dargestellt. Die Werte der Anpassungen sind in Tabelle 5.12 zu finden.

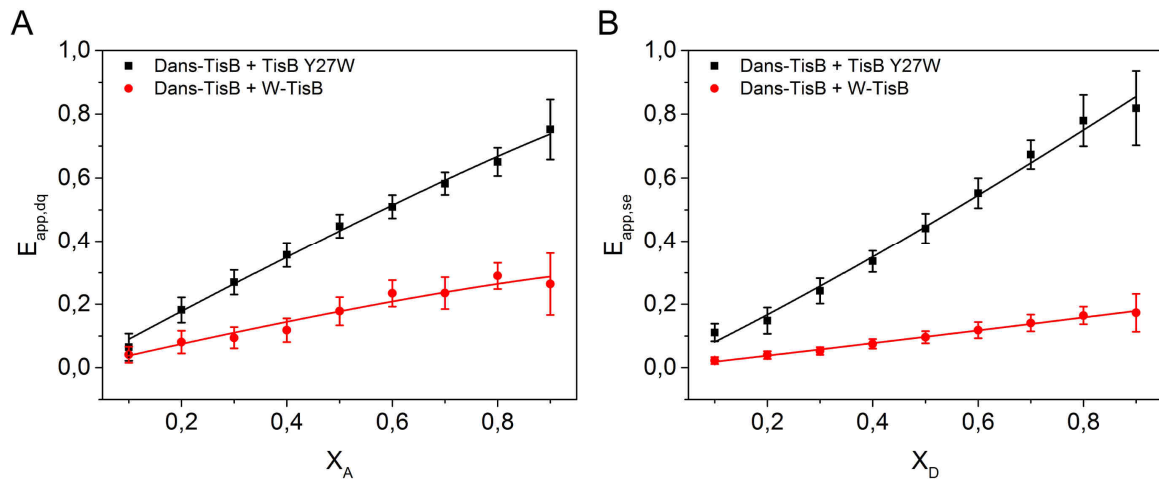


Abbildung 5.36: Auftragung der Donor- (A) und Akzeptor-Emission (B) in Abhängigkeit des Molenbruchs X_A und Anpassungen an Gleichung (3.14) bzw. (3.15). Die einzelnen Werte sind jeweils die Mittelwerte aus zwei Messreihen.

Tabelle 5.12 Ergebnisse der FRET-Auswertung nach Gleichung (3.14) bzw. (3.15).

		Donor-Quenching	Akzeptor-Emission
Dans-TisB + TisB Y27W	E	0.80 ± 0.02	0.77 ± 0.07
	n	2.13 ± 0.06	2.25 ± 0.14
Dans-TisB + W-TisB	E	0.30 ± 0.02	0.18 ± 0.01
	n	2.26 ± 0.23	2.09 ± 0.10

In beiden Fällen, sowohl bei der Fluoreszenzlöschung als auch bei der Zunahme der Akzeptor-Emission, ist eine nahezu lineare Zunahme der Werte $E_{app,dq}$ und $E_{app,se}$ in Abhängigkeit des entsprechenden Molenbruchs zu beobachten. Dies bedeutet, dass TisB in Form von Dimeren in der Membran vorliegt. Die Steigung der einzelnen Geraden ist ein Maß für die Effektivität des Energietransfers. Diese ist bei der Kombination aus Dans-TisB + TisB Y27W in beiden Fällen höher als bei Dans-TisB + W-TisB.

6. Diskussion

6.1 Synthese und Aufreinigung

Die benötigten Peptide konnten alle in ausreichenden Mengen (siehe Tabelle 5.1) synthetisiert werden. Im Verlaufe der Arbeit hat sich herausgestellt, dass für eine erfolgreiche Synthese die Beladung des verwendeten Harzes von entscheidender Bedeutung war. Zu Beginn wurde ein Harz mit einer Beladung von 0.66 mmol/mg verwendet. Hiermit konnten die Peptide zwar synthetisiert werden, die Ausbeuten lagen jedoch im Bereich von 5 – 15%. Bei Verwendung eines Harzes mit einer Beladung von 0.77 mmol/mg kam es zu erheblichen Problemen. Die Synthesen verliefen meist erfolglos oder die Ausbeuten waren sehr gering (<5%). Durch das Verwenden eines Harzes mit einer Beladung von 0.34 mmol/mg konnten die Ausbeuten erheblich gesteigert werden. Diese lagen dann im Bereich von 20% bis 44%, was für die Synthese eines aus 29 Aminosäuren bestehenden Peptids als sehr gut zu bezeichnen ist. Die Abspaltung unter reduktiven Bedingungen verhinderte die Oxidation des Schwefels im Methionin, wodurch sich die Ausbeute nochmals steigern ließ.

Die notwendige Reinheit der Peptide für die NMR-Experimente und Funktionsuntersuchungen konnte erfolgreich mittels HPLC erzielt werden. Wie sich gezeigt hat, ist die Löslichkeit von TisB in Wasser sehr gering. Aufgrund dessen wurden für die Aufreinigung hauptsächlich die organischen Lösungsmittel Acetonitril und Methanol verwendet. Die verwendeten Gradienten waren alle bis auf eine Ausnahme sehr ähnlich, was zeigt, dass sich die Peptide in ihren Hydrophobizitäten und Wechselwirkungen mit der stationären Phase nur geringfügig unterscheiden. Lediglich für TisB-*scr.* musste eine andere Methode zur Aufreinigung gewählt werden, da die Elutionszeit mit den standardmäßig genutzten Laufmitteln zu kurz war. Wie sich bei den CD-Untersuchungen gezeigt hat, sind die Peptide bereits in den verwendeten Laufmitteln zu einer α -Helix gefaltet. Die hydrophobe Seite von TisB kann mit der ebenfalls hydrophoben stationären Phase ideal wechselwirken, was sich in der Elutionszeit widerspiegelt. Durch Vertauschen von drei Aminosäuren wurde in TisB-*scr.* der polare Streifen an Seitenketten aufgelöst (vgl. Abbildung 1.3 B), die Ladungen über die gesamte Helix verteilt und damit der amphiphile Charakter zerstört. Das Resultat ist, dass diese Mutante mit der unpolaren stationären Phase deutlich weniger stark wechselwirkt und sich die Retentionszeit hierdurch erheblich verkürzt.

6.2 CD-Spektroskopie

TisB-Wildtyp

Die erhaltenen Spektren zeigen, dass TisB ein Peptid mit einem sehr hohen helikalen Anteil ist. In allen verwendeten Lösungsmitteln und Medien wurde ausschließlich eine überwiegend α -helikale Struktur von TisB beobachtet. Auch in denaturierender Umgebung (Guanidin-HCl, 8 M) und Detergenz (SDS, 50 mM) behält TisB seine helikale Sekundärstruktur (Abbildung 5.2). Selbst der Versuch, das Peptid durch erhöhte Temperatur zu entfalten, blieb erfolglos (Abbildung 5.3 A und Abbildung 5.4 A). Auch bei Temperaturen von 90 °C konnte keine Denaturierung beobachtet werden. Der helikale Anteil verringerte sich nur geringfügig, in Wasser um 7% und in SDS (5 mM) um 3%. Dieser Prozess war auch reversibel, was bedeutet, dass der helikale Anteil nach den thermischen Denaturierungsversuchen wieder nahezu dem zu Beginn entsprach (Abbildung 5.3 B und Abbildung 5.4 B). TisB bildet demnach eine sehr stabile Helix. In den verwendeten organischen Lösungsmitteln zeigt TisB ebenfalls sehr hohe α -helikale Anteile in der Sekundärstruktur (Abbildung 5.1 B). Folglich ist TisB während der Aufreinigung nicht unstrukturiert, sondern ebenfalls als Helix gefaltet. Hier unterscheidet sich TisB deutlich von anderen helikalen membranaktiven Peptiden. Diese sind in wässriger Lösung meist unstrukturiert und bilden ihre amphiphile helikale Struktur erst durch Wechselwirkung mit einer Lipidmembran oder durch Zugabe von Trifluorethanol aus [33,71,72].

Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse mit CONTIN-LL (Abbildung 5.6 und Tabelle B.1) zeigen bei den Messungen bei Raumtemperatur einen sehr hohen helikalen Anteil von 80 – 90%, wobei der unstrukturierte Anteil im Bereich von 6 – 12% liegt. Die Sekundärstrukturelemente β -Schleife und β -Faltblatt sind mit weniger als 6% nur sehr gering vorhanden. Bei 90 °C in Wasser beträgt der helikale Anteil „nur“ 75%, und β -Schleifen und unstrukturierte Elemente sind mit 8% bzw. 14% etwas erhöht. Die NRMSD-Werte der Berechnungen lagen alle im Bereich von 0.026 bis 0.053, was für eine zuverlässige Dekonvolution der CD-Spektren spricht.

Für die Löslichkeit von TisB in Wasser ist der pH-Wert entscheidend. Unter sauren Bedingungen ist TisB in Wasser etwas löslich. Es reicht die nach der Aufreinigung enthaltene Säure aus (TisB*4HCl), um das Peptid in einer Konzentration von ca. 1.0 mg/ml zu lösen. Wird der pH-Wert erhöht, so bleibt TisB nicht in Lösung, sondern fällt sichtbar aus. Dies liegt vermutlich an der Anzahl der geladenen Seitenketten im Peptid. Im Säuren sind die Aspartate ($pK_s = 3.9$) überwiegend protoniert und das Peptid ist dreifach positiv geladen (Nettoladung). Durch Erhöhung des pH-Wertes werden die Aspartate deprotoniert und die Nettoladung ist

nur noch einfach positiv. Die eingeschränkte Löslichkeit bei neutralem pH-Wert ist auch im CD-Spektrum von TisB in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) zu erkennen (Abbildung 5.1 A). Die negative Bande bei 210 nm und die positive Bande bei 194 nm sind weniger stark ausgeprägt als im Spektrum von TisB in Wasser. Hierbei kam es vermutlich zu Ausfällungen und infolge dessen aufgrund der verhältnismäßig großen Partikel und ihrer inhomogenen Verteilung zu differentieller Lichtstreuung und Absorptionsabflachung (*absorption flattening*) [73,74]. Bei kürzeren Wellenlängen ist dieser Effekt stärker ausgeprägt, wodurch zusätzlich zum Verlust an Intensität die Linienform verzerrt wird (Rot-Verschiebung). Das Spektrum in Wasser (Abbildung 5.1 A) zeigt diese Artefakte nicht. Durch die vom Peptid aus der HPLC-Aufreinigung mitgebrachte Säure wird der pH-Wert so weit gesenkt, dass seine Fällung verhindert wird. Dennoch ist die Bande bei 208 nm nicht so stark ausgeprägt wie beispielweise in Methanol oder SDS (50 mM) (Abbildung 5.2 A und Abbildung 5.1 B), was zeigt, dass es in diesen beiden Medien besser solubilisiert ist. Möglicherweise bilden sich in Wasser kleine helikale Aggregate, um so die hydrophobe Fläche gegenüber dem polaren Lösungsmittel zu minimieren (hydrophober Effekt). In Methanol, dem HPLC-Eluent oder in SDS (50 mM) liegt es demnach vermutlich eher als Monomer vor.

TisB-CF₃-Bpg-Analoga

Die für die ¹⁹F-NMR-Experimente synthetisierten TisB-Analoga dürfen sich in ihrer Struktur vom Wildtyp nicht unterscheiden. Andernfalls wären die daraus gewonnenen Erkenntnisse nicht auf den Wildtyp übertragbar. Um einen möglichen Einfluss der NMR-Sonde auf die Sekundärstruktur des Peptids auszuschließen, wurden von allen CF₃-Bpg-Analoga ebenfalls CD-Spektren aufgenommen (Abbildung 5.7). Diese zeigen, dass sich die markierten Peptide in ihrer Sekundärstruktur voneinander und gegenüber dem TisB-Wildtyp nicht unterscheiden. Die Spektren der Analoga im HPLC-Eluent (Abbildung 5.7 A) sind nahezu identisch, und verglichen mit dem des TisB-Wildtyps (Abbildung 5.1 B), sind keine Unterschiede festzustellen. Die Messungen der CF₃-Bpg-Analoga in DMPC (Abbildung 5.7 B) sowie in POPC und DOPC (Abbildung B.1 in Anhang B) zeigen hingegen unterschiedlich starke Intensität bei 195, 208 und 222 nm. Dies ist, wie bereits beschrieben, auf die unterschiedlich starke Trübung der einzelnen Proben und daraus resultierender differentieller Lichtstreuung und Absorptionsabflachung zurückzuführen. Alle synthetisierten CF₃-Bpg-Analoga sollten demnach für die ¹⁹F-NMR-Experimente geeignet sein, da sie sich in ihrer Sekundärstruktur vom Wildtyp nicht unterscheiden.

TisB-Mutationen

Die Ladungs-Mutanten zeigen sowohl in Wasser und als auch im HPLC-Eluent ebenfalls nahezu identische CD-Signale (Abbildung 5.8). Auch die Glutamin-Mutanten und ^{15}N -isotopenmarkierten TisB zeigen, wie erwartet, keine Unterschiede in ihrer Struktur (Abbildung 5.9). Einen Einfluss der Mutationen bzw. der Markierungen auf die Sekundärstruktur kann somit ausgeschlossen werden. Das CD-Spektrum von *D*-TisB (Abbildung 5.10 A) zeigt die für eine α -Helix charakteristische Form, ist jedoch aufgrund der enthaltenen *D*-Aminosäuren an der x-Achse gespiegelt. TisB-*rev.* zeigt keine strukturellen Unterschiede zum TisB-Wildtyp. Die Intensitäten der drei Banden bei 195, 208 und 222 nm im Spektrum von TisB-*scr.* in Wasser zeigen, dass der helikale Anteil dieser Mutation geringer ist. Im HPLC-Eluent unterscheiden sich die Spektren allerdings nicht (Abbildung 5.10 B). Möglicherweise versucht das Peptid in Wasser durch partielles Entwinden der Helix eine Sekundärstruktur mit amphiphilen Charakter auszubilden, um so anschließend durch Bildung von Oligomeren die hydrophobe Oberfläche zu minimieren. Im HPLC-Eluenten ist die Ausbildung einer amphiphilen Helix aufgrund der geringeren Polarität des Lösungsmittels nicht notwendig, die Peptide liegen vermutlich als Monomere vor und der helikale Anteil unterscheidet sich nicht von dem des TisB-Wildtyps. Von TisB-*rev.* und TisB-*scr.* wurden ebenfalls thermische Denaturierungsexperimente in Wasser durchgeführt (Abbildung 5.11). TisB-*rev.* zeigt hierbei das gleiche Verhalten wie der TisB-Wildtyp, was bedeutet, dass der helikale Anteil durch Erhöhung der Temperatur etwas abnimmt, durch Abkühlen jedoch wieder seine ursprüngliche Sekundärstruktur annimmt. TisB-*scr.* verhält sich dabei völlig anders. Der helikale Anteil von 60% nimmt um mehr als 20% im Laufe der Temperaturerhöhung ab, der Anteil an β -Faltblatt nimmt deutlich um 12% und unstrukturierte Elemente um etwa 8% zu (Abbildung 5.12 und Tabelle B.2). Auch nach Abkühlen behält das Peptid diese Struktur, der Prozess der Veränderung der Sekundärstruktur ist somit im Falle von TisB-*scr.* nicht reversibel. Das Vertauschen der drei Aminosäuren und die daraus resultierende „Zerstörung“ der amphiphilen Helix zeigt hier deutliche Auswirkungen auf das Verhalten des Peptids.

6.3 NMR-Spektroskopie

6.3.1 Festkörper- ^{15}N -NMR-Experimente

Um den Einfluss der Dicke der Membran auf die Orientierung von TisB zu untersuchen, wurden NMR-Messungen in verschiedenen Lipiden durchgeführt (Abbildung 5.13). Die hydrophobe Dicke der ausgebildeten Membranen reichen von 21.0 Å in DLPC bis 34.4 Å in

DErPC. Im kurzen Lipid DLPC wurde ein Pulverspektrum erhalten. TisB nimmt in diesem Lipid keine bestimmte Orientierung ein. Die Spektren von TisB ^{15}N -A16 in den Lipiden DMPC, DOPC, POPC, DPPC und DEiPC zeigen alle ein Signal im Bereich von 180 ppm bis 186 ppm. In diesen Lipiden ist TisB transmembran orientiert. In DErPC, dem verwendeten Lipid mit der längsten Alkylkette, ist TisB parallel zur Membranoberfläche orientiert, was am Signal bei 77 ppm zu erkennen ist. Die Dicke der Membran hat demnach einen Einfluss auf die Orientierung von TisB. Für eine transmembrane Orientierung ist eine gewisse Dicke der Membran notwendig. Diese liegt im Bereich zwischen 21.0 Å (DLPC) und 25.4 Å (DMPC). Ist die Membran allerdings zu dick, so ist TisB parallel zur Membranoberfläche orientiert. Das ist in DErPC der Fall. In diesem Lipid beträgt der hydrophobe Bereich etwa 34.4 Å. DErPC scheint für TisB zu dick zu sein, um die Membran erfolgreich zu durchspannen. Dieses Resultat ist etwas überraschend, da es für TisB als ideale Helix mit einer Gesamtlänge von etwa 44 Å möglich sein sollte. Aus den CD-Experimenten geht hervor, dass der helikale Anteil bei rund 85% liegt. Demnach ist der tatsächliche helikale Teil vermutlich etwas kürzer und nicht ausreichend um die DErPC-Membran zu durchspannen.

Die Messungen in den unterschiedlichen Lipiden wurden alle mit dem an Position 16 ^{15}N -markierten TisB durchgeführt. Zusätzlich zu dieser Position wurden drei weitere Peptide synthetisiert, um zu untersuchen, wie andere Bereiche der Helix orientiert sind. Denkbar wäre, dass die Helix einen Knick enthält oder gebogen ist. Um dies zu bestätigen oder auszuschließen, wurden Peptide synthetisiert, in welchen jeweils die Positionen 7, 21 und 25 die entsprechende ^{15}N -markierte Aminosäure enthalten. Die Signale dieser Peptide (Abbildung 5.14 und Tabelle 5.3) in POPC unterscheiden sich nur sehr gering in ihrer chemischen Verschiebung voneinander. TisB ^{15}N -L25 zeigt mit 207 ppm die stärkste chemische Verschiebung, ^{15}N -A16 mit 186 ppm die geringste. TisB ^{15}N -A7 und ^{15}N -L21 liegen mit 205 bzw. 194 ppm dazwischen. Die Positionen A7 und L25 liegen, wie in Abbildung 1.3 zu sehen, an der gleichen Position um die Helixachse. Wäre die Helix gebogen oder würde einen Knick enthalten, sollten sich die chemischen Verschiebungen dieser Positionen voneinander unterscheiden, sofern die Helix nicht perfekt senkrecht zur Membrannormalen ausgerichtet ist. Mit 205 ppm und 207 ppm sind die chemischen Verschiebungen von Position A7 und L25 aber nahezu identisch. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Helix weder gebogen bzw. stark gekrümmt ist, noch einen messbaren Knick enthält. Mit den ermittelten Werten der chemischen Verschiebung dieser vier TisB-Analoga wurden Strukturberechnungen durchgeführt. Die Berechnungen (Abbildung 5.15) ergeben einen Neigungswinkel von $\tau = 19^\circ$, einen azimutalen Rotationswinkel von 165° und einen Ordnungsparameter von 0.92. Der RMSD-Wert dieser Berechnung ist mit 0.41 ppm sehr klein, was für eine zuverlässige Analyse spricht bzw. das

Modell der idealen Helix gut geeignet ist. Die TisB-Helix ist mit knapp 20° relativ zur Membrannormalen geneigt. Die Überlegung, dass die TisB nicht gebogenen bzw. geknickten ist, hat demnach Bestand. Der Ordnungsparameter von 0.92 zeigt, dass die Mobilität des Peptids in der Lipidmembran gering ist. Bei dieser Strukturanalyse sollte allerdings beachtet werden, dass für eine Analyse mindestens vier verschiedene Positionen notwendig sind. Dies ist hier zwar gegeben, jedoch könnte die quantitative Auswertung aufgrund der geringen Anzahl an Daten noch fehlerbehaftet sein.

In mehreren Experimenten wurde der Einfluss verschiedener Parameter, wie pH-Wert, Peptidkonzentration, Anwesenheit negativ geladener Lipide und die Temperatur auf die Orientierung von TisB untersucht. Die neutralisierte und entsalzte Probe von TisB ^{15}N -L21 zeigt ausschließlich eine transmembrane Orientierung in POPC (Abbildung 5.18), wie auch die pH-unkontrollierten Proben. Ein unterschiedliches Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1:100, also eine Reduzierung der Peptidkonzentration hat keinen Einfluss auf die Orientierung des Peptids (Abbildung 5.17). Ebenso konnte auch kein Einfluss von negativ geladenen Lipiden (30% Phosphoglycerol) auf die Orientierung von TisB festgestellt werden (Abbildung 5.16). In verschiedenen Temperaturserien konnte gezeigt werden, dass die Temperatur einen gewissen Einfluss auf die Orientierung von TisB ausübt. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur von DMPC zeigt TisB ausschließlich eine zur Membranoberfläche parallele Orientierung. In DPPC und DEiPC sind unterhalb des Phasenübergangs beide Orientierungen zu sehen. Oberhalb des Phasenübergangs ist mit Ausnahme von DMPC immer nur die transmembrane Orientierung zu beobachten. Die durch Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur beobachteten Orientierungsänderungen waren stets reversibel. In der Gel-Phase nimmt die Länge der Lipide zu und damit steigt auch die hydrophobe Dicke der Membran. Dies führt scheinbar dazu, dass TisB teilweise aus der Membran herausgedrückt wird und sich oberflächlich, auf der Membran liegend, orientiert. In POPC/POPG wurde sowohl oberhalb als auch unterhalb des Phasenübergangs ausschließlich die transmembrane Orientierung beobachtet.

TisB Ladungs- und Glutamin-Mutationen

Die für Funktionsuntersuchungen synthetisierten Ladungs- und Glutamin-Mutanten wurden für ^{15}N -NMR-Experimente ebenfalls an Pos. 16 mit ^{15}N -Alanin markiert. Alle Mutationen zeigen, wie auch der TisB-Wildtyp, eine transmembrane Orientierung in POPC. Für die Ladungsmutanten D5K/K12D und D22K/K26D ist dieses Ergebnis überraschend. Die hier durchgeführten Mutationen sollten eine gegebenenfalls mögliche Bildung eines antiparallelen Dimers verhindern. Gleich geladene Reste sollten sich abstoßen und die Bildung des postulierten Charge-Zippers verhindern. Aufgrund dessen sollte keine Kompensation der Ladungen

möglich sein und ein Eintauchen in eine Membran erschwert bzw. verhindert werden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Beide Mutationen zeigen, wie auch der Wildtyp, eine transmembrane Orientierung. Möglicherweise bilden sich andere Formen von Oligomeren, oder denkbar wäre auch, dass die Ladungen durch Bildung von intramolekularen Salzbrücken zwischen K5 und D12 bzw. K22 und D26 kompensiert werden, was das Eintauchen dieser Mutanten in die Lipidmembran wiederum ermöglicht. In Abbildung 6.1 ist die Anordnung der Ladungen in den hypothetischen antiparallelen Dimeren für den Wildtyp und die vier Ladungs-Mutanten gezeigt.

TisB				TisB K12D/D22K				TisB D5K/K12D			
D5	K12	D22	K26	-	-	+	+	+	-	-	+
K26	D22	K12	D5	+	+	-	-	+	-	-	+
TisB				TisB D5K/K12D/D22K/K26D				TisB D22K/K26D			
-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-

Abbildung 6.1: Ladungsanordnung im Falle hypothetischer antiparalleler Dimere von TisB und den Ladungs-Mutanten. Die komplementären Ladungen können sich im TisB-Wildtyp sowie in den Mutanten K12D/D22K und D5K/K12D/D22K/K26D gegenseitig kompensieren. In D5K/K12D und D22K/K26D sollten sich gleich geladene Aminosäuren in dieser Anordnung abstoßen.

