

Dermcidin-Peptide: Membran-Interaktion und Wirkspektrum

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker Philipp Mühlhäuser

aus

Pforzheim

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2013 bis März 2016 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie – Lehrstuhl für Biochemie (Campus Süd) sowie am Institut für Biologische Grenzflächen 2, IBG-2 (Campus Nord), unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

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

Karlsruhe, den 09.05.2016

Philipp Mühlhäuser

Danksagungen

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

Prof. Dr. Anne S. Ulrich danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrem Arbeitskreis durchzuführen und für die herausfordernde Aufgabenstellung.

Dr. Johannes Reichert danke ich für die Zeit, die er sich während der letzten Jahre für mich nahm und für die fachkundige Unterstützung bei allen Fluoreszenz-Experimenten.

Dr. Parvesh Wadhvani danke ich für die Betreuung und für die Unterstützung bei der Planung von Peptidsynthesen und bei NMR-Experimenten.

Dr. Marina Berditsch danke ich für die Unterstützung bei sämtlichem mikrobiologischen Arbeiten und für ihre vielzähligen Denkanstöße für Untersuchung an Dermcidin-Peptiden.

Dr. Jochen Bürck, Bianca Posselt und Sigmar Roth danke ich für die fachkundige Hilfe bei CD- und OCD-Experimenten.

Prof. Dr. Peter Nick, Dr. Ningning Gao, Dr. Jan Maisch, Irina Peshatova danke ich für die Experimente mit den BY-2 Tabakzellen.

Dr. Carsten Weiss, Dr. Silvia Diabaté, Regina Fertig und Dorit Mattern danke ich für die Hilfe bei den Arbeiten mit RAW 264.7 Makrophagen und bei den ELISAs.

Dr. Cornelia Lee-Thedieck und Saskia Kraus danke ich für die Inkubationsexperimente mit den HaCaT-Zellen.

Andrea Eisele und Kerstin Scheubeck danke ich für die fachkundige Hilfe bei Problemen mit der Peptidsynthese und bei der Peptidreinigung mittels HPLCs.

Dr. Papia Sanyal, Dr. Jonathan Zerweck und Dr. Benjamin Zimpfer danke ich dafür, dass sie allzeit bereit waren meine Fragen zu beantworten und dass sie mir halfen Abläufe häufig genutzter Arbeitstechniken zu optimieren.

Dr. Lucie Caillon danke ich für die Unterstützung in der finalen Phase meiner Arbeit und dass sie, auf den vielversprechenden Ansätzen aus meiner Arbeit aufbauend, mit dem Dermcidin-Projekt fortfahren wird.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden, die mich nicht nur während der letzten Jahre, sondern während meines gesamten Studiums jederzeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Einheiten und Symbole	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Biologische Membranen	2
1.3 Antimikrobielle Peptide	6
1.4 Peptid-Membran-Interaktion von AMPs	8
1.5 Dermcidin und dessen abgeleitete Peptide	10
1.6 Wege in die Zelle	14
1.7 Zellpenetrierende Peptide	15
2. Zielsetzung	20
3. Methoden	21
3.1 Festphasenpeptidsynthese	22
3.2 Reinigung mittels HPLC	27
3.3 Zirkulardichroismus-(CD-)Spektroskopie	28
3.4 Orientierte Zirkulardichroismus-(OCD-)Spektroskopie	29
3.5 Festkörper-NMR-Spektroskopie	32
3.6 Biologische Tests	34
3.6.1 Test zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration	36
3.6.2 Weitere Methoden zur Bestimmung der Antimikrobiellen Aktivität	37
3.6.3 Hämolyse	39
3.6.4 Inkubation von BY-2 Tabakzellen	40
3.6.5 Inkubation von RAW Makrophagen	41
3.6.6 Makrophagen LDH	42
3.6.7 Makrophagen PI-Färbung	42
3.6.8 ELISA	43
3.6.9 HaCaT-Inkubation	44
3.6.10 Inkubation von Bakterien mit farbstoff-markierten DCD-Peptiden	45

3.7 Fluoreszenzspektroskopische Methoden	46
3.7.1 Farbstoff Leakage	46
3.7.1.1 ANTS/DPX-Leakage	46
3.7.1.2 Tb ³⁺ /DPA-Leakage	47
3.7.1.3 Leakage mit Membranpotential	48
3.7.2 NBD Bindung	49
3.7.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	51
3.7.4 Vesikelbasierter-CPP Test	51
3.7.5 Bestimmung des Hill-Koeffizienten	52
4. Ergebnisse	53
4.1 Synthese und Aufreinigung der Peptide	53
4.2 Strukturuntersuchungen	59
4.2.1 CD-Spektroskopie	59
4.2.2 OCD-Spektroskopie	64
4.2.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie	71
4.2.4 NBD-Bindungsexperimente	74
4.2.5 FRET-Experimente zur Assemblierung	79
4.3 Funktionsuntersuchungen Teil 1: Antimikrobielle Wirkung und Membranschädigung	82
4.3.1 MHK-Test zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität	82
4.3.2 Weitere Tests zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität	85
4.3.3 Leakage-Experimente	88
4.3.4 Hämolyse	91
4.3.5 RAW Makrophagen Inkubation	92
4.3.6 Immunantwort von RAW Makrophagen	95
4.4 Funktionsuntersuchungen Teil 2: Translokationsexperimente	96
4.4.1 Translokation in Vesikel	96
4.4.2 Konzentrationsabhängigkeit der Translokation	103
4.4.3 Translokation in BY-2 Tabakzellen	105
4.4.4 Translokation in HaCaT-Zellen	111
4.4.5 Translokation in Bakterien	113

5. Diskussion	114
5.1 Synthesen	114
5.2 Sekundärstruktur und Orientierung in Membranen	115
5.3 Antimikrobielle Aktivität und Membranschädigung	118
5.4 Translokation in Lipidvesikel und Zellen	121
6. Zusammenfassung	127
7. Ausblick	129
8. Literaturverzeichnis	130
9. Anhang	136
9.1 Theorie	136
9.1.1 Festphasenpeptidsynthese	136
9.1.2 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	139
9.1.3 Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie	141
9.1.4 Kernspinresonanz-(NMR-)Spektroskopie	142
9.1.5 Fluoreszenzspektroskopie	145
9.1.5.1 Farbstoff Leakage	145
9.1.5.2 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	146
9.1.5.3 Hill-Gleichung	148
9.2 Materialien und Geräte	149
9.3 HPLC-Gradienten und Ausbeuten der Peptidsynthese	153
9.4 Verteilungskoeffizienten der NBD-Bindung	154
9.5 Helikale-Netz-Darstellungen wichtiger DCD-1L Analoga	155

Abstract

About fifteen years ago Dermcidin-derived peptides DCD-1L and SSL-25 were discovered in human sweat. Dermcidin is continuously expressed by the eccrine sweat glands, secreted into the sweat and transported to the surface of the skin where it is further proteolytically processed. Several publications have described Dermcidin-derived peptides to be effective antimicrobial agents. However, in this thesis all attempts to reproduce any antimicrobial properties of these peptides failed, including the test on the very same bacterial strains that were reported to be susceptible to DCD-1L or SSL-25.

All investigated peptides used in this thesis (25 to 52 residues long) were synthesized by standard solid-phase peptide synthesis and purified using reverse phase HPLC techniques in satisfactory amounts.

Even without antimicrobial properties, Dermcidin-derived peptides exhibit a typical behavior of an α -helical antimicrobial peptide as observed by circular dichroism (CD) spectroscopy namely an unordered structure in aqueous solution and in presence of anionic lipid bilayers the DCD-peptides folded into an α -helical, amphiphilic structure.

Oriented CD and solid-state NMR spectroscopy showed largely a surface-aligned helix with an orientation, which remained independent of the peptide concentration, sample temperature, lipid composition or ionic strength of the sample. Unlike a typical antimicrobial peptide, DCD-peptides even at very high peptide concentrations do not insert into the membrane.

The affinity of the anionic peptide DCD-1L for anionic membranes only increased with the use of higher content of anionic lipids and with the increasing concentration of Zn^{2+} ions, an effect contrary to what would be biologically expected. This effect was less distinctive for the shorter cationic peptide SSL-25.

The postulated assembly of DCD-1L to an oligomeric pore might be achieved through the presence of alternating charge compensation in a so-called charge-zipper. Resonance energy transfer experiments however hold no evidence of a DCD-1L assembly, only monomeric bound peptides were observed without detection of monomeric backfolding of the N- to the C-terminus.

Based on the similarities between antimicrobial and cell-penetrating peptides, the translocation properties of Dermcidin-derived peptides were studied. These peptides translocate into lipid vesicles and eukaryotic cells. Membrane translocation of DCD-peptides was found to be a direct reflection of their binding efficiency to lipid membranes. Thus an increased anionic charge on the membrane and higher concentrations of Zn^{2+} -ions dramatically accelerated the translocation process. A positive influence of Zn^{2+} -ions was also found for the translocation into BY-2 tobacco cells.

It was shown that the translocation process of DCD-1L into lipid vesicles occurs in a synergistic manner. The observed Hill coefficient of 2 suggests that DCD-1L assembles into a dimer during the process of translocation whereas the shorter sequence of SSL-25 translocates as a monomer with a Hill coefficient of 1.

Preliminary translocation experiments in human keratinocytes show penetration within 15 min of incubation. The peptide seems to be located on or in the nucleus.

For the first time, in this thesis, it has been shown that Dermcidin-derived peptides are not antimicrobial but have more cell-penetrating properties. The translocation in keratinocytes in particular, coupled with the non-toxicity of these peptides given their human origin, opens up many promising uses, for example in cosmetics or in dermatology.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aca	7-Aminocoumarin-4-essigsäure
Ala, A	Alanin
AMP	Antimikrobielles Peptid
AN	Acetonitril
ANTS	8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure Dinatriumsalz
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
Asp, D	Asparaginsäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bzw.	beziehungsweise
¹³ C	Kohlenstoffisotop 13
ca.	zirka
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende
CD	Zirkulardichroismus (<i>engl.</i> circular dichroism)
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPP	Zellpenetrierendes Peptid (<i>engl.</i> cell-penetrating peptide)
DCM	Dichlormethan, Methylenchlorid
d.h.	das heißt
DErPC	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DErPG	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol Natriumsalz
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol Natriumsalz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPC	1,2-Dinervonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol Natriumsalz
DPA	Pyridin-2,6-dicarbonensäure
DPX	1,1'-(1,4-Phenylendimethylen)dipyridiniumdibromid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
¹⁹ F	Fluorisotop 19
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
¹ H	Wasserstoffisotop 1
² H	Wasserstoffisotop 2 (Deuterium)
H ₂ O	Wasser

HATU	1-[bis(Dimethylamin)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]pyridinium-3-oxid-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
His, H	Histidin
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>engl.</i> : high performance liquid chromatography)
KbE	Koloniebildende Einheit (<i>engl.</i> : colony forming unit, CFU)
LC/MS	Flüssigchromatographie/Massenspektroskopie (<i>engl.</i> : liquid chromatography/mass spectroscopy)
Leu, L	Leucin
Lsg.	Lösung
Lys, K	Lysin
MeOH	Methanol
MES	4-Morpholinethanesulfonsäure
MHK	minimale Hemmkonzentration
¹⁵ N	Stickstoffisotop 15
N-Terminus	Amino-terminales Ende
NBD	7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
nm	Nanometer
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (<i>engl.</i> : nuclear magnetic resonance)
OCD	Orientierter Zirkulardichroismus (<i>engl.</i> : oriented circular dichroism)
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
³¹ P	Phosphorisotop 31
PB	Phosphatpuffer (<i>engl.</i> : phosphate buffer)
PBS	Phosphatpuffer mit NaCl (<i>engl.</i> : phosphate buffer saline)
pH	pondus Hydrogenii
Phe, F	Phenylalanin
PIPES	1,4-Piperazindiethanesulfonsäure
P/L	molares Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol Natriumsalz
Rh	Rhodamin B
Rh-PE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-(Lissamin Rhodamin B sulfonyl Ammonium-Salz)
RP	Umgekehrte Phase (<i>engl.</i> : reversed phase)
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser, S	Serin
sog.	sogenannt(e,er)

Tab.	Tabelle
TFA	2,2,2-Trifluoethansäure
TFE	2,2,2-Trifluoethanol
TFFH	(Dimethylamino)(fluor)- <i>N,N</i> -dimethylmethaniminiumhexafluorophosphat
TIS	Triisopropylsilan
Trp, W	Tryptophan
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Einheiten und Symbole

°C	Grad Celsius
α	Alpha
Äq	Äquivalente
B_0	Magnetfeld
β	Beta
deg	Grad
$E_{app,dq}$	Fluoreszenzlöschung des Donors (<i>engl.</i> apparent donor quenching)
$E_{app,se}$	Ansteigende Emission des Akzeptors (<i>engl.</i> apparent sensitized emission)
g	Gramm
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
μ M	Mikromolar
μ mol	Mikromol
n	Hill-Koeffizient
N	Normalität
ppm	parts per million
rpm	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1.1:	Die Plasmamembran als Barriere	3
Abb. 1.2:	Modell einer Zellmembran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell	4
Abb. 1.3:	Zellmembran gramnegativer und grampositiver Bakterien	5
Abb. 1.4:	Orientierungen α -helikaler Peptide in Lipidmembranen	8
Abb. 1.5:	Interaktionsmöglichkeiten zwischen AMPs und Lipidmembranen	9
Abb. 1.6:	Helikale-Rad-Darstellung von SSL-25 und DCD-1L	11
Abb. 1.7:	Postsekretorische Prozessierung von DCD-1L	12
Abb. 1.8:	Assemblierung von DCD-1L mittels Salzbrücken	13
Abb. 1.9:	Weitere Möglichkeiten der DCD-1L-Assemblierung	14
Abb. 1.10:	Mechanismen der direkten Translation	18
Abb. 3.1:	Struktur von Fmoc-Leu-Wang Harz	22
Abb. 3.2:	Struktur der GQF-Aca-Sequenz	25
Abb. 3.3:	Schnittdarstellung der OCD-Probenkammer	31
Abb. 3.4:	OCD-Spektren im S-Zustand, T-Zustand und I-Zustand	31
Abb. 3.5:	13-Strichverfahren	35
Abb. 3.6:	Struktur von Hoechst 33342 und Propidiumiodid	42
Abb. 3.7:	Schematischer Versuchsaufbau der Leakage-Experimente	47
Abb. 3.8:	Veranschaulichung des Membranpotentials nach Valinomycin-Zugabe	49
Abb. 3.9:	Beispiel eines Bindungstests	50
Abb. 3.10:	Aca-Abspaltung nach Translokation in Vesikel	52
Abb. 4.1:	CD-Spektren von SSL-25 und DCD-1L	59
Abb. 4.2:	Salzeinfluss auf CD-Spektren von DCD-1L	60
Abb. 4.3:	Zn ²⁺ -Einfluss auf CD-Spektren von DCD-1L	61
Abb. 4.4:	pH-Einfluss auf CD-Spektren von DCD-1L	62
Abb. 4.5:	SDS-Einfluss auf CD-Spektren von DCD-1L	62
Abb. 4.6:	Vergleich einiger DCD-1L-Analoga mit dem Wildtyp	63
Abb. 4.7:	Orientierte CD-Spektren von SSL-25 und DCD-1L	64
Abb. 4.8:	OCD-Spektren von DCD-1L mit NaF	65
Abb. 4.9:	OCD-Spektren von DCD-1L mit Zn ²⁺	66
Abb. 4.10:	OCD-Spektrum von ¹⁵ N-vollmarkiertem DCD-1L	66
Abb. 4.11:	OCD-Spektren von DCD-1L in <i>E. coli</i> -Lipidextrakt	67
Abb. 4.12:	OCD-Spektren von DCD-1L in DErPC	68
Abb. 4.13:	OCD-Spektren von DCD-1L in DNPC	68
Abb. 4.14:	OCD-Spektren von DCD-1L in DErPC/DErPG	69
Abb. 4.15:	OCD-Spektren von DCD-1L in Lyso-Lipiden	70
Abb. 4.16:	P/L-Serie von Festkörper-NMR-Spektren eines DCD-1L-Analogons	71
Abb. 4.17:	Festkörper-NMR-Spektren der DCD-1L-Analoga mit Zn ²⁺	72
Abb. 4.18:	Festkörper-NMR-Spektrum eines DCD-1L-Analogon mit Lyso-Lipid	73
Abb. 4.19:	Bindung von NBD-DCD-1L an POPC- und POPC/POPG 7:3-Vesikel	74
Abb. 4.20:	Bindung von NBD-DCD-1L an POPC/POPG 7:3-Vesikel mit Zn ²⁺	75
Abb. 4.21:	Bindung von NBD-DCD-1L an POPC/POPG 3:1-, 1:1- und 1:3 -Vesikel	76
Abb. 4.22:	Verteilungskoeffizienten von NBD-DCD-1L	77
Abb. 4.23:	Bindung von NBD-SSL-25 an POPC/POPG 3:1- und 1:3-Vesikel	78

Abb. 4.24:	Donor-Quenching und Akzeptor-Emission bei P/L 1:400	79
Abb. 4.25:	Donor-Quenching und Akzeptor-Emission bei P/L 1:50	80
Abb. 4.26:	Mögliche Rückfaltung des DCD-1L	80
Abb. 4.27:	Spektren von Dansyl-DCD-1L, DCD-1WL und Dansyl-DCD-1WL	81
Abb. 4.28:	Beispielhaftes Ergebnis eines MHK-Tests	84
Abb. 4.29:	Beispielhaftes Ergebnis eines Atmungstests	85
Abb. 4.30:	Ausschnitte einiger Agarplatten von Radialdiffusionstests	86
Abb. 4.31:	Abtötungskinetik von SSL-25 und DCD-1L	87
Abb. 4.32:	ANTS/DPX-Leakage von SSL-25 und DCD-1L	88
Abb. 4.33:	Tb ³⁺ /DPA-Leakage von DCD-1L	89
Abb. 4.34:	ANTS/DPX-Leakage mit Membranpotential	90
Abb. 4.35:	Hämolyse von DCD-1L und SSL-25	91
Abb. 4.36:	LDH-Freisetzung von RAW 264.7 Makrophagen	92
Abb. 4.37:	Auswertung der PI-Färbung	93
Abb. 4.38:	RAW 264.7 Makrophagen nach 24 h Inkubation	94
Abb. 4.39:	TNF α -ELISA	95
Abb. 4.40:	Quantifizierung der TNF α -Konzentration	95
Abb. 4.41:	Zeitlicher Verlauf der Vesikel-Translokation	96
Abb. 4.42:	Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L in Abhängigkeit von Zn ²⁺	97
Abb. 4.43:	Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L in Abhängigkeit 2-wertiger Ionen	98
Abb. 4.44:	Translokation von SSL-24-GQF-Aca-A in Abhängigkeit von Zn ²⁺	99
Abb. 4.45:	Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L H38A	100
Abb. 4.46:	Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L „A“ und „P“	101
Abb. 4.47:	Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L „C“	102
Abb. 4.48:	Zeitlicher Verlauf der Translokation von „P2“ und „P3“	102
Abb. 4.49:	Initiale Transferraten von DCD-1L und SSL-25	103
Abb. 4.50:	Translokation von Rh-SSL-25 und Rh-DCD-1L in BY-2 Tabakzellen	105
Abb. 4.51:	Translokation von Rhodamin B in BY-2 Tabakzellen	106
Abb. 4.52:	Zn ²⁺ -abhängige Translokation in BY-2 Tabakzellen	107
Abb. 4.53:	Translokation von Rh-VED-23 in BY-2 Tabakzellen	107
Abb. 4.54:	Translokation von Rh-DCD-1L „A“, „P“ und „C“ in BY-2 Tabakzellen	108
Abb. 4.55:	Translokation von Rh-SSL-25-Lifeact in BY-2 Tabakzellen	109
Abb. 4.56:	Translokation von Rh-Lifeact und SSL-25 in BY-2 Tabakzellen	110
Abb. 4.57:	Translokation von Rh-SSL-25 in HaCaT-Zellen	111
Abb. 4.58:	HaCaT-Schnitte weisen auf Lokalisation im Kern	112
Abb. 4.59:	HaCaT-Zellen nach Inkubation in Puffer	112
Abb. 4.60:	CF-DCD-1L akkumuliert in bzw. an <i>S. aureus</i> DSM 1104	113
Abb. 5.1:	Verteilungskoeffizienten von SSL-25 und DCD-1L	116
Abb. 5.2:	Umlagerung eines Aspartatrests über ein Succinimid-Intermediat	118
Abb. 5.3:	Bakterien zeigten beschleunigten Metabolismus durch Peptid	119
Abb. 5.4:	Vergleich des Vesikelleakage von 1:50 PGLa und 1:5 DCD-1L	120
Abb. 5.5:	Translokation von TP1 und DCD-1L-Analogon in Zn ²⁺ -Abhängigkeit	122
Abb. 5.6:	Helikale-Rad-Darstellung von DCD-1L wt und „P2“	123
Abb. 9.1:	Schematische Darstellung der Festphasensynthese nach Merrifield	137
Abb. 9.2:	Abspaltung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe	138
Abb. 9.3:	Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen	138

Abb. 9.4:	Ursache des zirkulardichroitischen Effekts	139
Abb. 9.5:	Berechnete CD-Basisspektren der reinen Proteinstrukturen	140
Abb. 9.6:	OCD-Spektren α -helikaler Membranproteine	141
Abb. 9.7:	Schema zweier Kerne A und B im Raum	143
Abb. 9.8:	CSA-Tensor und NMR-Pulverspektrum	143
Abb. 9.9:	^{15}N -Festkörper-NMR-Pulverspektrum	144
Abb. 9.10:	Schematische Darstellung des ANTS/DPX-Leakage	145
Abb. 9.11:	Schematische Darstellung von Excitations- und Emissionsspektren	146
Abb. 9.12:	Schematische Darstellung von Quenching und Emissionserhöhung	147
Abb. 9.13:	Helikale-Netz-Darstellung von DCD-1L wt, „A“ und „P2“	155
Abb. 9.14:	Helikale-Netz-Darstellung von DCD-1L „C“, „P2“ und „P3“	156

Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tab. 1.1:	Einteilung antimikrobieller Peptide in Klassen	7
Tab. 1.2:	Aminosäuresequenzen der DCD-Peptide	10
Tab. 1.3:	Einteilung zellpenetrierender Peptide in Klassen	17
Tab. 3.1:	Kupplungsansätze für N-terminale Markierungen	24
Tab. 3.2:	Messparameter für die CD-Experimente	29
Tab. 4.1:	Ladungsreißverschluss-Motiv in DCD-Peptiden	53
Tab. 4.2:	Sequenzen aller Peptide ohne Markierung	55
Tab. 4.3:	Sequenzen der ^{15}N -markierten Peptide	55
Tab. 4.4:	Sequenzen der NBD-markierten Peptide	56
Tab. 4.5:	Sequenzen der Peptide für FRET-Experimente	56
Tab. 4.6:	Sequenzen der Peptide für Vesikel-Translokationen	57
Tab. 4.7:	Sequenzen der Rhodamin B-markierten Peptide	58
Tab. 4.8:	Sequenzen der Carboxyfluorescein-markierten Peptide	58
Tab. 4.9:	Hemmkonzentrationen der Dermcidin-Analoga	83
Tab. 4.10:	Hemmkonzentrationen von DCD-1L und SSL-25	84
Tab. 9.1:	Physikalische Eigenschaften ausgewählter Kerne	142
Tab. 9.2:	Typische Werte des Hill-Koeffizienten	148
Tab. 9.3:	Gerätschaften und verwendetes Verbrauchsmaterial	149
Tab. 9.4:	Lipide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden	151
Tab. 9.5:	Aminosäuren, die in dieser Arbeit Verwendung fanden	151
Tab. 9.6:	Fluorophore, die in dieser Arbeit Verwendung fanden	151
Tab. 9.7:	Weitere Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden	152
Tab. 9.8:	HPLC-Gradienten & Ausbeuten der Dermcidin-Peptide	153
Tab. 9.9:	Berechnete Verteilungskoeffizienten aus den Bindungsexperimenten	154

1. Einleitung

1.1 Motivation

Die zufällige Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming im Jahr 1928 hatte weitreichende Folgen für unser alltägliches Leben [1]. Antibiotika (*griechisch: anti* „gegen“; *biotikos* „lebhaft“) sind heute aus unserer modernen Gesellschaft nicht mehr wegzudenken. Sie finden vielfachen Einsatz in der Medizin, der Landwirtschaft und in industriellen Verfahren. Damit Antibiotika selektiv Mikroorganismen bekämpfen, wird an das Antibiotikum die Anforderung gestellt, dass es lediglich in Mechanismen oder Strukturen eingreift, die exklusiv in Mikroorganismen vorkommen. Unterschiede zwischen Mikroorganismen und Vielzellern bestehen z.B. im Ablauf der Proteinbiosynthese, bei der DNA-Replikation oder bei Aufbau und Zusammensetzung der Zellmembranen und der Zellwände. Durch unverhältnismäßigen Einsatz von Antibiotika sind bis heute viele Resistenzen gegenüber antibiotischen Medikamenten entstanden. Es werden dringend neue Antibiotika bzw. Alternativen zu konventionellen Antibiotika benötigt, denn die Entwicklung neuer Antibiotika war in den letzten Jahren langsamer als die Ausbildung neuer Resistenzen. Ein Wirkstoff, der Mikroorganismen auf eine neue Weise angreift wäre wünschenswert, da sich so bestehende Resistenzmechanismen gezielt umgehen ließen. Eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Antibiotika stellen antimikrobielle Peptide dar. Diese vorwiegend kationischen Peptide, die hauptsächlich in höheren tierischen Organismen zu finden sind, lagern sich an die Zellwand von Bakterien an und führen zu Störungen in der Zellmembran. Jedoch besitzen auch Pflanzen, Insekten und sogar manche Mikroorganismen selbst solche inhärenten Abwehrmechanismen gegen schädliche Bakterien und Pilze [2].

