

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen
von membranaktiven Peptiden/Peptaibolen
in Lipid-Modellmembranen

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. Sezgin Kara

aus

Hagenbach

Dekan: Prof. Dr. Willem M. Klopper

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2013 bis März 2016 am Institut für Organische Chemie (IOC), Lehrstuhl Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt. Ein wichtiger Teil der Arbeit wurde infolge der Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Thierry Brigaud an der Université de Cergy-Pontoise in Frankreich und mit Dr. María Ángeles Jiménez López am CSIC in Madrid durchgeführt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher nicht als Prüfungsschrift eingereicht, weder an dieser noch an einer anderen Hochschule.

Karlsruhe, den 8. März 2016

Danksagungen

Ich bedanke mich vorerst herzlich bei Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich für die freundliche Aufnahme als Doktorand in Ihrem Arbeitskreis und die interessanten Aufgabenstellungen im Rahmen meiner Promotion.

Ich danke besonders meinem Betreuer Dr. Sergii Afonin für die unzähligen Hilfestellungen und die informativen Diskussionen, die mir infolge der Untersuchungen sehr geholfen haben, sowie für das Korrekturlesen der Arbeit. Hierbei möchte ich auch Dr. Stephan L. Grage für seine Korrekturen und die NMR-technischen Auswertungen bedanken, die einen wesentlichen Teil der Untersuchungen in dieser Dissertation ausmachen. Auch Dr. Erik Strandberg danke ich für die durchgeführten NMR-Berechnungen.

Bei Dr. Jochen Bürck, Siegmund Roth und Bianca Posselt möchte ich mich für die freundliche Betreuung während den CD-Messungen am IBG-2 und ANKA bedanken.

Dr. Marina Berditsch und Dr. Papia Sanyal gebührt der Dank für die Hilfe bei den mikrobiologischen Tests.

Der Studentin Saskia Kattge danke ich sehr für die Durchführung einiger Festkörper-NMR-Experimente im Rahmen ihrer Bachelorarbeit, deren Ergebnisse in diese Arbeit mit eingeflossen sind.

Prof. Dr. Igor V. Komarov danke ich sehr herzlich für die freundliche Bereitstellung der CF₃-markierten Bpg-Aminosäure für den Einsatz in den Synthesen in Cergy-Pontoise.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die schöne Zeit und die große Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich speziell bei den Kollaborateuren bedanken: dabei gilt mein besonderer Dank der Gruppe um Prof. Thierry Brigaud an der Université de Cergy-Pontoise, speziell an Dr. Grégory Chaume, Dr. Olivier Monasson, Véronique Doan und Dr. Andrea Bordessa für die erfolgreiche Synthese der Peptaibole und der gesamten Gruppe Brigaud für die außerordentliche Hilfsbereitschaft während meines Forschungsaufenthalts in Cergy-Pontoise. Auch Dr. M. Angeles Jiménez und Héctor Zamora vom CSIC in Madrid, Spanien, danke ich vielmals für die NMR-Untersuchungen und die freundliche Betreuung während meines Aufenthalts in Madrid. Bei Dr. Norio Takeshita bedanke ich mich für die Hilfe bei den Tests

der antifungalen Aktivität (dōmo arigatō!) sowie bei Marina Putzu und Dr. Tomáš Kubař für die Durchführung der MD-Simulationen.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung des Projektes in Zusammenarbeit mit dem ANR (L'Agence nationale de la recherche) und die Ermöglichung des Auslandsaufenthalts in Frankreich.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Synchrotron-Strahlungsquelle des ANKA am Campus Nord des KIT für die Möglichkeit der Aufnahme der CD-Spektren.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung während des gesamten Zeitraums meines Studiums und der Promotion.

“Look deep into nature, and then you will understand everything better”

- Albert Einstein

Abstract

In this work, interactions between membrane-active peptides/peptaibols and lipid model membranes were investigated. First, solid state ^{31}P -NMR experiments were used to characterize archaeal diphytanoyl lipids, which are commonly used in electrophysiological studies. They were found to exhibit polymorphistic phase behavior, depending on temperature, hydration levels and lipid shape. The interaction of DPhPC with the antimicrobial peptide PGLa showed a membrane surface alignment of this peptide even at high concentration, indicating a relatively high threshold for peptide insertion and a high membrane integrity.

Subsequently, structural and functional properties of the short 11-mer peptaibol Harzianin HK VI (HZ) were analyzed by solid state ^{19}F -NMR and other complementary techniques. In biological tests, HZ did not display any significant antibacterial activity, but certain inhibitory effects were observed for some plant pathogenic fungi, as well as a low hemolytic activity. The membrane-bound structure of this short peptaibol was found to be stabilized by intramolecular H bonds of the type 4 \rightarrow 1 and is thus consistent with a *β -bend ribbon spiral*, a structural subtype of the 3_{10} helix. The helix axis of HZ is aligned in a surface-bound state in DPhPC membranes. In further experiments with different types of lipids, a partial insertion was modulated only by changes in the spontaneous lipid curvature, which is strongly affected by lipid shape. Positively curved membranes allow an insertion of HZ, but it does not occur in membranes with no or negative curvature. These results suggest that pore formation cannot be postulated uniformly for all members of the class of peptaibols. Instead, the short HZ appear to have an alternative mechanism for its membrane action, e.g. it might aggregate on the membrane surface and lead to a disintegration of the lipid bilayer by inducing lateral stress.

For the well-known Alamethicin (ALM, 20-mer), on the other hand, the structurally flexible C-terminus was found to be well represented by a mixed $\alpha/3_{10}$ -helical conformation, and a transmembrane alignment in DMPC lipid membranes was confirmed, which is fully compatible with a pore.

The comparative analysis of short and long peptaibols thus suggests that there is some structural, functional and mechanistic diversity amongst the members of this class of compounds.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Membranen	1
1.1.1	Lipidform und spontane Lipidmembrankrümmung	2
1.1.2	Lipidpolymorphie	4
1.1.3	Diphytanoyl-Lipide	5
1.2	Antimikrobielle Peptide (AMP)	7
1.3	Peptaibiotics	10
1.3.1	Alamethicine	14
1.3.2	Harzianine	17
1.4	Biophysikalische Methoden zur Untersuchung von Peptid-Lipidmembran- Wechselwirkungen	20
1.4.1	Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Charakterisierung von Peptiden in Lipidmembranen	21
1.4.2	CD-Spektroskopie für die Bestimmung von Proteinstrukturen	26
2	Motivation	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Materialien	30
3.2	Festphasen-Peptidsynthese	30
3.2.1	Synthese und Aufreinigung von PGLa-Peptiden	30
3.2.2	Synthese und Aufreinigung von HZ- und ALM-Peptiden	32
3.3	Lipide	35
3.4	Biologische Tests	35
3.4.1	Antibakterielle Aktivität	36
3.4.2	Antifungale Aktivität	38
3.4.3	Hämolytische Aktivität	39
3.5	CD-Spektroskopie	41
3.5.1	Vorbereitung der CD-Proben	41
3.5.2	Durchführung der CD-Messungen	42
3.5.3	OCD (Orientierte CD) -Spektroskopie	42
3.6	Festkörper-NMR-Spektroskopie	43
3.6.1	Vorbereitung der NMR-Proben	43
3.6.2	Durchführung der NMR-Messungen	44
3.6.3	Festkörper-NMR-Datenanalyse	46
3.7	Flüssigkeits-NMR	46
3.8	Molekulardynamik (MD) -Simulationen	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Peptidsynthese	49
4.2	Charakterisierung von Diphytanoyl-Lipiden	50
4.2.1	Strukturelle Merkmale von Diphytanoyl-Lipidmembranen mittels ³¹ P-Festkörper- NMR-Spektroskopie	50
4.2.2	Einfluss des antimikrobiellen PGLa auf Lipidmembranen aus DPhPC und DPhPG	52
4.2.3	Einfluss des PGLa auf gemischte Lipidmembranen aus DPhPC/DPhPG	54
4.2.4	Untersuchung von Lipidvesikel-Proben aus DPhPC und DPhPG unter dem Einfluss des PGLa	55
4.2.5	Bestimmung der Orientierung des PGLa in DPhPC-Lipidmembranen	56
4.2.6	Strukturelle Charakterisierung des PGLa in DPhPC und DPhPG durch CD- Spektroskopie	59

4.3	Untersuchung der Struktur und Funktion der Peptaibole HZ und ALM.....	61
4.3.1	Biologische Aktivität von HZ	61
4.3.2	Strukturelle Untersuchungen an HZ.....	67
4.3.3	Strategie für die Festkörper-NMR-Analyse von HZ und ALM.....	77
4.3.4	Charakterisierung von HZ in DPhPC-Lipidmembranen	80
4.3.5	Wechselwirkungen von HZ mit anderen Lipidmembranen	87
4.3.6	Struktur und Orientierung von ALM in DMPC	100
5	Diskussion	103
5.1	Diphytanoyl-Lipide	103
5.1.1	Diphytanoyl-Lipide als Modellmembranen	103
5.1.2	Wechselwirkungen des PGLa mit Diphytanoyl-Lipidmembranen	104
5.2	Struktur und Funktion von HZ	105
5.2.1	Strukturelle Merkmale.....	105
5.2.2	Funktionelle Merkmale	110
5.3	Struktur und Orientierung von ALM	113
6	Zusammenfassung	115
7	Literaturverzeichnis.....	116
8	Anhang	125

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Aib	α -Aminoisobuttersäure
ALM	Alamethicin F30/3
AMP	Antimikrobielle(s) Peptid(e)
Äq.	Äquivalente
Bpg	(S)-bicyclopent-[1.1.1]-1-yl-glycin
CD	Zirkulardichroismus-Spektroskopie (<i>circular dichroism</i>)
CPD-Puffer	Citrat-Phosphat-Dextrose-Puffer
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung (<i>chemical shift anisotropy</i>)
DCM	Dichlormethan
DDPC	1,2-didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DErPC	1,2-dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-(1`- <i>rac</i> -glycerol)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPC	Dodecylphosphatidylcholin
DPhPC	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPhPE	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
DPhPG	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-(1`- <i>rac</i> -glycerol)
DPhPS	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylserin

DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation (<i>electron spray ionization</i>)
EtOH	Ethanol
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GS	Gramicidin S
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HFIP	Hexafluorisopropanol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HZ	Harzianin HK VI
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LysoMPC	1-myristoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
LysoPPG	1-palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator (<i>matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight</i>)
MD	Molekulardynamik
MeOH	Methanol
MH	Müller-Hinton
MIC	Minimale Hemmkonzentration (<i>minimum inhibitory concentration</i>)
MS	Massenspektrometrie
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PGLa	Peptidyl-glycylleucin-carboxamid
PoPE	1,2-dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin

POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
RMSD	Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root-mean-square deviation</i>)
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRCD	Synchrotron-Zirkulardichroismus (<i>synchrotron radiation circular dichroism</i>)
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TIS	Triisopropylsilan
UPLC	Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<i>ultra-high-performance liquid chromatography</i>)

Aminosäuren wurden gelegentlich unter Verwendung ihres Dreibuchstabencodes nach der IUPAC/IUBMB-Nomenklatur abgekürzt, wobei in einigen Peptidsequenzen auch der Einbuchstabencode für die jeweilige Aminosäure verwendet wird.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Flüssig-Mosaik“-Modell der Zell-Plasmamembran von Singer und Nicolson. .	2
Abbildung 2: Chemische Strukturen und Amphipathizität ausgewählter Lipidmoleküle.	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Korrelation zwischen Lipidform und der spontanen Lipidmembrankrümmung.	4
Abbildung 4: Räumliche Darstellung von nicht-lamellaren Lipidphasen.	5
Abbildung 5: Charakteristische Merkmale von Membranlipiden von Archaeen.	6
Abbildung 6: Phasendiagramm des Lipids DPhPC.	7
Abbildung 7: Mechanismen der Wechselwirkung von AMP mit Lipidmembranen gemäß dem SMH-Modell.	10
Abbildung 8: Strukturen ausgewählter, α,α -dialkylierter Aminosäuren aus Peptaibolen.	11
Abbildung 9: Illustration der strukturellen Besonderheiten des ALM.	16
Abbildung 10: Hypothetische Mechanismen der Porenbildung von kurzen membranaktiven Peptiden.	19
Abbildung 11: Schematische Darstellung der helikalen Konformation β - <i>bend ribbon spiral</i>	20
Abbildung 12: Chemische Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten ^{19}F -markierten Aminosäuren.	22
Abbildung 13: Illustration der aus der ^{19}F -Festkörper-NMR zu bestimmenden Parameter eines Peptids in orientierten Lipidmembranen.	23
Abbildung 14: Korrelation zwischen ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektrum und Orientierung des Peptids in der Lipidmembran.	24
Abbildung 15: Typische ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren bestimmter Lipidanordnungen.	25
Abbildung 16: Repräsentative CD-Spektren für einige bekannte Sekundärstrukturen.	26
Abbildung 17: Auftreten von OCD-Spektren für bestimmte Peptidhelix-Orientierungen in Lipidmembranen.	27
Abbildung 18: Darstellung der Vertiefungen einer 12×8-Mikrotiterplatte.	37
Abbildung 19: Illustration der Ausrichtungen der orientierten NMR-Probe zum Magnetfeld.	45
Abbildung 20: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von makroskopisch orientierten Diphytanoyl-Lipiden.	51
Abbildung 21: Effekt des PGLa auf das Phasenverhalten von DPhPC und DPhPG anhand ^{31}P - und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren.	53
Abbildung 22: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von orientierten Lipidmischungen aus DPhPC/DPhPG.	55
Abbildung 23: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von nicht-orientierten DPhPC- und DPhPG-Lipidvesikeln.	56
Abbildung 24: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF_3 -Bpg-markierten PGLa und erhaltene dipolare Kopplungen.	57
Abbildung 25: Bestimmung der Orientierung und Dynamik des PGLa in DPhPC-Lipidmembranen.	58
Abbildung 26: OCD-Spektren von PGLa in hydratisierten DPhPC- und DPhPG-Lipidmembranen.	59
Abbildung 27: CD-Spektren von PGLa in DPhPC- und DPhPG-Vesikeln.	60
Abbildung 28: Repräsentative Ergebnisse der MIC-Bestimmung von HZ, ALM und dem Kontrollpeptid GS gegen <i>B. subtilis</i>	61
Abbildung 29: Bestimmung der bakteriellen Atmungsaktivität nach Behandlung mit HZ in verschiedenen Konzentrationen.	63
Abbildung 30: Fotoaufnahmen des Agarplattendiffusionstests des HZ gegen <i>F. oxysporum</i>	65

Abbildung 31: Induzierte Hämolyse von HZ und HZ 4-CF ₃ -Bpg in Abhängigkeit der Peptidkonzentration.....	67
Abbildung 32: CD-Spektren von HZ und HZ-Analoga in wässrigen Medien.....	68
Abbildung 33: CD-Spektren von HZ und HZ-Analoga in TFE.....	69
Abbildung 34: CD-Spektren von HZ und ausgewählten HZ-Analoga in DPC und SDS.....	70
Abbildung 35: CD-Spektren von HZ in Lipidvesikeln.....	70
Abbildung 36: SRCD-Spektrum von HZ in 50 % TFE-Lösung.....	71
Abbildung 37: Statistische Wahrscheinlichkeit von H-Brückenbindungen des HZ in DMPC.....	72
Abbildung 38: Ramachandran-Plots für alle Aminosäurereste in der HZ-Sequenz.....	73
Abbildung 39: NOESY-Spektrum des HZ in TFE mit zugeordneten NOE-Kreuzsignalen...	74
Abbildung 40: 3D-Darstellung der aus den Flüssigkeits-NMR-Daten konstruierten Strukturen des HZ.....	77
Abbildung 41: Illustration der Orientierung von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-CF ₃ -Ala im Peptidrückgrat....	78
Abbildung 42: Primärsequenz des HZ und das ¹⁹ F- und ¹⁵ N-NMR-Markierungsschema.....	79
Abbildung 43: ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Daten und -Strategie des ALM.....	80
Abbildung 44: ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren des DPhPC in orientierten NMR-Proben mit CF ₃ -markierten HZ-Analoga.....	81
Abbildung 45: ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektren der CF ₃ -markierten HZ-Analoga in orientierten DPhPC-Lipidmembranen.....	82
Abbildung 46: ¹⁵ N- und ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren des Systems HZ/DPhPC.....	83
Abbildung 47: OCD-Spektrum des HZ in DPhPC-Lipidmembranen.....	87
Abbildung 48: ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren des DMPC in orientierten NMR-Proben mit CF ₃ -markierten HZ-Analoga.....	88
Abbildung 49: ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektren der CF ₃ -markierten HZ-Analoga in orientierten DMPC-Lipidmembranen.....	89
Abbildung 50: ¹⁵ N- und ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren des Systems HZ/DMPC.....	90
Abbildung 51: Bestimmung der Orientierung des HZ in DMPC-Lipidmembranen aus Freie-Energie-MD-Simulationen.....	92
Abbildung 52: SROCD-Spektren des HZ in DMPC-Lipidmembranen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen.....	93
Abbildung 53: ¹⁹ F- und ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren der Systeme HZ/DMPC+LysoMPC und HZ/DDPC.....	94
Abbildung 54: ¹⁵ N- und ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren der Systeme HZ/DMPC+LysoMPC und HZ/DDPC.....	95
Abbildung 55: ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren des Lipids DPoPE und Beeinflussung durch HZ.....	99
Abbildung 56: ¹⁹ F- und ³¹ P-Festkörper-NMR-Spektren des Systems ALM in DMPC.....	100
Abbildung 57: Vergleichende Illustration von CD-Spektren des HZ mit Spektren aus der Literatur.....	107
Abbildung 58: Vergleich der Ramachandran-Plots von ausgewählten helikalen Strukturen mit den experimentellen Ergebnissen für HZ.....	108
Abbildung 59: Darstellung des Vergleichs zwischen Peptidlänge des HZ und der Dicke einiger Lipidmembranen.....	111
Abbildung 60: Orientierung des ALM in der DMPC-Lipidmembran.....	114
Abbildung 61: ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga in DPhPC bei einem P/L von 1:10.....	135
Abbildung 62: ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga in DMPC bei einem P/L von 1:10.....	135
Abbildung 63: OCD-Spektren von HZ in DDPC und DErPC.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte AMP mit jeweiliger Aminosäuresequenz, Herkunft und Sekundärstruktur.	9
Tabelle 2: Ausgewählte Peptaibole mit zugehöriger Sequenz und Herkunft.....	12
Tabelle 3: Einige ausgewählte natürliche ALM F30- und ALM F50-Analoga ^[68]	15
Tabelle 4: Einige ausgewählte natürliche Harzianin-Peptaibole mit Sequenz und Herkunftsstamm.	17
Tabelle 5: Magnetische Eigenschaften einiger NMR-aktiver Atomkerne.	21
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten CF ₃ -Bpg-markierten PGLa-Analoga.....	30
Tabelle 7: Synthetisch hergestellte ¹⁹ F- und ¹⁵ N-markierte HZ-Analoga.	32
Tabelle 8: Synthetisch hergestellte ¹⁹ F-markierte ALM-Analoga.	33
Tabelle 9: Ausbeuten der synthetisierten PGLa-, HZ- und ALM-Analoga.	49
Tabelle 10: Experimentell erhaltene dipolare Kopplungen der PGLa CF ₃ -Bpg – Peptide in DPhPC-Lipidmembranen.	57
Tabelle 11: Bestimmung der Strukturanteile des repräsentativen PGLa mittels CONTIN-LL-Algorithmus.....	60
Tabelle 12: Ergebnisse der MIC-Bestimmung von HZ-Peptiden gegen bakterielle Erreger...	62
Tabelle 13: Bestimmung der MIC gegen ausgewählte Fungi-Stämme.....	64
Tabelle 14: Ergebnisse der Agarplattendiffusionstests des nativen HZ anhand der Messung der Hemmzonen.	66
Tabelle 15: Hämolytische Konzentrationen von HZ und HZ 4-CF ₃ -Bpg.....	67
Tabelle 16: Berechnung der Sekundärstrukturanteile des SRCD-Spektrums des HZ in 50 % TFE.	71
Tabelle 17: ¹ H- und ¹³ C – NMR chemische Verschiebungen von HZ.....	75
Tabelle 18: Wasserstoffbrücken-Bindungen in HZ anhand der experimentellen Flüssigkeits-NMR-Daten in TFE.....	76
Tabelle 19: Kenngrößen der idealen helikalen Strukturen α -Helix, 3_{10} -Helix und β - <i>bend ribbon spiral</i>	83
Tabelle 20: Torsionswinkel Φ und Ψ im Peptidrückgrat für eine ideale α -Helix und 3_{10} -Helix sowie für die β -Homologie-Struktur.	84
Tabelle 21: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DPhPC-Lipidmembranen.....	86
Tabelle 22: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DMPC-Lipidmembranen.	91
Tabelle 23: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DMPC/LysoMPC-Lipidmembranen.	97
Tabelle 24: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DDPC-Lipidmembranen.	98
Tabelle 25: Dipolare Kopplungen der CF ₃ -Ala-markierten ALM-Analoga in DMPC-Lipidmembranen.	101
Tabelle 26: Struktur- und Orientierungsparameter des ALM in DMPC-Lipidmembranen anhand der ¹⁹ F-Festkörper-NMR-Analyse.	102
Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung des HZ anhand der verwendeten Methode.....	110
Tabelle 28: Literatur-Tabelle über die Verwendung von Lipidsystemen aus Diphytanoyl-Lipid-Mischungen als Modellmembranen seit 1990.....	135

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Lipide bzw. Fette erfüllen wichtige Aufgaben in Zellen, zu denen bspw. die Speicherung von Energie in Form von Fettreserven gehört. Sie sind zudem essentielle Bestandteile der Zellmembranen. Ihre Struktur besteht aus hydrophilen und hydrophoben Teilen. Aufgrund dieser Amphiphilie sind sie in der Lage große Molekülverbände zu bilden ^[1]. So formieren sie sich in wässrigen Medien mit ihren hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase hin und aggregieren mit ihren hydrophoben Ketten aufgrund des hydrophoben Effekts zusammen. Auf diese Weise ordnen sie sich zu unterschiedlichen Strukturen, zu denen bspw. Micellen und Doppelschichten gehören. Die Membranen der Zellen bestehen aus etwa 4 nm dicken Lipiddoppelschichten. Diese Biomembranen stellen Barrieren dar, mit denen sich die Zelle von der Außenwelt abgrenzt, sich einen Schutz verschafft und sich im Inneren durch Kompartimentierung Arbeitsbereiche schaffen kann. In Verbindung mit Membranproteinen erfüllen die semipermeablen Zellmembranen entscheidende Funktionen. Die in die Membran integrierten oder angelagerten Proteine regulieren in Form von Kanälen, Pumpen, Transportern und Rezeptoren das Membranpotential, den Energiehaushalt, den passiven und aktiven Stofftransport, die Signalweiterleitung und viele andere essentielle Prozesse der Zelle. Neben Lipiden und Proteinen bestehen die Plasmamembranen von eukaryotischen Zellen zusätzlich aus einer Schicht aus Kohlenhydraten, die sich auf der extrazellulären Seite befinden. Sie wird als Glykokalyx bezeichnet und bietet der Zelle zusätzlichen Schutz und gibt ihr eine bestimmte Oberfläche, die für Interaktionen mit der Außenwelt von Bedeutung ist. In Pflanzen, Prokaryoten und Fungi wird diese Rolle von der Zellwand übernommen.

Reine Lipide bilden in wässriger Umgebung unterschiedliche Phasen, die spezifische Strukturen und Anordnungen in zwei oder drei Dimensionen haben können ^[2]. Diese haben dynamischen fluiden Charakter, was auch an Biomembranen zu beobachten ist, die speziell durch das „Flüssig-Mosaik“-Modell (*fluid mosaic*) nach Singer und Nicolson beschrieben werden (Abb. 1). Die Lipidmoleküle können demnach in der fluiden Membran nicht nur lateral und durch Rotation, sondern durch einen Flip-Flop-Mechanismus auch transversal diffundieren. Membranproteine sind in dieser Lipidmembran ebenfalls sehr mobil und durch Rotationsdiffusion wie in einer zweidimensionalen Lösung frei beweglich ^[3]. Die Fluidität der

Lipidmembran ist abhängig von der Temperatur, dem Gehalt der Membran an Sterolen wie Cholesterol (Tiere), Stigmasterol (Pflanzen) und Ergosterol (Fungi) oder an Hopanoiden (Bakterien) sowie der Länge und dem Grad der Sättigung der Lipid-Acyllketten. Diese Faktoren bestimmen die Phasenübergangstemperatur der Lipidmembran T_m , welche den Übergang des betreffenden Lipids von der sogenannten Gel-Phase (*gel phase*, L_β) in die biologisch mehr relevante fluide Phase (*liquid crystalline phase* oder *fluid phase*, L_α) beschreibt.

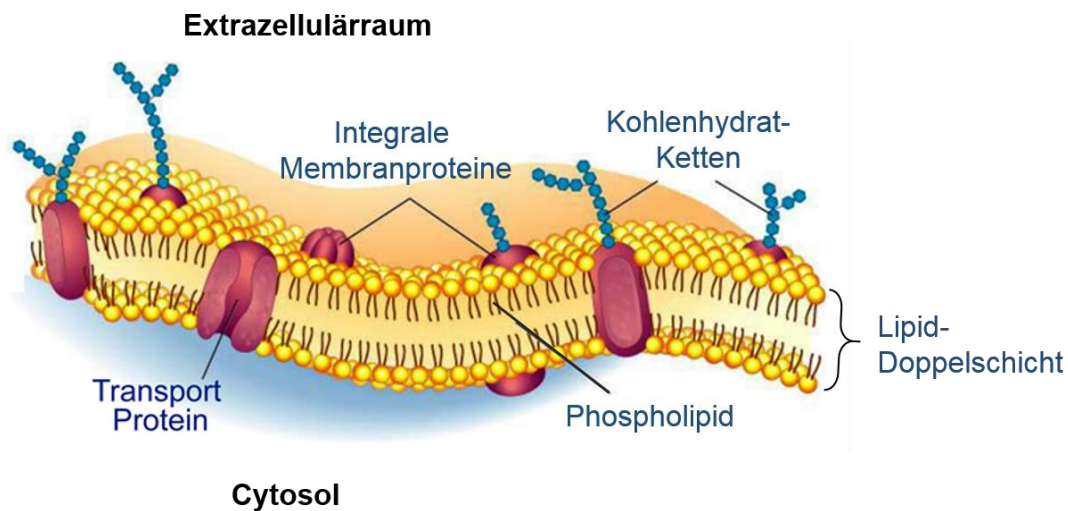


Abbildung 1: „Flüssig-Mosaik“-Modell der Zell-Plasmamembran von Singer und Nicolson.
(verändert übernommen aus <http://plaqxforte.lab-rms.com/>).

1.1.1 Lipidform und spontane Lipidmembrankrümmung

Biomembranen bestehen hauptsächlich aus veresterten Phospholipiden, die unterschiedliche Phosphat-Kopfgruppen tragen. Zu typischen Lipid-Kopfgruppen zählen die zwitterionischen Phosphatidyl-choline (PC) und -ethanolamine (PE) sowie die anionischen Phosphatidyl-glycerole (PG) und -serine (PS) (Abb. 2). Je nach Organismus bzw. Zelltyp treten an den Außenseiten der Zellmembranen charakteristische Kombinationen aus unterschiedlichen Kopfgruppen auf. Die hydrophoben Acylketten der Lipide unterscheiden sich dagegen anhand der Länge und der Sättigung der Kohlenwasserstoffketten. Ein bestimmtes Lipidmolekül kann dabei zwei gleiche oder auch gemischte Ketten besitzen.

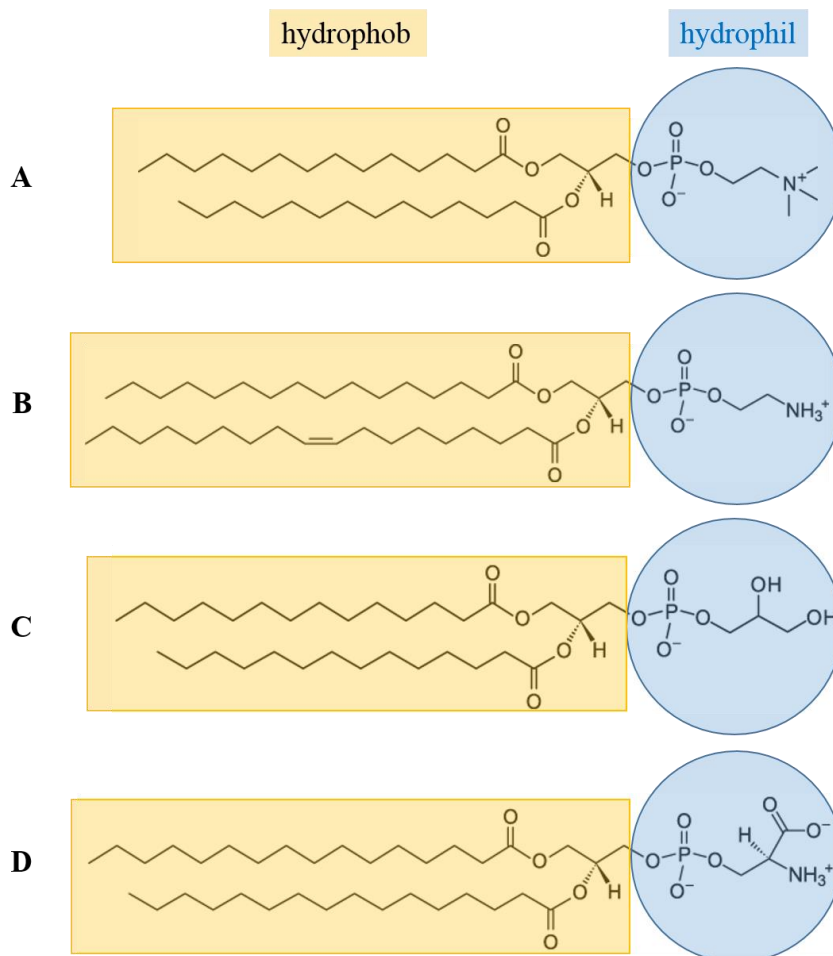


Abbildung 2: Chemische Strukturen und Amphipathizität ausgewählter Lipidmoleküle. DMPC (A), POPE (B), DMPG (C), DPPS (D).

Die durch Kombination von verschiedenen Kopfgruppen und Acylketten hervortretenden unterschiedlichen Lipidformen beeinflussen die Lipidmembranen in ihren Krümmungspräferenzen ^[4,5]. Dieser strukturelle Effekt wird unter der Bezeichnung spontane bzw. intrinsische Krümmung der Lipidmembran aufgeführt. Bei der Beziehung zwischen Lipidform und spontaner Membrankrümmung ist das entscheidende Kriterium das relative Volumenverhältnis der Kopfgruppe des Lipids zu seiner Acylkettenregion. Ist das Verhältnis ungefähr ausgeglichen, ist die Form des Lipids einem Zylinder ähnlich. Bei ungleichem Verhältnis dagegen spricht man von einer Kegel- bzw. Keilform. Bei Lipiden mit sterisch sperrigen Kettenregionen (z.B. ungesättigte Lipid-Acylketten) und/oder mit kleinen Kopfgruppen wie PE wird eine negative spontane Membrankrümmung induziert und im umgekehrten Fall (räumlich unsperrige Kettenregionen, z.B. Lyso-Lipide mit nur einer Acylkette) eine positive Krümmung (Abb. 3).

Die Krümmung der Membran kann außerdem durch Peptide/Proteine beeinflusst werden ^[6]. Genauso wie Proteine die Membrankrümmung modulieren, kann die spontane Membrankrümmung Peptide in ihrer Orientierung in der Membran bzw. den Grad ihrer Membranpenetration beeinflussen ^[5].

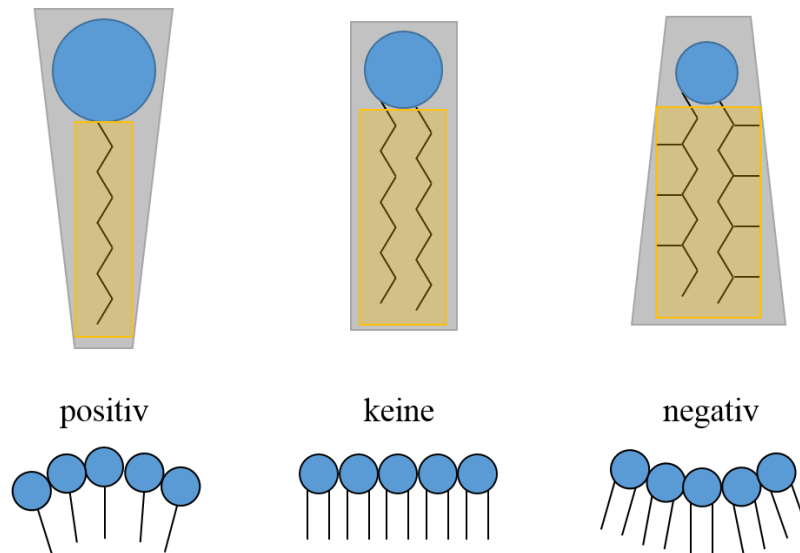


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Korrelation zwischen Lipidform und der spontanen Lipidmembrankrümmung.

Obere Reihe: typische Kegel- bzw. Zylinderform der Lipide; untere Reihe: entsprechende spontane Lipidmembran-Krümmung als positiv, negativ oder nicht gekrümmte Lipidmembran.

1.1.2 Lipidpolymorphie

Die Form der Lipide kann neben anderen Faktoren auch dazu führen, dass sie in wässrigen Systemen Anordnungen ausbilden, die von der Lipiddoppelschicht abweichen, welche auch als lamellare Lipidphase bezeichnet wird. Bei Auftreten solcher unterschiedlicher strukturellen Anordnungen spricht man von polymorphischem, nicht-lamellarem Phasenverhalten. Beispiele für nicht-lamellare Lipidphasen sind hexagonale und kubische Anordnungen ^[7,8] (Abb. 4). Dabei werden kubische Phasen in der Forschung speziell für die Kristallisation von Membranproteinen eingesetzt ^[8]. Sie besitzen zwar durch ihre periodischen Strukturmuster eine Fernordnung, weisen jedoch wie flüssige Kristalle in atomaren Größenordnungen keine Nahordnung auf ^[9]. Hexagonale Phasen sind gekennzeichnet durch die Assemblierung der Lipide in röhrenförmigen normalen oder invertierten Micellen, die sich dann zu Hexagons arrangieren. Das Auftreten der nicht-lamellaren Phasen hängt neben der Lipidform von äußeren Bedingungen wie Temperatur, Hydratation und dem Umgebungsmedium ab, und wird auch von

Peptiden beeinflusst, welche bspw. den Phasenübergang zwischen der lamellaren und der invertiert hexagonale Phase ($L_\alpha \rightarrow H_{II}$) modifizieren ^[10].

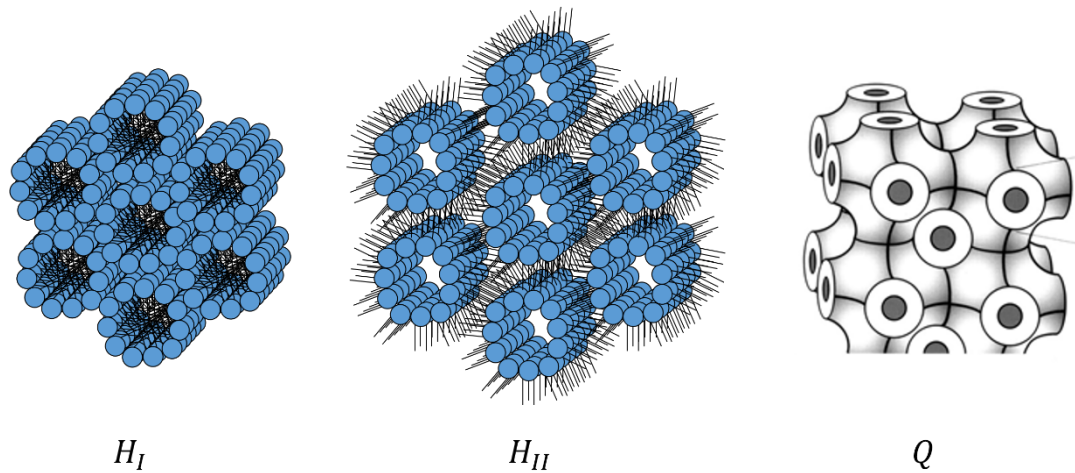


Abbildung 4: Räumliche Darstellung von nicht-lamellaren Lipidphasen.

H_I : Normale hexagonale Lipidphase; H_{II} : invertierte hexagonale Lipidphase; Q : kubische Lipidphase.

1.1.3 Diphytanoyl-Lipide

Archaeen sind für ihre außerordentliche Toleranz gegen extreme Bedingungen bekannt; sie können bei enormer Hitze oder Kälte, sehr saurem, alkalischem oder salzhaltigem Milieu problemlos überleben. Dieses außergewöhnlich extremophile Verhalten lässt sich anhand ihrer eigenartigen strukturellen Merkmale wiedererkennen. Ein Aspekt ist hierbei in der Zusammensetzung ihrer Zellmembranen zu finden. Kennzeichnend sind das Vorkommen von Ether-Lipiden statt veresterten Lipiden, wie sie in den Zellmembranen von Bakterien und Eukaryoten zu finden sind ^[11] und das Auftreten von Lipidmonoschichten, d.h. Acylketten, welche die gesamte Lipidmembran durchspannen ^[12] (Abb. 5). Eine weitere Besonderheit zeigt sich in der verzweigten Struktur ihrer Acylketten, denn hier kommen vermehrt Phytanoyl-Gruppen (3,7,11,15-tetramethylhexadecan, 16:4me) vor ^[13].

Phytanoyle werden aus Isopren-Einheiten gebildet, welches vielen Naturstoffen als Struktur-Grundgerüst dient ^[14]. Lipidmembranen aus Phytanoyl-Lipiden weisen eine hohe mechanische und chemische Stabilität ^[15] und eine niedrige Ionen- und Wasserdurchlässigkeit auf ^[15,16]. Auf diesen vorzüglichen Eigenschaften beruht die Verwendung der Diphytanoyl-Lipide als stabile Modellmembranen in der Forschung. Sie werden bevorzugt in elektrophysiologischen Untersuchungen von Membranproteinen ^[17,18,19,20] sowie allgemeinen Protein-Lipid-

Wechselwirkungsstudien ^[21,22,23] verwendet. Besonders DPhPC (1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) (Abb. 5B) wird in der Literatur oft angetroffen, da es in früheren Untersuchungen im Temperaturbereich von -120 bis 120 °C in der mobileren fluiden Lipidphase (*liquid crystalline phase*) vorgefunden wurde ^[24] und bei Raumtemperatur stabile Lipiddoppelschichten ausbildet ^[25]. Trotz der häufigen Verwendung der Diphytanoyl-Lipide sind nur wenige Informationen über ihre strukturellen Eigenschaften bekannt und auf welche Art diese von membranaktiven Peptiden bzw. Proteinen beeinflusst werden.

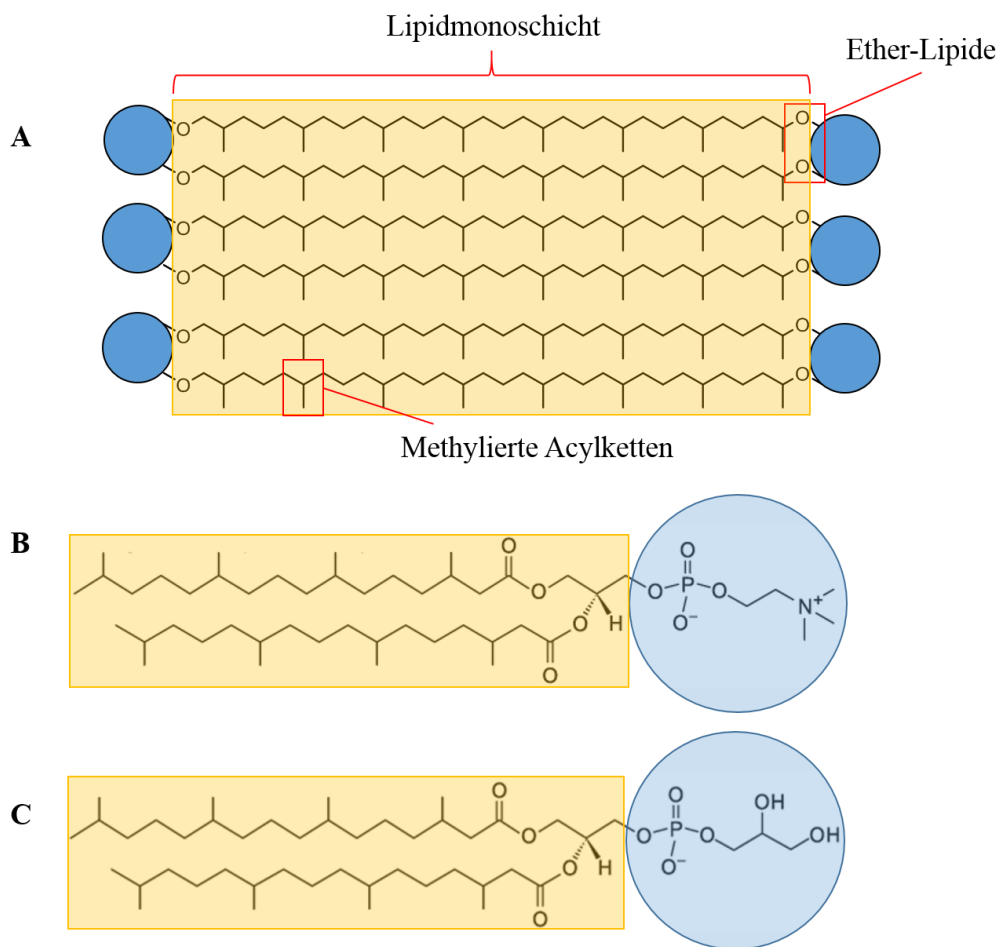


Abbildung 5: Charakteristische Merkmale von Membranlipiden von Archaeen.

Illustration der typischen Bildung der Lipidmonoschicht, der Präsenz von Ether-Lipiden und der Methylierung der Lipid-Acylketten (A), Chemische Strukturen von DPhPC (B) und DPhPG (C).

Mithilfe von Röntgenbeugungsexperimenten wurden in DPhPC zwei unterschiedliche Phasen innerhalb der Lipiddoppelschicht entdeckt ^[26]. ³¹P- und ²H-NMR-Messungen der Lipide deuten auf eine hydrationsabhängige strukturelle Neuorientierung der Phosphat-Kopfgruppe der Lipide bei der Bildung der zweiten lamellaren Lipidphase hin ^[27]. Weiterhin wurden nicht-

lamellare Lipidphasen nachgewiesen, die ebenfalls abhängig von Temperatur und Hydrationszustand auftreten (Abb. 6). Die infolge der beobachteten DPhPC-Lipidpolymorphie auftretenden nicht-lamellaren Phasen wurden als invertierte hexagonale Phase H_{II} und kubische Lipidphasen Q designiert. Die zwei lamellaren Lipidphasen wurden dagegen mit L_{α} und L_{α}' gekennzeichnet. Die Erhöhung der Temperatur und die miteingehende Dehydratation bedeuten einen graduellen Phasenübergang von lamellaren zu nicht-lamellaren Phasen hin.

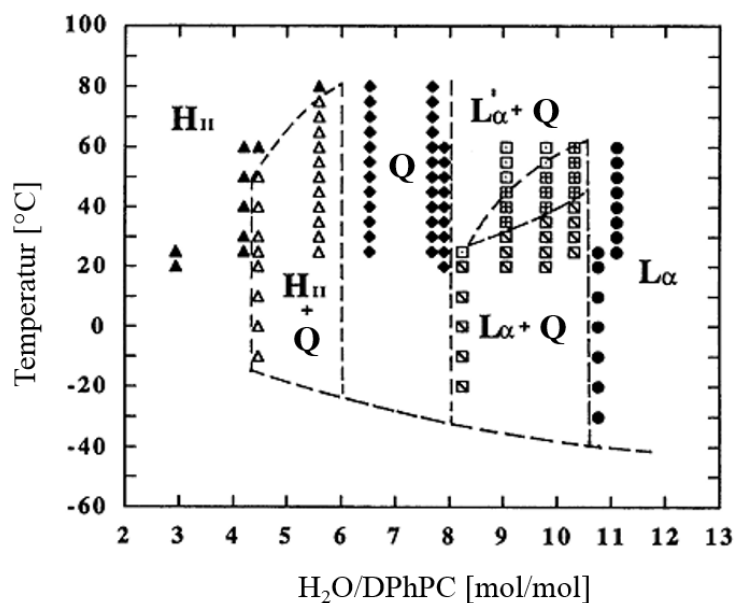


Abbildung 6: Phasendiagramm des Lipids DPhPC.

Das Diagramm wurde aus ^{31}P - und ^2H -NMR-Daten konstruiert (verändert übernommen aus [27]). Gefüllte Symbole: Bildung einer einzigen Phase; nicht-gefüllte Symbole: gemischte Phasen; Details über Symbole sind im Diagramm erkenntlich gemacht.

1.2 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Lebewesen besitzen ausgeklügelte Mechanismen und Strategien sich optimal gegen pathogene Einflüsse zu wehren. Antimikrobielle Peptide (AMP), auch *host defense* oder *self-defense peptides* genannt, sind ein evolutionär frühes und äußerst bemerkenswertes Zeugnis für ein solches Abwehrsystem [28–30]. Sie werden in Masse von allen Arten von Organismen produziert, in Bakterien in Form von Bakteriocinen und in multizellulären Organismen als Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie können gefährliche bakterielle, fungale und virale Erreger statisch durch Hemmung des Wachstums ihrer Kulturen oder lytisch durch Abtötung bekämpfen [28,30,31].

AMP sind seit einigen Jahren im Gespräch als vielversprechende praktische Alternativstoffe anstelle von herkömmlichen Antibiotika ^[32], deren antimikrobielle Wirkung infolge der Adaptation einiger gefährlicher Erreger, wie z.B. den *Methicillin-resistenten* Stämme des *Staphylococcus aureus* ^[33], abnimmt oder bereits verschwunden ist. Die Ausbildung dieser bakteriellen Resistenz gegen einst wirksame antibiotische Substanzen stellt aktuell eine ernstzunehmende gesundheitliche Bedrohung mit einer stets ansteigenden Zahl von gefährlichen Infektionen dar ^[34]. AMP sollen nicht nur bei dieser Problematik als eine neue antibiotisch wirkende Stoffklasse aushelfen, sondern zeigen auch Potential als Mittel zur Bekämpfung von malignen Krebszellen ^[35]. Es handelt sich bei ihnen größtenteils um kationische Peptide mit etwa 12 bis 50 Aminosäureresten. Ihre Strukturen besitzen amphipathische Natur mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Sie können zyklisch oder linear sein und bilden gängige Protein-Sekundärstrukturen wie α -Helices und β -Faltblätter aus. Die meisten AMP nehmen ihre Sekundärstruktur erst durch die Bindung an die hydrophobe Lipidmembran an, während sie in membranungebundener Form, bspw. in wässriger Lösung, oftmals keine Struktur aufweisen. Mechanistisch bezieht sich ihre Wirkung auf die Zerstörung der Lipiddoppelschicht-Anordnung. Die dadurch verursachte Permeabilisierung der Zellmembranen führt schließlich zum Tod der pathogenen Zielorganismen ^[28,31,36]. Die Affinität dieser membranolytischen Peptide beruht auf attraktiver elektrostatischer Wechselwirkung mit der netto negativ geladenen bakteriellen Zellmembran, welche anionische PG-Lipide beinhaltet, sowie auf hydrophoben Wechselwirkungen der unpolaren Reste des Peptids mit dem hydrophoben Membrankern. Auch Krebszellen exponieren vermehrt das anionische PS an der extrazellulären Seite der Plasmamembran, was die antikanzerogene Wirkung einiger kationischer AMP erklärt. Eukaryotische Organismen besitzen im Gegensatz zu Prokaryoten bevorzugt Membranen aus zwitterionischen Lipiden mit vorwiegend PC- und PE-Kopfgruppen. Sie wechselwirken daher schwach bis kaum mit AMP ^[37]. Folglich ist der antibiotische Effekt der AMP selektiv auf bakterielle Erreger eingeschränkt. Die Entwicklung einer bakteriellen Resistenz wird durch die schnelle und unspezifische Zerstörung der Zellmembranen, worauf die Zelle auf molekularer Ebene kaum eine gezielte Antwort geben kann, beträchtlich erschwert.

Das Peptid PGLa aus dem Afrikanischen Krallenfrosch dient als ein passendes Beispiel für ein AMP, da es alle klassischen Merkmale aufweist: es ist ein kationisches, amphipathisches, α -helikales Peptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren ^[38,39] (Tab. 1). Das Verhalten des PGLa in orientierten Lipidmembranen wurde in der Gruppe Ulrich durch Festkörper-NMR ausführlich untersucht ^[40,41].

Bezeichnung	Primärsequenz	Herkunft	Struktur
Gramicidin S ^[42]	cyclo-(VOLfP) ₂	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	β-Faltblatt
Indolicidin ^[43]	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	<i>Bos taurus</i>	Polyprolin- Helix II
Alamethicin F30/3 ^[44]	Ac-UPUAUAQUVUGLUP VUUEQF-ol	<i>Trichoderma viride</i>	(überwiegende) α-Helix
Magainin 2 ^[45]	GIGKFLHSAKKFGKAF VGEIMNS	<i>Xenopus laevis</i>	α-Helix
Melittin ^[46]	GIGAVLKVLTTGLPALISW IKRKRQQ-NH ₂	<i>Apis mellifera</i>	α-Helix
PGLa ^[47]	GMASKAGAIAGKIAKVAL KAL-NH ₂	<i>Xenopus laevis</i>	α-Helix

Tabelle 1: Ausgewählte AMP mit jeweiliger Aminosäuresequenz, Herkunft und Sekundärstruktur.
O: Ornithin, f: (R)-Phenylalanin, U: Aib, Ac-: Acetyl; F-ol: Phenylalaninol

In der Theorie werden die Mechanismen der AMP gemäß dem SMH-Modell (benannt nach und formuliert von Shai, Matsuzaki und Huang) erklärt, wobei drei grundlegende Mechanismen der Membranaktivität in Frage kommen ^[37,48], die in Abb. 7 illustriert werden.

Nach dem Teppich-Mechanismus (*carpet*), welches für Indolicidin vorgeschlagen wird, bedecken die Peptide die Membranoberfläche wie ein Teppich und penetrieren nicht in den Membrankern. Ab einer bestimmten Schwellenkonzentration wird die Ordnung der Lipidmembran nachhaltig zerstört, wodurch die Membranlyse eintritt. Der Fassdauben-Mechanismus (*barrel-stave*) schlägt im Gegensatz dazu die Bildung von Poren vor. Die Peptide tauchen dabei in die Membran ein und durchspannen sie. Die Poren bestehen aus mehreren amphiphilen Peptiden, die sich zu Oligomeren zusammenschließen. Dabei interagieren sie über ihre hydrophoben Bereiche mit dem Kern der Membran, während ihre hydrophilen Oberflächen der gebildeten Pore zugewandt sind. Der Zusammenbruch der zellulären Homöostase führt zum Zelltod ^[37]. Alamethicin gilt als das bekannteste AMP, das nach dem *barrel-stave*-Modell Membranporen ausbildet. Die Bildung von Wurmlöchern, *toroidal wormholes* bzw. *toroidal pores*, wurde als Mechanismus für Magainin 2 und ihm verwandte Peptide vorgeschlagen ^[49].

Demnach induzieren die Peptide, die zunächst nur auf der Membranoberfläche lagern, durch Druck eine positive Krümmung der Lipidmembran und führen zur Bildung von Poren durch allmähliche Insertion. Im Unterschied zum *barrel-stave*-Modell werden diese „Löcher“ von Peptiden und gekrümmten Lipiden gemeinsam gebildet ^[48]. Dabei ist die Größe der *toroidal pores* schwer zu bestimmen, weil keine diskreten, aus Peptid-Multimeren gebildeten Poren gebildet werden.