6.3.2 Festkörper- ^{19}F -NMR-Experimente

6.3.2.1 Die transmembrane Orientierung von TisB

Für die ^{19}F -NMR-Experimente wurden 14 verschiedene TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in den Lipiden DOPC, POPC und DMPC untersucht. Hierdurch steht ein umfangreicher Satz an Daten für die Strukturanalysen zur Verfügung. Die erhaltenen Spektren zeigen meist Triplets mit Aufspaltungen, die für die Strukturanalysen verwendet werden können. Pos. 9 zeigt in DOPC und POPC keine eindeutige Aufspaltung, von Pos. 23 konnte in DOPC nur eine der oberflächlich gebundenen Orientierung zugehörige Aufspaltung beobachtet werden. Diese beiden Positionen wurden deshalb in den Analysen nicht berücksichtigt. Die besten Ergebnisse der Strukturanalysen mit dem S_{mol} -Modell mit allen anderen Aufspaltungen ergeben einen Neigungswinkel der Helix von $21 - 25^\circ$, einen azimuthalen Rotationswinkel von 178° bzw. 179° und einen Ordnungsparameter von 0.87 bis 0.92, je nach verwendetem Lipid (Tabelle 5.5). Die RMSD-Werte dieser Berechnungen liegen zwischen 1.2 und 1.8 kHz und sind damit relativ hoch, was durch die Anzahl verwendeter Aufspaltungen erklärt werden kann. Das verwendete Modell der idealen Helix ist für die Strukturanalyse mit allen Aufspaltungen demnach nur bedingt geeignet. Die in den Analysen verwendeten Positionen (6 bis 25) erstrecken sich über 19 Aminosäuren. Das entspricht mehr als fünf Helix-Windungen. In einer idealen Helix

werden für die Position 6 und 24 sowie 7 und 25 die gleichen Aufspaltungen im NMR-Spektrum erwartet. Die Aufspaltungen von Pos. 6 (-2.8 kHz) und Pos. 24 ($+3.4$ kHz) weichen allerdings deutlich voneinander ab. Bei Pos. 7 und 25 ist der Unterschied mit 0.8 kHz geringer. Demnach ist das Modell einer idealen Helix für den kompletten Bereich von Pos. 6 bis 25 nicht geeignet. Aufgrund dessen wurden weitere Strukturanalysen durchgeführt, in denen der Bereich der verwendeten Aufspaltungen um eine Helix-Windung vermindert wurde. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Werden die Aufspaltungen von Pos. 24 und 25 in den Analysen nicht berücksichtigt, so verbessert sich das Ergebnis erheblich. Die RMSD-Werte dieser Analysen sind mit 1.02 kHz (DOPC), 0.69 kHz (DMPC) und 0.43 kHz (POPC) deutlich kleiner. Die Parameter bezüglich der Orientierung von TisB werden dabei nur geringfügig beeinflusst. Der Neigungswinkel τ ist je nach Lipid um $4^\circ - 5^\circ$ leicht erhöht und der azimutale Rotationswinkel ρ nimmt um $3^\circ - 7^\circ$ ab. Der Ordnungsparameter ändert sich um 0.03 bis 0.04 . Bei den Analysen mit den Aufspaltungen der Positionen 10 bis 25 sind die Auswirkungen deutlich kleiner. Der RMSD der Analyse von TisB in DOPC sinkt lediglich um 0.3 kHz bzw. ändert sich in POPC und DMPC nicht. In Abbildung 6.2 sind die partiellen Strukturanalysen der Peptid-Analoga in DOPC zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Modell der idealen Helix den Bereich von Position 6 bis 21 im TisB sehr gut beschreibt und für die Analyse bestens geeignet ist. Die Abweichungen der Aufspaltungen von Pos. 24 und 25 vom idealen Modell kommen vermutlich durch einen Knick oder Twist in der Helix nach Pos. 21 zustande.

Tabelle 6.1: Ergebnisse der Strukturanalysen (S_{mol} -Modell) mit den dipolaren Kopplungen der Positionen 6 – 21 sowie 10 – 25. Die bereits bekannten Ergebnisse der Analysen mit den Pos. 6 – 25 sind in grau dargestellt. Werden für die Analysen nur die Positionen 6 bis 21 verwendet, so nimmt der RMSD der Analysen deutlich ab.

Pos. in Analyse	DOPC			DMPC			POPC		
	6–25	6–21	10–25	6–25	6–21	10–25	6–25	6–21	10–25
Neigungswinkel τ [°]	22	26	19	25	29	26	21	26	18
Azimutaler Rotationswinkel ρ [°]	178	175	167	178	173	177	179	172	175
Ordnungsparameter S_{mol}	0.90	0.86	1.00	0.87	0.84	0.88	0.92	0.88	1.00
RMSD [kHz]	1.75	1.02	1.45	1.23	0.69	1.22	1.54	0.43	1.59

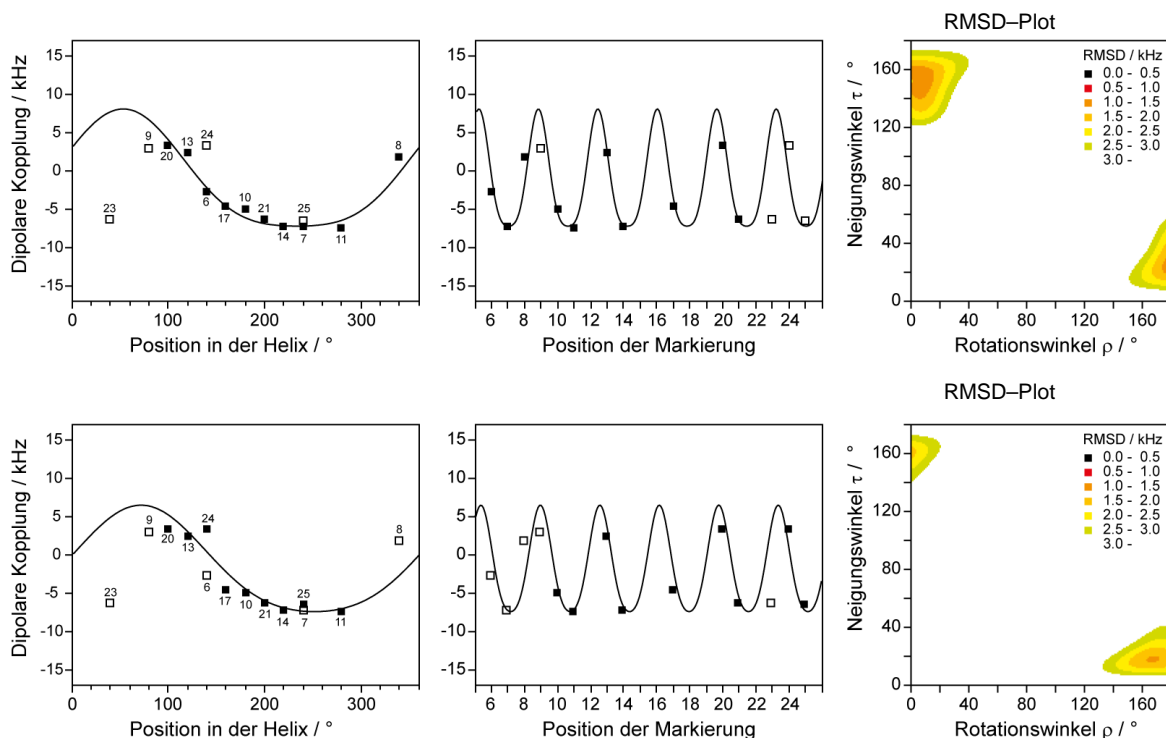


Abbildung 6.2: Partielle Strukturanalyse (S_{mol} -Modell) der Aufspaltungen von Pos. 6 bis 21 (oben) und 10 bis 25 (unten) in DOPC. Wird in der Analyse eine Helix-Windung am C-Terminus vernachlässigt, sinkt der RMSD der Analyse deutlich. Das ist nicht der Fall, sofern die Aufspaltungen der N-terminalen Helix-Windung in der Analyse vernachlässigt werden. Die Grafiken der Analysen in POPC und DMPC sind in Anhang C in Abbildung C.4 und Abbildung C.8 dargestellt.

Einfluss der Membrandicke auf den Neigungswinkel

Die verwendeten Lipide bilden aufgrund ihrer unterschiedlich langen hydrophoben Schwänze unterschiedlich dicke Membranen aus. Die hydrophobe Dicke einer DMPC-Membran liegt bei etwa 25.4 Å, gefolgt von DOPC mit 26.8 Å und POPC mit 28.3 Å. Beim Betrachten des Neigungswinkels nach dem S_{mol} -Modell von TisB in den Lipidmembranen fällt auf, dass dieser mit zunehmender Membrandicke abnimmt. Demnach passt sich der Neigungswinkel der TisB-Helix geringfügig an die Dicke der Membran an.

Strukturanalyse mit dem $\sigma_{\tau}/\sigma_{\rho}$ -Modell

Alternativ zur Strukturanalyse mit dem Modell des Ordnungsparameter S_{mol} wurden mit den erhaltenen Aufspaltungen auch Analysen mit dem σ_{τ} und σ_{ρ} -Modell durchgeführt. Hierbei wird die Mobilität des Peptids durch σ_{τ} und σ_{ρ} beschrieben. Diese beiden Größen beschreiben die Breite der Verteilung des Neigungs- und azimutalen Rotationswinkels. Beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Analysen ist festzustellen, dass sich vor allem die Neigungswinkel im Falle des besten Ergebnisses um bis zu 19° voneinander unterscheiden. Die Helix wäre nach dem $\sigma_{\tau}/\sigma_{\rho}$ -Modell in DOPC um 19° mehr geneigt, in POPC um 11° und in DMPC um 13°. Die Werte des azimutalen Rotationswinkels unterscheiden sich in den Analysen hingegen nur

um maximal 3° . Betrachtet man den RMSD-Plot der DOPC-Analyse (Abbildung 5.25), so ist zu sehen, dass der rote Bereich, der einem RMSD kleiner 1.8 kHz entspricht, sich über einen Bereich erstreckt, dem ein Neigungswinkel von $20^\circ - 50^\circ$ zugeordnet werden kann. In diesem Bereich liegt auch das beste Ergebnis der Analyse mit dem S_{mol} -Modell. Demnach unterscheiden sich zwar die Ergebnisse mit dem kleinsten RMSD, jedoch überlappen sich die Bereiche gleicher RMSD-Werte. Bei den Analysen der DMPC und POPC-Daten sind die Unterschiede kleiner. In POPC beträgt der Neigungswinkel τ nach dem S_{mol} -Modell 21° und nach dem σ_τ/σ_ρ -Modell 32° . Da die chemische Verschiebung von TisB ^{15}N -A16 in POPC und DOPC sich nur um 2 ppm unterscheidet, ist davon auszugehen, dass auch die Neigungswinkel in den beiden Lipiden relativ ähnlich sind. Außerdem würde man für $\tau = 41^\circ$ bzw. 43° im ^{15}N -Spektrum nicht Signale im Bereich von 180 bis 200 ppm erwarten.

Die partiellen Analysen mit dem σ_τ/σ_ρ -Modell bestätigen ebenfalls, dass die Positionen 6 – 21 sehr gut mit dem Modell der idealen Helix übereinstimmen und die Pos. 24 und 25 von diesem etwas abweichen. Wie schon bei der S_{mol} -Analyse sinkt der RMSD-Wert in allen Analysen deutlich, unabhängig vom verwendeten Lipid (Tabelle 6.2). Werden die Pos. 6 bis 21 verwendet, liefert die Analyse (DOPC) einen Neigungswinkel τ von 43° mit $\sigma_\tau = 7^\circ$ und einen azimutalen Rotationswinkel ρ von 174° mit $\sigma_\rho = 44^\circ$. Der RMSD ist mit 0.88 kHz statt 1.58 kHz deutlich geringer (Abbildung 6.3). Die Auswirkung auf die Orientierung ist mit einem Unterschied des Neigungs- und Rotationswinkels von 2° bzw. 4° nur sehr gering. Die Analysen der Aufspaltungen von Pos. 6 bis 21 in POPC (Abbildung C.5) liefern mit beiden Modellen identische Werte für Neigungswinkel τ (26°) und der azimutale Rotationswinkel ρ ist ebenfalls sehr ähnlich (171° bzw. 172°). Der RMSD beider Analysen ist identisch und mit 0.43 kHz sehr klein, was für ein sehr gutes Modell spricht. In DMPC sind wieder Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Analysen sichtbar. Der Neigungswinkel τ ist bei der σ_τ/σ_ρ -Analyse um 4° größer, der Unterschied des azimutalen Rotationswinkels beträgt lediglich 1° . Die RMSD-Werte der beiden Analysen sind relativ klein und mit 0.65 kHz und 0.69 kHz fast identisch.

Tabelle 6.2: Ergebnisse der Strukturanalysen (σ_τ/σ_ρ -Modell) mit den dipolaren Kopplungen der Positionen 6 – 21 im Vergleich mit den vollständigen Analysen (6 – 25). Die bereits bekannten Ergebnisse der Analysen mit den Pos. 6 – 25 sind grau dargestellt.

Pos. in Analyse	DOPC		DMPC		POPC	
	6–25	6–21	6–25	6–21	6–25	6–21
Neigungswinkel τ [°]	41	43	38	33	32	26
Verteilungsbreite σ_τ [°]	0	7	3	14	1	14
Azimutaler Rotationswinkel ρ [°]	178	174	175	172	176	171
Verteilungsbreite σ_ρ [°]	50	44	46	35	47	32
RMSD [kHz]	1.58	0.88	1.15	0.65	1.49	0.43

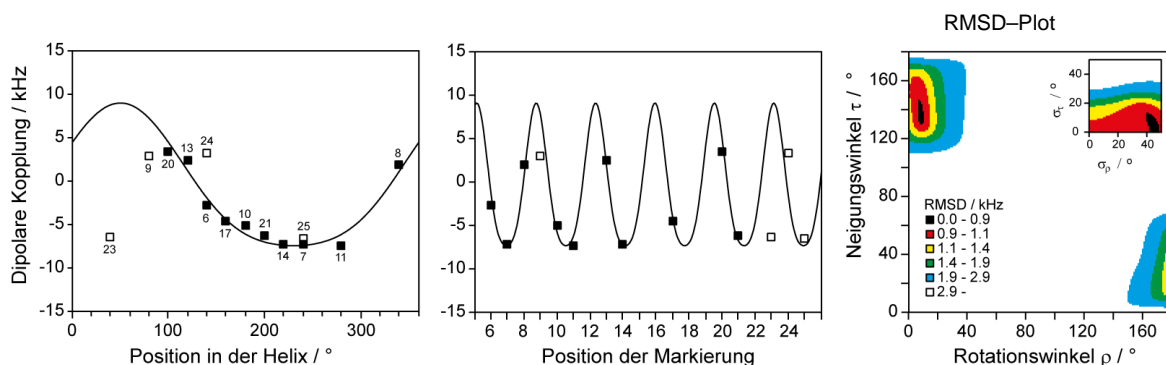


Abbildung 6.3: Partielle Strukturanalyse (σ_τ/σ_ρ -Modell) von TisB in DOPC. Werden nur die Aufspaltungen der Pos. 6 bis 21 verwendet, verringert sich der RMSD der Analysen in allen Lipiden deutlich. Die Auswirkung auf den Neigungs- und azimutalen Rotationswinkel ist aber nur sehr gering. Die Grafiken der Analysen in POPC und DMPC sind in Anhang C in Abbildung C.5 und Abbildung C.9 dargestellt.

Die Positionen I8, L9 und A23

Die Aufspaltungen von TisB L9- und A23-CF₃-Bpg wurden in den Strukturanalysen nicht verwendet. TisB I8-CF₃-Bpg zeigt ein zusätzliches Triplett. In Abbildung 1.3 ist zu erkennen, dass diese Positionen im Bereich des polaren Streifens an Aminosäuren im TisB liegen. Im Falle der Substitution von A23 könnte die Größe der CF₃-markierten Aminosäure einen Einfluss bei der Dimerisierung haben bzw. diese erheblich stören, weshalb im Spektrum (DOPC) nur die der Orientierung parallel zur Membranoberfläche zugehörigen Aufspaltung sowie Pulveranteile zu beobachten sind. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Seitenkette von CF₃-Bpg nicht wie bei Leucin und Isoleucin flexibel ist. Möglicherweise kommt es bei der Substitution dieser Positionen mit CF₃-Bpg ebenfalls zu Störungen bei der Dimerisierung des Peptids, was die abweichende Aufspaltung von Pos. 9 bzw. die zusätzliche Aufspaltungen bei Pos. 8 erklären würde.

6.3.2.2 Einfluss des pH-Wertes

In einigen Spektren der CF₃-Bpg-Analoga in DMPC sind zusätzliche Aufspaltungen zu beobachten. Oftmals ist außer dem Hauptsignal ein weiteres Triplett mit geringerer Intensität zu sehen. Diese Signale konnten einer Orientierung parallel zur bzw. auf der Membranoberfläche des Peptids zugeordnet werden (Abbildung 5.30). Durch Zugabe von vier Äquivalenten NaHCO₃ bei der Probenvorbereitung wurde das Auftreten dieser zusätzlichen Triplets unterdrückt (Abbildung 5.27). Scheinbar verhindert die Anwesenheit von Säure, welche nach der Aufreinigung mittels HPLC in jedem Peptid enthalten ist, teilweise das Eintauchen des Peptids in die Membran. Dieses Verhalten wurde mit Proben bestätigt, welche zusätzlich mit Salzsäure versetzt wurden (Abbildung 5.29, Abbildung 5.30). Die bereits bekannten Signale, welche der transmembranen Orientierung des Peptids zugeordnet wurden, nahmen in ihren Intensitäten deutlich ab, die Intensitäten der zuvor kleineren Signale deutlich zu (z.B. TisB A17-CF₃-Bpg). In Spektren, in welchen zuvor nur eine Aufspaltung zu sehen war, konnte durch die Zugabe von Säure das Auftreten eines zweiten Triplets forciert werden (TisB L21-CF₃-Bpg). Da die Intensität eines Signals die Menge an Peptid in der entsprechenden Orientierung wiedergibt, kann man davon ausgehen, dass durch die Zugabe von Säure das Eintauchen der Peptide in die Lipidmembran erheblich erschwert wird, bzw. dass unter stark sauren Bedingungen die Orientierung parallel zur Membranoberfläche bevorzugt ist. Wie bereits in Abschnitt 6.2 erwähnt, sind im Sauren die Seitenketten von Asp5 und Asp22 protoniert. Durch die Protonierung wird die Ausbildung der Salzbrücken des postulierten Charge-Zippers zwischen Asp5 und Lys26 sowie Lys12 und Asp22 verhindert. Die Ladungen der Lysine können folglich nicht kompensiert werden, wodurch das Peptid dreifach positiv geladen ist und das Eintauchen in die Lipidmembran nicht stattfinden kann. Als Resultat wird eine Orientierung parallel zur Membranoberfläche angenommen, in der die geladenen Seitenketten sich nicht im hydrophoben Bereich der Lipidmembran befinden. So gesehen ist dies ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein der postulierten Salzbrücken im Charge-Zipper im transmembranen Zustand von TisB.

Strukturanalysen der oberflächlichen Orientierung in DMPC

Die Strukturanalysen ermitteln einen Neigungswinkel von 84° (S_{mol}-Modell) bzw. 80° (σ_τ/σ_ρ-Modell) und einen azimutalen Rotationswinkel von 73°. Die RMSD-Werte sind wie auch schon bei den Analysen des transmembranen Zustands mit 1.84 kHz (S_{mol}-Modell) bzw. 1.81 kHz (σ_τ/σ_ρ-Modell) relativ hoch, durch die Anzahl von 14 Aufspaltungen aber erklärbar. Zusätzlich wurden partielle Analysen mit den Aufspaltungen von Pos. 6 bis 13 und von Pos. 14 bis 25 durchgeführt, also mit jeweils sieben Aufspaltungen des N- bzw. C-terminalen Teils der

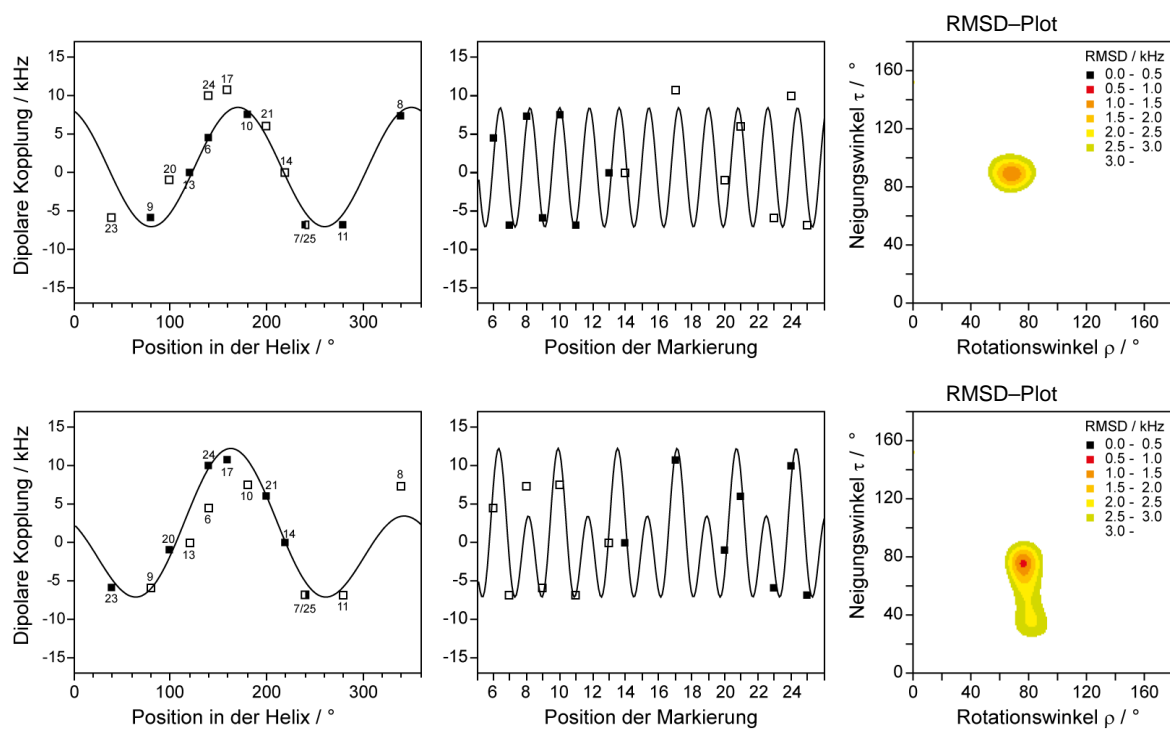
Helix. Die Ergebnisse in Tabelle 6.3 zeigen, dass der N-terminale Teil in der oberflächlichen Orientierung mit 90° (S_{mol} -Modell) bzw. 88° (σ_τ/σ_ρ -Modell) parallel zur Membranoberfläche orientiert ist, wohingegen der C-terminale Teil mit 76° (S_{mol} -Modell) bzw. 62° (σ_τ/σ_ρ -Modell) etwas geneigt ist. Auch der azimutale Rotationswinkel unterscheidet sich bei den Analysen des N- und C-terminale Teils um 8° voneinander. Wird die Aufspaltung von Pos. 14 in der Analyse des N-terminalen Teils verwendet, hat dies keine Auswirkung auf den RMSD der Analyse. Das ist nicht der Fall, wenn zusätzlich noch Pos. 17 in der Analyse berücksichtigt wird. Ebenso steigt der RMSD der Analyse des C-terminalen Teils, wenn Pos. 13 berücksichtigt wird. Demzufolge befindet sich in diesem Zustand von TisB in der Nähe von Pos. 14, also im mittleren Teil der Helix, ein leichter Knick mit einem Winkel von etwa 14° (S_{mol} -Modell) bzw. 28° (σ_τ/σ_ρ -Modell) und ein Twist von 8° .

Beim Ergebnis der σ_τ/σ_ρ -Analyse des C-terminalen Teils (Abbildung 6.5) ist zu beachten, dass der Bereich mit einem RMSD kleiner 1 kHz sehr groß ist und sich die Breite der Verteilung des Neigungswinkels von 40° bis 80° erstreckt. Im Falle der S_{mol} -Analyse ist hingegen der Bereich mit einem RMSD kleiner als 1 kHz besser definiert (Abbildung 6.4). Der azimutale Rotationswinkel ist in den Analysen unabhängig des verwendeten Modells mit 68° für den N-terminalen Teil bzw. 76° für den C-terminalen Teil identisch. Im Vergleich zum transmembranen Zustand von TisB sieht man bei der σ_τ/σ_ρ -Analyse, dass sich die Mobilität in den beiden Zuständen unterscheidet. Im Falle der oberflächlichen Orientierung ist der azimutale Rotationswinkel sehr klar definiert $\sigma_\rho = 0^\circ$ bzw. 1° , wohingegen die Breite der Verteilung des Neigungswinkels mit $\sigma_\tau = 27$ bis 32° groß ist. Bei transmembraner Orientierung überwiegt die Breite der Verteilung des azimutalen Rotationswinkels mit $\sigma_\rho = 44^\circ$ und der Neigungswinkel ist mit $\sigma_\tau = 7^\circ$ besser definiert.

Aufgrund der Tatsache, dass aus den Spektren aller CF_3 -Bpg-Analoga, also auch von Pos. L9 und A23, im Falle der oberflächlich gebundenen Orientierung eindeutige Aufspaltungen hervorgehen, und diese nicht wie bei der Analyse der transmembranen Orientierung vom Modell der idealen Helix abweichen, wird die Annahme unterstützt, dass diese Abweichungen durch sterische Effekte der Markierung bei der Dimerisierung verursacht werden. Auf der Membranoberfläche gebunden liegen die Peptide als Monomer vor und eine Störung von CF_3 -Bpg wird an keiner Position beobachtet.

Tabelle 6.3: Vergleich der Ergebnisse der Strukturanalysen der parallel zur Membranoberfläche gebundenen Orientierung von TisB in DMPC.