Bei einem solchen Wirkmechanismus ist es deutlich schwieriger für Bakterien Resistenzen zu entwickeln. Für eine medizinische Anwendung von antimikrobiellen Peptiden ist es jedoch unerlässlich ihren genauen Wirkmechanismus zu Verstehen. Ihre Struktur muss ebenso aufgeklärt sein wie ihre Interaktion mit der bakteriellen Membran. Das Peptid könnte beispielsweise die Membran durchspannen, auf der Membran aufliegen oder gar mit einem bestimmten Membranbestandteil interagieren [3]. Bis zum heutigen Tag konnten fast 2000 eukaryotische, antimikrobielle Peptide identifiziert werden [4]. Sie können nach Sequenz, Ladung, Funktionalität oder dreidimensionaler Struktur eingeteilt werden, z.B. kationisch, anionisch, amphiphil, reich an bestimmten Aminosäuren, vorwiegend α -helikal oder mit einer β -Faltblatt-Struktur (vergl. Kapitel 1.3) [3].

Anfangs der 2000er wurden die antimikrobiellen Peptide der Dermcidin-Familie in menschlichem Schweiß nachgewiesen [5]. Diese vielversprechende Gruppe an anionischen und kationischen α -helikalen Peptiden soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.2 Biologische Membranen

1.2.1 Allgemeiner Aufbau von Biomembranen

Zellen und die eventuell enthaltenen Zellorganellen werden durch Membranen umgeben. Diese trennen die einzelnen Reaktionsräume voneinander und schützen diese vor Umwelteinflüssen. Gleichzeitig muss jedoch auch ein Stoff- und Informationsaustausch mit der Umgebung möglich sein. Um diese Aufgaben zu erfüllen sind biologische Membranen aus vielen unterschiedlichen Molekülen aufgebaut [6].

Biologische Membranen bestehen aus Lipiden und Proteinen und sind ca. 5-10 nm dick. Der Hauptbestandteil von biologischen Membranen sind Phospholipide, die sich zu einer Doppelschicht anordnen. Diese Lipiddoppelschicht ist jedoch kein statisches, sondern ein dynamisches System und verhält sich wie eine zweidimensionale Flüssigkeit. In ihr bewegen sich die einzelnen Moleküle lateral frei, aber eine transversale Diffusion findet nur selten statt. Die Fluidität einer Membran ist abhängig von der Zusammensetzung und der Temperatur der Membran. So führt beispielsweise ein erhöhter Cholesteringehalt zu einer Versteifung der Membran, da die Beweglichkeit der Fettsäureketten der Lipide eingeschränkt wird [6].

Biomembranen setzen sich im Wesentlichen aus drei unterschiedlichen Typen von Lipiden zusammen: aus Phospholipiden, aus Sphingolipiden und aus dem Steroid Cholesterin.

Phospholipide bestehen aus Glycerol, welches an zwei seiner drei Hydroxylgruppen (an C1 und C2) mit einer Fettsäure und an der dritten mit einer Phosphatgruppe verestert ist. Durch ein weiteres Substrat, das an die Phosphatgruppe gebunden ist, werden die unterschiedlichen Phospholipide unterschieden.

Sphingolipide bestehen aus Sphingosin, das über seine Aminogruppe mit einer Fettsäure verknüpft ist. Ohne eine weitere Veresterung spricht man von Ceramiden. Sphingomyeline ergeben sich durch eine Veresterung mit Phosphocholin an der Hydroxylgruppe und Glycosphingolipide durch eine Veresterung mit einem (Oligo-)Saccharid [6].

Alle Membranlipide haben trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus eines gemeinsam. Sie bestehen aus einer polaren (hydrophilen) Kopfgruppe und aus einer unpolaren (hydrophoben) Kette. Dies verleiht ihnen einen amphiphilen Charakter, d. h. sie sind bestrebt sich in polaren Lösungsmitteln so anzuordnen, dass die hydrophobe Kette möglichst nicht mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommt.

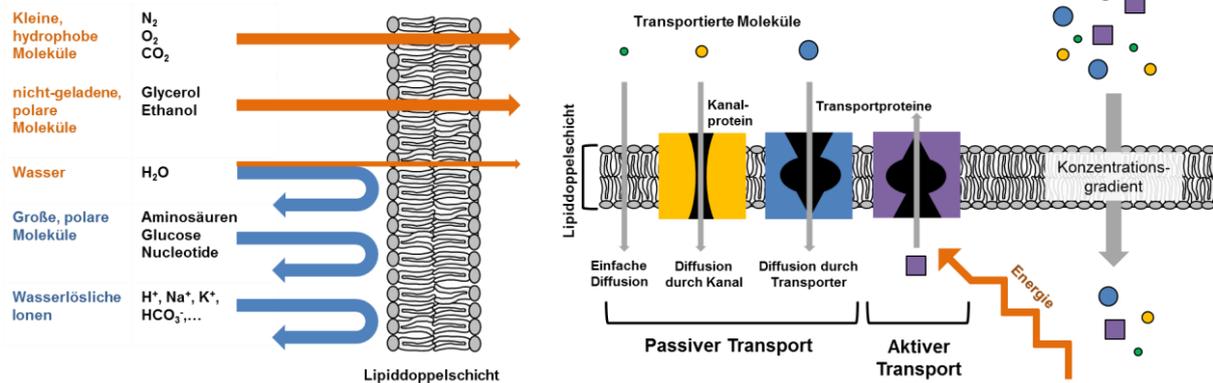


Abb. 1.1 Die Plasmamembran – Eine Lipiddoppelschicht die als Barriere dient und den Materialaustausch mittels Kanälen und Transportproteinen regelt.

Die Plasmamembran lässt kleine, nicht geladene Stoffe kleiner Molmassen passieren, bildet jedoch eine Barriere gegen Ionen und Stoffe höherer Molmassen aus (links). Sie reguliert den Transport mittels Kanälen und Transportproteinen. Der Passive Transport erfolgt in Richtung eines Konzentrationsgradienten. Entgegen der Konzentration kann lediglich aktiver Transport unter ATP-Verbrauch stattfinden (rechts) [7].

Eine Lipiddoppelschicht ist nahezu undurchlässig für Ionen, aber kleine ungeladene Moleküle wie H₂O und Gase wie N₂, O₂ und CO₂ können sie eigenständig durchdringen. Für einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen beiden Seiten einer biologischen Membran sind Proteine als weitere Funktionsträger in biologischen Membranen enthalten (Abb. 1.1) [6].

Diese Proteine erfüllen im Gegensatz zu den Lipiden nur eine geringe Stützfunktion. Sie sind jedoch ein wichtiger Bestandteil von biologischen Membranen, da sie eine Vielzahl von Aufgaben erfüllen. Sie übernehmen beispielsweise Aufgaben als Rezeptor für Signaltransduktionen, als Kanäle oder Pumpen zum Transport von Molekülen und Ionen oder als Enzyme. Man unterscheidet zwischen integralen, peripheren und lipidverankerten Membranproteinen. Membranproteine sind nach dem Flüssig-Mosaik-Modell (Abb. 1.2) von *Singer* und *Nicolson* nicht auf der Membran fixiert sondern frei in ihr beweglich [8].

Biologische Membranen sind asymmetrisch aufgebaut. Die ungleich verteilten Lipide und Proteine sorgen dafür, dass eine Lipiddoppelschicht geladen oder ungeladen sein kann. Beispielsweise befinden sich Glycolipide auf der extrazellulären Seite von Membranen, wo sie unter anderem für das Immunsystem wichtige Erkennungsmerkmale liefern (z.B. Blutgruppen und Rhesusfaktoren) [9].

Nicht nur die einzelnen Schichten einer biologischen Membran unterscheiden sich oft deutlich voneinander, auch die Membranen verschiedener Zellen und Organellen sind oft sehr unterschiedlich aufgebaut. So kommt z.B. in einer bakteriellen Membran kein Cholesterin vor und in mitochondriellen Membranen von Eukaryoten sind keine Glycolipide vorhanden [9].

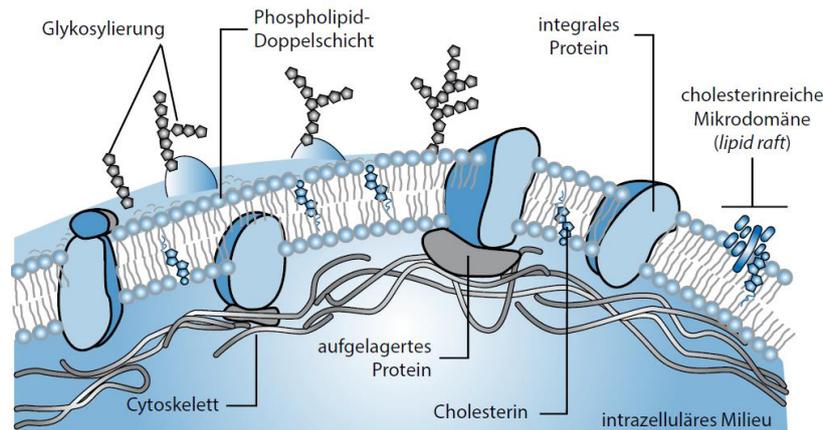


Abb. 1.2 Modell einer Zellmembran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell. Die Doppelschicht besteht aus einer zweidimensionalen Lösung gerichteter Lipide und globulärer Proteine. Lipide und integrale Proteine können lateral ungehindert diffundieren, sofern dies nicht durch spezifische Wechselwirkungen verhindert wird. Die transversale Diffusion läuft deutlich langsamer ab [9, 10].

1.2.2 Bakterielle Zellmembranen

Aufgrund des Aufbaus ihrer Zellwand können Bakterien in zwei Klassen eingeteilt werden: grampositive und gramnegative. Diese Bezeichnung ist zurückzuführen auf die von Hans Christian Gram 1884 entwickelte Methode zur differenzierten Färbung von Bakterien, die je nach Aufbau der Zellmembran unterschiedliche Ergebnisse liefert [11]. Die Zellmembran grampositiver Bakterien wird durch eine dicke Schicht aus Peptidoglykan (Murein), auch Zellwand genannt, umgeben. In ihr befinden sich Teichonsäuren, die auch als Lipoteichonsäuren bezeichnet werden, wenn sie kovalent an die Membran gebunden sind. Gramnegative Bakterien haben nur eine dünne Zellwand, die keine Teichonsäuren enthält, aber dafür eine zweite, asymmetrisch aufgebaute Membran, aus der Lipopolysaccharide in den extrazellulären Raum ragen (Abb. 1.3).

Bakterielle Membranen unterscheiden sich ansonsten durch Anzahl und Art der Lipide. Auf der Außenseite besitzen Bakterien Lipide mit vielen anionischen Kopfgruppen (hauptsächlich Phosphoglycerol), eukaryotischen Zellen besitzen jedoch hauptsächlich Lipide mit zwitterionische Kopfgruppen (z.B. Phosphoethanolamin und Phosphocholin).

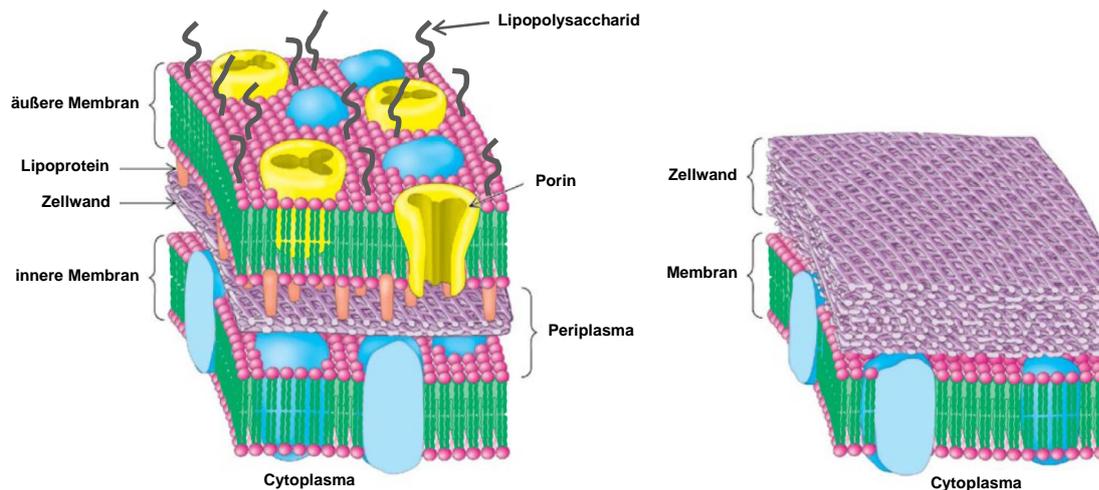


Abb. 1.3 Schematischer Aufbau von Zellwand und Zellmembran(en) von gramnegativen (links) und grampositiven (rechts) Bakterien. [9].

1.2.3 Modellmembranen

Zur Untersuchung von Peptiden mittels Zirkulardichroismus- (CD-), Kernspinresonanz- (NMR-) Spektroskopie oder Fluoreszenzmessungen wird im Experiment meist auf einfachere Modellmembranen zurückgegriffen. Eine naturgetreue Membran würde zwar der Komplexität membrangebundener Peptide Rechnung tragen, doch hierdurch kann die Interpretation der Messwerte deutlich erschwert werden. Als Lipide für Modellmembranen werden oft DMPC bzw. POPC, das als Grundgerüst der Membran fungiert, und DMPG bzw. POPG, das der Membran die typisch bakterielle negative Ladung verleiht, verwendet. Für eukaryotische Modellmembranen wird meist ein ungeladenes Lipid verwendet, dem Cholesterol zugesetzt wird um die Rigidität der Membran zu erhöhen.

Die Modellmembranen können für Messungen entweder als orientierte, anisotrope Doppelschicht (für die Festkörper-NMR- und OCD-Spektroskopie) oder als Vesikel (für die CD-Spektroskopie) präpariert werden. Multilamellare Vesikel (MLVs, *engl.* multilamellar vesicles) entstehen spontan, wenn die Lipide im Wasser suspendiert werden, aber kleine (SUVs, *engl.* small unilamellar vesicles) bzw. große unilamellare Vesikel (LUVs, *engl.* large unilamellar vesicles) müssen durch Ultraschallbehandlung oder Extrusion der MLVs erzeugt werden [12].

1.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) zeichnen sich als Teil der angeborenen Immunantwort dadurch aus, dass sie antimikrobielle Eigenschaften aufweisen, also das Wachstum von Bakterien hemmen oder diese abtöten. AMPs wurden in praktisch allen Organismen nachgewiesen [13]. Bereits 1939 wurden die ersten Antimikrobiellen Peptide (AMPs) durch René Dubos aus dem Bakterium *Bacillus Brevis* isoliert. Es handelte sich um die Peptide der Gramicidin-Familie (Gramicidin A, B, D) die ein breites Wirkspektrum gegen grampositive Bakterien zeigten [14, 15]. Anfang der 1940er Jahre wurde durch Georgyi Gause und Maria Brazhnikova ein weiteres antibakterielles Peptid, das Gramicidin S (Soviet), entdeckt, welche sich in Struktur und Wirkungsweise deutlich von Gramicidin A unterschied [16]. Die erfolgreiche Behandlung von infizierten Wunden bei Meerschweinchen zeigten den therapeutischen Nutzen dieser Peptide auf und führte schließlich dazu, dass Gramicidine die ersten kommerziell hergestellten AMPs wurden [16, 17]. Im Falle des Menschen, der sich wie alle anderen Lebewesen auch, ständig von mikrobiellen Infektionen bedroht ist war bereits lange bekannt, dass das adaptive Immunsystem ihn vor diesen Infektionen schützt. Warum aber können Pflanzen und Insekten, die nachgewiesener Weise kein adaptives Immunsystem besitzen, trotzdem weitgehend frei von Infektionskrankheiten leben? Ähnlich wie die bereits beschriebenen Prokaryoten stellen auch Eukaryoten AMPs her [18]. Als in den 1960er Jahren die ersten multiresistenten Keime auftraten wurde das Interesse an Wirtsabwehrmolekülen erneut geweckt [19]. Diese Notwendigkeit führte zum eigentlichen Anfang aller modernen Untersuchungen an AMPs [20]. Bereits 1962 wurde dann das erste tierische AMP, Bombinin, entdeckt, das aus dem Frosch *Bombina variegata* isoliert wurde [21]. In den späten 1970er Jahren und den 1980er Jahren wurden schließlich antimikrobielle Proteine aus Leukozyten isoliert und sequenziert, die heute als α -Defensine bekannt sind [22]. Die ersten α -helikalen AMPs wurden 1980 entdeckt, 1981 sequenziert, charakterisiert und umbenannt in Cecropine [23, 24]. Ein weiterer Meilenstein der AMP-Forschung war die Isolierung und Charakterisierung der Magainine durch Michael A. Zasloff im Jahre 1987. Diese ersten kationischen AMPs wurden auf der Haut des Krallenfroschs *Xenopus laevis* entdeckt und daher nach dem hebräischen Wort für „Schild“ benannt [25]. Mitte der 1990er wurde dann durch Brogden *et al.* auch die ersten anionischen AMPs identifiziert und charakterisiert [26]. Zu dieser Gruppe zählt auch das Dermcidin, beziehungsweise seine C-terminalen Peptide, welche 2001 durch Schittek *et al.* erstmals beschrieben wurden [5].

Antimikrobielle Peptide weisen nicht nur die unterschiedlichsten Sekundärstrukturmerkmale auf – es gibt sowohl α -helikale, β -Faltblatt und weitgehend unstrukturierte AMPs – sie variieren auch stark in ihrer Länge. Auch zyklische AMPs, beispielsweise wie Gramicidin S, sind bekannt und bereits Di- und Tripeptide können antimikrobiell aktiv sein [20]. Größere

AMPs erreichen Längen von bis zu 59 Aminosäuren, wobei der Übergang zu den noch größeren antimikrobiellen Proteinen fließend verläuft. Das Verhältnis zwischen hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren liegt meist bei 1:1 bis 1:2 [4]. Dies Verleiht AMPs einen amphiphilen Charakter und erlaubt ihnen an biologische Membranen zu binden. Hierbei weisen die unpolaren Seitengruppen der Peptide ins Membraninnere und die polaren Seitengruppen hin zur äußeren Umgebung. AMPs können sowohl kationisch (reich an Arg und Lys) als auch anionisch (reich an Asp und Glu) sein, wobei nur ca. 10 % aller AMPs anionisch sind. Da antimikrobielle Peptide über teilweise deutlich unterschiedliche Eigenschaften verfügen ist eine Unterteilung in unterschiedliche AMP-Klassen sinnvoll (Tab. 1.1) [27].

Tab. 1.1 Einteilung antimikrobieller Peptide in Klassen. Eine eindeutige Zuteilung zu genau einer Klasse ist nicht immer möglich [27].