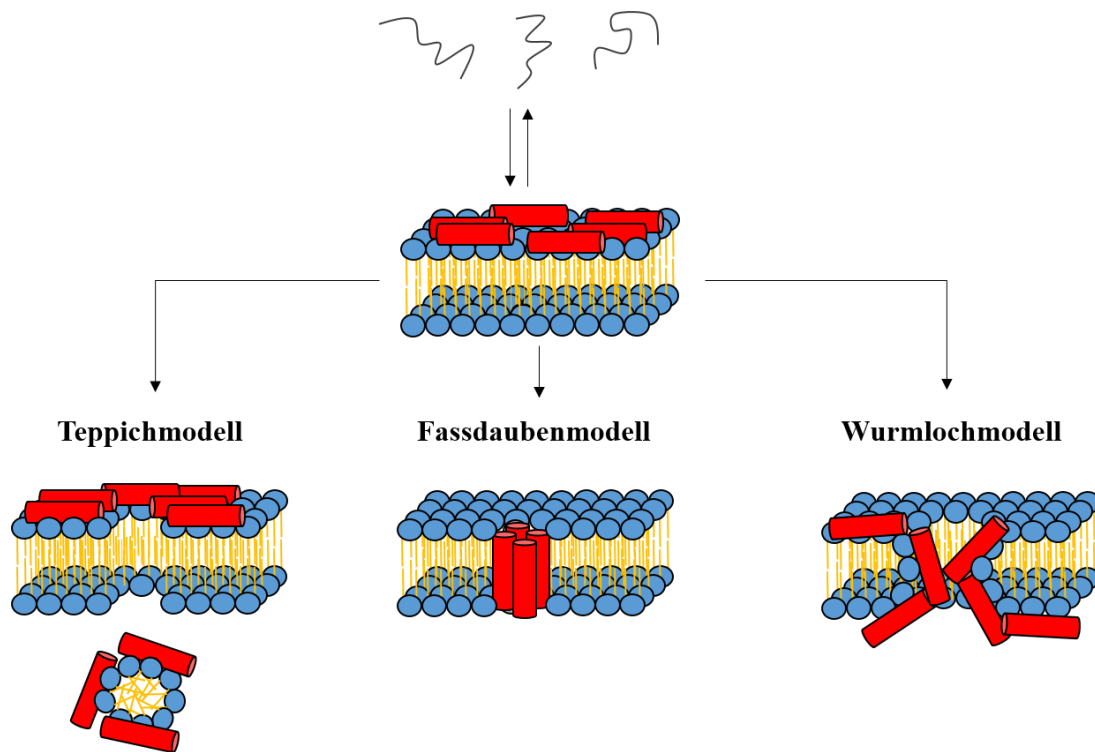


Abbildung 7: Mechanismen der Wechselwirkung von AMP mit Lipidmembranen gemäß dem SMH-Modell.
(Quelle: ^[37])

1.3 Peptaibiotics

Peptaibiotics gehören als antibiotisch wirkende natürliche Peptide ebenfalls zu der Gruppe der AMP. Sie werden wegen einiger ihrer spezifischen Eigenschaften, die in diesem Kapitel beschrieben werden, als eine eigene Gruppe aus membranaktiven Peptiden zusammengefasst.

Peptaibiotics werden ausschließlich von filamentösen Fungi, hauptsächlich von der Schimmelpilz-Gattung *Trichoderma*, als nichtribosomal synthetisierte sekundäre Metabolite produziert und zeigen antibakterielle, antifungale und antivirale Eigenschaften ^[50,51,52].

Charakteristisch ist das reichliche Vorkommen von nicht-proteinogenen, α,α -dialkylierten Aminosäuren in ihren Sequenzen, wie z.B. Iva (Isovalin, Einbuchstabencode: J) und Aib (α -Aminoisobuttersäure oder α -Methylalanin, Einbuchstabencode: U) (Abb. 8). Insbesondere Aib-Reste sind für die strukturellen Merkmale der Peptaibiotics von großer Bedeutung, was durch die Einfügung („-aib-“) in ihrem Namen verdeutlicht wird. Zu den weiteren Besonderheiten von Aib gehören seine außergewöhnlich hohe Stabilität gegen Proteasen ^[53] und seine starken attraktiven Wechselwirkungen mit Lipidmembranen ^[54].

Die terminalen Strukturen der Peptaibole unterscheiden sich von klassischen Peptiden durch N-terminale Acetylierung oder Acylierung und dem typischen Aminoalkohol am C-Terminus. Da die C-terminale Alkoholgruppe innerhalb der Gruppe der Peptaibiotics sehr häufig auftritt, benutzte man in der Literatur zunächst häufig die Bezeichnung Peptaibole. Später wurde der Name auf Peptaibiotics für Aib-Peptide mit antibiotischer Wirkung ausgeweitet. Peptaibole sind nicht immer geladen wie klassische AMP. Sie besitzen oft amphipathische Strukturen und enthalten etwa 5 bis 20 Aminosäurereste ^[55,56].

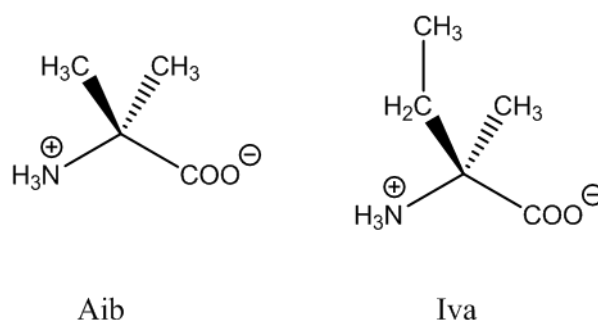


Abbildung 8: Strukturen ausgewählter, α,α -dialkylierter Aminosäuren aus Peptaibolen.
Aib und Iva in der (S)-Konfiguration

Seitdem die erste Veröffentlichung über ein Aib-enthaltendes Peptidantibiotikum im Jahre 1958 herausgebracht wurde (*ICI 13959* aus dem Schimmelpilz *Paecilomyces* ^[57]), wurden verschiedene weitere Vertreter aus Pilzen isoliert und charakterisiert ^[44,58,59,60]. Stoppacher et al. veröffentlichten kürzlich eine Online-Datenbank, in der mittlerweile über 1300 Peptaibiotics mit ihren Sequenzen, ihrer Herkunft und zugehörigen Referenzen registriert sind ^[61]. Einige ausgewählte Beispiele sind in Tab. 2 aufgelistet.

Da Peptaibole von den fungalen Zellen ausschließlich in heterogenen Mischungen in Form von mehreren Verbindungen synthetisiert werden, sind nachfolgend zur Unterscheidung jeweils die

spezifischen Bezeichnungen bzw. Abkürzungen des betreffenden Peptids, wie z.B. Alamethicin F30/3 (s. Tab. 2), mitangegeben.

Bezeichnung	Primärsequenz	Herkunft
Alamethicin F30/3 [62]	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U- U-E-Q-F-ol	<i>Trichoderma viride</i>
Suzukacillin-A 4 [63]	Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L/I-U-G-U-U-P-V/J- U-V/J-Q-Q-F-ol	<i>Trichoderma viride</i>
Trichogin A IV [64]	Oc-U-G-L-U-G-G-L-U-G-I-L-ol	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Trichorozin I [60]	Ac-U-N-I-L-U-P-I-L-U-P-V-ol	<i>Trichoderma harzianum</i>
Zervamicin ZIC [59]	Ac-W-I-E-J-I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-F-ol	<i>Emericellopsis salmosynnemata</i>

Tabelle 2: Ausgewählte Peptaibole mit zugehöriger Sequenz und Herkunft.

J: Isovalin; U: Aminoisobuttersäure; O: Hydroxyprolin; L/I: Leu oder Ile; V/J: Val oder Iva; Ac-: Acetyl; Oc-: Octanoyl; F-ol: Phenylalanin-ol; V-ol: Valin-ol.

Die α,α -dialkylierte Aminosäure Aib hat eingeschränkte Rotationsmöglichkeiten und kann daher nur bestimmte Torsionswinkel φ und ψ im Peptidrückgrat einnehmen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass hydrophobe Aib-Reste in Peptiden aus diesem Grund α - und 3_{10} -Helices sowie gemischte $\alpha/3_{10}$ -Strukturen induzieren [65,66,67]. Daher besitzen Peptaibole helikale Strukturen mit überwiegend α - und 3_{10} -Helix-Anteilen und β -Schleifen-basierte Helices wie dem β -bend ribbon spiral [68–71].

Klassifiziert werden Peptaibole grob anhand ihrer Größe in *long-chain* (17-20 Reste), *medium-chain* (11-16 Reste) und *short-chain* (5-10 Reste) Peptide. Über sehr kleine Peptaibiotics-Analoga mit weniger als 5 Resten wurde ebenso in der Literatur berichtet [50,72], wobei ihr Mechanismus und ihre Aktivität umstritten sind. Chugh, Wallace et al. versuchten eine Unterteilung anhand von Länge und Ähnlichkeit der Sequenzen in neun Untergruppen (*SF*, *sub families*), die von *SF1* bis *SF9* durchnummeriert werden [73]. Eine weitere besondere Gruppe stellen Lipopeptaibole dar. Sie haben oft kürzere Sequenzen, besitzen aber N-Termini, welche von einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette mit einer Länge von 8 bis 15 Kohlenstoffatomen

acyliert sind ^[74] (s. Tab. 2, Trichogin A IV). Im Hinblick auf ihre antimikrobielle Aktivität scheint der lipophile Schwanz am N-Terminus essentiell zu sein ^[72,75,76]. Stoppacher et al. veröffentlichten im Rahmen der Aufstellung ihrer Datenbank eine Gruppierung der Peptide in 5 verschiedene Klassen: (1) Peptaibole; (2) Lipopeptaibole; (3) Lipoaminopeptide, welche an ihrem N-Terminus C₄-C₁₅ Acylreste haben und an Position 3 der Sequenz häufig eine Lipoamino-säure besitzen; (4) zyklische Peptaibiotics; (5) alle restlichen Peptaibiotics, die nicht in die anderen Kategorien passen ^[77].

Es wird angenommen, dass der antimikrobielle Mechanismus der Peptaibole durch die Bildung von spannungsabhängigen Poren bzw. Ionenkanälen in Lipidmembranen nach dem *barrel-stave*-Mechanismus abläuft ^[73]. Sie sind somit in der Lage abhängig von Peptidkonzentration in den hydrophoben Membrankern zu penetrieren und sich dort zu Oligomeren zu assemblieren. Als Vorzeigemodell für Peptide mit *barrel-stave*-Wechselwirkung gilt das Peptaibol Alamethicin (s. dazu Kap. 1.3.1).

Abgesehen von ihrer Membranaktivität können Peptaibole auch anderweitige zellbiologische Wirkungen innerhalb der Zelle haben: die Stimulierung intrazellulärer cAMP-Bildung in Zellen, die den Calcitonin-Rezeptor exprimieren, die Freisetzung von Katecholaminen sowie die Abkoppelung der oxidativen Phosphorylierung sind einige Beispiele ^[56,78]. Hämolytische Aktivitäten einiger Peptaibole, darunter von Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin, sind bekannt ^[79,80]. Diese und weitere zelltoxische Nebenwirkungen stehen womöglich in Korrelation mit den von einigen *Trichoderma*-Spezies hervorgerufenen Infektionen beim Menschen ^[81].

Auch die weit verbreitete antifungale Wirkung von Peptaibiotics kann in Verbindung mit ihrem Herkunftsorganismus *Trichoderma* erklärt werden. *Trichoderma* sind biologisch aktive, saprophytische Organismen, die im Erdreich weit verbreitet sind. Sie besitzen spezifische antagonistische Eigenschaften in Bezug auf einige andere Fungi-Spezies, die als Pflanzenpathogene gelten. Die Entdeckung geht auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurück und ist später mehrfach in der Literatur charakterisiert worden ^[82,83,84]. Im Handel finden Pilze der *Trichoderma*-Gattung heute als Agenzien zur biologischen Schädlingsbekämpfung (*BCA*, *biological control agents*) Anwendung. Sie werden als Pflanzenschutzmittel in der Landwirtschaft/Agrarindustrie erfolgreich eingesetzt. In vielen Fällen wurde der beschriebene Konkurrenzkampf der *Trichoderma* bzw. ihre antifungalen Eigenschaften auch auf ihre synthetisierten Peptaibole zurückgeführt ^[85]. Peptaibole sind in der Lage pflanzenpathogene

Pilze wie *Aspergillus niger*, *Pestalotia rhododendri*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Botrytis cinerea* zu inhibieren.

Die Erforschung der Peptaibiotics steht noch in den Startlöchern, denn derzeit sind über 90 % des weltweiten Vorrats an Fungi-Spezies unbekannt ^[86]. Deshalb kann in Zukunft mit einer Fülle von neuen Verbindungen aus Pilzen gerechnet werden, die als Alternativ-Antibiotika sowohl antibakteriell als auch antifungal gegen Phyto- oder Humanpathogene Wirkung zeigen.

1.3.1 Alamethicine

Alamethicine bilden ohne Zweifel die prominentesten und am ausführlichsten untersuchten Vertreter unter den Peptaibolen. Bei der erstmaligen Entdeckung und Isolierung des Alamethicin im Jahre 1967 aus *Trichoderma viride* wurde es von Meyer, Reusser et al. als *antibiotic U-22324* designiert ^[44], wobei der Herkunftstamm vor kurzem als *Trichoderma arundinaceum* reklassifiziert wurde ^[87]. Alamethicin-Peptide werden von *NRPSs* (*nonribosomal peptide synthetase*) in heterogenen Mischungen synthetisiert und bestehen aus 20 Aminosäuren mit einem konservierten C-terminalen Phe-ol sowie dem Acetylrest am N-Terminus (s. Tab. 3). Alamethicin gehört als klassisches langes Peptaibol zu der *SF1*-Peptaibolgruppe, welche die meisten Peptaibole zusammenfasst ^[73]. Die biologische Aktivität ist sehr weitreichend und ausgeprägt gegen Gram-positive Bakterien und Fungi, doch sind sie weitestgehend unwirksam gegen Gram-negative Erreger und zeigen teilweise zytotoxisches Potential auf tierische Zellen ^[68,88]. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Befunden im Hinblick auf die allgemeine biologische Aktivität von Peptaibiotics ^[52].

Es gibt zwei Hauptgruppen innerhalb der Alamethicin-Familie: die anionischen ALM F30 und die neutralen ALM F50. Die entscheidende Position für die Ladungsunterschiede ist der Glu/Gln-Austausch an Position 18 des Peptids. Tab. 3 listet die Sequenzen einiger natürlicher Alamethicine auf:

Name	Sequenz
ALM F30/1	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-U-U-G-L-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F30/2	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-V-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F30/3 (ALM)	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F30/4	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-V-U-G-V-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F30/5	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-V-E-Q-F-ol
ALM F30/6	Ac-U-P-U-A-U-A-E-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F30/7	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F30/8	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-L-U-G-L-U-P-V-U-U-E-Q-F-ol
ALM F50/2	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-A-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-F-ol
ALM F50/5	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-F-ol
ALM F50/7	Ac-U-P-U-A-U-U-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-F-ol

Tabelle 3: Einige ausgewählte natürliche ALM F30- und ALM F50-Analoga ^[68].

U: Aminoisobuttersäure; Ac-: Acetyl; F-ol: Phenylalaninol

Fett unterstrichen ist die für diese Arbeit relevante, anionische ALM F30/3.

Nachdem für ALM verschiedene Strukturen vorgeschlagen wurden, sogar eine zyklische Variante ^[89], konnte die Kristallstruktur 1982 von Fox und Richards bestimmt werden ^[90]. Sie zeigt, dass ALM eine lineare Sequenz darstellt, mit der α -helikalen Konformation als dominierendes Strukturelement. In der Struktur wurde ein durch Pro¹⁴ induzierter, schwacher Knick bzw. eine Verkrümmung der Helix von etwa 20° ausgemacht. Daher ist die Struktur des ALM als *proline-kinked α -helical conformation* etabliert. Der C-Terminus von Pos. 15-20 wurde als gemischte Struktur aus α - und 3_{10} -Helix beschrieben (Abb. 9). Weitere strukturelle Untersuchungen mittels NMR bestätigten die α -Helix für die Region von Pro¹⁴ bis zum N-Terminus des ALM, wohingegen der C-terminale Teil als strukturell flexibel charakterisiert wurde ^[91]. Für dieses weniger reguläre Segment schlugen Esposito et al. eine der Kristallstruktur ähnliche α -helikale Struktur in MeOH vor ^[92], während sie unter ähnlichen Bedingungen von Banerjee et al. als β -Faltblatt charakterisiert wurde ^[93]. In membrangebundener Form wurden ebenfalls helikale Strukturen beobachtet ^[94]. Für das ALM F30/7 schlugen Salnikov et al. in POPC- und DMPC-Lipidmembranen eine gemischte $\alpha/3_{10}$ -helikale Struktur vor ^[95]. In einer früheren ALM-Studie benutzten Maisch et al. die Methode

der ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie, um die Orientierung und Struktur des Peptaibols in DMPC-Lipidmembranen zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, dass der N-terminale Teil eine α -helikale Struktur aufweist und das abgeknickte Peptid sich mit einer Ausrichtung von 8° zur Membrannormalen transmembran orientiert.

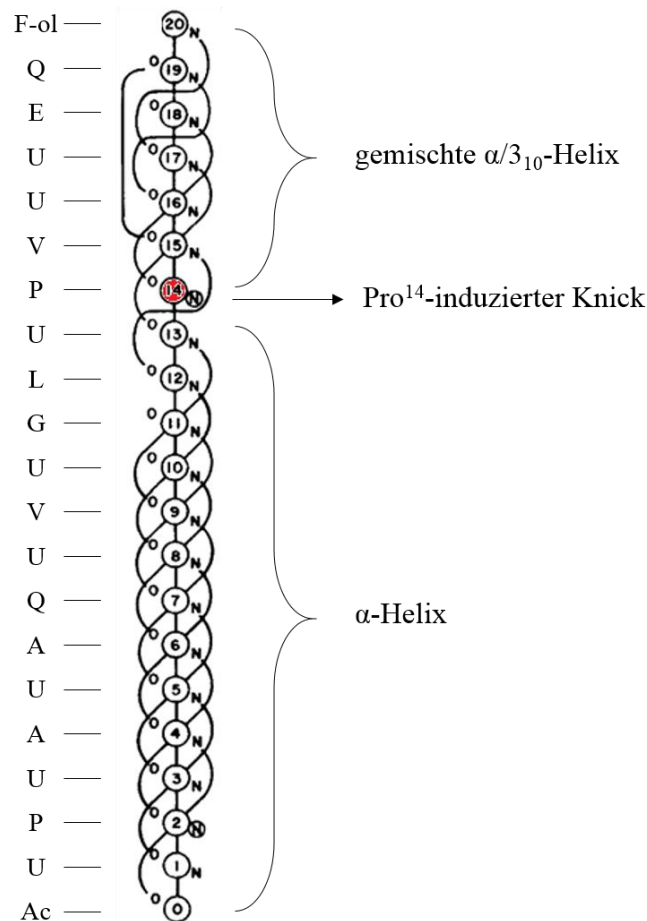


Abbildung 9: Illustration der strukturellen Besonderheiten des ALM.

Kristallstruktur verändert übernommen aus ^[90]. Die H-Brückenmuster sind indiziert durch über die Helixachse vertikal (4→1, 3₁₀-Helix) oder diagonal (5→1, α -Helix) gezogene Linien.

Wie zuvor erwähnt gilt ALM als das Prototyp-Peptid für den *barrel-stave* AMP-Mechanismus und bildet demnach spannungsabhängige Ionenkanäle in Lipidmembranen ^[96,97]. ALM-Monomere können nach der Bindung an die Membran in die hydrophobe Lipiddoppelschicht insertieren und Poren bilden, indem sie sich zu Oligomeren arrangieren. Die hydrophilen Seiten der amphiphilen Peptid-Monomere sind der zentralen Pore zugewandt und die hydrophoben Oberflächen stehen in Kontakt mit den Lipiden. Studien belegen, dass die wässrigen Poren aus 6-12 Molekülen bestehen ^[98], wobei ¹⁴Pro und damit der Knick in der Struktur der ALM-Monomere eine wichtige Rolle für die Stabilität der Kanäle spielt ^[99]. Die Insertion in den Kern

der Membran, d.h. der Übergang von dem inaktiven in den aktiven Zustand des ALM, ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Peptidkonzentration, dem molaren P/L-Verhältnis und verschiedenen Lipidmembraneigenschaften, die durch Temperatur, Hydratation, etc. vorgegeben werden ^[100,101].

1.3.2 Harzianine

Trichoderma harzianum ist eine bekannte myko-parasitische Spezies ^[102], aus der die Stoffklasse der Harzianine, eine eigenständige Gruppe aus natürlichen Peptaibolen, isoliert werden können. Harzianine umfassen aktuell 26 verschiedene Moleküle, wobei die Peptide jeweils 11, 14 oder 18 Aminosäuren besitzen, N-terminal acetyliert sind und teilweise charakteristische Aib-Pro (U-P)-Dipeptid-Einheiten aufzeigen.

Eine Übersicht über einige repräsentative Harzianin-Peptide, die im *Peptaibiotics Database* von Stoppacher et al. ^[61] aufgelistet sind, gibt die folgende Tabelle 4.

Name	Sequenz	Herkunft
Harzianin HA V ^[103]	Ac-U-G-A-U-J-Q-U-V-U-G-L-U-P- L-U-J-Q-L-ol	<i>T. harzianum</i>
Harzianin HB I ^[75]	Ac-U-N-L-I-U-P-J-L-U-P-L-ol	<i>T. harzianum</i>
Harzianin HC I ^[104]	Ac-U-N-L-U-P-S-V-U-P-U-L-U-P- L-ol	<i>T. harzianum</i>
Harzianin HK VI (HZ) ^[105]	Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-U-P-L-ol	<i>T. pseudokoningii</i>
Harzianin PCU4 ^[106]	Ac-U-N-L-U-P-S-I-U-P-U-L-U-P-V- ol	<i>T. afroharzianum</i>
Afroharzianin 7 ^[107]	Ac-U-G-A-U-V/J-Q-V/J-V/J-U-G- L/I-U-P-L/I-U-U-Q-L/I-ol	<i>T. afroharzianum</i>

Tabelle 4: Einige ausgewählte natürliche Harzianin-Peptaibole mit Sequenz und Herkunftsstamm.
 J: Isovalin; U: Aminoisobuttersäure; L/I: Leu oder Ile; V/J: Val oder (R)- bzw. (S)-Iva
 Ac-: Acetyl; L-ol: Leucin-ol; V-ol: Valin-ol; L/I-ol: Leucin-ol oder Isoleucin-ol
 Fett unterstrichen ist die für diese Arbeit relevante Harzianin HK VI.

Die erste Publikation über ein Harzianin-Peptaibol, das Harzianin HA V, stammt aus dem Jahre 1992 ^[103]. Hier zeigten Rebuffat et al. anhand von elektrophysiologischen Leitfähigkeitsmessungen über Lipidmembranen, dass das 18-mere Peptaibol in der Lage ist den Ionenfluss über die Membran drastisch zu erhöhen und schlugen daher die Bildung von spannungsabhängigen Poren vor, die allgemein für Peptaibole angenommen werden. Dagegen sind die Harzianine HC, die einige Jahre später in *T. harzianum* entdeckt wurden, mit 14 Aminosäureresten wesentlich kürzer, zeigen dennoch erhebliche Membranaktivität in Form von Permeabilisierung von Liposomen und Erhöhung der Leitfähigkeit über Membranen ^[104]. Strukturelle Untersuchungen der Harzianine HC mittels CD- und NMR-Spektroskopie weisen auf eine helikale Konformation hin, die durch intramolekulare N–H···O=C Wasserstoffbrücken der 4→1-Form, d.h. zwischen Rest 1 und 4 bzw. i und i+3, stabilisiert werden und daher mit einer 3_{10} -Helix konform sind, jedoch auch klare Abweichungen davon aufzeigen.

In den nächsten Jahren wurden zwei noch kürzere Vertreter Harzianin HK VI (HZ) und Harzianin HB I mit jeweils 11 Aminosäureresten entdeckt ^[75,105]. Das in dieser Arbeit untersuchte HZ besitzt die Aminosäuresequenz Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-U-P-L-ol und wird vom Fadenpilz *Trichoderma pseudokoningii* produziert. Somit ist es bis dato das einzige Molekül aus der Gruppe der Harzianine, welches aus einem anderen Stamm als *T. harzianum* stammt. HZ wird in die SF4-Gruppe der Peptaibole eingegliedert und gehört daher zu den kleinen bis mittelgroßen Peptaibolen (*medium-length*) bzw. mit Harzianin HB I gemeinsam zu den kleinsten bisher bekannten Harzianinen. Beide 11-mer Harzianine zeigen trotz ihrer kurzen Peptidsequenz membranolytische Aktivitäten ^[75,105]. Doch ist diese Fähigkeit bei den kurzen Harzianinen etwas schwächer ausgeprägt als bei längeren Peptaibolen. Ähnliche kurze Peptaibole wie Trichorozine und Trichorovine (Trichorovin TV XIIa ist bis auf den L-ol/I-ol – Austausch am C-Terminus identisch zu HZ) erhöhen ebenfalls den Ionenfluss über planare Lipidmembranen bei Anlegen von elektrischer Spannung ^[108]. Während für längere Peptaibole wie ALM die Formation von Ionenkanälen in Lipidmembranen bekannt ist ^[97], bleibt der Mechanismus der Wechselwirkung von kurzen Peptaibolen bzw. generell kleinen porenbildenden membranaktiven Peptiden ungewiss. Sie sind zu kurz, um die Lipidmembran zu durchspannen, um in ihr Poren und Kanäle zu bilden. Über mögliche Mechanismen zur Porenbildung gibt es einige Hypothesen, die in der Literatur diskutiert wurden ^[73]. Sie werden in Abb. 10 graphisch dargestellt:

- i. Peptid-Monomere assoziieren jeweils über ihre Termini zu Dimeren und durchspannen so die Lipidmembran (1)
- ii. die ursprünglich zu kurzen Peptide nehmen nach der Bindung an die Membran eine verlängerte Struktur an (2)
- iii. das Peptid verursacht eine Ausdünnung der Lipidmembran (*membrane thinning*) (3)

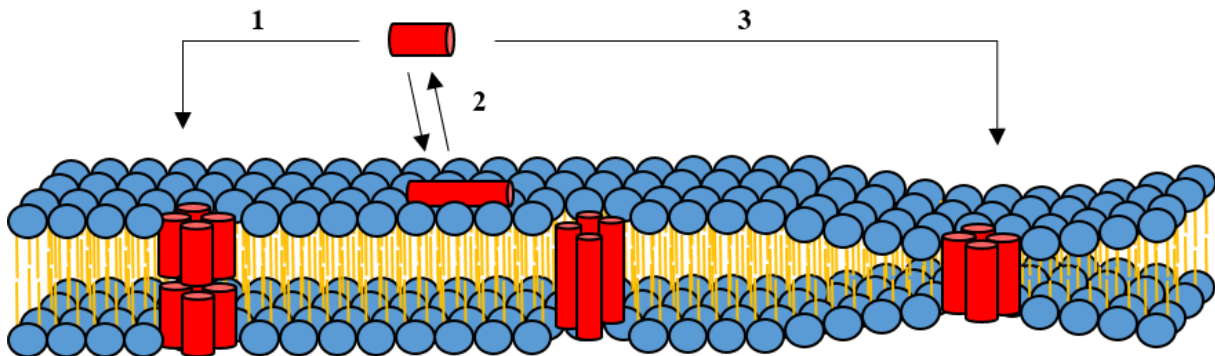


Abbildung 10: Hypothetische Mechanismen der Porenbildung von kurzen membranaktiven Peptiden.

Harzianine mit 11 und 14 Aminosäuren weisen ausgeprägte Sequenzen mit U-P-Einheiten auf, die zuvor bereits als Peptidsequenzen identifiziert wurden, welche die helikale Struktur *β -bend ribbon spiral* annehmen können und erstmals im Peptaibol Zervamicin nachgewiesen wurden [69,70]. *β -bend ribbon spiral* wurde wegen den identischen intramolekularen H-Brücken-Mustern (4 \rightarrow 1) als eine abweichende Form bzw. als ein Subtyp der 3_{10} -Helix tituiert [109] und in der Folge besonders für Harzianine mit U-P-Dipeptid- und X-Y-U-P-Tetrapeptid-Einheiten (X, Y: beliebige, meist hydrophobe Aminosäuren) vorgeschlagen [110]. Die Ausbildung dieser exotischen helikalen Konformation liegt in den strukturellen Besonderheiten der Aminosäuren Aib und Pro begründet (Abb. 11). Hier treffen die Helix-induzierende, dialkylierte, achirale Aminosäure Aib und das zyklische Pro aufeinander, welches aufgrund der N-Alkylierung keine H-Brücke ausbilden kann. Die Ähnlichkeiten zwischen der regulären 3_{10} -Helix und dem *β -bend ribbon spiral* wurden u.a. durch Analogien im Auftreten der Banden in CD-Spektren belegt [71]. Die Strukturen können dagegen neben NMR auch mithilfe der FTIR-Spektroskopie unterschieden werden [111,112]. Die aus β -Schleifen bestehenden Helices haben, neben den identischen H-Brücken, ähnliche Helix-Parameter wie 3_{10} -Helices und sind daher länger gestreckt als eine klassische rechtsgängige α -Helix mit H-Brücken vom 5 \rightarrow 1-Typ.

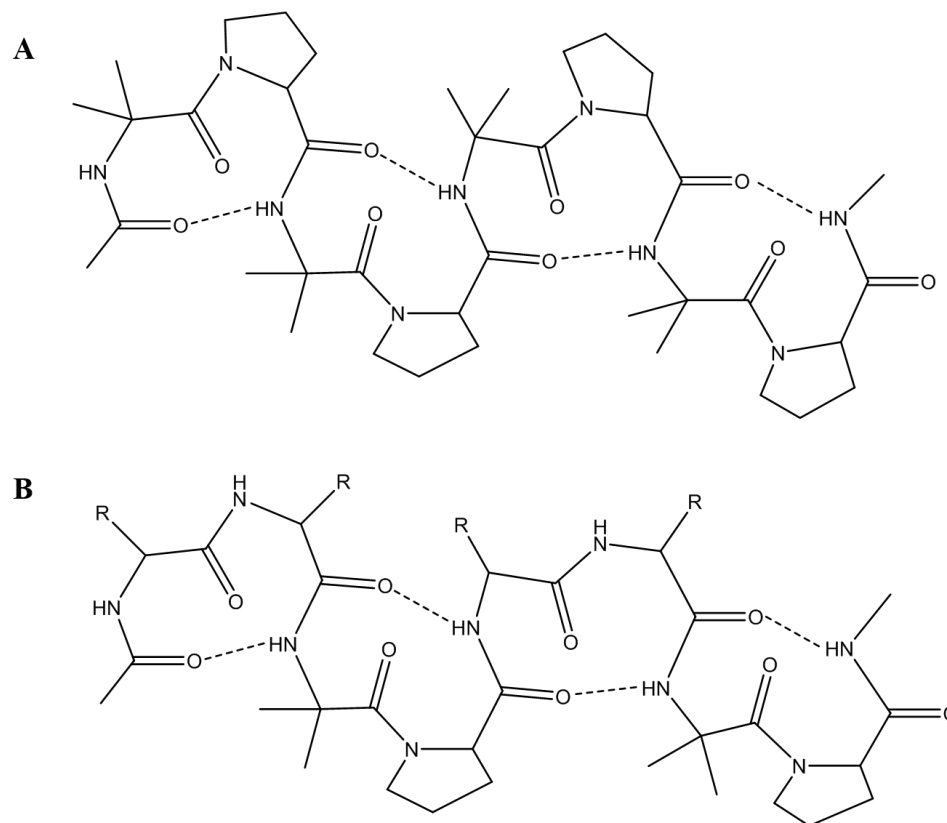


Abbildung 11: Schematische Darstellung der helikalen Konformation β -bend ribbon spiral. Illustration des klassischen β -bend ribbon spiral mit zufällig generierten repetitiven U-P-Einheiten (A) und der Variante charakterisiert durch X-Y-U-P-Tetrapeptid-Einheiten (B). H-Brücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

1.4 Biophysikalische Methoden zur Untersuchung von Peptid-Lipidmembran-Wechselwirkungen

In Untersuchungen von Peptid/Lipidmembran-Systemen liegt der Fokus primär auf den strukturellen Merkmalen der beiden Komponenten, um hauptsächlich die Strukturen sowie vielfältigen Funktionen und Mechanismen der Peptide/Proteine in Lipidmembranen charakterisieren und verstehen zu können. Klassische Methoden sind jedoch schwierig anzuwenden^[113]. Eine große Herausforderung ist die Tatsache, dass Peptide und Lipide infolge ihrer Wechselwirkungen Änderungen in ihren Strukturen, Anordnungen und Konformationen erfahren können, welche experimentell nicht immer leicht zu bestimmen sind. Außerdem kann die Aggregation von Molekülen zu Problemen führen. Für eine erfolgreiche und aufschlussreiche Erforschung ist daher oft der Einsatz von verschiedenen biophysikalischen Methoden notwendig, die sich gegenseitig komplementieren.

1.4.1 Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Charakterisierung von Peptiden in Lipidmembranen

Eine sehr oft benutzte und hilfreiche Methode bei der Untersuchung von Peptid-Membran-Interaktionen ist die Festkörper-NMR-Spektroskopie ^[114,115]. Diese Technik ermöglicht den Zugang zu weitreichenden Informationen über membranaktive Peptide in orientierten fluiden Lipidmembranen, wie z.B. ihre membrangebundene Struktur, Orientierung und Mobilität ^[116] und gibt auch die Möglichkeit Lipidanordnungen zu untersuchen. Zu häufig benutzten NMR-aktiven Kernen zählen ¹H, ¹⁵N, ¹³C und ³¹P (Tab. 5).

Atomkern	Kernspin	Natürliche Häufigkeit [%]	Gyromagnetisches Verhältnis γ [$10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$]	Absolute NMR-Sensitivität
¹ H	½	99,98	26,7522	100
² H	1	0,015	4,1066	0,000145
¹³ C	½	1,108	6,7283	0,0176
¹⁴ N	1	99,63	1,9338	0,101
¹⁵ N	½	0,37	-2,7126	0,000385
¹⁹ F	½	100	25,1815	83
³¹ P	½	100	10,8394	6,62

Tabelle 5: Magnetische Eigenschaften einiger NMR-aktiver Atomkerne.
Daten stammen aus ^[117].

¹⁹F-Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Bestimmung der Peptidorientierung in Lipidmembranen

Trotz ihrer Absenz in natürlichen Peptiden bieten in der Anwendung speziell ¹⁹F-Kerne eine Reihe von Vorteilen. Wie in Tab. 5 ersichtlich ist, besitzen ¹⁹F-Kerne eine hohe NMR-Sensitivität, was zum einen aus seinem relativ hohen gyromagnetischen Verhältnis und zum anderen aus seiner natürlichen Häufigkeit von 100 % resultiert. Da Fluor kein natürlicher Bestandteil von Peptiden ist, treten außerdem keine anderweitigen Störsignale auf. In der

Vergangenheit haben Ulrich et al. die beschriebenen vorzüglichen Merkmale des Fluors genutzt, um verschiedene membrangebundene AMP mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie zu untersuchen ^[118].

Für die Verwendung der ^{19}F -NMR-Spektroskopie werden die zu analysierenden Peptide mit ^{19}F -markierten Aminosäuren synthetisiert (Abb. 12). Als Reportergruppen werden oft CF_3 -Einheiten verwendet, die starr im Peptidrückgrat verankert sein müssen und die Konformation des Peptids nicht modifizieren dürfen, um verlässliche Informationen über Struktur und Orientierung des Peptids geben zu können. Außerdem sollten sie die native Struktur des Peptids nicht beeinflussen, was durch CD-Spektroskopie geprüft werden kann.

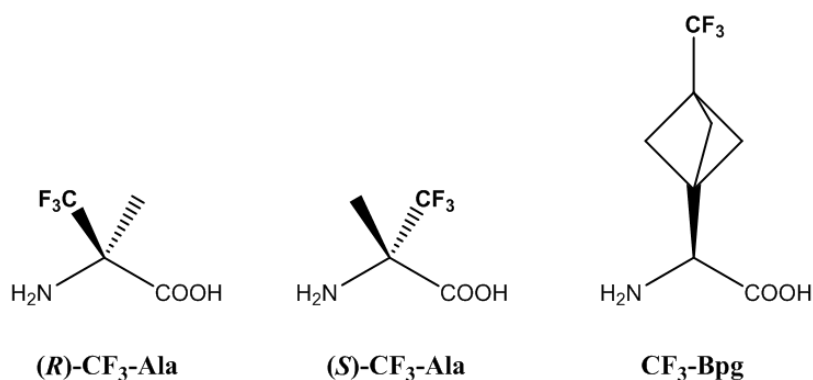


Abbildung 12: Chemische Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten ^{19}F -markierten Aminosäuren.
 CF₃-Bpg: (S)-3-(trifluormethyl)-bicyclopent-[1.1.1]-1-yl-glycin.

Die Orientierung der Peptidachse wird durch den Winkel θ zwischen dem C– CF_3 -Vektor und der Membrannormalen N beschrieben ^[115] (Abb. 13). Durch die folgende Formel

$$\Delta_{\text{CF}_3} = \Delta_{\text{CF}_3}^0 \frac{\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle}{2}$$

kann aus den beobachteten dipolaren Kopplungen Δ_{CF_3} die zeitlich gemittelte Orientierung der CF_3 -Gruppe in der orientierten Lipidmembran berechnet werden. Dazu werden mindestens vier Datenpunkte benötigt, welche für eine angenommene Struktur angeordnet werden ^[119]. Aus θ werden die Parameter in Abb. 13 bestimmt: der Neigungswinkel des Peptids τ , der Rotationswinkel ρ und seine Beweglichkeit anhand S_{mol} . Der Ordnungsparameter S_{mol}

beschreibt die Bewegung des gesamten Moleküls relativ zur Membrannormalen und kann Werte zwischen 0 (mobil) und 1 (starr) annehmen.

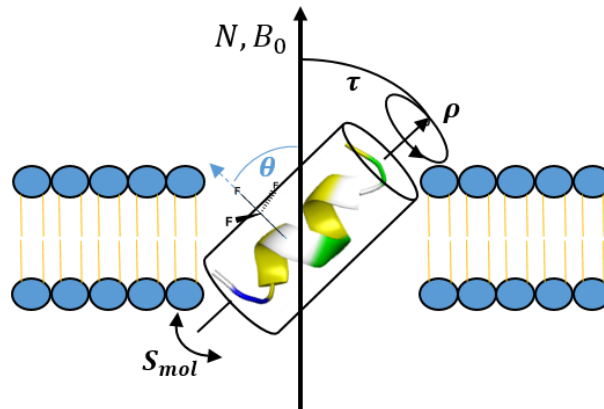


Abbildung 13: Illustration der aus der ^{19}F -Festkörper-NMR zu bestimmenden Parameter eines Peptids in orientierten Lipidmembranen.

^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Bestimmung der Peptidorientierung in Lipidmembranen

Ein weiterer oft verwendeter NMR-Kern, der die Orientierung und die Struktur von membranaktiven Peptiden offenbart, ist ^{15}N . ^{14}N ist das natürliche Isotop des Elements Stickstoff und ist in jeder Peptidbindung enthalten. Die selektive Substitution dieser Kerne mit dem selteneren ^{15}N modifiziert daher die Sekundärstruktur nicht und gibt stichhaltige Daten über die Ausrichtung des Peptidrückgrats. Doch führen die geringe natürliche Häufigkeit und NMR-Sensitivität von ^{15}N dazu, dass Messungen oft zeitaufwendig sind, besonders da nicht viel Material vorhanden ist und/oder eingesetzt werden kann. Hingegen liegt ein Vorteil bei der ^{15}N -Markierung darin, dass keine speziellen unnatürlichen Isotopenmarkierungen notwendig sind, denn es werden Isotopen-angereicherte kommerzielle Aminosäuren eingesetzt.

Die σ_{33} -Komponente des CSA-Tensors ist in einem α -helikalen Peptid nahezu parallel zum N–H-Bindungsvektor und zur Helixachse positioniert. In diesem Fall korreliert die chemische Verschiebung des ^{15}N gerade mit der ungefähren Ausrichtung des Peptids in der orientierten Lipidmembran ^[120]. In orientierten NMR-Proben liegt die Membrannormale N parallel zum Magnetfeld B_0 (0° -Ausrichtung). Bei einer parallelen Ausrichtung der Peptidhelixachse zu N und B_0 ergibt sich für das Peptid eine chemische Verschiebung von größer als 200 ppm, der Resonanzfall tritt also im Bereich von σ_{33} auf. Dies beschreibt den Fall eines in die Membran insertierten Peptids (*I-state*). Im Falle der Orientierung auf der Membranoberfläche (*S-state*)

resultieren Signale im Bereich von 80-100 ppm, etwa im Bereich von σ_{11} und σ_{22} . Werte dazwischen sprechen für eine geneigte Orientierung (*T-state*) des Peptids (Abb. 14). Für eine nicht-helikale Konformation wird die Korrelation zwischen chemischer Verschiebung und Orientierung schwieriger und müsste neu berechnet werden.

Das ^{15}N -Pulverspektrum deckt alle Orientierungen des Moleküls relativ zum Magnetfeld ab. In Abb. 14 sind das Pulverspektrum und das isotrope Spektrum für ein selektiv ^{15}N -markiertes Peptid abgebildet. Der CSA-Bereich erstreckt sich üblicherweise von ca. 220 ppm bis ca. 40 ppm. Die isotrope chemische Verschiebung δ_{iso} liegt etwa bei 110 ppm.

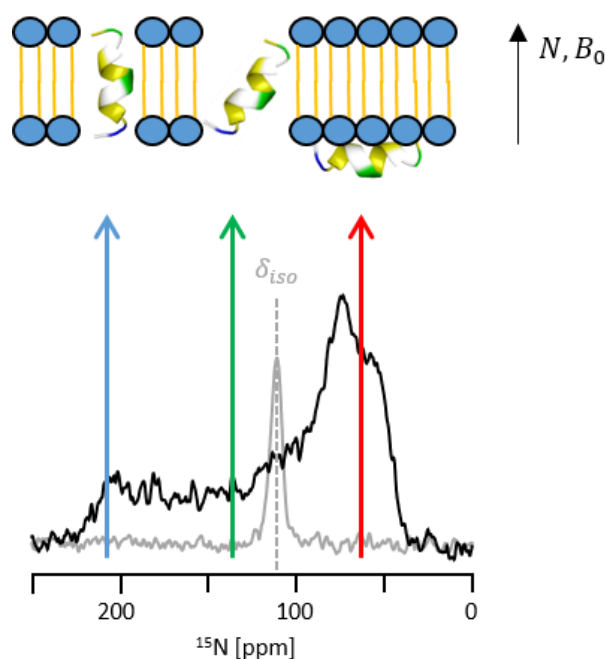


Abbildung 14: Korrelation zwischen ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektrum und Orientierung des Peptids in der Lipidmembran.

Darstellung des Pulverspektrums eines selektiv ^{15}N -markierten HZ-Peptids und der charakteristischen chemischen Verschiebungen für bestimmte Orientierungen eines helikalen Peptids in der Lipidmembran. *S-state*: *surface-bound state* (roter Pfeil); *T-state*: *tilted state* (grüner Pfeil); *I-state*: *inserted state* (blauer Pfeil)

^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Charakterisierung von Lipidmembranen

Die ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit strukturelle Merkmale der Lipidmembranen zu untersuchen, da Lipide natürlicherweise ^{31}P -Kerne enthalten. Die natürliche Häufigkeit von ^{31}P liegt bei 100 %, d.h. es gibt keine störenden Hintergrundsignale in den NMR-Spektren.

Durch ^{31}P -NMR-Messungen in orientierte Proben wird geprüft, ob die Lipidmembranen als reguläre Lipiddoppelschichten orientiert sind. Die Orientierung der Lipide ist die Voraussetzung für die Bestimmung der Orientierung und Struktur der inkorporierten Membranpeptide mittels ^{19}F - und ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie. Die Reorientierung der Lipid-Kopfgruppen, die Ausbildung von nicht-lamellaren Strukturen innerhalb der Lipidmembranen wie hexagonale oder kubische Lipidstrukturen oder Micellenbildung können ebenfalls mit der ^{31}P -Festkörper-NMR nachgewiesen werden. Daher ist diese einfach durchführbare Methode sehr geeignet membranmodifizierende Eigenschaften von Peptiden/Proteinen zu ermitteln.

Das Pulverspektrum der ^{31}P -Kerne repräsentiert wiederum alle möglichen Orientierungen der Lipidmoleküle und zeigt den CSA-Bereich für ^{31}P an, der je nach Referenz etwa zwischen 35 und -20 ppm liegt (Abb. 15). Pulverspektren werden auch in Lipid-Vesikeln beobachtet, da die Lipide sich in wässriger Umgebung als Liposome anordnen und darin alle Orientierungen annehmen können. In orientierten Proben hingegen kann je nach Auftreten des NMR-Signals die Lipidorientierung evaluiert werden. Wenn z.B. N und B_0 parallel ausgerichtet sind, erscheint das Signal bei guter Orientierung der Lipide im Tieffeld des CSA-Bereichs, d.h. am linken Ende des CSA-Signals. Von der Lipiddoppelschicht abweichende Lipidphasen bzw. -strukturen können somit leicht anhand ihrer CSA identifiziert werden (Abb. 15C und 15D).

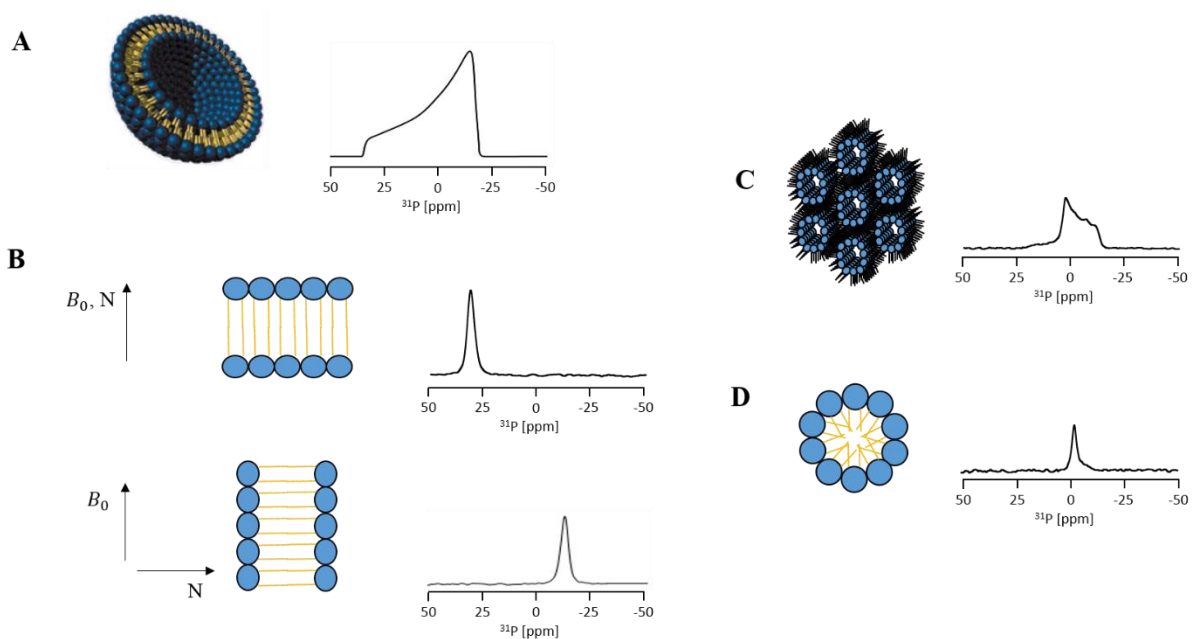


Abbildung 15: Typische ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren bestimmter Lipidanordnungen.

Repräsentatives ^{31}P -Pulverspektrum von Liposomen/Vesikel (A); ^{31}P -NMR-Spektren von Lipiddoppelschichten bei bestimmten Orientierungen zum Magnetfeld B_0 (B). Nicht-lamellare Lipidphasen: ^{31}P -Pulverspektrum der invertierten hexagonalen Lipidphase H_{II} (C) und bei Bildung von Micellen (D).

1.4.2 CD-Spektroskopie für die Bestimmung von Proteinstrukturen

Die CD-Spektroskopie bietet eine einfache Technik, um Sekundärstrukturelemente von Peptiden/Proteinen zu bestimmen. Hinter der Methode verbirgt sich der Effekt des Zirkulardichroismus (*CD, circular dichroism*), der bei Molekülen mit chiralen Zentren auftritt. Da Peptide chirale Moleküle sind (C_α -Atom ist außer bei Gly bei proteinogenen Aminosäuren immer chiral), kann die CD-Spektroskopie anhand von charakteristischen Banden Strukturelemente nachweisen.

In Peptiden und Proteinen ist der interessante Wellenlängenbereich, in dem elektronische Übergänge die signifikanten zugehörigen CD-Banden verursachen, zwischen 180 und 260 nm zu beobachten. Die Banden bei Wellenlängen > 240 nm werden durch die Peptidbindung erzeugt: ein schwacher $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei etwa 220 nm und eine starke Bande bei 190 nm hervorgerufen durch den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang ^[121]. Beide elektronischen Übergänge erfolgen jeweils von den Orbitalen des Sauerstoffatoms der Carbonylgruppe (n bzw. π) zum antibindenden π^* -Orbital der Peptidbindung. Für eine α -helikale Struktur bspw. sind zwei negative Banden bei 208 und 222 nm und eine starke positive Bande bei 190 nm charakteristisch (Abb. 16).

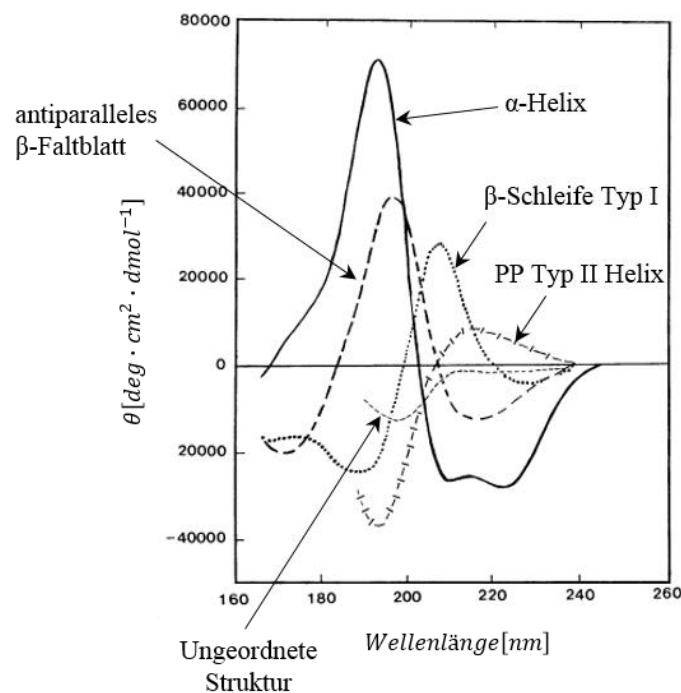


Abbildung 16: Repräsentative CD-Spektren für einige bekannte Sekundärstrukturen.
Verändert übernommen aus ^[121].

Orientierte CD-Spektroskopie (OCD) für die Bestimmung der Peptidorientierung in Lipidmembranen

Die OCD-Spektroskopie bietet eine alternative Methode die Orientierung von Peptiden in makroskopisch orientierten Lipidmembranen zu bestimmen ^[122,123]. Die Methode ist besonders gut geeignet für α -helikale Peptide, doch es ist auch möglich Aussagen über Peptide mit anderweitigen Strukturen zu treffen. Die Gewährleistung von gut hydratisierten orientierten Lipidmembranen ist neben anderen Faktoren ausschlaggebend für die Orientierung der Peptide. Dies wird in der OCD durch Installierung einer feuchten Hydrationskammer in die Probenzelle gewährleistet (s. Kap. 3.5.3). Im Gegensatz zur konventionellen CD-Spektroskopie sind die Bedingungen in der OCD somit biologisch relevanter ^[124]. Im Vergleich zur bereits vorgestellten ¹⁹F- und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine Isotopenmarkierung nicht notwendig.

Die der OCD zugrundeliegende Theorie von Moffitt besagt, dass in Peptidbindungen eines helikalen Peptids die aus den elektronischen Übergängen resultierenden Dipolmomente entweder parallel oder senkrecht zur Helixachse polarisiert sind ^[124]. Dies hat zur Folge, dass zur Membrannormalen senkrecht orientierte Helixachsen eine starke negative Bande bei 208 nm verursachen. Bei Abweichung der Peptidachse von dieser Orientierung wird die Bande bei 208 nm schwächer (Abb. 17). Durch das Auftreten von CD-Mustern können somit relativ einfach Orientierungsmerkmale von helikalen Peptiden bestimmt werden.