Pos. in Analyse	S_{mol} -Modell			σ_τ/σ_ρ -Modell		
	6-25	6-13	14-25	6-25	6-13	14-25
Neigungswinkel τ [°]	84	90	76	80	88	62
Verteilungsbreite σ_τ [°]	–	–	–	27	32	31
Azimutaler Rotationswinkel ρ [°]	73	68	76	73	68	76
Verteilungsbreite σ_ρ [°]	–	–	–	1	0	0
Ordnungsparameter S_{mol}	0.86	0.83	0.83	–	–	–
RMSD [kHz]	1.84	1.01	0.88	1.81	0.92	0.80

**Abbildung 6.4:** Strukturanalyse (S_{mol} -Modell) von Pos. 6 bis 13 (oben) und Pos. 14 bis 25 (unten).

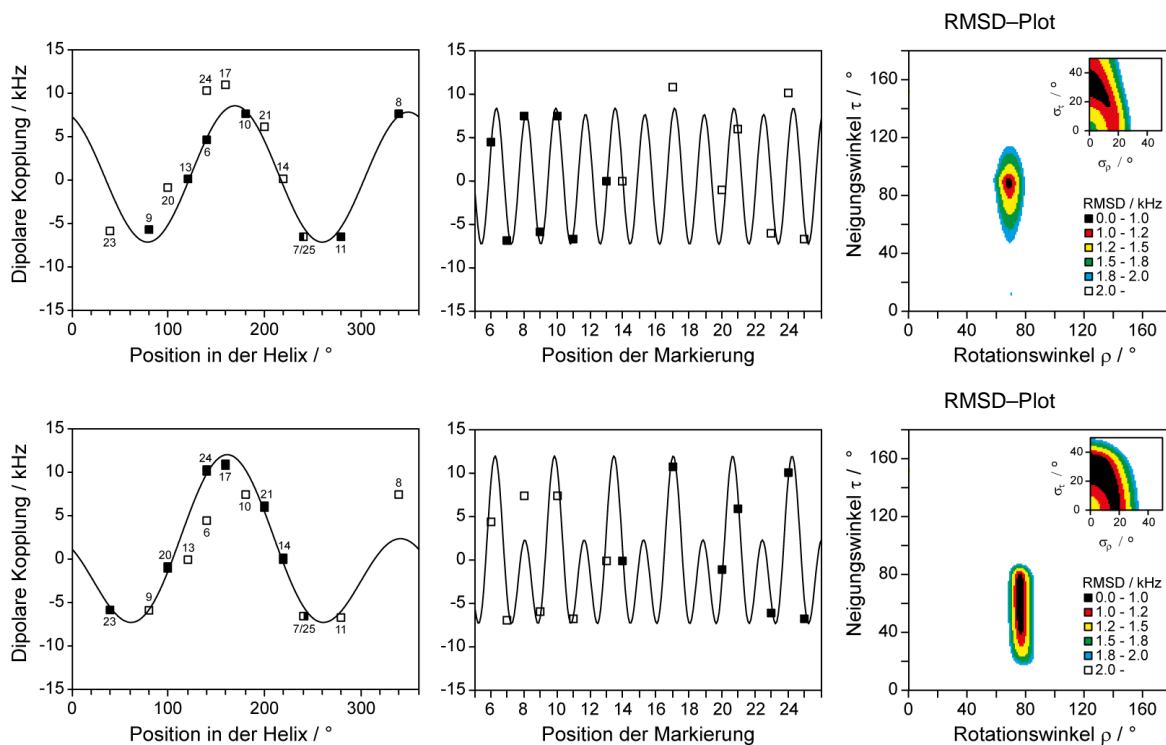


Abbildung 6.5: Strukturanalyse (σ_τ/σ_ρ) von Pos. 6 bis 13 (oben) und Pos. 14 bis 25 (unten).

6.3.2.3 Einfluss der Peptidkonzentration

Der Einfluss der Peptidkonzentration auf die Orientierung von TisB wurde ebenfalls mittels ^{19}F -NMR untersucht. Wie von vielen membranaktiven Peptiden bekannt, ist für das Eintauchen in die Lipidmembran eine gewisse Konzentration an Peptid notwendig [68]. Ist das P:L sehr groß, also die Peptid-Konzentration sehr gering, so sind die Peptide häufig an der Membranoberfläche gebunden. Bei Erhöhung der Peptidkonzentration kommt es zur Assemblierung der Peptide und diese können dann in die Membran eintauchen. Dies ist beim TisB jedoch nicht der Fall. In drei verschiedenen ^{19}F -NMR Konzentrationsserien wurde festgestellt, dass die Konzentration von TisB keinen Einfluss auf dessen Orientierung in der Lipidmembran hat. Hierzu wurden die Pos. 10 in DMPC bei einem P:L von 1:50, 1:100; 1:500 und 1:1000 sowie die Pos. 10 und 14 in POPC bei einem P:L von 1:50, 1:100 und 1:500 untersucht. In allen Spektren von TisB in POPC ist jeweils nur eine Aufspaltung und damit auch nur eine Orientierung zu beobachten, die transmembrane. Auch ein Erhöhen des P:L-Verhältnisses hat darauf keinen Einfluss (Abbildung 5.26). Alle Spektren zeigen unabhängig der resultierenden Peptid-Konzentration die gleiche Aufspaltung von etwa -6.4 kHz (Pos. 10) bzw. -7.2 kHz (Pos. 14). In DMPC zeigt TisB 10-CF₃-Bpg zwei unterschiedliche Aufspaltungen, welche zwei unterschiedlichen Orientierungen des Peptids zugeordnet werden konnte. Die Aufspaltung mit $+7.6$ kHz repräsentiert die oberflächliche Orientierung, die transmembrane wird durch die

Aufspaltung mit -6.8 kHz wiedergegeben. Sollte die Orientierung von der Konzentration des Peptids abhängig sein, so sollte die Intensität der Aufspaltung, welche die oberflächliche Orientierung repräsentiert, mit sinkender Peptidkonzentration zunehmen und gleichzeitig sollte das Signal des transmembranen Zustands (-6.8 kHz) abnehmen oder gar verschwinden. Dieser Verlauf der Intensitäten der Signale wurde jedoch nicht beobachtet. Daher ist davon auszugehen, dass die Peptidkonzentration in dem untersuchten Bereich keinen Einfluss auf die Orientierung von TisB hat.

6.3.2.4 Einfluss der Temperatur

Mit den CF_3 -Bpg-Analoga A7, I8, I10 und I14 wurden in DMPC auch NMR-Messungen unterhalb der Phasenübergangstemperatur durchgeführt. Bei 10 °C sind die Aufspaltungen von Pos. 10 und 14, welche der transmembranen Orientierung zugeordnet wurden, nicht mehr vorhanden. Pos. 8 zeigt ein zusätzliches Signal mit einer Aufspaltung von $+7.5$ kHz. Pos. 7 zeigt ein leicht verändertes Signal. Die ermittelten Aufspaltungen unterhalb des Phasenübergangs von DMPC können eindeutig der zur Membranoberfläche parallelen Orientierung des Peptids zugeordnet werden (vgl. Tabelle 5.7). Folglich bestätigen diese Ergebnisse auch die Beobachtungen der ^{15}N -NMR-Experimente, dass TisB unterhalb des Phasenübergangs von DMPC eine andere Orientierung einnimmt. Aus der transmembranen Orientierung wird bei 10 °C eine oberflächliche Orientierung.

6.3.2.5 Einfluss der Membranladung

Die Anwesenheit von 30% Phosphoglycerol in der Lipidmembran hat keine Auswirkungen auf die Orientierung von TisB, weder in DMPC/DMPG noch in POPC/POPG. Die erhaltenen Spektren und die Aufspaltungen sind nahezu identisch, verglichen mit den Spektren der Proben, welche kein Phosphoglycerol enthalten (vgl. Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und Tabelle 5.7).

6.3.2.6 Vergleich mit MD-Simulation

Im Rahmen einer Kooperation wurden von Dr. Thomas Steinbrecher (ehemals KIT) und Dr. Sabine Reisser (KIT) MD-Simulationen von TisB als antiparalleles Dimer in DOPC durchgeführt und ausgewertet. Anhand der Orientierung des Peptids während der Simulation wurden die dipolaren Kopplungen der einzelnen Positionen bestimmt. Mit diesen wurden gleichermaßen Strukturanalysen durchgeführt. In Tabelle 6.4 und Abbildung 6.6 sind die Ergebnisse mit den dipolaren Kopplungen der Positionen 3 bis 27 zu sehen. Die Kopplungen der Positionen 1, 2, 28 und 29 wurden in den Analysen nicht verwendet. Die Ergebnisse der Analysen beider

Modelle sind sehr ähnlich. Der Neigungswinkel τ beträgt 38° bzw. 37° , der azimutale Rotationswinkel ρ liegt bei 163° bzw. 164° . Die RMSD-Werte sind mit 1.34 kHz und 1.44 kHz sehr ähnlich.

Tabelle 6.4: Ergebnisse der Strukturanalysen der extrahierten dipolaren Kopplungen aus der MD-Simulation.

Pos. in Analyse	S_{mol} -Modell			σ_τ/σ_ρ -Modell		
	3-27	6-25	6-21 NMR-Pos.	3-27	6-25	6-21 NMR-Pos.
Neigungswinkel τ [°]	38	36	37	37	45	45
Verteilungsbreite σ_τ [°]	–	–	–	13	1	0
Azimutaler Rotationswinkel ρ [°]	163	161	159	164	159	159
Verteilungsbreite σ_ρ [°]	–	–	–	22	34	45
Ordnungsparameter S_{mol}	0.81	0.82	0.84	–	–	–
RMSD [kHz]	1.34	1.11	0.69	1.44	1.23	0.71

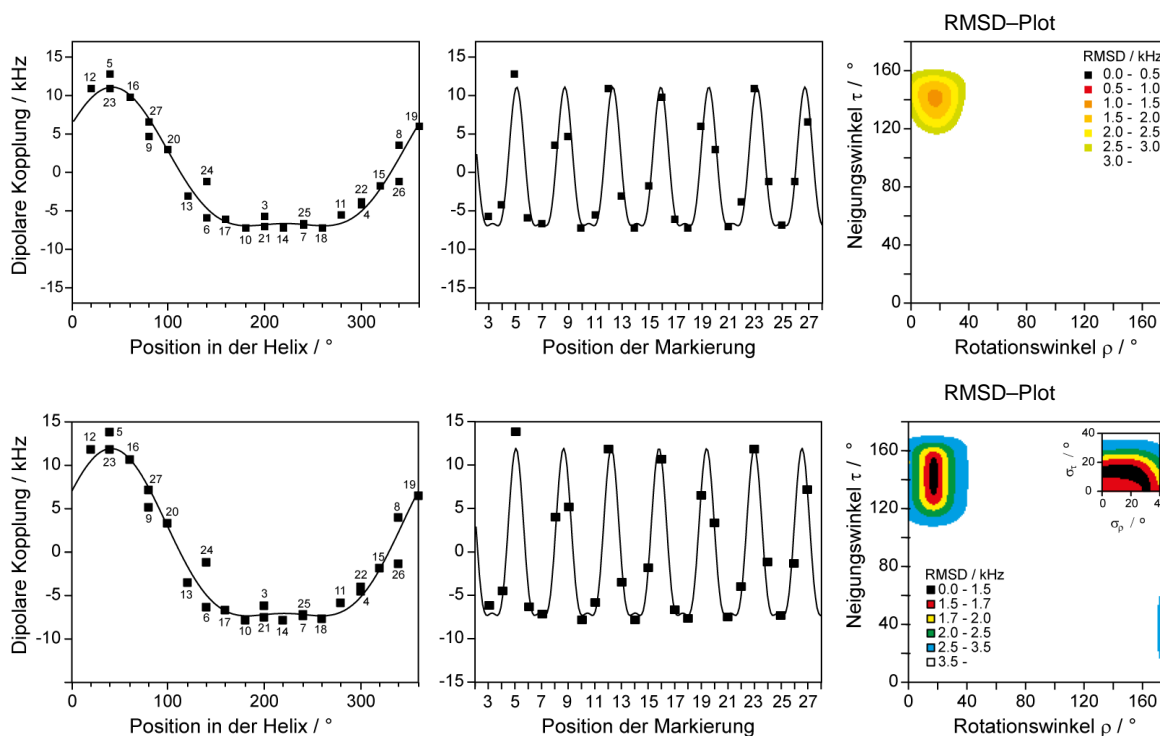


Abbildung 6.6: Strukturanalysen mit den extrahierten dipolaren Kopplungen aus der MD-Simulation.

Um die Ergebnisse der MD-Simulation und der NMR-Spektroskopie direkt miteinander vergleichen zu können, wurden Analysen der MD-Daten durchgeführt, in welchen nur die Positionen verwendet wurden, zu welchen auch NMR-Daten vorliegen. In Abbildung 6.7 sind die ermittelten Aufspaltungen der experimentellen NMR-Daten den MD-Daten gegenübergestellt. Die meisten dipolaren Kopplungen der experimentellen NMR-Daten stimmen mit den extrahierten Kopplungen aus der MD-Simulation gut überein oder liegen im gleichen Bereich.

Die Kopplungen von Pos. 6, 13 und 24 aus den MD-Simulationen weichen etwas von den experimentell bestimmten Kopplungen ab. Die größte Differenz zwischen experimentellen NMR- und MD-Simulation-Daten zeigt die Aufspaltung von Pos. 23. Diese wurde auch in der Strukturanalyse der NMR-Daten nicht berücksichtigt. Ebenso wurden die Aufspaltungen von Pos. 24 und 25 nicht in den Analysen verwendet, da bereits gezeigt werden konnte, dass diese vom Modell der idealen Helix geringfügig abweichen. Für den direkten Vergleich wurde deshalb der Bereich von Pos. 6 bis 21 der Helix verwendet. Das Ergebnis der Analyse (S_{mol} -Modell) ist in Abbildung 6.8 zu sehen. Während der MD-Simulation ist die TisB Helix im Schnitt um 37° geneigt und der azimutale Rotationswinkel beträgt 159° . Der Ordnungsparameter S_{mol} beträgt 0.84 und der RMSD liegt bei 0.69 kHz. Das Modell der idealen Helix ist damit auch ein sehr gut geeignetes Modell für diese Auswertung. Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Strukturanalyse der NMR-Daten weichen der Neigungswinkel um 11° und der azimutale Rotationswinkel um 16° voneinander ab. Der Ordnungsparameter ist mit 0.84 etwas kleiner, der RMSD der Analyse der MD-Daten ist um 0.3 kHz kleiner. Der Strukturanalyse mit σ_τ/σ_ρ -Modell nach, wäre die Helix um 45° geneigt. Dass diese Analyse einen höheren Wert für den Neigungswinkel τ bestimmt, wurde auch schon bei vorherigen Analysen beobachtet. Allerdings ist auch hier im RMSD-Plot zu sehen, dass der schwarze Bereich, der einem RMSD kleiner 0.8 kHz entspricht, einen Neigungswinkel von 30° bis 50° abdeckt. Das Resultat der Analysen im Gesamten betrachtet ist also sehr ähnlich.

	NMR	MD-Simulation	
	Aufspaltung	Aufspaltung	Verteilung
	[kHz]	[kHz]	[kHz]
I6	-2.8	-6.4	± 2.1
A7	-7.3	-7.2	± 1.6
I8	+2.0	+4.0	± 5.1
L9	(+3.1)	+5.3	± 4.7
I10	-5.0	-7.9	± 0.8
L11	-7.4	-5.9	± 2.6
L13	+2.6	-3.5	± 3.7
I14	-7.3	-7.9	± 0.8
A17	-4.6	-6.7	± 1.9
L20	+3.5	+3.4	± 5.2
L21	-6.3	-7.6	± 1.1
A23	(-6.4)	+11.9	± 3.2
V24	+3.4	-1.3	± 4.1
L25	-6.5	-7.4	± 1.5

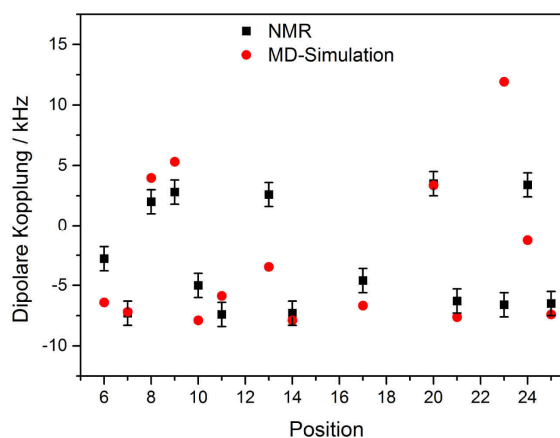


Abbildung 6.7: Vergleich der dipolaren Kopplungen aus den NMR-Daten und der MD-Simulation. Für die Aufspaltungen aus der NMR-Spektroskopie wurde ein Fehler von 1 kHz angenommen. Die Verteilungsbreite der Aufspaltung im zeitlichen Verlauf der MD-Simulation wird bei der NMR ausgemittelt. Die Daten aus der MD-Simulation wurden freundlicherweise von Dr. Sabine Reisser (KIT) zur Verfügung gestellt.

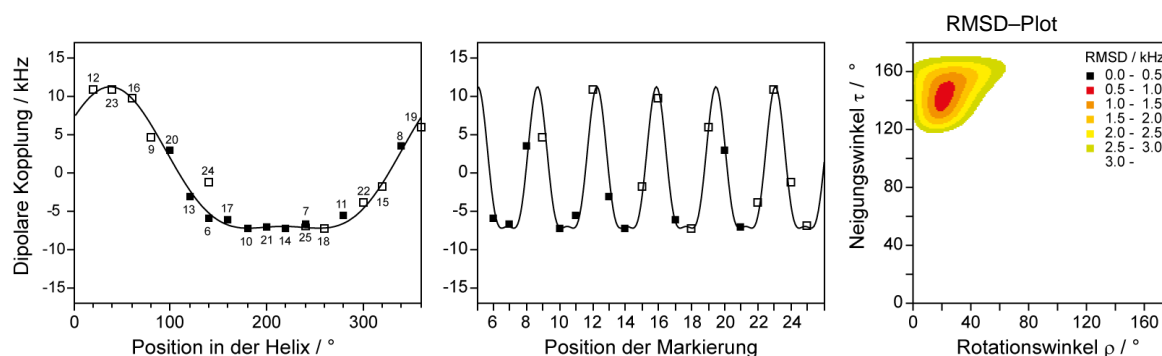


Abbildung 6.8: Ergebnisse der Strukturanalyse der extrahierten dipolaren Kopplungen aus der MD-Simulation von TisB in DOPC. Für den direkten Vergleich von MD-Simulation und NMR-Spektroskopie wurden nur die Positionen (6 – 21) in der Strukturanalyse berücksichtigt, welche auch in der Analyse der NMR-Daten verwendet wurden.

Vergleicht man die Ergebnisse der Analysen der MD-Daten mit den Ergebnissen aus der NMR-Spektroskopie, so sind diese zwar nicht identisch, stimmen aber dennoch gut miteinander überein. In der MD-Simulation ist die TisB-Helix tendenziell etwas stärker geneigt, der azimutale Rotationswinkel um ca. 15° kleiner und die Mobilität des Peptids etwas höher. Es sollte bedacht werden, dass die Simulation „nur“ eine Zeitspanne von 500 ns repräsentiert, wohingegen die ^{19}F -NMR-Daten das Verhalten des Peptids in einen Zeitraum von 4 ms wie-

dergeben. Möglicherweise ist das System in der Simulation noch nicht im Gleichgewicht. Abschließend lässt sich sagen, dass die experimentellen NMR-Daten und die Daten aus der MD-Simulation sehr ähnlich sind. Die Simulation scheint das Verhalten von TisB als antiparalleles Dimer in einer Lipidmembran gut wiederzugeben.

6.3.2.7 Vergleich der Ergebnisse aus ^{15}N - und ^{19}F -NMR von TisB in POPC

Die Ergebnisse der ^{15}N - und ^{19}F -NMR-Spektroskopie stimmen sehr gut miteinander überein. Die Strukturanalysen bestimmen einen Neigungswinkel in der Membran von $19 - 21^\circ$ sowie einen azimutalen Rotationswinkel von $165^\circ - 179^\circ$. Der Ordnungsparameter S_{mol} ist mit 0.92 in beide Fällen identisch. Der RMSD ist bei den Analysen mit den ^{19}F -NMR-Daten deutlich höher als bei der ^{15}N -NMR-Analyse, was auf die Verwendung eines deutlich größeren Datensatzes von 12 Positionen zurückgeführt werden kann, wohingegen die Auswertung der ^{15}N -NMR auf nur vier Positionen beruht. Das Modell der idealen Helix kann zur Strukturanalyse verwendet werden, was die Ergebnisse der CD-Spektroskopie bestätigt. Mittels ^{19}F -NMR konnte allerdings zusätzlich gezeigt werden, dass das Modell der idealen Helix nach Position 21 nicht mehr ideal passt. Zu vermuten ist hier ein Knick oder ein Twist in der Helix. Da die chemischen Verschiebungen von TisB ^{15}N -A7 und ^{15}N -L25 mit 205 und 207 ppm sehr ähnlich sind, handelt es sich dabei vermutlich eher um einen Twist in der Helix, oder ein vorhandener Knick wäre so klein, dass er im ^{15}N -NMR-Spektrum nicht zu erfassen ist. Die ^{15}N - und ^{19}F -NMR-Experimente zeigen außerdem, dass eine unterschiedliche Peptidkonzentration sowie ein 30%iger Anteil an Phosphoglycerol in Lipidmembranen keinen Einfluss auf die Orientierung haben. Zudem wurde beobachtet, dass TisB in DMPC unterhalb der Phasenübergangstemperatur eine zur Membranoberfläche parallele Orientierung bevorzugt und nur oberhalb des Phasenübergangs transmembran orientiert ist.

6.3.3 NMR-Abstandsmessung mittels CPMG⁸

Für die Abstandsmessungen wurden zwei Proben auf unterschiedliche Weise hergestellt. Einmal wurde Lipid und Peptid aus organischem Lösungsmittel rekonstituiert (V1), im anderen Fall wurde eine wässrige Lipid/Peptid-Suspension neutralisiert und mittels Dialyse entsalzt (V2). Die Orientierung des Peptids wurde überprüft durch Aufnahme eines ^{15}N -NMR-Spektrums, jeweils vor den Fluor und vor den CPMG-Experimenten. In beiden Proben waren die Peptide transmembran orientiert. In den Fluorspektren von V1 und V2 sind unterschiedliche Signale zu sehen. Während die neutralisierte und entsalzte Probe nur ein ^{19}F -Signal zeigt, sind in den Spektren der Probe V1 mehrere Signale zu sehen. Durch Verwenden von ^1H - ^{19}F -CP konnte das Auftreten des Signals bei -100 ppm nahezu vollständig unterdrückt und die

Intensität des Signals bei -80 ppm reduziert werden. Demnach ist die beobachtete Komponente bei -60 ppm das Fluorsignal, welches im *CP*-CPMG-Spektrum die Aufspaltung in Form eines Dubletts zeigt. Möglicherweise werden die Signale bei -80 und -100 ppm durch einen anderen Zustand der NMR-Sonde hervorgerufen. Einen Einfluss auf das *CP*-CPMG-Signal haben diese allerdings nicht. Die Ergebnisse der Abstandsmessungen der beiden Proben sind sehr ähnlich. In beiden *CP*-CPMG-Spektren ist ein eindeutiges Dublett mit einer Aufspaltung von 316 Hz (V1) sowie 286 Hz (V2) zu sehen. Diesen Aufspaltungen kann ein maximaler Abstand von 9.5 Å bis 10.4 Å zugeordnet werden, je nach Ordnungsparameter S_{mol} des Peptids (hier als Beispiel für $0.85 - 1.00$). Dieser liegt in POPC den Strukturanalysen nach im Bereich von 0.88 und 0.92 ., im Mittel also 0.90 . Demzufolge beträgt der maximale Abstand zwischen den Fluoratomen der NMR-Sonde 9.7 Å bis 10.0 Å, unter Annahme eines Winkels von 0° zwischen dem F-F-Verbindungsvektors und des Magnetfeldes. Hiermit ist die räumliche Nähe zweier TisB-Monomere direkt belegt, wodurch die Hypothese der Dimerisierung sehr stark unterstützt wird. Da die homonukleare dipolare Kopplung nicht nur vom Abstand der beiden Atome, sondern auch vom Winkel des F-F-Verbindungsvektors relativ zum äußeren Magnetfeld abhängig ist, kann, sofern dieser Winkel nicht bekannt ist, nur der maximale Abstand bestimmt werden. Demnach kann der tatsächliche Abstand der beiden Fluoratome auch deutlich geringer als 10 Å sein. In Abbildung 6.9 ist die Winkel-Abstandsabhängigkeit der beiden gemessenen dipolaren Kopplungen für einen Ordnungsparameter von 0.90 gezeigt.

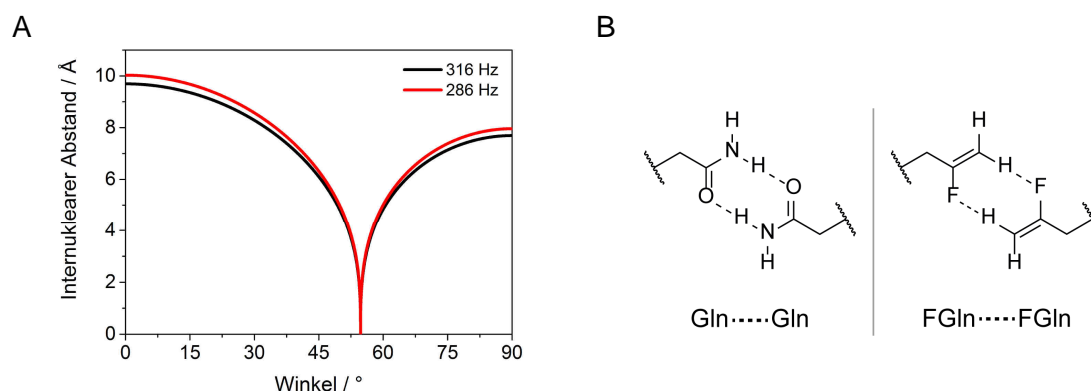


Abbildung 6.9: Winkel-Abstandsabhängigkeit der ermittelten homonuklearen dipolaren Kopplungen von V1 mit 316 Hz und V2 mit 286 Hz, hier dargestellt für einen Ordnungsparameter S_{mol} von 0.90 (A). Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen von Glutamin bzw. der NMR-Sonden Afhs (B).