Klasse	Prominente Vertreter
Anionische Peptide	Maximin H5, DCD-1L
Kationische lineare α -helikale Peptide	Cecropine, Magainine, LL37
Kationische zyklische Peptide	Gramicidin S
Kationische Peptide, die angereichert mit spezifischen Aminosäuren sind	Bac7, PR-39
Anionische und kationische Peptide, die Cysteine enthalten	Insekten-Defensine (Defensin A)
Anionische und kationische Peptidfragmente großer Moleküle	Lactoferricin (aus Lactoferrin)

AMPs werden entweder kontinuierlich exprimiert oder die Expression wird durch äußere Einflüsse wie Verletzungen und Infektionen stimuliert [28]. Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) vieler AMPs ist bei *in vitro* Experimenten oft deutlich höher als die Konzentration dieser AMPs in ihren natürlichen Umgebungen vermuten lässt. Diese Beobachtung kann allerdings dadurch erklärt werden, dass AMPs *in vivo* häufig hohe lokale Konzentrationen z. B. an Entzündungsherden erreichen [29]. Andere molekulare Komponenten die *in vivo* mit den entsprechenden AMPs vorliegen können ebenfalls synergistisch auf deren Aktivität wirken. Die Abwesenheit solcher Substanzen wäre eine andere Erklärung für hohe

beobachtete MHK-Werte [30]. So wurde beispielsweise die Synergie zwischen PGLa und Magainin 2 untersucht und deren Existenz eindeutig nachgewiesen [31].

AMPs sind evolutionär gesehen sehr alte Moleküle. Dennoch führen ihre andersartigen Wirkmechanismen, wie z. B. die direkte Interaktion mit und ihre hohe Selektivität gegen anionische Membranen dazu, dass sie auch weiterhin als Chance für die Entwicklung neuartiger antimikrobieller Wirkstoffe betrachtet werden [4].

1.4 Peptid-Membran-Interaktion von AMPs

Antimikrobielle Peptide können auf unterschiedliche Weise das bakterielle Wachstum hemmen oder Bakterien abtöten. Sie können z.B. intrazellulär angreifen und dort die Zellwandsynthese hemmen, Nukleinsäuren binden oder die Proteinbiosynthese hemmen. Sie können auch direkt mit der bakteriellen Membran interagieren und durch Porenbildung zum Absterben der Bakterien führen.

Es werden drei mögliche Orientierungen von α -helikalen Peptiden in Lipidmembranen beobachtet (Abb. 1.4). Peptide können oberflächlich gebunden sein (Abb. 1.4 A, S-Zustand, von *engl.* „surface“), sie können sich in die Membran neigen (Abb. 1.4 B, T-Zustand, von *engl.* „tilted“) oder die Membran senkrecht durchspannen (Abb. 1.4 C, I-Zustand, von *engl.* „inserted“) [32].

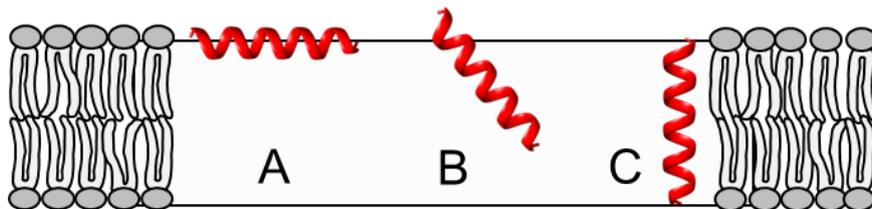


Abb. 1.4 Unterschiedliche Orientierungen eines α -helikalen Peptids in Lipidmembranen [32].

Die Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden zur Porenbildung auf Membranen können gut durch drei verschiedene Modelle (Abb. 1.5) beschrieben werden. Die Peptide besitzen in wässriger Umgebung häufig eine ungeordnete Struktur (Abb. 1.5 A). Erst beim Kontakt mit einer Lipiddoppelschicht bilden sich Sekundärstrukturen aus (Abb. 1.5 B, C) [12]. Beim Fassdauben-Mechanismus (*engl.*: barrel stave mechanism) lagern sich α -helikale Peptide zuerst an der Membranoberfläche zu einem Fass zusammen und tauchen dann in die Membran ein. Eine Pore bildet sich, wobei die polaren Seiten der Helices im Inneren der Pore liegen und die hydrophoben Seiten der Helices mit den Lipiden hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Nach dem Wurmloch-Mechanismus (*engl.*: toroidal wormhole

mechanism) tauchen die Peptide zuerst in die Membran ein und assemblieren erst dann zu einer oligomeren Pore. Im Teppich-Mechanismus (*engl.: carpet mechanism*) lagern sich sehr viele Peptide an der Oberfläche der Zellmembran an. Bei ausreichend hoher Konzentration kommt es dann zur Zusammenlagerung und ein anschließendes Eindringen in die Membran führt zur unspezifischen Zerstörung der Lipiddoppelschicht [12].

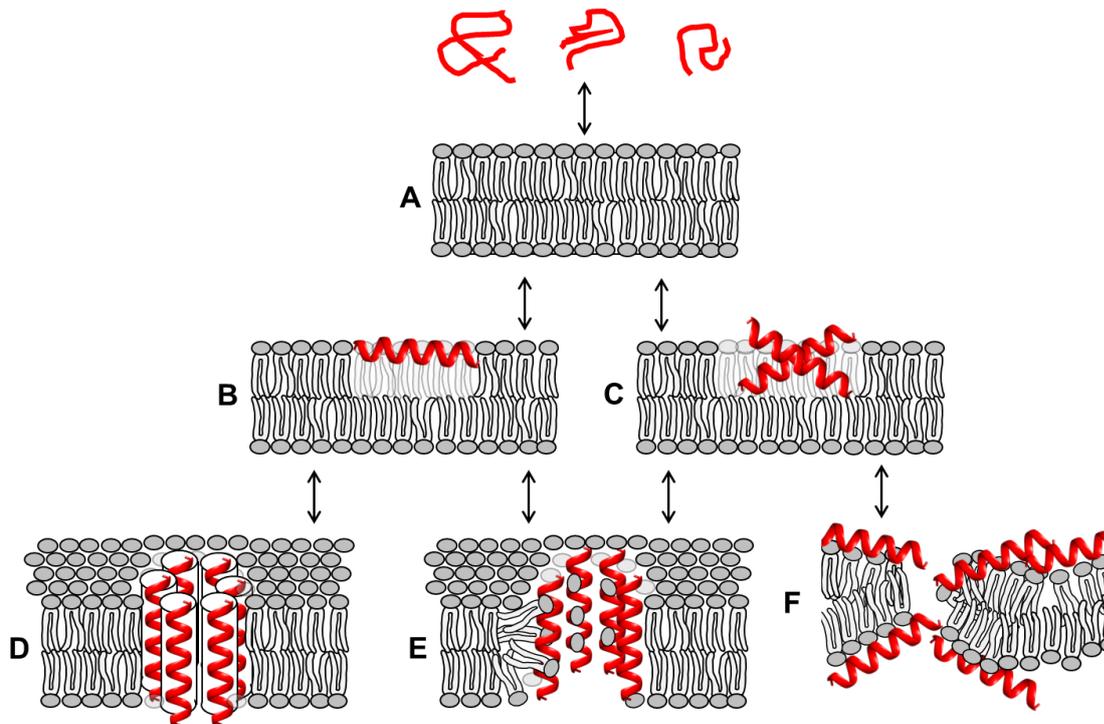


Abb. 1.5 Schematischer Überblick der Interaktionsmöglichkeiten zwischen helikalen antimikrobiellen Peptiden und Lipiddoppelschichten:

(A) Das Peptid ist in Lösung unstrukturiert und nähert sich der Membran. **(B)** Das Peptid bindet als Monomer an die Membran und bildet oberflächengebunden seine Sekundärstruktur aus. **(C)** Assemblierte Peptide auf der Membran können sich mittels Dimerisierung in die Membran neigen. **(D)** Nach dem Fassdauben-Mechanismus wird eine Pore durch die Membran gebildet. **(E)** Nach dem Wurmloch-Mechanismus werden membran-durchspannende Poren gebildet. Die polaren Kopfgruppen der Phospholipide können die positiven Ladungen der Peptide ausgleichen. **(F)** Nach dem Teppich-Mechanismus wird die Membran durch hohe lokale Peptidkonzentration geschädigt bzw. vollständig lysiert [12].

Poren oder vergleichbare Schädigungen der Zellmembran führen zum Ausfluss von Inhaltsstoffen aus der Zelle oder zum Eindringen von unerwünschten Substanzen in die Zelle. Auch ein Zusammenbruch des Membranpotentials, durch unkontrollierte Diffusion von Ionen, kann zum Erliegen von lebenswichtigen Prozessen und letzten Endes zum Zelltod führen [12].

1.5 Dermcidin und dessen abgeleitete Peptide

Das Epithel multizellulärer Organismen stellt eine Barriere zur Umgebung dar und ist somit die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen.

Als Teil des angeborenen Immunsystems beteiligen sich antimikrobielle Peptide im Epithel an der Verteidigung des Organismus. Meist kontrollieren diese Peptide das mikrobielle Wachstum in den ersten Stunden nach einer Verletzung des Epithels oder während der Wundheilung. Sie sind vorwiegend an Entzündungsprozessen der Haut involviert [5].

In der Haut von Säugetieren waren bis zum Beginn dieses Jahrtausends hauptsächlich zwei Klassen von antimikrobiellen Peptiden bekannt: Cathelicidine und β -Defensine. Diese werden in menschlichen Keratinozyten nach einer Induktion durch Entzündungsstimuli exprimiert und funktionieren primär als Antwort auf eine Verletzung [5].

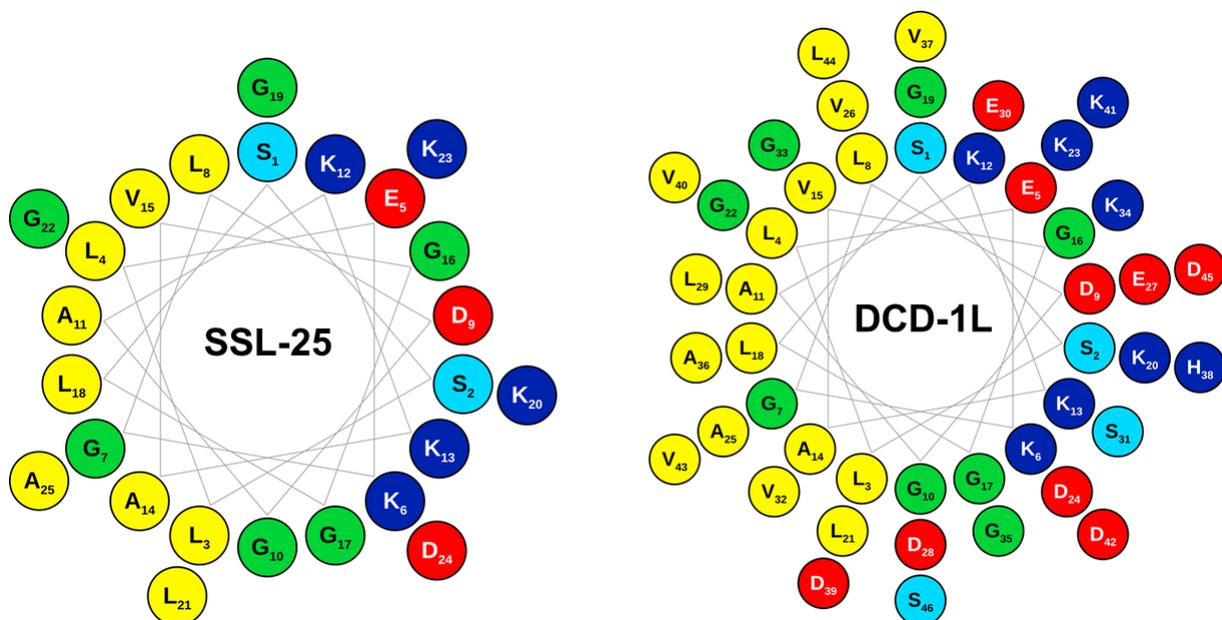
Dermcidin (DCD) wurde Anfang dieses Jahrhunderts im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Birgit Schittek (Universität Tübingen) in menschlichem Schweiß entdeckt. Es zeigte keinerlei Homologie zu bereits bekannten AMPs. Das Peptid wird spezifisch in ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert, in den Schweiß sezerniert und so auf die epidermale Oberfläche transportiert [5]. Im Schweiß liegen mehrere von DCD-1L (C-Terminus von DCD, 48-mer, anionisch) abgeleitete, C-terminal durch Peptidasen prozessierte Peptide wie beispielsweise DCD-1 (47-mer, anionisch) oder SSL-25 (25-mer, kationisch) vor, die sich in Länge und Ladung unterscheiden (Tab. 1.2) [5, 33].

Tab. 1.2 Aminosäuresequenzen einiger Peptide der DCD-Familie. Das Peptid DCD-1L besteht aus den 48 C-terminalen Aminosäuren der DCD-Sequenz. DCD-1 fehlt der letzte Leucinrest und SSL-25 fehlen die letzten 23 Reste der DCD-1L-Sequenz [5].

Peptid	Aminosäuresequenz	Molare Masse / Da
DCD	MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS NGPCHEASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLGKDAVED LESVGKGAVH DVKDVLDSVL	11283,8
DCD-1L	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSL	4818,5
DCD-1	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV	4705,3
SSL-25	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA	2412,8

Einige dieser von DCD abgeleiteten Peptide zeigen antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen. Die am häufigsten in Schweiß vorgefundenen Dermcidin-

Derivate sind die anionischen Peptide DCD-1L und DCD-1 [5, 34]. Diese antimikrobiell aktiven Peptide töten grampositive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*) und gramnegative Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium*) sowie *Candida albicans* [5, 35-38] ab. DCD-1(L) behält seine antimikrobielle Aktivität über ein breites pH-Spektrum und bei hohen Salzkonzentrationen, wie sie in menschlichem Schweiß vorherrschen, bei [5]. Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass DCD-1L zur seltenen Gruppe der anionischen AMPs gehört legt die Vermutung nahe, dass der Funktionsmechanismus von DCD-1(L) sich deutlich von bekannten kationischen AMPs unterscheiden könnte [39]. DCD-Peptide inhibieren die bakterielle Synthese von Makromolekülen, RNA und Proteine, ohne jedoch an DNA oder RNA zu binden. Die Analyse der publizierten Abtötungskinetik zeigt ein schnelles Abtöten der Bakterien innerhalb von 30-60 min gefolgt von Membrandepolarisation [40]. Von Dermcidin abgeleitete Peptide binden an Bestandteile der Zellhülle von grampositiven und gramnegativen Bakterien und an artifizielle Membranen. In Bindungsstudien ermittelten Senyurek et al., dass DCD-1L zwar an die Zellhülle bindet, jedoch nur schwache Bindung an wichtige Bestandteile dieser Zellhülle, wie Lipopolysaccharide (LPS) aus gramnegativen Bakterien, oder Lipoteichonsäuren (LTA) aus grampositiven Bakterien zeigt [40]. Während DCD-1L in Lösung weitgehend unstrukturiert ist, nimmt es in gebundener Form eine α -helikale Struktur an. Daher ist auch die Veranschaulichung in einer Helikalen-Rad-Darstellung (Abb. 1.6) legitim.



In Schweiß sezerniertes DCD-1L unterläuft weitere Prozessierungsschritte. Zunächst wird das C-terminale Leu von einer Carboxypeptidase abgespalten und das so entstandene Peptid wird als DCD-1 bezeichnet. Nun kann eine Abspaltung des N-terminalen Tripeptids SSL erfolgen, was zur Bildung eines LEK-Peptides führt. Da diese Peptide nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren, werden die weiteren Prozessierungsschritte der LEK-Peptide aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht diskutiert. Weitere C-terminale Abspaltungen durch eine Carboxypeptidase führen zu den Peptiden SSL-46 und SSL-45. Cathepsin D spaltet nun zwischen Leu29 und Glu30 führt zu SSL-29, welches in einem letzten Schritt zu SSL-25 prozessiert wird. Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob dieser letzte Schritt durch eine noch unbekannte Endoprotease oder durch sukzessive Spaltung einer Carboxypeptidase erfolgt. Das Fehlen der Peptide SSL-28, SSL-27 und SSL-26 im Schweiß legt jedoch nahe, dass wahrscheinlich eine Endoprotease verantwortlich ist [42].



Abb. 1.7 Abfolge der postsekretorischen Prozessierung von DCD-1L in menschlichem Schweiß [42].

Proteasen aus *S. aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* zeigten nur begrenzte Aktivität gegen DCD-Peptide unter physiologischen Bedingungen [43]. Diese Eigenschaft ermöglicht eine Anwendung in der forensischen Diagnostik [44]. Es wird angenommen, dass DCD-Peptide spezielle Mechanismen ausbildeten, um selbst in Protease-reichen Umgebungen wie dem menschlichen Schweiß Degradationen auch für Wochen zu umgehen [33].

Zunächst konnten zwar noch keine Hinweise für eine Membranpermeabilisierung durch DCD-1L erbracht werden [38], jedoch wurden diese Untersuchungen mit recht großen Fluorophoren wie Propidiumiodid durchgeführt und kleine Kanäle in Membranen würden hierbei unbemerkt bleiben. Nach der Interaktion mit der bakteriellen Membran bilden sich oligomere Komplexe, welche in die Membran insertieren, Ionenkanäle ausbilden und schließlich zum Zelltod führen. Morphologische Veränderungen bakterieller Oberflächen nach der Behandlung mit DCD-1L konnten mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) nachgewiesen werden [45].

Kationische AMPs sind dafür bekannt, dass sie bevorzugt an anionische bakterielle Oberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen binden. DCD-1(L) zeigt trotz negativer Gesamtladung eine ähnliche Affinität. Dies lässt sich damit erklären, dass die kationische N-terminale Region (Aminosäure 1-23) hauptsächlich für die Bindung des DCD-1(L) an bakterielle Membranen verantwortlich ist.

In der Aminosäuresequenz von DCD-1L wurde ein Ladungsreißverschluss-Motiv erkannt, welches über die Ausbildung von intra- bzw. intermolekularen Salzbrücken eine Rückfaltung oder Oligomerisierung begünstigen könnte. Eine durchgängige DCD-1L-Helix wäre etwa doppelt so lang wie ein durchschnittlicher Membrandurchmesser. Daher postulierten Walther *et al.* (2013), dass der vorwiegend kationische N-Terminus von DCD-1L (23 Aminosäuren) sich auf den vorwiegend anionischen C-Terminus (25 Aminosäuren) zurückfaltet und eine helikale Haarnadelstruktur ausbildet. Durch Ausbildung von sieben intra- und intermolekularen Salzbrücken würden die Ladungen kompensiert werden und so eine Membraninsertion des Peptids ermöglichen [46].

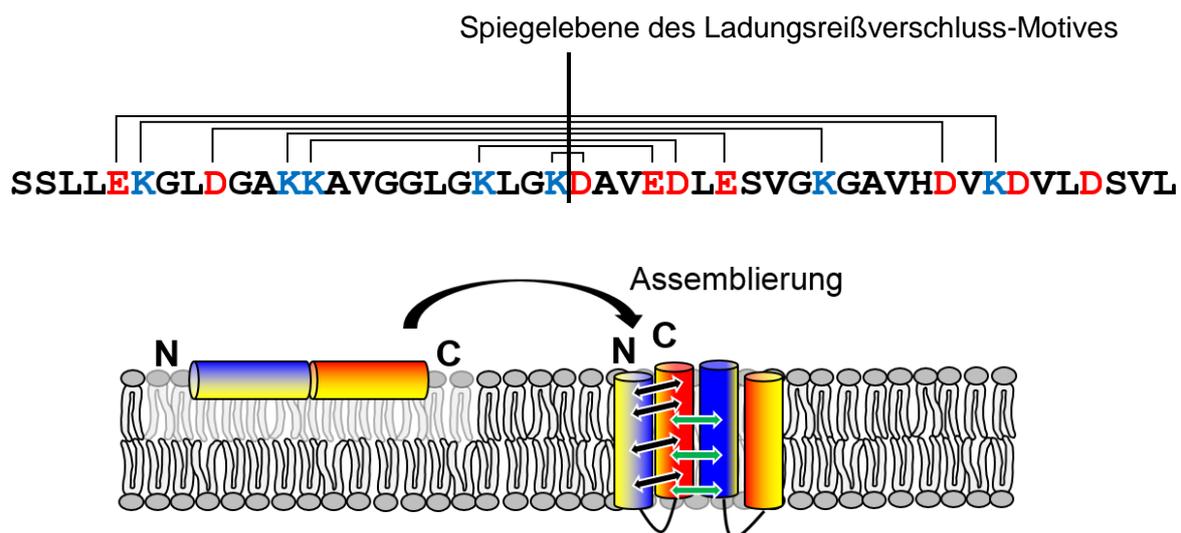


Abb. 1.8 Aminosäuresequenz von DCD-1L mit eingezeichnetem Ladungsreißverschluss-Motiv (oben) und vorgeschlagener Mechanismus der Assemblierung zu einer antimikrobiellen Pore (unten). Diese wird durch intramolekulare (schwarze Pfeile) und intermolekulare (grüne Pfeile) Salzbrücken stabilisiert [46].

Andere Assemblierungen wurden ebenfalls diskutiert [39]: Zum einen postulierten Paulmann *et al.* und Walther *et al.* eine Membraninsertion, bei der lediglich der N-Terminus von DCD-1L die Membran durchspannt und die C-Terminale Region, stabilisiert durch Zn^{2+} , auf der Membran oberflächlich gebunden vorliegt (siehe Abb. 1.9, oben) [45, 46]. Zum anderen wurde publiziert, dass DCD-1L im Kristall als Hexamer vorliegt und in Membranen Poren ausgebildet. Aufgrund der Länge der DCD-1L-Helix läge eine solche Pore schräg in der Membran (Abb. 1.9, unten) [47].