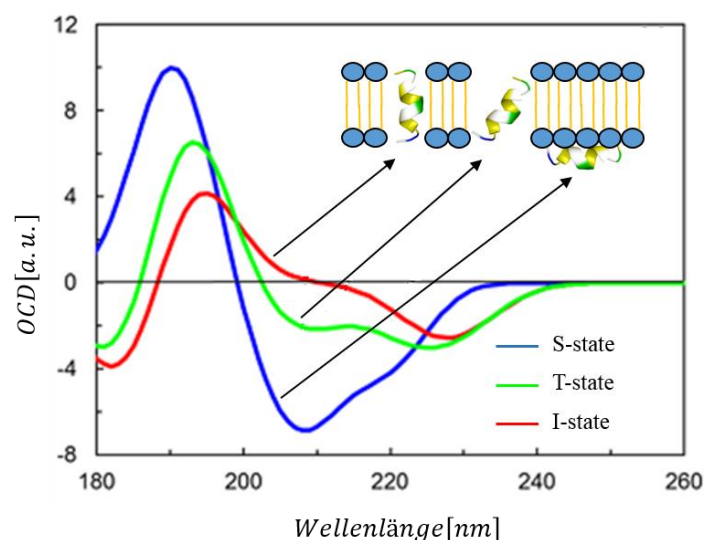


Abbildung 17: Auftreten von OCD-Spektren für bestimmte Peptidhelix-Orientierungen in Lipidmembranen

Verändert übernommen aus ^[124]

S-state: surface-bound state; T-state: tilted state; I-state: inserted state

2 Motivation

Protein/Peptid – Lipidmembran -Wechselwirkungen bilden eine der wichtigsten biologischen Schnittstellen auf zellulärer Ebene. In dieser Arbeit wird dieser Bereich molekular durch Verwendung der Festkörper-NMR-Spektroskopie und weiteren ergänzenden Methoden beleuchtet.

Auf der Seite der Lipidmembranen werden die außergewöhnlichen Diphytanoyl-Lipide charakterisiert, welche durch Methylgruppen verzweigte Acylketten besitzen und für die Stabilität von Zellmembranen der extremophilen Archaeen mitverantwortlich sind. Aufgrund ihrer häufigen Verwendung in der Forschung ist es notwendig ihre Eignung als Modellmembranen zu evaluieren und ihre Wechselwirkung mit membranaktiven Peptiden zu erforschen.

Zu solchen antibiotischen Peptiden gehören die Peptaibole. Sie sind natürliche Peptide aus Pilzen mit erhöhter Proteasestabilität und besitzen eine Vielfalt von antibiotischen Wirkungen. Peptaibole erreichen diese durch die Bildung von Poren in Lipidmembranen, welche sie penetrieren und permeabilisieren, und auf diese Weise ihren Zielorganismus abtöten. Dennoch konnte der detaillierte molekulare Mechanismus von Peptaibolen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden, insbesondere in Bezug auf Peptide mit kurzen Sequenzen, die im Normalfall als Monomere die Lipidmembran nicht durchspannen können. Die hier beabsichtigte Struktur- und Funktionsanalyse von zwei unterschiedlichen Peptaibolen soll in dieser Hinsicht Erkenntnisse liefern. Die Objekte der Untersuchungen sind das kurze nicht-charakterisierte Peptaibol Harzianin HK VI (HZ), das aus 11 Aminosäuren besteht, und das aus 20 Aminosäuren bestehende und bereits oft untersuchte Alamethicin F30/3 (ALM).

Über das Peptaibol HZ existieren in der Literatur kaum Informationen. Die Fragestellungen betreffen nicht nur die Funktion und den Mechanismus des kleinen Peptids, sondern auch seine Konformation in Lipidmembranen. Um in einer etwa 30-35 Å dicken Lipiddoppelschicht Kanäle und Poren zu bilden, braucht ein α -helikales Peptid eine Länge von etwa 18 bis 22 Aminosäuren. Ist ein nur halb so langes Peptid dazu auch in der Lage und wenn ja, wie schafft es das? Und wie verhält sich das Peptid in Lipidmembranen mit unterschiedlichen Eigenschaften?

ALM wurde dagegen in zahlreichen Untersuchungen intensiv erforscht. Dabei wurden seine strukturellen sowie biologischen Eigenschaften charakterisiert. ALM ist allgemein anerkannt als das prominenteste AMP, welches mit Lipidmembranen nach dem *barrel-stave-*

Mechanismus interagiert und aus Multimeren bestehende Poren in ihnen bildet. Die Struktur des ALM besteht aus zwei Hauptsegmenten, die durch einen Pro-Rest getrennt werden, welches den charakteristischen Knick in der Struktur verursacht. Während für den N-Terminus eine reguläre α -helikale Struktur bestimmt wurde, ist der C-terminale Teil des Peptaibols relativ flexibel. Ziel dieser Untersuchung ist es die Konformation des ALM mittels NMR-Messungen zu vervollständigen, wobei der Fokus dem flexiblen Segment gilt.

Der hier beabsichtigte Vergleich zwischen zwei Vertretern aus der Klasse der Peptaibole, welche sich aufgrund ihrer Länge und Klassifikation voneinander unterscheiden, soll das biomolekulare Verständnis über die Wechselwirkungen zwischen Peptaibolen bzw. membranaktiven Peptiden im Allgemeinen und Lipidmembranen mit unterschiedlichen Eigenschaften erweitern. Durch Aufschlüsselung ihrer oft unvorhergesehenen Funktionen und Mechanismen soll die Entwicklung bzw. Bereitstellung von gezielten antibiotischen Substanzen gegen multiresistente pathogene Erreger gewährleistet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang (Teil a) aufgelistet.

3.2 Festphasen-Peptidsynthese

3.2.1 Synthese und Aufreinigung von PGLa-Peptiden

Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem AMP PGLa und DPhPC-Lipidmembranen wurden PGLa-Analoga manuell synthetisiert. Es wurden insgesamt vier Peptide hergestellt, die jeweils an verschiedenen Positionen in der Peptidkette die ^{19}F -markierte Aminosäure $\text{CF}_3\text{-Bpg}$ enthielten. In der Peptidsequenz wurden die Positionen 9, 10, 13 und 14 mit dem Label markiert (Tab. 6). Zu beachten ist, dass anstelle des Methionins an Position 2 der Sequenz die nicht-proteinogene Aminosäure Norleucin in das Peptid eingeführt wurde, welches im Gegensatz zu Methionin nicht schwefelhaltig ist und daher gegenüber Oxidationen geschützt sein sollte. Das an Position 4 markierte PGLa-Analogon wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Anton Tkachenko verwendet.

Bezeichnung	Primärsequenz	Molekular- masse [g/mol]
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂	1968,2
PGLa 4-CF ₃ -Bpg	GN* A- CF₃-Bpg -KAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂	2054,2
PGLa 9-CF ₃ -Bpg	GN* ASKAGA- CF₃-Bpg -AGKIAKVALKAL-NH ₂	2028,2
PGLa 10-CF ₃ -Bpg	GN* ASKAGAI- CF₃-Bpg -GKIAKVALKAL-NH ₂	2070,2
PGLa 13-CF ₃ -Bpg	GN* ASKAGAIAGK- CF₃-Bpg -AKVALKAL-NH ₂	2028,2
PGLa 14-CF ₃ -Bpg	GN* ASKAGAIAGKI- CF₃-Bpg -KVALKAL-NH ₂	2070,2

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten CF₃-Bpg-markierten PGLa-Analoga.

N*: Norleucin

Synthese der CF₃-Bpg-markierten PGLa-Analoga

Die Reaktionen wurden nach einem Fmoc-basierten, modifizierten Syntheseprotokoll nach ^[125] durchgeführt. Es wurde Rink-Amid-Harz (Ansatz: 0,5 mmol; Maschenweite: 100-200 mesh) verwendet, welches durch Zugabe von DCM in einer 20 ml Plastikspritze aufgeschlämmt wurde (20 min auf Schüttler). Das Kupplungsreagenz bestand aus 3 Äq. der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure sowie jeweils 3 Äq. von HOBt und TBTU. Anschließend wurde DIPEA-Lösung im Überschuss dazugegeben. Das Reagenz wirkte ca. 40 min lang auf dem Schüttler auf das Harz ein. Zum Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen der Aminosäuren wurde eine 20% ige Piperidin-Lösung benutzt (15 min auf Schüttler). Pyridin/Essigsäureanhydrid (1:1, Vol/Vol) wurde für die Inaktivierung der nicht-reagierten Stellen auf dem Harz benutzt. Nach jedem Reaktionsschritt wurde das Harz mit NMP gewaschen.

Nach der vollständigen Synthese der PGLa-Sequenz wurde das Peptid-Abspaltungsreagenz aus TFA/H₂O (96:4, Vol/Vol) und einige Tropfen TIS auf das Harz gegeben und 45 min unter gelegentlichem Rühren stehen gelassen. Die Lösung wurde durch die Spritze abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Peptid durch Zugabe von Diethylether in Form eines weißen Feststoffs präzipitiert. Nach dem Zentrifugieren der Suspension wurde das Diethylether entfernt und die Rohprodukte über Nacht lyophilisiert.

Aufreinigung der CF₃-Bpg-markierten PGLa-Peptide mittels RP-HPLC

Die Rohprodukte wurden in einer Lösung aus A:B (3:2, Vol/Vol) gelöst (A: 90% H₂O, 10% ACN, 5 mM HCl; B: 90% ACN, 10% H₂O, 5 mM HCl). Nach der Lösung wurde das Analyt in eine Spritze rein filtriert. Zur RP-HPLC-Analyse der Proben wurde zunächst eine analytische C18-Säule (4,6 mm × 250 mm) verwendet. Als Laufmittel wurden die Lösungsmittel A und B benutzt. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min mit einem Lösungsmittelgradienten von 15-35 % B in 12 min. Die Fraktionen wurden eingesammelt und anhand von MALDI-TOF-Messungen identifiziert. Für die Aufreinigung wurde eine präparative C18-Säule (22 × 250 mm) bei einer Flussrate von 17 ml/min (Gradient: 15-36 % B in 14 min) eingesetzt.

Charakterisierung der Peptide durch MALDI-TOF

Die aus den HPLC-Läufen erhaltenen Fraktionen wurden für die massenspektrometrische Analyse mit MeOH auf ca. 2 ml aufgefüllt. Die Analytlösung in A/B-Mischung wurde dann nach gängigen Standardmethoden unter Verwendung von Dihydroxybenzol als Matrix für die

massenspektrometrischen Messungen verwendet. Die MALDI-TOF-Messungen wurden von Dr. Sergii Afonin durchgeführt.

3.2.2 Synthese und Aufreinigung von HZ- und ALM-Peptiden

Sämtliche Harzianin- und Alamethicin-Peptide wurden in Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Thierry Brigaud an der Université de Cergy-Pontoise synthetisiert, per RP-HPLC aufgereinigt und per UPLC/MS charakterisiert. Alle synthetisch hergestellten Analoga sind in Tab. 7 und Tab. 8 zusammengefasst.

Bezeichnung	Primärsequenz	Molekularmasse [g/mol]
HZ	Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-U-P-L-ol	1175,5
HZ 1(R)-CF ₃ -Ala	Ac-(R)- CF₃-Ala -N-I-I-U-P-L-L-U-P-L-ol	1253,7
HZ 1(S)-CF ₃ -Ala	Ac-(S)- CF₃-Ala -N-I-I-U-P-L-L-U-P-L-ol	1253,7
HZ 5(R)-CF ₃ -Ala	Ac-U-N-I-I-(R)- CF₃-Ala -P-L-L-U-P-L-ol	1253,7
HZ 5(S)-CF ₃ -Ala	Ac-U-N-I-I-(S)- CF₃-Ala -P-L-L-U-P-L-ol	1253,7
HZ 9(R)-CF ₃ -Ala	Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-(R)- CF₃-Ala -P-L-ol	1253,7
HZ 9(S)-CF ₃ -Ala	Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-(S)- CF₃-Ala -P-L-ol	1253,7
HZ 3-CF ₃ -Bpg	Ac-U-N- CF₃-Bpg -I-U-P-L-L-U-P-L-ol	1229,7
HZ 4-CF ₃ -Bpg	Ac-U-N-I- CF₃-Bpg -U-P-L-L-U-P-L-ol	1229,7
HZ 7-CF ₃ -Bpg	Ac-U-N-I-I-U-P- CF₃-Bpg -L-U-P-L-ol	1229,7
HZ 8-CF ₃ -Bpg	Ac-U-N-I-I-U-P-L- CF₃-Bpg -U-P-L-ol	1229,7
HZ 3- ¹⁵ N	Ac-U-N-(¹⁵ N)I-I-U-P-L-L-U-P-L-ol	1176,5
HZ 4- ¹⁵ N	Ac-U-N-I-(¹⁵ N)I-U-P-L-L-U-P-L-ol	1176,5
HZ 7- ¹⁵ N	Ac-U-N-I-I-U-P-(¹⁵ N)L-L-U-P-L-ol	1176,5
HZ 8- ¹⁵ N	Ac-U-N-I-I-U-P-L-(¹⁵ N)L-U-P-L-ol	1176,5

Tabelle 7: Synthetisch hergestellte ¹⁹F- und ¹⁵N-markierte HZ-Analoga.

Bezeichnung	Primärsequenz	Molekularmasse [g/mol]
ALM	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P- V-U-U-E-Q-F-ol	1965
ALM 17(<i>R</i>)-CF ₃ -Ala	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P- V-U-(R)-CF ₃ -Ala-E-Q-F-ol	2018,7
ALM 17(<i>S</i>)-CF ₃ -Ala	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P- V-U-(S)-CF ₃ -Ala-E-Q-F-ol	2018,7

Tabelle 8: Synthetisch hergestellte ¹⁹F-markierte ALM-Analoga.

Für die Synthesen der Peptaibole wurde ein Fmoc/tBu-basiertes Syntheseprotokoll verwendet. Die Peptide wurden unter Benutzung eines automatisierten, Mikrowellen-assistierten Peptidsyntheseegeräts synthetisiert.

Festphasensynthese der CF₃-Bpg-markierten Peptide

Als feste Phase wurde jeweils 0,15 mmol (300 mg) des H-*L*-Leu-ol-2-Chlorotrityl-Harz (Beladung: 0,5 mmol/g; Maschenweite: 200-400 mesh) eingesetzt. Vor jeder Synthese wurde das Harz 40-50 min in DMF aufgeschlämmt. Für jede eingeführte Aminosäure wurden zwei aufeinanderfolgende Peptidkupplungsreaktionen durchgeführt. Asn wurde in Abwesenheit der Seitenketten-Schutzgruppe verwendet. Eine Kupplungsreaktion wurde mit 3 Äq. der jeweiligen eingeführten Fmoc-geschützten Aminosäure in DMF, 3 Äq. von HATU in DMF und 4,2 Äq. von DIPEA in NMP durchgeführt. Dieses Gemisch wurde zusammen auf das Harz gegeben und 10 min bei 70 °C unter Schütteln zur Reaktion gebracht. Bei Aib-Resten fanden die Reaktionen bei 55 °C bzw. 60 °C mit einer Inkubationszeit von jeweils 15 min statt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde durch Verwendung einer 20 % igen Piperidin-Lösung erreicht, die zweifach mit einer jeweiligen Reaktionsdauer von 3 bzw. 12 min bei Raumtemperatur auf das Harz gegeben wurde. Die Waschschrte nach jeder Kupplungs- bzw. Entschützungsreaktion erfolgten durch 3×3 min Behandlung mit DMF.

Für die N-terminale Acetylierung der HZ-Analoga wurde das Harz nach dem Ende der Synthese der Peptidsequenz zweimal für eine Dauer von jeweils 1 h mit Essigsäureanhydrid (1,5 mmol)

und NMM (1,5 mmol) in DCM inkubiert. Das Reagenzgemisch von TFA/DCM/H₂O/TIS (47/47/4/2, Vol %) wurde als Abspaltungsreagenz verwendet. Das Harz wurde zweimal für 1h mit diesem Gemisch unter Schütteln aufgeschlämmt. Die Filtrate wurden vereinigt, der Hauptteil des Lösungsmittels unter einem leichten konstanten Luftstrom entfernt. Das entstandene Rohprodukt wurde nach Zugabe von 5 ml Wasser über Nacht lyophilisiert.

Festphasensynthese der CF₃-Ala-markierten HZ-Peptide

Als Ansatz wurden 500 mg (0,25 mmol) des H-L-Leu-ol-2-Chlorotryl-Harzes verwendet. Die Kupplungsreaktion des (*R*)- bzw. (*S*)-CF₃-Ala-OH erfolgte bei 60 °C für 20 min. Das restliche Syntheseprotokoll ist analog zur Synthese der CF₃-Bpg-markierten HZ-Peptide.

Die Peptide wurden durch 6-malige Behandlung des Harzes für jeweils 30 min mit 30 % iger HFIP-Lösung in DCM abgespaltet. Die Lösung wurde dann durch Zugabe von gekühltem Diethylether präzipitiert und anschließend lyophilisiert.

Festphasensynthese der CF₃-Ala-markierten ALM-Peptide

Als Ansatz wurden 300 mg (0,15 mmol) des H-L-Phe-ol-2-Chlorotryl-Harzes (Beladung: 0,48 mmol/g) verwendet. Gln wurde mit der Trityl-Gruppe als Seitenketten-Schutzgruppe und Glu mit der tert-butyl-Schutzgruppe eingesetzt. Das Kupplungsreagenz bestand aus 3 Äq. der Aminosäure in DMF, 4 Äq. von Oxyma Pure in DMF und 4 Äq. von DIC in DMF, das für 2 min bei 90 °C zur Reaktion gebracht wurde. Fmoc-Aib-OH und die synthetische Dipeptid-Einheit aus Aib – (*R*)-Tfm-Ala-OH bzw. Aib – (*S*)-Tfm-Ala-OH dagegen reagierten bei 50 °C für 10 min. 20 % ige Piperidin-Lösung in DMF wurde für das Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen verwendet (3 min bei 75 °C, für Fmoc-Aib-OH 2 × 10 min bei 25 °C). Die restlichen Schritte sind analog zur Synthese der CF₃-Bpg-markierten HZ-Peptide.

Festphasensynthese der ¹⁵N-markierten HZ-Peptide

Die ¹⁵N-markierten HZ-Peptide wurden nach dem selben Protokoll wie für CF₃-Bpg-markierte HZ-Peptide hergestellt.

Aufreinigung und Charakterisierung der HZ- und ALM-Peptide mittels RP-HPLC und UPLC/MS

Das Rohprodukt wurde mit einer analytischen C18 HPLC-Säule (3 × 100 mm) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min analysiert. Die Charakterisierung der HPLC-Signale erfolgte durch UPLC/MS mithilfe eines ESI/TOF-Spektrometers. Massenspektren wurden durch die ESI-Methode in positivem Ionenmodus aufgenommen. Dabei wurden die Lösungsmittel A (H₂O mit 0,1 % TFA) und B (ACN mit 0,1 % TFA) verwendet (50-100 % B in 5 min). Die Flussrate betrug 0,6 ml/min. Nach der analytischen HPLC-Charakterisierung wurde das Rohprodukt mithilfe einer semipräparativen C18-Säule (10 × 250 mm) bei einer Flussrate von 4 ml/min aufgereinigt. Mit den Lösungsmitteln A (H₂O mit 0,1 % Essigsäure) und B (ACN mit 0,1 % Essigsäure) wurde ein geeigneter Lösungsmittelgradient erstellt (je nach Peptid-Analogen 40-60 % B – 100 % B in 20 min). Fraktionen aus erneuten analytischen HPLC-Läufen mit dem aufgereinigten Produkt wurden durch MS charakterisiert.

Die Fraktionen des aufgereinigten Peptids wurden vereinigt, das Volumen der Lösungsmittel unter einem leichten Luftstrom eingengt und das Peptid lyophilisiert.

3.3 Lipide

Verwendete Lipide bzw. Lipidsysteme sind in im Anhang (Teil a) aufgelistet. Alle Lipide stammen von Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA).

3.4 Biologische Tests

Für die Durchführung von biologischen Tests unter sterilen Bedingungen ist es notwendig unter einer Reinraumbank zu arbeiten. Die dazu verwendeten Medien, Glasgeräte und Verbrauchsmaterialien wurden in einem Autoklav bei 121 °C und 1 bar 20 min lang sterilisiert. Um auch in der Folge Kontaminationen während der Arbeiten zu vermeiden, wurden Ösen und Pinzetten sowie Lösungen unter der Reinraumbank mithilfe eines Gasbrenners abgeflammt.

Im Folgenden werden die Methoden zur Beschreibung der biologischen Aktivität der synthetischen Peptide erläutert.

3.4.1 Antibakterielle Aktivität

Die MIC (*minimum inhibitory concentration*) der Peptid-Analoga wurde gegen die Gram-positiven Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Staphylococcus xylosus* (DSM 20267), *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) und gegen den Gram-negativen Erreger *Escherichia coli* (K12) getestet. Die Biofilm-Assays wurden für *S. aureus* und *E. faecalis* angewandt. Die Bestimmung der Atmungsaktivität der Bakterien wurde von Dr. Papia Sanyal nach der Methode in ^[126] durchgeführt. Die Stämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben.

Anzucht der Bakterienkulturen

Übernachtskulturen der bakteriellen Zellen wurden durch Beimpfung von 10 ml einfach konzentriertem Müller-Hinton-Medium (MH) angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden von der Übernachtskultur Verdünnungsstriche auf LB-Agarplatten gemacht und die Platte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Mit einer Öse wurden Zellkolonien von der Platte entnommen und die Übernachtskultur in 10 ml MH-Medium mit $OD_{550} = 0,02$ angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C, 220 rpm). Am nächsten Tag wurde der OD_{550} -Wert der Übernachtskultur gemessen, 10-fach in MH-Medium verdünnt. Dann wurde eine Testkultur mit $OD_{550} = 0,2$ aus der Übernachtskultur angesetzt, wobei die benötigten Volumina aus dem OD_{550} -Wert berechnet wurden. Die Testkultur wurde 3-4 h inkubiert bis $OD_{550} = 1 - 2$ erreicht wurde und danach mit MH-Medium auf $OD_{550} = 0,2$ verdünnt. Eine $OD_{550} = 0,2$ entspricht für Gram-positive Bakterien ungefähr 10^8 KbE/ml (KbE: Kolonien-bildende Einheiten). Für die Verdünnungstests wurden jeweils 20 ml der 100-fach (Gram-positiv) oder 1000-fach (Gram-negativ) verdünnten Zellsuspensionen bereitgestellt.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen für die MIC-Bestimmung

Die Bestimmung der MIC der Peptide erfolgte durch Verwendung eines modifizierten Verdünnungsassays aus der Literatur ^[127]. Für diesen Reihenverdünnungstest wurden Stammlösungen der zu testenden Peptide in 50 % EtOH mit einer Konzentration von 1024 µg/ml angesetzt. GS diente als Kontroll-Peptid in den Experimenten, dessen antimikrobielle Aktivitäten in vielen Fällen bekannt sind.

Die Verdünnungsreihen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt, die insgesamt 96 Wells/Vertiefungen (12×8) besitzen. Die 12 Reihen der Platte werden von 1-12 durchnummeriert, die 8 Spalten erhalten Buchstaben von A-H (Abb. 18). Alle Wells der Reihe A wurden mit 50 µl zweifach konzentriertem MH-Medium und alle restlichen Wells der Reihen B-H mit einfach konzentriertem MH-Medium befüllt. In die Wells der Reihe A der Spalten 1-9 wurden jeweils 50 µl der Peptidlösungen pipettiert. Jedes Peptid erhält drei Reihen, sodass drei Peptide auf einer Mikrotiterplatte untersucht werden. In das Well A10 kommt 50 µl 50 % EtOH als Lösungsmittelkontrolle. Anschließend wurden für die Reihen 1-10 die 1:1-Verdünnungsreihen durchgeführt, indem 50 µl der Reihe A entnommen und nach Mischen in die nächste Reihe B gegeben wurde. Dies wurde von Reihe A bis H fortgeführt und das letzte Volumen aus der Reihe H verworfen. In die Spalte 12 wurden als negative Kontrolle weitere 50 µl der Bakteriensuspension gegeben. Spalte 11 diente als positive Kontrolle ohne Peptid. Alle Wells außer Spalte 12 wurden schließlich mit 50 µl der Bakteriensuspension versetzt und die Mikrotiterplatte dann 20 h bei 37 °C inkubiert.

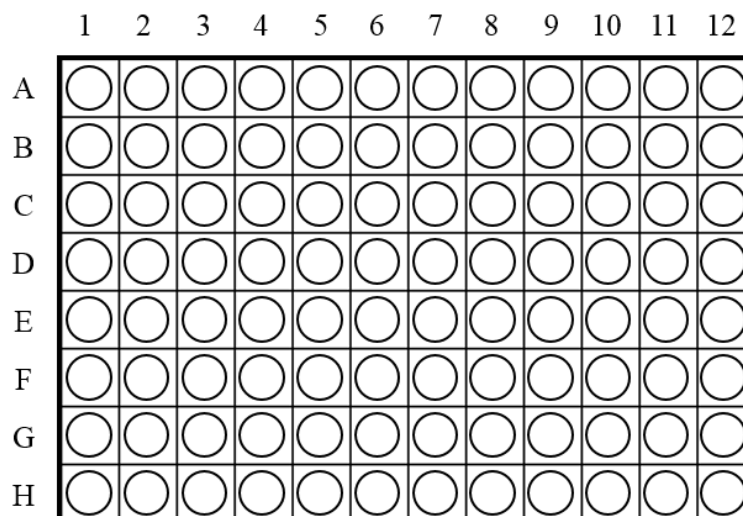


Abbildung 18: Darstellung der Vertiefungen einer 12×8-Mikrotiterplatte.

Für die Visualisierung des Wachstums wurden am folgenden Tag alle Wells der Platte mit 20 µl 2 % iger Resazurin-Lösung befüllt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Dokumentation wurden die Platten fotografiert. Die MIC wurde bestimmt als die Konzentration, bei der die blaue Farbe des Farbstoffes Resazurin (kein Wachstum) zu sehen ist. Der Farbstoff Resazurin diente als Indikator zur Veranschaulichung der Zytotoxizität der Peptidantibiotika. Vitale Zellen sind in der Lage das blaufarbige Resazurin (Absorption bei 600 nm) zur pinkfarbenen fluoreszierenden

Form Resorufin (Absorption bei 570 nm) zu reduzieren. Bei Zellen, deren Wachstum gehemmt ist, erscheint die Lösung daher blau.

3.4.2 Antifungale Aktivität

Die antifungale Aktivität der Peptide wurde anhand der Bestimmung ihrer MIC sowie mithilfe eines Agarplattendiffusionstests charakterisiert. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Norio Takeshita aus der Gruppe Fischer am KIT Standort Westhochschule durchgeführt. Die Pilzkulturen wurden von Dr. Takeshita bereitgestellt.

Bestimmung der MIC

Die für die MIC-Bestimmung verwendeten Fungi waren *Candida tropicalis*, *Aspergillus nidulans* (GR5) und *Magnaporthe oryzae*. Die Fungi wurden auf Agarplatten unter Benutzung eines Kompletmediums (CM) (Zusammensetzung s. Anhang Teil a) über Nacht kultiviert und jeweils etwa 10 ml der erhaltenen Zellsuspensionen für die Experimente vorgelegt. Die Wells der jeweiligen Platten enthielten 10^4 Sporen von *A. nidulans* und 10^2 Sporen von *M. oryzae*, wobei die Suspension aus *M. oryzae* durch Hyphen-Bildung etwas inhomogen erschien. Für die Inokulation wurde *C. tropicalis* mit einem $OD_{600} = 0,003$ bereitgestellt. Die Sporenzahl wurde mikroskopisch bestimmt. Die Vorbereitung der Verdünnungsreihen auf Mikrotiterplatten fand analog zur Beschreibung in Abschnitt 3.4.1 statt. Die Peptid-Startkonzentration betrug 128 oder 256 µg/ml. Die Inkubation nach Resazurin-Zugabe wurde bei 30 °C und für mindestens 20 h durchgeführt. Die Farbintensitäten des Resazurin wurden mit dem Auge täglich geprüft. Die Platten wurden schließlich zur Dokumentation fotografiert und die MIC anhand der Farbe bestimmt.

Agarplattendiffusionstest

In den Plattendiffusionstests, auch Hemmhofstests genannt, wurde der Effekt des unmarkierten HZ auf die pflanzenpathogenen Pilze *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe oryzae* und *Trichoderma harzianum* untersucht. Es wurde eine 17 mM Peptidlösung in 100 µl 50 % EtOH vorbereitet, die dreimal 1:1 auf eine 8,5 mM, 4,25 mM und 2,125 mM Lösung verdünnt wurde. Die Fungi-Kulturen wurden nach einer modifizierten

Beschreibung aus ^[128] mehrere Tage auf CM-Agarplatten angezüchtet. Das Inokulum von *F. oxyporum* besaß $OD_{600} = 0,003$. Die Sporensuspension von *M. oryzae* enthielt pro Well 10^2 Sporen und die von *T. harzianum* 10^4 Sporen. Die inhomogene Suspension von *S. sclerotiorum* enthielt Hyphen und verhinderte in diesem Fall die Bestimmung der Sporenzahl oder des OD_{600} -Wertes. Die Suspensionen wurden auf zugehörige Agarplatten aufplattiert. Danach wurden vier kleine Papierscheibchen mit einer Pinzette auf jede Agarplatte gelegt und jeweils 10 µl der vier verschieden konzentrierten Peptidlösungen mittig auf das zugehörige Scheibchen gegeben. Die zugegebenen Peptidmengen ergeben dann 200, 100, 50 und 25 µg. Anschließend wurden die Kulturen mehrere Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert. Die Farbintensitäten des Farbstoffs Resazurin wurden täglich geprüft. Erste deutliche Ergebnisse wurden nach 3 bis 4 Tagen erhalten. Die Platten wurden fotografiert und ggf. die Größe der Hemmhöfe ausgemessen.

3.4.3 Hämolytische Aktivität

Hämolytische Aktivitäten gegen Human-Erythrozyten wurden durch die Quantifizierung von freigesetztem Hämoglobin getestet. Das benutzte Erythrozyten-Konzentrat stammte aus dem Städtischen Klinikum Karlsruhe.

Waschen der Erythrozyten und Herstellung der Zellsuspensionen

5 ml Erythrozyten-Konzentrat wurden mit 45 ml Tris-HCl-Puffer (172 mM, pH 7,6 bei 4 °C) (Waschpuffer) versetzt und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde dann 10 min bei RT und 1700 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Sediment wurde erneut mit 50 ml Waschpuffer aufgenommen, gemischt und die Suspension erneut zentrifugiert (1700 rpm, 10 min). 1 ml des Erythrozyten-Sediments wurde anschließend nach Entfernen des Überstands 10-fach mit Waschpuffer verdünnt, sodass 10 ml Stamm-Zellsuspension entstand. 500 µl der Stamm-Zellsuspension wurden mit 9,5 ml Tris-HCl-Puffer (172 mM, pH 7,6 bei 37 °C) (Reaktionspuffer) 20-fach verdünnt. Diese Test-Zellsuspension wurde für die Hämolyse-Reaktion 5 min im Heizblock bei 37°C vorgewärmt.

Herstellung der Peptidlösungen

Peptid-Stammlösungen wurden durch Lösung von 1 mg des Peptids in 125 µl DMSO hergestellt (Konzentration: 8 mg/ml). 60 µl dieser Lösung wurden mit 540 µl Reaktionspuffer 1:10 verdünnt, sodass eine Stammlösung mit 0,8 mg/ml Peptidkonzentration entstand. Danach wurde die Stammlösung erneut mit Reaktionspuffer 1:1 verdünnt. Mit dieser verdünnten Peptid-Stammlösung wurden durch Mischung mit dem Reaktionspuffer in drei unterschiedlichen Volumenverhältnissen drei verschiedene Verdünnungsreihen erstellt. Als positive Kontrolle diente 200 µl Triton X-100 (100 % Hämolyse) und als negative Kontrolle wurde 200 µl Reaktionspuffer benutzt. In allen restlichen Eppendorf-Gefäßen befanden sich 200 µl der zu analysierenden verdünnten Peptidlösung.

Durchführung der Hämolyse

Je 200 µl der vorgewärmten Test-Zellsuspension wurden in alle zu testenden Eppendorf-Gefäße gegeben und die Gefäße für 40 min bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Gefäße zentrifugiert (13000 rpm, 10 min). Aus den Gefäßen wurden jeweils 350 µl in zugehörige Küvetten überführt und die Absorption des Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 540 nm am SmartSpecPlus-Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse wurden vom Spektrometer ausgedruckt und mithilfe der Formel

$$HC = \frac{E_{Probe}}{E_{Triton X-100}} \times 100 \%$$

ausgewertet. E_{Probe} ist die Extinktion der Probe, $E_{Triton X-100}$ die Extinktion des Triton X-100. HC gibt hier die prozentuale Hämolyse der Probe bezogen auf 100 % iger Hämolyse durch Triton X-100 an.

3.5 CD-Spektroskopie

3.5.1 Vorbereitung der CD-Proben

CD-Proben in Lösungsmitteln

Für die Bereitstellung von CD-Proben in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln wurde eine Stammlösung des Peptids in MeOH (1 mg/ml) hergestellt. Aus dieser Lösung wurden mehrere Aliquote mit 0,1 mg Peptid in Eppendorf-Gefäßen bereitgestellt und über Nacht unter Vakuum vom Lösemittel befreit. 1 ml des jeweiligen Mediums wurde zum Peptid-Aliquot gegeben und das Peptid durch Ultraschall und Vortex-Einsatz solubilisiert. Aus dieser Peptidlösung mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml wurden 100 µl zur Messung in die Messküvette übertragen. Bei CD-Messungen unter Benutzung von Synchrotron (SR)-Strahlung betrug die Endkonzentration des Peptids in der Messzelle 8 mg/ml.

CD-Proben in Vesikeln

Für Vesikelmessungen wurden für jedes eingesetzte Detergens bzw. Lipid, je nach molarem Verhältnis zum Peptid, passende Stammlösungen in MeOH oder MeOH/H₂O-Mischungen vorbereitet. Die Proben mit Detergentien hatten ein molares Peptid/Detergens (P/D) -Verhältnis von 1:200, die Lipidproben dagegen ein P/L-Verhältnis von 1:50 bis 1:10. Die berechneten Volumina aus diesen Stammlösungen wurden mit Aliquoten aus der Peptid-Stammlösung (0,1 mg) vereint. Die kosolubiliserte Mischung trocknete dann unter einem Luftstrom und über Nacht unter Vakuum. Am nächsten Tag wurde der Probenfilm in den Eppendorf-Gefäßen mit Phosphat-Puffer (10 mM, pH 7,4) unter Ultraschallbehandlung und Schütteln resuspendiert. Für die Herstellung von Vesikeln wurden 5 bis 7 Gefrier-Tau-Zyklen unternommen. Für die Lipide wurde zusätzlich starker Ultraschall und 35 °C Wasserbad (mindestens 20 min) benutzt. Ein Gefrier-Tau-Zyklus beinhaltete: Einfrieren in flüssigem Stickstoff, 5 min Auftauen im Wasserbad bei Raumtemperatur unter Ultraschallbehandlung, Vortexen.

3.5.2 Durchführung der CD-Messungen

CD-Spektren wurden an einem konventionellen CD-Spektropolarimeter und an der SRCD-Beamline UV-CD12 an der ANKA-Synchrotron-Strahlungsquelle am Campus Nord des KIT aufgenommen.

Für die Messung wurden Quarzglas-Küvetten mit 0,1 cm Dicke (SRCD: CaF₂-Küvette, nominell 10 µm) verwendet. Im Wellenlängenbereich von 180-260 nm (SRCD: 170-270 nm) wurden drei aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt, die gemittelt wurden. Als Referenzspektrum wurde das jeweilige Medium ohne Peptid separat gemessen. Die Scangeschwindigkeit betrug 10 nm/min mit 8 s Response-Zeit, einer Datenaufnahme von 0,1 nm und 1 nm spektraler Bandbreite (SRCD: spektrale Bandbreite 0,5 nm, Verweilzeit 1500 ms). Wenn nicht anders angegeben, wurde eine Temperatur von 30 °C gewählt. Nach den Messungen wurden die Spektren von ihren jeweiligen Referenzspektren subtrahiert, geglättet und bei 260 nm auf die Absorbanz 0 referenziert. Für diese Bearbeitung der CD-Spektren sowie die Erstellung der Experimente und Bedienung des CD-Spektropolarimeters wurde die Spectra Analysis-Software von Jasco benutzt.

Die Sekundärstrukturanteile der CD-Spektren wurden mithilfe des DICHROWEB-Servers ^[129] berechnet.

3.5.3 OCD (Orientierte CD) -Spektroskopie

Für die OCD-Messungen wurden ein umfunktioniertes Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter und die SRCD-Beamline UV-CD12 an der Synchrotron-Strahlungsquelle ANKA am Campus Nord des KIT verwendet.

Vorbereitung der OCD-Proben

OCD-Proben wurden aus Peptid- und Lipid-Stammlösungen in MeOH vorbereitet. Die Peptid- und Lipid-Aliquote wurden kosolubilisiert, das Lösungsmittel zuerst unter einem konstanten Luftstrom eingengt und anschließend über Nacht unter Vakuum entfernt. Bei Messungen am konventionellen OCD-Spektrometer wurden Proben mit Lipidmengen von 200 µg eingesetzt, die Peptidvolumina wurden entsprechend dem gewünschten P/L-Verhältnis berechnet. Bei

SROCD-Messungen betragen die P/L-Verhältnisse 1:20 bis 1:200. Pro Probe wurden bei SROCD-Messungen 1,7-17 μg Peptid und 158-215 μg Lipid eingesetzt. Für jede Messung wurde eine reine Lipid-Referenzprobe angefertigt, die vor der Peptid-Probe gemessen wurde.

Die OCD-Proben wurden vor der Messung durch Zugabe von 70 μl milli-Q H_2O resuspendiert. Die Lipid-Vesikel wurden mittels 7 Gefrier-Tau-Zyklen (Beschreibung s. Abschnitt 3.5.1) und unter Benutzung von starkem Ultraschall hergestellt. Das gesamte Volumen der Vesikel-Suspension wurde dann auf eine Suprasil Quarzglas-Scheibe deponiert und unter Luft getrocknet bis ein Probenfilm entstand. Danach wurde die Scheibe 3 h unter Vakuum gelagert und über Nacht in der OCD-Zelle bei 30 °C und unter 96 % iger relativer Luftfeuchtigkeit (gesättigte K_2SO_4 -Lösung) hydratisiert.

Durchführung der OCD-Messungen

Für die Messungen wurden jeweils hausgemachte OCD-Zellen verwendet. Der Aufbau ist in ^[123,124] beschrieben. Die über Nacht hydratisierte Probe wurde am nächsten Tag durch Aufnahme von drei aufeinanderfolgenden Scans in 0,1 nm Intervallen bei einer Scangeschwindigkeit von 10 nm/min, 8 s Response-Zeit, 1 nm Bandbreite und einer Temperatur von 30 °C im Wellenlängenbereich von 180-260 nm durchgeführt. Bei SROCD-Messungen wurden Spektren zwischen 175-270 nm bei einer Bandbreite von 0,5 nm aufgenommen. Die Probe wurde in acht verschiedenen Winkeln gemessen, indem sie zwischen 0° und 315° in 45°-Schritten rotiert wurde. Die bei acht Winkeln aufgenommenen Spektren wurden nachträglich gemittelt, die Referenz subtrahiert und die Elliptizität bei 260 nm auf den Wert 0 korrigiert.

3.6 Festkörper-NMR-Spektroskopie

3.6.1 Vorbereitung der NMR-Proben

Orientierte NMR-Proben

Für die Vorbereitung der orientierten NMR-Proben wurden Peptide und Lipide unter Berücksichtigung des gewünschten molaren Verhältnisses (P/L) in Eppendorf-Gefäßen abgewogen und in 100-200 μl MeOH oder in Mischungen aus MeOH und CHCl_3 gelöst. In den

Messungen betrug die Lipidmenge 5-20 mg, die Peptidmenge dagegen 0,5 mg für ^{15}N -markierte HZ-Analoga oder 0,1-1 mg für ^{19}F -markierte HZ- und ALM-Peptide und 0,5-1,5 mg für PGLa-Peptide. Die Peptid- und Lipidlösungen wurden vereinigt, gut gemischt und auf dünne Glasplättchen ($7,5 \times 12 \times 0,08$ mm) aufgetragen, welche zuvor in MeOH gereinigt wurden. Je nach Lipidmenge wurden 7-20 Glasplättchen verwendet. Die Peptid/Lipid-Filme wurden für ein paar Minuten unter einem Luftstrom und danach mindestens 4 h unter Vakuum getrocknet. Danach wurden die Plättchen aufeinandergestapelt und über Nacht in einer Hydrationsbox mit ges. K_2SO_4 -Lösung bei 48°C gelassen (96 % relative Luftfeuchtigkeit). Daraufhin wurde der hydratisierte Glasstapel zum Schutz vor Dehydration in Parafilm und anschließend mit Polyethylen-Folie umwickelt.

Nicht-orientierte NMR-Proben in Lipidvesikeln

Lipide und Peptide wurden wie bei der Herstellung der orientierten Proben gelöst. Alle Peptid-Proben wurden mit einem P/L-Verhältnis von 1:50 vorbereitet. Die Proben ohne Peptid besaßen 10 mg Lipid. Das Volumen des Lösungsmittels betrug 10-20 μl . Die Lösungen wurden in kleine Glasröhrchen (5 mm Durchmesser, 15 mm Länge) gegeben, unter einem konstanten Luftstrom und anschließend über Nacht unter Vakuum getrocknet. Um Lipidvesikel herzustellen, wurden die Proben durch Zugabe von 20 μl deionisiertem Wasser unter Schütteln und Ultraschallbehandlung (10 min) resuspendiert und danach einige Male eingefroren und wieder aufgetaut. Um die Dehydration der Probe zu vermeiden, wurde das Glasröhrchen mit einem Plastik-Stopfen geschlossen.

3.6.2 Durchführung der NMR-Messungen

Alle NMR-Spektren wurden unter ^1H -Entkopplung (TPPM – *two-pulse phase modulation*) aufgenommen. Die Temperatur wurde über die installierte Einheit reguliert. Als Luftzufuhr-Rate wurde 1200 l/h eingestellt. ^1H -NMR-Messungen vor und nach den ^{31}P -, ^{19}F - und ^{15}N -Experimenten wurden zur Referenzierung mithilfe des auftretenden H_2O -Signals herangezogen. In Abb. 19 werden die aus Glasstapeln bestehenden orientierten NMR-Proben und die Ausrichtungen illustriert. Falls nicht anders angegeben, besitzen orientierte NMR-Proben in dieser Arbeit stets eine parallele Ausrichtung der Membrannormalen N zum Magnetfeld B_0 (0° Orientierung).

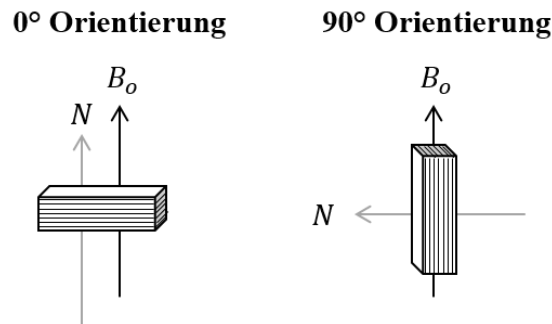


Abbildung 19: Illustration der Ausrichtungen der orientierten NMR-Probe zum Magnetfeld.

^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Für die ^{31}P -NMR-Messungen der Lipide wurde ein ^1H - ^{19}F /X- oder HXY-Flachspulen-Probenkopf von Bruker verwendet. Die Resonanzfrequenz für ^{31}P -Kerne liegt bei 202,46 MHz für einen 500 MHz-Spektrometer (242,8 MHz für 600 MHz). Es wurde eine Hahn-Echo-Pulssequenz^[130] und ^1H -Entkopplung (SPINAL64) unter Verwendung einer 90° -Pulslänge von 5 μs und Echo-Zeit von 30 μs benutzt. Die Messtemperatur betrug 30°C und die Anzahl der Scans wurde je nach Lipidmenge auf 256 oder 512 eingestellt. Konzentrierte Phosphorsäure diente als Referenz für die erhaltenen ^{31}P -NMR-Spektren.

^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ^{19}F -NMR-Spektren der markierten Peptaibole wurden unter Benutzung des $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ -Flachspulen-Probenkopfes von Doty Scientific oder eines hausgemachten $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ -Flachspulen-Probenkopfes bei einer Resonanzfrequenz von 470,6 MHz aufgenommen. Die Ausrichtung der Probe ist in beiden Probenköpfen über eingebaute Goniometer zwischen 0° - (N und B_0 parallel) und 90° -Ausrichtung der orientierten NMR-Probe (N und B_0 orthogonal) einstellbar. In den Experimenten wurde eine typische 90° -Pulslänge von 3,25 μs unter ^1H -Entkopplung (TPPM) verwendet. Die Anzahl der Scans wurde abhängig von der Peptidmenge angepasst und variierte zwischen 1000 und 2500. Die Temperatur wurde in Serienmessungen meist zwischen 10 und 50°C verändert. Vor dem Beginn der Scans in Temperaturserien erfolgte eine Äquilibrationszeit von 600 s. Die Spektren wurden mit einer 100 mM Natriumfluorid-Lösung auf den Wert -119,5 ppm referenziert.

¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ¹⁵N-Messungen wurden mit dem Doppelresonanz-Flachspulen-Resonator (LowE) bei einer Frequenz von 60,7 MHz und mithilfe von Kreuzpolarisationsexperimenten (CP) (Mischzeit: 500 μ s) durchgeführt. Das Experiment wurde häufig über Nacht oder den ganzen Tag über bei einer konstanten Temperatur von 35 °C laufen gelassen. Referenziert wurde mit ¹⁵N-markiertem Ammoniumsulfat auf die chemische Verschiebung von 26,8 ppm.

Zur Erstellung, Bearbeitung und Modifikation der NMR-Experimente und -Spektren wurde die Software Bruker Topspin benutzt.

3.6.3 Festkörper-NMR-Datenanalyse

Die Ergebnisse der Festkörper-NMR-Messungen geben Aufschluss über strukturelle und funktionelle Merkmale des untersuchten Peptids in Lipidmembranen. Dazu wurden in dieser Arbeit die Programme von Dr. Erik Strandberg (bei der Untersuchung des PGLa in DPhPC-Lipidmembranen) und von Dr. Stephan Grage (für die Charakterisierung von HZ und ALM) aus der Arbeitsgruppe Ulrich verwendet. Anhand der Berechnungen wurden Daten über die Peptide HZ und ALM gewonnen, welche ihre Struktur, ihr dynamisches Verhalten und ihre Orientierung in Lipidmembranen beschreiben. Dieser Ansatz wurde von der Gruppe Ulrich bereits erfolgreich angewandt ^[40,131,132]. Die strukturelle Betrachtung geschah unter der Annahme einer bestimmten Peptid-Konformation. Die erhaltenen Parameter sind der Neigungswinkel des Peptids τ , der Rotationswinkel um die Helixachse σ und der dynamische Ordnungsparameter S_{mol} . Sie wurden in Abschnitt 1.4.1 besprochen. Die Daten wurden mithilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (RMSD) ausgewertet, wie u.a. in ^[131] beschrieben.

3.7 Flüssigkeits-NMR

Die Flüssigkeits-NMR-Spektren von HZ wurden in Zusammenarbeit mit Dr. María Ángeles Jiménez López und Héctor Zamora Carreras aufgenommen. Dabei wurde nach der Methodologie verfahren, welche am CSIC in Madrid, Spanien, etabliert wurde.

Vorbereitung der NMR-Proben

3,27 mg des nativen HZ wurden in 3 ml MeOH/CHCl₃ (1:1, Vol/Vol) gelöst. Für drei Messungen in DPC- und SDS-Mizellen sowie in TFE-Lösung wurde die HZ-Lösung in drei 1 ml-Aliquote mit einer Peptidkonzentration von jeweils 1,09 mg/ml aufgeteilt. Für ein molares P/D-Verhältnis von 1:100 wurden entsprechende Stammlösungen von DPC-d38 und SDS-d25 hergestellt und mit der Peptidlösung vereint. Diese Lösung wurde dann unter einem Luftstrom und anschließend über Nacht unter Vakuum getrocknet. Der Probenfilm wurde danach für die NMR-Messung in 500 µl H₂O/D₂O (9:1, Vol %) resuspendiert und 4 µl DSS dazugegeben. Die Lösung wurde etwa 15 min bei 25 °C im Ultraschallbad behandelt und für die Messung in ein NMR-Glasröhrchen gegeben. Im Falle der TFE-Probe wurde das Peptid-Aliquot nach der Trocknung über Nacht direkt in 100 % iger TFE-d₂-Lösung aufgenommen und nach Vortexen zur Messung gebracht.

NMR-Messung und -Auswertung

Die Flüssig-NMR-Spektren wurden an einem 600 MHz Bruker Avance Spektrometer aufgenommen. Die Temperatur wurde durch eine MeOH-Probe kalibriert. 1D-¹H-NMR wurde zur Referenzierung der Spektren und Prüfung der Qualität der Probe eingesetzt. 2D-NMR-Spektroskopie-Experimente ¹H-¹H-COSY (*Correlation Spectroscopy*), ¹H-¹H-TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) und ¹H-¹H-NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) wurden nach gängigen Standardmethoden durchgeführt. TOCSY-Spektren wurden durch Verwendung eines homonuklearen Hartmann-Hahn-Transfers und 60 ms Mischsequenz (DIPS12) aufgenommen. NOESY-Spektren wurden unter Verwendung einer Mischzeit von 150 ms gemessen. ¹H-¹³C-HSQC-Messungen (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) wurden bei natürlicher ¹³C-Häufigkeit durchgeführt. Die Datenmatrix bestand aus 2048×512 Punkten in t_2 bzw. t_1 . In beiden Dimensionen wurden die Phasen der Spektren korrigiert. Die erhaltenen NMR-Daten wurden mithilfe des Topspin-Programms von Bruker prozessiert.

Die ¹H-NMR-Signale des HZ wurden mit dem Programm SPARKY^[133] ausgewertet und nach Standardmethoden zugeordnet^[134]. Die automatische Strukturberechnung anhand der NOE-Zuordnungen erfolgte mithilfe der Software CYANA^[135], welche 7 Zyklen von automatischen Berechnungen von 100 geeigneten Konformeren durchführt. Dort wurden die Daten aus den zugeordneten chemischen Verschiebungen, die integrierten Kreuzsignale aus den NOESY-Spektren und die vom Webserver TALOS+^[136] berechneten Torsionswinkel φ und ψ eingelesen. Die aus CYANA erhaltenen 100 Konformere wurden zu 20 Konformeren mit den

niedrigsten Energien reduziert und die generierten Strukturen des HZ mit dem Programm PYMOL^[137] visualisiert.

3.8 Molekulardynamik (MD) -Simulationen

Die MD-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit Marina Putzu und Dr. Tomáš Kubař durchgeführt. Dazu wurde die von der Gruppe von Prof. Elstner am KIT etablierte Methodologie benutzt.

Die MD-Simulation^[138] ist eine gut geeignete Methode zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Peptiden und Lipidmembranen^[139]. Besonders hilfreich sind neue *extended sampling* Techniken wie die REST2 (*replica exchange with solute tempering*)^[140]. Die Kollaborateure in diesem Projekt verwendeten das Simulationspaket GROMACS^[141], für das eine Implementierung in REST2 verfügbar ist^[142].

Das molekulare System wurde durch folgende Kraftfelder dargestellt: das Lipid (DMPC) mit Slipids^[143], das Peptid HZ dagegen mit Amber parm14SB^[144] und die Wasserumgebung mit TIP3P^[145]. Eine REST2-Simulation wurde für 750 ns mit 6 *replica* durchgeführt. Die benötigte Simulationszeit betrug 30 Tage. Es wurde ein 120 Intel Xeon E5-2630v3-Kernprozessor des Hochleistungs-Computers Justus verwendet, welches an der Universität Ulm installiert ist.

4 Ergebnisse

4.1 Peptidsynthese

Die in Abschnitt „Material und Methoden“ aufgelisteten Peptide wurden erfolgreich und in ausreichender Menge mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt (s. Tab. 9). Die Produkte weisen allesamt eine Reinheit > 98 % auf.

Peptid	Ausbeute		
	[mg]	[μ mol]	[%]*
PGLa	32	16,3	3,3
PGLa CF ₃ -Bpg	25-35	12,3-17	2,5-3,4
HZ	35	29,8	12
HZ CF ₃ -Ala	5,8-33,3	4,7-27,1	1,9-10,8
HZ CF ₃ -Bpg	13-34	10,4-27,1	7-18,1
HZ ¹⁵ N	10-25	8,5-21,3	5,7-14,2
ALM	30,4	15,5	10,3
ALM CF ₃ -Ala	9-10,5	4,5-5,2	3-3,5

Tabelle 9: Ausbeuten der synthetisierten PGLa-, HZ- und ALM-Analoga.

*: Prozent-Angaben bzgl. einer theoretischen Ausbeute von 100 %.

4.2 Charakterisierung von Diphytanoyl-Lipiden

4.2.1 Strukturelle Merkmale von Diphytanoyl-Lipidmembranen mittels ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die weitreichende Nutzung von DPhPC und anderen Diphytanoyl-Lipiden als Modellmembranen ist darin begründet, dass ihre Lipidmembranen in früheren Untersuchungen als äußerst stabil beschrieben wurden. In diesem Abschnitt werden die polymorphen Eigenschaften der Diphytanoyl-Lipide anhand von ^{31}P -Festkörper-NMR-Messungen untersucht.