Nach dem postulierten Modell, in welchem das antiparallele Dimer durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen zwei Glutaminen stabilisiert wird, würde man je nach Stärke der H-Brücken einen intermolekularen O-O-Abstand im Bereich von ca. 3.7 Å – 5.2 Å erwarten. Die eingesetzte NMR-Sonde sollte ebenfalls zur Ausbildung der vermuteten Wasserstoffbrücken fähig sein. Der erwartete F-F-Abstand läge demnach ebenfalls in diesem Bereich. Geht

man davon aus, dass die Wasserstoffbrücken tatsächlich existieren, so wäre der Winkel des F–F–Verbindungsvektors im Bereich von $48.5^\circ - 52.6^\circ$ bzw. $56.7^\circ - 61.5^\circ$ also nahe am Wert des magischen Winkels. In der MD–Simulation von TisB in DOPC wurden die Wasserstoffbrücken zwischen den Glutaminen an Pos. 19 jedoch nicht beobachtet. Während der Simulation betrug der Amid–Amid–Abstand zwischen 8 \AA und 14 \AA . Das liegt im Bereich des Ergebnisses der NMR–Abstandsmessung. Kombiniert man die Ergebnisse der NMR–Spektroskopie und MD–Simulation, lägen der Abstand im Bereich zwischen 8 \AA und 10 \AA und der Winkel zwischen F–F–Bindungsvektor und Magnetfeld zwischen 0° und 35° . Auch hier scheint die MD–Simulation das Verhalten von TisB in der Membran sehr gut wiederzugeben, da die experimentellen Daten aus der NMR–Spektroskopie und die Ergebnisse der MD–Simulation sehr gut zusammen passen.

6.4 Fluoreszenzexperimente

6.4.1 Messungen der Equilibrierung des pH–Gradienten

Da die Anreicherung von TisB in der inneren Membran von *E. coli* ein Sinken des ATP–Spiegels in der Zelle zur Folge hat, wird angenommen, dass dies aufgrund eines durch TisB induzierten Abfalls des pH–Gradienten ausgelöst wird. Mit entsprechend präparierten Lipid–Vesikeln sollten mit fluoreszenzspektroskopischen Experimenten diese Funktion von TisB untersucht werden. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass TisB einen pH–Gradienten an einer Lipidmembran ausgleicht und das konzentrationsabhängig. Die Versuche wurden bei TisB–Konzentrationen von 1 bis $24 \mu\text{M}$ durchgeführt, was einem P:L–Verhältnis von 1:200 bis 1:8 entspricht. Bei geringer TisB Konzentration erfolgt der beobachtete pH–Ausgleich innerhalb weniger Minuten. Beispielsweise ändert sich der pH–Wert im Inneren der Vesikel nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ TisB in etwa 5 min um 0.5 pH–Einheiten. Bei der höchsten TisB–Zugabe ist der pH–Wert nach etwa 1 min vollständig ausgeglichen. Für die Untersuchung der Kinetik der pH–Equilibrierung wurden die Signale in den Protonenfluss umgerechnet und in Abhängigkeit der eingesetzten TisB–Konzentration aufgetragen. Durch Anpassung dieser Werte an die Hill–Gleichung wurde der Hill–Koeffizient bestimmt. Dieser wird in der Enzymkinetik dazu genutzt, um die Kooperativität der Substratbindung an ein Enzym zu messen. Ein Hill–Koeffizient von eins zeigt keine Kooperativität, ist er größer als eins, so spricht man von einem positiven kooperativen Effekt. Die Anpassung der erhaltenen initialen Geschwindigkeiten des Protonenflusses an die Gleichung (4.2) ergeben einen Hill–Koeffizienten von $n_H = 2.11 (\pm 0.19)$, also positive Kooperativität. Das bedeutet, dass die funktionelle Einheit von TisB in der

Membran, die an der pH-Equilibrierung beteiligt ist, nicht aus einem einzelnen TisB-Molekül bestehen kann. Die Anzahl an Untereinheiten kann nicht kleiner als der Hill-Koeffizienten sein. Demnach besteht die aktive TisB-Spezies aus mindestens zwei Molekülen. Der Hill-Koeffizient nahe zwei ist allerdings kein Beweis dafür, dass TisB als Dimer vorliegt. Beispielsweise bindet Sauerstoff im Hämoglobin mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 2.8 - 3.4$ [75]. Hämoglobin ist aber ein Heterotetramer und besteht aus vier Untereinheiten. Es wird also lediglich das Maß der Kooperativität durch den Hill-Koeffizienten beschrieben und nicht der Oligomerisierungszustand ermittelt.

Die Glutamin-Mutationen TisB Q19A und Q19N wurden in analoger Weise bezüglich des pH-Ausgleichs getestet. Sollte die Seitenkette des Glutamins an der Funktion von TisB beteiligt sein, so wird für TisB Q19A eine vom Wildtyp unterschiedliche Aktivität erwartet. Da sich Asparagin und Glutamin sehr ähnlich sind und die gleiche funktionelle Gruppe (Carbonsäureamid) besitzen, wird für diese Mutante eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität erwartet. Genau dieses Verhalten der beiden Mutanten wurde bei der pH-Equilibrierung beobachtet. TisB Q19A zeigt einen deutlich langsameren Abbau des pH-Gradienten. TisB Q19N scheint in ähnlicher Weise wie der TisB-Wildtyp bzw. etwas schneller den unterschiedlichen pH-Wert auszugleichen. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass das Carbonsäureamid der Seitenkette im Glutamin (bzw. Asparagin) maßgeblich an der Funktion von TisB beteiligt ist.

Mit den verschiedenen Ladungsmutanten soll die Charge-Zipper-Hypothese des antiparallelen Dimers und das Vorhandensein der Salzbrücken zwischen den Seitenketten von Asp5/Lys26 und Lys12/Asp22 weiter untermauert werden. Die Ladungsanordnung in den hypothetischen antiparallelen Dimeren der Mutanten sind in Abbildung 6.1 gezeigt. Demnach sollte im Falle von K12D/D22K und D5K/K12D/D22K/K26D die Dimer-Bildung nach dem Charge-Zipper-Modell möglich sein, hingegen nicht bei den Mutationen D5K/K12D und D22K/K26D, da sich hier gleich geladene Seitenketten abstoßen würden. Der beobachtete pH-Verlauf im Inneren der Vesikel nach Zugabe der Mutanten D5K/K12D und D22K/K26D entspricht dabei genau den Erwartungen. Nach Peptid-Zugabe sinkt der pH-Wert im Inneren der Vesikel langsam. Der anfängliche Sprung, der in allen Messungen zu sehen ist, kommt durch die lokal auftretende hohe Konzentration an Peptid im Moment der Zugabe zustande. Da dieses sehr hydrophob ist, wirkt es möglicherweise ähnlich wie ein Detergenz und es kommt so zur Lyse einzelner Vesikel. Nach etwa zwei Sekunden ist das Peptid vollständig mit dem Medium vermischt und der anschließende pH-Abfall beruht auf der molekularen Funktion der Peptide in der Membran. Die Mutante K12D/D22K zeigt eine Aktivität in Form von pH-Ausgleich, diese ist jedoch verglichen mit dem TisB-Wildtyp etwas geringer. Der pH-Ausgleich nach Zugabe

von TisB D5K/K12D/D22K/K26D ist geringfügig schneller im Vergleich zum TisB-Wildtyp. Demnach zeigen beide Mutationen, von denen die Fähigkeit zur pH-Equilibrierung erwartet wurde, den gewünschten Effekt. Die Mutante K12D/D22K „arbeitet“ dabei etwas langsamer als der TisB-Wildtyp. In dieser Mutation befinden sich alle negativ geladenen Seitenketten im Bereich von Pos. 5 – 12, die positiv geladenen im Bereich von Pos. 22 – 29. Der N-terminale Teil der Helix ist daher negativ, der C-terminale Teil positiv geladen. Als Monomer wäre diese Mutation als einzige nicht in der Lage, intramolekulare Salzbrücken zu bilden, um so beispielsweise ein Eintauchen in die Membran zu ermöglichen. Möglicherweise hat diese Ladungsverteilung Auswirkungen auf die Kinetik beim Eintauchen in die Membran und diese Mutante zeigt deshalb eine verminderte Aktivität bezüglich der pH-Equilibrierung.

Vergleich mit Ergebnissen der ^{15}N -NMR-Spektroskopie

In ^{15}N -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass alle vier Ladungs-Mutationen eine transmembrane Orientierung in der Membran einnehmen. Wie erwartet, zeigen aber zwei Mutationen (D5K/K12D und D22K/K26D) eine erheblich reduzierte bzw. nahezu keine Aktivität beim pH-Ausgleich. Folglich ist die transmembrane Orientierung nicht das alleinige Kriterium für die Fähigkeit den pH-Gradienten abzubauen. Maßgebend hierfür ist die Ladungsabfolge, also die Anordnung von Asp und Lys im Peptid. Außerdem ist Gln an Pos. 19 (oder alternativ Asn) für die Aktivität von essentieller Bedeutung.

Vergleich mit Biofilminduktion bei *E. coli*

Die Ladungsmutanten wurden im Rahmen einer Kooperation von Papia Sanyal (KIT) auf Aktivität in Form von Biofilminduktion von Bakterien (*E. coli* K12) getestet. Wie sich herausstellte, konnte durch externe Zugabe von TisB die Bildung von Biofilm induziert werden (Dr. Marina Berditsch, KIT, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Masse an Biofilm wurde mittels Anfärben mit Kristallviolett quantifiziert. Der TisB-Wildtyp dient hierbei als Referenz. Die Mutationen D5K/K12D und D22K/K26D zeigen eine deutlich geringere bzw. keine Aktivität bei der Biofilminduktion. Im Falle der Mutationen K12D/D22K und D5K/K12D/D22K/K26D ist die Induktion von Biofilm zu beobachten. Diese ist bei der Mutante K12D/D22K verglichen mit dem TisB-Wildtyp etwas geringer, während D5K/K12D/D22K/K26D in etwa die gleiche Biofilmzunahme aufweist. Das gleiche Aktivitätsmuster der Mutanten wurde auch bei der pH-Equilibrierung beobachtet. Die Wirkung der Peptide auf Bakterien korreliert demnach direkt mit der Fähigkeit des pH-Ausgleichs in Lipid-Vesikeln. Zusätzlich wird hierdurch die Notwendigkeit einer intermolekularen, komplementären Ladungsabfolge für die Aktivität bestätigt, wie sie im TisB-Wildtyp und den Mutanten K12D/D22K und D5K/K12D/D22K/K26D vorhanden ist.

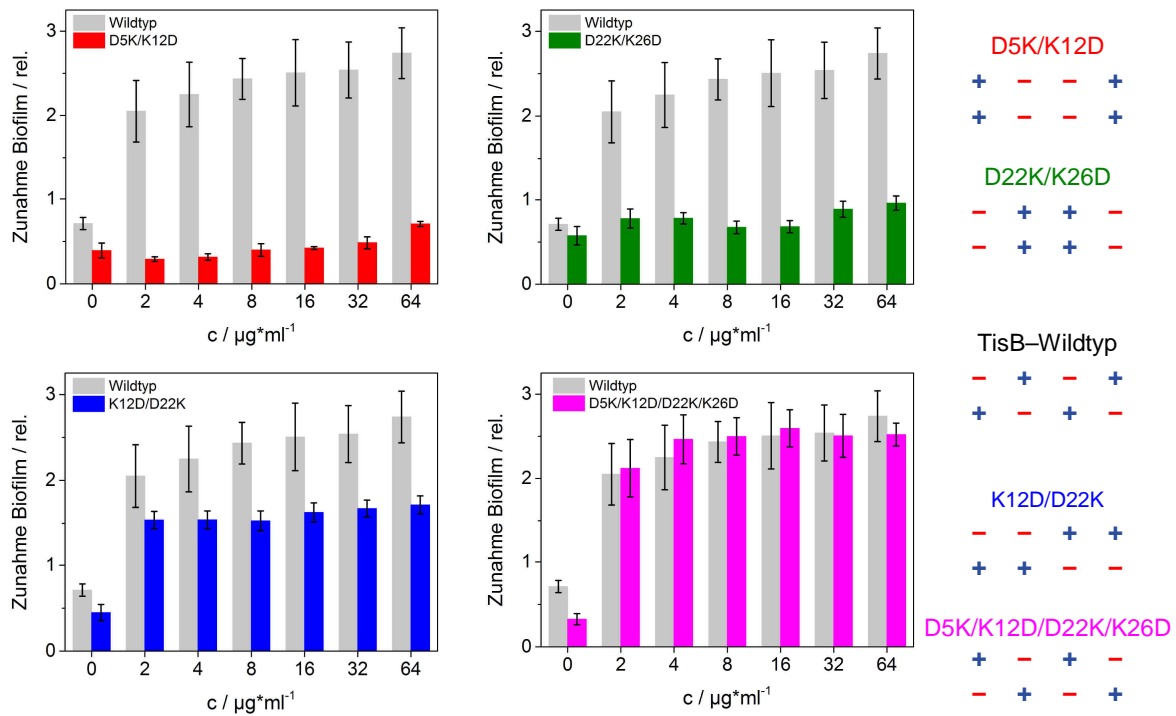


Abbildung 6.10: Aktivitätsbestimmung mittels Biofilminduktion von *E. coli* K12 des TisB-Wildtyps (grau dargestellt) und der Ladungsmutanten. Die Mutanten D5K/K12D sowie D22K/K26D zeigen keine Aktivität bei der Biofilminduktion. Die Mutante K12D/D22K zeigt eine etwas geringere Aktivität als der TisB-Wildtyp, die Aktivität von D5K/K12D/D22K/K26D unterscheidet sich nicht von der des TisB-Wildtyps. Dieses Verhalten der Mutationen wurde in nahezu gleichem Maße auch bei den Fluoreszenzmessungen bei der Equilibrierung des Protonengradienten beobachtet. Die Daten der Biofilminduktion wurden freundlicherweise von Papia Sanyal (KIT) zur Verfügung gestellt.

6.4.2 FRET-Experimente

Mit den FRET-Experimenten sollte der Zustand der Oligomerisierung von TisB in der Membran bestimmt werden. Hierzu wurden drei verschiedene TisB-Mutanten verwendet, die jeweils mit einem Fluorophor versehen wurden. Als Donor wurde einmal Tryptophan am N-Terminus angefügt und im anderen Fall in der Nähe des C-Terminus die Pos. 27 Tyr zu Trp mutiert. Als Akzeptor wurde Dansyl N-terminal am TisB angefügt. Hintergrund der Verwendung zweier verschiedener Donor-TisB-Moleküle war, zu untersuchen, welche Termini sich in räumlicher Nähe befinden. Damit sollte es möglich sein, zu unterscheiden, ob TisB ein antiparalleles oder ein paralleles Dimer in der Membran ausbildet. Sollte TisB als antiparalleles Dimer in der Membran vorliegen, wird für die Kombination aus Dans-TisB + TisB Y27W eine höhere Effizienz des FRETs als bei Dans-TisB + W-TisB erwartet. Dies ist in Abbildung 6.11 schematisch dargestellt.

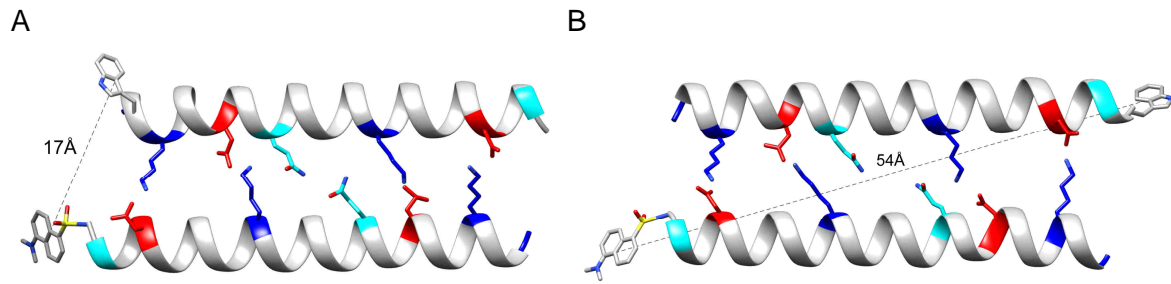


Abbildung 6.11: Hypothetische antiparallele Dimere von Dans-TisB mit TisB-Y27W (A) und Dans-TisB mit W-TisB (B). Im Falle des Paares (A) sollten sich Donor- und Akzeptor-Molekül deutlich näher kommen und die Effizienz des FRET höher sein als bei (B) (Abbildung schematisch).

Bei den Messungen wurden jeweils sowohl Donor- als auch die Akzeptorfluoreszenz bestimmt. Um die Anzahl der Untereinheiten des TisB-Oligomers zu erhalten, wurden die ermittelten anteiligen Fluoreszenzamplituden in Abhängigkeit des Molenbruchs X_A bzw. X_D aufgetragen. Die Auftragung und Auswertung nach den in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Methoden liefert die in Tabelle 5.12 gezeigten Ergebnisse. In beiden Fällen ist ein nahezu linearer Verlauf des Donor-Quenchens bzw. der verstärkten Emission des Akzeptors zu beobachten (Abbildung 5.36). Die Anzahl an Untereinheiten der untersuchten Moleküle beträgt demzufolge rund 2. Dies bestätigen auch die Ergebnisse aus den Anpassungen nach Gleichung (3.14) und (3.15). Die Werte für n (Anzahl an Untereinheiten) liegen im Bereich von 2.09 bis 2.26 mit einem Fehler von 0.06 bis 0.23. Damit ist eindeutig gezeigt, dass TisB in Form eines Dimers in der Membran vorliegt. Betrachtet man die Werte von E , welche die Effizienz der Energietransfers darstellen, so stellt man fest, dass diese bei der Kombination aus Dans-TisB + TisB Y27W deutlich größer sind ($E_{app,dq} = 0.80$ und $E_{app,se} = 0.77$) als bei Dans-TisB + W-TisB ($E_{app,dq} = 0.30$ und $E_{app,se} = 0.18$). Demzufolge sind die Abstände zwischen Donor und Akzeptor unterschiedlich. Im Falle von Dans-TisB + TisB Y27W befinden sich die Moleküle deutlich mehr in räumlicher Nähe. Dies entspricht dem antiparallelen Dimer. Die erhaltenen Werte der Energietransfers für den Fall von Dans-TisB + W-TisB sind unerwartet hoch. Sollten sich Donor und Akzeptor nach dem Modell, wie in Abbildung 6.11 B gezeigt, in einem Abstand von etwa 54 Å befinden, wird eigentlich kein FRET erwartet. Demnach sollte der Energietransfer bei 0 liegen. Das ist jedoch nicht der Fall.

Nach Gleichung (3.11) wurden mit den erhaltenen Werten E der Energietransfers die Abstände zwischen Donor und Akzeptor berechnet. Im Falle, in dem sich Donor und Akzeptor deutlich näher kommen, sind die Werte mit $E = 0.77$ bzw. 0.80 fast gleich. Hieraus ergibt sich unter Verwendung eines Försterradius von $r_0 = 24$ Å (Berechnung siehe Anhang D) ein Abstand zwischen Donor und Akzeptor von 19 ± 1 Å. Nach dem Modell (Abbildung 6.11 A) wird ein

Wert von 17 \AA erwartet. Der tatsächliche gemessene Abstand ist demnach geringfügig um $2 \text{ \AA} - 3 \text{ \AA}$ größer. Bei der Kombination aus Dans-TisB + W-TisB ergibt die Auswertung einen Abstand von $30 \pm 2 \text{ \AA}$. Demnach kommen sich Donor und Akzeptor deutlich näher, als nach dem Modell in Abbildung 6.11 B erwartet wird.

Tabelle 6.5: Berechnete Abstände zwischen Donor und Akzeptor nach Gleichung (3.11) auf Grundlage der erhaltenen Energietransfers. Für den Försterradius des FRET-Paares wird Wert von 24 \AA angenommen.

	Dans-TisB + TisB Y27W	Dans-TisB + W-TisB
Energietransfer	0.78 ± 0.02	0.24 ± 0.06
Abstand r [\AA]	19 ± 1	30 ± 2

Allerdings beruht das Modell auf idealen Helices, was für die terminalen Bereiche (Pos. 1 – 3 und 28 – 30) eher nicht zutrifft. Zudem würden sich die hydrophoben Donor- und Akzeptor-Moleküle, wie in Abbildung 6.11 gezeigt, in der wässrigen Phase befinden. Die berechneten Abstände lassen darauf schließen, dass sich Dansyl und die Tryptophan-Seitenkette im hydrophoben Bereich der Membran befinden und sich dadurch, wie in Abbildung 6.12 B dargestellt, deutlich näher kommen und in einem Bereich liegen, welcher der hydrophoben Dicke von POPC-Membranen mit 28.3 \AA entsprechen. Zudem müssen die Helices den Festkörper-NMR-Ergebnissen zufolge aus Symmetriegründen eine gekreuzte Anordnung annehmen (Abbildung 6.12). Hierdurch ist das FRET-Paar im Falle von Dans-TisB + TisB Y27W um 2 \AA weiter voneinander entfernt, hingegen befinden sich Donor und Akzeptor bei Dans-TisB + W-TisB hierdurch mehr in räumlicher Nähe.

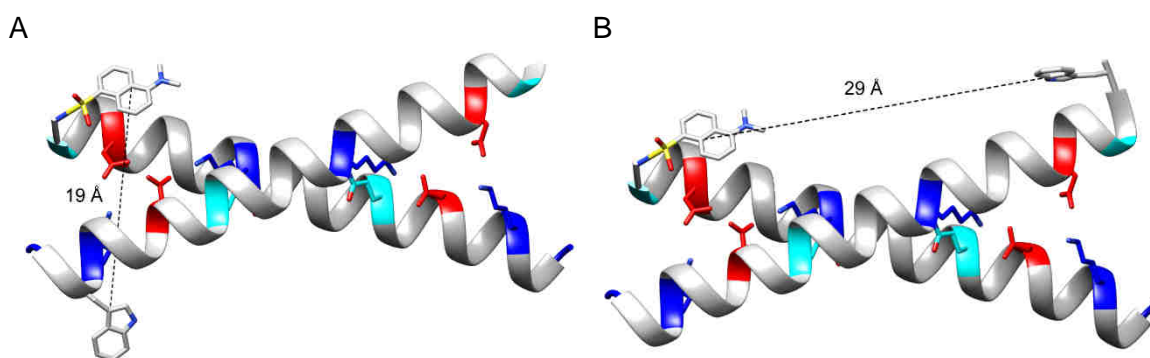


Abbildung 6.12: Mögliche Anordnung der antiparallelen Dimere von Dans-TisB + TisB Y27W (A) und Dans-TisB + W-TisB (B) ausgehen von den berechneten Abständen und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Aus Symmetriegründen müssen die antiparallelen Helices in gekreuzter Anordnung vorliegen und die hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffe Dansyl und die Seitenkette des Tryptophans befinden sich im hydrophoben Bereich der Membran und nicht in der wässrigen Phase.

6.5 *D*-TisB, TisB-*rev.* und TisB-*scr.*

Mit fluoreszenzspektroskopischen Experimenten wurde gezeigt, dass TisB in der Lage ist, einen angelegten Protonengradienten an einer Lipidmembran zu equilibrieren. Um zu zeigen, dass das Sinken des intrazellulären ATP-Spiegels direkt auf eine Wechselwirkung von TisB in der Membran zurückzuführen ist und nicht durch Inhibition entsprechender Rezeptoren erfolgt, wurden die Mutationen *D*-TisB, TisB-*rev.* und TisB-*scr.* synthetisiert und im Rahmen einer Kooperation in biologischen Experimenten⁹ auf Aktivität in Form von Biofilminduktion untersucht. Sollte die Wirkung von TisB auf Zellen auf Wechselwirkungen mit Membranproteinen bzw. einem Rezeptor beruhen, so sollten das Spiegelbild von TisB und die umgekehrte Peptidsequenz nicht in der Lage sein, mit diesem zu interagieren, da sie sich strukturell zu sehr von TisB unterscheiden. Sowohl für *D*-TisB als auch für TisB-*rev.* wird in diesem Fall keine biologische Aktivität erwartet. Beruht die biologische Aktivität jedoch auf der Bildung eines antiparallelen Dimers in der Membran nach dem Charge-Zipper Modell, so wird in etwa die gleiche biologische Aktivität, welche der TisB-Wildtyp zeigt, erwartet, da in beiden Fällen der polare Streifen an Aminosäuren und die Abfolge der geladenen Aminosäuren noch vorhanden ist. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen genau den Erwartungen (Abbildung 6.13). *D*-TisB und TisB-*rev.* zeigen die gleiche Aktivität wie der TisB-Wildtyp. Die Mutante TisB-*scr.*, in welcher der polare Streifen durch gezieltes Vertauschen dreier Aminosäuren zerstört wurde, zeigt keine biologische Aktivität. Dies entspricht ebenfalls dem erwarteten Verhalten. Damit wurde gezeigt, dass die biologische Aktivität von TisB nicht auf indirektem Wege, beispielsweise durch Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen oder Rezeptoren zustande kommt, sondern dass TisB selbst in der Membran für die Equilibrierung des Protonengradienten verantwortlich ist und infolge dessen die Bildung von Biofilm induziert wird. Zusätzlich wird durch diese Ergebnisse nochmal gezeigt, dass der polare Streifen von Aminosäuren entlang der Helix maßgeblich an der Funktion des Peptids beteiligt ist.