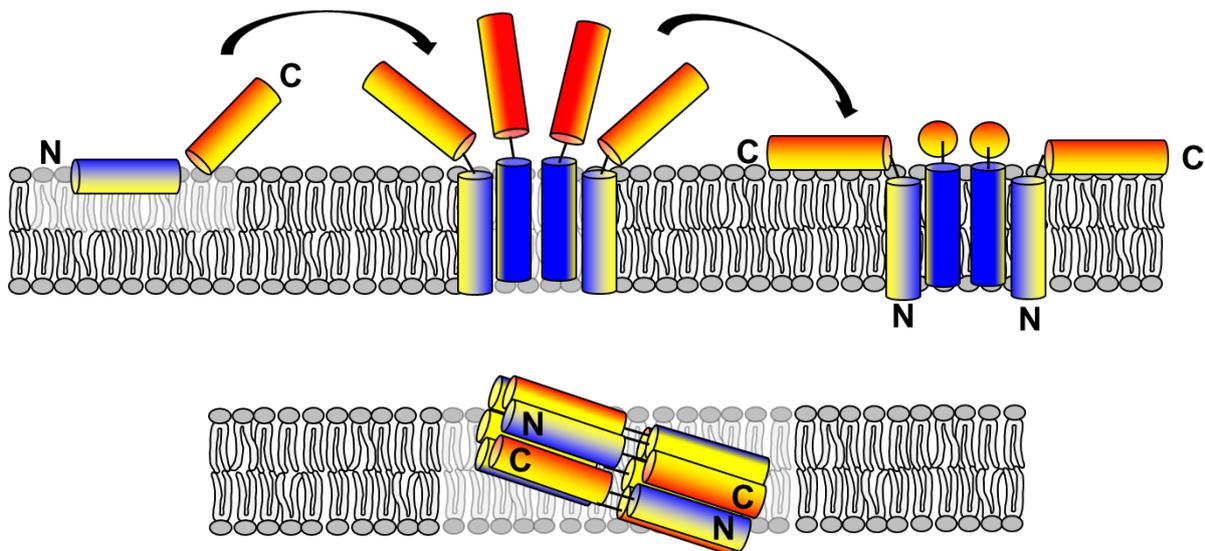


Abb. 1.9 Weitere Möglichkeiten der DCD-1L-Assemblierung. Lediglich der N-Terminus von DCD-1L durchspannt die Membran, während die C-Terminale Region, stabilisiert durch Zn^{2+} -Ionen (in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt), auf der Membran oberflächlich gebunden vorliegt (oben). Alternativ wurde gefunden, dass DCD-1L im Kristall als Hexamer vorliegt und in Membranen Poren ausgebildet, bei dem es schräg in der Membran vorliegt (unten) [45-47].

1.6 Wege in die Zelle

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben ist die Zellmembran keine unbewegliche Barriere, sondern besitzt eine dynamische Struktur. Sie grenzt die Zelle von der Umgebung ab und durch sie kann der Ein- und Austritt von Ionen und Molekülen geregelt werden. Sehr kleine Moleküle können die Zellmembran durch Diffusion durchqueren, sofern ihre Ladung und ihre Polarität mit der Membranzusammensetzung kompatibel sind. Andere Moleküle, die für den Stoffwechsel der Zelle unerlässlich sind wie z. B. Aminosäure oder Zucker, gelangen über Membrankanäle oder Transporter in die Zelle. Ionen überwinden mittels Ionenpumpen die Zellmembran (Abb. 1.1 rechts). Makromoleküle können in der Regel nur durch Endozytose die Membranbarriere überwinden. Allgemein beschreibt der Ausdruck Endozytose viele unterschiedliche Mechanismen, die aber grob in zwei große Kategorien unterteilt werden kann: Phagozytose (*griechisch: phagein* „fressen“ und *cýtos* „Zelle“), das Zellfressen, ist die aktive Aufnahme von Partikeln bis hin zu anderen Zellen, während Pinozytose (*griechisch: pinein* „trinken“), das Zelltrinken, die Aufnahme von gelösten Molekülen beschreibt [48]. Auf eine ausführliche Beschreibung aller endozytotischen Vorgänge wird hier verzichtet, da die Untersuchung dieser Mechanismen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.7 Zellpenetrierende Peptide

Um membranundurchlässige Moleküle in eine Zelle zu verbringen wurden bereits verschiedene chemische und physikalische Methoden wie die Hitzetransformation oder die Elektroporation entwickelt. Diese Methoden stören jedoch die Zellmembran zumindest temporär und können so zu erheblichen Nebenwirkungen für die Zellen führen. Zellpenetrierende Peptide (*engl.* cell-penetrating peptides, CPPs) können jedoch die Zellmembran eigenständig durchqueren, ohne die Stabilität der Membran nachhaltig zu beeinträchtigen. Die Aufgabe der meisten CPPs ist es, eine biologisch relevante Fracht (*engl.* Cargo) in Zellen einzuschleusen. In der Vergangenheit wurden für CPPs auch die Ausdrücke Proteintransduktionsdomäne (PTD), Trojanische Peptide oder Membrantranslokationssequenzen (MTS) verwendet [49].

Ende der 1980er Jahre bzw. Anfang der 1990er Jahre wurde das bis dahin vorherrschende Postulat über die Undurchlässigkeit der Zellmembran für Proteine und Peptide revidiert [50]. 1988 wurde in zwei unabhängigen Publikationen gezeigt, dass das HIV-Tat Transaktivatorprotein HIV-1 Membranbarrieren überwinden kann [51, 52]. 1991 berichtete die Gruppe um Alain Prochiantz (Collège de France, Paris) über die zelluläre Aufnahme einer Homeodomäne aus Tauffliegen gefolgt von der Beschreibung des Penetratins (1994), welches für die eigentliche Translokation der Domäne verantwortlich war [53, 54].

Heute beinhalten CPPs eine große Familie von Peptiden, die sich in Länge, Ladung, Hydrophobizität, Löslichkeit, und weiteren Eigenschaften unterscheiden [55]. Auf den ersten Blick haben diese Peptide nur wenig gemein außer ihrer Fähigkeit exogene Moleküle in Zellen zu überführen. Ihre diverse Natur erschwert nicht nur eine exakte Definition, auch die Unterteilung in einzelne Klassen gestaltet sich schwierig. Erste einfache Versuche der Klassifizierung fanden nach dem Ursprung der jeweiligen Peptide statt. Es wurde nach von Proteinen abgeleiteten Peptiden und nach synthetischen Peptiden unterschieden, mit der Gruppe der chimären Peptide (teils synthetisch, teils von Proteinen abgeleitet) dazwischen [55]. Diese Klassifizierung mag zwar gut sein um die Bedeutung des Zellpenetrationsphänomens zu verstehen, sie erlaubt jedoch keine Korrelation zwischen den Eigenschaften der CPPs und ihrer der Interaktion mit Lipidmembranen. Daher wurden CPPs nach ihren physikochemischen Eigenschaften gruppiert: Man unterscheidet zwischen kationischen, anionischen, amphipathischen und hydrophoben CPPs (Tab. 1.3). Diese Einteilung korreliert gut mit den Interaktionsmustern der Peptide mit Membranen und anderen Zellstrukturen. Die meisten CPPs dieser Gruppen, mit Ausnahme der anionischen CPPs, besitzen unter physiologischen Bedingungen eine positive Gesamtladung. Anionische CPPs treten hingegen sehr selten auf. Um die kationischen CPPs von den amphipathischen und den hydrophoben CPPs abzugrenzen zeichnen sich kationische CPPs durch einen

kontinuierlichen Abschnitt aus basischen Aminosäuren (Arg, Lys) aus. Daher sollte bei kationischen CPPs stets diese Region für die eigentliche Zellaufnahme des Peptides verantwortlich sein. Das erste entdeckte zellpenetrierende Peptid HIV-1 fällt in diese Kategorie. Es besitzt eine Sequenz aus 8 basischen Aminosäuren (Tab. 1.3) und wurde zum Prototyp kationischer CPPs. Seine 8 positiven Ladungen stellen das Minimum für effektiv translozierende kationische CPPs dar [56]. Aus dieser Erkenntnis folgten ausgiebige Untersuchungen dieser Peptidgruppe und vieler verwandten Peptide, welche ebenfalls DNA/RNA-Bindung zeigen, wie beispielsweise Oligoarginine. Diese translozieren erheblich besser als die entsprechenden Oligolysine derselben Länge. Ab einer Länge von 8 Argininen (R8) werden diese Peptide effektiv in Zellen aufgenommen. Mit zunehmender Länge werden sie effektiver aufgenommen, da jedoch mit zunehmender Länge die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wird sind die optimalen Längen dieser Sequenzen R8-R10 [57]. Diese polykationischen Abschnitte sind allgemein üblich in DNA-, RNA- und Heparin-bindenden Proteinen aus allen Gattungen, von Viren bis zu Säugetieren, und stellen somit eine reiche Quelle für CPP-Sequenzen dar [58].

Amphipatische CPPs besitzen zwei unterschiedliche Seitenflächen. Eine Seite ist typischerweise positiv geladen oder zumindest hydrophil und die andere Seite ist hydrophob. Mit ca. 40 % stellen amphipatische CPPs die größte Gruppe aller CPP-Sequenzen dar. Zu dieser Gruppe gehören ebenfalls einige Peptide mit negativer Gesamtladung [55]. Eine weitere Einteilung der amphipatischen CPPs erfolgt in primäre und sekundäre amphipatische CPPs anhand ihrer Länge, Sequenz und Bindung an Lipide [59]. In primären amphipatischen CPPs (paCPPs) sind die Regionen mit dem unterschiedlichen Charakter entweder durch die Primärstruktur des Peptides voneinander getrennt oder durch eine stabile Sekundärstruktur wie beispielsweise die α -helix des TP10. Sekundäre amphipatische CPPs (saCPPs) hingegen sind in Lösung nicht strukturiert. Sie entwickeln ihren amphipatischen Charakter erst wenn sie aufgrund einer Membraninteraktion ihre Sekundärstruktur annehmen [60]. Primäre amphipatische CPPs sind im Allgemeinen länger als kationische oder sekundäre amphipatische CPPs und besitzen meist Sequenzen von 20 Aminosäuren oder mehr. Sie binden stark an anionische und neutrale Membranen und sind theoretisch lang genug um den hydrophoben Teil der Membran zu durchspannen. Sie können in Lipidmembranen insertieren und diese stören oder Lipide umordnen. Die meisten saCPPs sind synthetischen oder chimären Ursprungs, jedoch konnten auch vereinzelt Sequenzen aus Proteinen isoliert werden. Die saCPPs bilden meist nach der Assoziierung mit einer anionischen Membran eine α -Helix aus. Hierbei bilden sich eine polare und eine hydrophobe Seite aus. Diese Regionen lassen sich mit Hilfe der Helikalen-Rad-Projektion gut unterscheiden. Auch viele AMPs, darunter SSL-25 und DCD-1L weisen solche Eigenschaften auf. (Siehe Kapitel 1.4 und 1.5) Typische saCPPs wie beispielsweise MAP sind jedoch meist kürzer. Trotz ihrer

amphipatischen Struktur insertieren die meisten saCPPs nicht tief in Membranen und verursachen im Allgemeinen weniger Membranstörungen als paCPPs. Obwohl viele CPPs amphipatisch sind, weisen nur wenige amphipatische Peptide zellpenetrierende Eigenschaften auf [50].

Hydrophobe CPPs (hCPP) kommen neben anionischen CPPs nur recht selten vor. Sie bestehen entweder nur aus hydrophoben Aminosäuren oder sie besitzen nur sehr wenige, typischerweise kationische, Aminosäuren. Sie wurden bisher nur selten zum Transport eingesetzt. Eine prominente Ausnahme stellt der Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor K-FGF (Tab. 1.3) dar, welcher bereits erfolgreich für Proteineinschleusung eingesetzt wurde [61].

Tab. 1.3 Einteilung von CPPs in verschiedene Klassen [50].

Klasse	Typische Vertreter	Sequenz
Kationische Peptide	HIV-1 pTat(49-57) Polyarginin	RKKRRQRRR (R) _n , n=6-12
Amphipathische Peptide	Pep-1 TP10 MAP	KETWWETWWTEWSQPKKRKV AGYLLGKINLKALAALAKKIL KLALKALKALKAALKLA
Hydrophobe Peptide	Pept1 K-FGF	PLILLRLLRGQF AAVLLPVLLAAP
Anionische Peptide	SAP(E) MAP12	VELPPPVELPPPVELPPP LKTLTETLKELTKTLTEL

Theorien darüber wie es CPPs gelingt Zellmembranen zu überwinden, wurden nach und nach entwickelt, diskutiert und neuen Erkenntnissen angepasst. Zwischen den beiden Pfaden - direkter Zellpenetration/Translokation und Endozytose - zu unterscheiden, sollte unmittelbar möglich sein: So sollte die direkte Penetration fluoreszenzmarkierter Peptide eine uniforme Markierung des Zellinneren zur Folge haben, während über Endozytose aufgenommene Peptide granulare, punktförmige Muster aufgrund der vesikulären Einschlüsse zeigen sollten. Jedoch konnten in einigen Fällen beide Mechanismen in Experimenten mit ähnlichen Bedingungen und denselben Zellen für ein und dasselbe Peptid beobachtet werden. So kann eine Erhöhung der Peptidkonzentration die Translokation von R8 in HeLa-Zellen von Endozytose zu direkter Translokation verändern [62]. Dieses Verhalten zeigt die Flexibilität von CPPs sich auch veränderten Umweltbedingungen anzupassen und gegebenenfalls sogar ihren Translokationsmechanismus zu verändern. Im Allgemeinen ist jedoch der Translokationsmechanismus eines CPPs ein komplexer Prozess,

der beispielsweise von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Peptids selbst, von der assoziierten Fracht, vom Zelltyp in den transloziert wird, also von dessen Zellmembran und seiner extrazellulären Matrix, abhängen kann. Weitere Faktoren wie Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert spielen ebenfalls eine Rolle [63].

Die Endozytose von CPPs besteht aus zwei Schritten, dem endozytischen Eintritt und dem endosomalen Austritt. Letzterer ist entscheidend um Degradation in Lysosomen zu vermeiden und so der Fracht zu erlauben ihr Ziel zu erreichen bzw. seine biologische Aktivität auszuüben. Die genauen Bedingungen des endosomalen Austritts sind noch weitgehend unbekannt [63].

Die direkte Translokation beinhaltet die Destabilisierung der Plasmamembran durch energie- und temperaturunabhängige Vorgänge. Zunächst als Mechanismus für alle CPPs beschworen, wurde sie als später nur noch als Artefakt der Zellfixierung angesehen. Wenig später wurde sie durch Fluoreszenzexperimente an Zellen bei 4 °C bewiesen, da bei tiefen Temperaturen keine Endozytose mehr stattfinden kann. Von einigen Hypothesen, wie CPPs dies bewerkstelligen wurden berichtet, einen allgemeingültigen Mechanismus scheint es allerdings nicht zu geben. Die drei meistuntersuchten Mechanismen sind die Ausbildung von invertierten Micellen, die Porenbildung durch transmembrane Insertion und die Adaptive Translokation. Diese Mechanismen sind in Abb. 1.10 dargestellt [63].

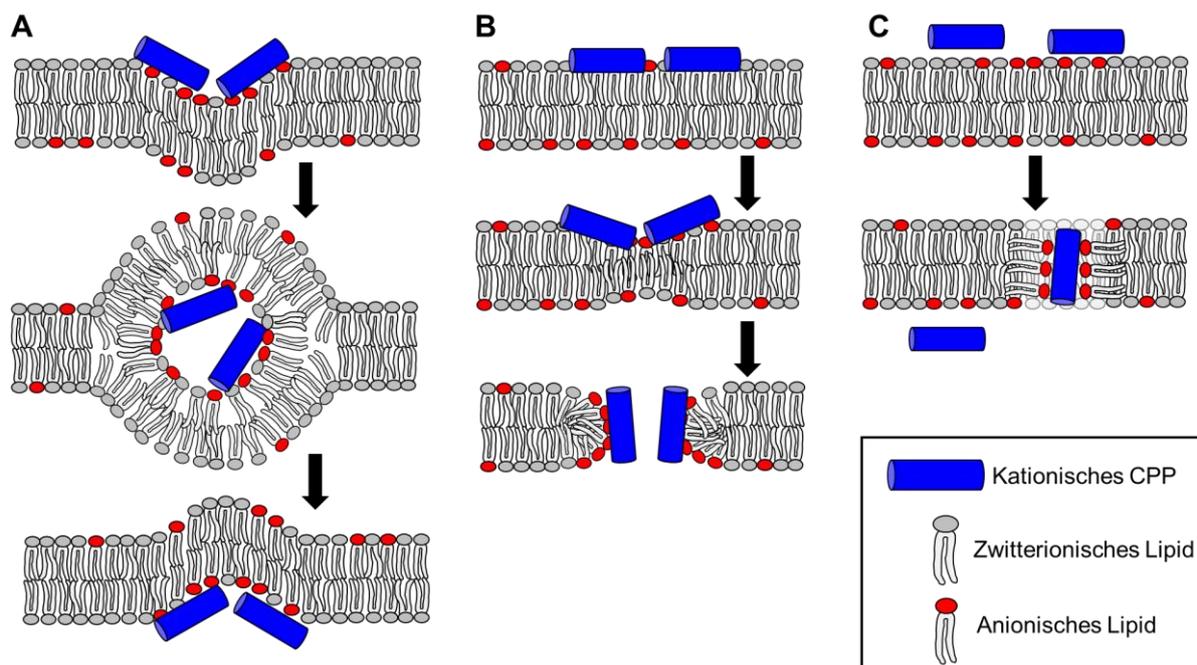


Abb. 1.10 Beispiele für vorgeschlagene Mechanismen der direkten Translokation. (A) Die Bildung einer inversen Micelle. (B) Porenbildung. (C) Adaptive Translokation [63].

CPPs der zweiten Generation unterscheiden sich von den oben beispielhaft erwähnten klassischen CPPs durch die Modifikation ihrer Sequenz mit kleinen organischen Molekülen, durch die Verwendung nicht-ribosomaler Aminosäuren oder durch zusätzliche Stabilisierung ihrer Struktur durch nicht-peptidische Bindungen. Diese Derivatisierungen verleihen den CPPs der zweiten Generation einige Vorteile gegenüber den klassischen CPPs erster Generation. So kann die Effektivität des Transports von CPPs durch die Kupplung von Fettsäuren an den N-terminus deutlich erhöht werden. Die bisher erfolgreichste Modifikation hierbei war die Kupplung von Stearinsäuren [50].

Die Prenylierung von Proteinen, d. h. die Kupplung von Farnesyl-(C15) oder Geranylgeranyl-(C20)Isoprenoiden an den C-Terminus ist eine übliche hydrophobe posttranslationale Modifikation die bei ca. 2% aller Säugetierproteine vorkommt. Auf diese Weise werden viele Proteine in der Plasmamembran verankert. Dieselbe Modifikation des C-Terminus kann auch einigen Peptiden zellpenetrierende Eigenschaften verleihen, die ohne diese Modifikation nicht dazu in der Lage waren. Die Translokation solcher Peptide soll direkt ins Cytosol erfolgen und unabhängig von ATP-Verbrauch und Endozytosemechanismen erfolgen [64, 65].

Um α -helikale Peptide zu stabilisieren können zwei in der Helix übereinanderliegende Aminosäuren mit hydrophoben chemischen Gruppen verknüpft werden. Diese Gruppe von Peptiden wird als gestapelte Peptide (*engl.* stapled peptides) bezeichnet [66, 67]. Solches „Stapeln“ erhöht die Affinität vieler Peptide zu anderen Proteinen und erlaubt oft die Aufnahme in Zellen [68]. Obwohl diese Modifikation Peptide nicht garantiert zu CPPs macht, werden doch die meisten dieser Peptide zellpenetrierend. Ein gutes Beispiel für die Anwendung solcher Peptide ist die Aktivierung des p53-Tumor-Unterdrückungs-Proteins durch SAH-8 [66] und durch sMTide-Peptide [68].

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Untersuchung der membrangebundenen Form und die Aufklärung der Funktion von Dermcidin-Peptiden, insbesondere DCD-1L und SSL-25.

Hierzu waren verschiedenste Analoga zu synthetisieren, die jeweils in den entsprechenden Untersuchungstechniken zur Strukturaufklärung (CD-, OCD- und Festkörper-NMR) bzw. zur Funktions- und Interaktionsanalyse (Biologische Testverfahren und Fluoreszenzspektroskopie) verwendet werden sollten.

Die Sekundärstruktur sowie die Orientierung von DCD-1L sollte in membrangebundenem Zustand charakterisiert werden, ein besonderes Augenmerk lag hier unter anderem auf der Rolle von 2-wertigen Ionen, vor allem Zn^{2+} -Ionen.

Ein weiteres Ziel stellte die Untersuchung des Ladungsreißverschluss-Motives im DCD-1L Molekül dar, da postuliert worden war, dass durch ein solches Motiv das an sich sehr polare Peptid durch komplementäre Kompensation der geladenen Seitenketten in einer hydrophoben Membran stabil assemblieren kann.

Die antimikrobielle Wirkung sollte sowohl mit etablierten wie auch mit modifizierten mikrobiologischen Tests und fluoreszenzspektroskopischen Verfahren untersucht werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob durch geringe aber gegebenenfalls durchaus einflussreiche Modifikationen der Sequenzen, die in der Literatur beschrieben, teils unterschiedlich bestimmten antimikrobiellen Aktivitäten erklärt werden können. Darüber hinaus sollte eine gegebenenfalls indirekte Wirkung über die Induktion einer Immunantwort an Makrophagen untersucht werden.

Aufgrund teilweise überlappender Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) und zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) sollte auch die zellpenetrierenden Eigenschaften von DCD-1L und einiger Analoga untersucht werden. Hierzu waren Translokationsexperimente an Lipidvesikeln und im Falle positiver Ergebnisse auch an lebenden Zellen durchzuführen. Hinzu kamen Experimente zum Einfluss von zweiwertigen Ionen, insbesondere Zn^{2+} -Ionen, da von letzteren bereits bekannt war, dass diese für Strukturbildung und Funktion essentiell zu sein scheinen.

3. Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind im Anhang (Kapitel 9.2) aufgeführt. Theoretische Hintergründe zu vielen im Folgenden aufgeführten Methoden können im Anhang (Kapitel 9.1) nachgelesen werden.

Extern durchgeführte Experimente

Da unser Labor auf bakterielle Inkubationen spezialisiert ist, wurden alle Experimente an eukaryotischen Zellen in den Labors unserer Kooperationspartner durchgeführt. Diese Einrichtungen befanden sich alle in Instituten des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT).

- Die Arbeiten mit Tabakzellen wurden am Botanischen Institut im Arbeitskreis von Prof. Dr. Nick von Dr. Ningning Gao, Dr. Jan Maisch oder Irina Peshatova ausgeführt.
- Die Experimente mit RAW Makrophagen zur Untersuchung der Immunantwort fanden am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) im Arbeitskreis von Dr. Carsten Weiss unter Anleitung von Dr. Silvia Diabaté und Regina Fertig statt. Die Kultivierung der Zellen wurde von Dorit Mattern übernommen.
- Die Experimente mit HaCaT-Zellen fanden am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) im Arbeitskreis von Dr. Cornelia Lee-Thedieck statt. Die Experimentelle Arbeit, die Kultivierung der Zellen, deren Inkubation und die Mikroskopischen Arbeiten, wurde von Saskia Kraus übernommen.

3.1 Festphasenpeptidsynthese

3.1.1 Kupplungen

3.1.1.1 Synthese des DCD-1L Wildtyps

Die Synthese des DCD-1L Wildtyps wurde vollständig an einem multiplen Peptidsynthesizer (Syro II) durchgeführt. Es wurde eine standardisierte Fmoc-Synthesestrategie benutzt [69].