Mithilfe der ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie von makroskopisch orientierten NMR-Proben (s. Abb. 19) konnte die in der Literatur berichtete DPhPC-Lipidpolymorphie bestätigt werden [27]. Im Temperaturbereich zwischen 10 und 40 °C deutet das NMR-Signal bei einer chemischen Verschiebung von etwa 30 ppm in Abb. 20A auf gute Lipidorientierung und dem Auftreten von lamellaren Lipidphasen hin. Ab etwa 30 °C tritt neben dem orientierten Signal verstärkt ein zweites Signal bei etwa 20 ppm auf, das bei Erhöhung der Temperatur intensiver wird. Aus der Literatur können diese beiden lamellaren Lipidphasen als L_α und L_α' identifiziert werden. Die Entstehung von L_α' wurde als Folge der Reorientierung der PC-Lipid-Kopfgruppe bei partieller Dehydration erklärt [27]. Bei einer maximalen experimentellen Temperatur von 70 °C werden beide lamellare Lipidphasen L_α und L_α' in ähnlichem Maß gebildet. Bei hohen Temperaturen zeigt DPhPC einen Übergang in zwei verschiedene nicht-lamellare Lipidphasen, die als Signale bei ~ 6 ppm bzw. bei 0 ppm erscheinen. Bei dem ersten Signal handelt es sich um die Bildung der invertierten hexagonalen Phase H_{II} , die erst bei höheren Temperaturen auftritt und durch eine geringe Intensität gekennzeichnet ist. Das zweite Signal deutet vermutlich auf die in der Literatur für DPhPC-Lipide vorgeschlagenen kubischen Phasen hin. Sie erscheinen an der isotropen chemischen Verschiebung als quasi frei bewegliche Moleküle. Die kubischen Phasen dominieren bei erhöhter Temperatur und sind bereits bei Umgebungstemperatur schwach erkennbar. Die Ergebnisse zeigen eine durch Erwärmen induzierte DPhPC-Lipidphasenumordnung in der Reihenfolge $L_\alpha \rightarrow L_\alpha' \rightarrow Q \rightarrow H_{II}$. Bei 70 °C koexistieren alle vier Lipidphasen nebeneinander.

Unter kommerziell erhältlichen Diphytanoyl-Lipiden ist DPhPC als der stabilste Lipiddoppelschicht-bildende Vertreter identifiziert worden, während die Lipide mit PG-, PE- und PS-Kopfgruppen selbst bei Umgebungstemperatur und unter den vorherrschenden

Hydrationsbedingungen keine Orientierung als lamellare Lipiddoppelschichten gezeigt haben (Abb. 20B–D). DPhPG und DPhPS weisen bei Erhöhung der Temperatur einen graduellen Phasenübergang von der H_{II} -Phase zu kubischen Phasen auf, während bei DPhPE keine Phasenverschiebungen auftreten und im gesamten Fenster bis 70 °C ausschließlich die invertierte hexagonale H_{II} -Phase gebildet wird.

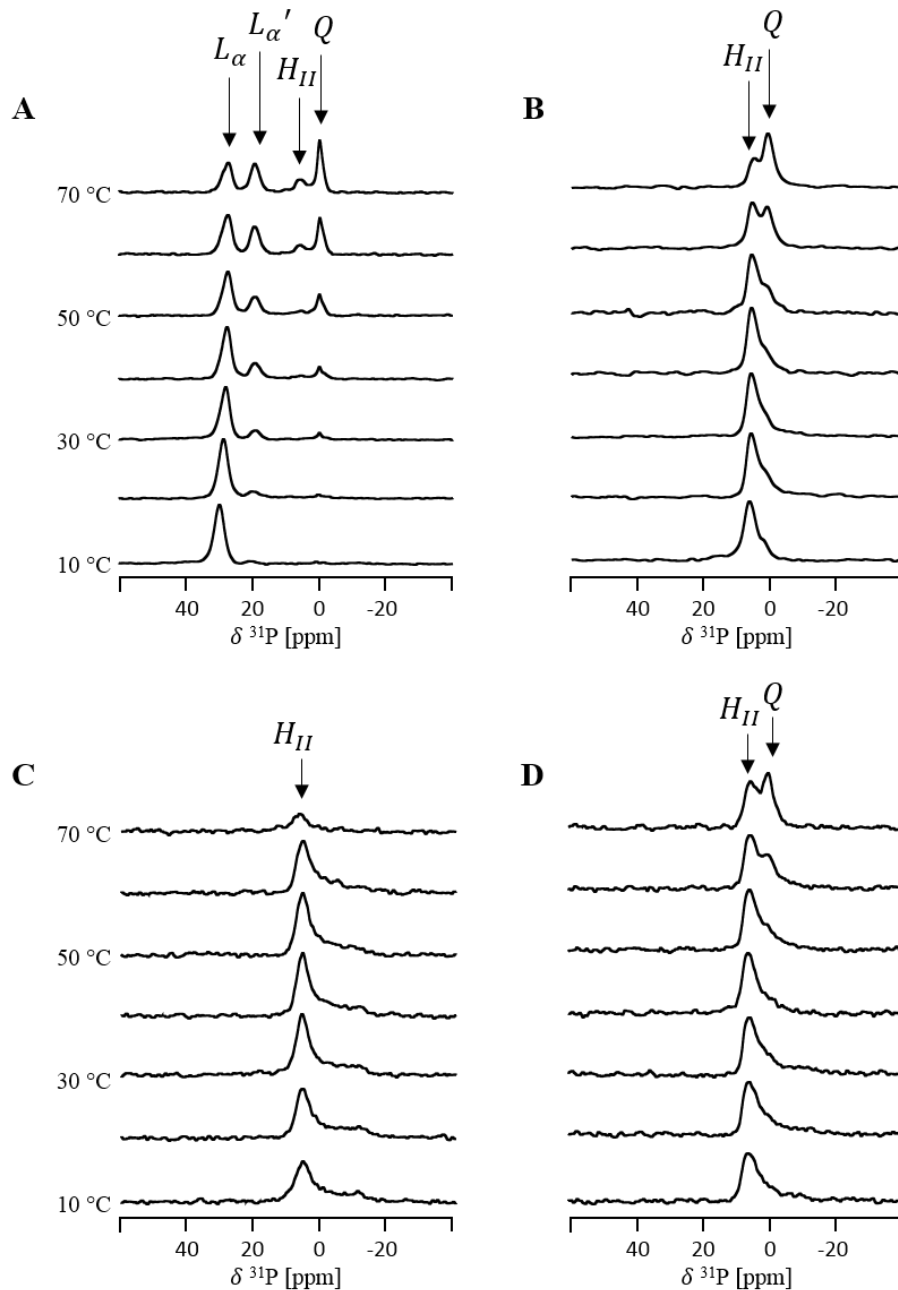


Abbildung 20: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von makroskopisch orientierten Diphytanoyl-Lipiden.
DPhPC (A), DPhPG (B), DPhPE (C) und DPhPS (D).

4.2.2 Einfluss des antimikrobiellen PGLa auf Lipidmembranen aus DPhPC und DPhPG

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen des PGLa mit Diphytanoyl-Lipidmembranen wurden fünf, an jeweils verschiedenen Aminosäure-Positionen der Sequenz mit CF₃-Bpg-markierten Analoga synthetisiert. Da CF₃-Bpg hervorragend für die Substitution von unpolaren Aminosäuren geeignet ist, wurden die Ala- und Ile-Reste an den Positionen 9, 10, 13 und 14 ausgesucht, welche die Mitte des Peptids repräsentieren. Zudem wurde der ¹⁹F-Marker an ⁴Ser am N-Terminus des Peptids inkorporiert. In der folgenden Peptidsequenz sind die markierten Reste hervorgehoben: GMASKAGAI**IA**GK**IA**KVALKAL-NH₂ (s. auch Tab. 6).

Der Vergleich der ³¹P-NMR-Spektren des DPhPC in reiner Form und nach Zugabe von PGLa indiziert, dass das AMP das Phasenverhalten des DPhPC moduliert, indem es die Entstehung der nicht-lamellaren kubischen Phasen zu höheren Temperaturen verzögert und das hydrationsbedingte Auftreten der L_α'-Phase beschleunigt (Abb. 21A). Lamellare Phasen werden im Gegensatz zu nicht-lamellaren Phasen stabilisiert. In anionischen DPhPG-Lipiden treten, in ähnlicher Weise wie in DPhPC, durch PGLa-Anwesenheit abgeschwächte kubische Phasen auf, die Bildung der H_{II}-Phase wird dagegen nicht beeinflusst. Lamellare Phasen sind in DPhPG jedoch nicht erkennbar.

Die Struktur und Orientierung von PGLa in DPhPC- bzw. DPhPG-Lipidmembranen wurde durch ¹⁹F-NMR-Messungen des synthetischen PGLa 13-CF₃-Bpg überprüft (Abb. 21). Die Triplet-Signale, welche aus der dipolaren Kopplung des CF₃-Bpg resultieren, sind in DPhPC bis 50 °C erkennbar, was bedeutet, dass die Peptide in membrangebundenem Zustand vorliegen und sich in ihr diskret orientieren. Die Aufspaltungen sind temperaturunabhängig und ändern sich während der gesamten Temperaturserie nicht. Durch das verstärkte Auftreten von nicht-lamellaren Lipidphasen und der schlechteren Lipidorientierung verschwindet das Triplet allmählich und geht über in das Signal an der isotropen Position der CSA (δ_{iso}), welches für Peptide mit isotroper Bewegung oder bei Ausrichtung der ¹⁹F-Markierung im magischen Winkel von 54,7° charakteristisch ist. In anionischen DPhPG-Lipiden, welche unter den vorherrschenden experimentellen Bedingungen keine Lipiddoppelschichten ausbilden, dominiert aufgrund der Absenz der lamellaren Phasen das isotrope Signal, wobei sich hier eine kleine Fraktion der Peptide bei niedrigen Temperaturen dennoch durch Bindung an die Membran orientieren kann.

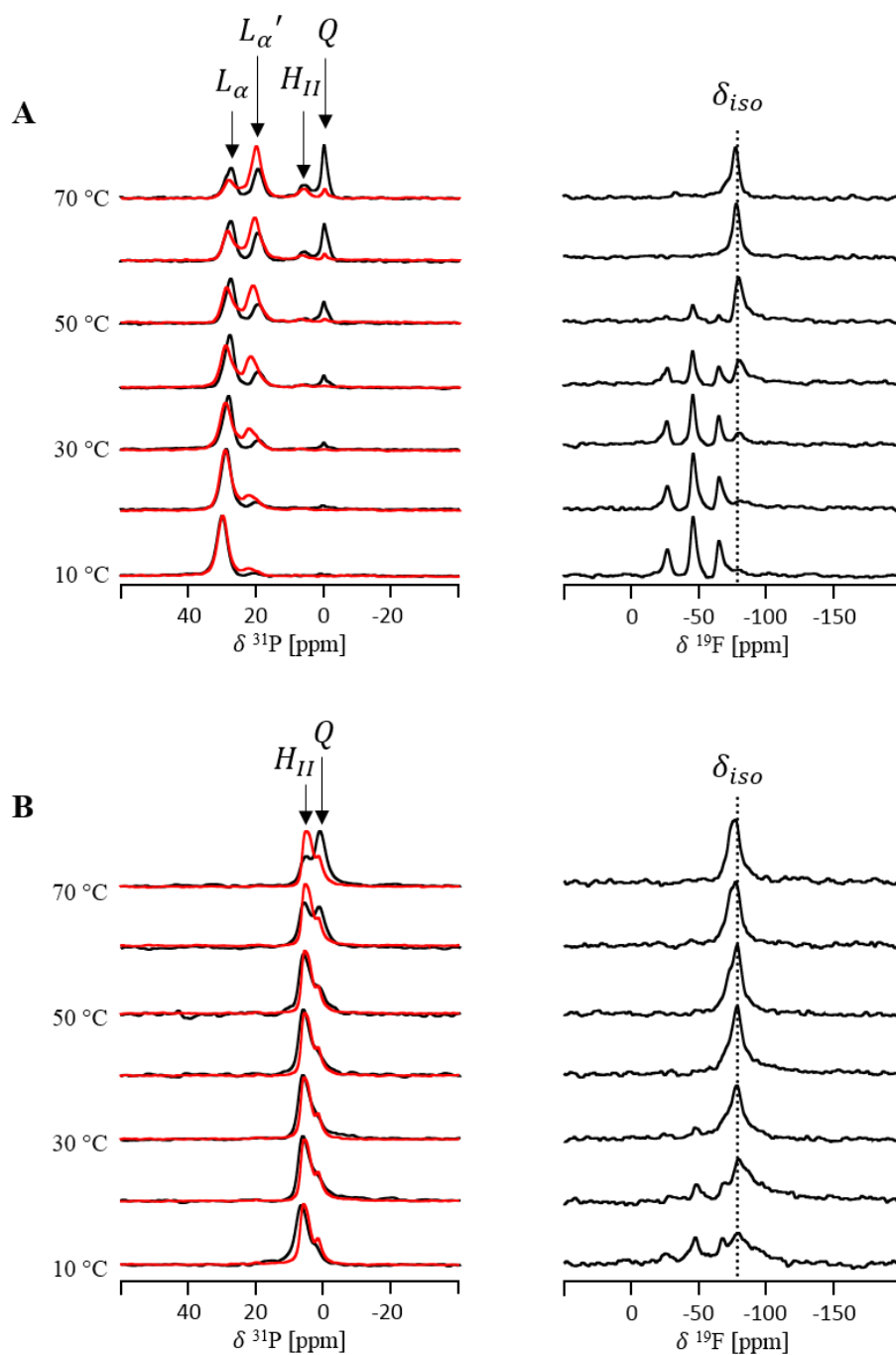


Abbildung 21: Effekt des PGLa auf das Phasenverhalten von DPhPC und DPhPG anhand ^{31}P - und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren.

DPhPC (A, links) und DPhPG (B, links) in purem Zustand (schwarze Spektren) und mit PGLa 13- CF_3 -Bpg bei P/L 1:50 (rote Spektren); entsprechende ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren von PGLa 13- CF_3 -Bpg in DPhPC (A) und DPhPG (B) befinden sich jeweils in der rechten Spalte.

4.2.3 Einfluss des PGLa auf gemischte Lipidmembranen aus DPhPC/DPhPG

Auf die gleiche Weise wie im vorigen Abschnitt wurde hier die Modifizierung des Lipidphasenverhaltens drei verschiedener DPhPC/DPhPG-Mischungen (1:1, 3:1, 9:1, mol/mol) durch PGLa untersucht. Erwartungsgemäß steigt die Orientierung der DPhPC/DPhPG-Lipidmischungen als Lipiddoppelschichten mit sinkendem Anteil an DPhPG (Abb. 22). Die ^{31}P -NMR-Serien der reinen Lipidproben aus DPhPC/DPhPG in 1:1- und 3:1-Mischungen zeigen keine Bildung von lamellaren Phasen unter gegebenen Bedingungen. Nur DPhPC/DPhPG in molarem Verhältnis von 9:1 ist dazu in der Lage (Abb. 22A). Die Bildung der lamellaren und nicht-lamellaren Lipidphasen in den Mischungen ist nicht proportional zum Anteil von DPhPC bzw. DPhPG, was bedeutet, dass in gemischten Lipidsystemen die jeweiligen strukturellen Anordnungen von DPhPC und DPhPG gemeinsam gebildet werden und keine separaten Domänen entstehen. PGLa führt analog zu den Beobachtungen bei DPhPC und DPhPG zu einer Verschiebung des Phasenübergangs lamellar \rightarrow nicht-lamellar zu höheren Temperaturen. Dies hat zur Folge, dass die Peptide sich in allen Mischungen diskret orientieren. Erst bei höheren Temperaturen geht diese Information verloren. Ähnlich wie in reinem DPhPG und im Gegensatz zu reinem DPhPC reicht in DPhPC/DPhPG-Mischungen die schwache Bildung von lamellaren Phasen für die Bindung und Orientierung des PGLa aus, was vermutlich eine Folge der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Peptid und der anionischen Lipidmembran ist.

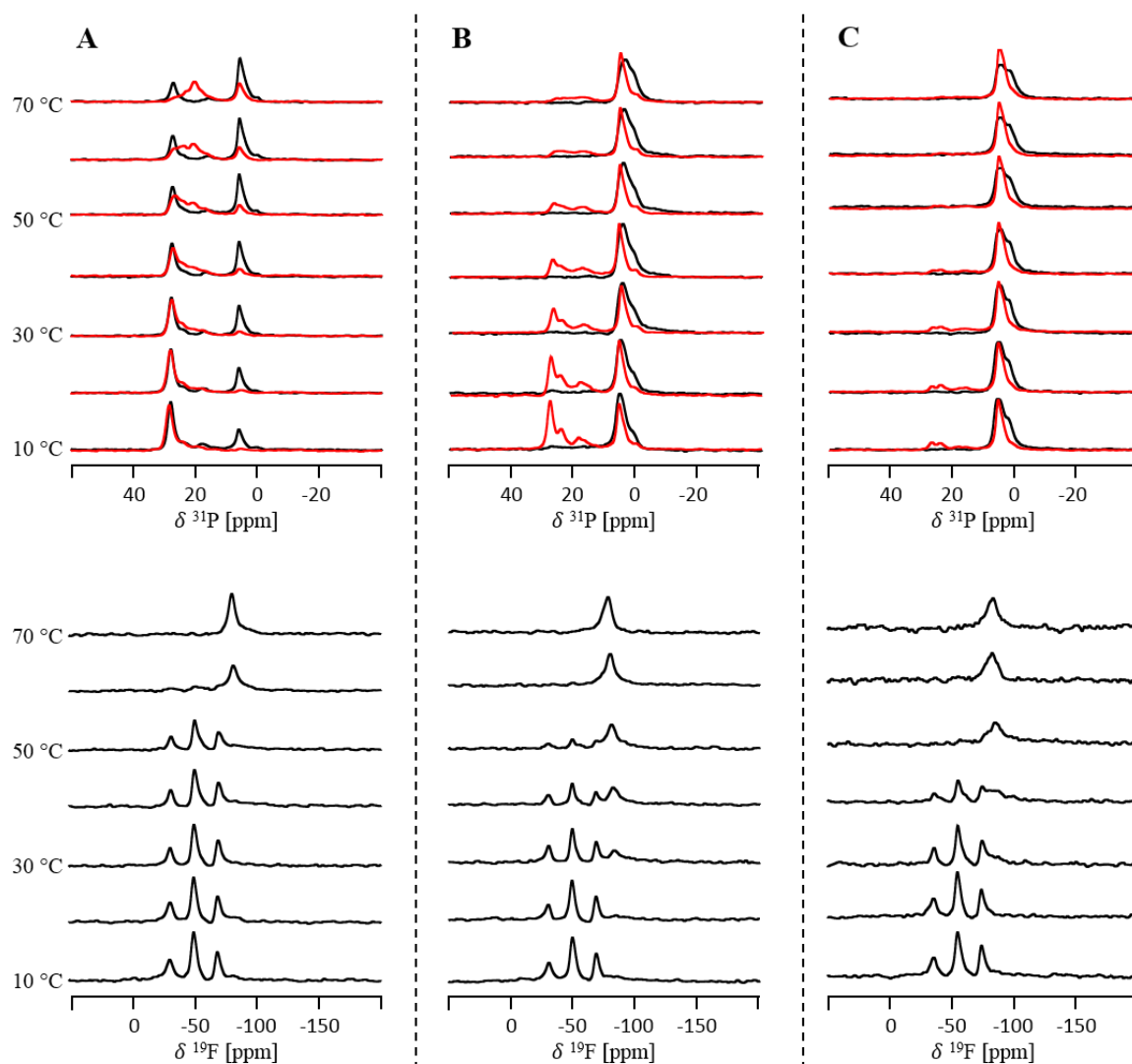


Abbildung 22: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von orientierten Lipidmischungen aus DPhPC/DPhPG. DPhPC/DPhPG in 9:1- (A), 3:1- (B) und 1:1-Verhältnis (C) in purem Zustand (schwarze Spektren) und mit PGLa 13-CF₃-Bpg bei P/L 1:50 (rote Spektren); entsprechende ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren des PGLa 13-CF₃-Bpg sind jeweils in der unteren Reihe dargestellt.

4.2.4 Untersuchung von Lipidvesikel-Proben aus DPhPC und DPhPG unter dem Einfluss des PGLa

Als eine alternative Art der Charakterisierung der Lipide wurden nicht-orientierte Lipidproben aus Vesikeln von DPhPC und DPhPG hergestellt und analysiert. Die ^{31}P -NMR-Spektren von DPhPC-Vesikeln in Abb. 23 zeigen die erwartete charakteristische Form eines Pulverspektrums, bei der alle möglichen Orientierungen der Lipidmoleküle im CSA-Bereich zwischen etwa 35 und -18 ppm vertreten sind. Ab 60 °C wird die einheitliche Vesikelbildung durch das Auftreten von abweichenden Anordnungen der Lipidmoleküle gestört, indiziert durch

das Signal etwa bei $\delta_{iso} \approx 10$ ppm. Dieser Temperatureffekt wird durch PGLa-Präsenz eliminiert (rote Spektren), d.h. PGLa sorgt auch hier für eine Stabilisierung der Bildung der Lipiddoppelschicht bzw. die Gewährleistung der Membranintegrität. DPhPG weist ein typisches Pulverspektrum einer hexagonalen Phase auf und bildet hier selbst bei einem vermutlich höheren Hydrationsgrad der Probe keine lamellare Phase. PGLa erzeugt eine zusätzlich Komponente bei δ_{iso} . Die Form der Spektren lässt die Bildung von nicht-lamellaren Anordnungen wie in den orientierten Proben vermuten.

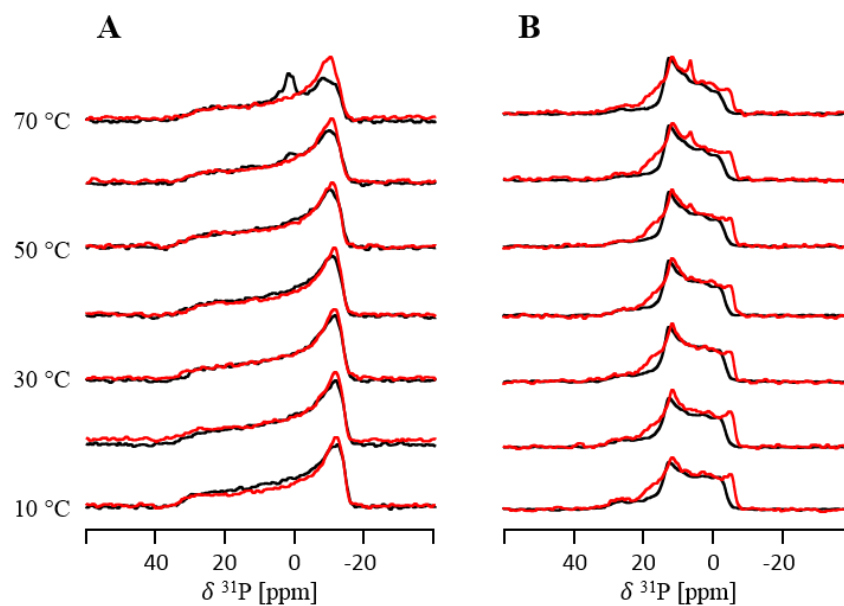


Abbildung 23: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren von nicht-orientierten DPhPC- und DPhPG-Lipidvesikeln.

DPhPC (A) und DPhPG (B) in purem Zustand (schwarze Spektren) und mit PGLa 13-CF₃-Bpg bei P/L 1:50 (rote Spektren).

4.2.5 Bestimmung der Orientierung des PGLa in DPhPC-Lipidmembranen

Bestimmung der PGLa-Orientierung durch ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Da DPhPC bei Umgebungstemperatur als einziges Diphytanoyl-Lipid stabile Lipiddoppelschichten ausbildet, wurde es für die nachfolgenden Orientierungsbestimmungen des Peptids als geeignetes Lipidsystem befunden und verwendet.

Alle synthetisierten ^{19}F -markierten PGLa-Peptide weisen diskrete dipolare Kopplungen auf (Abb. 24). Tab. 10 gibt einen Überblick über die erhaltenen Werte. Die Erhöhung der Peptidkonzentration von einem P/L-Verhältnis von 1:50 auf 1:10 übt keinen großen Effekt auf

die ^{19}F -NMR-Spektren und die Größenordnung der Kopplungswerte aus. Eine mögliche konzentrationsabhängige Reorientierung ist daher nicht zu beobachten. Auch bei einer hohen Konzentration (P/L 1:10) treten keine Pulverspektren auf, wodurch eine Aggregation der Peptide ebenfalls ausgeschlossen werden kann. Die dipolaren Kopplungen der CF_3 -Gruppen der fünf Peptide fluktuieren für eine helikale Konformation wellenförmig in Abhängigkeit der Aminosäureposition (Abb. 24B).

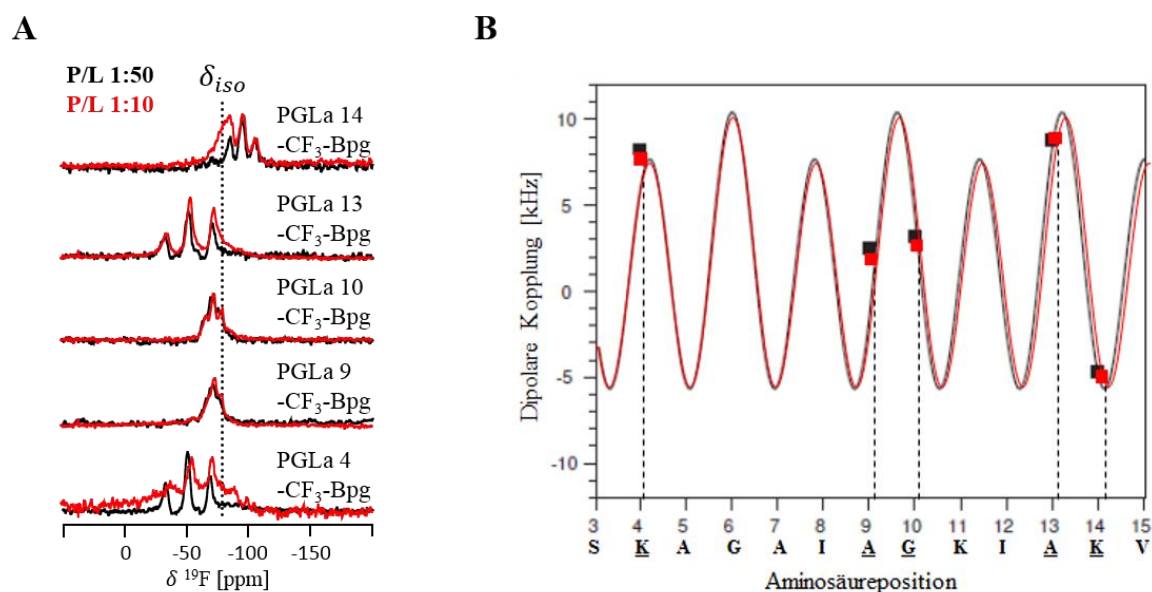


Abbildung 24: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF_3 -Bpg-markierten PGLa und erhaltene dipolare Kopplungen.

(A) ^{19}F -NMR-Spektren in DPhPC bei P/L 1:50 (schwarz) und 1:10 (rot); (B) Darstellung der dipolaren Kopplungen als Funktion der Position in der Helix.

Position der CF_3 -Bpg-Markierung	Dipolare Kopplung [kHz]	
	P/L 1:50	P/L 1:10
PGLa 4- CF_3 -Bpg	8,4	7,7
PGLa 9- CF_3 -Bpg	2,6	1,9
PGLa 10- CF_3 -Bpg	3,3	2,8
PGLa 13- CF_3 -Bpg	8,9	8,9
PGLa 14- CF_3 -Bpg	-4,5	-4,9

Tabelle 10: Experimentell erhaltene dipolare Kopplungen der PGLa CF_3 -Bpg – Peptide in DPhPC-Lipidmembranen.

T = 35 °C

Anhand des $\rho - \tau$ -Diagramms, das in Abb. 25A zu sehen ist, wurde in Abhängigkeit der RMSD-Plots die am besten zu den experimentellen Daten passende Ausrichtung der Peptide und ihr dynamisches Verhalten bestimmt. Die Helixachse des PGLa orientiert sich in DPhPC-Lipiddoppelschichten in beiden Peptidkonzentrationen (P/L 1:50 und 1:10) mit $\tau = 83^\circ$ senkrecht zum Magnetfeld und zur Membrannormalen, und liegt somit auf der Membranoberfläche (*S-state*). Der N-Terminus des Peptids ist dabei schwach Richtung Membrankern geneigt. Der ρ -Winkel von 111° bedeutet, dass die geladene Seite der amphiphilen Helixachse zur wässrigen Phase hin zeigt. Die Mobilität der Peptide ist mit $S_{mol} \approx 0,7$ für ein nicht-insertiertes Peptid auf der Membranoberfläche in erwarteter Größenordnung.

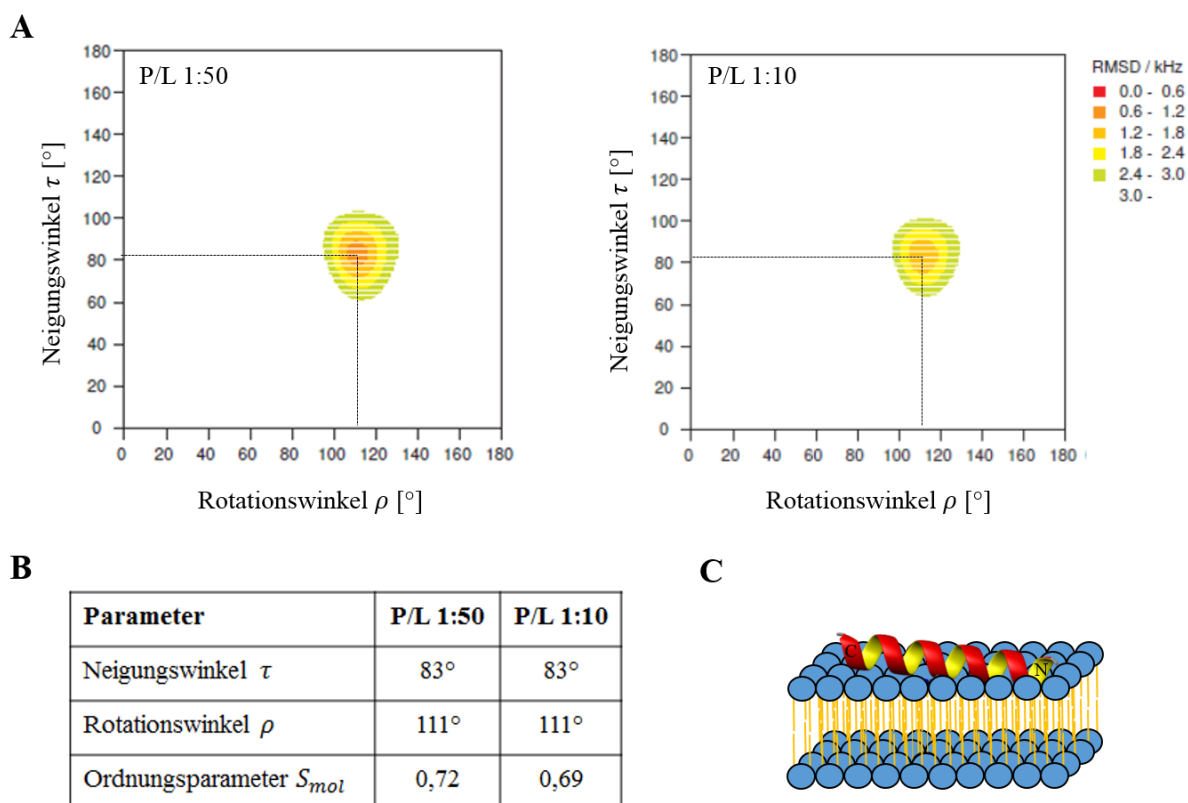


Abbildung 25: Bestimmung der Orientierung und Dynamik des PGLa in DPhPC-Lipidmembranen.

(A) $\rho - \tau$ -Diagramm in Abhängigkeit der RMSD-Werte. (B) Tabellarische Zusammenfassung der aus den ^{19}F -NMR-Messungen erhaltenen Parameter. (C) Illustration der PGLa-Orientierung in der DPhPC-Lipidmembran.

Bestimmung der PGLa-Orientierung durch OCD-Spektroskopie

Die Muster der OCD-Spektren mit den negativen Maxima bei 208 und 222 nm und der positiven Bande bei etwa 190 nm indizieren die senkrechte Ausrichtung der Helixachse des PGLa zur Membrannormalen, was mit den Ergebnissen aus der Festkörper-NMR konform ist

(Abb. 26). Dieses Ergebnis wird nicht nur in DPhPC, sondern auch durch abgeschwächte Signale in DPhPG erhalten, welches in den Festkörper-NMR-Experimenten als ein Lipidsystem befunden wurde, welches unter den dortigen Bedingungen keine lamellaren Phasen ausbilden kann (vgl. Abb. 21).

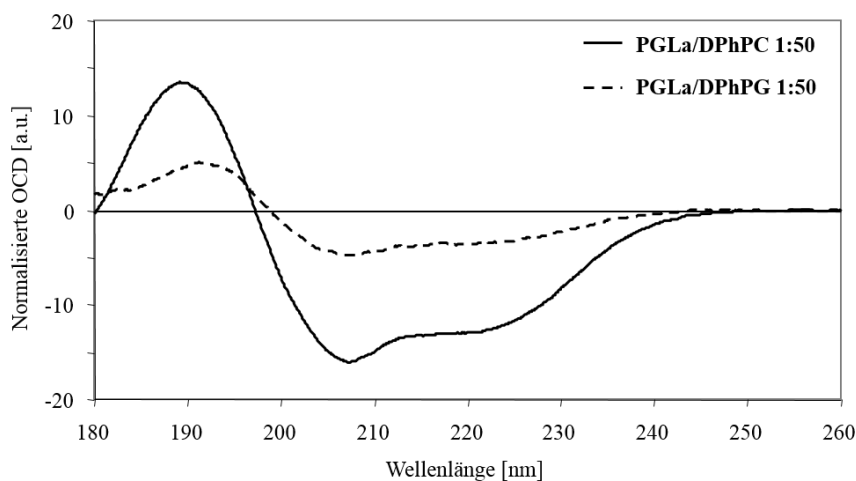


Abbildung 26: OCD-Spektren von PGLa in hydratisierten DPhPC- und DPhPG-Lipidmembranen. Spektren wurden bei 30 °C aufgenommen.

4.2.6 Strukturelle Charakterisierung des PGLa in DPhPC und DPhPG durch CD-Spektroskopie

Die strukturellen Befunde für PGLa durch CD-Spektroskopie sind wie erwartet: PGLa zeigt in membranungebundenem Zustand keine definierte Struktur (*random coil*, negatives Maximum bei 198 nm) und nimmt in hydrophoben Lipidmembranen die α -helikale Struktur an, angedeutet durch die negativen Banden bei 208 und 222 nm und das starke positive Maximum bei 192 nm (Abb. 27). Aufgrund seiner positiven Ladung besitzt PGLa typischerweise eine hohe Affinität zu negativ geladenen Lipidmembranen, wie sie in bakteriellen Zellmembranen vorkommen ^[39]. In DPhPC- und DPhPG-Lipidvesikeln konnten die Bindungspräferenzen charakterisiert werden, denn in deionisiertem Wasser ist die elektrostatische Attraktion und stärkere Bindung des PGLa an die negativ geladenen PG-Kopfgruppen anhand der stärkeren CD-Signale im Vergleich zu DPhPC-Vesikeln ersichtlich. In ionischem Puffer-Medium ist die Signalstärke und somit die Bindung des PGLa an PC-Kopfgruppen durch eine erhöhte Signalintensität ähnlich stark wie in DPhPG, was bedeutet, dass ionische Medien die Bindung der kationischen Peptide verstärken bzw. vermitteln (Abb. 27B). Die mithilfe des Algorithmus CONTIN-LL

bestimmten prozentualen Strukturanteile der CD-Spektren veranschaulichen das Bindungsverhalten der Peptide durch die berechnete Helizität, die in folgender Reihenfolge abnimmt: DPhPG (70-90 %) > DPhPC (30-55 %) > wässrige Medien (5%) (Tab. 11), und in DPhPC-Vesikeln in ionischer Umgebung höher ist als in deionisiertem wässrigem Medium (56 % gegen 32 %).

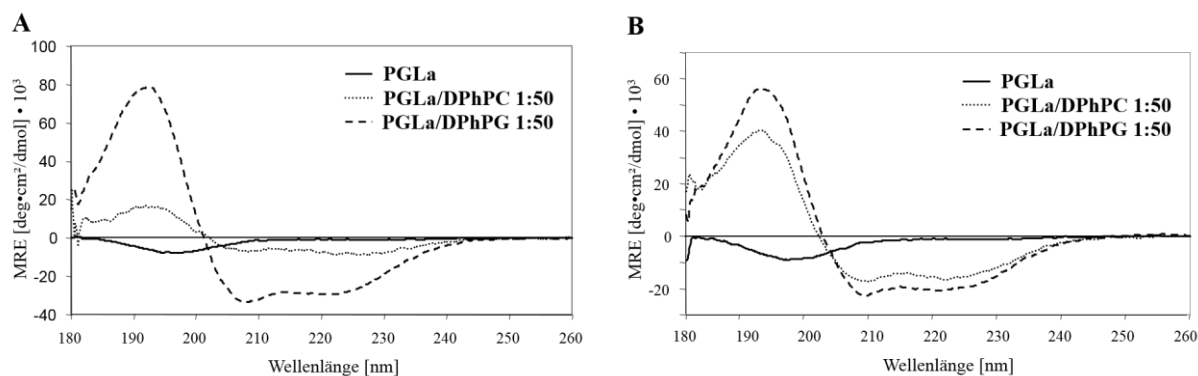


Abbildung 27: CD-Spektren von PGLa in DPhPC- und DPhPG-Vesikeln.
Struktur in deionisiertem Wasser (A) und Phosphat-Puffer (10 mM, pH 7,4) (B).
Spektren wurden bei 30 °C aufgenommen.

System		Strukturanteile des PGLa [%]			
Medium	Peptidzustand	Helix	unstrukturiert	andere	RMSD
H ₂ O	frei	5,1	52,8	42,1	0,39
	DPhPC (1/50)	32,5	40,1	27,4	0,043
	DPhPG (1/50)	91,3	0,0	8,7	0,091
PP	frei	5,2	55,4	39,4	0,296
	DPhPC (1/50)	55,9	28,1	16,0	0,058
	DPhPG (1/50)	72,4	11,1	16,5	0,03

Tabelle 11: Bestimmung der Strukturanteile des repräsentativen PGLa mittels CONTIN-LL-Algorithmus.

PP: Phosphat-Puffer (10 mM, pH 7,4)

4.3 Untersuchung der Struktur und Funktion der Peptaibole HZ und ALM

4.3.1 Biologische Aktivität von HZ

Für die natürlich vorkommenden AMP ist die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von grundlegender Bedeutung. Für die Forschung ist sie eine der wichtigsten zu untersuchenden Eigenschaften, denn das primäre Ziel der Forschungen ist es AMP als Ersatzantibiotika in den Markt zu bringen, um die Ausbreitung von gefährlichen resistenten Mikroben nachhaltig unter Kontrolle zu kriegen. Da auch Peptaibole zu diesen membranmodifizierenden Peptiden gehören, liegt es nahe sie in dieser Hinsicht zu charakterisieren. Im Gegensatz zu ALM wurde die biologische Aktivität von HZ bisher nie beschrieben und wird hier zum ersten Mal analysiert.

Antibakterielle Aktivität

Die antibakterielle Aktivität der HZ-Peptide wurde durch die Bestimmung ihrer MIC gegen ausgewählte bakterielle Erreger analysiert. Als Vergleich zu HZ wurde hier der MIC-Test von nativem ALM gegen einige Bakterienstämme durchgeführt.

In Abb. 28 ist die Fotoaufnahme der Mikrotiterplatte nach dem Ende des Resazurin-Farbumschlags exemplarisch im Falle von *B. subtilis* zu sehen.

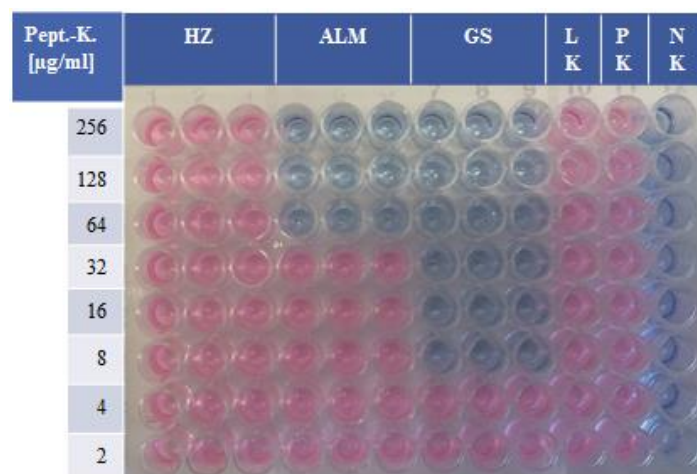


Abbildung 28: Repräsentative Ergebnisse der MIC-Bestimmung von HZ, ALM und dem Kontrollpeptid GS gegen *B. subtilis*.

LK: Lösungsmittelkontrolle; PK: Positive Kontrolle ohne Peptidzugabe; NK: Negative Kontrolle ohne Bakterienzugabe; Pept.-K.: Peptidkonzentration.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder das native HZ noch seine ^{19}F -markierten Peptid-Analoga nennenswerte Aktivitäten gegen bakterielle Erreger aufzeigen (Tab. 12). Abgesehen von einer sehr schwachen Aktivität des nativen HZ gegen das Gram-positive *S. aureus* (128 $\mu\text{g/ml}$) liegen alle experimentell bestimmten MIC der HZ-Peptide oberhalb von 256 $\mu\text{g/ml}$, der Grenzkonzentration in den Tests. Das native ALM dagegen ist bekannt dafür, dass es besonders Gram-positive Bakterien hemmt. In diesen Tests konnte eine geringe Aktivität gegen *B. subtilis* (64 $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 31) und eine sehr schwache Inhibition des *S. xylosus* (256 $\mu\text{g/ml}$) gefunden werden. Alle hier analysierten Peptaibole sind, wie aus Erfahrungen aus früheren Untersuchungen zu erwarten war ^[68], nicht aktiv gegen das Gram-negative *E. coli*.

Bakterium		MIC [$\mu\text{g/ml}$]			
		HZ	HZ CF ₃ -Ala	HZ CF ₃ -Bpg	ALM
<i>E. coli</i>	Gram-negativ	> 256	> 256	> 256	> 256
<i>S. aureus</i>		128	> 256	> 256	n. a.
<i>S. xylosus</i>	Gram-positiv	> 256	> 256	> 256	256
<i>E. faecalis</i>		> 256	> 256	> 256	n. a.
<i>B. subtilis</i>		> 256	> 256	> 256	64

Tabelle 12: Ergebnisse der MIC-Bestimmung von HZ-Peptiden gegen bakterielle Erreger.

Die Untersuchung der Biofilminduktion des HZ wurde anhand der Beobachtung der bakteriellen Atmungsaktivität gegen *S. aureus* und *E. faecalis* durchgeführt. In Abb. 29 sind die Atmungsintensitäten veranschaulicht. Die dargestellte Absorptionsdifferenz zwischen den Wellenlängen 570 und 600 nm, den Absorptionsmaxima von Resorufin bzw. Resazurin, gibt Aufschluss über die Atmungsaktivität der Peptide ^[126]. Die Zellatmung wurde nach 3, 24 und 48 h beobachtet und danach die Platten mikroskopisch auf Biofilm-Bildung überprüft. Für HZ konnte keine Bildung von Biofilmen der Bakterienkulturen nachgewiesen werden. Über die Atmungsüberwachung wurde neben dem MIC auch die minimale bakterizide Konzentration (MBC) des Peptids ermittelt, bei der das Antibiotikum gerade noch den Zielorganismus abtötet. Der MBC des HZ gegen *S. aureus* beträgt 256 $\mu\text{g/ml}$ und gegen *E. faecalis* > 256 $\mu\text{g/ml}$, was seine schwache antibakterielle Aktivität gegen das Gram-positive *S. aureus* bekräftigt.

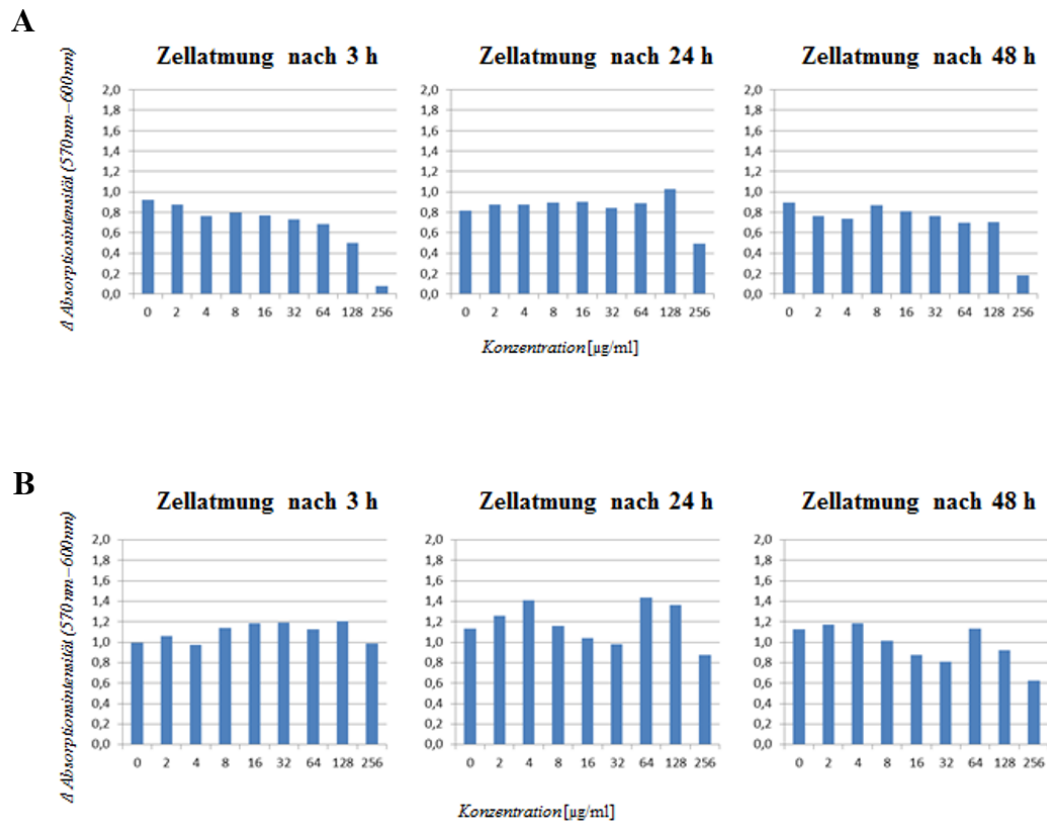


Abbildung 29: Bestimmung der bakteriellen Atmungsaktivität nach Behandlung mit HZ in verschiedenen Konzentrationen.

Atmungsaktivität von (A) *S. aureus* und (B) *E. faecalis*.

Antifungale Aktivität

Die Beschreibung der antifungalen Eigenschaften der Peptaibole ist aufgrund des antagonistischen Verhaltens ihres Herkunftsorganismus *Trichoderma* gegen andere Pilze in ihrem Lebensraum von großer Bedeutung [83,84]. In diesem Konkurrenzkampf haben es die *Trichoderma* oft auf pflanzenpathogene Pilze abgesehen und sind daher als mögliche biologische Schädlingsbekämpfer besonders interessant für die Industrie. Besonders Peptaibole spielen hierbei eine wichtige Rolle, da einige von ihnen das Wachstum der benachbarten Fungi biologisch kontrollieren können. Aus diesem Grund wurde die antifungale Aktivität des HZ untersucht.

Wie bereits bei der Prüfung der antibakteriellen Aktivität wurde die MIC der Peptide gegen einige als Pflanzen- und Humanpathogene bekannten Pilzstämme getestet. *C. tropicalis* und *A. nidulans* gehören zu Pilzarten, die u.a. Menschen und Tiere befallen können. HZ und ALM weisen in den MIC-Bestimmungen keine Aktivitäten gegen diese beiden Arten auf, hemmen jedoch auf eine moderate Art den Fungus *M. oryzae*, welcher weltweit als einer der

gefährlichsten fungalen Pathogene gilt und den sogenannten „Reisbrenner“ (*rice blast*) verursacht [146]. Die MIC beträgt für beide Peptaibole ALM und HZ sowie die CF₃-Ala-markierten HZ-Analoga 16-32 µg/ml (Tab. 13). Die Aktivität der Peptide gegen den pflanzenpathogenen Fungus *S. sclerotiorum* konnte nicht erfasst werden, da der Farbumschlag des Resazurin nicht wie erwartet erfolgte. Vermutlich ist der Grund dafür in der inhomogenen Hyphen-Suspension zu finden. Der Antagonismus wurde evaluiert, indem die Aktivität des HZ gegen einen Vertreter seines eigenen Stamms *T. harzianum* untersucht wurde, dem Pilz, aus dem bisher die meisten Harzianine isoliert wurden. Erwartungsgemäß sind sie nicht aktiv und der MIC beträgt > 128 µg/ml. In weiteren Experimenten wurde die Aktivität von einer molaren 1:1-Mischung aus HZ und ALM betrachtet. Hierbei offenbart sich ein leichter verstärkender Effekt der beiden Peptaibole, da ihre Mischung eine leichte Aktivität gegen *A. nidulans* und *C. tropicalis* vorweist (128 bzw. 64 µg/ml). Die Aktivität gegen *M. oryzae* verstärkt sich durch Kombination der Peptaibole dagegen nicht.

Pilz	MIC [µg/ml]			
	HZ	HZ CF ₃ -Ala	ALM	HZ + ALM (1:1)
<i>A. nidulans</i>	> 128	> 128	> 128	128
<i>C. tropicalis</i>	> 128	> 128	> 128	64
<i>M. oryzae</i>	16-32	16-32	16-32	16-32
<i>S. sclerotiorum</i> *	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
<i>T. harzianum</i>	> 128	> 128	--	--

Tabelle 13: Bestimmung der MIC gegen ausgewählte Fungi-Stämme.

*: keine Daten wegen Hyphen-Bildung; nicht analysierbar.

Die Agarplattendiffusionstests indizieren eine weitere selektive Wirkung des nativen HZ auf das Wachstum des Pflanzenpathogens *F. oxysporum*. Nach 5 Tagen Inkubation der Kultur bei 30 °C wurden Hemmhöfe beobachtet, wobei eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration bzw. Menge des HZ und den Durchmessern der Hemmhöfe besteht (Abb. 30 und Tab. 14). Die Durchmesser der Hemmzonen wurden als Maß für die Inhibition verwendet. Die lichtmikroskopischen Fotoaufnahmen der Platte innerhalb und außerhalb der Hemmhöfe zeigen, dass *F. oxysporum* nicht komplett abgetötet wird, denn auch in der Hemmzone sind

Hyphen in Form von filamentösen Strukturen zu erkennen. Das deutlich abgeschwächte Auftreten verweist vielmehr auf eine Hemmung des Wachstums.

Fusarium oxysporum

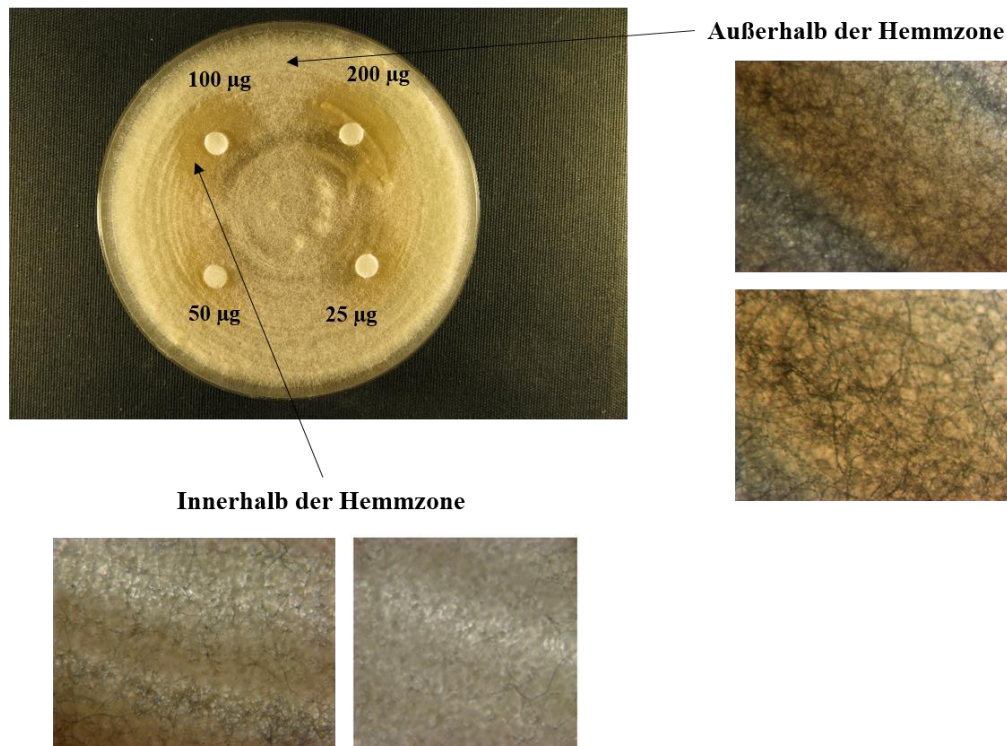


Abbildung 30: Fotoaufnahmen des Agarplattendiffusionstests des HZ gegen *F. oxysporum*. Aufnahmen wurden nach 5 Tagen Inkubation bei 30 °C gemacht. Die vier Scheiben wurden mit verschiedenen Peptidmengen (200, 100, 50, 25 µg) inkubiert.