⁹ Die biologischen Experimente zur Biofilmbildung wurden von Papia Sanyal (KIT) durchgeführt.

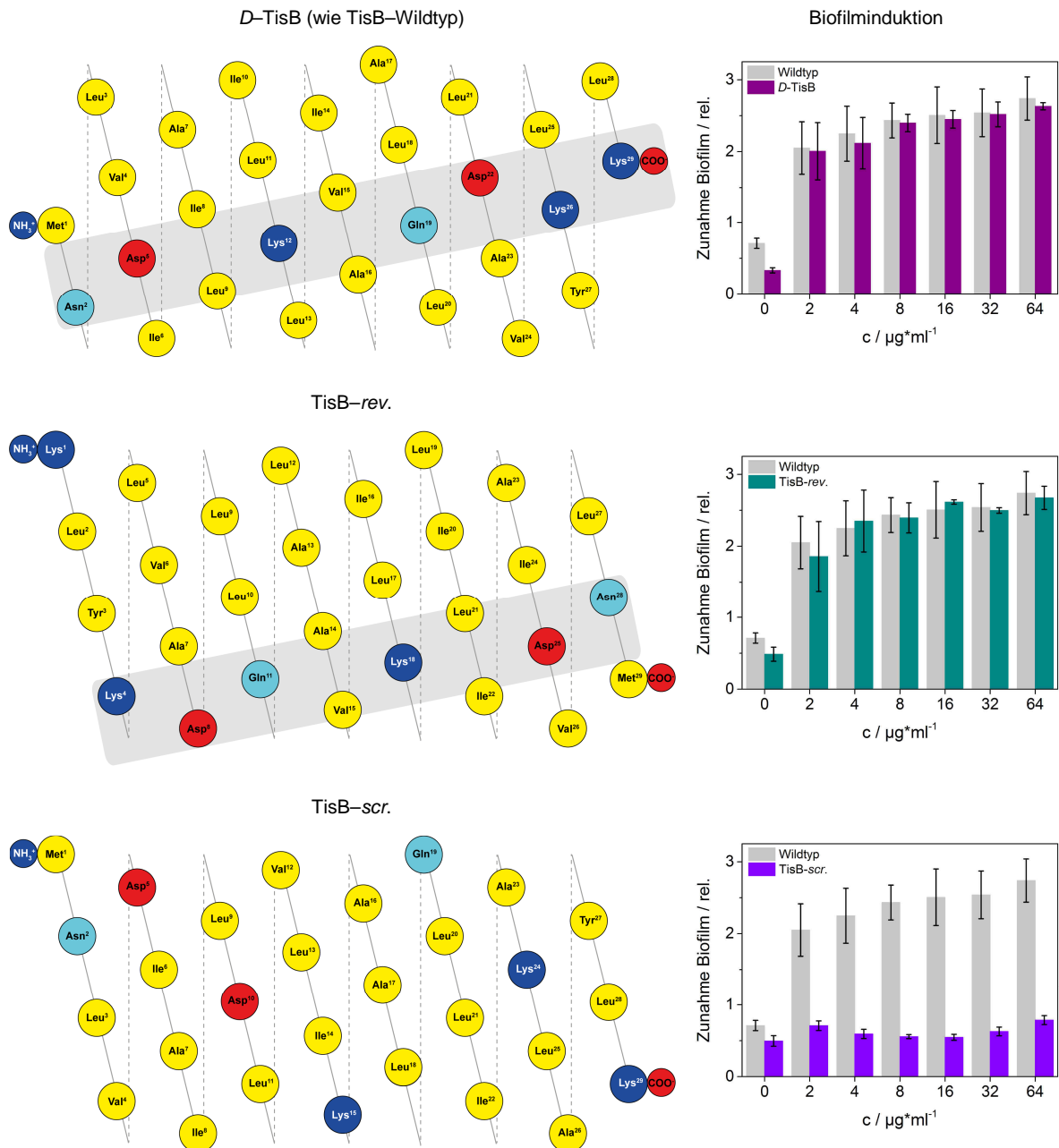


Abbildung 6.13: Anordnung der Aminosäuren in *D*-TisB, TisB-*rev.* sowie TisB-*scr.* und die Aktivität bei der Biofilminduktion. Wie erwartet sind das Spiegelbild *D*-TisB und die rückwärtige Sequenz TisB-*rev.* biologisch aktiv. In beiden Fällen sollte die Bildung eines antiparallelen Dimers möglich sein. Die Mutante TisB-*scr.* in welcher der polare Streifen durch gezieltes Vertauschen dreier Aminosäuren aufgehoben wurde, zeigt keine Aktivität. Die Daten der Biofilminduktion wurden freundlicherweise von Papia Sanyal (KIT) zur Verfügung gestellt.

6.6 Modell zum Wirkungsmechanismus von TisB

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, anhand der durchgeführten Struktur- und Funktionsuntersuchungen ein Modell für TisB zu entwickeln, welches den Wirkungsmechanismus in

der Membran beschreibt. Zu Beginn wurden drei Möglichkeiten vorgestellt, wie TisB in der Membran angereichert zum Ausgleich eines pH-Gradienten führen könnte:

- TisB bildet spezifische Kanäle, die zum Abbau des pH-Gradienten führen
- TisB löst sich im lipophilen Inneren der Membran und arbeitet als Protonophor
- TisB bindet an Rezeptoren und wirkt inhibitorisch

Mit Fluoreszenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass TisB selbst in der Membran zum Zusammenbruch eines angelegten pH-Gradienten an Lipid-Vesikeln führt. Zusätzlich zeigten verschiedene Ladungs-Mutanten ein identisches Wirkungsmuster bezüglich Aktivität beim pH-Ausgleich und Biofilminduktion. Aufgrund der biologischen Untersuchungen von *D*-TisB und TisB-*rev.* ist auszuschließen, dass TisB als Inhibitor wirkt.

In FRET-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass TisB in der Membran als Dimer mit einer deutlichen Bevorzugung der antiparallelen Anordnung vorliegt. Hierdurch werden geladene Aminosäuren kompensiert und ermöglichen ein Eintauchen des Peptids in den hydrophoben Bereich der Membran. Ein Mechanismus wie bei Protonophoren, wie z.B. DNP, CCCP oder FCCP, ist aber sehr unwahrscheinlich, denn sollten die Termini eines antiparallelen Dimers jeweils ein Hydroxyl-Ion binden und in einem Flip-Flop-Mechanismus auf die gegenüberliegende Seite transportieren, so würde dies nicht zum Ausgleich des pH-Wertes führen, da immer zwei Ionen gleicher Ladung gleichzeitig auf die jeweils andere Seite transportiert werden würden. Außerdem hätte Gln19 in diesem Modell keine für die Aktivität entscheidende Rolle und die Abfolge der geladenen Aminosäuren wäre irrelevant. Diesem Modell nach wäre auch von den Mutanten D5K/K12D, D22K/K26D und Q19A eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität beim pH-Ausgleich zu erwarten, was nicht der Fall ist.

Die NMR-Ergebnisse zeigen, dass TisB in einer transmembranen Orientierung mit einem Neigungswinkel von etwa 20° – 30° die Membran durchspannt. Untersuchungen der Glutamin- und Ladungs-Mutationen belegen die Notwendigkeit der komplementären Abfolge der Ladungen (intermolekular) sowie eine bedeutenden Funktion von Gln19 und unterstützen die Hypothese des Charge-Zipper-Modells mit der Bildung von Salzbrücken zwischen Asp5/Lys26 bzw. Lys12/Asp22. Der gemessene intermolekulare Gln19-Gln19 Abstand >10 Å zeigt ebenfalls die erwartete räumliche Nähe zweier TisB-Helices. So angeordnet, befindet sich zwischen den einzelnen Helices im Dimer ein schmaler polarer Streifen. Entlang diesem wäre es denkbar, dass Oxonium-Ionen, Hydroxid-Ionen oder Wassermoleküle die Membran passieren können. Im Falle von Wassermolekülen könnte der pH-Ausgleich beispielsweise nach einem Grotthuß-Mechanismus stattfinden. In Abbildung 6.14 ist die Anordnung von TisB als antiparalleles

Dimer in der Membran, unter Berücksichtigung des aus der NMR-Spektroskopie ermittelten Neigungs- und azimuthalen Rotationswinkels um die Helixachse, dargestellt.

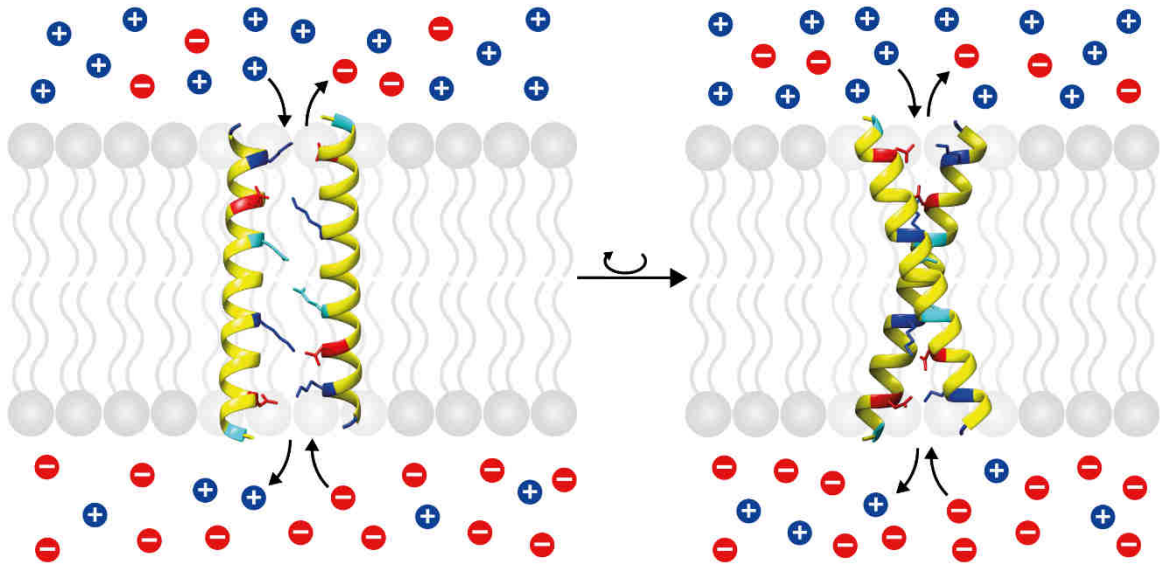


Abbildung 6.14: Schematische Darstellung der Funktion von TisB in der Membran. Antiparallele Dimere die nach dem Charge-Zipper-Modell durch vier Salzbrücken stabilisiert werden, könnten Oxonium-Ionen \oplus oder Hydroxid-Ionen \ominus entlang des schmalen polaren Streifens das Passieren durch eine Membran ermöglichen. Alternativ könnte der pH-Ausgleich entlang eines Wasserfadens durch das Dimer nach einem Grotthuß-Mechanismus stattfinden (nicht dargestellt).

Dieses Modell war auch in MD-Simulationen über den gesamten Zeitraum von 500 ns stabil. Poren, bestehend aus größeren Oligomeren (8-, 12-, 16- und 18-mer), hingegen kollabierten [76]. Neuere MD-Simulationen lassen vermuten, dass es eine Präferenz für Hydroxid-Ionen gibt. Mittels *Umbrella sampling* wurde das PMF (*potential of mean force*) für verschiedene Moleküle und Ionen während des Passierens eines antiparallelen TisB Dimers berechnet. Hierbei zeigte sich, dass die Energiebarriere für OH^- geringer ist als für H_3O^+ (Thomas Steinbrecher, ehemals KIT, unveröffentlichte Ergebnisse). Angesichts der positiven Nettoladung von TisB erscheint diese Präferenz für negativ geladene Ionen durchaus sinnvoll. Dies unterstützt zudem die Resultate von Gurnev et al. [77], welche zeigen, dass TisB an planaren Lipidmembranen sehr kleine, für Anionen selektive Poren bzw. selektive Kanäle bildet.

7. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, die Struktur von TisB in Lipidmembranen aufzuklären und auf Basis von Funktionsuntersuchungen ein Modell zu entwickeln, welches die Wirkung auf Bakterien auf molekularer Ebene beschreibt. Zirkulardichroismus-Experimente zeigen einen sehr hohen helikalen Anteil von über 80% in allen verwendeten Medien. Da keinerlei Denaturierung beobachtet werden konnte, ist die Helix äußerst stabil. In verschiedenen NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde eine transmembrane Orientierung von TisB mit einem Neigungswinkel von etwa $20^\circ - 30^\circ$ und einem azimuthalen Rotationswinkel von $165^\circ - 179^\circ$ festgestellt, wobei die Konzentration des Peptids keinen Einfluss hat. Je nach Lipidsystem wurde eine temperaturabhängige Orientierung beobachtet. Bei niedrigem pH-Wert war eine deutliche Abnahme des transmembranen Zustandes festzustellen, was sich nach der Charge-Zippers-Hypothese durch protonierte Aspartate und dadurch fehlende Ladungskompensation zwanglos erklären lässt. Fluoreszenzspektroskopische Messungen des Wildtyps zeigen, dass TisB in einer Lipidmembran einen angelegten pH-Gradienten ausgleicht. Hierbei wurde ein kooperativer Effekt mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 2$ ermittelt. Demnach liegt TisB in aktiver Form mindestens als Dimer vor. Durch gezieltes Vertauschen der geladenen Aminosäuren Asp und Lys konnte belegt werden, dass für die Effizienz des Abbaus des pH-Gradienten und bei der Biofilminduktion eine bestimmte Ladungsabfolge in der Sequenz notwendig ist. Ebenfalls wurde die Notwendigkeit eines Glutamins an Pos. 19 festgestellt. Die Messung des intermolekularen Gln-Gln-Abstands ($<10 \text{ \AA}$) zeigt die räumliche Nähe zweier TisB-Moleküle in der Membran. Durch Förster-Resonanzenergietransfer-Experimente konnte die Oligomerisierung von TisB zu antiparallelen Dimeren eindeutig belegt werden. Anhand dieser Resultate wurde ein Modell entwickelt, welches den Zustand von TisB in der Membran beschreibt und so die Funktion des Peptids auf molekularer Ebene erklärt: Als antiparalleles Dimer, stabilisiert durch vier Salzbrücken zwischen Asp5/Lys26 und Lys12/Asp22, durchspannt es Lipidmembranen in transmembraner Orientierung und ermöglicht den pH-Ausgleich. Dieser könnte stattfinden, indem Oxonium- oder Hydroxid-Ionen entlang des polaren Streifens innerhalb der Dimere die Membran passieren oder nach einem Grotthuß-Mechanismus entlang eines Wasserfadens im TisB-Dimer erfolgen. Zudem wurde die Relevanz des Charge-Zipper-Motivs für die Effizienz bei der pH-Equilibration und bei der Biofilminduktion belegt. Der Charge-Zipper stellt somit ein Strukturmotiv dar, welches für TisB bei der Assemblierung zu Oligomeren und für seine Funktion von entscheidender Bedeutung ist.

8. Literaturverzeichnis

- [1] A. Giuliani, G. Pirri, S. F. Nicoletto, "Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics", *Cent. Eur. J. Biol.* **2007**, *2*, 1–33.
- [2] H. Jenssen, P. Hamill, Hancock, Robert E W, "Peptide antimicrobial agents", *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491–511.
- [3] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria", *Am J Infect Control* **2006**, *34*, S3-10; discussion S64-73.
- [4] M. Berditsch, S. Afonin, T. Vladimirova, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, "Antimicrobial Peptides can Enhance the Risk of Persistent Infections", *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 222.
- [5] J. W. Bigger, "Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin. by Intermittent Sterilisation", *The Lancet* **1944**, *244*, 497–500.
- [6] I. Keren, N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang, K. Lewis, "Persister cells and tolerance to antimicrobials", *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 13–18.
- [7] C. C. Dawson, C. Intapa, M. A. Jabra-Rizk, "Persisters": survival at the cellular level", *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002121.
- [8] K. Lewis, "Persister cells, dormancy and infectious disease", *Nat. rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 48–56.
- [9] T. Dörr, M. Vulić, K. Lewis, "Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli", *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000317.
- [10] K. Lewis, "Persister cells", *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 357–372.
- [11] C. Unoson, Wagner, E Gerhart H, "A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in Escherichia coli", *Mol. Microbiol.* **2008**, *70*, 258–270.
- [12] F. Hayes, "Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest", *Science* **2003**, *301*, 1496–1499.
- [13] E. M. Fozo, M. R. Hemm, G. Storz, "Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 579–589.
- [14] L. van Melderen, Saavedra De Bast, Manuel, "Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities?", *PLoS Gen.* **2009**, *5*, e1000437.
- [15] T. R. Blower, X. Y. Pei, F. L. Short, P. C. Fineran, D. P. Humphreys, B. F. Luisi, Salmond, George P C, "A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system", *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 185–190.

- [16] S. J. Labrie, J. E. Samson, S. Moineau, "Bacteriophage resistance mechanisms", *Nat. rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 317–327.
- [17] Fernández de Henestrosa, Antonio R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, R. Woodgate, "Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*", *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1560–1572.
- [18] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H., "ExpASY: SIB bioinformatics resource portal", **2012**, zu finden unter <http://enzyme.expasy.org>, abgerufen am 30 Jan 2015.
- [19] Wagner, E Gerhart H, C. Unoson, "The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes", *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1513–1519.
- [20] J. Vogel, L. Argaman, Wagner, E Gerhart H, S. Altuvia, "The small RNA *IstR* inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide", *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 2271–2276.
- [21] F. Darfeuille, C. Unoson, J. Vogel, Wagner, E Gerhart H, "An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes", *Mol. Cell* **2007**, *26*, 381–392.
- [22] S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, H. W. Huang, "Membrane pores induced by magainin", *Biochemistry* **1996**, *35*, 13723–13728.
- [23] R. O. Fox, F. M. Richards, "A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution", *Nature* **1982**, *300*, 325–330.
- [24] M. T. Tosteson, D. C. Tosteson, "The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers", *Biophys. J.* **1981**, *36*, 109–116.
- [25] D. I. Fernandez, Le Brun, Anton P, T. C. Whitwell, M.-A. Sani, M. James, F. Separovic, "The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15739–15751.
- [26] 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*, 12416–12423.
- [27] M. N. Melo, R. Ferre, Castanho, Miguel A R B, "Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations", *Nat. rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 245–250.
- [28] M. R. Yeaman, N. Y. Yount, "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance", *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27–55.

- [29] W. Müller-Esterl, *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 1. Aufl., Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg, **2004**.
- [30] J. M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochemie*, 6. Aufl., Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], **2007**.
- [31] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, N. D. Clarke, *Biochemistry*. online verfügbar bei NCBI Bookshelf, 5. Aufl., Freeman and Company, New York, **op. 2002**.
- [32] "RÖMPP Online", **2015**, zu finden unter <https://roempp.thieme.de>, abgerufen am 14 Feb 2015.
- [33] E. Strandberg, A. S. Ulrich, "NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides", *Concepts Magn. Reson.* **2004**, *23A*, 89–120.
- [34] A. Fallert-Müller, U. Maid, P. Falkenburg, H.-D. Jakubke, "Lexikon der Biochemie", **1999**, zu finden unter <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/>, abgerufen am 11 Feb 2015.
- [35] P. Mitchel, "Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism", *Nature* **1961**, *191*, 144–148.
- [36] P. G. Heytler, W. W. Prichard, "A new class of uncoupling agents — Carbonyl cyanide phenylhydrazones", *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1962**, *7*, 272–275.
- [37] Karlish, S. J. D., N. Shavit, M. Avron, "On the Mechanism of Uncoupling in Chloroplasts by Ion-Permeability Inducing Agents", *Eur. J. Biochem.* **1969**, *9*, 291–298.
- [38] T. H. Walther, C. Gottselig, S. L. Grage, M. Wolf, A. V. Vargiu, M. J. Klein, S. Vollmer, S. Prock, M. Hartmann, S. Afonin et al., "Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism", *Cell* **2013**, *152*, 316–326.
- [39] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der biophysikalischen Chemie*, 2. Aufl., Vieweg & Teubner, Wiesbaden, **2011**.
- [40] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, "How to study proteins by circular dichroism", *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- [41] S. M. Kelly, N. C. Price, "The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function", *Current protein & peptide science* **2000**, *1*, 349–384.
- [42] A. S. Ulrich, "Solid state ^{19}F NMR methods for studying biomembranes", *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2005**, *46*, 1–21.
- [43] 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 alpha-amino acid designed for peptide structure analysis by solid-state ^{19}F NMR spectroscopy", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5659–5661.

- [44] P. K. Mykhailiuk, N. M. Voievoda, S. Afonin, A. S. Ulrich, I. V. Komarov, "An optimized protocol for the multigram synthesis of 3-(trifluoromethyl)bicyclo[1.1.1]pent-1-ylglycine (CF₃-Bpg)", *Journal of Fluorine Chemistry* **2010**, *131*, 217–220.
- [45] S. Afonin, P. K. Mikhailiuk, I. V. Komarov, A. S. Ulrich, "Evaluating the amino acid CF₃-bicyclopentylglycine as a new label for solid-state ¹⁹F-NMR structure analysis of membrane-bound peptides", *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 614–623.
- [46] S. L. Grage, A. S. Ulrich, "Structural parameters from ¹⁹F homonuclear dipolar couplings, obtained by multipulse solid-state NMR on static and oriented systems", *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 98–106.
- [47] K. Kano, J. H. Fendler, "Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles", *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *509*, 289–299.
- [48] A. Agostiano, F. Mavelli, F. Milano, L. Giotta, M. Trotta, L. Nagy, P. Maroti, "pH-sensitive fluorescent dye as probe for proton uptake in photosynthetic reaction centers", *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **2004**, *63*, 125–128.
- [49] Y. Avnir, Y. Barenholz, "pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction", *Analytical Biochemistry* **2005**, *347*, 34–41.
- [50] T. Förster, "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz", *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.
- [51] L. Stryer, "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler", *Annual review of biochemistry* **1978**, *47*, 819–846.
- [52] AAT Bioquest, "Product Technical Information Sheet. Tide Fluor™ and Tide Quencher™ Dyes, Optimized for Maximizing The Power of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)" **2012**.
- [53] B. D. Adair, D. M. Engelman, "Glycophorin A Helical Transmembrane Domains Dimerize in Phospholipid Bilayers: A Resonance Energy Transfer Study", *Biochemistry* **1994**, *33*, 5539–5544.
- [54] B. H. Meyer, J.-M. Segura, K. L. Martinez, R. Hovius, N. George, K. Johnsson, H. Vogel, "FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2138–2143.
- [55] K. Kawano, Y. Yano, K. Omae, S. Matsuzaki, K. Matsuzaki, "Stoichiometric analysis of oligomerization of membrane proteins on living cells using coiled-coil labeling and spectral imaging", *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3454–3461.

- [56] Hackenberger, Christian P R, "The reduction of oxidized methionine residues in peptide thioesters with NH₄I-Me₂S", *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2291–2295.
- [57] Avanti Polar Lipids, Inc., "Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids", zu finden unter <http://avantilipids.com>, abgerufen am 14 Aug 2014.
- [58] D. Marsh, "Energetics of hydrophobic matching in lipid-protein interactions", *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3996–4013.
- [59] L. Whitmore, B. A. Wallace, "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data", *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W668-73.
- [60] L. Whitmore, B. A. Wallace, "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases", *Biopolymers* **2008**, *89*, 392–400.
- [61] M. Rance, R. Byrd, "Obtaining high-fidelity powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy", *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, *52*, 221–240.
- [62] T. Maurer, H. R. Kalbitzer, "Indirect Referencing of ³¹P and ¹⁹F NMR Spectra", *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **1996**, *113*, 177–178.
- [63] Y. Ishihara, A. Calderon, H. Watanabe, K. Okamoto, Y. Suzuki, K. Kuroda, "A precise and fast temperature mapping using water proton chemical shift", *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **1995**, *34*, 814–823.
- [64] M. H. Levitt, D. Suter, R. R. Ernst, "Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization", *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4243.
- [65] G. Metz, X. L. Wu, S. O. Smith, "Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR", *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1994**, *110*, 219–227.
- [66] S. H. Park, A. A. Mrse, A. A. Nevzorov, M. F. Mesleh, M. Oblatt-Montal, M. Montal, S. J. Opella, "Three-dimensional Structure of the Channel-forming Trans-membrane Domain of Virus Protein "u" (Vpu) from HIV-1", *Journal of Molecular Biology* **2003**, *333*, 409–424.
- [67] S. Zhang, X. Wu, M. Mehring, "Elimination of ringing effects in multiple-pulse sequences", *Chemical Physics Letters* **1990**, *173*, 481–484.
- [68] E. Strandberg, P. Wadhvani, P. Tremouilhac, Dürr, Ulrich H N, A. S. Ulrich, "Solid-state NMR analysis of the PGLa peptide orientation in DMPC bilayers: structural fidelity of ²H-labels versus high sensitivity of ¹⁹F-NMR", *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1676–1686.