Die Aminosäuresequenz des Peptids wurde in das Steuerprogramm des Synthesizers eingetragen, wobei die letzte Aminosäure (im Fall von DCD-1L Leu⁴⁸) weggelassen wurde, da diese bereits an die verwendeten Harze gekuppelt war. Es wurde ein niederbeladenes Fmoc-Leu-Wang-Harz (Abb. 3.1).

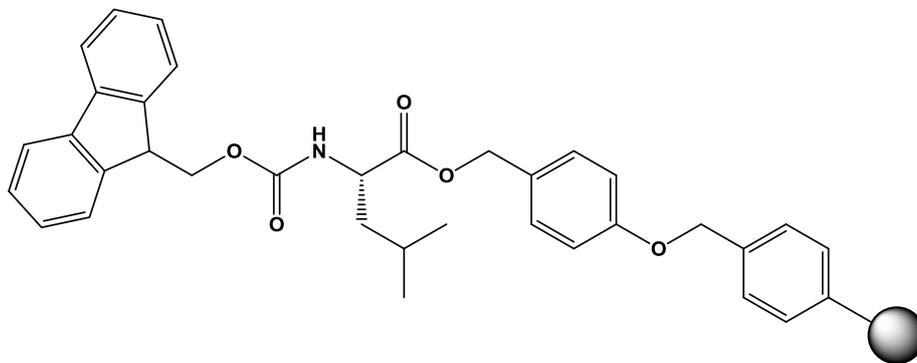


Abb. 3.1 Die Ausgangssubstanz für die Synthese von DCD-1L war ein niederbeladenes (low load) Fmoc-Leu-Wang Harz.

Von den Harzen (Beladung: 0,35 - 0,28 mmol/g) wurde jeweils 100 μ mol für SSL-25 und 50 μ mol für DCD-1L in 10 mL Reaktionsgefäße eingewogen und für 1-2 h in DMF aufquellen lassen. Das Steuerprogramm berechnete die benötigten Mengen an Reagenzien. Diese wurden vor der Synthese in die vorgeschriebenen Gefäße des Synthesizers gefüllt. Von den benötigten Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden 0,57 mol/L Lösungen in DMF hergestellt. Als Aktivierungs-Reagenz diente eine Mischung aus DIPEA und NMP (2:3 v/v). Zum Entschützen wurde eine 20%ige Piperidin-Lösung in DMF verwendet. Als Waschlösung diente DMF/NMP (1:1 v/v). Das Kupplungsreagenz war eine Mischung aus HOBt und HBTU (beide 0,49 mol/L) in DMF. Pro Aminosäurerest wurde eine Doppelkupplung mit jeweils 4 Äq Aminosäure, 4 Äq HOBt, 4 Äq HBTU und 8 Äq DIPEA, bezogen auf 100 μ mol Harz, durchgeführt. Aufgrund der Länge der DCD-1L-Sequenz wurde bei ihr, und allen vergleichbar langen Sequenzen, mit den doppelten molaren Äquivalenten gekuppelt (Ansatzgröße wurde auf 50 μ mol abgesenkt, daher wurde mit 8 Äq Aminosäure, 8 Äq HOBt, 8 Äq HBTU und 16 Äq DIPEA gekuppelt).

Nach der Synthese wurden die Harze dreimal mit Methanol gewaschen. Für eine Probeabspaltung wurde eine Spatelspitze der Harze in ein separates Zentrifugenröhrchen gefüllt. Dieses Zentrifugenröhrchen wurde 30 min, die Reaktionsgefäße über Nacht im Exsikkator unter vermindertem Druck getrocknet.

Andere Peptide, deren Sequenz nur aus den 20 proteinogenen Aminosäuren bestand, oder lediglich nicht racemisierende, preisgünstige Aminosäuren enthielt, wurden ebenfalls nach dieser Methode synthetisiert. (siehe Tab. 4.2).

3.1.1.2 Synthese der ^{15}N -markierten DCD-1L-Analoga

Die ^{15}N -markierten Aminosäuren mussten vor Gebrauch zuerst mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen werden. Im vorliegenden Fall musste ^{15}N -markiertes Leucin geschützt werden. Hierzu wurde 1 g der Aminosäure (1 Äq) in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 2 Äq 10 %iger Natriumcarbonatlösung gelöst. Die Lösung wurde in einen Rundkolben überführt und im Eisbad gekühlt. Unter starkem Rühren wurde nun 1,1 Äq einer Fmoc-Cl-Lösung in Dioxan (10 mL Dioxan pro g Fmoc-Cl) langsam innerhalb von ca. 20 min zugetropft. Hierbei fiel ein weißer Feststoff aus. Nach der Zugabe von Fmoc-Cl wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung langsam auf RT gebracht und weitere 2 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf 200 mL H_2O geschüttet und zweimal mit 50 mL Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde im Eisbad auf 5-10 °C gekühlt und tropfenweise konz. HCl zugetropft bis pH = 2,0. Die Lösung wurde dreimal mit 50 mL Essigsäureethylester extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung wurde an einem Rotationsverdampfer bis zum Erhalt einer viskosen Flüssigkeit eingengt. Nach Zugabe von ca. 50 mL AN/ H_2O (1:1) und gutem Mischen wurde die Lösung bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die Reinheit dieser Aminosäuren wurde mittels LC/MS überprüft (vergl. Kapitel 3.1.3)

Die Synthese der ^{15}N -markierten DCD-1L-Analoga erfolgte größtenteils am multiplen Peptidsynthesizer (Syro II). Lediglich die Kupplung der ^{15}N -markierten Aminosäure wurde manuell durchgeführt. Alle Peptide wurden bis zu der Stelle synthetisiert, an der ^{15}N -Leu bzw. ^{15}N -Val eingefügt werden sollte. Diese Synthese erfolgte analog zur Synthese des Wildtyps. Für die manuelle Kupplung von Fmoc- ^{15}N -Leu bzw. Fmoc- ^{15}N -Val wurden 2 Äquivalente der Aminosäure, 2 Äq HOBt, 1,9 Äq HBTU und 4 Äq DIPEA über Nacht schüttelnd gekuppelt. Nach einer Kontrolle der Kupplung (siehe 3.1.2.1) wurden die restlichen Aminosäuren wieder mit dem multiplen Synthesizer gekuppelt. Hierzu wurde analog zu Kapitel 3.1.1.1 verfahren. Lediglich ein zusätzlicher Fmoc-Entschützungs-schritt wurde vor dem standardisierten

Syntheseprogramm einprogrammiert, da der N-Terminus des Peptids nach dem manuellen Syntheseschritt noch in geschützter Form vorlag. Die Harze wurden nach der Synthese dreimal mit Methanol gewaschen, in den Reaktionsgefäßen über Nacht im Exsikkator getrocknet und analog zu Kapitel 3.1.1.1 weiter verfahren.

Peptide, die andere nicht-proteinogene Aminosäuren enthielten oder solche, die zu Racemisierung neigen, wurden analog zu dieser Synthese hergestellt.

3.1.1.3 Synthese der N-terminal Fluorophor-markierten Analoga

Die Synthese der N-terminal mit Fluorophoren markierten Peptide erfolgte zunächst analog zu den Wildtyp-Sequenzen am Multiplen Peptidsynthesizer. Nach der Synthese wurde das Harz erneut in DMF für 1 h quellen gelassen. Es wurde gewaschen und über Nacht mit den entsprechenden Reaktionslösungen (siehe Tab. 3.1) unter Schütteln gekuppelt. Die Kupplungslösungen bestanden aus den folgenden Substanzen, gelöst in DMF:

Tab 3.1 Kupplungsansätze für N-terminale Markierungen

Fluorophor	Äquivalente des Fluorophors	Sonstige Kupplungsreagenzien
Dansylchlorid	3 Äq	10 Äq DIPEA
NBD-chlorid	5 Äq	2 Äq DIPEA
Rhodamin B	1,2 Äq	5 Äq DIC, 2 Äq HOBt
Carboxyfluorescein	2 Äq	5 Äq DIC, 2 Äq HOBt

Die Harze wurden nach der Synthese dreimal mit Methanol gewaschen, in den Reaktionsgefäßen über Nacht im Exsikkator getrocknet und analog zu Kapitel 3.1.1.1 weiter verfahren.

3.1.1.4 Synthese der Aca-markierten Analoga

Wie bei allen Synthesen wurde ein vorbeladenes Wang Harz mit geringer Ladung (*engl.* Low-load, abgekürzt LL) eingesetzt. Die Kupplungen von Fmoc-Aca-OH, Fmoc-Phe-OH und Fmoc-Gln-OH erfolgten manuell. Bei DCD-1L Analoga wurde ein Fmoc-Leu-LL Wang-Harz und bei SSL-25-Analoga ein Fmoc-Ala-LL Wang-Harz eingesetzt. Nach ca. 1 h quellen in DCM/DMF 1:1 (v/v) (beide Lösungsmittel trockneten vor Verwendung mind. 24 h über einem Molekularsieb 3A) wurde zweimal mit HOAt und HATU gekuppelt (1,2 eq Fmoc-Aca-OH, 1,2

eq HOAt, 1,2 eq HATU, 2,4 eq 2,4,6-Collidin in trockenem DMF/DCM 1:1 (v/v)) und anschließend einmal mit TFFH (1,2 eq Fmoc-Aca-OH, 5 eq TFFH, 2,4 eq 2,4,6-Collidin in trockenem DMF/DCM 1:1 (v/v)). Mit einer Probeabspaltung (siehe 3.1.2.1) wurde überprüft, ob das gewünschte Fragment (Fmoc-Aca-L bzw Fmoc-Aca-A) vorlag.

Nach einer Standardentschützung am N-Terminus (2 mL 20 % Piperidin für 30 min) wurde Fmoc-Phe-OH gekuppelt. Die Kupplung des Fmoc-Phe-OH erwies sich als reaktionsträge. Daher wurde dreimal mit TFFH gekuppelt (5 eq Fmoc-Phe-OH, 5 eq TFFH, 5 eq 2,4,6-Collidin, in DCM/DMF (1:1), Lösung 20 min vor Zugabe inkubieren). Es wurde mit Cappinglösung (440 μ L Ac₂O, 200 μ L DIPEA, 16 mg HOBt in 8 mL NMP) 20 min inkubiert und gewaschen.

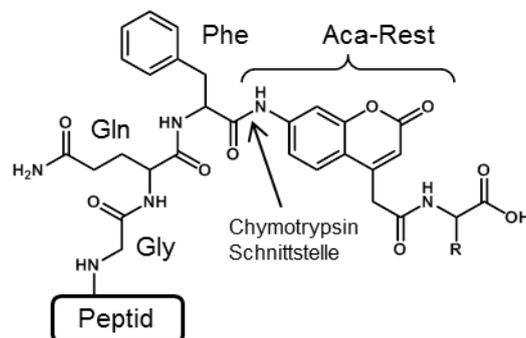


Abb 3.2 Zusätzlich zu dem 7-Aminocoumarin-4-essigsäure (Aca) mussten bei den Peptiden für den Vesikel-CPP Test noch 3 weitere Aminosäuren eingebaut werden, um einerseits die Wellenlänge des gebundenen Aca zu verschieben und andererseits eine schnelle Abspaltung durch Chymotrypsin zu gewährleisten.

Nach der Entschützung wurde Fmoc-Gln(trt)-OH nach modifizierten Standard-Kupplungsbedingungen zweimal gekuppelt (4 Äq Aminosäure, 4 Äq HOBt, 3,8 Äq HBTU, 8 Äq DIPEA in DMF). Nach erneuter Kontrolle der Kupplung (siehe 3.1.2.1) wurden die restlichen Aminosäuren wieder mit dem multiplen Synthesizer gekuppelt. Hierzu wurde analog zu Kapitel 3.1.1.1 verfahren. Lediglich ein zusätzlicher Fmoc-Entschützungsschritt wurde vor dem standardisierten Syntheseprogramm einprogrammiert, da der N-Terminus des Peptids nach dem manuellen Syntheseschritt noch in geschützter Form vorlag. Die Harze wurden nach der Synthese dreimal mit Methanol gewaschen und in den Reaktionsgefäßen über Nacht im Exsikkator getrocknet.

3.1.2 Abspaltung vom Harz

3.1.2.1 Probeabspaltungen

Zwischen den manuellen Syntheseschritten der Analoga, und nach der Synthese aller Peptide, wurde eine Probeabspaltung durchgeführt. Hierfür wurde eine Spatelspitze des Harzes entnommen, in eine Pipettenspitze mit Glaswolle überführt, dreimal mit Methanol gewaschen und auf dem Kopf stehend in ein 2 mL Reaktionsgefäß gestellt. Nach einer Trocknungszeit von ca. 1 h im Vakuumexsikkator wurde das nun trockene Harz aus der Pipettenspitze in das Reaktionsgefäß überführt. Es wurde ca. 200 µL „milde“ Abspaltungslösung (92,5 % TFA, 5 % Triisopropylsilan, 2,5 % H₂O, v/v) zugegeben und 1 h auf dem Rüttler inkubiert. Die Lösung wurde durch eine Pipettenspitze mit Glaswolle in ein leeres Reaktionsgefäß abfiltriert und das Lösungsmittel mit N₂ abgedampft. Es wurden ca. 1,5 mL kalter (4 °C) Diethylether hinzugegeben, für 3 min bei 13600 rpm zentrifugiert und der Diethylether abdekantiert.

Das Peptid wurde in 400 µL AN/H₂O (1:1, v/v) aufgenommen und mittels LC/MS geprüft, ob die Synthese erfolgreich verlaufen war.

3.1.2.2 Abspaltungen nach der Synthese

War in der Sequenz des Peptids Cystein, Histidin oder Methionin, wurde eine „scharfe“ Abspaltungslösung eingesetzt. Peptide ohne diese Aminosäuren wurden mit „milder“ Abspaltungslösung vom Harz gespalten.

Die über Nacht getrockneten Harze wurden in 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 10 mL „milder“ Abspaltungslösung (92,5 % TFA, 5 % Triisopropylsilan, 2,5 % H₂O) oder scharfer Abspaltungslösung (77,5 % TFA, 5 % Phenol, 5% Thioanisol, 5 mL Triisopropylsilan, 5 % H₂O, 2,5 % Ethandithiol, v/v) pro g Harz versetzt und 4 h bei RT gerüttelt. Danach wurde durch die Reaktionsgefäße (Glasfritte am Boden) in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen abfiltriert und mit 2-4 mL TFA gewaschen. Im Argonstrom wurde die Lösung bis auf 1-2 mL eingeengt, mit 25 mL kaltem (4 °C) Diethylether versetzt und bei 4500 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Danach wurde die überstehende Lösung verworfen und der weiße Niederschlag in ca. 20 mL AN/H₂O (1:1) aufgenommen. Die Lösung wurde bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Es wurde ein weißes Pulver erhalten.

3.1.3 Analyse mittels LC/MS

Die Methode der LC/MS ist eine Verbindung einer analytischen HPLC mit einem Massenspektrometer. Jede Messung liefert ein Chromatogramm mit zugehörigem Massenspektrum.

Die vom Harz abgespaltenen und lyophilisierten Peptide wurden mittels LC/MS analysiert und identifiziert. Hierzu wurde eine Spatelspitze des Peptids in AN/H₂O (1:1, v/v) gelöst, in ein spezielles Glasgefäß überführt und in den Probenstisch des LC/MS-Gerätes gestellt. Nach Programmierung des Steuerprogramms wurden die Proben automatisch auf ihrem Stellplatz auf dem Probenstisch erkannt und nacheinander gemessen. Anhand der Retentionszeit des Chromatogramms und den zugewiesenen Massen ließen sich die Bestandteile der untersuchten Lösungen charakterisieren.

3.2 Reinigung mittels HPLC

Die analysierten und identifizierten Peptide wurden mittels HPLC gereinigt. Hierzu wurde eine Umkehrphasensäule (RP-Säule, *engl.* reversed phase) verwendet. SSL-25 wt und seine farbstoffmarkierten Analoga konnten mit einer präparativen C18-Säule gereinigt werden, aber für die Aufreinigung von DCD-1L wt und dessen Analoga musste stets eine semipräparativen C18-Säule verwendet werden.

Es wurde eine Flussrate von 10 mL/min für die präparative und 7 ml/min für die semipräparative Säule verwendet und bei T = 35 °C gearbeitet. Als mobile Phase wurden die Lösungen A (4475 mL H₂O, 500 mL AN, 25 mL 1M HCl) und B (475 mL H₂O, 4500 mL AN, 25 mL 1M HCl) verwendet. Jedes synthetisierte Peptid wurde mit einer anderen Methode, unter Optimierung des Gradienten zwischen Lösung A und B gereinigt (vergl. Anhang Tab. 9.8). In jedem Durchgang wurden 5-8 mg Rohprodukt in Lösung A gelöst und auf die Säule aufgetragen. Zu Beginn wurden alle größeren Peaks fraktionierend aufgesammelt und mittels LC/MS der Produktpeak des Chromatogramms identifiziert. Hierzu wurden 400 µL der aufgefangenen Fraktion direkt in ein spezielles Glasgefäß gefüllt und analysiert. Nach der Identifikation des Produktpeaks konnte in den nachfolgenden Durchgängen der Produktpeak durch seine gleichbleibende Retentionszeit immer erkannt werden, sodass nur diese Fraktion gesammelt wurde. Alle produktenthaltenden Fraktionen eines Peptids wurden, in einem Rundkolben vereinigt, bei -80 °C eingefroren, anschließend lyophilisiert, die Reinheit des Peptids mittels LC/MS bestätigt, in Peptidröhrchen abgewogen und bei -20 °C gelagert.

3.3 Zirkulardichroismus-(CD-)Spektroskopie

3.3.1 Probenvorbereitung für CD-Experimente in Lösung

Von den verschiedenen Peptiden wurden 1 mg/mL Stammlösungen vorbereitet. Die Peptide wurden in 10 mM Phosphatpuffer (PB), in 10 mM MES-Puffer oder in MilliQ-H₂O gelöst. Für die Messung wurden in einem Reaktionsgefäß Stammlösung und die jeweils verwendeten Lösungsmittel und sonstigen Zusatzstoffe gemischt. Meist wurden Peptidkonzentrationen von 20-80 µM gemessen. Die Proben wurden analog mit anderen Lösungsmitteln vorbereitet.

3.3.2 Probenvorbereitung für CD-Experimente in Lipid-Vesikeln

Von den verschiedenen Peptiden wurden 1 mg/mL Stammlösungen in 10 mM PB oder 10 mM MES-Puffer präpariert. Von den verschiedenen Lipiden wurden 5 mg/mL Stammlösungen in CHCl₃/Methanol hergestellt. Die benötigten Mengen der Lipidstammlösung(en) wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt, im N₂-Strom eingedampft und für mindestens 3 h im Exsikkator getrocknet. Der getrocknete Lipidfilm wurde im verwendeten Puffer aufgenommen, 10 Gefrier-Tau-Zyklen unterzogen und anschließend für 10-20 min, abhängig von der Lipidmischung, sonifiziert. Diese Lipidvesikel dienten für die folgenden Experimente als Stammlösung. Hierzu wurden in separaten Reaktionsgefäßen Vesikel mit dem entsprechenden Puffer verdünnt und Peptid zugegeben. Als Referenz diente eine Vesikelprobe ohne Peptid. Es wurden meist Proben mit 30-100 µM Peptid und ca. 1-5 mM Lipid vorbereitet, wodurch sich P/L-Verhältnisse von 1:25 - 1:100 ergaben.

3.3.3 CD-Experimente

Nachdem die Proben wie in Abschnitt 3.3.1 oder 3.3.2 beschrieben, angesetzt worden waren, wurden zur Messung jeweils 250 µL in eine 0,1 cm Messküvette überführt und die Küvette in die Probenhalterung des Spektrometers eingebracht. Tabelle 3.2 gibt die verwendeten Messparameter wieder. Die Messung von Peptidproben in Lösung erfolgte in einem Jasco J-815 CD-Spektropolarimeter.

Tab. 3.2 Messparameter für die CD-Experimente

Parameter	Wert
Probenvolumen	250 μ L – 300 μ L
Temperatur	30 °C
Spektraler Messbereich	180-260 nm
Detektor-Response-Zeit	8 s
Anzahl der gemittelten Messungen	3
Messgeschwindigkeit	10 nm/min

Nach der Messung wurde die Probe aus der Küvette entnommen und meist gleich verworfen. Wurde die Probe jedoch aufbewahrt, so wurde sie in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Vesikel-Proben sollten nicht für längere Zeit aufbewahrt werden, da die Lipid-Vesikel schon wenige Tage nach ihrer Herstellung aggregieren und für eine Messung unbrauchbar werden.

3.4 Orientierte Zirkulardichroismus-(OCD-)Spektroskopie

3.4.1 Probenvorbereitung

Es wurden Stammlösungen von Lipiden in CHCl_3 /Methanol (1:1) und Peptiden in Methanol/ H_2O (3:1) hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden Peptid-Lipid-Mischungen hergestellt und gegebenenfalls verdünnt, bis eine homogene Lösung vorlag. Die Probenmenge wurde so berechnet, dass höchstens 10 μ g Peptid und 200 μ g Lipid auf dem jeweiligen Quarzglassubstrat aufgetragen wurden. Höhere Mengen an Peptid führten meist zu verzerrten Spektren und zu viel Peptid führt zu Absorptionsabflachung in Bereichen geringer Wellenlängen.

Gereinigte Quarzglasplatten (\varnothing 20 mm) wurden zentral auf einer Unterlage mit kreisförmigen Markierungen platziert. Von den Lipid-Referenzproben und den Peptid-Lipid-Proben wurden die berechneten Volumina (meist 40-70 μ L) mit einer gasdichten Spritze (Hamilton, USA) langsam auf der Glasplatte so aufgebracht, dass bereits während diesem Vorgang ein Großteil des Lösungsmittels evaporiert. Die abgeschiedene Probe muss sich während und nach dem Verdampfungsvorgang des organischen Lösungsmittelgemisches stets innerhalb der inneren kreisförmigen Markierung der Unterlage befinden, da nur dieser Bereich später mit dem zirkular polarisierten Licht bestrahlt wird. Überdies ist es wichtig bei Probe und

Referenz möglichst homogene Proben mit gleichem Probendurchmesser und mit gleicher Schichtdicke zu gewährleisten.

Die Proben wurden an der Luft getrocknet (ca. 1 h), in einem Exsikkator unter vermindertem Druck bei ca. 5 mbar für 3-4 h Lösungsmittelreste entfernt und die Probe anschließend in eine Hydrierkammer eingebaut. Die Proben hydratisierten bei derselben Temperatur, bei der sie später gemessen wurden (normalerweise oberhalb der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide) über Nacht über einer gesättigten K_2SO_4 -Lösung. Am nächsten Tag wurde eine Probe in die Probenkammer (Abb. 3.3) des OCD-Spektrometers eingebaut, die anderen Proben verblieben bis zu ihrer Messung in den Hydrierkammern.