In Tab. 14 sind die gemessenen Hemmzonen des *F. oxysporum* aufgelistet. Die verwendeten HZ-Mengen bzw. Konzentrationen sind proportional zu den Größen der Hemmzonen, was indiziert, dass eine konzentrationsabhängige Inhibition vorliegt. In *T. harzianum*, *M. oryzae* und *S. sclerotiorum* sind vergleichbare Resultate nicht gefunden worden, wobei für die letzteren beiden Pilzkulturen keine homogenen Zellsuspensionen zubereitet werden konnten. Ein erkennbares Wachstum der Kultur aus *S. sclerotiorum* konnte auch nach mehreren Tagen Inkubation nicht registriert werden.

Menge HZ [µg]	Durchmesser der Hemmzone [mm]			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>M. oryzae</i> *	<i>S. sclerotiorum</i> *	<i>T. harzianum</i>
200	14,8	n. a.	n. a.	0
100	11,4	n. a.	n. a.	0
50	8,2	n. a.	n. a.	0
25	4,9	n. a.	n. a.	0

Tabelle 14: Ergebnisse der Agarplattendiffusionstests des nativen HZ anhand der Messung der Hemmzonen.

*: nicht analysierbar

Hämolytische Aktivität

Für die Berücksichtigung von AMP als alternative Antibiotika müssen auch ihre toxischen Nebenwirkungen überprüft werden. Ein solcher essentieller Test ist die Bestimmung ihrer Aktivität gegen Erythrozyten. Eine starke hämolytische Aktivität der antibiotischen Substanz erschwert in den meisten Fällen eine zukünftige Verwendung in der klinischen Forschung.

Der Test der hämolytischen Aktivität wurden für das native HZ und ein repräsentatives CF₃-markiertes Peptid-Analogon, HZ 4-CF₃-Bpg, durchgeführt. Die hämolytische Wirkung von ALM-Peptiden ist aus der Literatur bekannt ^[79]. In den Untersuchungen infolge dieser Arbeit zeigt auch das kleinere Peptaibol HZ hämolytische Wirkungen (Abb. 31 und Tab. 15). Der ermittelte HC₉₀-Wert von nativem HZ beträgt 74 µg/ml, d.h. es wirkt bei dieser Konzentration stark hämolytisch. Die Hälfte der Erythrozyten werden bei 53 µg/ml zerstört, was für eine effektive Hämolyse spricht. Das markierte HZ 4-CF₃-Bpg ist mit einem HC₉₀ = 23,6 µg/ml sogar stärker wirksam. Die CF₃-Markierung führt also zu einer fast dreimal effektiveren Hemmung von roten Blutkörperchen.

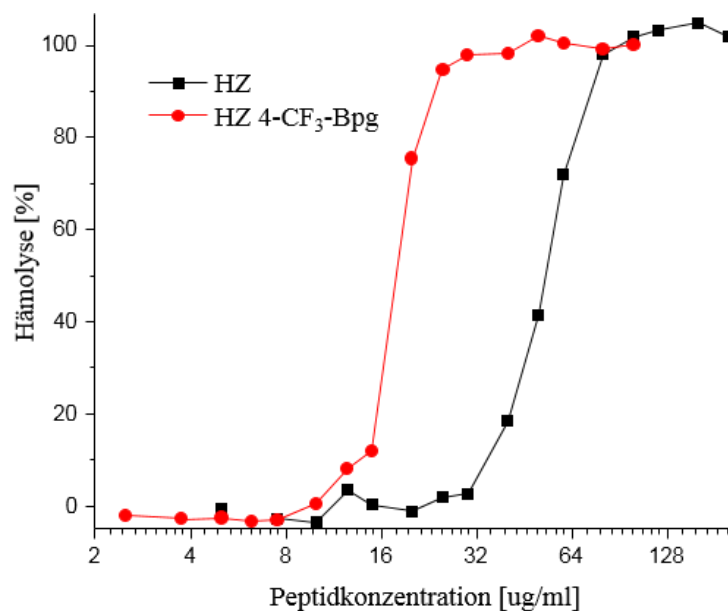


Abbildung 31: Induzierte Hämolyse von HZ und HZ 4-CF₃-Bpg in Abhängigkeit der Peptidkonzentration.

Peptid	Hämolytische Konzentration [µg/ml]			
	<i>HC</i> ₁₀	<i>HC</i> ₂₅	<i>HC</i> ₅₀	<i>HC</i> ₉₀
HZ	34,1	42,5	53	74
HZ 4-CF ₃ -Bpg	13,7	16	17,8	23,6

Tabelle 15: Hämolytische Konzentrationen von HZ und HZ 4-CF₃-Bpg.

Angegeben sind die Konzentrationen, die zu 10, 25, 50 und 90 % Hämolyse führen.

4.3.2 Strukturelle Untersuchungen an HZ

In der bisher einzigen Publikation wurde für HZ anhand von Flüssigkeits-NMR-Daten eine β -*bend ribbon*-Struktur mit einem H-Brückenmuster 4→1 vorgeschlagen^[105], wobei dieser Befund im Gegensatz zu der ALM-Struktur rein qualitativ war. Von einer detaillierten Strukturanalyse des HZ wurde jedoch abgesehen. In dieser Arbeit wurden gleich mehrere Methoden wie CD, Flüssigkeits- und Festkörper-NMR und MD kombiniert, um die strukturellen Merkmale des HZ im Detail zu analysieren, speziell in Hinblick auf seinen strukturellen Eigenschaften in membrangebundener Form.

Struktur durch CD-Spektroskopie

Durch die Methode der CD-Spektroskopie wurden allgemeine Sekundärstrukturelemente des HZ charakterisiert. Die Untersuchung schloss die ^{19}F -markierten Peptid-Analoga mit ein, womit eine mögliche Strukturmodifizierung des nativen Peptids durch die Inkorporierung der ^{19}F -Labels analysiert wurde, was besonders für die nachfolgenden Festkörper-NMR-Untersuchungen von Wichtigkeit ist.

In deionisiertem Wasser und in Phosphat-Puffer (10 mM, pH 7,4) konnten die meisten HZ-Peptide aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität nicht solubilisiert werden. Die ionische Puffer-Lösung übt dabei keinen Effekt auf die Löslichkeit aus. Die CD-Spektren mit schwachen Signalen in Abb. 32 deuten darauf hin. Im Falle von HZ 5-(*R*)- CF_3 -Ala und HZ 4- CF_3 -Bpg sind allerdings negative Banden zu erkennen, jeweils bei 198 und 202 nm, was indiziert, dass HZ-Peptide bei ausreichender Löslichkeit in wässriger Lösung unstrukturiert sind (*random coil*).

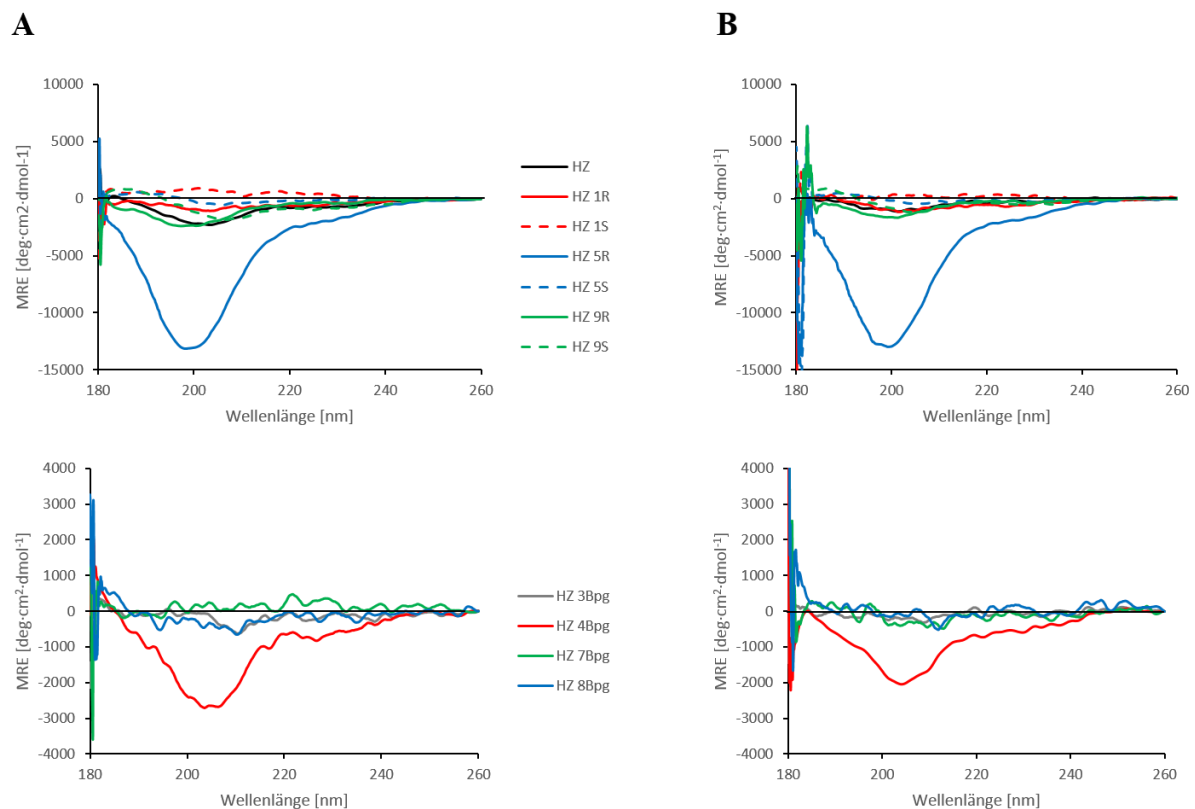


Abbildung 32: CD-Spektren von HZ und HZ-Analoga in wässrigen Medien.
Spektren in deionisiertem H_2O (A) und Phosphat-Puffer (10 mM, pH 7,4) (B) bei 30 °C.

In reinem TFE sind die hydrophoben HZ-Peptide viel besser löslich und zeigen im Gegensatz zu wässrigen Lösungen ein ähnliches charakteristisches CD-Bandenmuster. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Inkorporierung der ^{19}F -Markierung die strukturellen Eigenschaften des HZ nicht beeinflusst, weil die Muster der CD-Spektren voneinander nicht abweichen. Die Spektren weisen positive Banden im Wellenlängenbereich 185-190 nm und ein ausgeprägtes negatives Maximum bei ~ 203 -205 nm auf (Abb. 33), deutlich unterscheidbar von dem CD-Muster einer klassischen α -Helix mit Banden bei 192 nm (positiv) sowie 208 und 222 nm (negativ) und dem CD-Spektrum eines unstrukturierten Peptids (negativ bei 198 nm). Das Minimum bei 205 nm geht bei höheren Wellenlängen in eine schwache Schulter bei 225-230 nm über und schwächt kontinuierlich ab. In der Literatur wurde ein ähnliches Auftreten der CD-Banden mit der Bildung von 3_{10} -Helices ^[147] und β -bend ribbon spiral ^[71] in Zusammenhang gebracht, wobei auch bekannt ist, dass beide Strukturen von Aib-Resten induziert werden können ^[65] (s. auch Abschnitt „Diskussion“).

In zwitterionischen (DPC) und anionischen (SDS) Detergentien zeigen die beobachteten CD-Spektren ähnliche Charakteristika (Abb. 34). Dies indiziert die Bindung der HZ-Peptide an die hydrophoben Micellen, wodurch sie ihre typische Struktur annehmen. Die Ladung der Detergentien hat dabei keine Wirkung auf die Struktur und Bindungseigenschaften der Peptid-Analoga.

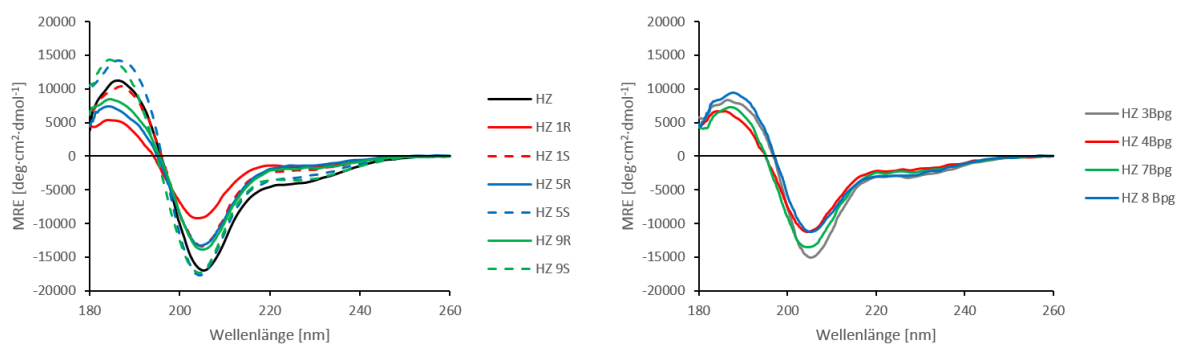


Abbildung 33: CD-Spektren von HZ und HZ-Analoga in TFE.
T = 30 °C.

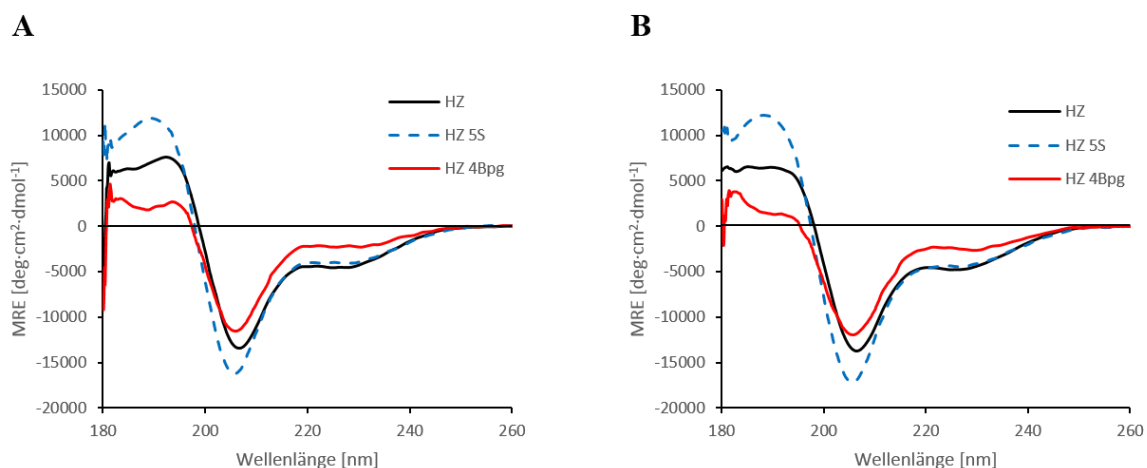


Abbildung 34: CD-Spektren von HZ und ausgewählten HZ-Analoga in DPC und SDS.

Spektren in DPC- (A) und SDS-Mizellen (B) jeweils bei einem P/D-Verhältnis von 1/200 und 30 °C.

Das native HZ behält in Lipid-Vesikeln seine Konformation, unabhängig von der Temperatur und der vorherrschenden Lipidphase in DMPC ($T_m = 23$ °C). In der Gel-Phase (10 °C) sind die Signale schwächer und werden mit steigender Temperatur stärker (Abb. 35A). Die Länge der Lipid-Acyllketten bzw. die Dicke der Membranen wurde von DDPC (C_{10}) zu DErPC (C_{22} , einfach ungesättigt) erhöht. Es konnten jedoch keine strukturellen Änderungen festgestellt werden, ebenso nicht bei Verwendung des DPhPC (Abb. 35B).

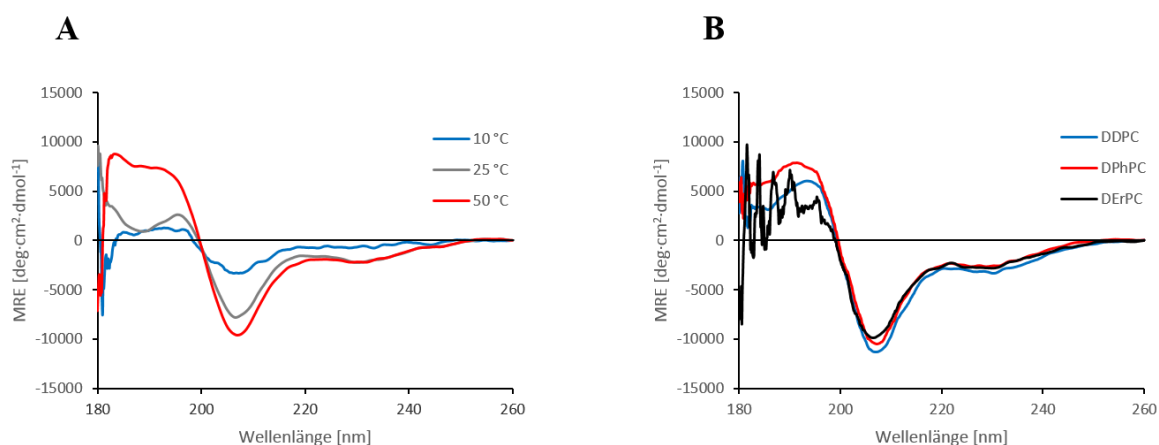


Abbildung 35: CD-Spektren von HZ in Lipidvesikeln.

(A) Spektren in DMPC (P/L 1:20) bei variierender Temperatur; (B) Spektren in unterschiedlichen Lipid-Vesikeln (P/L 1:20) bei 30 °C.

Das einheitliche Auftreten der CD-Banden des HZ wurde strukturell evaluiert, indem ein repräsentatives SRCD-Spektrum des Peptaibols in 50 % iger TFE-Lösung aufgenommen wurde (Abb. 36). Durch Verwendung von Synchrotron-Strahlung können verlässliche Spektren im Wellenlängenbereich unter 190 nm erhalten werden. Die Berechnungen der Strukturanteile aus den CD-Spektren sind in Tab. 16 dargestellt. Es wurde der als Set 2 bezeichnete Datenset der Algorithmen im DICHROWEB-Server ^[129] verwendet, welcher speziell die 3_{10} -helikalen Anteile berechnet. Demnach besitzt die Struktur des HZ etwa gleiche Anteile aus 30-35 % α -Helix und nicht-definierbaren Strukturen und ist nur zu 10 % 3_{10} -helikal, obwohl die Banden eine starke Ähnlichkeit zu CD-Spektren von 3_{10} -Helices zeigen. Jedoch sind in zwei aus drei Berechnungsmethoden die Abweichungen der Ergebnisse relativ hoch (NRMSD > 0,1).

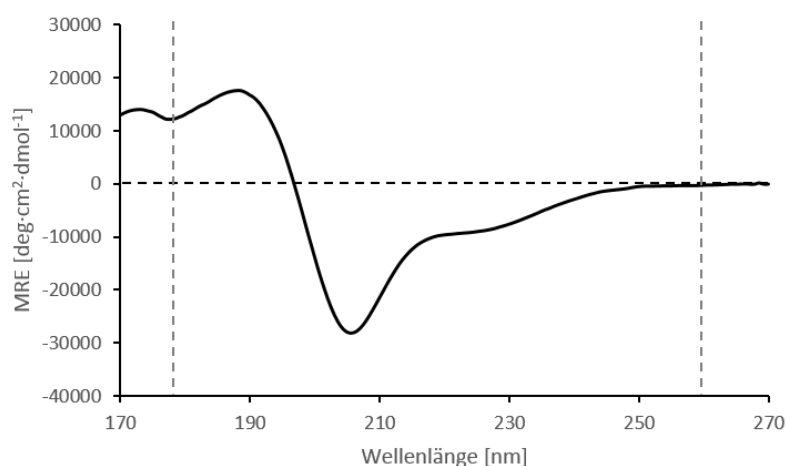


Abbildung 36: SRCD-Spektrum von HZ in 50 % TFE-Lösung.

TFE-Lösung in Phosphat-Puffer (10 mM, pH 7,4) bei 30 °C. Die grau gestrichelten Linien zeigen den strukturell evaluierten Wellenlängenbereich an.

Algorithmus	Sekundärstrukturanteile [%]						
	α	3_{10}	β	Schleifen	PPII	RC	NRMSD
CONTIN	31,4	10	0	14,4	9,9	34,2	0,253
SELCON3	28,6	8,4	5,9	13,3	6,9	34,7	0,132
CDSTRR	35	10	4	12	9	29	0,005

Tabelle 16: Berechnung der Sekundärstrukturanteile des SRCD-Spektrums des HZ in 50 % TFE.

Die Analyse wurde mithilfe des DICHROWEB-Servers ^[129] durchgeführt (Set 2, 178-260 nm).

β : β -Faltblatt; PPII: Polyprolin-Helix II; RC: *random coil* (unstrukturiert)

NRMSD: normalisierte RMSD

Struktur in MD-Simulationen

Aus den 750 ns MD-Simulationen wurde der Abstand der (N–H···O=C)-Wasserstoffbrücken-Kontakte des HZ in DMPC ermittelt. Diese Daten wurden benutzt, um die H-Brückenbindungen der Art 5→1 bzw. 4→1 in HZ zu analysieren. Für Pro sind H-Brücken nur theoretisch dargestellt mit einer theoretischen Bindungslänge zwischen dem H-Donoratom und dem Akzeptoratom von 0,4 nm, da sie tatsächlich keine H-Bindungen ausbilden können.

In 4→1 H-Brücken, die typischerweise von 3_{10} -Helices gebildet werden, indiziert die hohe Wahrscheinlichkeit des H-Brückenkontakts bei einer charakteristischen (N–H···O=C)-Bindungslänge in Peptiden < 0,24 nm ein strukturell übereinstimmendes Resultat (Abb. 37). Demnach sind alle möglichen H-Brücken-Kontakte der Art 4→1 zu erwarten und machen dieses Bindungsmuster plausibel. Dagegen sind für die α -helikalen 5→1-Kontakte niedrigere Wahrscheinlichkeiten zu beobachten.

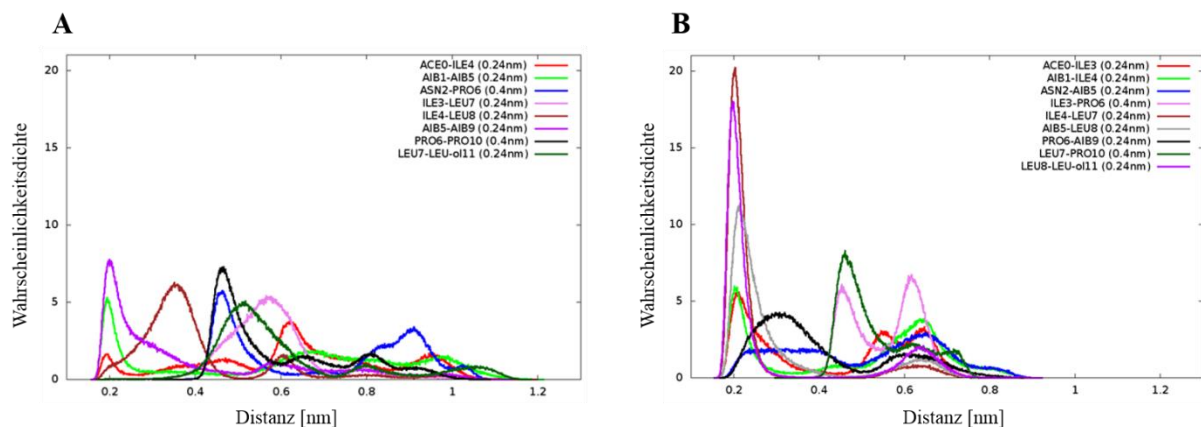


Abbildung 37: Statistische Wahrscheinlichkeit von H-Brückenbindungen des HZ in DMPC.
Die Abstände wurden für jeweilige Aminosäurepaare 5→1 (A) bzw. 4→1 (B) des HZ analysiert.

Die Ramachandran-Plots für alle individuellen Aminosäurereste in der HZ-Sequenz in Abb. 38 verdeutlichen eine einheitliche bevorzugte Kombination der Torsionswinkel φ und ψ im Bereich für helixbildende Peptide/Proteine. Der beobachtete Bereich variiert für φ zwischen -55° und -85° und für ψ zwischen -15° und -35° . In ^3Leu und ^4Leu sind zusätzliche Winkelkombinationen in der Region des β -Faltblatt erkennbar, während $^{11}\text{Leu-ol}$ strukturell mobil erscheint.

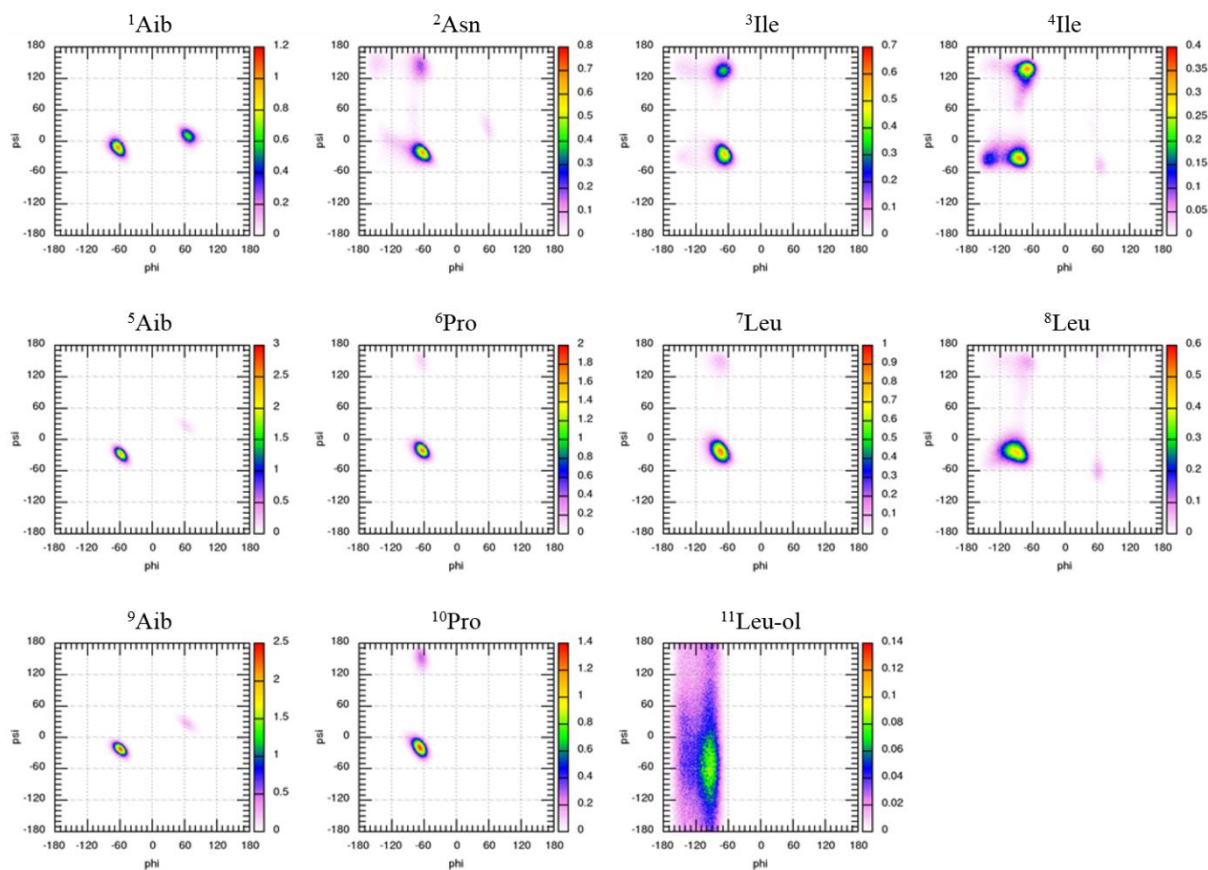


Abbildung 38: Ramachandran-Plots für alle Aminosäurereste in der HZ-Sequenz.

Die Daten stammen aus einer 750 ns MD-Simulation in einer DMPC-Lipidmembran. Die Farbskala verdeutlicht die Energieoberfläche mit rot als den energetisch günstigsten Bereich von Winkelkombinationen.

Struktur durch Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie

Die Flüssigkeits-NMR-Struktur des HZ wurde in DPC- und SDS-Detergentien sowie in TFE bestimmt.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale des Peptids können anhand der jeweiligen NMR-Kontakte und deren chemischen Verschiebungen, die in Tab. 17 zusammengefasst werden, vollständig zugeordnet werden (Abb. 39). Die NMR-Daten in den drei unterschiedlichen Umgebungen stimmen weitestgehend miteinander überein, was auch in den bereits dargestellten CD-Messungen angedeutet wird.

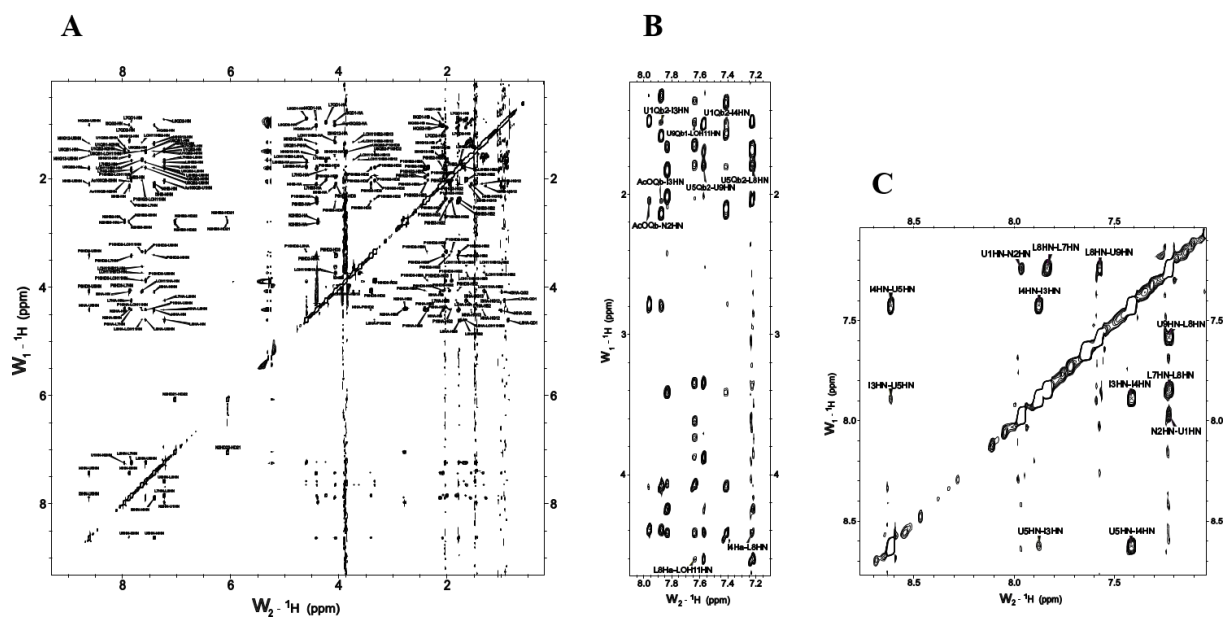


Abbildung 39: NOESY-Spektrum des HZ in TFE mit zugeordneten NOE-Kreuzsignalen.

Gesamter spektraler Bereich (A), (B) Region der α H-, β H-, ...HN-Korrelations-signale, (C) Region der H_N - H_N -Korrelations-signale.

Rest	Resonanz	Bedingungen		
		TFE	DPC	SDS
Ac	CH ₃ CO/ ¹³ CH ₃ CO	2,04 / 25,3	2,03 / 25,4	2,06 / 25,1
¹ Aib	H _N	7,23	9,05	8,40
	C _{β1} H ₃ / ¹³ C _{β1}	1,45 / 28,7	1,43 / 28,9	1,47 / 28,5
	C _{β2} H ₃ / ¹³ C _{β2}	1,49 / 26,4	1,41 / 26,1	1,44 / 25,7
² Asn	H _N	7,96	8,67	8,44
	C _α H / ¹³ C _α	4,39 / 56,3	4,31 / 62,8	4,35 / 55,4
	C _β H / ¹³ C _β	2,77, 2,80 / 38,4	2,79, 2,79 / 38,3	2,83, 2,83 / 37,9
	N _γ H ₂	6,06, 7,03	6,88, 7,68	6,87, 7,61
³ Ile	H _N	7,88	7,92	7,95
	C _α H / ¹³ C _α	4,08 / 64,4	3,97 / 62,8	3,99 / 62,6
	C _β H / ¹³ C _β	2,13 / 39,3	2,06 / 38,3	2,08 / 38,1
	C _{γ1} H / ¹³ C _{γ1}	1,29, 1,58 / 29,0	1,26, 1,57 / 28,4	1,29, 1,59 / 28,1
	C _{δ1} H ₃ / ¹³ C _{δ1}	0,94 / 13,0	0,89 / 13,3	0,92 / 12,8
⁴ Ile	C _{γ2} H ₃ / ¹³ C _{γ2}	1,00 / 18,0	0,91 / 17,9	0,95 / 17,5
	H _N	7,41	7,34	7,37
	C _α H / ¹³ C _α	4,42 / 62,8	4,12 / 62,2	4,16 / 61,9
	C _β H / ¹³ C _β	2,09 / 40,3	1,92 / 38,8	1,97 / 38,5
	C _{γ1} H / ¹³ C _{γ1}	1,34, 1,56 / 28,9	1,30, 1,56 / 28,3	1,34, 1,58 / 28,0
	C _{δ1} H ₃ / ¹³ C _{δ1}	0,89 / 12,7	0,79 / 12,3	0,83 / 12,0
	C _{γ2} H ₃ / ¹³ C _{γ2}	1,01 / 18,3	0,90 / 18,0	0,94 / 17,7

⁵ Aib	H _N	8,62	9,08	8,96
	C _{β1} H ₃ / ¹³ C _{β1}	1,49 / 26,2	1,41 / 26,0	1,45 / 25,7
	C _{β2} H ₃ / ¹³ C _{β2}	1,80 / 22,8	1,71 / 22,2	1,75 / 21,9
⁶ Pro	C _α H / ¹³ C _α	4,41 / 67,4	4,49 / n.b.	4,51 / 65,6
	C _β H / ¹³ C _β	1,80, 2,42 / 32,1	1,80, 2,37 / 31,4	1,83, 2,38 / 31,0
	C _γ H / ¹³ C _γ	1,96, 2,08 / 29,5	1,97, 1,97 / 28,7	1,99, 1,99 / 28,3
	C _δ H / ¹³ C _δ	3,41, 4,06 / 53,7	3,38, 3,82 / 53,1	3,41, 3,84 / 52,6
⁷ Leu	H _N	7,84	7,53	7,65
	C _α H / ¹³ C _α	4,24 / 58,1	4,15 / 56,7	4,19 / 56,3
	C _β H / ¹³ C _β	1,65, 2,01 / 43,1	1,58, 1,92 / 42,2	1,61, 1,94 / 41,9
	C _γ H / ¹³ C _γ	1,83 / 28,6	1,87 / 27,5	1,88 / 27,2
	C _{δ1} H ₃ / ¹³ C _{δ1}	0,95 / 23,0	0,91 / 23,3	0,94 / 22,8
	C _{δ2} H ₃ / ¹³ C _{δ2}	1,05 / 25,7	0,99 / 26,1	1,02 / 25,7
⁸ Leu	H _N	7,23	6,96	7,04
	C _α H / ¹³ C _α	4,60 / 55,6	4,40 / 54,2	4,45 / 53,8
	C _β H / ¹³ C _β	1,69, 1,76 / 44,0	1,62, 1,69 / 42,7	1,68, 1,68 / 42,2
	C _γ H / ¹³ C _γ	1,64 / 28,4	1,66 / 27,4	1,68 / 27,1
	C _{δ1} H ₃ / ¹³ C _{δ1}	0,87 / 23,0	0,81 / 23,4	0,85 / 23,1
	C _{δ2} H ₃ / ¹³ C _{δ2}	0,90 / 25,5	0,85 / 26,0	0,90 / 25,6
⁹ Aib	H _N	7,57	7,45	7,59
	C _{β1} H ₃ / ¹³ C _{β1}	1,48 / 28,3	1,44 / 28,3	1,50 / 28,5
	C _{β2} H ₃ / ¹³ C _{β2}	1,50 / 26,4	1,47 / 26,0	1,47 / 25,7
¹⁰ Pro	C _α H / ¹³ C _α	4,41 / 68,6	4,49 / n.b.	4,52 / 66,9
	C _β H / ¹³ C _β	1,78, 2,37 / 32,4	1,70, 2,35 / 32,0	1,77, 2,38 / 31,6
	C _γ H / ¹³ C _γ	1,92, 2,02 / 29,1	1,89, 1,96 / 28,3	1,92, 1,96 / 28,0
	C _δ H / ¹³ C _δ	3,34, 3,87 / 53,1	3,28, 3,77 / 52,2	3,34, 3,82 / 51,9
¹¹ Leu	H _N	7,64	7,59	7,64
	C _α H / ¹³ C _α	4,07 / 54,0	3,97 / 53,1	4,02 / 52,9
	C _β H / ¹³ C _β	1,32, 1,65 / 42,5	1,22, 1,53 / 41,9	1,27, 1,53 / 41,4
	C _γ H / ¹³ C _γ	1,62 / 28,4	1,60 / 27,6	1,60 / 27,3
	C _{δ1} H ₃ / ¹³ C _{δ1}	0,92 / 24,3	0,86 / 24,3	0,89 / 23,7
	C _{δ2} H ₃ / ¹³ C _{δ2}	0,96 / 25,7	0,93 / 26,5	0,95 / 26,1
-ol	C _{β1} H ₂ OH / ¹³ C _{β1}	3,61, 3,73 / 68,7	3,44, 3,48 / 68,0	3,52, 3,55 / 67,7

Tabelle 17: ¹H- und ¹³C – NMR chemische Verschiebungen von HZ.

HZ in DPC-d38 und SDS-d25 (P/D, 1/100) und TFE-d2-Lösung (referenziert gegen DSS).

n.b.: nicht bestimmbar

Durch die Anwesenheit von starken sequentiellen H_N (i) – H_N (i+1) – und schwachen H_N (i) – H_N (i+2) – NOE-Korrelationssignalen sowie moderaten bis starken αH (i) – H_N (i+3) – NOE-

Korrelationssignalen in den NMR-Spektren kann für HZ eine helikale Struktur angenommen werden. Weiterhin bestehen NOE-Kontakte, welche die H-Brückenbindungen verdeutlichen und für die Unterscheidung zwischen einer α -Helix und einer 3_{10} -Helix bzw. β -*bend ribbon* – Konformation herangezogen werden können. In Tab. 18 gelten zur Identifizierung der H-Brücken die Kriterien für die Bindungslänge $< 0,25$ nm und für den Winkel zwischen der Proton-Donor-Bindung und der Donor-Akzeptor-Linie $< 35^\circ$ sowie das Vorkommen dieses Kontakts in mindestens einer der 20 generierten HZ-Strukturen. Die Experimente deuten auf beide Arten von H-Brücken hin: im N-terminalen Bereich auf zwei $4 \rightarrow 1$ -Kontakte, welche von 3_{10} -Helices gebildet werden, und in der Mitte bzw. am C-Terminus des Peptids auf insgesamt drei H-Brücken der Art $5 \rightarrow 1$, wie bei einer α -Helix.

H-Brücke	Muster	Häufigkeit in 20 Strukturen	(N-H \cdots O=C)- Bindungslänge [nm]	(N-H \cdots O=C)- Winkel [°]
$^0\text{Ac} - ^3\text{Ile}$	$4 \rightarrow 1$	8	0,207-0,208	13,5-14,7
$^1\text{Aib} - ^4\text{Ile}$	$4 \rightarrow 1$	5	0,198-0,202	23,8-26,7
$^3\text{Ile} - ^7\text{Leu}$	$5 \rightarrow 1$	15	0,224-0,237	17,7-20,4
$^4\text{Ile} - ^8\text{Leu}$	$5 \rightarrow 1$	5	0,187-0,197	21,9-32,6
$^7\text{Leu} - ^{11}\text{Leu}$	$5 \rightarrow 1$	12	0,208-0,231	23,3-33,9

Tabelle 18: Wasserstoffbrücken-Bindungen in HZ anhand der experimentellen Flüssigkeits-NMR-Daten in TFE.

Bezüglich der Isomerie von Pro-Resten an Position 6 und 10 des HZ wurde die Unterscheidung der *cis*-Form von der *trans*-Form mithilfe der Differenz der chemischen Verschiebungen von $^{13}\text{C}_\beta$ und $^{13}\text{C}_\gamma$ herangezogen, wie in ^[148] beschrieben. $\Delta_{\beta\gamma}$ -Werte von 3,6 (^6Pro) bzw. 3,3 ppm (^{10}Pro) bedeuten die Identifizierung von zwei *trans*-Pro-Resten in der HZ-Sequenz.

Für HZ wird eine helikale Sekundärstruktur von ^3Ile bis ^8Leu bzw. ^9Aib in DPC mit Peptidlängen von 19-22 Å vorgeschlagen (Abb. 40). Dieses Ergebnis impliziert eine nicht-kontinuierliche Struktur mit flexiblen Enden. Die strukturelle Analyse der NOE-Kreuzpeaks durch CYANA ergibt, dass die Übereinstimmung der experimentellen Daten mit klassischen helikalen Strukturen in der Reihenfolge 3_{10} -Helix – β -*bend ribbon spiral* – α -Helix zunimmt.

Bei der Betrachtung der dreidimensionalen NMR-Strukturen des HZ wird deutlich, dass eine Seite der Helixachse aus jeweils zwei Leu- und Ile-Resten und dem acetylierten N-Terminus gebildet wird, während die gegenüberliegende Oberfläche aus Aib-Resten besteht. Die beiden Pro-Reste und ²Asn, der einzige polare Rest in der Sequenz, bilden eine dritte Oberfläche.

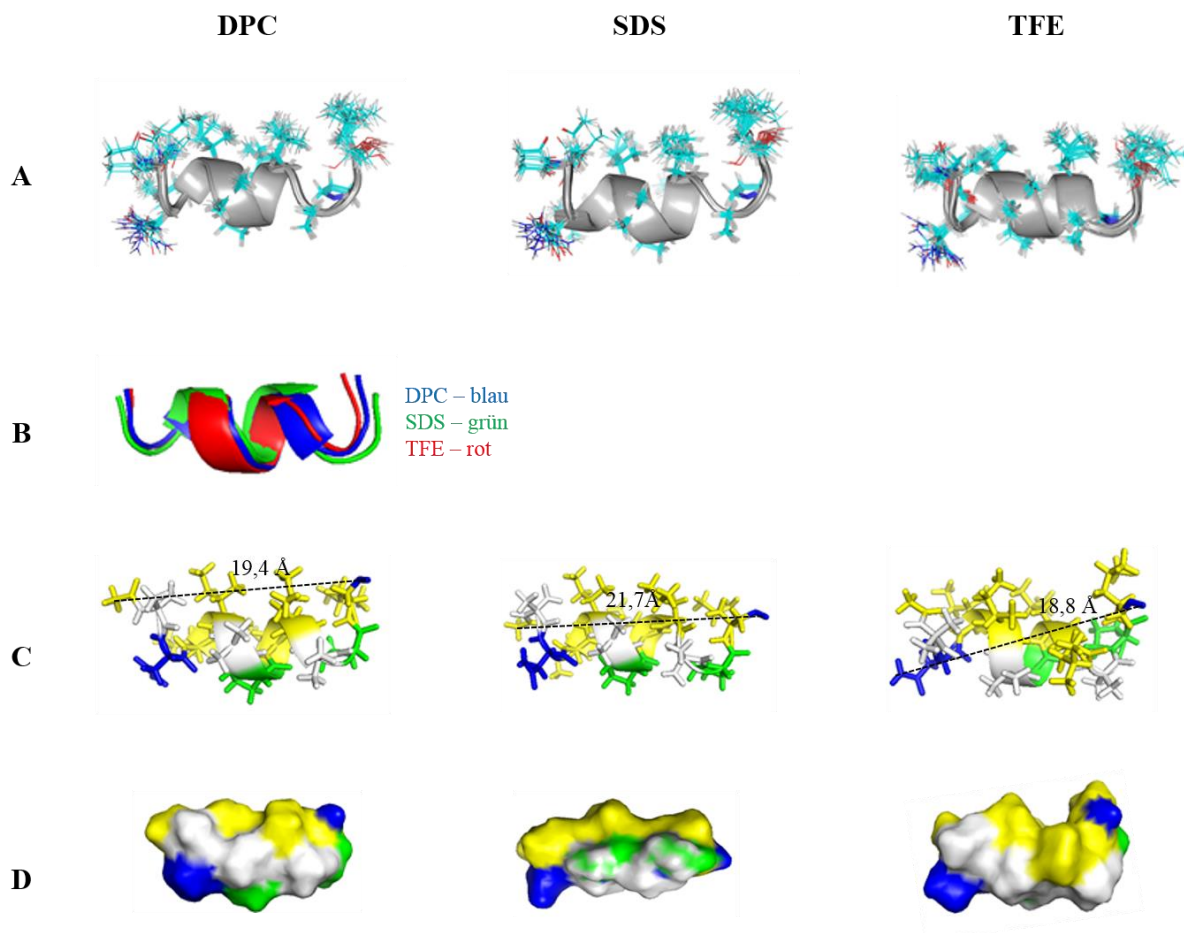


Abbildung 40: 3D-Darstellung der aus den Flüssigkeits-NMR-Daten konstruierten Strukturen des HZ.

Für die Visualisierung wurde die Software PYMOL ^[137] verwendet: (A) Überlagerung der 20 generierten Strukturen; (B) Überlagerung der drei Grundstrukturen in DPC, SDS und TFE. (C) Energieärmste Grundstrukturen mit der Angabe der maximalen Länge des Peptids; (D) Darstellung als Oberflächenmodell. Farbschema in (C) und (D): Ile, Leu, Acetyl-Rest (gelb); Aib (weiß), Asn, Alkohol-Gruppe von Leu-ol (blau), Pro (grün). N→C-Terminus verläuft in den Darstellungen von links nach rechts.

4.3.3 Strategie für die Festkörper-NMR-Analyse von HZ und ALM

Harzianin HK VI (HZ)

Für die ¹⁹F-Festkörper-NMR-Untersuchungen in dieser Arbeit wurden bestimmte Aminosäurereste im Peptidrückgrat durch synthetische ¹⁹F-Reporter-Aminosäuren substituiert,

die in der Gruppe Ulrich bereits als geeignet befunden wurden: Aib-Positionen wurden durch (*R*)- bzw. (*S*)-Trifluormethylalanin ((*R*)-CF₃-Ala, (*S*)-CF₃-Ala) ^[149] substituiert, während (*S*)-3-trifluormethyl-bicyclopent-[1,1,1]-1-yl-glycin (CF₃-Bpg) ^[150] die hydrophoben Reste Ile und Leu ersetzte.

Die beiden (*R*)- und (*S*)-Enantiomere des CF₃-Ala geben zwei NMR-Orientierungsparameter pro Position aus, da die Orientierung der CF₃-Gruppe in beiden Enantiomeren unterschiedlich ist und dadurch die zwei Winkel $\theta^{(R)}$ und $\theta^{(S)}$ separat bestimmt werden (Abb. 41). Für diese Strategie wurden (*R*)- bzw. (*S*)-CF₃-Ala jeweils enantiomerenrein synthetisiert.

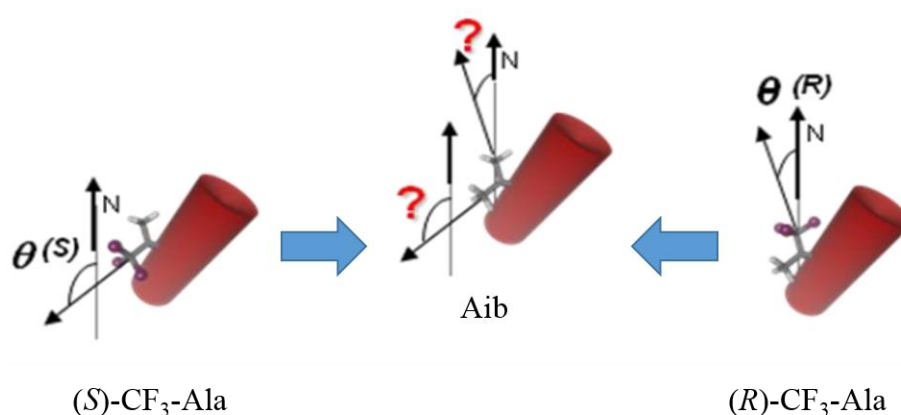


Abbildung 41: Illustration der Orientierung von (*R*)- und (*S*)-CF₃-Ala im Peptidrückgrat.
Quelle: modifiziert aus ^[149].

CF₃-Ala wurde in die Sequenz des HZ als Substituent der drei Aib-Reste an den Positionen 1, 5 und 9 eingeführt. Es unterscheidet sich im Vergleich zu Aib lediglich durch eine Methylgruppe, die durch die Trifluormethylgruppe (CF₃) ersetzt wurde. Die Kupplung von CF₃-Ala wird in der Festphasensynthese durch seine elektronenziehende CF₃-Gruppe besonders erschwert, da dadurch die Nucleophilie der Aminogruppe erheblich vermindert wird und CF₃-Ala zudem eine sterisch gehinderte Aminosäure ist.

Die Leu- und Ile-Reste sind an Position 3, 4, 7 und 8 des HZ lokalisiert. Diese Reste wurden durch CF₃-Bpg ersetzt, welches hervorragend als Substituent für hydrophobe Aminosäuren wie Leu und Ile dient ^[150] (Abb. 42). Dieselben Aminosäuren wurden zudem mit ¹⁵N markiert. Es wurden also insgesamt 14 verschiedene Labels (10×¹⁹F, 4×¹⁵N) synthetisch hergestellt, die in den Festkörper-NMR-Berechnungen kombiniert werden können. Durch dieses Markierungsschema kann das HZ-Segment von Position 1 bis 9 charakterisiert werden und

bestimmte Segmente können durch wahlweise Benutzung der Daten aus bestimmten Positionen separat analysiert werden.

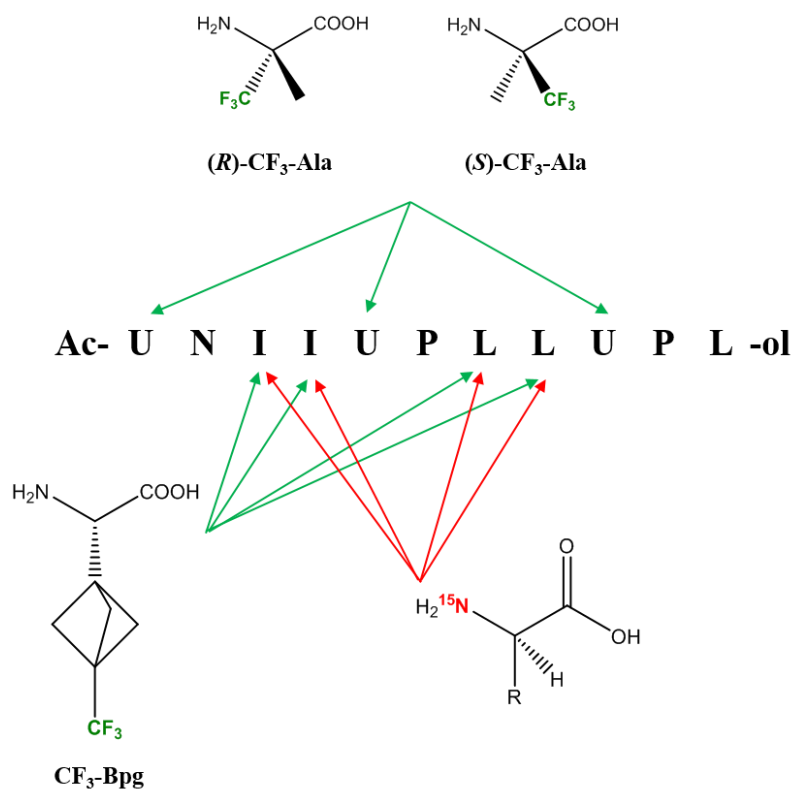


Abbildung 42: Primärsequenz des HZ und das ^{19}F - und ^{15}N -NMR-Markierungsschema.