- [69] E. Strandberg, P. Wadhvani, P. Tremouilhac, Dürr, Ulrich H N, A. S. Ulrich, "Solid-state NMR analysis of the PGLa peptide orientation in DMPC bilayers: structural fidelity of 2H-labels versus high sensitivity of 19F-NMR", *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1676–1686.
- [70] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of enzyme kinetics*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [71] K. Gast, D. Zirwer, M. Müller-Frohne, G. Damaschun, "Trifluoroethanol-induced conformational transitions of proteins: insights gained from the differences between alpha-lactalbumin and ribonuclease A", *Protein science : a publication of the Protein Society* **1999**, *8*, 625–634.
- [72] P. Luo, R. L. Baldwin, "Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water", *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413–8421.
- [73] D. Mao, B. A. Wallace, "Differential light scattering and absorption flattening optical effects are minimal in the circular dichroism spectra of small unilamellar vesicles", *Biochemistry* **1984**, *23*, 2667–2673.
- [74] C. L. Teeters, J. Eccles, B. A. Wallace, "A theoretical analysis of the effects of sonication on differential absorption flattening in suspensions of membrane sheets", *Biophysical Journal* **1987**, *51*, 527–532.
- [75] J. M. Holt, G. K. Ackers in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **2009**.
- [76] 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*, 1460–1469.
- [77] P. A. Gurnev, R. Ortenberg, T. Dörr, K. Lewis, S. M. Bezrukov, "Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers", *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2529–2534.
- [78] S. W. Provencher, J. Glöckner, "Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism", *Biochemistry* **1981**, *20*, 33–37.
- [79] N. Sreerama, R. W. Woody, "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set", *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 252–260.
- [80] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein", *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411–2423.
- [81] I. L. Medintz, N. Hildebrandt, *FRET - Förster resonance energy transfer. From theory to applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, **2014**.

- [82] H. Binder, "The Molecular Architecture of Lipid Membranes - New Insights from Hydration-Tuning Infrared Linear Dichroism Spectroscopy", *Appl. Spectrosc. Rev.* **2003**, *38*, 15–69.

Anhang

A Materialien

Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
CD-Spektropolarimeter	J-815 Software: Spectra Manager	Jasco GmbH
Fluoreszenzspektrometer	Fluoromax 2 Software: Datamax Std. v2.20 Fluorolog FL 1065 Software: FluorEssence	HORIBA Jobin Yvon
HPLC-Anlage	Hochdruckmischer: 2080-DHD Pumpen: PU-2087 Plus Säulenthermostat: Jetstream Plus Steuerbox: LC-Net II/ACC UV-Detektor: MD-2010 Plus Software: Chrompass	Jasco GmbH
Kühlschrank	Economy KGT 3946 Medline Lgex 3410 Premium Exi 310L	Liebherr
LC-System	Agilent 1100 Series Software: Hystar	Agilent
Lyophilisator	Alpha 1-4 LSC Alpha 2-4 LD	Christ
Massenspektrometer	ESI.microTOF	Bruker Daltonics
NMR-Spektrometer	Avance II WB, 500 MHz Avance III HD, 500 MHz Avance II WB, 600 MHz Software: Topspin V2.1/V3.2	Bruker
Ofen	Heraeus	Kendro
Peptidsynthesizer	Liberty Software: Pepdriver V2.5.4	CEM Corporation
pH-Elektrode	Benchtop Meter PCE-BPH1	PCE Instruments
Pumpen	RC6 AF 4-8	Trivac Vacuubrand Oerlikon Leyboldvacuum

Rotationsverdampfer	Laborata 4003-control	Heidolph
Rührer	MR3001K	Heidolph
	RH basik 2	Ika
Säule	RP Protein C4, CAT 214TP1010	Vydac
	RP Protein C18, CA T218TP52	
Schüttler	KM2	Edmund Bühker GmbH
Spektrofluorimeter		
Thermometer	EKT 3001	Heidolph
Tiefkühltruhe	HFC 286 Basic	Heraeus
ESI-TOF-Massenspektrometer	Bruker Daltronics TOF	Bruker
Trockenschrank	Kelvitron	Heraeus
Vortex	Vortex Genius 3	Ika
	Reax Top	Heidolph
	Genie 2 T	Scientific Industries, Inc.
	TopMix FB 15024	Fisher
Waagen	BP 211D	Sartorius
	BP 301S	
	Ultramikrowaage	ME5S
Wasseraufbereitung	Milli-Q	Millipore
Ultraschallbad	Sonorex Super RU 510	Bandelin
Ultrasonic	Cleaner USC 20	VWR
Ultraschallprozessor	UTR200	Hielscher
UV/Vis-Spektrometer	UV-2100	Shimadzu
Zentrifuge	3-18 K	Sigma
	2-6 K	
	Minispin	Eppendorf

Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
1,2 Ethandithiol (f. S.)	Merck KGaA, Darmstadt, D
1,4 Dioxan	Merck KGaA, Darmstadt, D
2-Amino-5-fluorhex-5-ensäure	Prof. Dr. G. Haufe, Universität Münster, D
Aceton (f. A.)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acetonitril (HPLC)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Ammoniumiodid	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
Chloroform (Spektroskopie)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dansylchlorid 99%	ABCR GmbH&Co KG, Karlsruhe, D
Dichlormethan (f. Ps., stabilisiert mit Amylen)	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
Diethylether (f. A.)	Merck KGaA, Darmstadt, D

Dimethylformamid (f. Ps.)	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
Dimethylsulfid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol (1% Ethylmethyketon)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethylacetat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Fmoc- <i>D</i> -Ala-OH*H ₂ O	
Fmoc- <i>D</i> -Asn(trt)-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Asp(OtBu)-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Gln(trt)-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Gly-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Ile-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Leu-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Lys(Boc)-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Met-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Tyr(tBu)-OH	
Fmoc- <i>D</i> -Val-OH	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, D
Fmoc- <i>L</i> -Asn(trt)-OH	und/oder
Fmoc- <i>L</i> -Asp(OtBu)-OH	Novabiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, D
Fmoc- <i>L</i> -Gln(trt)-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Gly-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Ile-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Leu-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Lys(Boc)-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Met-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Tyr(tBu)-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Val-OH	
Fmoc- <i>L</i> -Trp(Boc)-OH	
Fmoc- <i>L</i> -CF ₃ -Bpg	Universität Kiev
Fmoc-Cl	Novabiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, D
Fmoc- ¹³ C/ ¹⁵ N- <i>L</i> -Asp(OtBu)-OH	Cortecnet, Voisins Bretonneux, F
Fmoc- ¹⁵ N- <i>L</i> -Lys(Boc)-OH	Cortecnet, Voisins Bretonneux, F
Fmoc-OSu	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, D
Guanidinhydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
HBTU (f. Ps)	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
HEPES	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
HOBt (f. Ps)	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
HPTS (8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
MES	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
Methanol (HPLC)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Methanol (Spektroskopie)	Merck KGaA, Darmstadt, D
¹⁵ N- <i>L</i> -Alanin-OH	Cortecnet, Voisins Bretonneux, F

¹⁵ N- <i>L</i> -Leucin-OH	Cortecnet, Voisins Bretonneux, F
Natriumcarbonat (f. S.)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (f. S.)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (f. S.)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (1 N Maßlösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumsulfat (f. S.)	Merck KGaA, Darmstadt, D
n-Hexan	Merck KGaA, Darmstadt, D
N-Methyl-2-pyrrolidon (f. Ps)	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
N,N-Diisopropylcarbodiimid (99.8%)	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, D
N,N-Diisopropylethylamin (99.72%)	IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, D
Octylglucosid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Phenol (99+%)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
Piperidin	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
PyBOP	Novabiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure (37%)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Salzsäure (1 N Maßlösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sephacryl 100HR	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
Thioanisol (99%)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, D
Titrisol (Phosphatpuffer pH 7)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trifluoressigsäure (f. Ps.)	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
Triisopropylsilan (99%)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Wang-Resin Fmoc- <i>L</i> -Lys(Boc)-OH	Novabiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, D
Wang-Resin Fmoc- <i>D</i> -Lys(Boc)-OH	Novabiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, D

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Eigenschaft	Hersteller/Bezugsquelle
Dialyseschlauch	Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 1 ml, MWCO 500-1000	Carl Roth GmbH & Co. KG
Eppendorf-Reaktionsgefäße	0.5 ml, 2 ml 0.5 ml, 2 ml (<i>low binding</i>)	Eppendorf, VWR
Frischhaltefolie		Penny/Aldi
Glasplättchen	15 x 7.5 x 0.08 mm 9 x 7.5 x 0.08 mm	Marienfeld GmbH & Co KG
Gastight®-Spritzen	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µl	Hamilton, VWR
Küvetten	101-QS (10 mm) 104.002-QS (10 mm)	Hellma®, VWR

Küvetten	104-QS (10 mm)	Hellma®, VWR
	110-QS (1 mm)	
	105.201-QS (10 mm)	
Mini-Extruder		Avanti® Polar Lipids Inc.
Parafilm®		VWR
Pasteurpipetten	3, 7 ml (Plastik)	BD Discardit™ II, VWR
	1 ml (Glas)	
Petrischalen	90 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen	10, 200, 1000 µl	VWR
Polycarbonatmembran	100 nm	Whatman
Rundfilter für Extruder	10 mm, Dicke 100 µm	Avanti® Polar Lipids Inc.
Rundfilter	90, 150 mm	Whatman, VWR
Spritzen	10 ml (f. Ps)	MultisynTech
	5, 10 ml	BD Discardit™ II /VWR
Tücher	Labortücher 20.5 x 20 cm	Kimberly Clark
	Präzisionstücher 7552, 11 x 21 cm	Kimtech Science
Zentrifugengefäße (Falcon)	50 ml	Corning (CEM)
	15, 50 ml	Sarstedt
Zentrifugensäulen	2 ml	Pierce, Fisher Scientific

Lipide

Lipid	Hersteller
DEiPC	NOF Corporation, White Plains, NY, US
DErPC	
DMPC	
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-3-phosphocholin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <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-(1'-rac-glycerol) (Natriumsalz)
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
Rhod-PE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-(lissamin rhodamin B sulfonyl) (Ammoniumsalz)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (Natriumsalz)

B CD-Spektroskopie

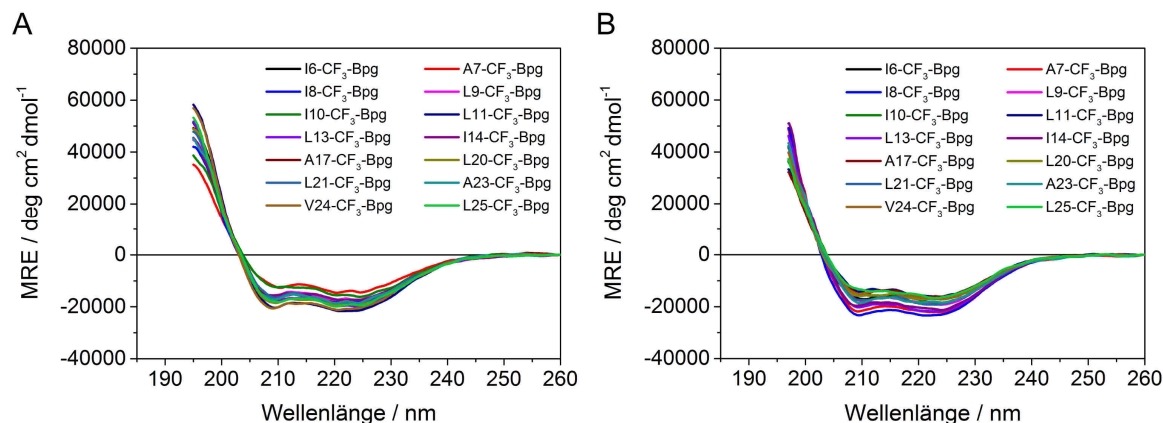


Abbildung B.1: CD-Spektren der TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC-(A) und DOPC-(B) Vesikeln.

Tabelle B.1: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse mit dem Algorithmus CONTIN-LL. Als Referenzdatensatz wurde Set 7 verwendet [59,60,78,79]. Die Anteile sind in Prozent, der angegebene NRMSD ist dimensionslos.

	Temp.	Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	Ungeordnet	NRMSD
Wasser	20 °C	83.2	1.9	2.5	12.4	0.038
	90 °C	75.3	2.3	8.0	14.4	0.035
Phosphatpuffer 10 mM	20 °C	89.6	0.4	6.3	3.6	0.026
	20 °C	87.5	1.1	2.5	8.8	0.027
SDS 5 mM	90 °C	84.8	2.3	4.2	8.6	0.033
	20 °C	88.6	1.0	2.2	8.3	0.043
HPLC-Eluent	20 °C	91.7	0.7	1.4	6.1	0.053
DMPC (P:L = 1:100)	30 °C	83.3	1.4	3.2	12.1	0.030
POPC (P:L = 1:100)	20 °C	86.8	1.5	3.2	8.6	0.032

Tabelle B.2: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von TisB-*rev.* und TisB-*scr.* mit dem Algorithmus CONTIN-LL. Als Referenzdatensatz wurde Set 7 verwendet [59,60,78,79]. Die Anteile sind in Prozent, der angegebene NRMSD ist dimensionslos.

		Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	Ungeordnet	NRMSD
TisB- <i>rev.</i>	vorher	85.4	1.3	3.2	10.1	0.041
	nachher	82.9	1.5	4.4	11.2	0.040
TisB- <i>scr.</i>	vorher	61.3	4.6	11.7	22.6	0.034
	nachher	38.0	16.4	15.2	30.4	0.071

C NMR-Spektroskopie

TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC

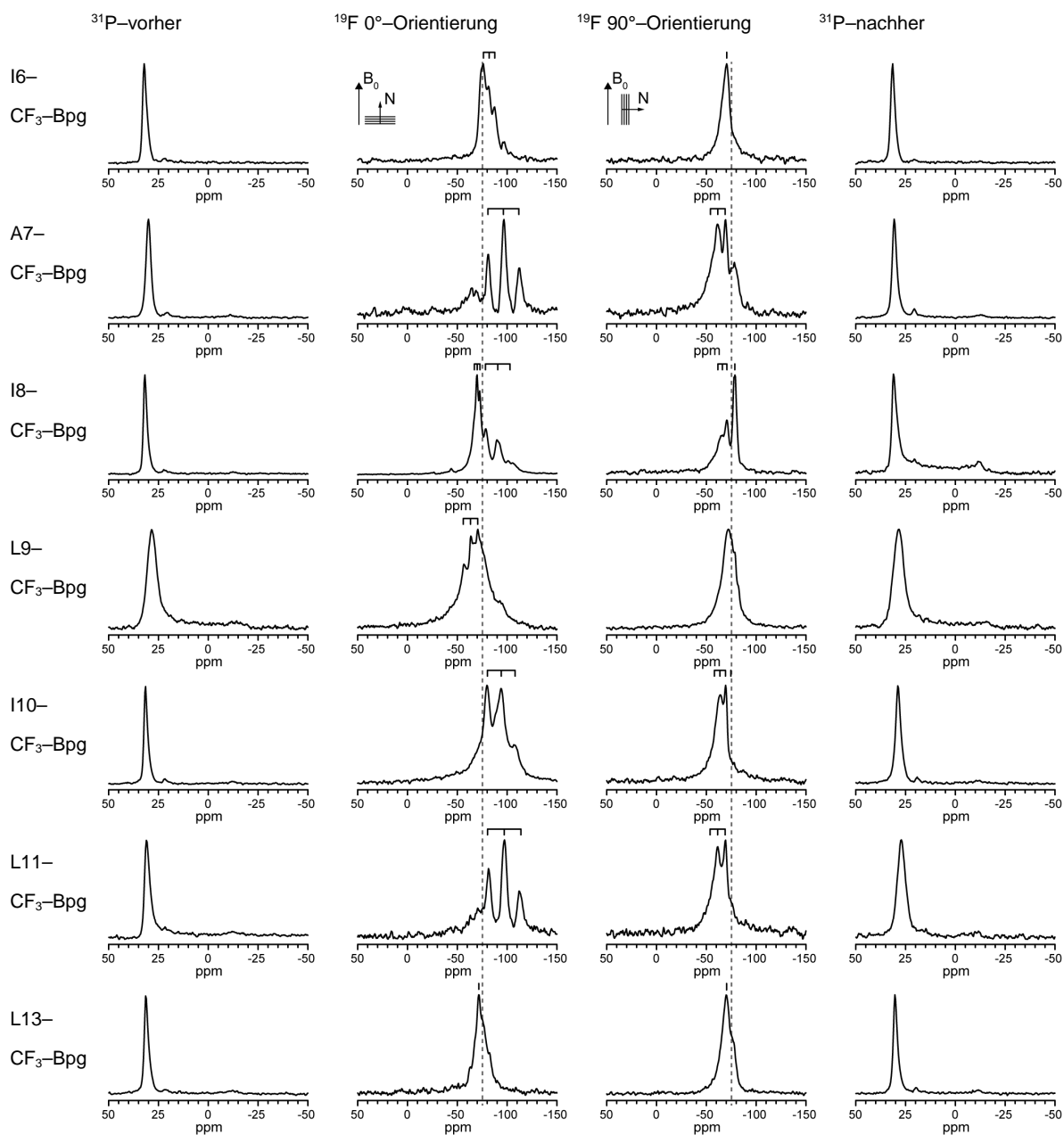


Abbildung C.2: NMR-Spektren der TisB-Analoga I6- bis L13-CF₃-Bpg in POPC bei einem P:L von 1:100.¹⁰

¹⁰ Die hier dargestellten NMR-Spektren der Positionen 6, 7, 10, 11, 13 und 14 wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit aufgenommen und werden hier der Vollständigkeit wegen gezeigt.

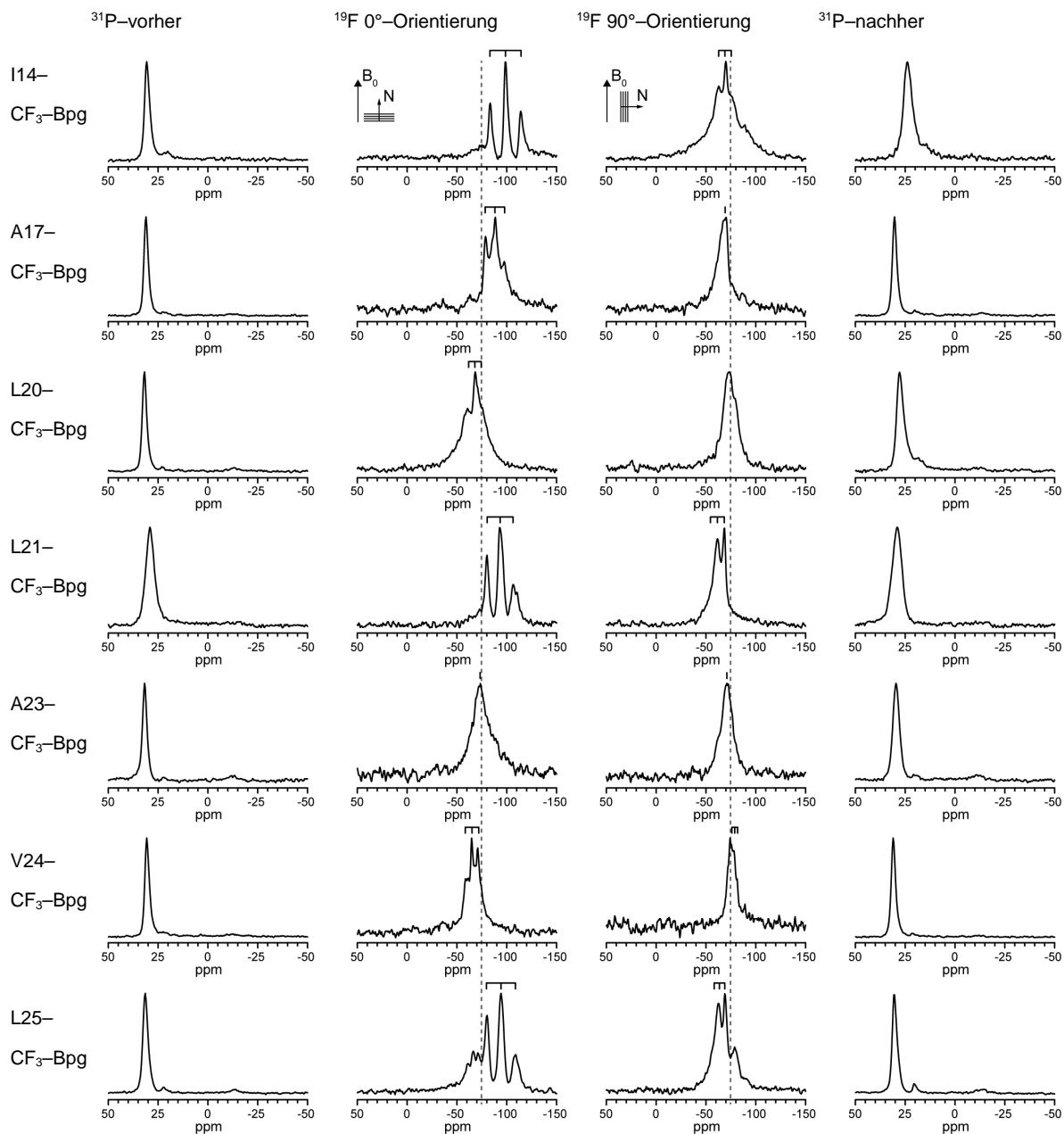


Abbildung C.3: NMR-Spektren der TisB-Analoga I14- bis L25- CF_3 -Bpg in POPC bei einem P:L von 1:100.

Strukturanalysen POPC

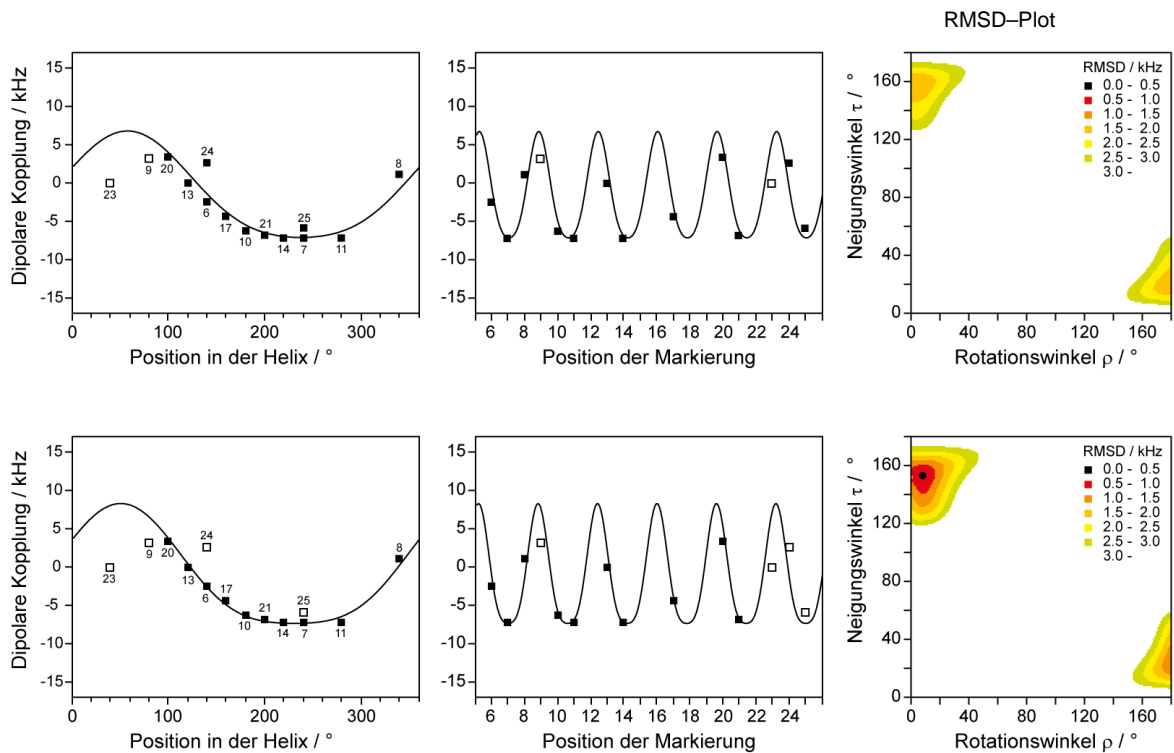


Abbildung C.4: Strukturanalyse (S_{mol} -Modell) der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in POPC.