3.4.2 OCD-Experimente

Die Messung von OCD-Proben erfolgte in einem Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter, das speziell hierfür im Arbeitskreis Ulrich mit einer selbst konstruierten OCD-Messzelle modifiziert wurde. In dieser Messzelle wurde die orientierte Probe senkrecht zum einfallenden Lichtstrahl eingebaut (Abb. 3.3). Die Temperatur der Probe wurde über einen Thermostaten geregelt. Die Proben wurden bei einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit von 97% gemessen, was durch die Hydratation mit gesättigter K_2SO_4 -Lösung in der Hydrierkammer und später, während der Messung, in der Probenkammer gewährleistet wurde. Durch die Rotation der Messzelle um den Lichtstrahl wurden Spektren der Probe unter acht verschiedenen Winkeln (0° , 45° , 90° , 135° , 180° , 225° , 270° und 315°) gemessen. Bei jedem Winkel wurde, analog zur CD-Spektroskopie, dreimal gemessen und die Messungen anschließend gemittelt. Nach der Messung wurden die OCD-Spektren über alle Winkel gemittelt, wodurch Artefakte (Einfluss des Lineardichroismus durch Unebenheiten der Oberfläche, Doppelbrechung durch die optischen Materialien des Spektrometers) weitgehend minimiert wurden. Um abzuschätzen wie stark die OCD-Messungen durch LD-Effekte beeinflusst wurden, wurde ein LD-Spektrum bei 0° aufgenommen. Wie bei der CD-Spektroskopie wurde auch hier ein Referenzspektrum der Lipide ohne Peptid aufgenommen.

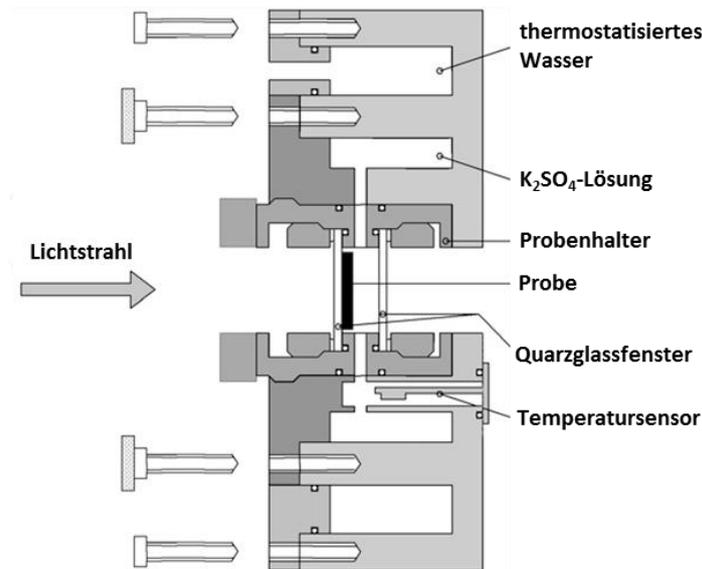


Abb. 3.3 Schnittdarstellung der OCD-Probenkammer [70].

Bei der Auswertung der Spektren wurden die Minima und das Maximum der orientierten Helixspektren beurteilt. Ein deutlich membran-insertierter Zustand (I-Zustand, *engl.* inserted state) der Helixachse parallel zur Membrannormale liegt dann vor, wenn die Elliptizität bei 208 nm beim Wert 0 liegt oder sogar positive Werte annimmt (Abb. 3.4, rote Linie). Ist bei 208 nm jedoch eine stark ausgeprägte negative Bande vorhanden (Abb. 3.4 blaue Linie) so kann von einer ausschließlich parallel zur Membranoberfläche orientierten Helix (S-Zustand, *engl.* surface state, Oberflächen-nah) ausgegangen werden. Der Übergang zwischen diesen beiden Zuständen, also eine schräg in die Membran geneigte Helix (T-Zustand, *engl.* tilted state) liegt dann vor, wenn die Bande bei 208 nm weniger stark ausgeprägt ist, als die negative Bande bei 222 nm, aber noch negative Werte annimmt (Abb. 3.4, grüne Linie).

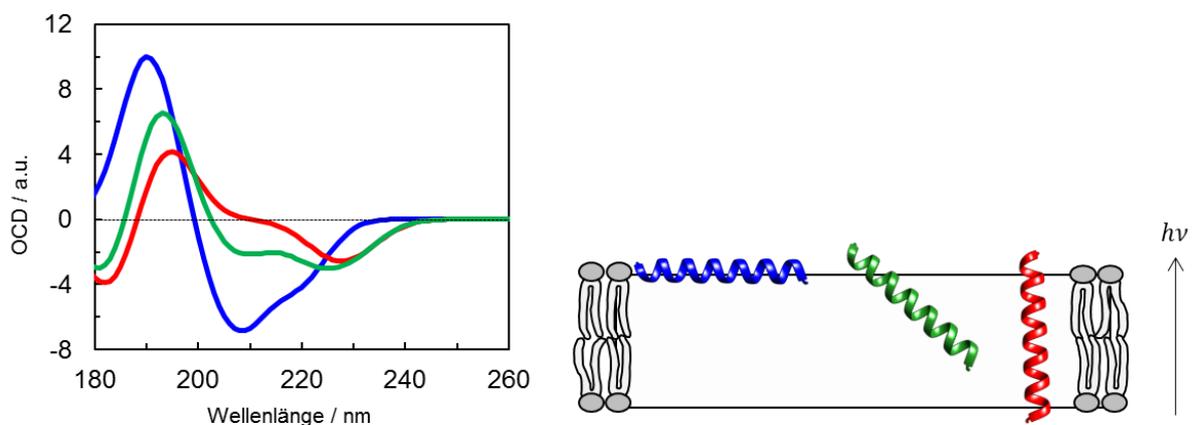


Abb. 3.4 OCD-Spektren α -helikaler Membranproteine im S-Zustand (blau), T-Zustand (grün) und I-Zustand (rot).

3.5 Festkörper-NMR-Spektroskopie

3.5.1 Probenvorbereitung

Die berechnete(n) Menge(n) Lipid(e) wurde(n) in ein Reaktionsgefäß gewogen und in 100-200 μL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) gelöst. Das Peptid wurde in „low-binding“ Reaktionsgefäße gewogen und in 20-50 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (ca. 1:10, v/v) gelöst. Hierbei muss immer mit dem H_2O begonnen werden, da es sonst nur schwer löslich ist. Das gelöste Lipid wurde zur Peptidlösung gegeben, durchmischt und auf die gewünschte Anzahl an Glasplättchen (10-24) zu etwa gleichen Mengen verteilt. Für ^{15}N -Proben wurden Glasplättchen der Dimensionen 9 x 7,5 x 0,08 mm verwendet. Nachdem das Lösungsmittel weitgehend abgedampft war wurde das restliche Lösungsmittel auf den Glasplättchen im Exsikkator unter vermindertem Druck über Nacht entfernt. Die Glasplättchen wurden gestapelt, ein weiteres Glasplättchen oben aufgelegt, fixiert und die Proben für mindestens 12 h in einer luftdichten Kammer mit gesättigter Kaliumsulfatlösung bei 48 °C inkubiert. Diese Vorgehensweise gewährleistete eine relative Luftfeuchtigkeit von mind. 96 % in der Kammer. Die Proben wurden zum Schutz vor Wasserverlust vorsichtig in Parafilm und anschließend in Frischhaltefolie eingewickelt.

3.5.2 ^{31}P -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Direkt vor jeder ^{15}N -Messung wurden direkt danach ^{31}P -Messungen durchgeführt um die Orientierung der Lipiddoppelschicht jeder NMR-Probe zu überprüfen.

Die ^{31}P -NMR-Experimente wurden mit einem Flachspulen-Doppelresonanz-Probenkopf ($^1\text{H}/\text{X}$) an einem 500 MHz UltraShield NMR-Spektrometer von Bruker unter Verwendung von einer Hahn-Echo-Pulssequenz und ^1H -Entkopplung [71]. Abhängig von der Lipidmenge wurden 128-512 Scans bei der gewählten Temperatur, hier meist 35 °C, aufgenommen. Referenziert wurde auf Phosphorsäure mit einer chemischen Verschiebung von 0 ppm. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 200 Hz prozessiert.

3.5.3 ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ^{15}N -NMR-Experimente wurden mit einem Doppelresonanz-LowE-Flachspulenresonator ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$) an einem 500 MHz UltraShield NMR-Spektrometer von Bruker unter Verwendung von MOIST Kreuzpolarisation (CP) und anschließender ^1H -Entkopplung (SPINAL64) bei derselben Temperatur durchgeführt, bei der die ^{31}P -Messungen stattfanden [72]. Die Dauer des Mischpulses dauerte 1 ms und die Aquisitionszeit betrug 10 ms. Als Referenz diente ^{15}N -

Ammoniumsulfat mit einer chemischen Verschiebung von 26,8 ppm [73]. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 200 Hz prozessiert. Es wurden Proben mit einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis (P/L) zwischen 1:50 und 1:200 vorbereitet. Die eingesetzte Peptidmenge betrug 1 mg für jede Probe. Je nach Signalstärke wurden 20000-35000 Scans aufgenommen.

3.6 Biologische Tests

Arbeiten unter sterilen Bedingungen

Um Kontaminationen durch Bakterien und Pilze zu vermeiden wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumbank durchgeführt. Zellkulturmedien und sonstige Lösungen wurden im Autoklav bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 1 bar für 20 Minuten sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen, wurden durch einen Cellulose-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Pipettenspitzen und Kulturwannen wurden ebenfalls bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 1 bar für 20 min sterilisiert.

Vorbereitungen

Um die antimikrobielle Aktivität von Peptiden zu bestimmen wurden Bakterienstämme benutzt, die von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) für solche Untersuchungen vorgeschlagen wurden. Meist wurde jeweils ein grampositiver Stamm (*Staphylococcus aureus* DSM 1104) und ein gramnegativer Stamm (*Escherichia coli* DSM 1103) verwendet. Es kamen jedoch ebenfalls folgende Stämme zum Einsatz: *S. xylosus* DSM 20266, *S. epidermidis* DSM 1798, *K. rhizophila* DSM 348, *E. coli* DSM 498, *E. faecalis* DSM 2570, *P. aeruginosa* DSM 1117, *B. subtilis* DSM 347, *C. albicans* DSM 1386.

Die Anfälligkeit der Bakterien hängt von dem ihrem Zustand ab, der wiederum durch Wachstumsphase und die Teilungsrate bestimmt wird. Das Ziel der folgenden Arbeitsschritte war es die Bakterienzellen, die als Kryokulturen bei -80 °C lagerten, so zu reanimieren, dass eine standardisierte Beimpfung mit stets gleich aktiven Bakterien erzielt wird.

Zunächst wurden 10 mL Mueller-Hinton-(MH-)Medium (3 g/L Fleischextrakt, 17 g/L hydrolasiertes Casein, 1,5 g/L lösliche Stärke) mit einem einzelnen Glaskügelchen der Kryokulturen der jeweiligen Bakterienstämme beimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Kultur wurde am nächsten Tag ein 13 Strichverfahren (Abb. 3.5) auf LB-Agarplatten durchgeführt.

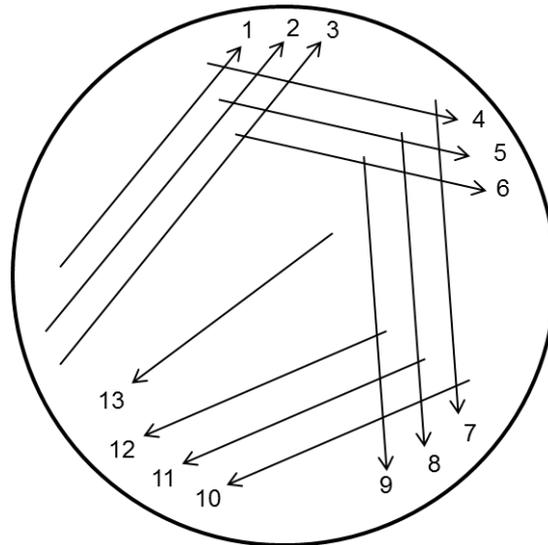


Abb. 3.5 13 Strichverfahren – die Impföse muss nach jeweils drei Strichen erneut ausgeglüht und im Agar abgekühlt werden, bevor die nächsten drei Striche (vier Striche zum Schluss) zum Verdünnen der Bakterien gezogen werden.

Diese Agarplatten inkubierten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Agarplatten im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Agarplatten konnten bei Bedarf bis zu 2 Wochen für weitere Versuche aufbewahrt werden.

Die Peptide wurden aus dem Gefrierschrank (-20 °C) geholt und auf Raumtemperatur gebracht (mindestens 30 Minuten). MilliQ-H₂O wurde mit einem Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Filtropur S, Sarstedt AG&Co., Nümbrecht) sterilisiert. Die berechnete Menge jedes zu testenden Peptides wurde in 2 mL „peptide low-binding“ Zentrifugenröhrchen abgewogen. Normalerweise wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1024 µM in H₂O hergestellt und umgehend eingesetzt. Lediglich in selten eingesetzten Lösungsmitteln, wie beispielsweise 50 % EtOH, wurden die Lösungen auch bis zu einer späteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden auch Stammlösungen mit höheren oder niedrigeren Konzentrationen hergestellt.

Da die Konzentration der Peptide in den folgenden Arbeitsschritten zweimal halbiert wurde, lieferte eine Konzentration der Stammlösung von 1024 µM eine Arbeitskonzentration von maximal 256 µM.

3.6.1 Test zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK-Test)

Für die MHK-Tests wurden Mikrotiterplatten (Nuclon™, Nunc GmbH & Co., Wiesbaden) mit insg. 96 Kavitäten (im Folgenden mit dem englischen Begriff „Well“ bezeichnet) benutzt. In die erste Reihe wurden jeweils 50 µL 2-fach MH-Medium und in alle anderen Reihen 50 µL 1-fach MH-Medium pipettiert. Hierfür wurde eine elektronische 300 µL Multikanalpipette (Mettler-Toledo GmbH, Gießen) verwendet. Es wurden 50 µL der 4-fach konzentrierten Peptidstammllösung in die Wells der ersten Reihe pipettiert. Nach gründlichem Durchmischen wurden aus den Wells der ersten Reihe 50 µL der Lösung in die Wells der zweiten Reihe pipettiert. Dieser Vorgang wurde bis zur achten Reihe wiederholt. Aus den Wells der letzten Reihe wurden dann 50 µL aufgenommen und verworfen. Für diese Verdünnungsreihe wurde eine 100 µL Multikanalpipette (Eppendorf, New York) verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden bis zur weiteren Verwendung in einer verschließbaren Wanne gelagert um die Verdampfung der Lösungen zu minimieren.

Es wurden Kolonien gepickt, mit diesen Zellsuspensionen in 500 µL MH-Medium vorbereitet und dann die Optische Dichte dieser Suspensionen bei 550 nm (OD_{550}) bestimmt. 10 mL MH-Medium wurden so beimpft, dass eine $OD_{550} = 0,02$ erreicht wurde. Diese Übernachtskulturen wurden höchstens 18 h inkubiert und dann die OD_{550} bestimmt. Nun wurden 10 mL MH-Medium mit einer $OD_{550} = 0,2$ beimpft und 3-4 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine $OD_{550} = 1-2$ erreicht war. Dieses Vorgehen lieferte Bakterien, die sich in einem frühen exponentiellen Wachstumsstadium befanden, also eine sehr hohe Aktivität besaßen. Diese Testkulturen wurden erneut auf $OD_{550} = 0,2$ verdünnt. Anschließend wurden grampositive Bakterienstämme (z.B. *S. aureus*) 100-fach und gramnegative Bakterienstämme (z.B. *E. coli*) 1000-fach verdünnt. Je 50 µL dieser verdünnten Testkulturen wurden mit einer elektronischen Multikanalpipette in alle Wells der Mikrotiterplatten gegeben, mit Ausnahme der Negativkontroll-Wells. Hier wurde lediglich 50 µL MH-Medium zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden für 20-22 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Es wurden 20 µL einer sterilen 0,2 mg/mL Resazurin-Lösung mit einer elektronischen Multikanalpipette in jedes Well der Mikrotiterplatten gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde anschließend über die Farbe der Lösung in den Wells bestimmt. Man kann davon ausgehen, dass in den blau gefärbten Wells das bakterielle Wachstum gehemmt war, während in den rosa gefärbten hauptsächlich lebende Zellen vorlagen. Diese Analyse konnte gegebenenfalls mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät „FLASH Scan 550“ (Analytik Jena, Jena) durchgeführt werden. Zur Dokumentation der Ergebnisse dienen einerseits die Scans des Mikrotiterplatten-Lesegeräts, andererseits wurden auch Digitalfotografien der Mikrotiterplatten gespeichert.

3.6.2 Weitere Methoden zur Bestimmung der Antimikrobiellen Aktivität

Atmungstest

Über Nacht wurden die Bakterienkulturen wie bereits in Abschnitt 3.6.1 beschrieben angezogen. Auch für diesen Test wurde MH-Medium verwendet und die Durchführung erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten. In die Positionen A1-A12 wurden 40 µL des 2-fach konzentrierten MH-Mediums, in alle anderen Positionen MH-Medium vorgelegt. Die Peptide wurden in 5-fach konzentrierten Stammlösungen angesetzt und 1:1 bis zur Reihe H verdünnt. Die Platten wurden mit 40 µL einer Bakteriensuspension, eingestellt auf $OD_{550} = 0,2$, inokuliert. Als Negativkontrolle wurden in die Spalte 12 nur 40 µL MH-Medium gegeben. Als Positivkontrolle wurde in die Spalte 11 nur Bakteriensuspension ohne Peptide gegeben. Im Gegensatz zum MHK-Test (3.6.1) wurde hier jedoch sofort 20 µL 0,2 mg/mL Resazurinlösung in alle Positionen der Mikrotiterplatte verteilt und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Atmungsaktivität konnte als die Differenz der reduzierten Form des Farbstoffs, Resafurin, bei 570 nm und der oxidierten Form des Farbstoffs, Resazurin, bei 600 nm dargestellt werden. Die Messungen erfolgen ebenfalls an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät „FLASH Scan 550“ (Analytik Jena, Jena) in regelmäßigen Abständen.

Radialdiffusion

Über Nacht wurden die Bakterienkulturen wie bereits in Abschnitt 3.6.1 beschrieben angezogen. Es wurden unterschiedliche Agarmedien, vorbereitet, autoklaviert und jeweils 17 mL in 50 mL Fläschchen aliquantiert und für 10 min auf 60 °C temperiert. Es wurden die folgenden Agarmedien verwendet:

- **LB-Agar** (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar-Agar, pH 7,0)
- **Salzfreier LB-Agar** (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 15 g/L Agar-Agar, pH 7,0)
- **MH-Agar** (17,5 g/L hydrolysiertes Casein, 3 g/L Rindfleischextrakt, 1,5 g/L lösliche Stärke, 15 g/L Agar-Agar, pH 7,3)
- **MH-Agar mit KCl** (17,5 g/L hydrolysiertes Casein, 3 g/L Rindfleischextrakt, 1,5 g/L lösliche Stärke, 15 g/L Agar-Agar, 20 g/L KCl, pH 7,3)
- **Difco Antibiotic Medium 2** (1,5 g/L Fleischextrakt, 6,0 g/L Bacto-Trypton, 3 g/L Hefeextrakt 15 g/L Agar-Agar, pH 7,2)
- **TSB-Agar** (17 g/L Bacto Trypton, 3 g/L Bacto Soyton, 2,5 g/L Glucose, 5g/L NaCl, 2,5 g/L Dikaliumhydrogenphosphat, 15 g/L Agar-Agar, pH 7,3)

Aus den Übernachtskulturen wurden Bakteriensuspensionen mit $OD_{550} = 0,3$ hergestellt und jeweils 50 µL dieser Suspensionen pro Fläschchen zugegeben. Nach gründlicher

Durchmischung wurde aus jedem Fläschchen eine Agarplatte gegossen. Nach dem Abkühlen der Platten wurden je Platte 3-4 9 mm breite Löcher mit einem Stanzer gestochen. In diese Löcher wurden dann 50 µL einer zu testenden Lösung gefüllt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zunächst inkubierten die Agarplatten mit der Agarseite nach unten für ca. 1 h, bis die Lösungen vollständig in den Agar eingezogen waren. Die Platten wurden mit der Agarseite nach oben weiter inkubiert. Am nächsten Tag konnten dann die entstandenen Hemmhöfe ausgewertet und interpretiert werden.

Abtötungskinetik

Die Abtötungskinetik wurde nach der „Drop-Plate“-Methode durchgeführt [74]. Hierzu wurde zunächst MH-Agar (3 g/L Fleischextrakt, 17 g/L hydrolasiertes Casein, 1,5 g/L Stärke, 15 g/L Agarose) hergestellt, autoklaviert und Agarplatten mit je ca. 20 mL Agar gegossen. Nach vollständigem Erstarren des Agars wurden die Platten mit einem Permanent-Marker in Viertel eingeteilt und je zwei Agarplatten je Zeitpunkt und jede Kurve der Abtötungskinetik (1 Kontrolle und für jedes Peptid) und für jeweils 4 Verdünnungen (10^{-1} - 10^{-4} und 10^{-5} 10^{-8}) beschriftet. Für jeden Zeitpunkt (0, 20, 40 und 60 min) und jedes Peptid (inkl. Kontrolle) wurden acht 1,5 mL Reaktionsgefäße mit den Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-8}) beschriftet und mit je 900 µL MH-Medium (3 g/L Fleischextrakt, 17 g/L hydrolasiertes Casein, 1,5 g/L Stärke) befüllt. Es wurde 900µL einer Testkultur von *S. aureus* DSM 1104 mit OD550 = 0,2 für jedes Peptid und für die Kontrolle aus einer Tageskultur hergestellt. Jeder Testkultur wurden weitere 100 µL (10-fach konzentrierte Peptidlösung oder Medium für die Kontrollbestimmung) zugesetzt. 100 µL dieser Kulturen wurden in das Reaktionsgefäß mit der Verdünnung 10^{-1} gegeben und dann jeweils 10-fach verdünnt bis 10^{-8} . Die Testkulturen inkubierten bei 37°C in einem nicht-luftdichten 4 mL Kulturröhrchen für 20 min. Während dieser Zeit wurde von den Verdünnungen auf je zwei Agarplatten 5 mal 10 µL auf die entsprechenden Viertel der vorbereiteten Agarplatten getropft. Nach 20 minütigen Inkubation der Testkulturen wurde erneut 100 µL entnommen, einer 10-fachen Verdünnungsreihe unterzogen, weiter inkubiert und währenddessen wie zuvor 10 Tropfen je 10 µL pro Verdünnung auf die Agarplatten aufgebracht. Dieser Vorgang wurde für 40 min und 60 min Inkubationszeit wiederholt. Die Agarplatten inkubierten über Nacht. Es wurde geprüft, ab welchen Verdünnungen einzelne Kolonien in den nun eingezogenen Tropfen gewachsen waren. Diese wurden gezählt und hieraus die kolonienbildenden Einheiten (KbE) der Proben zu den gemessenen Zeiten bestimmt.