Alamethicin F30/3 (ALM)

ALM wurde als porenbildendes Peptaibol in der Literatur umfangreich untersucht und charakterisiert. In früheren Arbeiten zu ALM in der Gruppe Ulrich wurde durch Maisch et al. die ^{19}F -Festkörper-NMR-Methode bereits eingesetzt, um die Konformation und Orientierung des ALM in DMPC-Lipidmembranen zu beschreiben ^[149]. Dabei wurden (R) - und (S) - CF_3 -Ala in die ALM-Sequenz an den Positionen 5, 10 und 16 eingebracht (Abb. 43). Die markierten Peptid-Analoga des ALM wurden in Hinblick auf ihre biologischen Effekte (antimikrobielle Aktivität, Hämolyse) sowie auf ihre Struktur und Verhalten in Lipidmembranen durch Einsatz von CD- und ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektroskopie analysiert. Die Integrität von CF_3 -Ala wurde verifiziert, da seine Inkorporierung in das Peptidrückgrat des ALM weder die biologischen noch die strukturellen Eigenschaften des Peptids modifiziert haben. Die ^{19}F -NMR-Strategie von Maisch et al. bestand darin die Positionen von 5 bis 16 strukturell zu analysieren, wobei jedoch keine der angenommenen Strukturen als passend befunden wurde. Eine reguläre α -Helix konnte

nur für das ALM-Segment von Position 5 bis 10 am N-Terminus bestätigt werden. ALM befindet sich demnach starr ($S_{mol} = 0,99$) als transmembran orientiertes Peptid mit einem Neigungswinkel $\tau = 8^\circ$ in der DMPC-Lipidmembran, was mit früheren Ergebnissen konform ist.

Einige strukturelle Fragen stehen dennoch offen, insbesondere die vollständige Festkörper-NMR-Analyse des C-terminalen Segments des ALM hinter ^{14}Pro , welches den Knick in der Helix verursacht. Es existieren NMR-Daten über ^{16}Aib , welches durch die Enantiomere des $\text{CF}_3\text{-Ala}$ substituiert wurde, doch eine Position ist unzureichend für die Analyse. Zur Vervollständigung der Strukturanalyse des C-terminalen Segments des ALM durch ^{19}F -Festkörper-NMR wurde hier zusätzlich ^{17}Aib durch (*R*)- und (*S*)- $\text{CF}_3\text{-Ala}$ ersetzt.

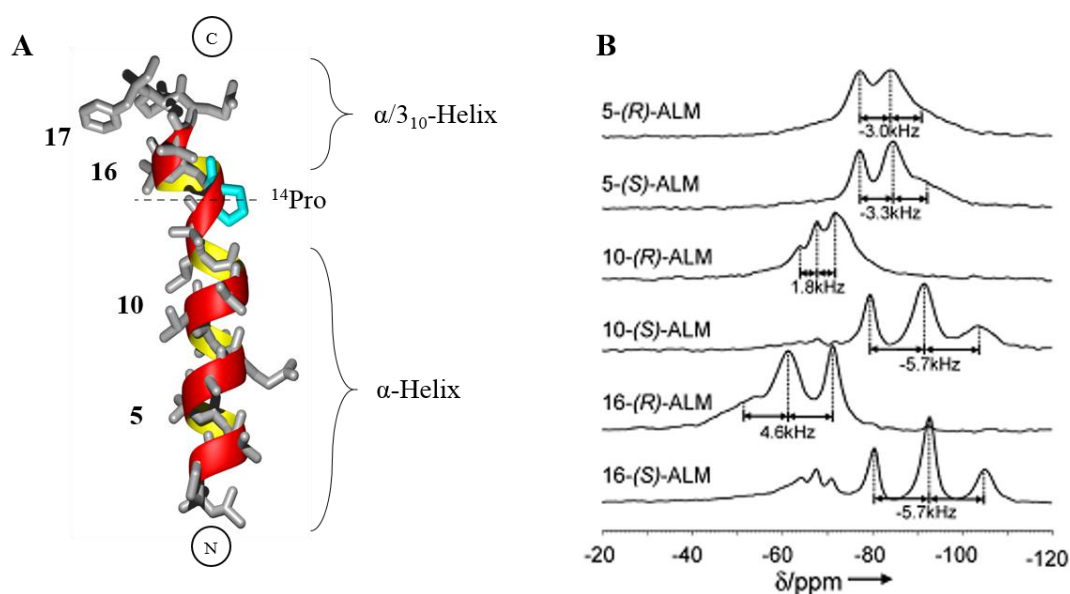


Abbildung 43: ^{19}F -Festkörper-NMR-Daten und -Strategie des ALM.

(A) Darstellung der 3D-Struktur des ALM mit dem Knick an ^{14}Pro und der $\text{CF}_3\text{-Ala}$ -markierten Positionen. (B) NMR-Spektren der $\text{CF}_3\text{-Ala}$ -markierten ALM-Analoga in DMPC bei 35°C aus einer früheren Untersuchung^[149].

4.3.4 Charakterisierung von HZ in DPhPC-Lipidmembranen

Struktur und Orientierung des HZ in DPhPC durch ^{19}F - und ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ^{31}P -NMR-Spektren der Lipide deuten auf eine gute Orientierung hin, mit Ausnahme der Proben mit HZ 1-(*R*)- und 1-(*S*)- $\text{CF}_3\text{-Ala}$, bei denen die für DPhPC beobachteten nicht-

lamellaren Phasen detektiert werden (Abb. 44). Die Tripletts-Signale in der ^{19}F -NMR (Abb. 45) und die schmale Linienform in der ^{15}N -NMR (Abb. 46) zeigen, dass die Peptide nicht zu mobil sind und eine bevorzugte Ausrichtung aufweisen. Da in den ^{19}F -NMR-Messungen keine Änderungen der Kopplungen im Temperaturbereich zwischen $10\text{ }^\circ\text{C}$ und $50\text{ }^\circ\text{C}$ erkennbar sind, wurden für die nachfolgenden Berechnungen die Werte aus den NMR-Spektren bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ verwendet (Abb. 45).

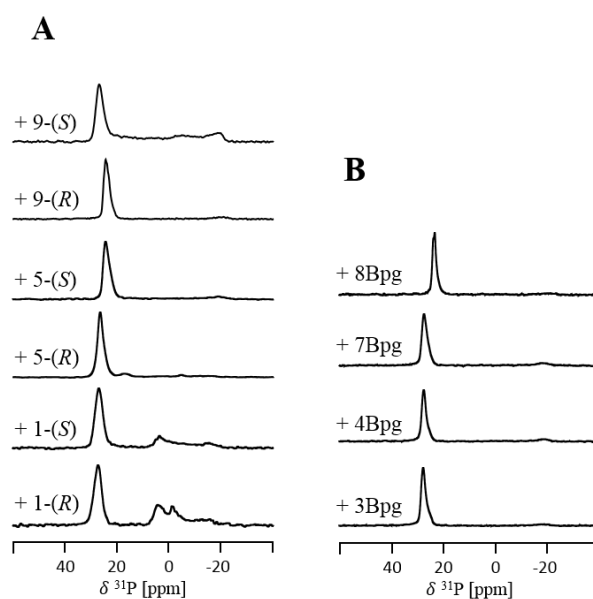
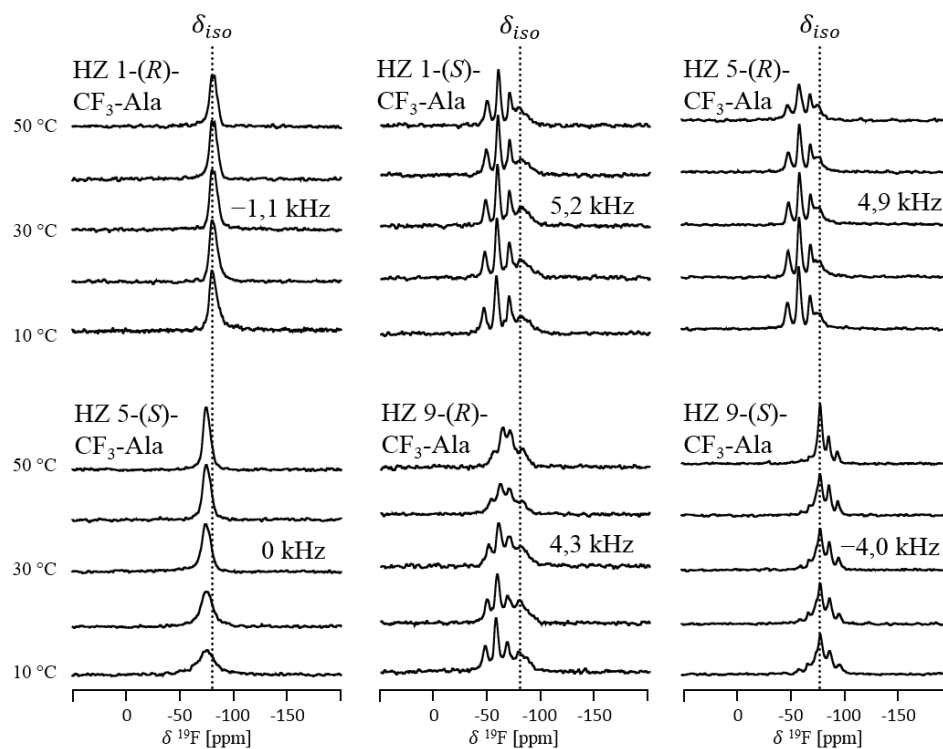


Abbildung 44: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DPhPC in orientierten NMR-Proben mit CF_3 -markierten HZ-Analoga.

Spektren des DPhPC mit (R)- und (S)- CF_3 -Ala- (A) und CF_3 -Bpg (B) -markierten HZ-Analoga nach den ^{19}F -Messungen bei einem P/L von 1:100 ($T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

A



B

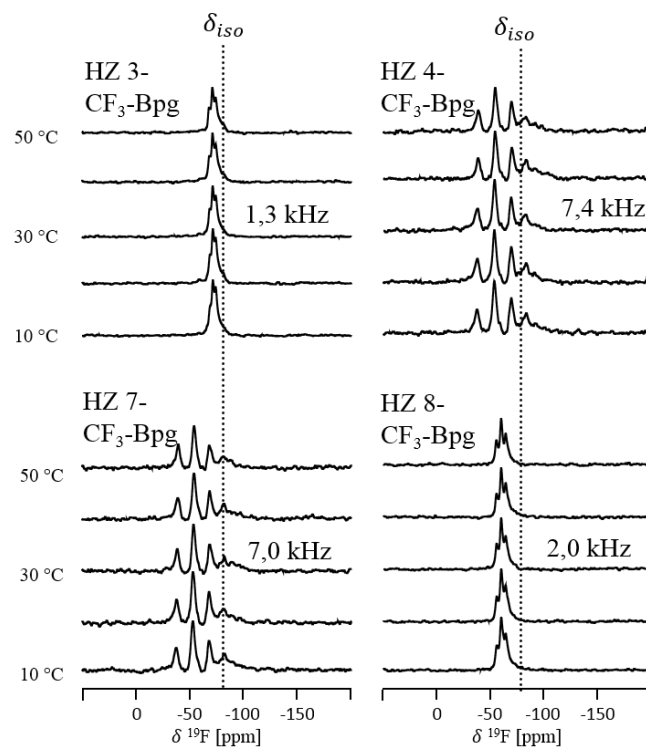


Abbildung 45: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF_3 -markierten HZ-Analoga in orientierten DPhPC-Lipidmembranen.

^{19}F -NMR-Spektren von HZ-Analoga mit (R)- und (S)- CF_3 -Ala- (A) und CF_3 -Bpg-Markierung (B) mit Angabe der erhaltenen dipolaren Kopplungen Δ_{CF_3} bei 30 °C und einem P/L von 1:100.

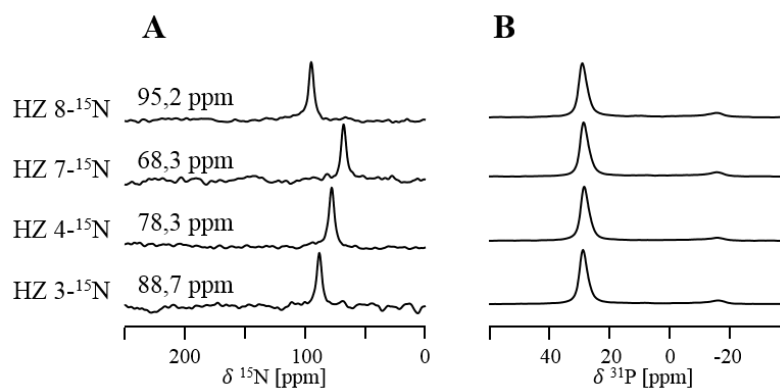


Abbildung 46: ^{15}N - und ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des Systems HZ/DPhPC.

(A) ^{15}N -NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga; (B) ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DPhPC nach den ^{15}N -Messungen. P/L 1:50; T = 35 °C.

Aus den erhaltenen dipolaren Kopplungen Δ_{CF_3} bzw. der ^{15}N chemischen Verschiebung wurde die Membranorientierung des HZ nach der gängigen Analysemethode berechnet, welche in vorigen Kapiteln bereits für PGLa beschrieben wurde. Dazu wurden zunächst drei Strukturen angenommen: (1) die ideale α -Helix; (2) die ideale 3_{10} -Helix; (3) eine β -Homologie-Struktur aus der Literatur, welches eine Variante des klassischen *β -bend ribbon spiral* ^[69,70] ist und im Falle des homologen 14-mer Harzianin HC IX speziell für X-Y-U-P -Sequenzen (X, Y: beliebig) vorgeschlagen wurde ^[110]. Für jede der betrachteten rechtsgängigen helikalen Konformationen existieren diskrete Kombinationen von Torsionswinkeln φ und ψ sowie bestimmte charakteristische Größen (s. Tab. 19 und 20), die als Vorgaben in die Berechnungen eingeflossen sind. Außerdem wurden die drei Flüssigkeits-NMR-Strukturen des HZ verwendet, sodass insgesamt sechs Konformationen geprüft wurden.

Kenngröße	α -Helix	3_{10} -Helix	<i>β-bend ribbon spiral</i>
(N-H \cdots O=C) - H-Brücken-Muster	5 \rightarrow 1	4 \rightarrow 1	4 \rightarrow 1
Reste pro Windung	3,6	3,0	3,43
Drehung pro Rest	100°	120°	106°
Translation pro Rest [\AA]	1,5	1,94 – 2,0	1,85 – 2,06
Translation pro Windung [\AA]	5,4	5,8 – 6,0	6,35 – 7,06

Tabelle 19: Kenngrößen der idealen helikalen Strukturen α -Helix, 3_{10} -Helix und *β -bend ribbon spiral*.
Quellen: ^[70,109]

Strukturmodell	Reste	φ	ψ
α -Helix (ideal)	X	-55°	-45°
3_{10} -Helix (ideal)	X	-60°	-30°
β -Homologie-Struktur	X	-90°	-27°
	Y	-98°	-17°
	U	-49°	-50°
	P	-78°	+3°

Tabelle 20: Torsionswinkel Φ und Ψ im Peptidrückgrat für eine ideale α -Helix und 3_{10} -Helix sowie für die β -Homologie-Struktur.

Quellen: ^[109,110]

Im Falle der β -Homologie-Struktur wurden neben den Torsionswinkeln der X-Y-U-P-Einheit, die in HZ zweifach vorkommen und in Tab. 20 angegeben sind, C- und N-terminale Reste, die nicht zu der Tetrapeptid-Einheit gehören, aus den NMR-Daten des Harzianin HC IX aus der Literatur durch folgende Werte vervollständigt: φ (^1Aib) = -10°; ψ (^1Aib) = -40°; φ (^2Asn) = -87°; ψ (^2Asn) = -16°; φ ($^{11}\text{Leu-ol}$) = -92°.

In der ersten Analyse wurden die Daten aus den CF_3 -Bpg-Messungen benutzt, welche Informationen über das Peptidsegment von ^3Ile bis ^8Leu geben und daher die Mitte des Peptids repräsentieren. Strukturell sind die besten Übereinstimmungen mit experimentellen Ergebnissen unter Verwendung bzw. Annahme der Flüssigkeits-NMR-Struktur aus DPC, der β -Homologie-Struktur und der α -Helix erhalten worden, wohingegen reine 3_{10} -Helices aufgrund der hohen RMSD-Werte nicht für geeignet befunden wurden (Tab. 21). Der Neigungswinkel τ liegt für die Flüssigkeits-NMR-Struktur bei 50°, für die β -Homologie-Struktur bei 59° und für die α -Helix bei 28°, was in allen Fällen eine geneigte Orientierung impliziert. Der berechnete azimuthale Rotationswinkel um etwa 180° würde die Ausrichtung der Leu/Ile-Oberfläche Richtung wässriger Phase bedeuten.

Dasselbe Segment wurde mithilfe von ^{15}N -NMR-Messungen analysiert. Die Ergebnisse sprechen für die beste Eignung der β -Homologie-Struktur sowie eine gute Übereinstimmung

für $^3_{10}$ -Helix und der Flüssigkeits-NMR-Struktur in DPC, wobei hier eine mögliche Oberflächenorientierung impliziert wird ($\tau = 78-88^\circ$), was auch durch die ^{15}N -NMR-Signale im Bereich 70-95 ppm zu erwarten ist. Das Peptid ist mit $\rho = 42^\circ$ im Vergleich zur obigen ^{19}F -Analyse etwas um die Helixachse rotiert. In beiden Analysen besitzen die Peptide eine eher schwache Mobilität ($S_{mol} = 0,5-0,8$).

Im zweiten Teil der Analyse wurden ^{19}F -NMR-Daten aus CF_3 -Bpg- und CF_3 -Ala-Messungen kombiniert und zwei Segmente separat analysiert, die durch ^6Pro getrennt sind: der N-terminale Teil von ^3Ile bis ^5Aib und der C-terminale Teil von ^7Leu bis ^9Pro . In beiden Segmenten zeigt HZ die Bevorzugung der β -Homologie-Struktur mit einer vermeintlichen Oberflächenausrichtung. Die etwas abweichenden Neigungswinkel der beiden Segmente von 78° und 84° könnten einen leichten Knick von 6° an ^6Pro bedeuten.

Position der Datenpunkte	Isotopen-Label	Struktur	ρ [°]	τ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
3-4-7-8	CF_3 -Bpg	α-Helix	176	28	1,0	0,44
		$^3_{10}$ -Helix	16	74	0,9	2,46
		β-Homologie	192	59	0,5	0,40
		NMR (DPC)	179	50	0,8	0,30
		NMR (SDS)	192	50	0,5	1,80
		NMR (TFE)	169	43	0,8	2,79
3-4-7-8	^{15}N					RMSD [ppm]
		α -Helix	210	66	1,0	4,68
		$^3_{10}$-Helix	45	78	0,8	2,38
		β-Homologie	222	88	0,8	1,15
		NMR (DPC)	206	79	0,8	2,20
NMR (SDS)	17	90	0,8	2,75		

					Ergebnisse	
		NMR (TFE)	204	83	0,8	2,79
3-4-5	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					RMSD [kHz]
		α -Helix	101	75	1,0	2,79
		3_{10} -Helix	132	83	0,5	3,21
		β-Homologie	219	84	0,7	0,52
		NMR (DPC)	10	90	0,9	1,65
		NMR (SDS)	198	78	0,9	2,46
		NMR (TFE)	1	87	1,0	1,70
7-8-9	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					
		α -Helix	169	78	1,0	1,98
		3_{10} -Helix	15	69	1,0	2,27
		β-Homologie	188	78	0,7	0,66
		NMR (DPC)	177	60	0,8	1,46
		NMR (SDS)	205	81	0,7	1,50
		NMR (TFE)	33	83	1,0	1,70

Tabelle 21: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DPhPC-Lipidmembranen.

Die Daten wurden anhand der ¹⁹F- und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Ergebnisse berechnet. Die Ergebnisse mit guter Übereinstimmung sind durch fette Markierung hervorgehoben.

Für eine bessere Veranschaulichung des Neigungswinkel τ wurden alle Werte über 90° durch folgende Beziehungen in äquivalente Werte unter 90° umberechnet: $\tau \rightarrow 180^\circ - \tau$ und $\rho \rightarrow \rho + 180^\circ$.

Eine mögliche konzentrationsabhängige Reorientierung wurde durch Messung der CF₃-Bpg-markierten HZ-Analoga bei erhöhter Peptidkonzentration (P/L 1:10) überprüft, hatte jedoch keine Auswirkungen auf die erhaltenen dipolaren Kopplungen, womit auch keine Änderungen der Orientierung erwartet werden (Spektren s. Anhang Teil c).

Orientierungsbestimmung des HZ in DPhPC durch OCD-Spektroskopie

Das OCD-Spektrum des HZ in DPhPC ist von dem Muster des CD-Spektrums von HZ nicht stark unterschiedlich (Abb. 47). Analog zu den CD-Banden erscheint ein negatives Maximum bei ~206-207 nm. Die Schulter bei etwa 230 nm, die in den CD-Spektren schwach angedeutet werden, ist im OCD-Spektrum in DPhPC nicht zu beobachten. In erster Näherung spricht das OCD-Spektrum für die Orientierung der Peptidhelix parallel zur Membran, wie im Falle von amphiphilen, auf der Membran liegenden α -Helices.

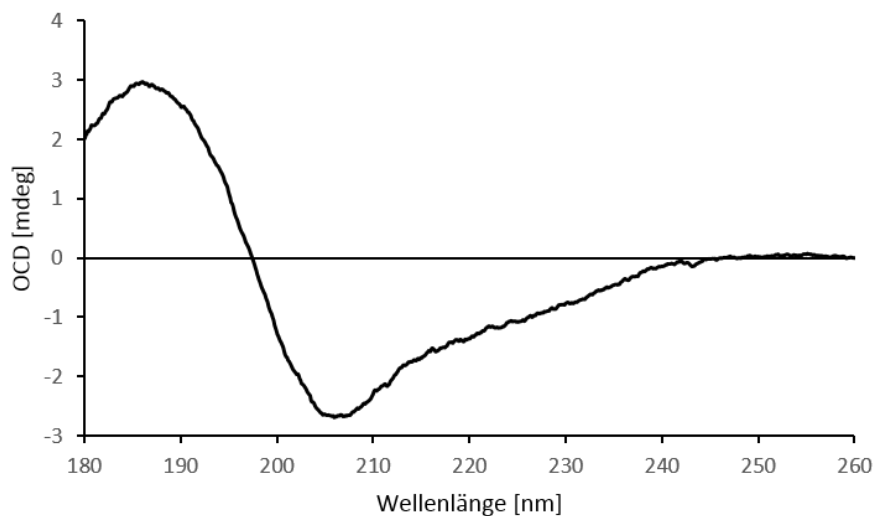


Abbildung 47: OCD-Spektrum des HZ in DPhPC-Lipidmembranen.
T = 30 °C

4.3.5 Wechselwirkungen von HZ mit anderen Lipidmembranen

Struktur und Orientierung des HZ in DMPC durch ^{19}F - und ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Abb. 48 stellt die ^{31}P -NMR-Spektren der DMPC-Lipide nach den ^{19}F -NMR-Messungen dar, welche in allen Proben eine gute Orientierung aufweisen und keine nicht-lamellaren Anteile zeigen, die in einigen Proben des DPhPC zu sehen waren.

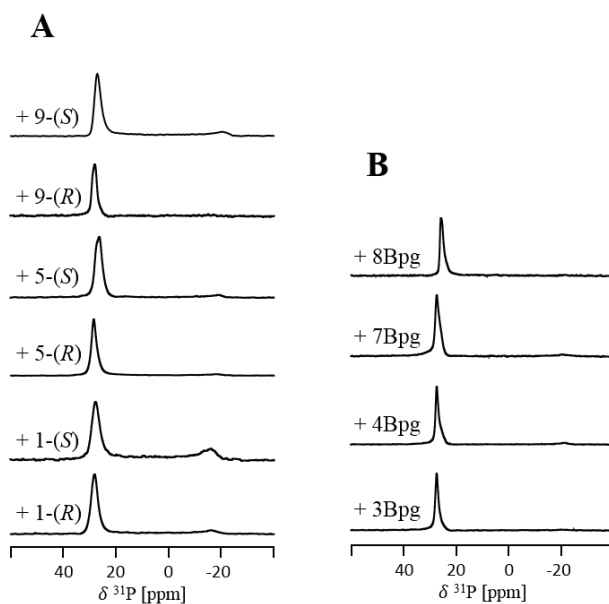


Abbildung 48: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DMPC in orientierten NMR-Proben mit CF_3 -markierten HZ-Analoga.

Spektren des DMPC mit (*R*)- und (*S*)- CF_3 -Ala- (A) und CF_3 -Bpg (B) -markierten HZ-Analoga nach den ^{19}F -Messungen bei einem P/L von 1:100 ($T = 30^\circ\text{C}$).

In den ^{19}F -NMR-Messungen in DMPC sind oberhalb der Phasenübergangstemperatur deutliche dipolare Kopplungen zu erkennen. In der Gel-Phase dagegen sind die Signale nicht gut aufgelöst (Abb. 49). Die ^{19}F -NMR-Ergebnisse in der fluiden Phase verdeutlichen ein etwas abweichendes Muster an Kopplungswerten im Vergleich zu DPhPC-Lipidmembranen. Entgegen den Erwartungen von strukturell und/oder orientierungsbezogen unterscheidbaren Resultaten, sind Peptide wie in DPhPC senkrecht zur Membrannormalen ausgerichtet, mit den besten Ergebnissen für die Annahme einer kontinuierlichen α -Helix, dem β -Homologie-Modell und der Flüssigkeits-NMR-Struktur in DPC (Tab. 22). Dies wird unter Berücksichtigung der ^{15}N -NMR-Daten bekräftigt, da hier ähnliche chemische Verschiebungen (72-97 ppm) auftauchen wie in DPhPC-Lipidmembranen (Abb. 50). Die Rotation im Winkelbereich von etwa 0° bis 50° impliziert eine gewisse undefiniertheit der rotationellen Ausrichtung. Aus struktureller Sicht fällt die hohe Abweichung der Daten von einer reinen 3_{10} -Helix auf mit einer guten Übereinstimmung sowohl des Hauptsegments von ^3Ile bis ^8Leu als auch der zwei getrennt betrachteten Segmente zum strukturell verwandten β -Homologie-Modell mit Neigungswinkeln von 92° und 113° für den N-terminalen bzw. C-terminalen Teil, was einen Knick von etwa 21° bedeuten würde.

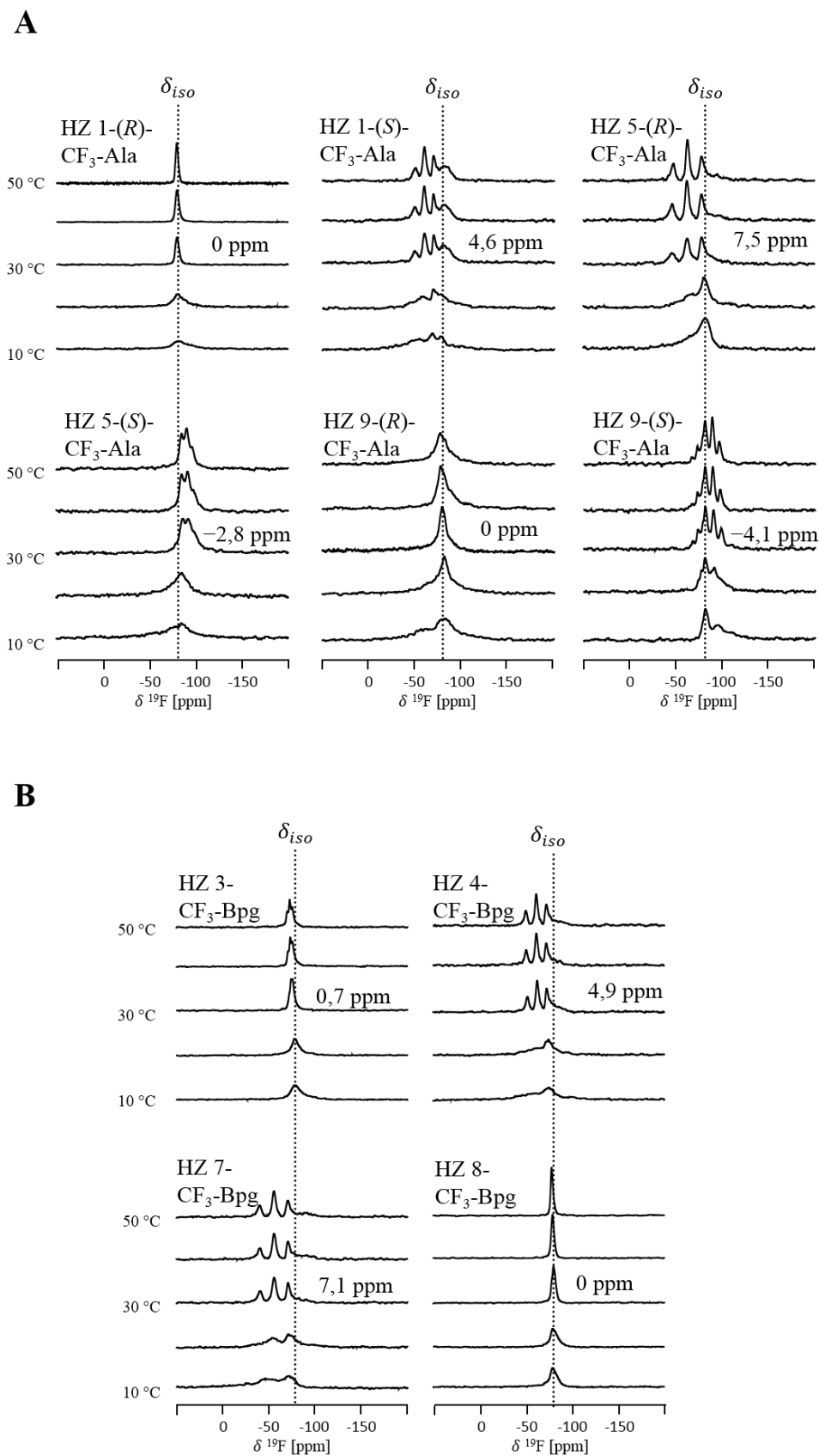


Abbildung 49: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der CF_3 -markierten HZ-Analoga in orientierten DMPC-Lipidmembranen.

^{19}F -NMR-Spektren von HZ-Analoga mit (R)- und (S)- CF_3 -Ala- (A) und CF_3 -Bpg-Markierung (B) mit Angabe der erhaltenen dipolaren Kopplungen Δ_{CF_3} bei 30 °C und einem P/L von 1:100.

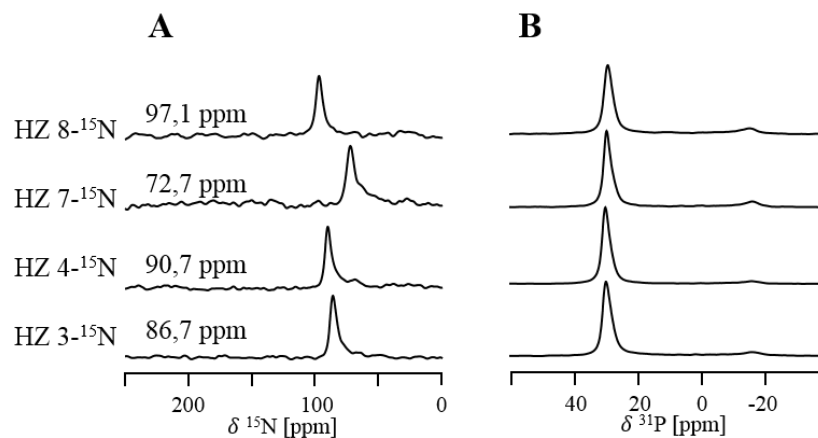


Abbildung 50: ^{15}N - und ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des Systems HZ/DMPC.

(A) ^{15}N -NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga; (B) ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DMPC nach den ^{15}N -Messungen. P/L 1:50; T = 35 °C.

Position der Datenpunkte	Isotopen-Label	Struktur	ρ [°]	τ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
3-4-7-8	CF ₃ -Bpg	α-Helix	183	41	0,6	0,47
		3 ₁₀ -Helix	14	76	0,7	1,56
		β-Homologie	200	60	0,4	0,73
		NMR (DPC)	184	51	0,6	0,66
		NMR (SDS)	195	38	0,5	1,02
		NMR (TFE)	174	40	0,7	1,66
3-4-7-8	^{15}N					RMSD [ppm]
		α -Helix	16	72	0,8	3,09
		3 ₁₀ -Helix	52	74	0,8	5,03
		β-Homologie	229	88	0,7	2,77
		NMR (DPC)	216	79	0,6	1,72
		NMR (SDS)	206	88	0,7	5,35
		NMR (TFE)	212	83	0,6	1,81

						Ergebnisse	
3-4-5	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					RMSD	
						[kHz]	
		α -Helix	94	71	1,0	2,18	
		3_{10} -Helix	243	82	0,7	2,62	
		β-Homologie	229	88	0,8	0,28	
		NMR (DPC)	16	86	1,0	0,68	
		NMR (SDS)	204	81	1,0	1,46	
	NMR (TFE)	6	82	1,0	0,76		
7-8-9	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala						
		α -Helix	172	71	0,8	0,55	
		3_{10} -Helix	17	71	1,0	1,41	
		β-Homologie	199	67	0,5	0,13	
		NMR (DPC)	187	51	0,6	0,45	
		NMR (SDS)	215	74	0,7	0,80	
			NMR (TFE)	36	85	1,0	1,35

Tabelle 22: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DMPC-Lipidmembranen.

Die Daten wurden anhand der ¹⁹F- und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Ergebnisse berechnet. Die Ergebnisse mit guter Übereinstimmung sind durch fette Markierung hervorgehoben.

Alle τ wurden nach den Umformungen, die in Tab. 21 angegeben sind, in äquivalente Werte umgerechnet.

Die Erhöhung der Peptidkonzentration beeinflusst die erhaltenen dipolaren Kopplungen der CF₃-Bpg-markierten HZ-Peptide nicht (Spektren s. Anhang Teil c). Daher ist hier ebenfalls keine Konzentrationsabhängigkeit der Struktur oder Orientierung des HZ zu erwarten.

Orientierung des HZ in DMPC anhand MD-Simulationen

In den Frei-Energie-MD-Simulationen wurde die Gibbs-Energie als eine Funktion der Entfernung des HZ-Moleküls vom Kern einer DMPC-Lipidmembran und sein Neigungswinkel relativ zur Membrannormalen bestimmt. In Abb. 51 wird der energetisch günstigste Aufenthalt eines einzigen HZ-Moleküls in der Lipiddoppelschicht aus DMPC veranschaulicht. Bei einer

Entfernung von etwa 3 nm vom Membrankern sind energetisch stabile Bereiche erkennbar, d.h. das Peptid ist bevorzugt bzw. die meiste Zeit außerhalb des hydrophoben Kerns lokalisiert. Durch die absoluten Minima bei einem Neigungswinkel von 90° kann zudem eine bevorzugte Orientierung auf der Membranoberfläche gefunden werden, wobei der günstige Energiebereich zwischen etwa 60° und 120° eine schwache Neigung des Peptids und gewisse Orientierungsflexibilität nahelegt.

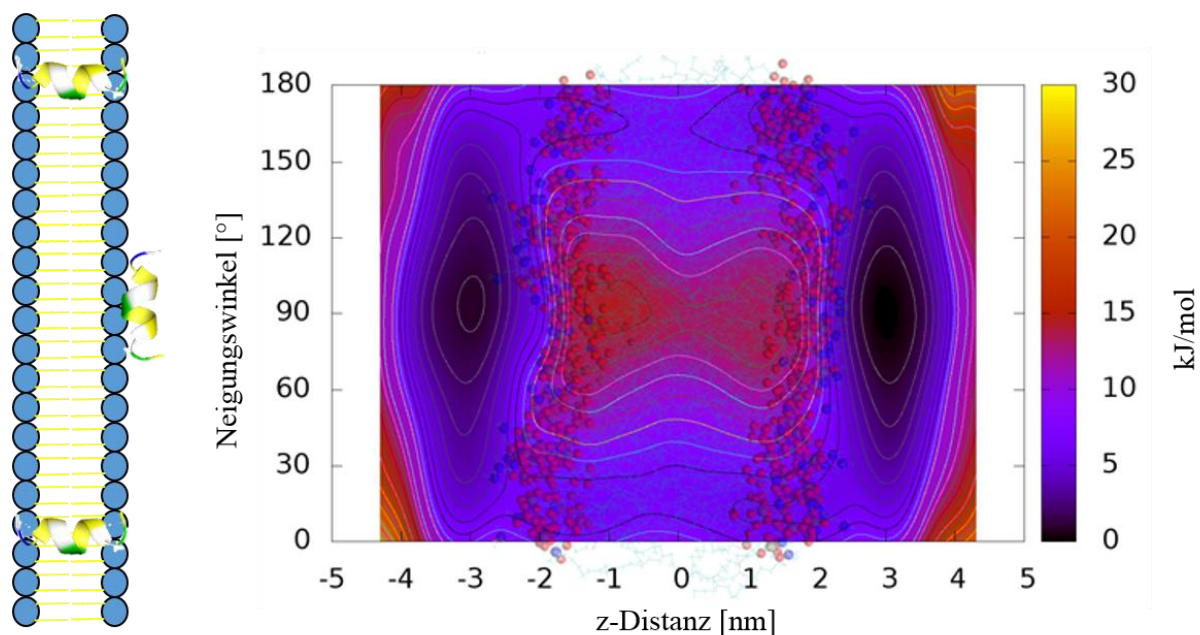


Abbildung 51: Bestimmung der Orientierung des HZ in DMPC-Lipidmembranen aus Frei-Energie-MD-Simulationen.

Die Farbskala veranschaulicht die Energieoberfläche mit dunkelblau als den energetisch günstigsten Bereich.

Orientierung des HZ in DMPC durch OCD-Spektroskopie

In SROCD-Experimenten wurden verschiedene P/L-Verhältnisse bereitgestellt. Wie im Falle des DPhPC sind keine klar erkennbaren Unterschiede zu den erhaltenen CD-Spektren zu erkennen (Abb. 52). Lediglich ein konzentrationsabhängiger Abfall der OCD-Signale ist ersichtlich.

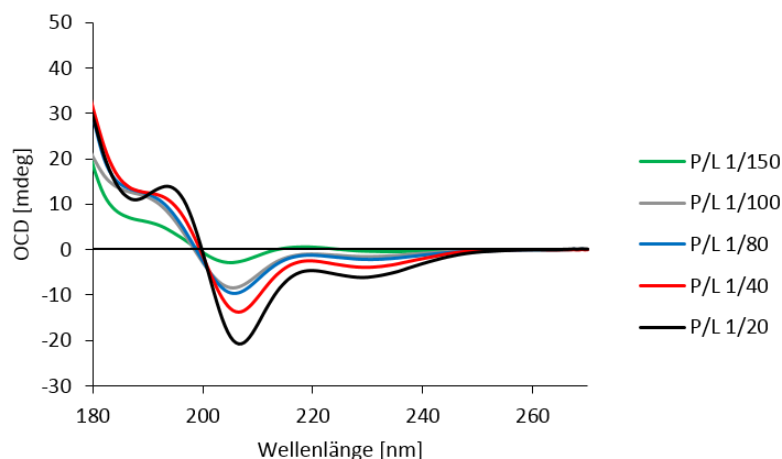


Abbildung 52: SROCD-Spektren des HZ in DMPC-Lipidmembranen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen.

T = 30 °C

Orientierung und Struktur des HZ in anderen Lipidsystemen

Die Untersuchung der Wechselwirkungen des HZ mit Lipidmembranen wurde in der folgenden Betrachtung auf weitere Lipidsysteme mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgeweitet. Interessanterweise sind die Größenordnungen der Δ_{CF_3} vergleichbar mit entweder den Ergebnissen in DMPC oder DPhPC, welche in vorigen Abschnitten geschildert wurden: POPE/DMPG (7:3, mol/mol), DPoPE, DErPC und DMoPC ähneln dabei den Werten des DPhPC, wogegen das DMPC/DMPG-System (7:3, mol/mol) das Kopplungsmuster von reinem DMPC widerspiegelt. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Änderung der Ladung, die Länge der Acylketten und die Präsenz von PE-Kopfgruppen allesamt keine Effekte auf das Verhalten der Peptide in den Lipidmembranen haben. Die einzigen Ausnahmen bilden das kurze DDPc und DMPC/LysoMPC (2:1) bei Raumtemperatur, die unterschiedliche Kopplungsmuster aufweisen. Die ^{31}P - und ^{19}F -NMR-Spektren dieser beiden Systeme sind in Abb. 53 zusammengefasst. DMPC/LysoMPC ist zudem das einzige untersuchte Lipidsystem, welches temperaturabhängige Änderungen in den dipolaren Kopplungen zeigt, wobei die Kopplungswerte bei hohen Temperaturen denen des DMPC ähneln. Folglich wurde das Verhalten des HZ in diesen beiden Lipidsystemen durch NMR-Berechnungen näher charakterisiert (Tab. 23 und 24).

In den ^{31}P -NMR-Spektren einiger DMPC/LysoMPC-Proben mit CF_3 -Bpg-markierten HZ-Analoga sind nicht-orientierte Lipidanteile zu erkennen, die womöglich aufgrund Micellenbildung des Lyso-Lipids zustande kommen. In der HZ 9-(S)- CF_3 -Ala-Probe in DDPc fallen zwei diskrete Triplett-Signale im ^{19}F -NMR-Spektrum auf, wobei die mit positiver

Aufspaltung (links von δ_{iso}) in früheren Messungen als TFA-Rest identifiziert wurde, sodass nur das Signal mit positiver Aufspaltung vom Peptid stammt.

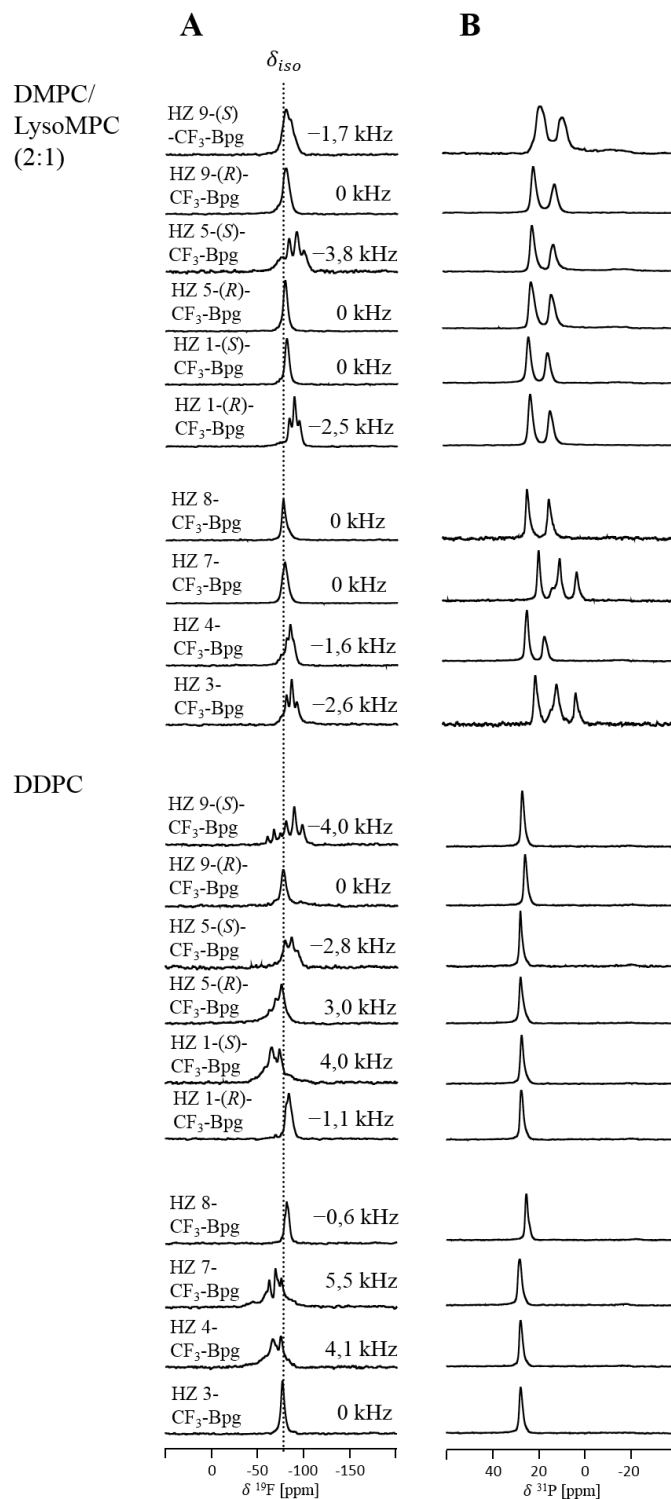


Abbildung 53: ^{19}F - und ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren der Systeme HZ/DMPC+LysoMPC und HZ/DDPC.

(A) ^{19}F -NMR-Spektren der CF₃-markierten HZ-Analoga; (B) ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DMPC/LysoMPC (2:1, mol/mol) und DDPC nach den ^{19}F -Messungen. P/L 1:100; T = 30 °C.

Die ^{15}N -Spektren des HZ sowohl in DDPC als auch in DMPC/LysoMPC (2:1) bestätigen das unterschiedliche Kopplungsmuster (Abb. 54), das in ^{19}F -NMR-Spektren beobachtet wurde, durch chemische Verschiebungen von 100-118 ppm (DDPC) und 127-145 ppm (DMPC/LysoMPC). Beide Ergebnisse lassen auf eine geneigte Peptidorientierung schließen, wobei im Lyso-System eine stärkere Neigung zu erwarten ist als in DDPC. Die Lipide sind im Gegensatz zu einigen ^{19}F -NMR-Proben sehr gut als Lipiddoppelschichten orientiert (s. Abb. 54B).

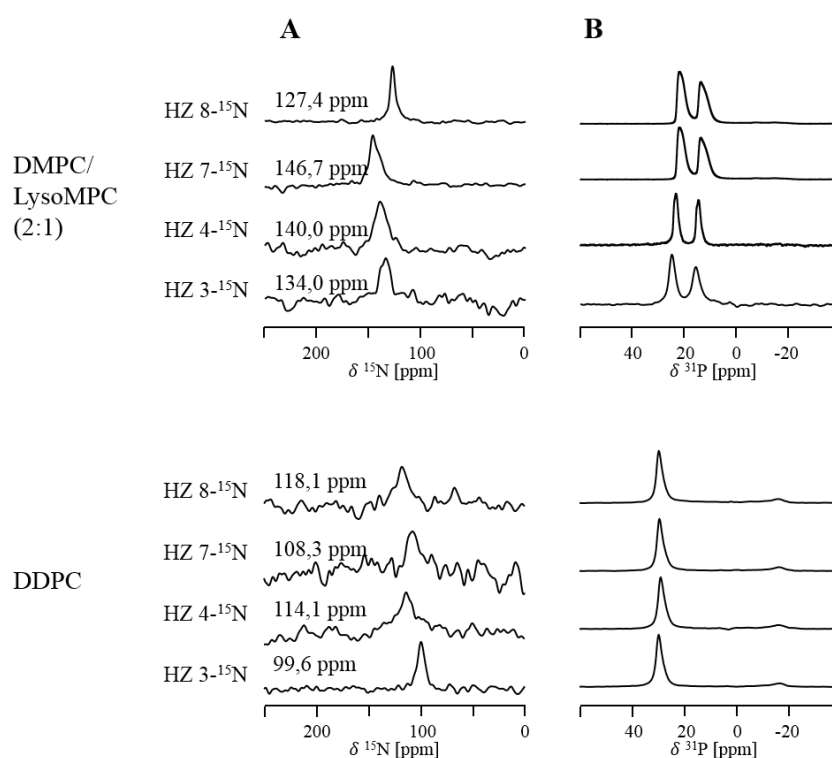


Abbildung 54: ^{15}N - und ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren der Systeme HZ/DMPC+LysoMPC und HZ/DDPC.

(A) ^{15}N -NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga; (B) ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DMPC/LysoMPC (2:1, mol/mol) und DDPC nach den ^{15}N -Messungen. P/L 1:50; T = 35 °C.

Die Struktur- und Orientierungsberechnungen des HZ in DMPC/LysoMPC resultieren in erheblichen Neigungen des Peptids in der Lipidmembran ohne übereinstimmenden strukturellen Tendenzen (Tab. 23). Obwohl die Peptide in den ^{19}F -Experimenten Neigungen zeigen, ist ein bevorzugter Winkel nicht auszumachen und die erhaltenen Orientierungsparameter und -winkel variieren stark. Die relativ niedrigen Werte für S_{mol} implizieren eine hohe Mobilität des Peptids in diesem Lipidsystem, anders als in DMPC und

DPhPC und/oder verdeutlichen die Schwierigkeit die Daten den strukturellen Modellen anzupassen, da die meisten Strukturmodelle relativ niedrige RMSD-Werte ergeben.

Position der Datenpunkte	Isotopen-Label	Struktur	ρ [°]	τ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
3-4-7-8	CF ₃ -Bpg	α -Helix	36	50	0,2	0,87
		3₁₀-Helix	132	18	0,3	0,61
		β -Homologie	73	58	0,2	0,92
		NMR (DPC)	63	10	0,3	0,62
		NMR (SDS)	30	79	0,7	0,39
		NMR (TFE)	129	8	0,4	0,12
3-4-7-8	¹⁵ N					RMSD [ppm]
		α -Helix	91	46	0,9	1,29
		3 ₁₀ -Helix	171	18	0,4	3,54
		β-Homologie	144	26	0,4	2,27
		NMR (DPC)	213	9	0,5	2,61
		NMR (SDS)	109	40	0,4	5,87
NMR (TFE)	87	23	0,4	3,31		
3-4-5	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					RMSD [kHz]
		α -Helix	64	4	1,0	0,23
		3 ₁₀ -Helix	125	17	0,4	0,51
		β-Homologie	126	36	0,5	0,13
		NMR (DPC)	123	16	0,5	0,12
NMR (SDS)	84	10	0,5	0,33		

		NMR (TFE)	154	11	0,5	0,13
7-8-9	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					
	α -Helix		113	4	0,3	0,40
	3₁₀-Helix		140	57	0,2	0,13
	β-Homologie		91	8	0,2	0,36
	NMR (DPC)		8	13	0,2	0,50
	NMR (SDS)		39	88	0,2	0,42
	NMR (TFE)		151	48	0,2	0,23

Tabelle 23: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DMPC/LysoMPC-Lipidmembranen.

Die Daten wurden anhand der ¹⁹F- und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Ergebnisse berechnet. Die Ergebnisse mit guter Übereinstimmung sind durch fette Markierung hervorgehoben.

Alle τ wurden nach den Umformungen, die in Tab. 21 angegeben sind, in äquivalente Werte umgerechnet. DMPC/LysoMPC (2:1, mol/mol)

Ähnlich wie beim DMPC/LysoMPC-System sind die Peptide in DDPC-Lipidmembranen mobiler als in DMPC und DPhPC, indiziert durch häufiges Auftreten von S_{mol} -Werten von 0,2-0,4 (Tab. 24). Strukturen aus den Flüssigkeits-NMR-Messungen zeigen die beste Übereinstimmung, wobei jedoch analog zum Lysolipid-System keine definierten Orientierungen, sondern eher ein Bereich an Neigungs- und Rotationswinkeln durch erhöhte Mobilität der Peptide erkennbar sind.

Position der Datenpunkte	Isotopen-Label	Struktur	ρ [°]	τ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
3-4-7-8	CF ₃ -Bpg					
		α -Helix	177	59	0,3	0,45
		3₁₀-Helix	145	57	1,0	0,41
		β-Homologie	204	78	0,3	0,30
		NMR (DPC)	183	66	0,4	0,24
		NMR (SDS)	176	31	0,3	1,28

					Ergebnisse	
		NMR (TFE)	170	48	0,4	0,60
3-4-7-8	¹⁵ N					RMSD [ppm]
		α -Helix	282	52	1,0	2,70
		3₁₀-Helix	54	55	0,3	1,36
		β -Homologie	56	67	0,2	1,47
		NMR (DPC)	38	71	0,2	1,18
		NMR (SDS)	3	57	0,3	0,45
		NMR (TFE)	280	47	0,4	2,09
3-4-5	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					RMSD [kHz]
		α -Helix	98	74	1,0	0,58
		3 ₁₀ -Helix	241	73	0,5	1,43
		β -Homologie	225	83	0,5	0,95
		NMR (DPC)	194	88	0,7	0,29
		NMR (SDS)	22	76	0,7	0,44
		NMR (TFE)	5	88	0,7	0,21
7-8-9	CF ₃ -Bpg + CF ₃ -Ala					
		α -Helix	172	72	0,5	0,72
		3₁₀-Helix	151	57	0,5	0,56
		β -Homologie	202	74	0,3	0,96
		NMR (DPC)	184	65	0,4	0,73
		NMR (SDS)	219	83	0,6	0,17
		NMR (TFE)	163	45	0,5	0,27

Tabelle 24: Struktur- und Orientierungsparameter des HZ in DDPC-Lipidmembranen.

Die Daten wurden anhand der ¹⁹F- und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Ergebnisse berechnet. Die Ergebnisse mit guter Übereinstimmung sind durch fette Markierung hervorgehoben.

Alle τ wurden nach den Umformungen, die in Tab. 21 angegeben sind, in äquivalente Werte umgerechnet.