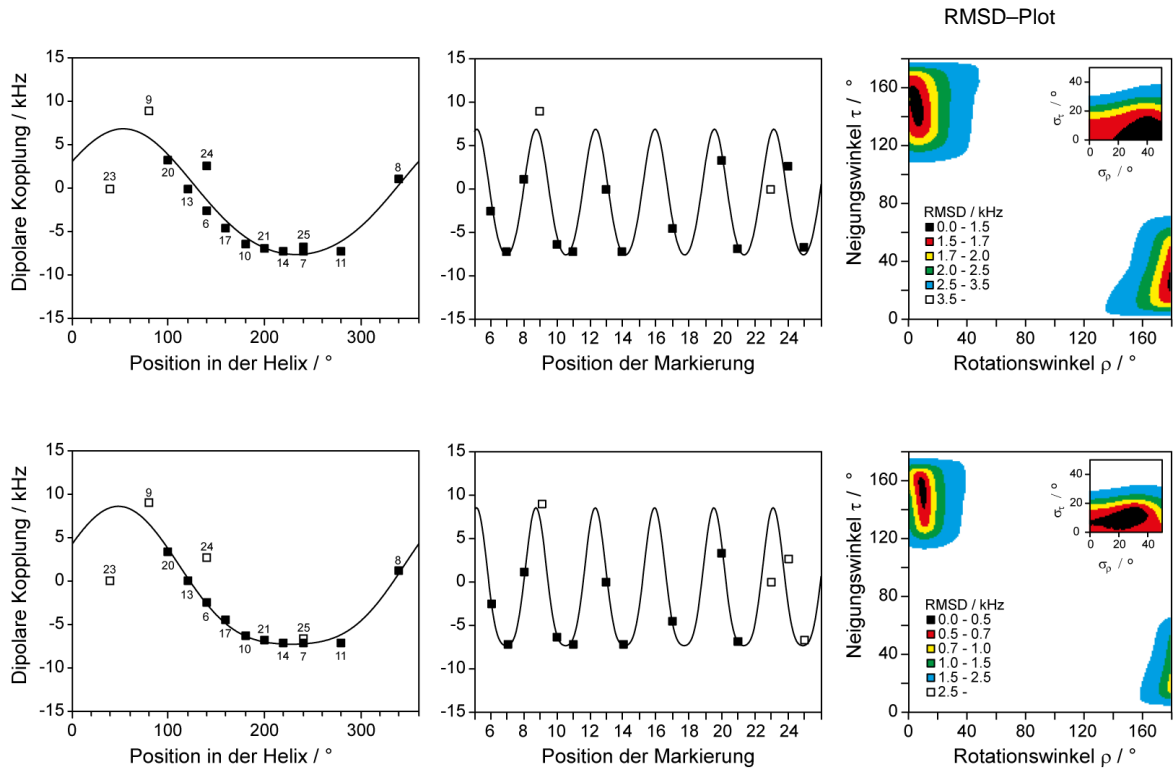
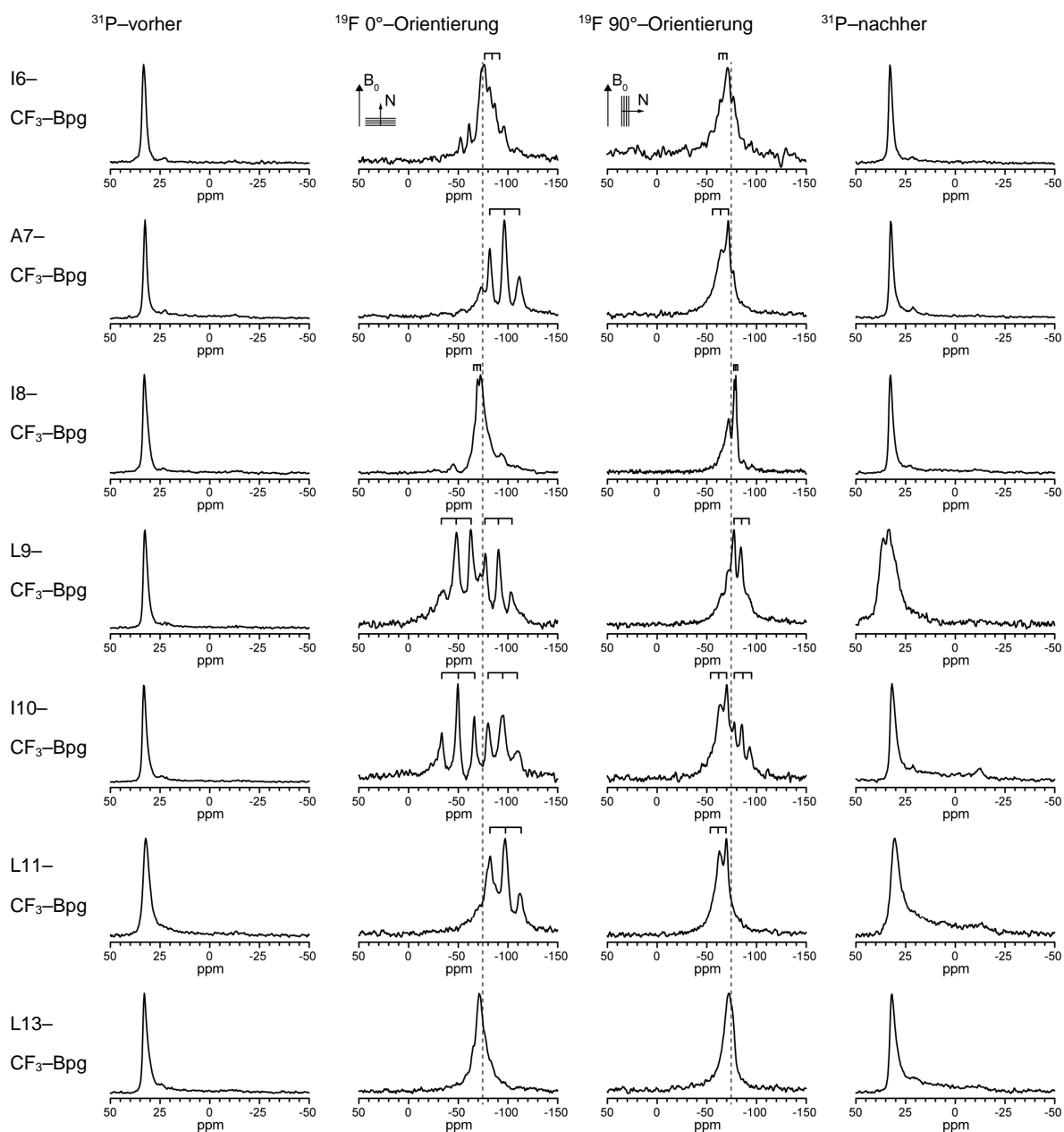


Abbildung C.5: Strukturanalysen (σ_τ/σ_ρ -Modell) der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in POPC.

TisB–CF₃–Bpg–Analoga in DMPCAbbildung C.6: NMR-Spektren der TisB-Analoga I6- bis L13-CF₃-Bpg in DMPC bei einem P:L von 1:100.¹¹

¹¹ Die hier dargestellten NMR-Spektren der Positionen 6, 7, 10, 11, 13 und 14 wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit aufgenommen und werden hier der Vollständigkeit wegen gezeigt.

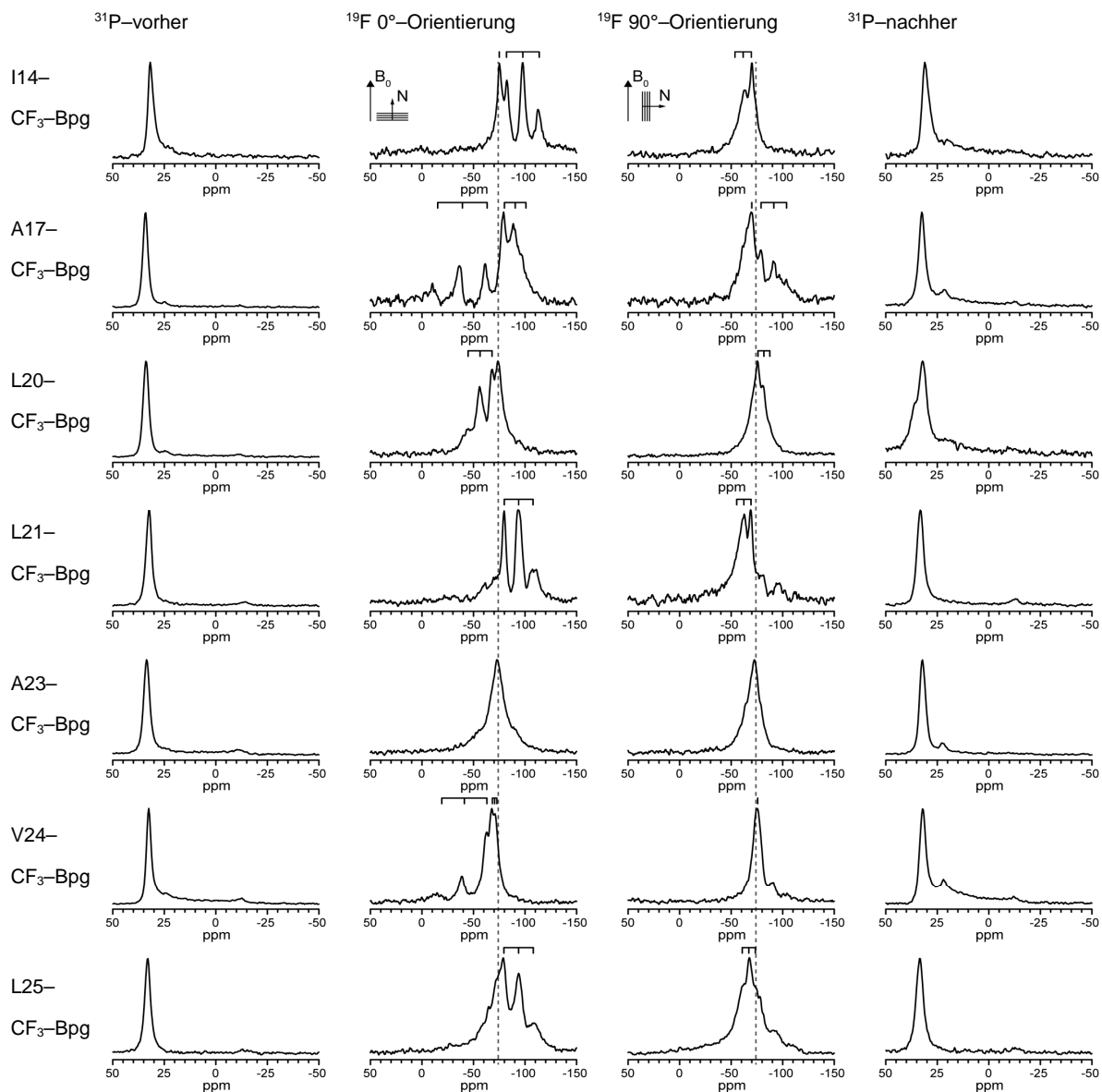


Abbildung C.7: NMR-Spektren der TisB-Analoga I14- bis L25- CF_3 -Bpg in DMPC bei einem P:L von 1:100.

Strukturanalysen DMPC

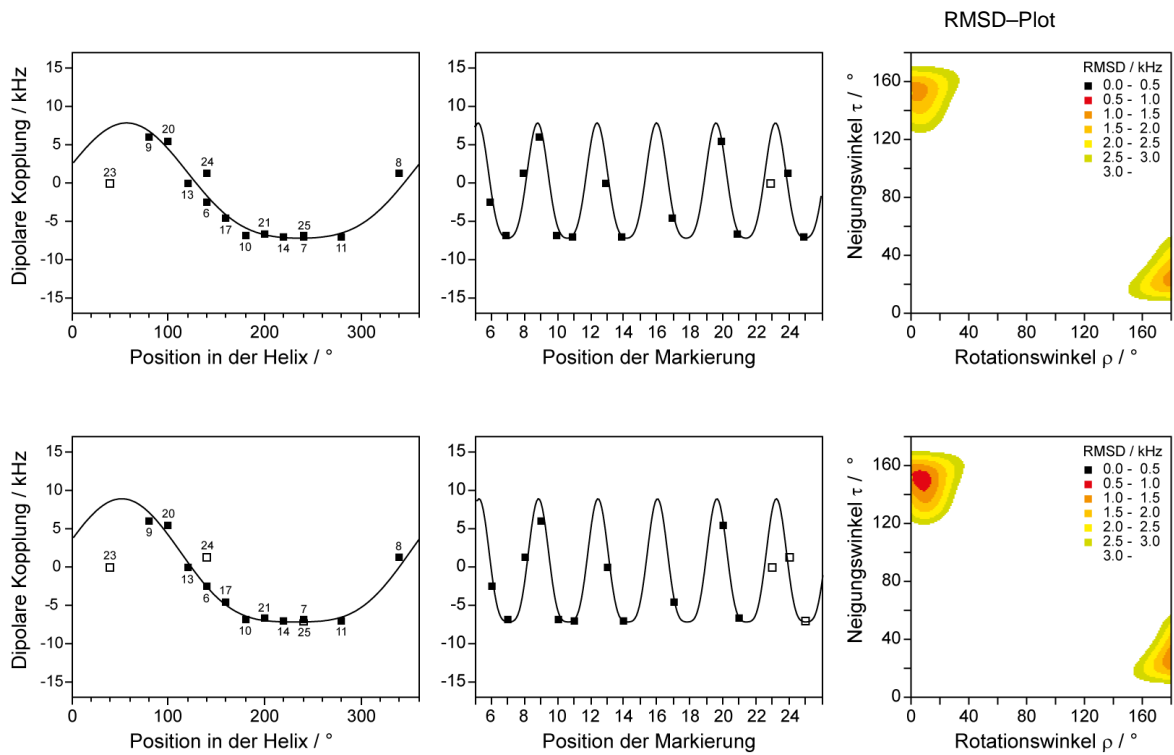


Abbildung C.8: Strukturanalysen (S_{mol} -Modell) der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in DMPC.

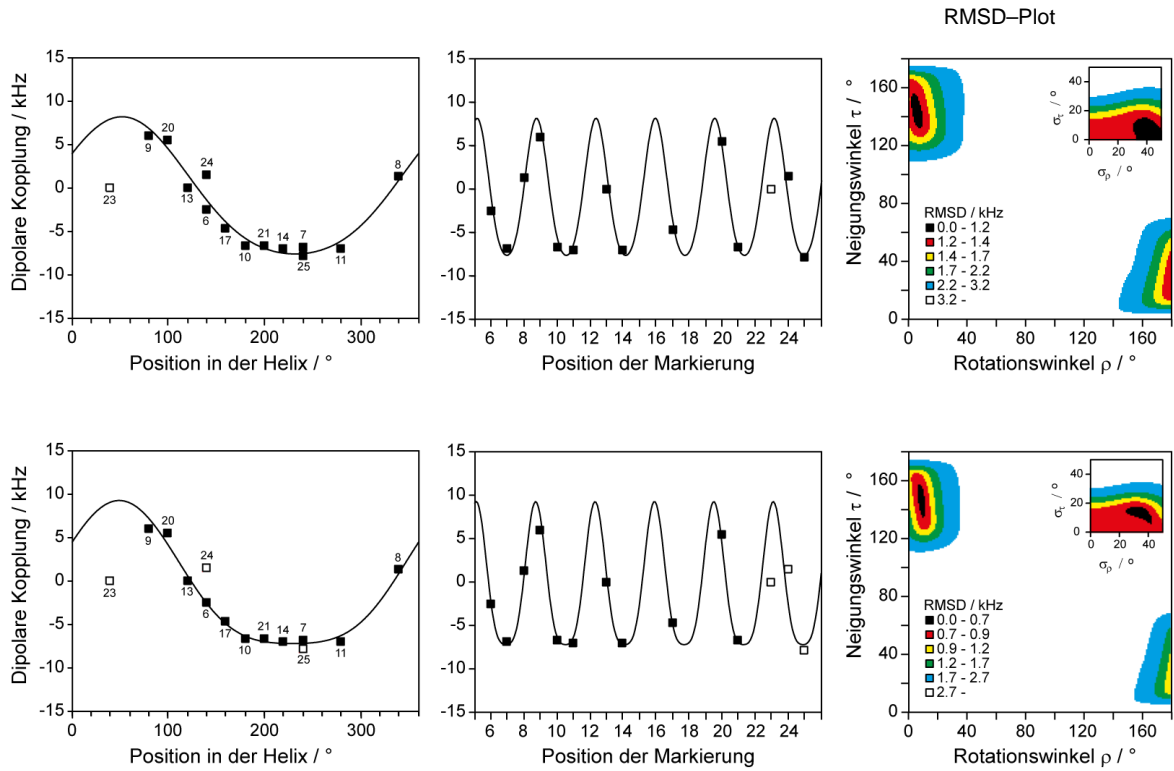


Abbildung C.9: Strukturanalysen (σ_τ/σ_ρ -Modell) der TisB- CF_3 -Bpg-Analoga in DMPC.

Spektren der neutralisierten und dialysierten Proben

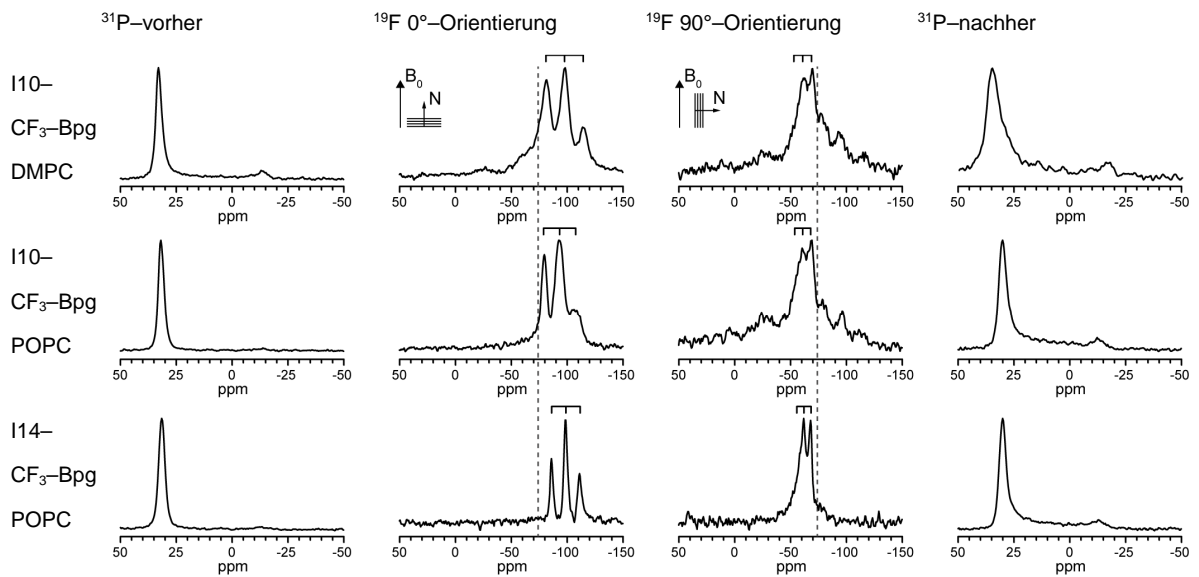


Abbildung C.10: NMR-Spektren der neutralisierten und dialysierten Proben von TisB I10-CF₃-Bpg in DMPC und TisB I10- und I14-CF₃-Bpg in POPC.

Spektren der Konzentrationsreihen

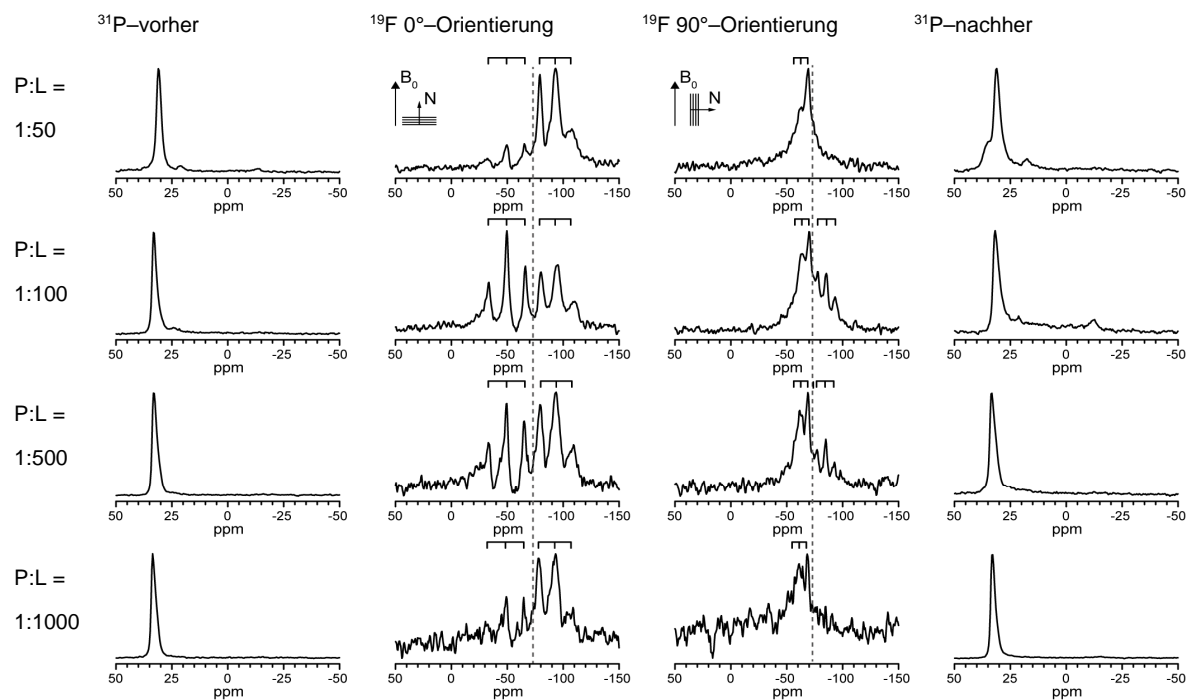


Abbildung C.11: NMR-Spektren der Konzentrationsreihe von TisB I10-CF₃-Bpg in DMPC.

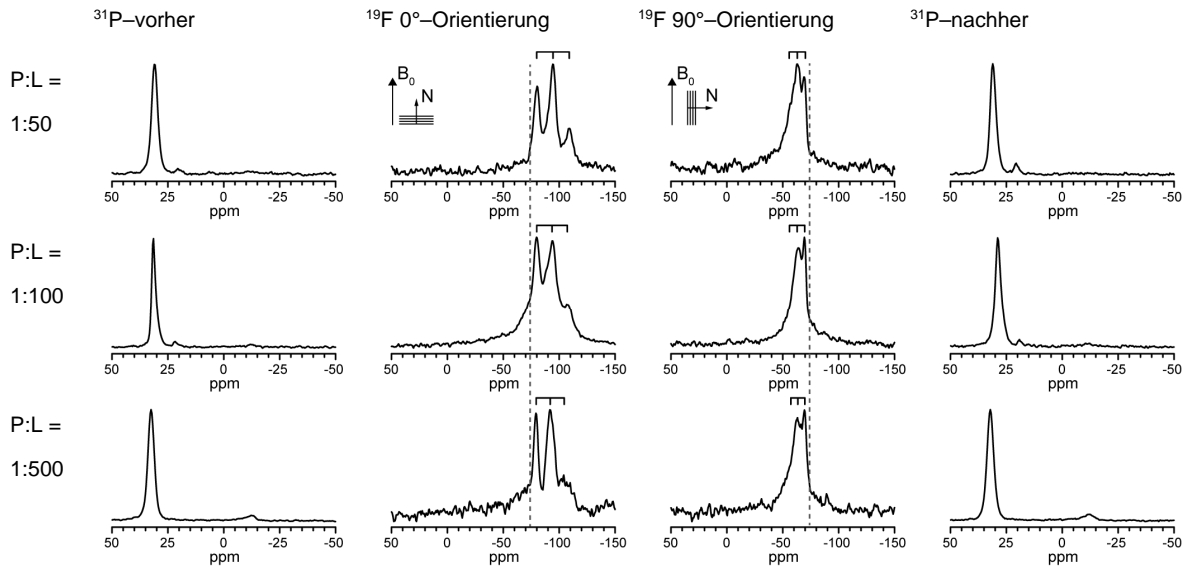


Abbildung C.12: NMR-Spektren der Konzentrationsreihe von TisB I10-CF₃-Bpg in POPC.

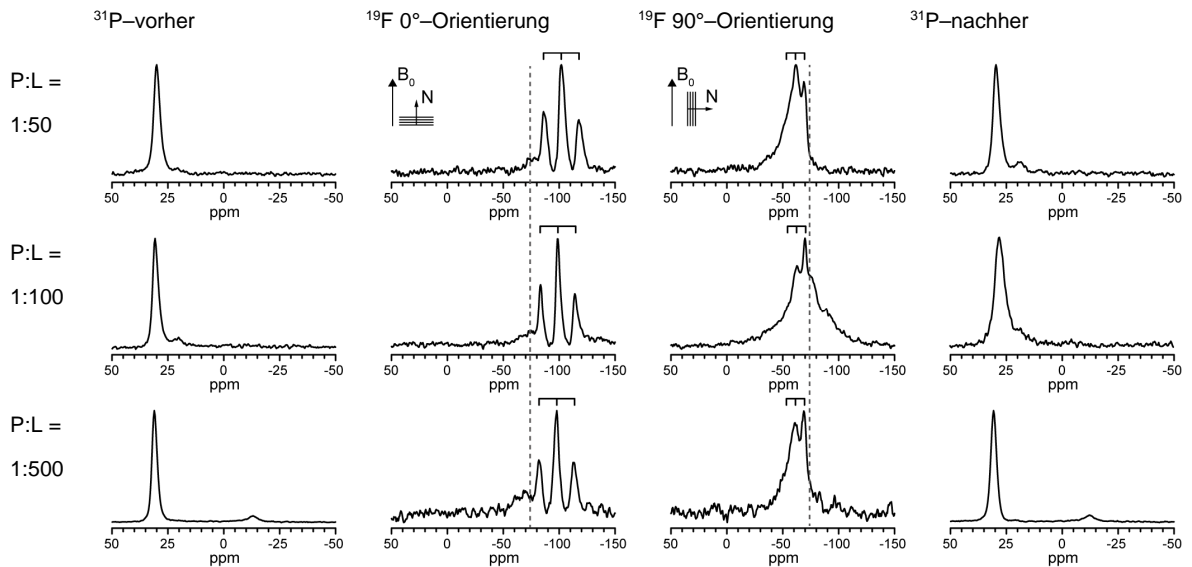


Abbildung C.13: NMR-Spektren der Konzentrationsreihe von TisB I14-CF₃-Bpg in POPC.