3.6.3 Hämolyse

Das Erythrozytenkonzentrat für diese Versuche wurde von der Blutbank des Klinikums Karlsruhe bezogen. 5 mL dieser in Zitrat-Phosphat-Dextrose-(CPD)-Puffer gelagerten Erythrozyten wurden in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 45 mL Waschpuffer (172 mM Tris-HCl, pH 7,6 bei RT eingestellt) versetzt und vorsichtig gemischt. Es wurde bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen, erneut 45 mL Waschpuffer zugegeben und zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf wenige Millimeter entfernt. In ein 15 mL Zentrifugenröhrchen wurden 9 mL Waschpuffer vorgelegt und 1 mL des sehr weichen Sediments dazu gegeben. Diese 10 % Hämatokritlösung wurde als Stammzellsuspension bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Direkt vor der Hämolyse wurden 9,5 mL vorgewärmter Reaktionspuffer (172 mM Tris-HCl, pH 7,6 bei 37 °C eingestellt) in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 500 µL der Stammzellsuspension versetzt. Diese 0,5 % Hämatokritlösung wurde als Testzellsuspension bezeichnet und vor Verwendung 5 min im Wasserbad vorgewärmt.

Wie bei dem MHK-Test (siehe 3.6.1) wurde hier eine 2-fach-Verdünnungsreihe für die Peptide durchgeführt. Diese fand jedoch in 2 mL Zentrifugenröhrchen statt und nicht in einer Mikrotiterplatte. Die PeptidstammLösung wurde 4-fach konzentriert in Reaktionspuffer angesetzt (1024 µM wenn bis 256 µM getestet wurde). Es wurden in Zentrifugenröhrchen 200 µL Reaktionspuffer vorgelegt die Röhrchen der Verdünnungsreihe beschriftet. Durch Zugabe von 200 µL PeptidstammLösung halbierte sich die Peptidkonzentration. Nach gutem Durchmischen wurde 200 µL dieser Lösung in das nächste Röhrchen überführt und durch weiteres Wiederholen die Verdünnungsreihe vorbereitet. Aus dem letzten Zentrifugenröhrchen wurden 200 µL verworfen. Als Negativkontrolle dienten drei Röhrchen mit jeweils 200 µL Reaktionspuffer, als Positivkontrolle dienten drei Röhrchen mit jeweils 200 µL 0,2% Triton X-100 in Reaktionspuffer.

Je 200 µL der vorgewärmten Testzellsuspension wurden in jede Verdünnungsstufe, in die Positiv- und in die Negativkontrolle gegeben. Die Proben wurden für 30 min unter gelegentlichem vorsichtigem schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurden alle Proben bei 13000 rpm zentrifugiert und 350 µL des Überstands in Küvetten überführt. Die Hämolyse wurde durch die Absorption des freigesetzten Hämoglobins bei 540 nm gemessen. Hierbei wurde jede Probe dreimal gegen die Negativkontrolle (Autohämolyse) als Referenz gemessen. Die gemessenen Extinktionswerte wurden auf die maximal erreichbare Extinktion durch Triton X-100 bezogen. So wurde die prozentuale Hämolyse erhalten und gegen die Konzentration des Peptids aufgetragen.

3.6.4 Inkubation von BY-2 Tabakzellen

Die Peptide für diese Versuche wurden von mir synthetisiert, gereinigt und als gebrauchsfertige Aliquants Dr. Ningning Gao bzw. Dr. Jan Maisch übergeben, welche die eigentlichen Inkubationen der BY-2 Tabakzellen durchführten. Diese Experimente fanden am Institut für Botanik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Nick statt.

Die Kultivierung und die Inkubation der Zellen erfolgten analog zu bereits etablierten Methoden [75]. Es wurden Zellen der BY-2 Tabakzellen-Linie (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) in Flüssigmedium kultiviert [76]. Diese Medium enthielt Murashige-Skoog-Salze (4,3 g/L), KH_2OP_4 (200 mg/L), Inositol (100 mg/L), Thiamin (1 mg/L) und 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (0,2 mg/L) bei pH 5,8 [76]. Die Zellen wurden wöchentlich in Unterkulturen aufgeteilt indem 1,5-5 mL stationäre Zellen in 30 mL frisches Medium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben überführt wurden. Die Zellsuspensionen wurden in einem Kreisschüttler (KS250 basic, IKA Labortechnik) bei 25 °C und 150 rpm inkubiert. Wenn nicht anders angegeben wurden die Experimente stets drei Tage nach Aufteilung der Unterkulturen durchgeführt.

In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 50 μL Zellen mit 950 mL Flüssigmedium gemischt. 1-10 μL einer 1 mM einer Rhodamin B-markierten Peptidstammlösung wurden zugesetzt sodass die Zellen mit 1-10 μM Peptid inkubiert wurden. Diese Mischung wurde unter kontinuierlichem Schütteln für eine bestimmte Zeit, 30 min bis 24 h, bei 25 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in spezialangefertigten Färbekammern mit Nylongewebe (70 μm Porengröße) überführt um diese durch Waschen mit sterilem Kulturmedium von restlichem fluoreszenzmarkiertem Peptid zu reinigen. Danach wurden die Zellen umgehend unter dem Mikroskop untersucht [77]. Hierzu wurde ein AxioImager Z.1 Mikroskop (Zeiss) mit einem ApoTome Mikroskop-Schieberegler zur optischen Aufteilung und einer gekühlten, digitalen CCD-Kamera (AxioCam MRm) eingesetzt. Zur Beobachtung von Rhodamin B wurde ein Fluoreszenz-Filter Set 43 HE ($I_{\text{ex}}=550$ nm, Strahlspalter bei 570 nm, und $I_{\text{em}}=605$ nm) benutzt. Die Aufnahmen mit einer Axio-Vision Software analysiert und mit Photoshop (Adobe Systems) nachbearbeitet.

3.6.5 Inkubation von RAW Makrophagen

Die Kultivierung der RAW Makrophagen wurde von Dorit Mattern am Institut für Toxikologie und Genetik des KIT im Arbeitskreis von D. Carsten Weiss durchgeführt. Am Vortag der Inkubationen wurden die Zellen in 96-Well- oder in 12-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellzahl pro Well betrug 10000 Zellen ($3,1 \times 10^4/\text{cm}^2$) für die 96-Well-Platten. Diese inkubierten über Nacht in 200 μL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Medium) mit 10 % FCS pro Well.

Alle weiteren Schritte wurden vom mir unter fachkundiger Aufsicht von Dorit Mattern in den Laboren von Dr. Carsten Weiss am Institut für Toxikologie und Genetik durchgeführt.

Es wurden 1 mM Stammlösungen der Peptide in sterilem H_2O angesetzt (Gramicidin S wurde mit 5 % DMSO in H_2O angesetzt.) Die Peptide wurden in DMEM-Medium bis zur verwendeten Endkonzentration (0,5 μM ; 5 μM ; 20 μM und 50 μM) verdünnt. Das überstehende Medium wurde von den über Nacht in der 96-Well-Platte gewachsenen Zellen vorsichtig abgenommen und durch jeweils 100 μL frisches DMEM-Medium mit und ohne Peptide ersetzt. Es wurden jeweils 4 Wells pro Peptid und Konzentration inkubiert. Die restlichen Wells wurden als Kontrolle mit Medium befüllt. Die Zellen inkubierten 24 h bei 37 °C. 30 min vor Inkubationsende wurden einige Kontroll-Wells mit 10 μL 1%igem Triton X-100 befüllt. Aus jedem Well wurden 50 μL entnommen, in eine neue 96-Well Platte überführt und abgedeckt im Kühlschrank bis zur Durchführung des LDH-Tests (Kapitel 3.6.6). Die inkubierten Zellen wurden direkt für die Propidiumiodid-Färbung (Kapitel 3.6.7) weiterverwendet.

Diese Inkubation war ausreichend, um den LDH-Test und die Propidiumiodid-Färbung durchzuführen. Für Untersuchungen der Immunantwort mittels enzymverknüpften Immunosorbensuntersuchungen (ELISA, Kapitel 3.6.8) wurde eine größere Menge inkubiertes DMEM-Medium benötigt. Hierzu wurden die Zellen in 12-Well-Mikrotiterplatten in 600 μL inkubiert, wovon nach der Inkubation 550 μL bis zur Durchführung des ELISA bei -20 °C gelagert wurden.

3.6.6 Makrophagen LDH

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 50 μL inkubiertem DMEM-Medium wurde wie in Kapitel 3.6.5 vorbereitet. Es wurden 50 μL PBS-Puffer (engl. Phosphate buffered saline; Phosphatgepufferte Salzlösung) in jede Well zugegeben. Das LDH-Reagenz wurde aus Lösungen eines Kits hergestellt. Für eine 96-Well-Platte wurden 5 mL PBS, 100 μL Lösung 1 und 5 mL Lösung 2 gemischt und je 100 μL je Well zugegeben. Es wurde 10 min im dunklen inkubiert. Die Absorption der Triton X-100-Probe sollte bei ca. 1 liegen. Mit 50 μL 1 N HCl je Well wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 490 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen die Messung behinderten. Die LDH-Freisetzung wurde in % der Tritonkontrolle angegeben.

3.6.7 Makrophagen PI-Färbung

Die in Kapitel 3.6.5 inkubierten Zellen in 50 μL DMEM-Medium wurden mit zwei Farbstoffen, Hoechst 33342 und Propidiumiodid, gefärbt. Hoechst 33342 diffundierte hierbei durch die intakte Membran und bindet an die DNA. Alle Zellkerne wurden blau gefärbt. Durch die Zählung der Zellkerne wurde die Zellzahl in jeder Probe bestimmt. Durch die Analyse der Fluoreszenzintensität der Kerne und in Kombination mit der Propidiumiodid-Färbung (PI-Färbung) konnte zwischen den unterschiedlichen Apoptosestadien unterschieden werden. Propidiumiodid (PI) diffundierte nur durch geschädigte Membranen, band an die DNA und fluoreszierte rot. Durch PI gefärbte Zellen wurden abhängig von der Hoechst 33342-Fluoreszenzintensität entweder als nekrotisch oder spät-apoptotisch klassifiziert.

Die Zellen wurden je Well mit 100 μL DMEM-Medium mit 0,15 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 und 0,125 $\mu\text{g/mL}$ PI für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend an einer Hochdurchsatzmikroskopie unterzogen. Diese fand an einem Olympus IX81 Mikroskop mit 10er Objektiv unter Verwendung der Scan^R Aufnahme-Software statt. Pro Well wurden 4 Pilder je Kanal (Hellfeld, Hoechst 33342, PI) aufgenommen und die Daten anschließend mit der Scan^R-Software ausgewertet.

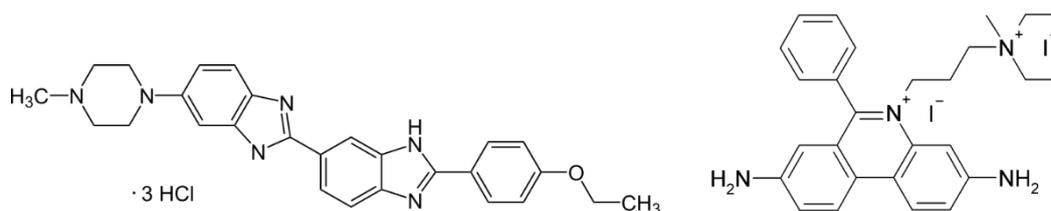


Abb. 3.6 Chemische Strukturen von Hoechst 33342 (links) und Propidiumiodid (rechts)

3.6.8 ELISA

Es wurden enzymverknüpfte Immunosorbensuntersuchungen (*engl.* enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) gegen drei unterschiedliche Proteine, Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL1 β) und Interleukin 6 (IL6), durchgeführt. Diese wurden mit dem jeweiligen ELISA Kit von BD Biosciences durchgeführt. Alle Puffer und Antikörper waren in diesen Kits bereits gebrauchsfertig enthalten.

Die verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit Abfang-Antikörpern beschichtet. Hierzu wurden 22 μ L der Abfang-Antikörper-Stammlösung mit 11 mL Beschichtungspuffer gemischt. In jedes Well wurden 100 μ L dieser Lösung pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgesaugt und dreimal mit je 300 μ L Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte auf einem Zellstofftuch „ausgeschlagen“ um Reste des Puffers zu entfernen. Die Platte wurde zur Blockierung mit 200 μ L Verdünnungspuffer 1 h bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und alle Wells der Mikrotiterplatte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden die jeweiligen Protein-Standards verdünnt. Diese Verdünnungen dienten in dem ELISA als Referenzwerte. Nun wurde je Well der Mikrotiterplatte 100 μ L inkubiertes Medium (aus Kapitel 3.6.5) gegeben und abgedeckt für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und die Platte fünfmal mit je 200 μ L Waschpuffer je Well gewaschen. Es wurden 11 mL Verdünnungspuffer mit 22 μ L Detektions-Antikörper-Lösung und 22 μ L Meerrettichperoxidase-Lösung gemischt und 100 μ L in jedes Well pipettiert. Nach 1 h Inkubation wurde die Lösung abgenommen und siebenmal jedes Well mit je 200 μ L Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer inkubierte in jedem Waschschrift für mindestens 30 s in der Mikrotiterplatte. Es wurde 12 mL Substratlösung aus 6 mL Substratreagenz A und 6 mL Substratreagenz B hergestellt. Diese enthielten H₂O₂ als Substrat für die Peroxidase und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Indikator für den Reaktionsfortschritt der Peroxidase. Je Well wurden 100 μ L dieser Substratlösung zugegeben und ohne Abdeckung für 30 min im Dunklen inkubiert. Das TMB färbte die Wells mit Protein in dieser Zeit blau. Der Reaktionsfortschritt wurde bei 650 nm verfolgt. Als die höchste Standardkonzentration eine Absorption von ca. 0,6 bis 1 aufwies wurde durch die Zugabe von 50 μ L einer Stopplösung (0,18 m H₂SO₄) je Well die Reaktion der Peroxidase gestoppt. Die Indikatorfärbung änderte sich von blau zu gelb. Durch die Messung der Absorption bei 450 nm wurden die Proben gemessen. Die Standards mit bekannter Proteinkonzentration dienten hierbei zur Eichung der Proteinkonzentration der Proben.

3.6.9 HaCaT-Inkubation

Die Experimente mit HaCaT-Zellen fanden am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) im Arbeitskreis von Dr. Cornelia Lee-Thedieck statt. Die Experimentelle Arbeit, die Kultivierung der Zellen, deren Inkubation und die Mikroskopischen Arbeiten, wurde von Saskia Kraus übernommen. Die Peptide wurden von mir synthetisiert, gereinigt und gebrauchsfertig eingewogen. Der Saccharose-Puffer wurde von mir hergestellt und vor Gebrauch von Saskia Kraus steril filtriert.

Die HaCaT-Zellen wurden aufgeteilt, gezählt und 50000-70000 Zellen pro Kammer einer „Chamber Slide“ (8 Kammern) ausgesät. Über Nacht wurde unter 600 µL HaCaT-Medium inkubiert, sodass die Zellen adhären konnten.

Der Saccharose-Puffer wurde steril filtriert. Der Überstand der Zellen (HaCaT-Medium) wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen der Negativkontrollen wurden mit 600 µL Saccharosepuffer oder HaCaT Medium ohne Peptid versetzt. Die beiden Peptide, SSL-25 wt und Rh-SSL-25, wurden jeweils in Saccharose-Puffer auf 2 µM verdünnt und mit je 600 µL dieser Lösungen die Zellen überschichtet. Es wurde 15 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der Puffer bzw. das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert (15 min, Lichtausschluss) und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 min inkubiert um die Zellmembran zu permeabilisieren und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 % BSA in PBS für 30 min inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 mL Färbelösung (2 µL DAPI, 50 µL Alexa Fluor® 488 Phalloidin, 1948 µL PBS) hergestellt, jeweils 250 µL in eine Kammer gegeben, für 30 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert, fünfmal mit PBS gewaschen und 500 µL PBS in jede Kammer gegeben. Anschließend wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurden 8 Kammern mit HaCaT-Zellen parallel inkubiert, wobei drei Kammern das Rhodamin B markierte Peptid in Saccharose-Puffer enthielten, zwei Kammern lediglich den Saccharose-Puffer, zwei Kammern Wildtyp-Peptid in Saccharose-Puffer und eine Kammer HaCaT-Medium.

3.6.10 Translokation in Bakterien

Es wurden Bakterien des Stammes *S. aureus* DSM 1104 in einer Übernachtskultur aus MH-Medium bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Es wurde eine Tageskultur mit Zellen aus der Übernachtskultur bis $OD_{550} = 0,2$ angeimpft und bis ca. $OD_{550} = 1$ wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurde 1 mL bei 2000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet dreimal mit Schweißpuffer (10 mM KH_2PO_4 , 40 mM NaCl, pH 6,0) gewaschen. Dann wurden die Zellen in 500 μ L Schweißpuffer mit 50 μ M Carboxyfluorescein-markiertem Peptid für 30 min bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit Schweißpuffer gewaschen, in 50 μ L Schweißpuffer resuspendiert, 5 μ L auf Glasplättchen (microscope slides, VWR) aufgetragen, mit Deckglas versehen, mikroskopiert (Axioskop 40, Carl Zeiss) und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert (integrierte PowerShot A640, Canon).

3.7 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

3.7.1 Farbstoff-Leakage

Der Prozess des Auslaufens von in Lipidvesikeln eingeschlossenen Fluorophoren wird im Folgenden mit dem aus dem Englischen übernommenen Ausdruck „Leakage“ bezeichnet.

3.7.1.1 ANTS/DPX-Leakage

Die Lipide wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen in CHCl_3 gelöst und 0,02-0,03 mol% Rh-PE (gelöst in CHCl_3) zugegeben. Im N_2 -Strom wurde die Lösung zur Trockne eingedampft und restliches CHCl_3 im Exsikkator unter verringertem Druck über mindestens 3 h entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde in Vesikel-Innenpuffer (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX, 63 mM NaCl, pH 7,0) als 10 mM Lipidsuspension aufgenommen und 10 Gefrier-Tau-Zyklen unzerzogen. Diese Lipid-Stammlösungen wurden bis zum Tag der Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei Bedarf wurden die benötigten Mengen entnommen und durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmessern extrudiert (31-mal) und über Nacht bei RT im Dunklen gelagert. Die sich außerhalb der Vesikel befindlichen Fluorophore und Quencher wurden durch Größenausschlusschromatographie entfernt. Hierzu wurden kleine Säulen (sog. Spin-columns, Volumen 2 mL) mit Sephacryl-100 HR befüllt und mit dem Vesikel-Außenpuffer A (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 150 mM NaCl, pH 7,0) durch mehrfaches Waschen bei jeweils 1500 x g, 2 min konditioniert. Pro Säule wurden maximal 200 μL der 10 mM Vesikel-Lösung aufgetragen und unter denselben Bedingungen eluiert.

Die Peptide wurden in H_2O gelöst und als 1000 μM Stammlösung bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Entsprechende Verdünnungen dieser Stammlösung wurden am Tag der Verwendung im entsprechenden Vesikel-Außenpuffer angesetzt.

Die Messungen wurden in 1,5 mL Gesamtvolumen in 10 mm Quarzglasküvetten (Hellma QS) durchgeführt. Für jede Vesikelpräparation wurde ein Rhodamin-Absorptionsspektrum der Lipidvesikel (540 nm Anregung) aufgenommen um zu prüfen, welcher Lipid-Verlust durch die Extrusion und die Größenausschlusschromatographie vorlag. Die Emission wurde im Bereich von 560-700 nm aufgezeichnet. Das Maximum der Spektren lag bei ca. 585 nm. Als Referenz (100 μM) wurde eine Probe der Vesikel gemessen, die lediglich sonifiziert wurde und somit die ursprüngliche Konzentration aufwies. Für das eigentliche Leakage-Experiment wurde bei einer konstanten Wellenlänge angeregt (355 nm) und die Emission bei einer Wellenlänge (508 nm) im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Die spektralen Bandbreiten betragen jeweils 5 nm. Für die Messungen wurden das jeweilige Peptid in Vesikel-

Außenpuffer A oder Vesikel-Außenpuffer B (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 300 mM Saccharose, pH 7,0) vorgelegt und unter Rühren Vesikel zugegeben, sodass in jeder Messung eine Lipidkonzentration von 100 μM vorlag. 900 s nach der Vesikelzugabe wurden durch die Zugabe von Triton X-100 (20 μL 20 %ige Stammlösung bzw. 0,27 %) die Vesikel vollständig lysiert. Auf den hiermit erhaltenen Wert wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte skaliert. Zusätzlich wurden Blindwert-Experimente durchgeführt (ohne Peptid) um die Stabilität der Vesikel zu überprüfen.