Wechselwirkungen des HZ mit DPOPE

Aufgrund der keilförmigen Lipidstruktur besitzen die Lipidmembranen aus DPOPE eine negative spontane Krümmung und sind dadurch in der Lage nicht-lamellare Strukturen anzunehmen. DPOPE besitzt daher einen gut detektierbaren, temperaturabhängigen $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ -Phasenübergang bei etwa 43 °C [151], wodurch dieses Lipidsystem hervorragend geeignet ist für die Untersuchung von krümmungsinduzierenden Eigenschaften von Peptiden [10].

^{31}P -NMR-Spektren des Lipids wurden in Temperatur-Serienmessungen zwischen 10 und 80 °C aufgenommen. Für das pure DPOPE wird die $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ -Phasenübergangstemperatur bei ~40 °C gefunden (Abb. 55), die im Bereich des Literaturwertes liegt. In der Peptid/Lipid-Messung zeigt HZ bei einem P/L-Verhältnis von 1:100 keine modifizierenden Wirkungen auf den Phasenübergang, erhöht ihn aber marginal um etwa 5 °C auf 45 °C bei vierfach erhöhter Konzentration.

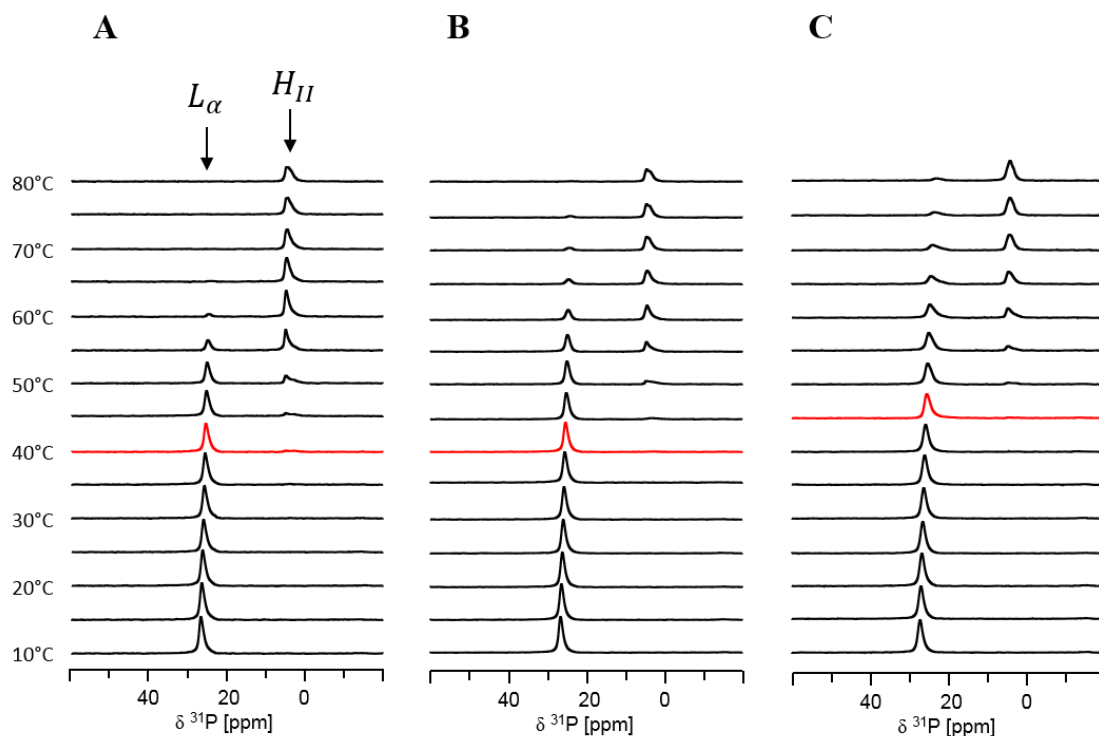


Abbildung 55: ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des Lipids DPOPE und Beeinflussung durch HZ.

Spektren des DPOPE in purem Zustand (A) und bei Präsenz von HZ bei einem P/L-Verhältnis von 1:100 (B) und 1:25 (C). Der Beginn des lamellar \rightarrow nicht-lamellar-Lipidphasenübergangs ist durch rote Farbe gekennzeichnet.

4.3.6 Struktur und Orientierung von ALM in DMPC

Die Struktur des ALM in DMPC-Lipidmembranen wurde mittels ^{19}F -Festkörper-NMR-Messungen analysiert. Es wurden Daten aus einer früheren Untersuchung aus der Gruppe Ulrich ^[149] verwendet, um primär die C-terminale Konformation des ALM zu bestimmen. Bei der Analyse wurde die Kristallstruktur aus ^[90] herangezogen, welche in der Protein-Datenbank in ^[152] unter der Bezeichnung 1AMT.pdb zugänglich ist, um ihre Übereinstimmung mit den hier erhaltenen experimentellen Daten zu überprüfen. Die Einheitszelle der Struktur enthält drei Moleküle mit leicht unterschiedlichen Konformationen. In den folgenden Untersuchungen wurde das Molekül verwendet, das in der Analyse mit allen Datenpunkten den besten RMSD zeigte. Die zwei postulierten Helixsegmente wurden zusammen und getrennt analysiert.

Die DMPC-Lipide zeigen eine gute Orientierung als Lipiddoppelschichten. In der Gel- bzw. der fluiden Phase des DMPC weisen die Peptide verschiedene dipolare Aufspaltungen auf, was bereits in der früheren Festkörper-NMR-Studie gefunden wurde (Abb. 56 und Tab. 25).

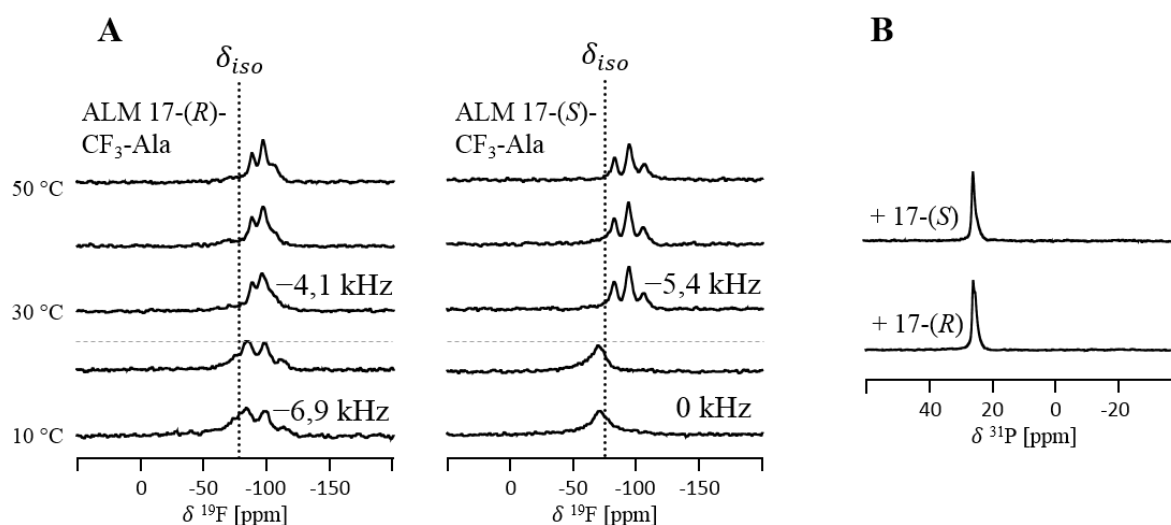


Abbildung 56: ^{19}F - und ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des Systems ALM in DMPC.

(A) ^{19}F -NMR-Spektren der CF₃-Ala-markierten ALM-Analoga in orientierten DMPC-Lipidmembranen mit Angabe der erhaltenen dipolaren Kopplungen Δ_{CF_3} bei einem P/L von 1:100 ($T = 30\text{ °C}$). (B) ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektren des DMPC nach den ^{19}F -NMR-Messungen ($T = 30\text{ °C}$).

Temperatur	Dipolare Kopplungen Δ_{CF_3} [kHz]							
	5-(R)- CF ₃ - Ala	5-(S)- CF ₃ - Ala	10-(R)- CF ₃ - Ala	10-(S)- CF ₃ - Ala	16-(R)- CF ₃ - Ala	16-(S)- CF ₃ - Ala	17-(R)- CF ₃ - Ala	17-(S)- CF ₃ - Ala
15 °C	8,1	0	-6,6	1,4	n.b.	n.b.	-6,9	0
35 °C	-3,0	-3,3	+1,8	-5,7	+4,6	-5,7	-4,1	-5,4

Tabelle 25: Dipolare Kopplungen der CF₃-Ala-markierten ALM-Analoga in DMPC-Lipidmembranen.

Die Daten stammen aus den ¹⁹F-Festkörper-NMR-Messungen bei einem P/L-Verhältnis von 1:100.

Frühere Ergebnisse aus ¹⁴⁹ sind in grauer Farbe dargestellt.

n.b.: nicht bestimmt

Anhand des niedrigen RMSD-Werts von 0,21 ist ersichtlich, dass die Struktur des C-terminalen Segments (16-17) durch die Kristallstruktur aus der Literatur sehr gut repräsentiert wird (Tab. 26). Die Übereinstimmung bedeutet eine gemischte Konformation aus α - und 3_{10} -Helix für den C-terminalen Bereich. Der S_{mol} -Wert von 1,0 veranschaulicht den starren Zustand dieses Segments des ALM in der Membran. Für das gesamte Segment (5-10-16-17) resultiert ein Neigungswinkel τ von 2° und somit eine Transmembranorientierung des ALM in DMPC-Lipidmembranen, wobei in diesem Fall der Rotationswinkel ρ keine Bedeutung besitzt, weil das Peptid sich im hydrophoben Membrankern befindet.

Die Kristallstruktur passt in der Gel-Phase des DMPC nicht und die Peptide sind durch höhere Mobilität gekennzeichnet. Zusammen mit Neigungswinkeln von etwa 55-57° für das Segment von ⁵Aib bis ¹⁷Aib im Vergleich zur Membrannormalen wird eine geneigte Ausrichtung der Peptide indiziert. Jedoch sind die Daten mit hohen RMSD-Werten verbunden und daher nicht vertrauenswürdig. Die Betrachtung der Neigungen des C-terminalen und N-terminalen Segments könnten einen Knick von etwa 40° in der Struktur bedeuten.

Datenpunkte	Temperatur [°C]	ρ [°]	τ [°]	S_{mol}	RMSD [kHz]
16-17	35	208	46	1,0	0,21
5-10	35	208	4	1,0	1,71
5-10-16-17	35	323	2	0,9	1,73
5-10	15	347	83	0,7	4,27
5-10-17	15	121	55	0,3	4,71

Tabelle 26: Struktur- und Orientierungsparameter des ALM in DMPC-Lipidmembranen anhand der ^{19}F -Festkörper-NMR-Analyse.

Die Ergebnisse mit guter Übereinstimmung sind durch fette Markierung hervorgehoben. In diesen Daten wird das N-terminale Segment (5-10) als Hauptachse definiert.

5 Diskussion

5.1 Diphytanoyl-Lipide

5.1.1 Diphytanoyl-Lipide als Modellmembranen

In dieser Untersuchung wurde zum ersten Mal eine detaillierte strukturelle NMR-Untersuchung von Diphytanoyl-Lipiden in orientierten Proben unternommen. Die DPhPC-Lipidpolymorphie, der in der Literatur bereits beschrieben wurde ^[27], ist dabei als ein Temperatur- bzw. Hydratationseffekt charakterisiert worden. Je höher die Temperatur und die damit verbundene Dehydratation der orientierten Lipidprobe, desto mehr werden nicht-lamellare Lipidphasen begünstigt. Der dadurch hervortretende Lipidphasenübergang des DPhPC von lamellaren zu nicht-lamellaren Phasen ist in der Reihe $L_{\alpha} \rightarrow L_{\alpha}' \rightarrow Q \rightarrow H_{II}$ zu beobachten. Die Bildung von zwei diskreten lamellaren Lipidphasen wurde zuvor als eine hydrationsbedingte Reorientierung der PC-Kopfgruppe in nicht-orientierten Proben beschrieben. Die Bildung der kubischen Phasen dagegen bleibt hypothetisch und wurde für DPhPC nie verifiziert. Theoretisch könnte es sich auch um die Bildung von invertierten Micellen oder anderweitigen Anordnungen handeln, welche unspezifische Anordnungen der Lipidmoleküle repräsentieren.

Während DPhPC auf festen Trägern Lipiddoppelschichten bilden konnte, wurde dies für die anderen untersuchten Diphytanoyl-Lipide DPhPG, DPhPE und DPhPS nicht festgestellt. Der Grund liegt womöglich in der Struktur bzw. Lipidform der Diphytanoyl-Lipide, denn sie besitzen sperrige Acylketten und dies sollte ihren Übergang zu nicht-lamellaren Lipidphasen begünstigen, wie dies im Fall des DPhPC gefunden wird. So ist es nicht überraschend, dass bspw. DPhPE, welches nicht nur sperrige Acylketten trägt, sondern auch eine kleine Kopfgruppe, eine starke negative spontane Membrankrümmung verursacht, sodass es gar nicht in der Lage ist Lipiddoppelschichten zu bilden, wie es schon in ^[153,154] berichtet wurde. Stattdessen zeigt DPhPE in dem hier gemessenen Temperaturbereich ausschließlich die invertierte hexagonale Phase H_{II} . Die Frage ist, wie hoch das Niveau der Hydratation in den orientierten NMR-Proben ist und ob es einen großen Effekt auf die Lipidanordnungen hat, dass viele Experimente unter Verwendung von Diphytanoyl-Lipiden in wässrigen Lösungen stattfinden. Die Vorbereitung von Vesikel-NMR-Proben aus DPhPG konnte diesen Punkt erläutern, indem gezeigt wurde, dass DPhPG auch bei erhöhter Hydratation keine stabilen

Vesikeln bildet. DPhPS weist hier in orientierten Membranen ähnliche Merkmale auf wie DPhPG und wurde in der Literatur dennoch als geeignetes Lipidsystem postuliert, welches in elektrophysiologischen Untersuchungen mit typischem Aufbau einzelne Lipidmembranen gebildet hat ^[154]. Da die Ergebnisse in dieser Arbeit in dieser Hinsicht ein hydrations- bzw. temperaturabhängiges polymorphisches Verhalten der Diphytanoyl-Lipide und daher mögliche strukturelle Defekte in den Lipidmembranen indizieren, ist die Nutzung dieser Lipidsysteme zu reevaluierten. Neben DPhPC werden in der Literatur besonders Lipidsysteme aus DPhPC/DPhPX-Mischungen benutzt. Der Grund liegt oft in der Einführung von negativer Ladung in die Membran (PG oder PS) oder der Imitation von typischen Zusammensetzungen bekannter zellulärer Biomembranen (PC/PG, PC/PE). Als Teil einer Literaturrecherche werden im Anhang (Teil b) die Untersuchungen der letzten Jahre tabellarisch zusammengefasst, in denen solche DPhPC/DPhPX-Mischungen als Modellmembranen benutzt wurden.

Folglich wird hier festgestellt, dass Bedingungen wie hohe Temperaturen und unzureichende Hydratation, vor allem in Kombination mit Verwendung von hohen Anteilen (mehr als 50 %) an Diphytanoyl-Lipiden außer DPhPC vermieden werden sollten.

5.1.2 Wechselwirkungen des PGLa mit Diphytanoyl-Lipidmembranen

Die Wechselwirkungen des PGLa mit DPhPC-Lipidmembranen lässt weitere interessante Eigenschaften der Diphytanoyl-Lipide in Erscheinung treten, im speziellen des DPhPC. Durch seine positive Ladung besitzt PGLa zu zwitterionischen PC-Lipidmembranen eine schwächere Affinität als zu negativ geladenen PG-Kopfgruppen, was aus den Ergebnissen der ³¹P- und ¹⁹F-Festkörper-NMR-Messungen verdeutlicht wird.

Die Verstärkung der L_{α} -Phase durch das membranaktive PGLa indiziert eine Wechselwirkung des kationischen Peptids mit der PC-Kopfgruppe der Lipide. Vermutlich wird bei der Bindung des Peptids die Membranoberfläche in einen lokal dehydratisierten Zustand gebracht, wodurch der Übergang von L_{α} zu L_{α}' energetisch günstiger wird. Weiterhin induziert PGLa positive Membrankrümmung in DPhPC, was anhand der Verschiebung des Phasenübergangs lamellar → nicht-lamellar zu höheren Temperaturen gezeigt wird. Da für die Klasse der Magainine die Bildung von *toroidal pores* postuliert werden und diese aus positiv gekrümmten Lipiden bestehen, kann der Effekt des PGLa auf diesen Mechanismus zurückgeführt werden. Aus struktureller Sichtweise wurde für PGLa in früheren Studien die α -helikale Konformation nur bis ⁶Ala bestätigt ^[38]. Das N-terminal davon liegende Segment wurde bisher durch NMR-

Techniken nicht analysiert. Hier wurde durch ^{19}F -Festkörper-NMR gezeigt, dass sich die α -Helix bis ^4Ser ausstreckt.

In Wechselwirkungen mit Lipidmembranen konnte PGLa in früheren Untersuchungen in den hydrophoben Membrankern von DMPC/DMPG-Lipidmembranen konzentrationsabhängig eintauchen ^[41]. In weitergehenden Studien wurde das Peptid unterhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipidsystems als insertiert vorgefunden, was bis dato nur in Kombination mit Magainin 2 infolge eines Synergieeffekts beobachtet wurde ^[155]. In der fluiden Phase flippt die Helix zu einer T-state-Orientierung und wird bei höheren Temperaturen vom Membrankern rausgestoßen ^[40]. In den Untersuchungen hier wurde die außerordentliche Stabilität von DPhPC-Membranen anhand der Abwesenheit einer Insertierung des PGLa in den Membrankern selbst bei hohen Konzentrationen bekräftigt. Unabhängig von der Konzentration des Peptids und der Temperatur besetzt PGLa die Oberfläche der Lipidmembran, was durch ^{19}F -Festkörper-NMR- und OCD-Spektroskopie gezeigt wurde. PGLa ist somit nicht in der Lage in DPhPC-Lipidmembranen zu insertieren, weil die archaealen Diphytanoyl-Lipide mit ihrem dicht gepackten, methylierten Acylketten eine relativ hohe Schwelle für die Insertion von porenbildenden Peptide darstellen, was in der Literatur ebenfalls diskutiert wurde ^[156]. Womöglich spielt hier erneut die Kegelform (*conic shape*) und die dadurch verursachte starke negative spontane Krümmung der Lipidmembran eine bedeutende Rolle. In der Literatur wurden solche Lipidmembranen mit höheren Schwellenkonzentrationen für Peptidinsertierung in Zusammenhang gebracht, während Membranen mit positiver spontaner Krümmung leichter penetriert werden können ^[157–159]. Diese Krümmungseigenschaften der Diphytanoyl-Lipide könnten Faktoren sein, welche die Insertion membranaktiver Moleküle erschweren und die anfangs diskutierte Resistenz und Widerstandsfähigkeit von Archaeen zusätzlich erklären.

5.2 Struktur und Funktion von HZ

5.2.1 Strukturelle Merkmale

Bei der strukturellen Charakterisierung des HZ wurde die Präsenz einer helikalen Konformation in allen Umgebungen, welche als Lipidmembran-Mimik dienen, und durch alle verwendeten Methoden bewiesen.

In der CD-Spektroskopie erschwert die schlechte Wasserlöslichkeit der hydrophoben HZ-Peptide die Bestimmung der Konformation in wässrigen Medien. Dabei gibt es dennoch Unterschiede in der Löslichkeit der verschiedenen ^{19}F -markierten HZ-Analoga, womöglich aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizität der Peptide. Diejenigen von ihnen, welche besser löslich sind, zeigen keine bestimmte Struktur (*random coil*) mit negativen Maxima bei einer Wellenlänge von etwa 198 nm. Die Spektren in hydrophober Umgebung weisen definierte CD-Muster auf, mit einer positiven Bande bei 188 nm und einer etwas stärkeren negativen Bande bei etwa 204-207 nm sowie einer schwachen Schulter bei etwa 227 nm. Dieses typische Spektrum des HZ wird in CD-Messungen weder von der Ladung der Membran noch von der Temperatur bzw. dem Lipid-Phasenzustand beeinflusst. Auch die Änderung der hydrophoben Dicke der Lipiddoppelschicht modifiziert die Struktur nicht, was für eine hohe strukturelle Stabilität spricht. Die ^{19}F -Markierung der Peptide mit CF_3 -Bpg und (*R*)- und (*S*)- CF_3 -Ala moduliert die Sekundärstruktur der Peptide ebenfalls nicht, womit die Integrität ihrer Inkorporierung verifiziert wird.

Der Vergleich der erhaltenen CD-Spektren für HZ mit CD-Spektren aus der Literatur lässt eine starke Ähnlichkeit zu 3_{10} -helikalen Strukturen ^[160] sowie dem *β -bend ribbon spiral* ^[71,111] zu, welcher auf β -Schleifen basiert, jedoch eine helikale Struktur darstellt und dasselbe H-Brückenmuster wie die klassische 3_{10} -Helix aufweist (Abb. 57). Die Ähnlichkeit ihrer CD-Spektren deutet auch auf die strukturelle Verwandtschaft der beiden Konformationen hin. Außerdem ist bekannt, dass diese Strukturen von Aib-Resten stabilisiert werden, welche charakteristisch für Peptaibole wie HZ sind ^[65,66], und für einige Harzianine angenommen wurden, inklusive dem hier untersuchten HZ ^[105]. Das klassische *β -bend ribbon spiral* wurde dabei speziell für Aib-Pro-Sequenzen vorgeschlagen, die ebenfalls in HZ vorkommen.

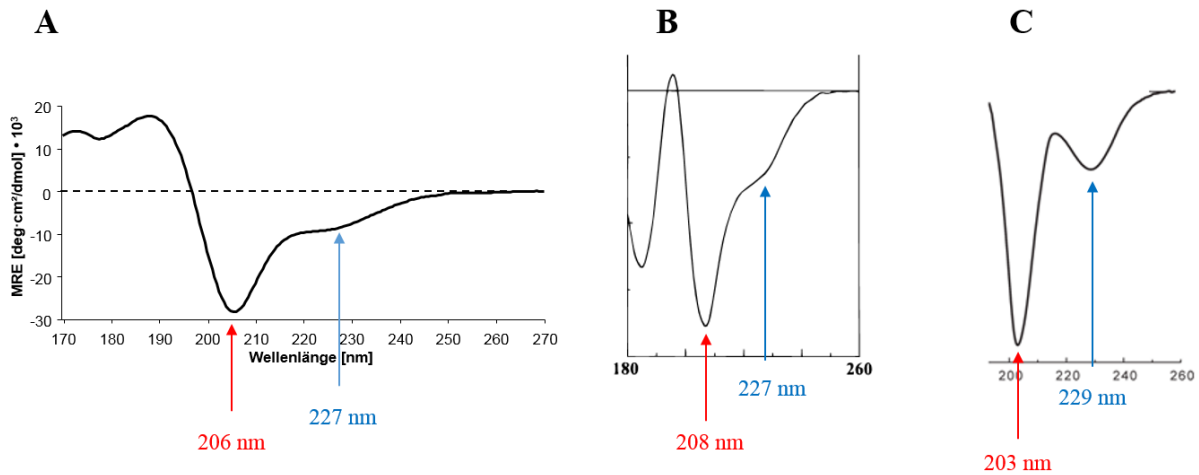


Abbildung 57: Vergleichende Illustration von CD-Spektren des HZ mit Spektren aus der Literatur.

Darstellung eines CD-Spektrums des HZ (A); das CD-Spektrum eines 3_{10} -helikalen, Aib-enthaltenden Octapeptids (B); CD-Spektrum für ein β -bend ribbon spiral-bildendes N-acetyliertes (Aib-Pro)-Tetrapeptid (C) (verändert übernommen aus ^[111,161]).

Charakteristische negative CD-Banden werden durch farbige Pfeile illustriert.

Als ein Maß zur Unterscheidung zwischen α - und 3_{10} -Helices benutzen Manning und Woody in theoretischen Untersuchungen ^[160] das Verhältnis der CD-Signale $\frac{\theta(208)}{\theta(222)}$ und postulieren für die 3_{10} -Helix einen Wert von 0,3-0,4, der mit denen für HZ beobachteten Werten von etwa 0,4 übereinstimmt. Die durchgeführte quantitative Sekundärstrukturanalyse der HZ-Spektren resultiert jedoch bei einem 3_{10} -helikalen Anteil von etwa 10 % und größeren Anteilen einer α -Helix und unstrukturierten Bereichen (beide 30-40 %). Das Auftreten der CD-Banden könnte die Ergebnisse der Strukturevaluierung dennoch erklären, denn eine Überlagerung der CD-Spektren einer α -Helix und eines unstrukturierten Peptids wird ein ähnliches Muster mit einem Minimum zwischen 198 nm und 208 nm aufweisen.

In MD-Simulationen ergeben strukturelle Untersuchungen des HZ die Bevorzugung einer helikalen Struktur mit Wasserstoffbrücken zwischen Rest 1 und 4 (4 \rightarrow 1-Typ), wie sie bei einer 3_{10} -Helix und dem β -bend ribbon spiral vorkommen. Dies wird deutlich bei der Betrachtung der Abstände der N-H \cdots O=C -Kontakte. Aus den Ergebnissen lässt sich vermuten, dass die simulierte HZ-Struktur etwas gestreckter ist als eine reguläre α -Helix, da die Kontakte hierfür weiter auseinander liegen und ungünstig sind. Die Ramachandran-Plots für alle Aminosäurereste bekräftigen die Vermutung (Abb. 58), weil hier die typischen α -helikalen Torsionswinkel von $\varphi = -55^\circ$ und $\psi = -45^\circ$ oft am Rand oder außerhalb des Bereichs der tatsächlichen Winkelkombinationen liegen, während 3_{10} -Helices mit den durchschnittlich beobachteten Torsionswinkeln $\varphi = -60^\circ$ und $\psi = -30^\circ$ bessere Übereinstimmungen liefern.

Das im Abschnitt Ergebnisse eingeführte β -Homologie-Strukturmodell besitzt bestimmte Winkelkombinationen, die für die meisten Reste ebenfalls besser passen als für α -Helices, außer für ^1Aib und ^9Aib . Es ist wahrscheinlich, dass die Annahme einer starren durchgängigen idealisierten Struktur, wie im Falle von α - und 3_{10} -Helices die Realität nicht ganz widerspiegelt, da bspw. α -Helices einen größeren Bereich an Winkelkombinationen annehmen können und nicht durch einheitliche Torsionswinkel charakterisiert sind.

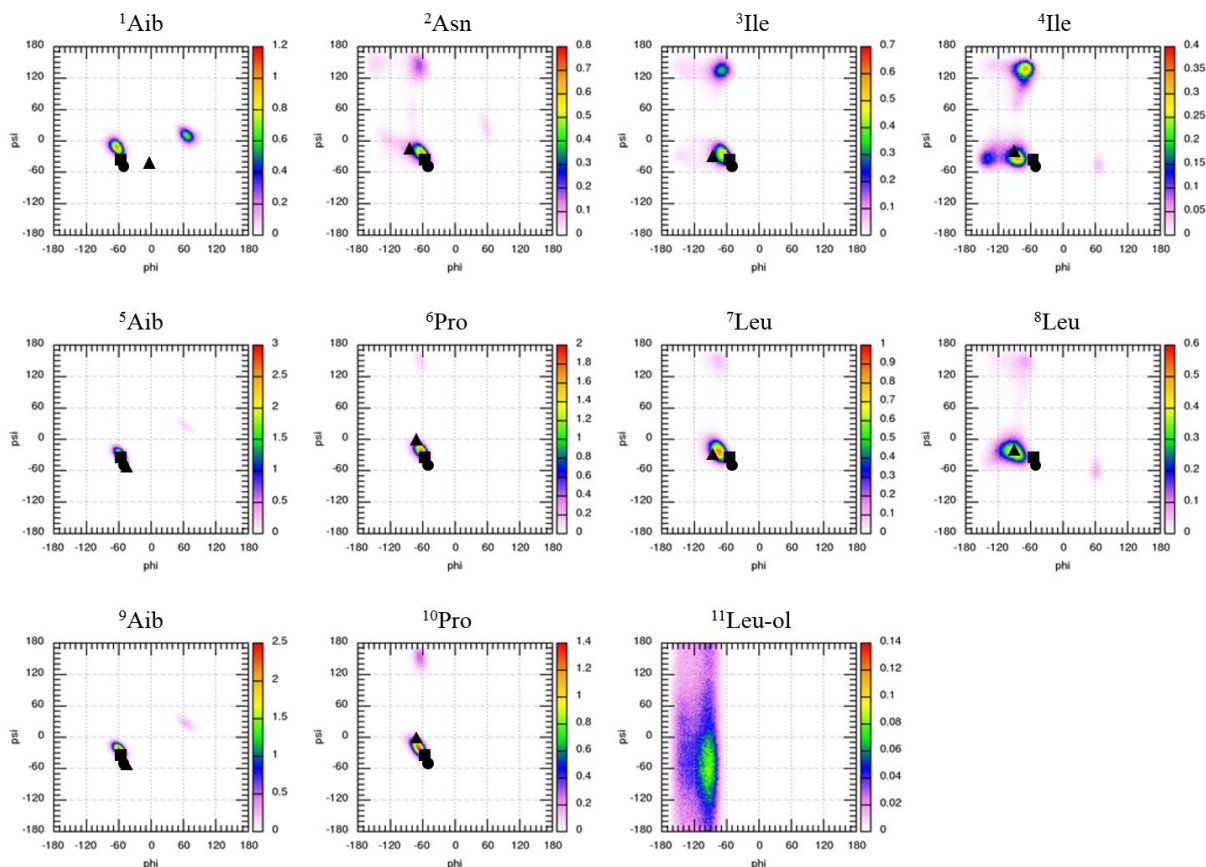


Abbildung 58: Vergleich der Ramachandran-Plots von ausgewählten helikalen Strukturen mit den experimentellen Ergebnissen für HZ.

Daten stammen aus einer 750 ns MD-Simulation. Kennzeichnung der typischen Torsionswinkel für eine α -Helix (Kreis), 3_{10} -Helix (Quadrat) und β -Homologie-Struktur (Dreieck).

Die Farbskala verdeutlicht die Energieoberfläche mit rot als den energetisch günstigsten Bereich von Winkelkombinationen.

Für die Reste ^3Ile und ^4Ile erscheinen neben den Torsionswinkeln im helikalen Bereich des Plots weitere ungewöhnliche Kombinationen bei $\varphi = -70^\circ$ und $\psi = 130^\circ$, die im Bereich der β -Faltblatt-Strukturen liegen. Möglich ist die Präsenz einer β -Schleife, die jedoch im Falle des Typs II durch folgende Torsionswinkel für Dipeptide beschrieben wird: $\varphi_i = -60^\circ$, $\psi_i = 120^\circ$,

$\varphi_{i+1} = 80^\circ$, $\psi_{i+1} = 0^\circ$ [162]. Während der Rest i der Dipeptid-Einheit mit dieser Konformation geeignet zu sein scheint, werden die Winkel des Rests $i+1$ in den Plots nicht beobachtet.

Bei der allgemeinen Evaluierung der Daten aus der Flüssigkeits-NMR weist die α -Helix die Struktur mit der größten experimentellen Übereinstimmung auf, wobei keine durchgängige Struktur impliziert wird. Vielmehr wird das Segment von ^3Ile bis $^8\text{Leu}/^9\text{Aib}$ als helikal und die Termini als strukturell mobil charakterisiert. Diese Resultate sind konform mit den Ergebnissen der CD-Strukturberechnungen und den CD-Spektren, die vermutlich als Summe der Spektren der α -Helix und unstrukturierten Anteilen entstehen können. Weiterhin werden für die Mitte bzw. den C-Terminus des HZ drei H-Brücken der Art 5 \rightarrow 1 und für den N-Terminus zwei H-Brücken der Art 4 \rightarrow 1 vorgeschlagen, was impliziert, dass das Peptid vorwiegend eine α -Helix mit einem strukturell abweichenden N-terminalen Segment aus 3_{10} -helikalen Motiven, β -*bend ribbon spiral* oder anderen helikalen Strukturen mit 4 \rightarrow 1 H-Brückenmuster bildet.

In der Festkörper-NMR-Analyse dagegen konnten unter allen Bedingungen gute Ergebnisse mit der β -Homologie-Struktur gefunden werden, sowohl bei der Betrachtung des Hauptsegments, als auch getrennter Bereiche des Peptids. Besonders im Vergleich zu der strukturell verwandten idealen 3_{10} -Helix wird die β -Homologie-Struktur dennoch bevorzugt.

Methode	Strukturelles Ergebnis über HZ
CD	<ul style="list-style-type: none"> • 3_{10}-Helix oder β-<i>bend ribbon spiral</i> bzw. β-Homologie-Struktur passend anhand dem Muster der Spektren • Strukturberechnung und CD-Muster können auch eine Überlagerung von α-Helix und <i>random coil</i> bedeuten
MD	<ul style="list-style-type: none"> • 3_{10}-Helix oder β-<i>bend ribbon spiral</i> bzw. β-Homologie-Struktur passend aufgrund H-Brückenmuster • β-Homologie-Struktur durchgehend passend anhand Ramachandran-Plots
Flüssigkeits-NMR	<ul style="list-style-type: none"> • zentrale α-Helix und unstrukturierte Termini passen etwas besser als β-Homologie-Struktur • Sekundärstruktur wird vorgeschlagen von ^3Ile bis ^9Aib

-
- Mögliche Segment-Bildung anhand der H-Brücken: $3_{10}/\beta$ am N-Terminus, α von Mitte des Peptids bis C-Terminus
- Festkörper-NMR
- β -Homologie-Struktur ist die einzige Konformation, die unter allen Bedingungen gut passt

Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung des HZ anhand der verwendeten Methode.

Eine kontinuierliche Struktur scheint für HZ nicht sehr wahrscheinlich. Da idealisierte Strukturen genau dies annehmen, könnten sie in den Festkörper-NMR-Berechnungen ungünstig erscheinen. Anhand einer generellen Betrachtung kann jedoch für HZ die Bevorzugung der β -Homologie-Struktur, einer Form des *β -bend ribbon spiral* mit H-Brücken der Art $4 \rightarrow 1$, angenommen werden, da sie in keiner der Methoden als unpassend beschrieben wird, während die anderen Strukturen dies nicht vorweisen können (Tab. 27).

5.2.2 Funktionelle Merkmale

Biologische Aktivität

Die Untersuchungen zeigen klar, dass HZ nicht als vielversprechendes AMP betrachtet werden kann, da es praktisch keine antibakteriellen Aktivitäten besitzt. Aus der Literatur wurden für Peptide vergleichbarer Länge oder Sequenz, wie Trichogin GA IV und Harzianin HB I, ähnliche Hinweise gefunden. Trichogin GA IV besitzt 11 Aminosäuren wie HZ und ist zwar antimikrobiell aktiv, aber dieses Merkmal hängt mit dem lipophilen Octanoyl-Schwanz am N-Terminus zusammen und geht verloren, wenn die Kette kürzer wird ^[76]. Das strukturell verwandte Harzianin HB I besitzt auch 11 Reste und wurde ebenfalls als nicht antimikrobiell eingestuft ^[75]. Die Befunde deuten also an, dass für kurze Peptaibole eine hinreichende Länge essentiell ist, um antimikrobielle Aktivitäten zu besitzen.

HZ zeigt jedoch moderate Aktivitäten gegen das fungale Pflanzenpathogen *M. oryzae* (MIC: 16-32 $\mu\text{g/ml}$) und gegen Erythrozyten ($HC_{90} = 74 \mu\text{g/ml}$). Diese selektiven Wirkungen könnten mit der spezifischen Lipidmembranzusammensetzungen von fungalen Zellen bzw. Blutzellen zusammenhängen. Die hämolytische Aktivität rührt wahrscheinlich von der Hydrophobizität des Peptids, welche in der Literatur als eine Hämolyse-verstärkende Eigenschaft bestimmt wurde ^[163]. Nach dieser Theorie erhöht die Einführung des CF_3 -Bpg in das Peptid die

Hydrophobizität, weil die hämolytische Aktivität dadurch verstärkt wird ($HC_{90} = 13,7 \mu\text{g/ml}$). Die antifungale Aktivität von Peptaibolen ist eine bekannte Eigenschaft, die oft mit den antagonistischen Eigenschaften ihres Herkunftsorganismus *Trichoderma* in Zusammenhang gebracht wird. Dieser Aspekt spielt möglicherweise bei der Erklärung der schwachen selektiven antifungalen Aktivität des HZ eine Rolle.

Wechselwirkungen mit Lipidmembranen

Zur Beschreibung der möglichen Mechanismen von kurzen porenbildenden Peptiden/Peptaibolen wurden verschiedene theoretische Erklärungen gegeben, die in der Einleitung geschildert wurden. Die Mechanismen sehen die Insertion des kurzen Peptids in die Lipidmembran vor, da Peptaibole als porenbildende membranaktive Peptide postuliert werden. Die initiale Frage, wie HZ in die Membran eindringt, kann anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit beantwortet werden mit: es wird nicht transmembran orientiert gefunden. Die Annahme der Struktur der 3_{10} -Helix oder β -bend ribbon spiral und eine resultierende strukturelle Streckung des HZ, um die Membran zu durchspannen, stellt eine der hypothetischen Mechanismen dar. Jedoch besitzt HZ trotz einer strukturellen Änderung kaum die Länge, um Membranen wie DMPC oder DPhPC als Monomere durchspannen zu können (Abb. 59). Selbst in dünnen DDPC-Membranen konnte eine Insertion nicht nachgewiesen werden.

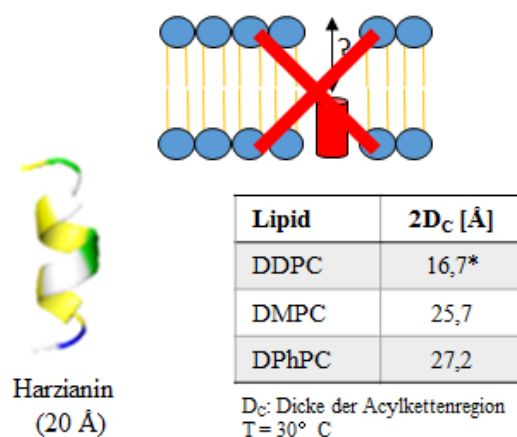


Abbildung 59: Darstellung des Vergleichs zwischen Peptidlänge des HZ und der Dicke einiger Lipidmembranen.

Die Werte für die Dicke der Acylkettenebenen der Lipidmembranen wurden aus ^[164] entnommen.
* abgeschätzter Wert aus Vergleichswerten.

In Festkörper-NMR-Untersuchungen wird HZ in den Lipidmembranen von DPhPC und DMPC bevorzugt auf der Membranoberfläche gefunden. Dies wird in DMPC in MD-Simulationen bestätigt, wobei dort die Darstellung eines einzelnen Moleküls die Situation in der Realität nicht wiedergibt. Dies ist für ein hydrophobes Peptid wie HZ zunächst überraschend, da es sich bevorzugt im Membrankern aufhalten sollte. Jedoch ist eine Neigung in die Membran erkennbar, wenn HZ mit „weichen“ Lipidsystemen wechselwirkt, wie an den Beispielen des DDPC und DMPC/LysoMPC gesehen. Die Festkörper-NMR-Daten zeigen, dass die Peptide dann eine hohe Mobilität besitzen (s. Tab. 23 und 24).

Der wichtigste Faktor bei der Wechselwirkung des HZ mit Lipidmembranen scheint die spontane Membrankrümmung zu sein. Auffallend ist die Beobachtung einer Neigung des HZ ausschließlich in Systemen, die aufgrund ihrer Lipidform eine positive spontane Membrankrümmung aufweisen: DDPC und DMPC/LysoMPC, wobei im letztgenannten System die Insertion stärker ist. In Membranen, welche keine Krümmungspräferenzen haben oder negative spontane Krümmung besitzen, befinden sich die Peptide relativ starr auf der Membranoberfläche. Wie im Fall der DPhPC-Modulierung des PGLa erwähnt, kann diese Beobachtung mit der leichteren natürlichen Penetration von Lipidmembranen mit negativer spontaner Krümmung erklärt werden ^[5,158,159], jedoch nicht mit einem möglichen Mechanismus des HZ in Einklang gebracht werden. Eine weitere interessante Beobachtung wurde in DMPC/LysoMPC-Membranen gemacht, in denen die Peptide bei Raumtemperatur in die Membran insertieren können und bei höheren Temperaturen aus ihr gedrängt werden, was wahrscheinlich eine Folge der Dehydration des Lipidsystems ist, welche die Porenbildung in Lipidmembranen verhindern kann, was am Beispiel des ALM gezeigt wurde ^[21,101].

Kleine Peptaibole besitzen membranmodifizierende Wirkungen, was auch für HZ durch die Permeabilisierung von Liposomen beobachtet wurde ^[105]. Doch der Mechanismus dieser Aktivität ist unklar. HZ ist im Gegensatz zu kationischen AMP ein hydrophobes Peptid und besitzt keine elektrostatischen Anziehungskräfte zu negativ geladenen Membranen, wodurch eine schwächere Attraktion zu erwarten ist.

Die Membraninsertion wurde im Falle des bereits erwähnten Peptaibols Trichogin GA IV in MD-Simulationen gefunden ^[165], wobei das Peptid eine starke Ausdünnung der Membran verursacht hat. Jedoch besitzt es durch den lipophilen Rest eine ausreichende Länge, was ein wichtiges Kriterium für die Membraninsertion zu sein scheint. Die Bedeutung der Peptidlänge bei der Porenbildung wurde in einer Studie bestätigt, bei der Aib-enthaltende 3_{10} -helikale Peptide mit unterschiedlichen Längen auf Kanalaktivität überprüft wurden ^[166]. Peptide

verlieren in dieser Untersuchung ihre Aktivität mit abnehmender Länge. Folglich ist für die Bildung von Kanälen eine ausreichende Länge erforderlich. Somit ist die Insertion des HZ anhand seiner kurzen Länge nicht zu erwarten und wurde auch experimentell nicht beobachtet. In der Literatur wurde für das 11-mere Trichorovin XIIa, das fast identisch zum HZ ist, die Translokation durch die Membranen von lebenden Zellen berichtet ^[167], die von Aib-Präsenz abhängig war. Dieser Mechanismus kann in dieser Untersuchung jedoch nicht validiert werden und scheint eher unwahrscheinlich zu sein, da das Peptid sich hier nicht im Membrankern aufhält. Bei solch einer Wirkweise wäre die weiterführende Frage des Zielorts in der Zelle zunächst festzustellen.

Aufgrund der Orientierung auf Membranoberflächen könnte ein Mechanismus nach dem *carpet*-Modell möglich sein, wonach die Peptide die Membran bedecken und bei ausreichender Konzentration durch Druckausübung die Membranordnung beeinträchtigen. Ein ähnlicher Mechanismus wird in Bezug auf die Wirkung von Amyloiden vermutet, die auf eine unspezifische Art abläuft und durch Aggregation und Störung der Membranintegrität beruht ^[168]. Dieser Mechanismus wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie für kleine Peptaibole vorgeschlagen ^[169] und könnte im Falle des HZ auch von Bedeutung sein. Die uniforme Postulierung der Porenbildung für alle Peptaibole scheint somit nicht der Wahrheit zu entsprechen.

Letztendlich bleibt die Frage dennoch umstritten, ob diese kleinen Peptaibole, die von filamentösen Fungi in Vielzahl produziert werden, tatsächlich einem gezielten Zweck dienen oder aber einfach nur verkürzte Nebenprodukte aufgrund unvollständiger Peptidbiosynthese darstellen. In der Literatur kann bspw. auf Peptaibolin verwiesen werden, welches nur aus 5 Aminosäuren besteht und als membraninaktiv postuliert wurde ^[72].

5.3 Struktur und Orientierung von ALM

Die ALM-Kristallstruktur aus der Literatur besitzt eine amphipathische α -helikale Struktur mit einem Knick der Helixachse bei ¹⁴Pro. In der C-terminalen Domäne werden schwache Anteile von ₃₁₀-Helices entdeckt. Die Überprüfung dieser Struktur zeigt für das C-terminale Segment eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten der ¹⁹F-Festkörper-NMR. Daraus lässt sich schließen, dass das C-terminale Segment auch in DMPC-Lipidmembranen eine Mischung aus der α -Helix und ₃₁₀-Helix darstellt. Dagegen besitzt der N-Terminus nach der

Analyse eine schlechtere Übereinstimmung mit den experimentellen Daten aus der früheren Untersuchung. Es könnte sein, dass die beobachteten Werte für die dipolaren Kopplungen etwas abweichen und daher einen gewissen Fehler beinhalten.

Weiterhin wird bei der ^{19}F -NMR-Analyse des gesamten Segments eine fast perfekte transmembrane Orientierung des Peptids mit einem Neigungswinkel des Gesamtsegments von 2° gefunden, was für das porenbildende ALM erwartet und beschrieben wurde (Abb. 60).

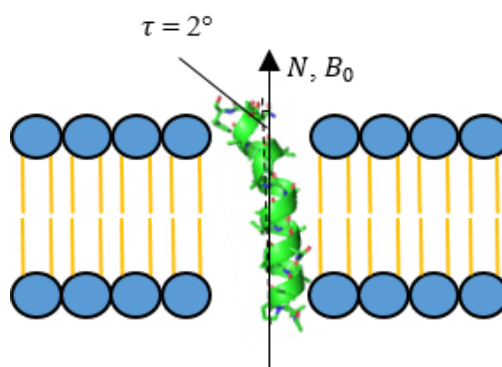


Abbildung 60: Orientierung des ALM in der DMPC-Lipidmembran.
Zur Veranschaulichung wurde die ALM-Kristallstruktur aus ^[90] verwendet.

Bei der separaten Analyse weist der N-terminale Bereich des ALM eine Neigung von 4° auf und der C-terminale Bereich von 46° , was möglicherweise für einen Knick in der Helix von etwa 40° spricht. Dieser Knick ist nicht weit entfernt von dem Wert der Kristallstruktur, für die ein Knick von etwa $35\text{-}37^\circ$ ermittelt werden kann. Jedoch müssen für eine klare Aussage die Helixachsenrotationen der beiden Segmente relativ zueinander bekannt sein.

In der Gel-Phase weisen die Peptide hohe RMSD-Werte auf, was implizieren kann, dass die Struktur des ALM nicht mit der Kristallstruktur beschrieben werden kann. Es ist auch möglich, dass die Kopplungswerte falsch abgelesen wurden, da die Auflösung einiger NMR-Spektren nicht sehr hoch ist (s. Abb. 56 und ^[170]).

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Wechselwirkungen zwischen Membran-aktiven Peptiden/Peptaibolen und Lipidmembranen untersucht. Zunächst wurde mittels ^{31}P -Festkörper-NMR Spektroskopie gezeigt, dass Diphytanoyl-Lipide, die in der Literatur häufig als Modellmembranen benutzt werden, ein polymorphes Phasenverhalten aufweisen, welches durch Temperatur, Hydratation und die Form der Lipide beeinflusst wird. Die Wechselwirkungen von PGLa mit DPhPC zeigten eine hohe Schwelle für die Membraninsertion des Peptids und zeugen daher von einer hohen Membrankohäsivität.

Anschliessend wurde das kurze Peptaibol Harzianin HK VI (HZ, 11-mer) durch Verwendung der ^{19}F -Festkörper-NMR Spektroskopie und weiteren ergänzenden Methoden strukturell und funktionell charakterisiert. In biologischen Tests wurde für HZ keine signifikanten antibakteriellen Aktivitäten beobachtet, jedoch zeigte es moderate selektive Wirkung gegen einige pflanzenpathogene Pilze sowie eine schwache hämolytische Aktivität. Die strukturellen Ergebnisse legen eine Faltung als stabilisierte Variante einer *β -bend ribbon spiral* in membrangebundener Form nahe. Diese helikale Struktur mit β -Schleifen besitzt Wasserstoffbrücken der Form 4 \rightarrow 1 und ist daher nah verwandt mit der klassischen 3_{10} -Helix. Als molekulare Orientierung von HZ in DPhPC Doppelschichten wurde eine Ausrichtung der Helix-Achse entlang der Membranoberfläche gefunden. Diese Orientierung wurde bei weiteren Experimenten mit unterschiedlichen Lipidmembransystemen nur durch die spontanen Krümmungspräferenzen der Lipide moduliert und ist daher primär von der Form der Lipidmoleküle abhängig. Nur in Membranen mit einer positiven spontanen Membrankrümmung nahm HZ eine geneigte Orientierung an, jedoch wurde eine komplette Membraninsertion auch in dünnen Membranen nicht beobachtet. Die Bildung von Poren kann somit nicht einheitlich für alle Vertreter der Peptaibol-Klasse postuliert werden. Dieses kurze Peptaibol scheint einen alternativen Funktions-Mechanismus vorzuweisen, indem es z.B. lateral auf der Membranoberfläche aggregiert und dadurch eine Störung der Membranintegrität auslöst.

Für das lange Peptaibol Alamethicin (20-mer) hingegen wurde die Bildung einer gemischten $\alpha/3_{10}$ -helikalen Konformation am C-Terminus, der als strukturell flexibel gilt, und eine transmembrane Orientierung in DMPC-Lipidmembranen gefunden, was eine Pore bestätigt.

Die Ergebnisse deuten sowohl auf strukturelle als auch funktionelle und mechanistische Variabilität in der Klasse der membranaktiven Peptaibole hin, besonders im Hinblick auf die Unterschiede zwischen langen und kurzen Peptaibolen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] W. Müller-Esterl, U. Brandt, *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 1. Aufl., Elsevier Spektrum Akad. Verl., München, **2004**.
- [2] V. Luzzati, P. A. Spegt, *Nature* **1967**, *215*, 701–704.
- [3] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science (New York, N.Y.)* **1972**, *175*, 720–731.
- [4] a) P. R. Cullis, M. J. Hope, C. P. Tilcock, *Chemistry and physics of lipids* **1986**, *40*, 127–144; b) I. R. Cooke, M. Deserno, *Biophysical journal* **2006**, *91*, 487–495.
- [5] E. Strandberg, D. Tiltak, S. Ehni, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1818*, 1764–1776.
- [6] J. Zimmerberg, M. M. Kozlov, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2006**, *7*, 9–19.
- [7] R. C. Yashroy, *J Biosci* **1990**, *15*, 93–98.
- [8] E. M. Landau, J. P. Rosenbusch, *PNAS* **1996**, *93*, 14532–14535.
- [9] K. Larsson, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 7304–7314.
- [10] S. Pujals, H. Miyamae, S. Afonin, T. Murayama, H. Hirose, I. Nakase, K. Taniuchi, M. Umeda, K. Sakamoto, A. S. Ulrich et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1894–1899.
- [11] a) K. Shinoda, W. Shinoda, T. Baba, M. Mikami, *The Journal of chemical physics* **2004**, *121*, 9648–9654; b) A. Jacquemet, J. Barbeau, L. Lemiègre, T. Benvegnu, *Lipids for the future from agro-resources to human health* **2009**, *91*, 711–717; c) van de Vossenberg, J. L., A. J. Driessen, W. N. Konings, *Extremophiles : life under extreme conditions* **1998**, *2*, 163–170.
- [12] A. Gliozzi, R. Rolandi, M. de Rosa, A. Gambacorta, *The Journal of membrane biology* **1983**, *75*, 45–56.
- [13] a) M. Kates, L. S. Yengoyan, P. S. Sastry, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1965**, *98*, 252–268; b) R. Anderson, M. Kates, M. J. Baedecker, I. R. Kaplan, R. G. Ackman, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1977**, *41*, 1381–1390.
- [14] L. K. Buehler, *Cell membranes*, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, NY, **2015**.
- [15] S. Tristram-Nagle, D. J. Kim, N. Akhuzada, N. Kucerka, J. C. Mathai, J. Katsaras, M. Zeidel, J. F. Nagle, *Chemistry and physics of lipids* **2010**, *163*, 630–637.
- [16] a) J. Gutknecht, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 6443–6446; b) K. Yamauchi, K. Doi, M. Kinoshita, F. Kii, H. Fukuda, *Biochimica et biophysica acta* **1992**, *1110*, 171–177.
- [17] M. Andersson, H. M. Keizer, C. Zhu, D. Fine, A. Dodabalapur, R. S. Duran, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, *23*, 2924–2927.
- [18] T. I. Rokitskaya, N. I. Kolodkin, E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, *Biochimica et biophysica acta* **2011**, *1808*, 91–97.
- [19] a) P. Greisen, K. Lum, M. Ashrafuzzaman, D. V. Greathouse, O. S. Andersen, J. A. Lundbæk, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 12717–12722; b) M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz, F. C. Simmel, *Science (New York, N.Y.)* **2012**, *338*, 932–936; c) J. Liu, A. J. Wolfe, E. Eren, J. Vijayaraghavan, M. Indic, van den Berg, Bert, L. Movileanu, *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1818*, 2908–2916.
- [20] C. Verdía-Báguena, J. L. Nieto-Torres, A. Alcaraz, M. L. DeDiego, J. Torres, V. M. Aguilera, L. Enjuanes, *Virology* **2012**, *432*, 485–494.
- [21] H. W. Huang, Y. Wu, *Biophysical journal* **1991**, *60*, 1079–1087.
- [22] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, H. W. Huang, *Biophysical journal* **2002**, *82*, 908–914.