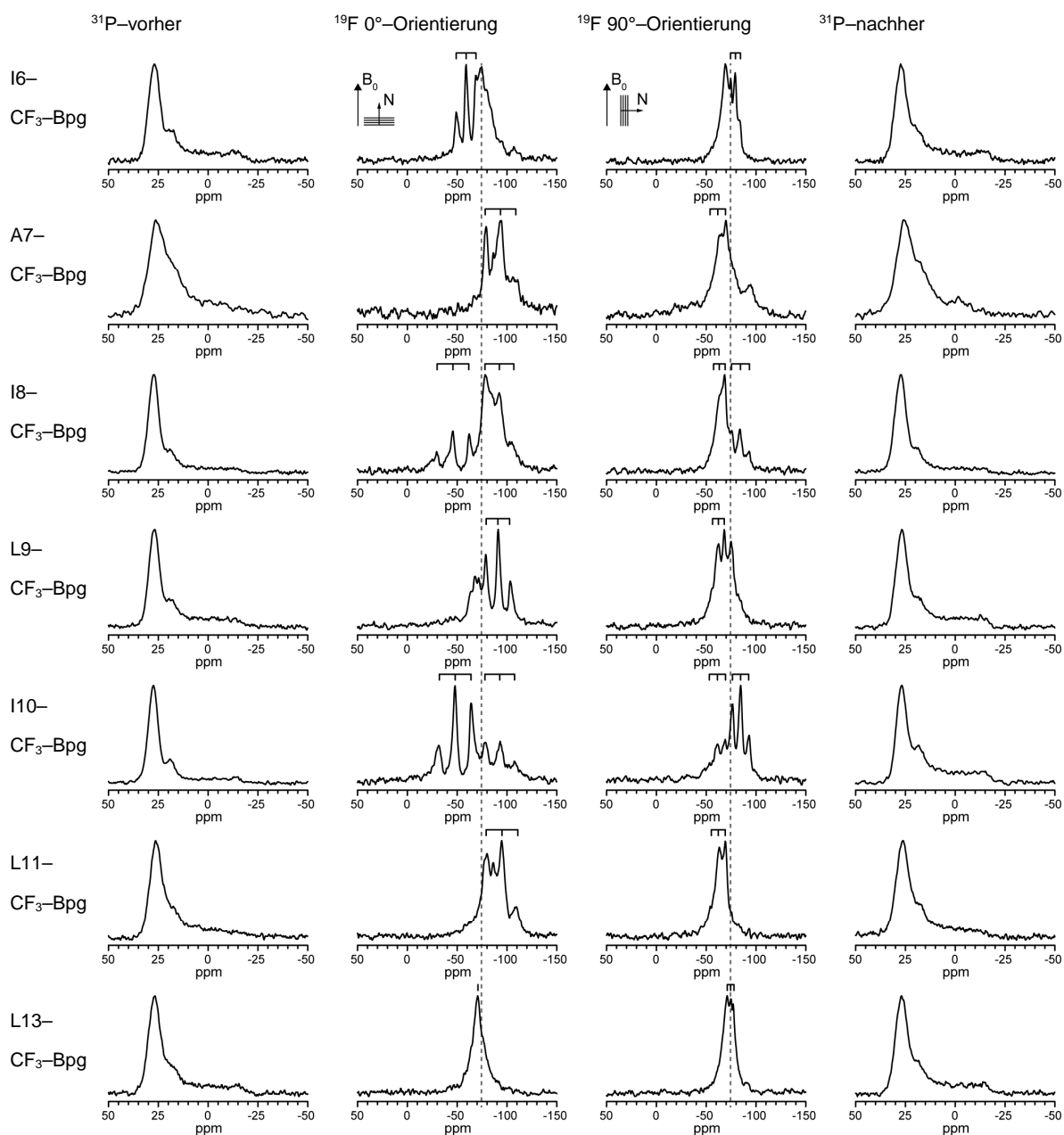
TisB-CF₃-Bpg-Analoga in DMPC angesäuert

Abbildung C.14: NMR-Spektren der TisB-Analoga I6- bis L13-CF₃-Bpg in DMPC bei einem P:L von 1:100 unter stark sauren Bedingungen.

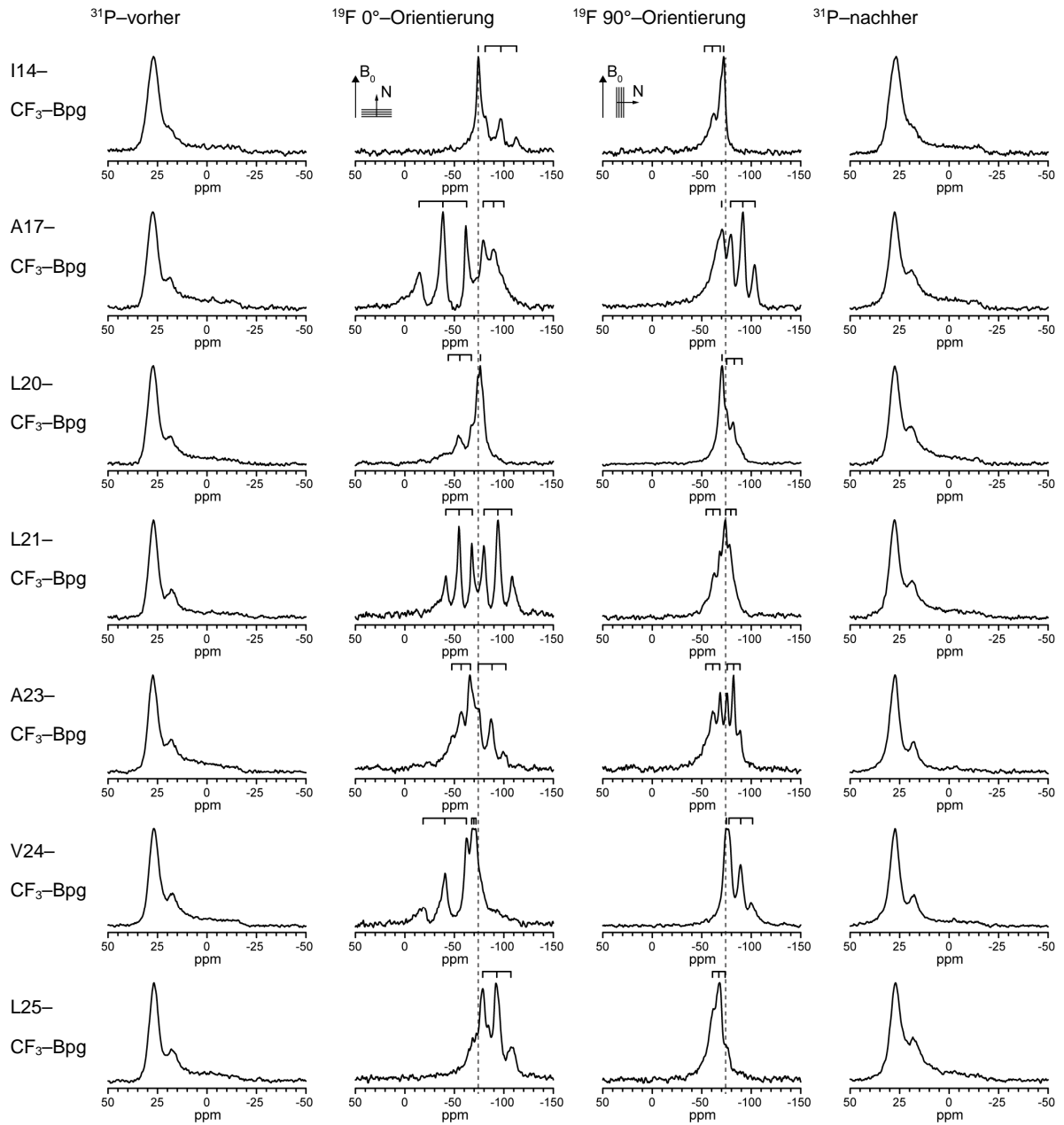


Abbildung C.15: NMR-Spektren der TisB-Analoga I14- bis L25- CF_3 -Bpg in DMPC bei einem P:L von 1:100 unter stark sauren Bedingungen.

NMR–Proben entsäuert mit NaHCO_3

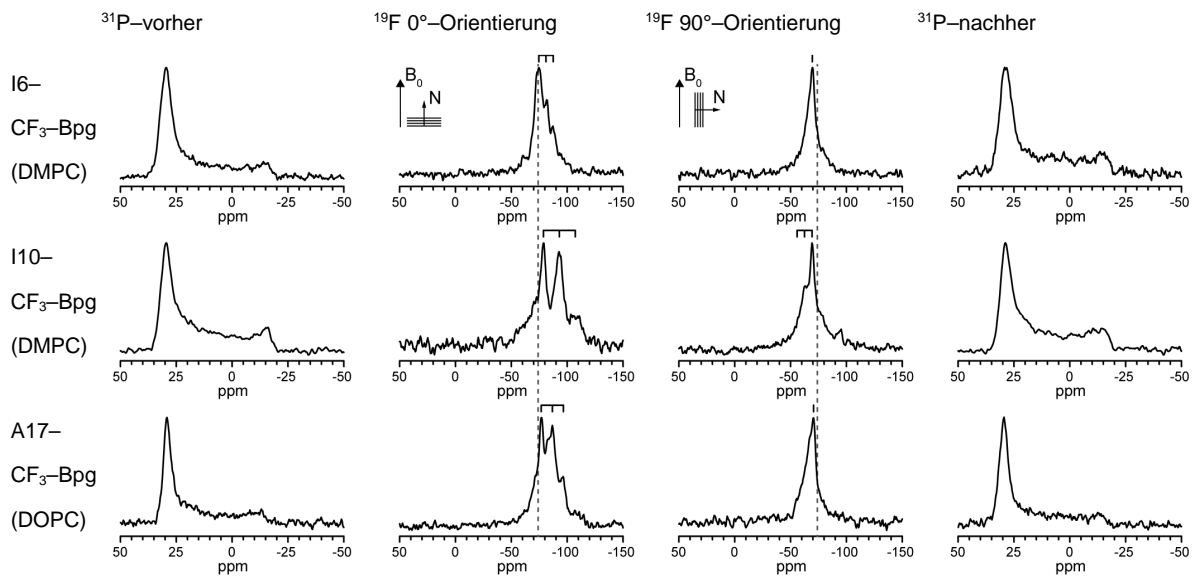


Abbildung C.16: NMR–Spektren der entsäuerten NMR–Proben.

TisB– CF_3 –Bpg–Analoge in DMPC/DMPC (7:3)

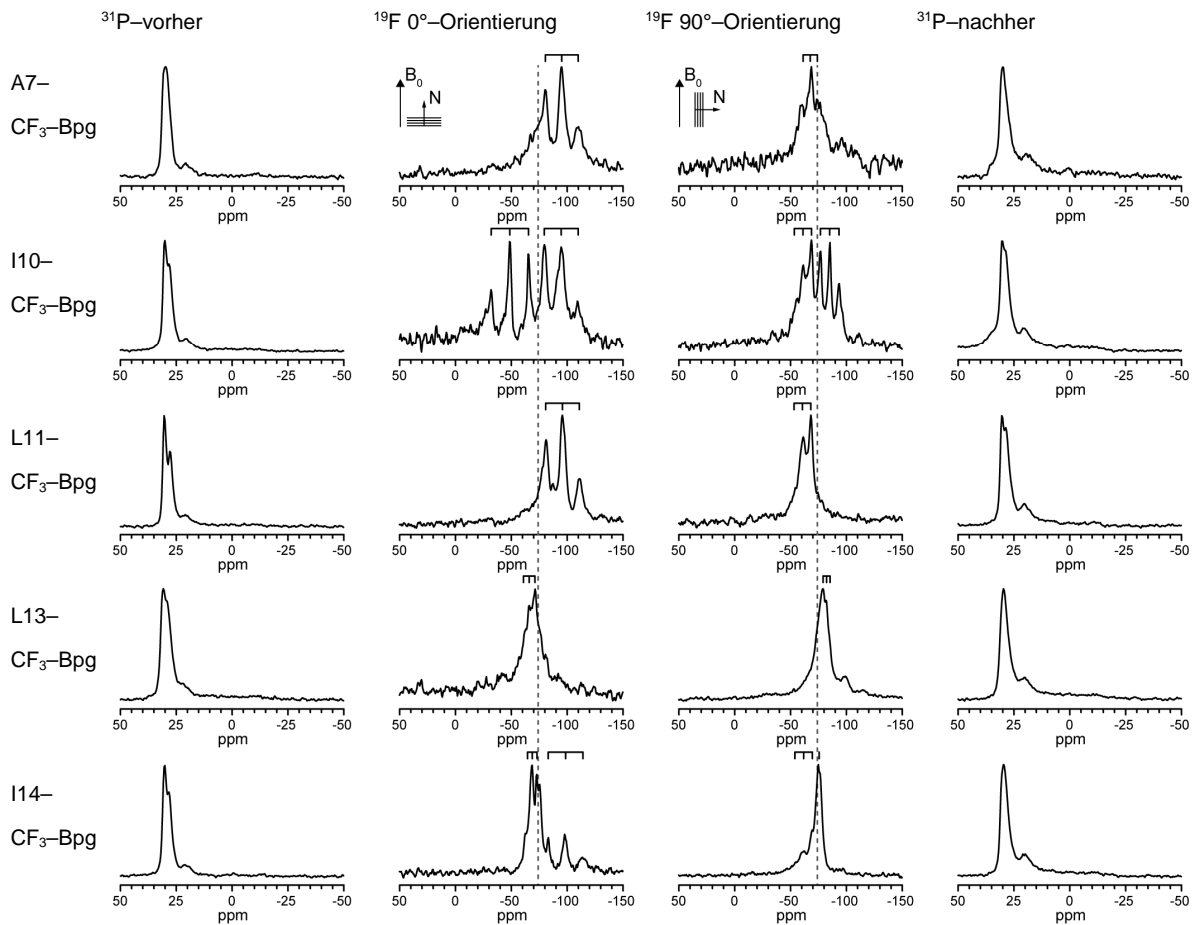


Abbildung C.17: NMR–Spektren einiger TisB– CF_3 –Bpg–Analoge in DMPC/DMPC (7:3).

TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC/POPG (7:3)

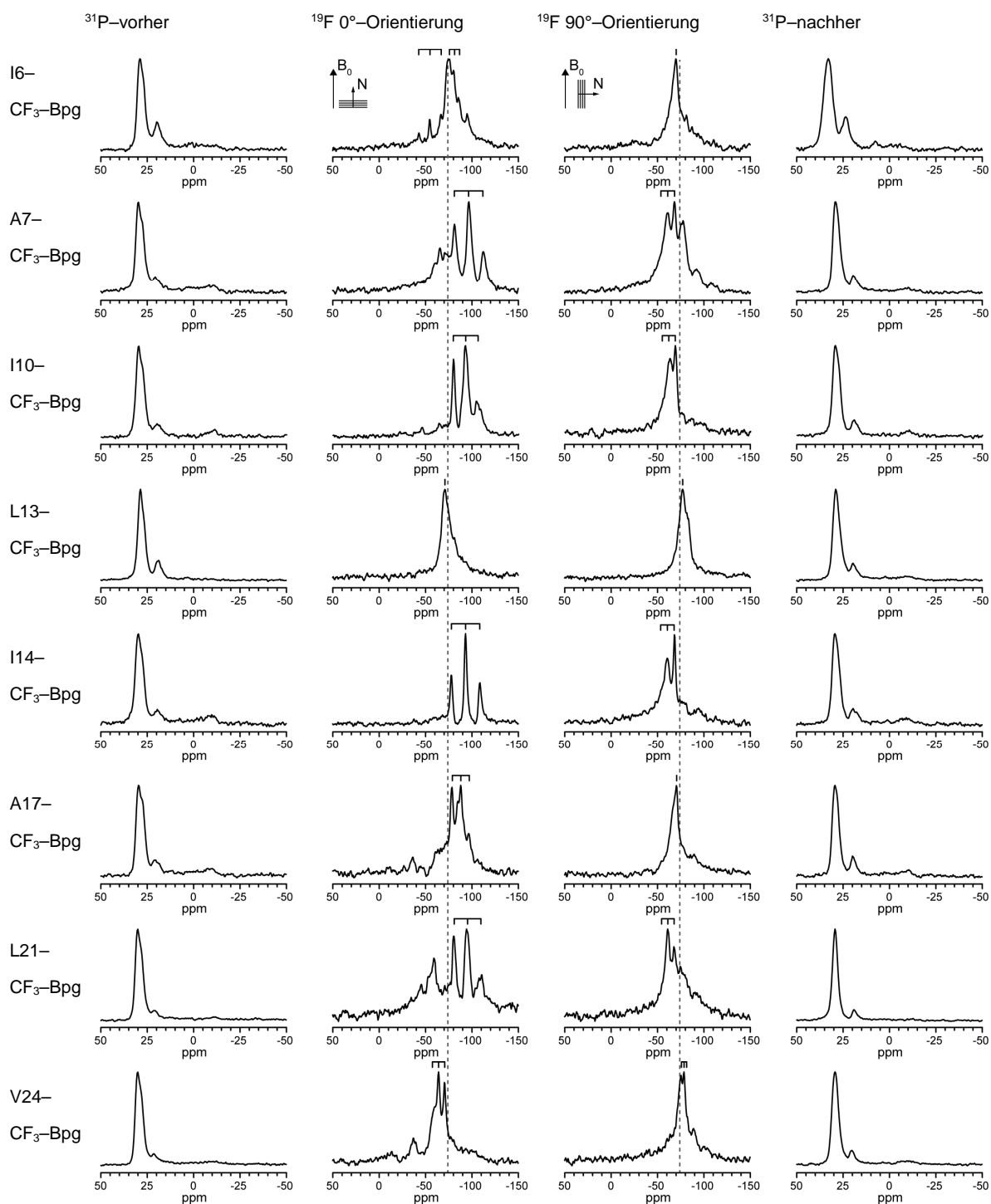


Abbildung C.18: NMR-Spektren einiger TisB-CF₃-Bpg-Analoga in POPC/POPG (7:3).

D Fluoreszenzspektroskopische Experimente

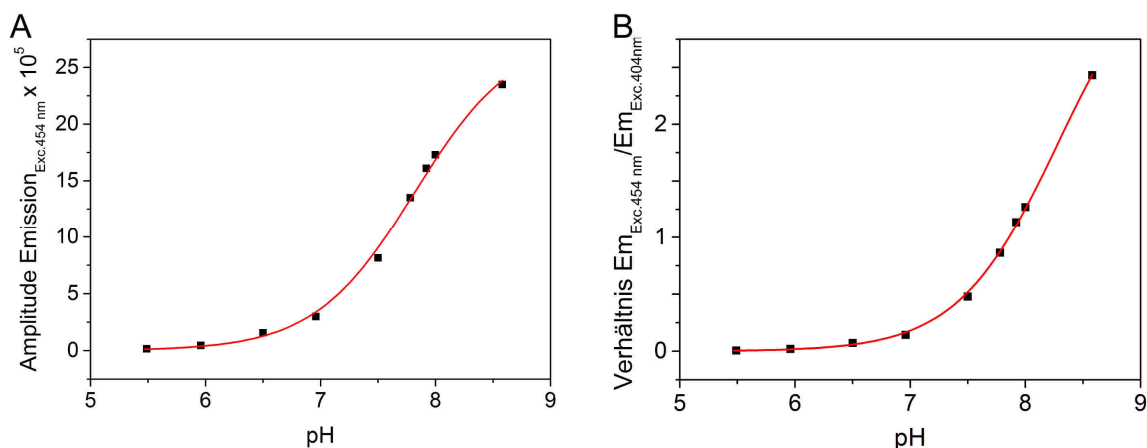


Abbildung D.19: Kalibrierung von HPTS der Amplituden (A) bei Anregung bei 454 nm und der Verhältnisse aus den Emissionen bei Anregung bei 454 nm und 404 nm (B).

Tabelle D.3: Erhaltene Parameter der HPTS-Kalibrierung.

	A_{Max}	pK	Offset	R^2
Amplitude	4580 ± 87.9	7.83 ± 0.02	0,003	0.99722
Verhältnis	3.70 ± 0.05	8.30 ± 0.01	0.0003	0.99926

Tabelle D.4: Initiale Anfangsgeschwindigkeiten des Protonenflusses in Abhängigkeit der TisB-Konzentration.

Konzentration [μM]	Geschwindigkeit [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	Fehler [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
1	1.7E-07	1.4E-07
2	2.2E-07	1.6E-07
4	4.7E-07	1.8E-07
6	9.4E-07	1.8E-07
8	1.7E-06	2.5E-07
10	2.5E-06	3.2E-07
12	2.8E-06	3.6E-07
14	3.9E-06	4.5E-07
16	4.0E-06	2.6E-07
18	4.5E-06	2.2E-07
20	5.0E-06	2.4E-07
24	5.3E-06	3.4E-07

Tabelle D.5: Zugabetabelle zur Herstellung der Proben für die FRET-Experimente.

Molenbruch X_A	V (Lipid) [μl]	V (Donor) [μl]	V (Akzeptor) [μl]
0.1	400	90	10
0.2	400	80	20
0.3	400	70	30
0.4	400	60	40
0.5	400	50	50
0.6	400	40	60
0.7	400	30	70
0.8	400	20	80
0.9	400	10	90
–	400	10	–
0	400	100	–
–	400	–	10
1	400	–	100

Verwendete spektroskopische Parameter

Tabelle D.6: Verwendete Absorptionskoeffizienten.

	$\epsilon_{280} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]^a$	$\epsilon_{340} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]^a$	$\epsilon_{291} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]^b$
TisB	1490 ^c		
TisB Y27W	5500 ^c		4920
W-TisB	6990 ^c		4980
Dans-TisB		3600	1710

^a In Lösung

^b Peptide co-solubilisiert in Lipid-Vesikeln

^c nach [80]

Allgemeine Formel für Förster-Abstand [81]:

$$R_0 = \sqrt[6]{\left(\frac{9 (\ln 10) \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 N_A n^4} J\right)} \quad (7.1)$$

κ^2 = Orientierungsfaktor (2/3 für isotrope Verteilung)

ϕ_D = Quantenausbeute des Donors 0.35 (dimensionslos)

N_A = Avogadro-Konstante $6.022 \times 10^{23} [\text{mol}^{-1}]$

n = Brechungsindex (Lipid) 1.43 (dimensionslos) [82]

Überlappungsintegral [81]:

$$J = \int I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (7.2)$$

I_D = Intensität Donor-Fluoreszenz (normalisiert, dimensionslos)

ε_A = Extinktion des Akzeptors [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

λ = Wellenlänge [nm]

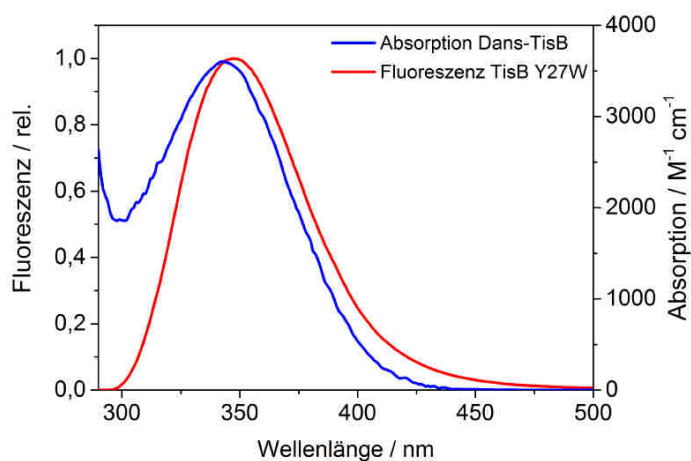


Abbildung D.20: Überlappung der Fluoreszenz des Donors TisB Y27W und der Absorption des Akzeptors Dansyl-TisB in Lipid-Vesikeln.

Für das Überlappungsintegral J wurde ein Wert von $3.83 \times 10^{13} \text{ nm}^4 \cdot M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ erhalten. Mit diesem Wert und den oben angegebenen Konstanten beträgt der Försterradius $r_0 = 24 \text{ \AA}$.

Publikationsliste

- B.Zimpfer, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2015**, (in Bearbeitung)
- B. Zimpfer, P. Wadhvani, J. Reichert, A.S. Ulrich, *J. Pept. Sci.*, **2014**, *20*, 196.
- B. Zimpfer, P. Wadhvani, J. Reichert, S. Prock, P. Sanyal, M. Berditsch, E. Strandberg, J. Buerck, A.S. Ulrich, *Biophys. J.*, **2014**, *106*, 88a.
- T. Steinbrecher, S. Prock, J. Reichert, P. Wadhvani, B. Zimpfer, J. Buerck, M. Berditsch, M. Elstner, A.S. Ulrich, *Biophys. J.*, **2012**, *103*, 1460–1469.
- S. Prock, T. Steinbrecher, J. Buerck, P. Wadhvani, B. Zimpfer, M. Elstner, A.S. Ulrich, *Biophys. J.*, **2012**, *102*, 492a.
- B. Zimpfer, *Strukturuntersuchungen am TisB mittels Zirkulardichroismus- und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie*, Diplomarbeit, Karlsruhe, **2012**.

Konferenzbeiträge / Posterpräsentationen:

33rd European Peptide Symposium, Sofia 2014

Structure–Function analysis of TisB in membranes: A stress–response peptide from *E. coli*

58th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Francisco 2014

Structure–Function analysis of the stress–response peptide TisB

BIF EAB, KIT 2013

Molecular mechanism of the biofilm–inducing peptide TisB

BIF EAB, KIT 2012

The bacterial stress–response peptide TisB forms a miniature proton–conductive channel