- [23] a) M. Raghunathan, Y. Zubovski, R. M. Venable, R. W. Pastor, J. F. Nagle, S. Tristram-Nagle, *The journal of physical chemistry. B* **2012**, *116*, 3918–3927; b) M. T. Eddy, T.-C. Ong, L. Clark, O. Teijido, van der Wel, Patrick C A, R. Garces, G. Wagner, T. K. Rostovtseva, R. G. Griffin, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 6375–6387.
- [24] H. Lindsey, N. O. Petersen, S. I. Chan, *Biochimica et biophysica acta* **1979**, *555*, 147–167.
- [25] a) W. R. Redwood, F. R. Pfeiffer, J. A. Weisbach, T. E. Thompson, *Biochimica et biophysica acta* **1971**, *233*, 1–6; b) W. C. Hung, F. Y. Chen, H. W. Huang, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, *1467*, 198–206.
- [26] Y. Wu, K. He, S. J. Ludtke, H. W. Huang, *Biophysical journal* **1995**, *68*, 2361–2369.
- [27] C. H. Hsieh, S. C. Sue, P. C. Lyu, W. G. Wu, *Biophysical journal* **1997**, *73*, 870–877.
- [28] M. Zasloff, *Nature* **2002**, *415*, 389–395.
- [29] M. R. Yeaman, N. Y. Yount, *Pharmacological reviews* **2003**, *55*, 27–55.
- [30] Reddy, K V R, R. D. Yedery, C. Aranha, *International journal of antimicrobial agents* **2004**, *24*, 536–547.
- [31] R. Bals, *Med Klin* **2000**, *95*, 496–502.
- [32] G. Wang, *Antimicrobial peptides. Discovery, design and novel therapeutic strategies*, CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK, Cambridge, MA, ©2010.
- [33] R. Köck, K. Becker, B. Cookson, van Gemert-Pijnen, J E, S. Harbarth, J. Kluytmans, M. Mielke, G. Peters, R. L. Skov, M. J. Struelens et al., *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **2010**, *15*, 19688.
- [34] <http://www.cdc.gov/drugresistance/>
- [35] a) J. S. Mader, D. W. Hoskin, *Expert opinion on investigational drugs* **2006**, *15*, 933–946; b) D. W. Hoskin, A. Ramamoorthy, *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1778*, 357–375.
- [36] Y. Shai, *Biopolymers* **2002**, *66*, 236–248.
- [37] Y. Shai, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1462*, 55–70.
- [38] B. Bechinger, M. Zasloff, S. J. Opella, *Biophysical journal* **1998**, *74*, 981–987.
- [39] A. Latal, G. Degovics, R. F. Epanand, R. M. Epanand, K. Lohner, *European journal of biochemistry / FEBS* **1997**, *248*, 938–946.
- [40] S. Afonin, S. L. Grage, M. Ieronimo, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 16512–16514.
- [41] R. W. Glaser, C. Sachse, Dürr, Ulrich H N, P. Wadhvani, S. Afonin, E. Strandberg, A. S. Ulrich, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3392–3397.
- [42] G. F. Gause, M. G. Brazhnikova, *Nature* **1944**, *154*, 703.
- [43] M. E. Selsted, M. J. Novotny, W. L. Morris, Y. Q. Tang, W. Smith, J. S. Cullor, *The Journal of biological chemistry* **1992**, *267*, 4292–4295.
- [44] C. E. Meyer, F. Reusser, *Experientia* **1967**, *23*, 85–86.
- [45] M. Zasloff, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 5449–5453.
- [46] E. Habermann, *Science (New York, N.Y.)* **1972**, *177*, 314–322.
- [47] M. G. Giovannini, L. Poulter, B. W. Gibson, D. H. Williams, *Biochemical Journal* **1987**, *243*, 113–120.
- [48] K. Matsuzaki, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1462*, 1–10.
- [49] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11361–11368.
- [50] T. Degenkolb, J. Kirschbaum, H. Brückner, *Chemistry & biodiversity* **2007**, *4*, 1052–1067.
- [51] a) E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, G. M. Bonora, *PNAS* **1982**, *79*, 7951–7954; b) H. Brückner, H. Graf, *Experientia* **1983**, *39*,

- 528–530; c) C. P. Kubicek, M. Komoń-Zelazowska, E. Sándor, I. S. Druzhinina, *Chemistry & biodiversity* **2007**, *4*, 1068–1082; d) J. Raap, K. Erkelens, A. Ogrel, D. A. Skladnev, H. Brückner, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2005**, *11*, 331–338.
- [52] V. K. Gupta, R. L. Mach, S. Sreenivasaprasad, *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, Wiley, **2015**.
- [53] H. Yamaguchi, H. Kodama, S. Osada, F. Kato, M. Jelokhani-Niaraki, M. Kondo, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2003**, *67*, 2269–2272.
- [54] J. W. Taylor, E. T. Kaiser, *Methods in enzymology* **1987**, *154*, 473–498.
- [55] A. Szekeres, B. Leitgeb, L. Kredics, Z. Antal, L. Hatvani, L. Manczinger, C. Vagvolgyi, *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **2005**, *52*, 137–168.
- [56] T. Degenkolb, A. Berg, W. Gams, B. Schlegel, U. Gräfe, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2003**, *9*, 666–678.
- [57] G. W. Kenner, R. C. Sheppard, *Nature* **1958**, *181*, 48.
- [58] a) T. Ooka, Y. Shimojima, T. Akimoto, I. Takeda, S. Senoh, J. Abe, *Agricultural and Biological Chemistry* **1966**, *30*, 700–702; b) A. D. Argoudelis, A. Dietz, L. E. Johnson, *The Journal of antibiotics* **1974**, *27*, 321–328.
- [59] K. L. Rinehart, L. A. Gaudio, M. L. Moore, R. C. Pandey, J. C. Cook, M. Barber, R. D. Sedgwick, R. S. Bordoli, A. N. Tyler, B. N. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6517–6520.
- [60] A. Iida, M. Sanekata, S. Wada, T. Fujita, H. Tanaka, A. Enoki, G. Fuse, M. Kanai, K. Asami, *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1995**, *43*, 392–397.
- [61] N. K. N. Neumann, N. Stoppacher, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner, R. Schuhmacher, *Chemistry & biodiversity* **2015**, *12*, 743–751.
- [62] J. Kirschbaum, C. Krause, R. K. Winzheimer, H. Brückner, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2003**, *9*, 799–809.
- [63] C. Krause, J. Kirschbaum, G. Jung, H. Brückner, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2006**, *12*, 321–327.
- [64] C. Auvin-Guette, S. Rebuffat, Y. Prigent, B. Bodo, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2170–2174.
- [65] I. L. Karle, P. Balaram, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6747–6756.
- [66] S. Aravinda, N. Shamala, P. Balaram, *Chemistry & biodiversity* **2008**, *5*, 1238–1262.
- [67] a) Y. Demizu, M. Doi, M. Kurihara, H. Okuda, M. Nagano, H. Suemune, M. Tanaka, *Organic & biomolecular chemistry* **2011**, *9*, 3303–3312; b) A. W. Burgess, S. J. Leach, *Biopolymers* **1973**, *12*, 2599–2605.
- [68] B. Leitgeb, A. Szekeres, L. Manczinger, C. Vagvolgyi, L. Kredics, *Chemistry & biodiversity* **2007**, *4*, 1027–1051.
- [69] I. L. Karle, J. Flippen-Anderson, M. Sukumar, P. Balaram, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 5087–5091.
- [70] B. Di Blasio, V. Pavone, M. Saviano, A. Lombardi, F. Natri, C. Pedone, E. Benedetti, M. Crisma, M. Anzolin, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6273–6278.
- [71] G. Yoder, T. A. Keiderling, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, *Biopolymers* **1995**, *35*, 103–111.
- [72] M. Crisma, A. Barazza, F. Formaggio, B. Kaptein, Q. B. Broxterman, J. Kamphuis, C. Toniolo, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2813–2825.
- [73] J. K. Chugh, B. A. Wallace, *Biochem. Soc. Trans* **2001**, *29*, 565.
- [74] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, R. F. Epand, R. M. Epand, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2001**, *58*, 1179–1188.
- [75] I. Augeven-Bour, S. Rebuffat, C. Auvin, C. Goulard, Y. Prigent, B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1587–1594.

- [76] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, V. Monaco, C. Goulard, S. Rebuffat, B. Bodo, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4952–4958.
- [77] N. Stoppacher, Neumann, Nora K N, L. Burgstaller, S. Zeilinger, T. Degenkolb, H. Brückner, R. Schuhmacher, *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 734–743.
- [78] a) Y. Nagaoka, A. Iida, T. Kambara, K. Asami, E. Tachikawa, T. Fujita, *Biochimica et biophysica acta* **1996**, *1283*, 31–36; b) H. Ducholier, *Chemistry & biodiversity* **2007**, *4*, 1023–1026; c) T. Katayama, K. Miyagawa, T. Kodama, S. Oikawa, *Biological & pharmaceutical bulletin* **2001**, *24*, 1420–1422.
- [79] G. Irmscher, G. Jung, *Eur J Biochem* **1977**, *80*, 165–174.
- [80] M. Dathe, C. Kaduk, E. Tachikawa, M. F. Melzig, H. Wenschuh, M. Bienert, *Biochimica et biophysica acta* **1998**, *1370*, 175–183.
- [81] D. Liu, *Molecular Detection of Human Fungal Pathogens*, CRC Press, Hoboken, **2011**.
- [82] a) I. Chet, J. Inbar, *Appl Biochem Biotechnol* **1994**, *48*, 37–43; b) T. Benítez, A. M. Rincón, M. C. Limón, A. C. Codón, *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **2004**, *7*, 249–260; c) M. Schirmbock, M. Lorito, Y. L. Wang, C. K. Hayes, I. Arisan-Atac, F. Scala, G. E. Harman, C. P. Kubicek, *Applied and environmental microbiology* **1994**, *60*, 4364–4370.
- [83] G. E. Harman, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56.
- [84] D. K. Bell, *Phytopathology* **1982**, *72*, 379.
- [85] a) D. Ishiyama, T. Satou, H. Senda, T. Fujimaki, R. Honda, S. Kanazawa, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 728–732; b) H.-Y. Li, Y. Luo, X.-S. Zhang, W.-L. Shi, Z.-T. Gong, M. Shi, L.-L. Chen, X.-L. Chen, Y.-Z. Zhang, X.-Y. Song, *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *354*, 75–82; c) A. Berg, M. Ritzau, W. Ihn, B. Schlegel, W. F. Fleck, S. Heinze, U. Grafe, *The Journal of antibiotics* **1996**, *49*, 817–820; d) M. Shi, L. Chen, X.-W. Wang, T. Zhang, P.-B. Zhao, X.-Y. Song, C.-Y. Sun, X.-L. Chen, B.-C. Zhou, Y.-Z. Zhang, *Microbiology (Reading, Engl.)* **2012**, *158*, 166–175; e) S. Xiao-Yan, S. Qing-Tao, X. Shu-Tao, C. Xiu-Lan, S. Cai-Yun, Z. Yu-Zhong, *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *260*, 119–125; f) E. L. Ghisalberti, K. Sivasithamparam, *Soil Biology and Biochemistry* **1991**, *23*, 1011–1020.
- [86] G. C. Ainsworth, P. M. Kirk, *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 10. Aufl., CABI, Wallingford, **2008**.
- [87] T. Degenkolb, R. Dieckmann, K. F. Nielsen, T. Gräfenhan, C. Theis, D. Zafari, P. Chaverri, A. Ismaiel, H. Brückner, H. von Döhren et al., *Mycol Progress* **2008**, *7*, 177–219.
- [88] A. Ishiyama, K. Otoguro, M. Iwatsuki, M. Iwatsuki, M. Namatame, A. Nishihara, K. Nonaka, Y. Kinoshita, Y. Takahashi, R. Masuma et al., *The Journal of antibiotics* **2009**, *62*, 303–308.
- [89] J. W. Payne, R. Jakes, B. S. Hartley, *Biochem. J.* **1970**, *117*, 757–766.
- [90] R. O. Fox, F. M. Richards, *Nature* **1982**, *300*, 325–330.
- [91] J. C. Franklin, J. F. Ellena, S. Jayasinghe, L. P. Kelsh, D. S. Cafiso, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4036–4045.
- [92] G. Esposito, J. A. Carver, J. Boyd, I. D. Campbell, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1043–1050.
- [93] U. Banerjee, S. I. Chan, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3709–3713.
- [94] a) D. P. Tieleman, H. J. Berendsen, M. S. Sansom, *Biophysical journal* **1999**, *76*, 3186–3191; b) C. E. Dempsey, L. J. Handcock, *Biophysical journal* **1996**, *70*, 1777–1788.
- [95] E. S. Salnikov, H. Friedrich, X. Li, P. Bertani, S. Reissmann, C. Hertweck, J. D. J. O'Neil, J. Raap, B. Bechinger, *Biophysical journal* **2009**, *96*, 86–100.
- [96] a) D. S. Cafiso, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **1994**, *23*, 141–165; b) M. K. Mathew, P. Balaram, *FEBS letters* **1983**, *157*, 1–5.
- [97] P. Mueller, D. O. Rudin, *Nature* **1968**, *217*, 713–719.

- [98] a) S. Qian, W. Wang, L. Yang, H. W. Huang, *Biophysical journal* **2008**, *94*, 3512–3522; b) D. P. Tieleman, B. Hess, M. S. P. Sansom, *Biophysical journal* **2002**, *83*, 2393–2407.
- [99] C. Kaduk, H. Duclohier, M. Dathe, H. Wenschuh, M. Beyermann, G. Molle, M. Bienert, *Biophysical journal* **1997**, *72*, 2151–2159.
- [100] a) Y. Wu, H. W. Huang, G. A. Olah, *Biophysical journal* **1990**, *57*, 797–806; b) H. W. Huang, Y. Wu, *Biophysical journal* **1991**, *60*, 1079–1087; c) F.-Y. Chen, M.-T. Lee, H. W. Huang, *Biophysical journal* **2002**, *82*, 908–914; d) M. Bortolus, M. de Zotti, F. Formaggio, A. L. Maniero, *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1828*, 2620–2627.
- [101] K. He, S. J. Ludtke, W. T. Heller, H. W. Huang, *Biophysical journal* **1996**, *71*, 2669–2679.
- [102] Almeida, Fausto Bruno dos Reis, F. M. Cerqueira, R. d. N. Silva, C. J. Ulhoa, A. L. Lima, *Biotechnology letters* **2007**, *29*, 1189–1193.
- [103] S. Rebuffat, H. Duclohier, C. Auvin-Guette, G. Molle, G. Spach, B. Bodo, *FEMS microbiology immunology* **1992**, *5*, 151–160.
- [104] S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 1849.
- [105] S. Rebuffat, S. Hlimi, Y. Prigent, C. Goulard, B. Bodo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 2021.
- [106] G. Leclerc, S. Rebuffat, C. Goulard, B. Bodo, *The Journal of antibiotics* **1998**, *51*, 170–177.
- [107] T. Degenkolb, K. Fog Nielsen, R. Dieckmann, F. Branco-Rocha, P. Chaverri, G. J. Samuels, U. Thrane, H. von Döhren, A. Vilcinskis, H. Brückner, *Chemistry & biodiversity* **2015**, *12*, 662–684.
- [108] a) A. Iida, M. Sanekata, S.-i. Wada, T. Fujita, H. Tanaka, A. Enoki, G. Fuse, M. Kanai, K. Asami, *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1995**, *43*, 392–397; b) S.-i. Wada, A. Iida, N. Akimoto, M. Kanai, N. Toyama, T. Fujita, *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1995**, *43*, 910–915.
- [109] C. Tonlolo, E. Benedetti, *Trends in Biochemical Sciences* **1991**, *16*, 350–353.
- [110] I. Segalas, Y. Prigent, D. Davoust, B. Bodo, S. Rebuffat, *Biopolymers* **1999**, 71–85.
- [111] F. Formaggio, C. Toniolo, *Chirality* **2010**, *22 Suppl 1*, E30-9.
- [112] D. F. Kennedy, M. Crisma, C. Toniolo, D. Chapman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6541–6548.
- [113] S. L. Grage, S. Afonin, A. S. Ulrich, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2010**, *618*, 183–207.
- [114] a) F. M. Marassi, S. J. Opella, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2000**, *144*, 150–155; b) T. A. Cross, S. J. Opella, *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, *4*, 574–581; c) T. A. Cross in *Methods in Enzymology : Solid-Phase Peptide Synthesis*, Academic Press, **1997**; d) R. G. Griffin, *Nature structural biology* **1998**, *5 Suppl*, 508–512.
- [115] A. S. Ulrich, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2005**, *46*, 1–21.
- [116] a) E. Strandberg, A. S. Ulrich, *Concepts Magn. Reson.* **2004**, *23A*, 89–120; b) E. Strandberg, J. Zerweck, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Biophysical journal* **2013**, *104*, L9-11; c) S. H. Park, A. A. de Angelis, A. A. Nevzorov, C. H. Wu, S. J. Opella, *Biophysical journal* **2006**, *91*, 3032–3042; d) C. Song, C. Weichbrodt, E. S. Salnikow, M. Dynowski, B. O. Forsberg, B. Bechinger, C. Steinem, B. L. de Groot, U. Zachariae, K. Zeth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 4586–4591.
- [117] J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR spectroscopy*, Oxford Univ. Press, Oxford, **2004**.
- [118] a) J. Salgado, S. L. Grage, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, R. N. McElhaney, A. S. Ulrich, *Journal of Biomolecular NMR* **2001**, *21*, 191–208; b) S. Afonin, R. W. Glaser, M. Berditchevskaia, P. Wadhvani, K.-H. Gührs, U. Möllmann, A. Perner, A. S. Ulrich, *Chembiochem* **2003**, *4*, 1151–1163; c) R. W. Glaser, C. Sachse, Dürr, Ulrich H N, P.

- Wadhvani, A. S. Ulrich, *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 153–163; d) S. Afonin, Dürr, Ulrich H N, R. W. Glaser, A. S. Ulrich, *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2004**, *42*, 195–203.
- [119] F. Separovic, A. Naito, *Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides*, Royal Society of Chemistry, **2014**.
- [120] B. Bechinger, C. Sizun, *Concepts Magn. Reson.* **2003**, *18A*, 130–145.
- [121] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et biophysica acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- [122] a) G. A. Olah, H. W. Huang, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2531; b) Y. Wu, H. W. Huang, G. A. Olah, *Biophysical journal* **1990**, *57*, 797–806.
- [123] J. Bürck, S. Roth, P. Wadhvani, S. Afonin, N. Kanithasen, E. Strandberg, A. S. Ulrich, *Biophysical journal* **2008**, *95*, 3872–3881.
- [124] J. Burck, P. Wadhvani, S. Fanghanel, A. S. Ulrich, *Accounts of chemical research* **2016**.
- [125] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach*, Oxford University Press, New York, **2000**.
- [126] P. Sanyal, *Die Wirkung membranaktiver Peptide auf Biofilminduzierung und Biofilmeliminierung*, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2015**.
- [127] I. Wiegand, K. Hilpert, Hancock, Robert E W, *Nat Protoc* **2008**, *3*, 163–175.
- [128] K.R.N.Reddy, D.A.Choudary, M.S.Reddy, *Antifungal activity and genetic variability of trichoderma harzianum isolates*, *37*, **2007**, zu finden unter https://www.researchgate.net/profile/DrKRN_Reddy/publication/200053783_Antifungal_activity_and_genetic_variability_of_trichoderma_harzianum_isolates/links/0deec521ca21debbc8000000.pdf.
- [129] L. Whitmore, B. A. Wallace, *Nucleic acids research* **2004**, *32*, 73.
- [130] M. Rance, R. Byrd, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, *52*, 221–240.
- [131] R. W. Glaser, C. Sachse, Dürr, Ulrich H N, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2004**, *168*, 153–163.
- [132] E. Strandberg, P. Wadhvani, P. Tremouilhac, Dürr, Ulrich H N, A. S. Ulrich, *Biophysical journal* **2006**, *90*, 1676–1686.
- [133] T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco.
- [134] K. Wüthrich, M. Billeter, W. Braun, *Journal of molecular biology* **1984**, *180*, 715–740.
- [135] P. Guntert, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2004**, *278*, 353–378.
- [136] <http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/TALOS/>
- [137] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- [138] A. Rahman, *Phys. Rev.* **1964**, *136*, A405.
- [139] D. P. Tieleman, M. S. P. Sansom, *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, *83*, 166–179.
- [140] L. Wang, R. A. Friesner, B. J. Berne, *The journal of physical chemistry. B* **2011**, *115*, 9431–9438.
- [141] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718.
- [142] G. Bussi, *Molecular Physics* **2014**, *112*, 379–384.
- [143] J. P. M. Jämbeck, A. P. Lyubartsev, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 3164–3179.
- [144] L. Wickstrom, A. Okur, C. Simmerling, *Biophysical journal* **2009**, *97*, 853–856.
- [145] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [146] R. Dean, Van Kan, Jan A L, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis et al., *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 414–430.
- [147] C. Toniolo, F. Formaggio, R. W. Woody in *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy* (Hrsg.: N. Berova, P. L. Polavarapu, K. Nakanishi, R. W. Woody), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, **2012**.

- [148] M. Schubert, D. Labudde, H. Oschkinat, P. Schmieder, *J Biomol NMR*, **24**, 149–154.
- [149] D. Maisch, P. Wadhvani, S. Afonin, C. Böttcher, B. Kokschi, A. S. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15596–15597.
- [150] S. Afonin, P. K. Mikhailiuk, I. V. Komarov, A. S. Ulrich, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 614–623.
- [151] R. M. Eppard, R. F. Eppard, *Biopolymers* **2000**, *55*, 358–363.
- [152] <http://www.rcsb.org/>
- [153] M. Andersson, J. Jackman, D. Wilson, P. Jarvoll, V. Alfredsson, G. Okeyo, R. Duran, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, *82*, 550–561.
- [154] N. Tomita, M. M. Mohammad, D. J. Niedzwiecki, M. Ohta, L. Movileanu, *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1828*, 1057–1065.
- [155] E. Strandberg, P. Tremouilhac, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, *Biochimica et biophysica acta* **2009**, *1788*, 1667–1679.
- [156] A. Polak, M. Tarek, M. Tomšič, J. Valant, N. P. Ulrih, A. Jamnik, P. Kramar, D. Miklavčič, *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **2014**, *100*, 18–26.
- [157] M.-T. Lee, W.-C. Hung, F.-Y. Chen, H. W. Huang, *Biophysical journal* **2005**, *89*, 4006–4016.
- [158] H. W. Huang, *Biochimica et biophysica acta* **2006**, *1758*, 1292–1302.
- [159] W. T. Heller, K. He, S. J. Ludtke, T. A. Harroun, H. W. Huang, *Biophysical journal* **1997**, *73*, 239–244.
- [160] M. C. Manning, R. W. Woody, *Biopolymers* **1991**, *31*, 569–586.
- [161] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2744–2745.
- [162] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425–1436.
- [163] M. Dathe, T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W. Maloy, D. L. MacDonald, M. Beyermann, M. Bienert, *FEBS letters* **1997**, *403*, 208–212.
- [164] N. Kučerka, M.-P. Nieh, J. Katsaras, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 2761–2771.
- [165] S. Bobone, Y. Gerelli, M. de Zotti, G. Bocchini, A. Farrotti, B. Orioni, F. Sebastiani, E. Latter, J. Penfold, R. Senesi et al., *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 1013–1024.
- [166] J. E. Jones, V. Diemer, C. Adam, J. Raftery, R. E. Ruscoe, J. T. Sengel, M. I. Wallace, A. Bader, S. L. Cockroft, J. Clayden et al., *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 688–695.
- [167] S.-i. Wada, Y. Hitora, R. Tanaka, H. Urata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 3999–4001.
- [168] H. Lin, R. Bhatia, R. Lal, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2001**, *15*, 2433–2444.
- [169] S. J. Pike, J. E. Jones, James Raftery, Jonathan Clayden, S. J. Webb, *Organic & biomolecular chemistry* **2015**, *13*, 9580–9584.
- [170] D. Maisch, *Synthese und Strukturuntersuchungen des membranaktiven Peptaibols Alamethicin mittels ¹⁹F-Festkörper-NMR*, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2008**.
- [171] A. A. Sobko, E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, S. D. Zakharov, W. A. Cramer, *FEBS letters* **2004**, *576*, 205–210.
- [172] A. Horner, F. Goetz, R. Tampé, E. Klussmann, P. Pohl, *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 42495–42501.
- [173] A. A. Sobko, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, *Biochimica et biophysica acta* **2009**, *1788*, 1962–1966.
- [174] A. A. Pashkovskaya, V. E. Maizlish, G. P. Shaposhnikov, E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1778*, 541–548.

- [175] Y. N. Antonenko, T. B. Stoilova, S. I. Kovalchuk, N. S. Egorova, A. A. Pashkovskaya, A. A. Sobko, E. A. Kotova, A. Y. Surovoy, *Biochimica et biophysica acta* **2006**, 1758, 493–498.
- [176] Y. N. Antonenko, T. B. Stoilova, S. I. Kovalchuk, N. S. Egorova, A. A. Pashkovskaya, A. A. Sobko, E. A. Kotova, S. V. Sychev, A. Y. Surovoy, *FEBS letters* **2005**, 579, 5247–5252.
- [177] B. V. Chernyak, D. S. Izyumov, K. G. Lyamzaev, A. A. Pashkovskaya, O. Y. Pletjushkina, Y. N. Antonenko, D. V. Sakharov, K. W. A. Wirtz, V. P. Skulachev, *Biochimica et biophysica acta* **2006**, 1757, 525–534.
- [178] A. V. Krylov, E. A. Kotova, A. A. Yaroslavov, Y. N. Antonenko, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, 1509, 373–384.
- [179] Y. V. Khrantsov, T. I. Rokitskaya, A. A. Rosenkranz, G. A. Trusov, N. V. Gnuchev, Y. N. Antonenko, A. S. Sobolev, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2008**, 128, 241–247.
- [180] A. A. Pashkovskaya, E. P. Lukashev, P. E. Antonov, O. A. Finogenova, Y. A. Ermakov, N. S. Melik-Nubarov, Y. N. Antonenko, *Biochimica et biophysica acta* **2006**, 1758, 1685–1695.
- [181] M. Wu, E. Maier, R. Benz, R. E. Hancock, *Biochemistry* **1999**, 38, 7235–7242.
- [182] M. Ashrafuzzaman, O. S. Andersen, R. N. McElhaney, *Biochimica et biophysica acta* **2008**, 1778, 2814–2822.
- [183] M. Raja, E. Vales, *Biophysical chemistry* **2009**, 142, 46–54.
- [184] A. A. Sobko, M. A. Vigasina, T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, S. D. Zakharov, W. A. Cramer, Y. N. Antonenko, *J Membrane Biol*, 199, 51–62.
- [185] T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, *Biophysical journal* **2002**, 82, 865–873.
- [186] L. Niu, *Surface- Plasmon Optical and Electrochemical Characterization of Biofunctional Surface Architectures*, Dissertation, Johannes-Gutenberg Universität Mainz, **2008**.
- [187] W. T. Heller, A. J. Waring, R. I. Lehrer, H. W. Huang, *Biochemistry* **1998**, 37, 17331–17338.
- [188] L. He, J. W. F. Robertson, J. Li, I. Kärcher, S. M. Schiller, W. Knoll, R. Naumann, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, 21, 11666–11672.
- [189] A. V. Sokolov, V. S. Sokolov, T. B. Feldman, M. A. Ostrovsky, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2, 404–411.
- [190] T. Mach, *Weak binding of antibiotics in bacterial porins : measurement and biological relevance*, Dissertation, Jacobs University Bremen, **2009**.
- [191] H. M. Keizer, M. Andersson, C. Chase, W. P. Laratta, J. B. Proemsey, J. Tabb, J. R. Long, R. S. Duran, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2008**, 65, 178–185.
- [192] M. Andersson, G. Okeyo, D. Wilson, H. Keizer, P. Moe, P. Blount, D. Fine, A. Dodabalapur, R. S. Duran, *Biosensors & bioelectronics* **2008**, 23, 919–923.
- [193] G. S. Harms, G. Orr, M. Montal, B. D. Thrall, S. D. Colson, H. P. Lu, *Biophysical journal* **2003**, 85, 1826–1838.
- [194] V. A. Frolov, A. Y. Dunina-Barkovskaya, A. V. Samsonov, J. Zimmerberg, *Biophysical journal* **2003**, 85, 1725–1733.
- [195] C. Verdiá-Báguena, J. L. Nieto-Torres, A. Alcaraz, M. L. DeDiego, L. Enjuanes, V. M. Aguilella, *Biochimica et biophysica acta* **2013**, 1828, 2026–2031.
- [196] P. A. Gurnev, M. Queralt-Martin, V. M. Aguilella, T. K. Rostovtseva, S. M. Bezrukov, *Biophysical journal* **2012**, 102, 2070–2076.
- [197] A. Missner, A. Horner, P. Pohl, *Biochimica et biophysica acta* **2008**, 1778, 2154–2156.
- [198] T. I. Rokitskaya, S. D. Zakharov, Y. Antonenko, E. A. Kotova, W. A. Cramer, *FEBS letters* **2001**, 505, 147–150.

- [199] E. E. Pohl, A. V. Krylov, M. Block, P. Pohl, *Biochimica et biophysica acta* **1998**, 1373, 170–178.
- [200] U. Dörner, E. Maier, R. Benz, *Biochimica et biophysica acta* **2004**, 1667, 47–55.

8 Anhang

a. Materialien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
ACN	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
CHCl ₃	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
D ₂ O	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DCM	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
DDPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
DHB	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DIC	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Diethylether	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dihydroxybenzol	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DIPEA	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
DMF	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
DMPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
DMPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
DPC-d38	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
DPhPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
DPhPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)

DPoPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
DSS	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Ethanol	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Fmoc-Aib-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
Fmoc-Ala-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland) und Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Fmoc-Asn-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
Fmoc-CF ₃ -Bpg-OH	Enamine Ltd. (Kiew, Ukraine)
Fmoc-Gly-OH	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Fmoc-Ile-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland) und Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Fmoc-Leu-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland) und Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Fmoc-Met-OH	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Fmoc-Pro-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Fmoc-Val-OH	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
HATU	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HFIP	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
H-L-Leu-ol-2-Chlorotriethyl-Harz	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
H-L-Phe-ol-2-Chlorotriethyl-Harz	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HOBt	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
K ₂ SO ₄	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lyso-MPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
MeOH	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Müller-Hinton-Medium	Beckton, Dickinson and Company (Sparks, USA)
NMM	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

NMP	Biosolve (Valkenswaard, Niederlande)
Oxyma Pure	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Piperidin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
POPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
Pyridin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Resazurin-Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Rink-Amid-Harz	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS-d25	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Silica Gel Orange	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TBTU	IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
TFA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TFE	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
TFE-d2	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
TIS	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Tris-HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien**Hersteller**

CaF ₂ -Küvette (Dicke: 10 µm)	Hellma (Müllheim, Deutschland)
Deckgläser (7,5 × 12 × 0,08 mm)	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Eppendorfgefäße (0,5, 1 und 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Falcons (15 und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Suprasil Quarzglas-Küvette (0,1 cm Dicke)	Hellma (Müllheim, Deutschland)
Glasröhrchen (5 × 15 mm)	New Era Enterprises (Newfield, NJ, USA)
Suprasil QS Quarzglas-Scheibe	Hellma Optik (Jena, Deutschland)
Parafilm	VWR (Radnor, USA)
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	VWR (Radnor, USA)
Rundfilter (110 mm)	VWR (Radnor, USA)

Geräte	Hersteller
500 MHz Festkörper-NMR-Spektrometer	Bruker Avance II HD (Karlsruhe, Deutschland)
600 MHz Festkörper-NMR-Spektrometer	Bruker Avance II WB (Karlsruhe, Deutschland)
Automatisches Peptidsynthese-Gerät	
SyroWave	Biotage SyroWave (Uppsala, Schweden)
Liberty Blue	CEM Liberty Blue (Matthews, USA)
CD-Spektropolarimeter J-815	Jasco (Tokyo, Japan)
Heizofen	Thermo Fisher Scientific Heraeus (Waltham, Massachusetts, USA)
Lyophilisator	Christ (Osterode am Harz, Deutschland) und Cinquepascal S.R.L. (Trezza sul Naviglio, Italien)
MALDI-TOF-MS-Anlage	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
CD-Spektropolarimeter J-810 (OCD)	Jasco (Tokyo, Japan)
Reinstwasseranlage	Merck Millipore (Schwalbach, Deutschland) und Siemens AG (München, Deutschland)
RP-HPLC-Anlage	Jasco (Tokyo, Japan) und Waters (Guyancourt, Frankreich)
Pumpen 2087-PU Plus	
Hochdruckmischer 2080-DHD	
Diodenarray-Detektor MD-2010	
Säulenthermostat TC-100	Dionex (Sunnyvale, CA, USA)
Injektor	IDEX Health & Science (Wertheim, Deutschland)
Analytische Säulen	
C18 (4,6 × 250 mm, 10 µm)	Grace Vydac (Columbia, USA)
C18 Kinetix (3 × 100 mm, 2,6 µm)	Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Präparative Säulen	
C18 (22 × 250 mm, 10 µm)	Grace Vydac (Columbia, USA)
C18 Jupiter (10 × 250 mm, 10 µm)	Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Schüttler Promax 1020	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

SmartSpecPlus-Spektrophotometer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Tiefkühler	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Ultraschallbad UTR 200	Hielscher (Teltow, Deutschland)
Ultraschallgerät Super RK 510	Sonorex (Darmstadt, Deutschland)
UPLC/MS-Anlage	Waters (Milford, MA, USA)
C18-Säulen BEH (2,1 × 50 mm, 1,7 µm)	
Detektor 3100	
Vortex REAX 2000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waagen	Sartorius AG (Greifensee, Schweiz)
Zentrifuge 3-18K	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)

Komplettmedium (CM) für die Kultivierung von Fungi

Angaben für 1l:

50 ml Nitratsalzlösung (20x): 120 g NaNO₃, 10,4 g KCl, 10,4 g MgSO₄ · 7H₂O, 30,4 g KH₂PO₄ (Angaben pro 1000 ml)

1 ml Spurenelementlösung (100x): 2,2 g ZnSO₄ · 7H₂O, 1,1 g H₃BO₃, 0,5 g MnCl₂ · 4H₂O, 0,17 g CoCl₂ · 6H₂O, 0,16 g CuSO₄ · 5H₂O, 0,5 g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 5 g Na₂EDTA (Angaben pro 100 ml) (Komponenten auf 80 ml auffüllen, aufkochen, auf 60 °C abkühlen, pH mit KOH einstellen, auf RT abkühlen, auf 100 ml auffüllen)

10 g *D*-Glucose

2 g Pepton

1 g Hefeextrakt

1g Casein Hydrolysat

1 ml Vitaminlösung: jeweils 0,01 g Biotin, Pyridoxin, Thiamin, Riboflavin, p-Aminobenzoesäure, Nikotinsäure (Angaben pro 100 ml) (dunkel und kühl lagern)

pH 6,5

15 g Agar/l

b. Verwendung von Diphytanoyl-Lipid-Mischungen in der Literatur

Lipidsystem	Temp [°C]	Art des Experiments	Lipidmembran- bezogene Beobachtungen	Ref.*
DPhPC/DPhPG				
DPhPC/DPhPG (7:3) DPhPC/DPhPS (7:3)	RT	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Membranprotein führt zu Wurmlöchern (<i>toroidal pores</i>) in planaren DPhPC/DPhPG (7:3) – Lipidmembranen Induzierter Ionenfluss in Liposomen: DPhPC/DPhPS (7:3) < DPhPC/DPhPG (7:3)	[171]
DPhPC/DPhPG (20 und 58 mol % DPhPG)	?	Untersuchungen von Protein-Lipidmembran- Wechselwirkungen durch Fluoreszenz- Korrelations- Spektroskopie	Bindungsverhalten des Proteins in DPhPC/DPhPG ist elektrostatischer Natur	[172]
DPhPC/DPhPG (8:2)	23	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Leitfähigkeit des Ionenkanals in DPhPC niedriger als in DPhPC/DPhPG wird zurückgeführt auf Ladung der Lipidmembran	[18]
DPhPC/DPhPG (9:1)	?	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Rekonstitution in Lipidsystem	[173]
DPhPC/DPhPG (7:3)	24-26	Bindungseigenschaften des Membranproteins an Lipidmembranen durch Fluoreszenz- Korrelations- Spektroskopie	Bindung nur an anionische DPhPC/DPhPG, nicht an zwitterionische DPhPC- Lipidmembranen	[174]
DPhPC/DPhPG (7:3)	RT	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Rekonstitution in Lipidsystem	[175]
DPhPC/DPhPG (7:3)	20	Elektrophysiologische Experimente mittels	Rekonstitution in Lipidsystem	[176]

Leitfähigkeitsmessungen				
DPhPC/DPhPG (7:3)	24-26	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Rekonstitution in Lipidsystem	[177]
DPhPC/DPhPG (9:1 und 1:1)	20-22	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Hemmung der Ionenkanäle durch Substrat mit mehr DPhPG in der Lipidmembran schwächer; ohne Substrat umgekehrter Effekt der stärkeren Hemmung mit mehr DPhPG	[178]
DPhPC/DPhPG (7:3)	RT	Protein-Lipidmembran-Interaktionsstudien	Rekonstitution in Lipidsystem	[179]
DPhPC/DPhPG (1:1)	24-26	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Rekonstitution in Lipidsystem	[180]
DPhPC/DPhPG (4:1)	25	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Hohe Peptidkonzentrationen und hohe Membranspannungen notwendig, um Kanäle zu bilden	[181]
DPhPC/DPhPG (4:1)	25	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Membranlyse zurückzuführen auf Protein, nicht auf Lipidmembran-Defekte Proteinwirkung ohne Bildung von diskreten Kanälen	[182]
DPhPC/DPhPG (7:3)	RT	Elektrophysiologische Experimente mittels Fluoreszenz-Spektroskopie	Ionen hemmen die Kanalaktivität in DPhPC/DPhPG, aber nicht in <i>E. coli</i> Membranen Protein aggregiert in <i>E. coli</i> Membranen	[183]
DPhPC/DPhPG (7:3 und mit 6, 8 und 10 % DPhPG)	24-26	Elektrophysiologische Experimente mittels Fluoreszenz-Spektroskopie	Einige Peptidmutanten konnten nicht in die Membran rekonstituiert werden Mit höherem DPhPG-Gehalt konnten Übergänge zwischen	[184]

			Zuständen des Ionenkanals nicht erfasst werden	
DPhPC/DPhPG (2:1)	22-24	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	DPhPG führt zu höherer Kanalaktivität des Membranpeptids; wird erklärt durch die Verstärkung des Kationenflusses durch anionische Lipide	[185]
DPhPC/DPhPG (3:1, 1:1, 1:3)	?	Fluoreszenz-Spektroskopie und Oberflächenmikroskopie	Mehr DPhPG verursacht niedrigere Membranresistenz gegen membranaktives Peptid; wird erklärt durch elektrostatische Attraktion des Peptids	[186]
DPhPC/DPhPG (3:1)	26,7	Proteinorientierungsanalyse mittels orientierter CD-Spektroskopie	Unbekannte Aggregate bei DPhPC/DPhPG-Mischungen beobachtet während Rekonstitution eines geladenen Proteins, nicht bei Rekonstitution des hydrophoben ALM	[187]
DPhPC/CHOL/DPhPG (6:3:1)	?	Dielektrische Spektroskopie und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	Rekonstitution in Lipidsystem	[188]
DPhPC/DPhPE				
DPhPC/DPhPE (verschiedene Mischungen)	RT	Elektronenmikroskopie, Atomkraft-Mikroskopie, NMR-Diffusionsmessungen, Elektrophysiologische Experimente	Mehr als 50% DPhPC in Lipidsystem führt zu Vesikelbildung; mehr als 50% DPhPE: kleine Vesikelstrukturen; Vesikel mit > 0,15 g/l bilden Lipiddoppelschichten auf Metalloberflächen Elektrische Stabilität der Membranen: DPhPE > DPhPC/PE (3:7) > DPhPC/PE (7:3) > DPhPC/PE (1:1)	[153]
DPhPC/DPhPE (7:3)	RT	Elektrophysiologische Experimente (Methodenbeschreibung)	Rekonstitution in Lipidsystem	[17]
DPhPC/DPhPE (3:5)	?	Elektrophysiologische Experimente mittels	Ionendurchlässigkeit zweimal höher in	[189]

		Leitfähigkeitsmessungen	DPhPC/DPhPE (3:5) als in DPhPC; Erklärung: bessere Aggregation und Aktivität des Proteins bei DPhPE-Präsenz	
DPhPC/DPhPE (1:1 und 7:3)	RT	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	DPhPE bildet alleine keine Lipiddoppelschichten, DPhPC/DPhPE (1:1 und 7:3) und DPhPS dagegen schon; Ionenleitfähigkeit über Pore in allen Lipidsystemen ähnlich; Präsenz von PE-Lipidkopfgruppen führen zu einem Porenzustand mit niedrigerer Leitfähigkeit	[154]
DPhPC/DPhPE (5:1)	25	Orientierte CD-Spektroskopie	ALM wurde in orientierte DPhPC/PE (5:1) Lipidmembranen rekonstituiert, zeigt Insertion bei höheren P/L als bei DPhPC	[22]
DPhPC/DPhPE (10:1 und 20:1)	RT	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Rekonstitution in Lipidsystem	[190]
DPhPC/DPhPE (7:3)	?	Elektrophysiologische Experimente und Elektronenmikroskopie	Rekonstitution in Lipidsystem	[191]
DPhPC/DPhPE (7:3)	?	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeitsmessungen	Ionenkanalaktivität niedriger als erwartet; Erklärung durch Verwendung eines neuen Systems	[192]
DPhPC/DPhPE (9:1 and 6:1)	30	Orientierte CD-Spektroskopie	Porenbildung in Biomembranen abhängig von spontaner Lipidmembran-Krümmung; negative Krümmung durch PE-Kopfgruppen hemmt die Porenbildung	[157,158]
DPhPC/DPhPE (1:4)	?	Elektrophysiologische Experimente mittels	Rekonstitution in Lipidsystem	[193]

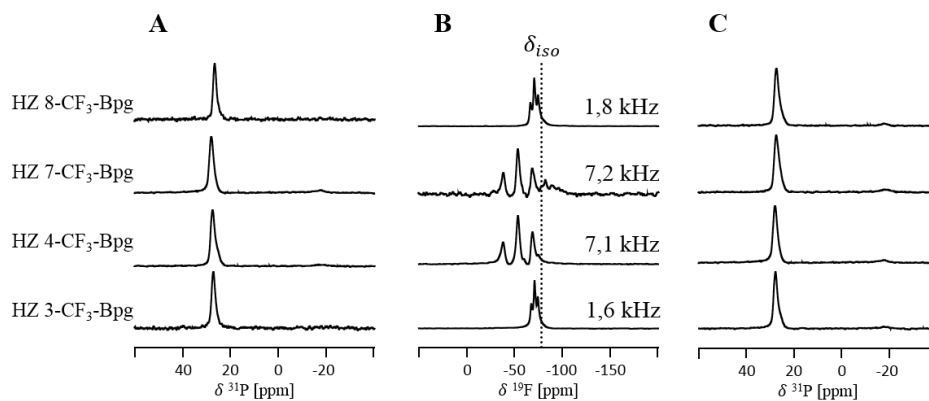
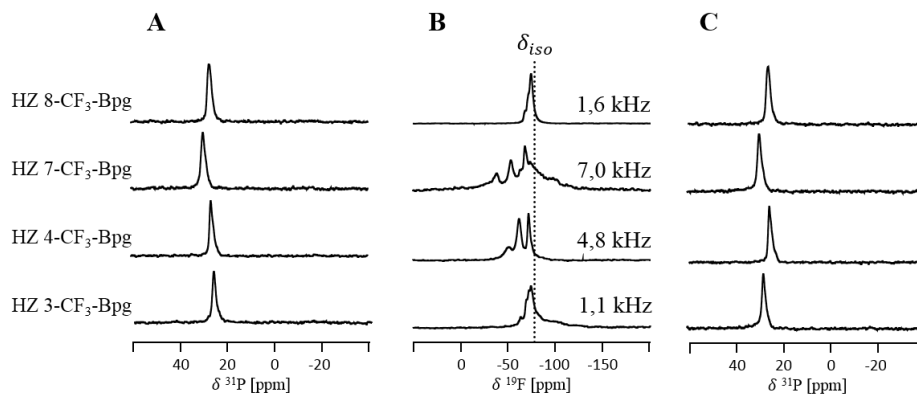
Fluoreszenz-Mikroskopie (Methodenbeschreibung)			
DPhPC/DPhPE (98:2, 95:5, 9:1)	26,7	Orientierte CD- Spektroskopie	PE-Kopfgruppen erhöhen den Schwellen-P/L für die Insertion des Peptids ^[159]
DPhPC/DPhPE (2:1)	37	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Rekonstitution in ^[194] Lipidsystem
DPhPC/DPhPS			
DPhPC/DPhPS (4:1, 1:1, 1:3)	23	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Ionenleitfähigkeit über ^[195] Membran vermindert sich mit mehr DPhPS in 1 M KCl; wird erklärt durch Ladungseigenschaften der Lipidmembran
DPhPC/DPhPS (4:1 and 1:1)	23	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	DPhPC/DPhPS (4:1) ^[20] durchlässiger für Kationen als DPhPC; mehr DPhPS erhöht Permeabilität; Erklärung: Ladung der Membran beeinflusst Kanalaktivität
DPhPC/DPhPS (1:4)	20-22	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	In DPhPC/PS-Mischung ^[196] ist Leitfähigkeit höher als in DPhPC, deutet auf Ionenfluss, der von Membranladung abhängt
DPhPC/DPhPS (1:1)	21-23	Elektrophysiologische Experimente mittels elektrochemische Mikroskopie	Membranpotential: ^[197] DPhPC/PS: -63 mV, DPhPC: -6 mV
DPhPC/DPhPS (3:1 and 7:3)	20-22	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Rekonstitution in ^[198] Lipidsystem
DPhPC/DPhPS (1:1)	23-25	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Bindung von Ionenkanal- ^[199] hemmenden Substraten verstärkt sich bei DPhPS- Präsenz i. Vgl. zu DPhPC aufgrund Ladung
DPhPC/DPhPS (4:1)	20	Elektrophysiologische Experimente mittels Leitfähigkeits- messungen	Rekonstitution in ^[200] Lipidsystem
DPhPC/DPhPE/ DPhPS (1:3:1, 3:3:1)	23	Elektrophysiologische Experimente mittels	Positive ^[20] Membrankrümmung hilft bei Porenbildung und PE

Leitfähigkeits-
messungeninduziert negative
Krümmung; mehr
DPhPS mehr Aktivität (s.
oben)**Tabelle 28: Literatur-Tabelle über die Verwendung von Lipidsystemen aus Diphytanoyl-Lipid-Mischungen als Modellmembranen seit 1990.**

*: die Nummerierung der Referenzen ist nach dem Haupttext angegeben

CHOL: Cholesterol

c. Festkörper-NMR-Spektroskopie

**Abbildung 61: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga in DPhPC bei einem P/L von 1:10.****Abbildung 62: ^{19}F -Festkörper-NMR-Spektren der markierten HZ-Analoga in DMPC bei einem P/L von 1:10.**

d. OCD-Spektroskopie

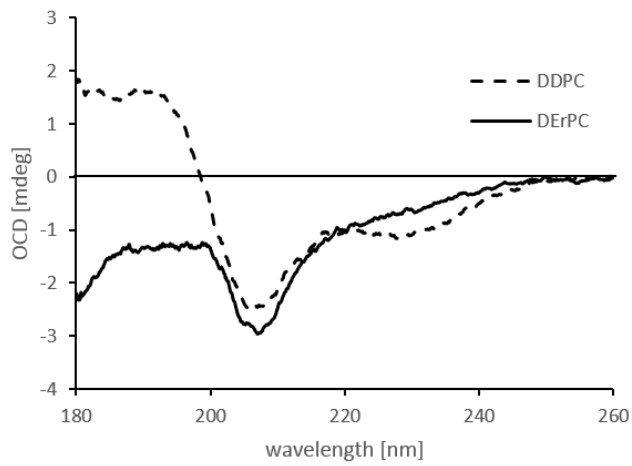


Abbildung 63: OCD-Spektren von HZ in DDPC und DErPC.

HZ in DDPC- (A) und DErPC-Lipidvesikeln (B) bei einem P/L von 1:20 ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Sezgin Kara
Geburtsdatum, -ort	14.05.1986, Karlsruhe
Staatsangehörigkeit	deutsch

AUSBILDUNG

01/2013 – 04/2016	Promotion am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Institut für Organische Chemie (IOC) „Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von membranaktiven Peptiden/Peptaibolen in Lipid-Modellmembranen“ Betreuung: Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich
05/2012 – 10/2012	Diplomarbeit am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Institut für Organische Chemie (IOC) „Untersuchungen an Phytanoyl-Lipiden und ihrer Wechselwirkung mit dem antimikrobiellen Peptid PGLa“ Betreuung: Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich
11/2010 – 12/2010	Studentische Hilfskraft (HiWi-Tätigkeit) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Institut für Organische Chemie (IOC)
10/2005 – 10/2012	Studium der Chemie (Diplom) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
03/2005	Allgemeine Hochschulreife am Europa-Gymnasium Wörth

Publikationen

1. S. Kara, S. Afonin, S.L. Grage, A. Bordessa, V. Doan, G. Chaume, T. Brigaud, A.S. Ulrich, Structure of the short peptaibol Harzianin HK VI, *Biophys. J.* **2016**, *in progress*.
2. S. Kara, S. Afonin, A.S. Ulrich, Diphytanoyl lipids as lipid model membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* **2016**, *in progress*.
3. S.L. Grage, S. Afonin, S. Kara, G. Buth, A.S. Ulrich, Membrane thinning and thickening induced by membrane-active, amphipathic peptides, *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *in press*.
4. S. Afonin, D.S. Radchenko, S. Kattge, S. Kara, A.S. Ulrich, Does a methionine-to-norleucine substitution in PGLa influence peptide-membrane interactions?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, 1858, 2019-2027.
5. V. Kubyshekin, S. Afonin, S. Kara, N. Budisa, P.K. Mykhailiuk, A.S. Ulrich, γ -(S)-Trifluoromethyl proline: Evaluation as a structural substitute of proline for solid state ^{19}F -NMR peptide studies, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 3171–3181.

Konferenzbeiträge/Posterpräsentationen/Workshops:

1. S. Kara, S. Afonin, V. Doan, A. Bordessa, S.L. Grage, G. Chaume, N. Takeshita, T. Brigaud, A.S. Ulrich, Membrane-bound structure of the short peptaibol Harzianin HK-VI. 590th WE-Heraeus-Seminar: Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy, Bad Honnef, May 17-20, 2015.
2. S. Kara, S. Afonin, V. Doan, S.L. Grage, G. Chaume, T. Brigaud, A.S. Ulrich, Structure-function analysis of the peptaibol Harzianin HK-VI. International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2014), Madrid, E, October 1-3, 2014.
3. V. Doan, G. Chaume, A. Bordessa, F. Rizzolo, E. Peroni, A.M. Papini, S. Kara, S. Afonin, A.S. Ulrich, T. Brigaud, Solid phase peptide synthesis of a ^{19}F -labeled harzianin: an antimicrobial peptaibol. Peptides in Paris Symposium (PIPS 2014), Paris, F, October 5-8, 2014.
4. V. Doan, G. Chaume, F. Rizzolo, E. Peroni, A.M. Papini, S. Kara, S. Afonin, E. Strandberg, A.S. Ulrich, T. Brigaud, Solid phase peptide synthesis of a ^{19}F -labeled harzianin: an antimicrobial peptaibol. 33rd European Peptide Symposium, Sofia, BG, August 31 - September 5, 2014.

5. V. Doan, G. Chaume, A. Bordessa, F. Rizzolo, E. Peroni, A.M. Papini, S. Kara, S. Afonin, A.S. Ulrich, T. Brigaud, Solid phase peptide synthesis of a ¹⁹F-labeled harzianin: an antimicrobial peptaibol. Colloque Francais de Chimie du Fluor, Gif-sur-Yvette, F, May 12-15, 2014.
6. V. Doan, G. Chaume, A. Bordessa, F. Rizzolo, E. Peroni, A.M. Papini, E. Strandberg, S. Kara, S. Afonin, A.S. Ulrich, T. Brigaud, Solid phase peptide synthesis of a ¹⁹F-labeled Harzianin: an antimicrobial. 11emes Rencontres de Chimie Organique, Cachan, F, April 4, 2013.
7. S. Kara, S. Afonin, Characterization of Alamethicin and Harzianin. ANR-DFG Peptaibols Workshop, Cergy-Pontoise, F, June 2-3, 2014.