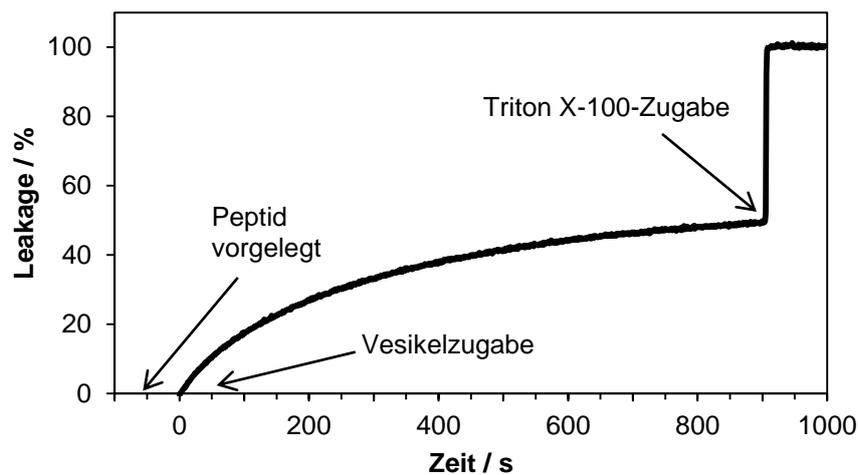


Abb. 3.7 Schematischer Versuchsablauf der Leakage-Experimente

3.7.1.2 Tb^{3+} /DPA-Leakage

Die Lipide wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen in CHCl_3 gelöst und 0,02-0,03 mol% Rh-PE (gelöst in CHCl_3) zugegeben. Im N_2 -Strom wurde die Lösung zur Trockne eingedampft und restliches CHCl_3 im Exsikkator unter verringertem Druck über mindestens 3 h entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde in Vesikel-Innenpuffer (10 mM PIPES, 5 mM TbCl_3 , 10 mM Trinatriumcitrat, 120 mM NaCl, pH 7,0) als 10 mM Lipidsuspension aufgenommen und 10 Gefrier-Tau-Zyklen unternommen. Diese Lipid-Stammlösungen wurden bis zum Tag der Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei Bedarf wurden die benötigten Mengen entnommen und durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmessern extrudiert (31-mal) und über Nacht bei RT im Dunklen gelagert. Die sich außerhalb der Vesikel befindlichen Fluorophore wurden durch Größenausschlusschromatographie entfernt. Hierzu wurden kleine Säulen (sog. Spin-columns, Volumen 2 mL) mit Sephacryl-100 HR befüllt und mit dem Vesikel-Außenpuffer A (10 mM PIPES, 150 mM NaCl pH 7,0) durch mehrfaches Waschen

bei jeweils 1500 x g, 2 min konditioniert. Pro Säule wurden maximal 200 μL der 10 mM Vesikel-Lösung aufgetragen und unter denselben Bedingungen eluiert.

Die Peptide wurden in H_2O gelöst und als 1000 μM Stammlösung bei 4 °C aufbewahrt. Entsprechende Verdünnungen dieser Stammlösung wurden am Tag der Verwendung im entsprechenden Vesikel-Außenpuffer angesetzt. Die Messungen wurden in 1,5 mL Gesamtvolumen in 10 mm Quarzglasküvetten (Hellma QS) durchgeführt. Für jede Vesikelpräparation wurde ein Rhodaminspektrum der Lipidvesikel (540 nm Anregung) aufgenommen um zu prüfen, welcher Konzentrationsverlust durch die Extrusion und die Größenausschlusschromatographie vorlag. Die Emission wurde im Bereich von 560-700 nm aufgezeichnet. Das Maximum der Spektren lag bei ca. 585 nm. Als Referenz (100 μM) wurde eine Probe der Vesikel gemessen, die lediglich sonifiziert wurde und somit die ursprüngliche Konzentration aufwies.

Für das eigentliche Leakage-Experiment wurde bei einer konstanten Wellenlänge angeregt (278 nm) und die Emission bei einer Wellenlänge (488 nm) im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Die spektralen Bandbreiten betragen 5 nm für die Anregung und 3 nm für die Emission. Für die Messungen wurden das jeweilige Peptid in Vesikel-Außenpuffer A oder Vesikel-Außenpuffer B (10 mM PIPES, 300 mM Saccharose, pH 7,0) vorgelegt und unter Rühren Vesikel zugegeben, sodass in jeder Messung eine Lipidkonzentration von 100 μM vorlag. 900 s nach der Vesikelzugabe wurden durch die Zugabe von Alamethicin (5 μL einer 1mg/mL Stammlösung) die Vesikel vollständig lysiert. Auf den hiermit erhaltenen Wert wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte skaliert. Zusätzlich wurden Blindwert-Experimente durchgeführt (ohne Peptid) um die Stabilität der Vesikel zu überprüfen.

3.7.1.3 Membranpotentiale durch Valinomycin

Die Vorbereitung der Lipide und die Herstellung der Vesikel erfolgte analog zu Kapitel 4.7.1.1, mit folgender Abänderung: Es wurden zwei Ansätze hergestellt ein Ansatz mit Vesikel-Innenpuffer A (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX, 63 mM NaCl, pH 7,0) und ein Ansatz in Vesikel-Innenpuffer B (10 mM PIPES-Dikaliumsalz, 12,5 mM ANTS, 45 mM DPX, 63 mM KCl, pH 7,0), sodass Vesikel mit niedriger und hoher K^+ -Innenkonzentration entstanden. Auch die Außen-Puffer wurden geändert. Es wurde in Außenpuffer A (10 mM PIPES, 150 mM NaCl, pH 7,0) und Außenpuffer B (10 mM PIPES, 150 mM KCl, pH 7,0) gemessen

Der Versuchsablauf wurde ebenfalls angepasst. Es wurden Vesikel in der Küvette vorgelegt, nach 100 s wurde 5 μL Valinomycin-Stammlösung (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugegeben und nach 300 s das Peptid. Durch den K^+ -selektiven Carrier Valinomycin stellt sich gemäß der Nernst'schen

Beziehung ein Membranpotential entsprechend der im Innen- und Außenpuffer vorliegenden K^+ -Konzentrationen ein (siehe Abb. 3.8).

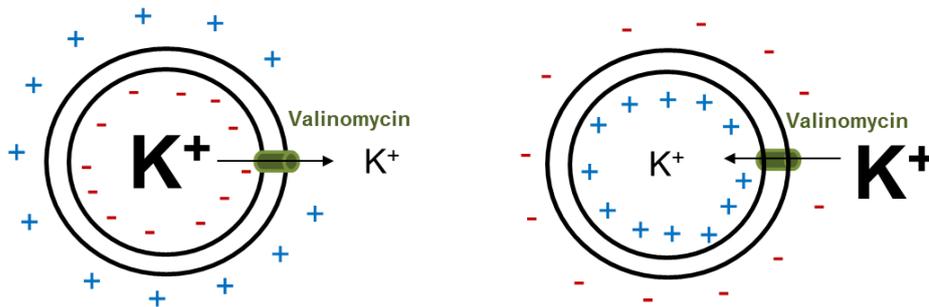


Abb. 3.8 Veranschaulichung des Membranpotentials nach Zugabe von Valinomycin. Hohe K^+ -Konzentrationen in den Vesikeln ergeben nach der Zugabe des Valinomycins ein positives Potential außen, während hohe K^+ -Außenkonzentrationen zu einem außen negativen Potential führen.

3.7.2 NBD-Bindungstest

Zur Quantifizierung von membrangebundenen Peptiden wurde auf ein von Gazit *et al.* eingeführtes fluoreszenzspektroskopisches Verfahren zurückgegriffen [78]. Hierbei wird die Eigenschaft des Farbstoffs 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD) ausgenutzt, in hydrophober Umgebung etwa 20-fach stärker zu fluoreszieren als in wässriger Umgebung.

Mittels N-terminaler Farbstoffkupplung (Kapitel 3.1.1.3) wurde an ein DCD-1L Wildtyp Peptid vor der Abspaltung vom Harz der N-Terminus des Peptids mit NBD-Cl umgesetzt.

Die Lipide (POPC, POPG) für die Vesikel eingewogen und in $CHCl_3$ gelöst und 1,3 μL Rh-PE-Stammlösung zugesetzt um später die Konzentration der hergestellten Vesikel zu überprüfen. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Lösung im N_2 -Strom getrocknet und restliches Lösungsmittel über 4 h im Vakuum entfernt. Die Lipide wurden mit Puffer (300 mM Saccharose, 10 mM PIPES, pH 7,0) versetzt, sodass eine Konzentration von 10 mM Lipid erreicht wurde. Nach gründlichem vortexen wurde die Lipidmischung 10 Gefrier-/Tauzyklen (-196 °C/30 °C) unterzogen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die benötigten Mengen entnommen und durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmessern 31-mal extrudiert.

Das Peptid wurde als 10 μM Stammlösung eingesetzt und in der Küvette auf eine Endkonzentration von 100 nM verdünnt.

Vor jeder Messung wurden Lipidstammlösung und Peptidstammlösung in eine 10 mm Fluoreszenz-Küvette (Hellma Analytics) pipettiert, mit Puffer auf 1500 μL aufgefüllt und gemischt. Die Konzentration des Peptides wurde konstant gehalten und die Lipidmenge variiert. Die Probe wurde bei einer Wellenlänge von 464 nm angeregt und

Emissionsspektren von 480 bis 700 nm aufgezeichnet. Anregung und Emission erfolgten mit einer spektralen Bandbreite von 6 nm.

Die Auswertung erfolgte analog zu Melo et al. [79]. Hiernach gilt für den membrangebundenen Peptidanteil X_{geb} :

$$X_{geb} = \frac{K_p \gamma_L [L]}{1 + K_p \gamma_L [L]} \quad (3.1)$$

Wobei K_p der Verteilungskoeffizient und γ_L das molare Volumen der Lipide ist.

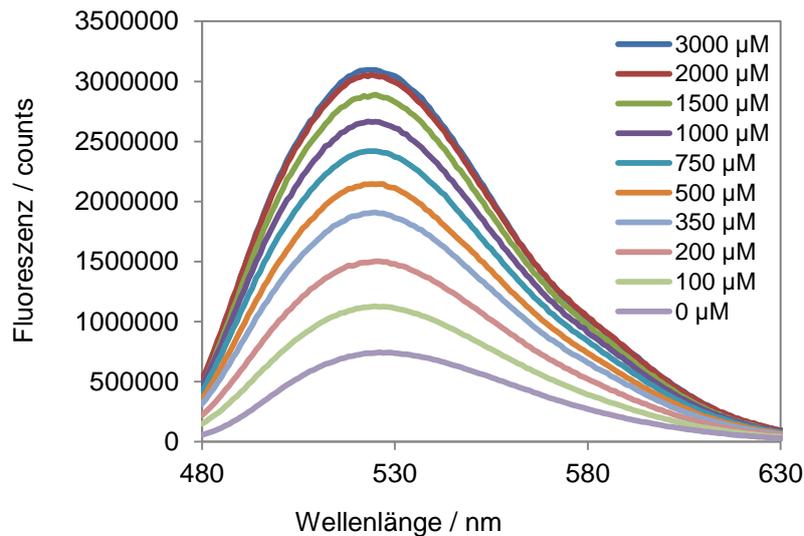


Abb. 3.9 Beispielspektren eines Bindungstests. Die Fluoreszenzintensität des NBD nimmt mit zunehmender Lipid-Konzentration zu.

Die Maxima dieser Spektren wurden bei ca. 528 nm abgelesen, der auf das Maximum der reinen Peptidprobe referenziert und in Abhängigkeit der Lipidkonzentration aufgetragen. An die Datenpunkte wurde an die Beziehung 3.1 angepasst, wodurch sich das Sättigungsmaximum wie auch die Assoziationskonstante K_a ergaben. K_a steht mit K_p in folgender Beziehung:

$$K_p = K_a * \gamma_L \quad (3.2)$$

3.7.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Die Lipide wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen in CHCl_3 gelöst und 0,02-0,03 mol% Rh-PE (gelöst in CHCl_3) zugegeben. Im N_2 -Strom wurde die Lösung zur Trockne eingedampft und restliches CHCl_3 im Exsikkator unter verringertem Druck über mindestens 3 h entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde in Vesikelpuffer (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 300 mM Saccharose, pH 7,0) als 10 mM Lipidsuspension aufgenommen und 10 Gefrier-Tau-Zyklen unzerzogen. Diese Lipid-Stammlösungen wurden bis zum Tag der Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei Bedarf wurden die benötigten Mengen entnommen und durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmessern 31-mal extrudiert.

Die Peptide wurden in H_2O gelöst und als 1000 μM Stammlösung bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Entsprechende Verdünnungen dieser Stammlösung wurden am Tag der Verwendung im entsprechenden Vesikel-Außenpuffer angesetzt. Die gewünschten Mengen 10 mM Lipidstammlösung wurden mit den Peptiden, der ZnSO_4 -Stammlosung gemischt und mit Vesikel-Puffer auf 1500 μL aufgefüllt, sodass in jeder Probe 200 μM Lipide, 10 μM Zn^{2+} und 0,5 μM Peptide (für P/L 1:400) oder 4 μM (für P/L 1:50) vorlag. Es wurde bei 290 nm angeregt und ein Spektrum von 300-565 nm aufgezeichnet. Die spektralen Bandbreiten für Anregung und Emission waren 5 nm für P/L 1:400 und 3 nm für P/L 1:50. Es wurden Peptidmischungen aus Dansyl-DCD-1L und W-DCD-1L bzw. DCD-1WL gemessen. Als Referenzmessungen dienten Proben aus DCD-1L wt und Dansyl-DCD-1L, DCD-1WL oder W-DCD-1L. Die Maxima dieser Spektren wurden bei 345 nm (Maximum von Trp) und 480 nm (Maximum von Dansyl) abgelesen. Die Werte wurden bei 345 nm um die Intensität des Dansyl-DCD-1L, gewichtet nach dem Dansyl-DCD-1L-Anteil der Probe, korrigiert und bei den Referenzmessungen um die Intensität des DCD-1L wt.

3.7.4 Vesikelbasierter CPP Test

Die Lipide wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen in CHCl_3 gelöst und 0,02-0,03 mol% Rh-PE (gelöst in CHCl_3) zugegeben. Im N_2 -Strom wurde die Lösung zur Trockne eingedampft und restliches CHCl_3 im Exsikkator unter verringertem Druck über mindestens 3 h entfernt. Der getrocknete Lipidfilm wurde in Vesikel-Innenpuffer (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 50 mM Saccharose, 10 mg/mL Chymotrypsin, pH 7,0) als 10 mM Lipidsuspension aufgenommen und 10 Gefrier-Tau-Zyklen unzerzogen. Diese Lipid-Stammlösungen wurden bis zum Tag der Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei Bedarf wurden die benötigten Mengen entnommen und durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmessern extrudiert (31-mal) und über Nacht bei RT im Dunklen gelagert. Das

sich außerhalb der Vesikel befindliche Chymotrypsin wurde durch Größenausschlusschromatographie entfernt. Hierzu wurden Minisäulen zur Zentrifugation mit Sephacryl-500 HR befüllt, mit dem Vesikel-Außenpuffer (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 50 mM Saccharose, pH 7,0) mehrfach gewaschen und jeweils bei 1500 x g 2 min zentrifugiert um die Säule zu konditionieren. Eine geringe Menge Vesikel (max. 200 μ L der 10 mM Stammlösung) Vesikel wurden pro Säule (2 mL Säulenmaterial) unter denselben Bedingungen eluiert.

Die Peptide wurden in H₂O gelöst und als 1000 μ M Stammlösung bei 4 °C aufbewahrt. Entsprechende Verdünnungen dieser Stammlösung wurden am Tag der Verwendung im entsprechenden Vesikel-Außenpuffer angesetzt.

Die Durchführung der Experimente erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift aus einer Veröffentlichung von Marks et al. [80]. Das Peptid wurde in Vesikel-Außenpuffer in einer Konzentration von 2 μ M vorgelegt, 300 μ L 1 mg/mL Antitrypsin und nach Bedarf ZnSO₄-Stammlösung zugegeben. Nach 100 s wurden 100 μ M Vesikel zugegeben. Nach weiteren 900 s wurde, 300 μ L 10 mg/mL Chymotrypsin zugegeben um eine vollständige Abspaltung des Aca und somit einen Maximalwert (100 %) zu erhalten.

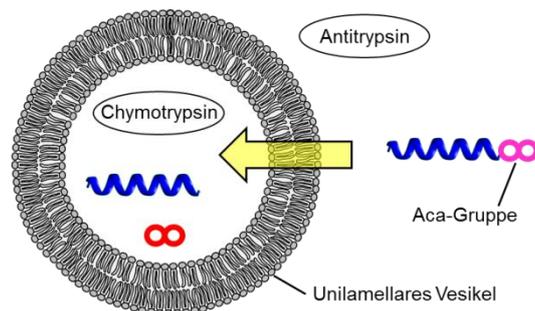


Abb. 3.10 Schematische Darstellung des vesikelbasierten CPP Tests. Die Aca-Abspaltung erfolgt durch Chymotrypsin nach der Translokation in die Vesikel. Das Fluoreszenz-Maximum des Aca-Rests wird zu höheren Wellenlängen verschoben.

3.7.5 Bestimmung des Hill-Koeffizienten

Die initialen Transferraten des vesikelbasierten CPP Tests wurden genutzt, um zu aufzuzeigen, ob der Membrandurchtritt linear oder kooperativ erfolgt. Die Vorbereitung der Lipidvesikel und der Peptidstammlösungen erfolgte wie in Kapitel 3.7.4. Für diese Messungen wurden jeweils 50 μ M Lipid eingesetzt und auf das Antitrypsin im Außenpuffer verzichtet. Die Messungen erfolgten analog zu Kapitel 3.7.4. Die Peptidkonzentration variierte zwischen 62,5 nM und 3 μ M. Die initialen Transferraten im Bereich < 10 s wurden gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und an eine Hill-Funktion (siehe Kapitel 9.1.5.3) angepasst.

4 Ergebnisse

4.1 Synthese und Aufreinigung der Peptide

Im Verlauf dieser Arbeit waren viele unterschiedliche Peptide nötig um die aufgestellten Hypothesen zu untersuchen und gegebenenfalls zu bestätigen. Hier aufgelistet sind alle Peptide, die in den folgenden Kapiteln 4.2 – 4.4 die Grundlage aller weiteren Experimente waren.

Hierzu wurden nicht nur Wildtypsequenzen synthetisiert und modifiziert, sondern auch das dem DCD-1L inhärente Motiv des Ladungsreißverschlusses (siehe Kapitel 1.5) modifiziert. Die beiden Analoga DCD-1L „A“ und DCD-1L „P“ sollten das Motiv in Richtung zweier Extreme hin ändern. DCD-1L „A“ besaß eine verbesserte Verteilung der einzelnen Ladungen während DCD-1L „P“ alle positiven Ladungen im N-Terminus konzentrierte. Hierzu wurden jeweils zweimal die Aminosäuren eines Paares im Ladungsreißverschlussmotiv ausgetauscht. Das Analoga DCD-1L „C“ entstand durch den Austausch dreier Aminosäurepaare die sich nicht im Motiv gegenüber standen. Auf diese Weise sollte ein Kontrollpeptid entstehen, welches kein solches Motiv besitzt und dieses folglich nicht zur Assemblierung eines Oligomers eingesetzt werden konnte. Dieses Motiv ermöglicht sowohl ein intramolekulare Strukturausbildung eines Monomers durch Rückfaltung des C-Terminus auf den N-Terminus (Abb. 1.8) als auch eine Antiparallele Oligomerisierung (Abb. 1.9). Auch eine Mischung aus intra- und Intermolekularen Salzbrücken wäre denkbar und würde zu einer Assemblierung wie in Abb. 1.8 führen.

Tab. 4.1 Das Ladungsreißverschluss-Motiv in Dermcidin-Peptiden und den designten Analoga DCD-1L „A“, DCD-1L „P“ und DCD-1L „C“. Die Spiegelebene der Ladungen des Wildtyp-Motives ist dunkelrot in der Sequenz der Peptide durch eine Vertikale Linie dargestellt. Alle positiv geladenen Aminosäuren sind blau, alle negativ geladenen Aminosäuren rot dargestellt.

Peptid	Sequenz	Spiegelebene des Ladungsreißverschluss-Motives
SSL-25	--+ - ++ + + - SSLLE E KGLDG AKKAVGGL G K LGK DA	
DCD-1L wt	--+ - ++ + + - - - + - +- - SSLLE E KGLDG AKKAVGGL G K LGK DAV E DL E SV G K G AVHDV K DVLD S VL	
DCD-1L „A“	--+ - +- - + - ++ - + - +- - SSLLE E KGLDG AKD A VGGL E LGK DAV K K L E SV G K G AVHDV K DVLD S VL	
DCD-1L „P“	++ + ++ + + - - - - - - - SSLL K KGL K G AKKAVGGL G K LGK DAV E DL E SV G E G AVHDV E DVLD S VL	
DCD-1L „C“	+- - +- + + + - - + - - +- - SSLL E KGLDG AKD A VGGL G K LGK K AV E DL K SV G E G AVHDV K DVLD S VL	

Die in Tabelle 4.2 aufgeführten Peptide dienten in erster Linie dem Studium der Struktur und der antimikrobiellen Funktionsweise in Versuchen, die keine zusätzliche Markierung erforderten. Die Wildtyp-Peptide, SSL-25 und DCD-1L, an manchen Stellen auch als SSL-25 wt und DCD-1L wt bezeichnet, waren wohl die am meisten verwendeten Peptide der vorliegenden Arbeit. Nach ersten Erkenntnissen über die antimikrobiellen Eigenschaften der Dermcidin-Peptide wurde das Peptid DCD-1 K6Ac synthetisiert, da eine ausführliche Abhandlung über Acetylierungen in Peptiden nahelegte, dass der erste Lysinrest der DCD-1L-Sequenz acetyliert sei [81]. Gleichzeitig zeigten andere Quellen, dass die letzte Aminosäure des DCD-1L in menschlichem Schweiß schnell durch eine Carboxypeptidase entfernt wird [33, 42]. Daher wurden die Peptide DCD-1 und DCD-1 K6Ac synthetisiert und auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften hin untersucht (Kapitel 4.3).

Es wurden zwei weitere DCD-1L-Peptide, DCD-1L via DmbGly und DCD-1L D9E, synthetisiert um eine eventuell auftretende Succinimid-Umlagerung an dem DG-Motiv zu verhindern. Mit einem Dmb-geschützten Gly wurde diese Umlagerung während der gesamten Synthese verhindert. Danach wurde die Dmb-Schutzgruppe abgespalten. Um ebenfalls eine nach der Synthese stattfindende Umlagerung zu verhindern wurde das DG-Motiv durch Ersetzen des Asp durch Glu entfernt.

Die nicht-markierten Analoga DCD-1L „A“ und DCD-1L „P“ wurden ebenfalls für antimikrobielle Untersuchungen benötigt. Das Peptid DCD-1L allK entstand aus Vergleichen der Helikalen-Rad-Projektion von DCD-1L und anderen, kationischen AMPs. DCD-1L zeigte eine klare hydrophobe Region auf seiner Helix, sowie eine ihr gegenüber liegende geladene, hydrophile Seite. AMPs mit solchen Strukturen sind jedoch häufig stark positiv geladen [4]. Daher wurden alle anionische Aminosäurereste, Aspartat und Glutamat, durch Lysinreste ersetzt, was ein stark positiv geladenes DCD-1L-Analogon zur Folge hatte.

Tab. 4.2 Sequenzen aller Peptide ohne Markierung. Aminosäuren, die von der Wildtyp-Sequenz abweichen sind rot markiert.

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
SSL-25	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA	2412,8
DCD-1	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV	4705,3
DCD-1 K6Ac	SSLLEK(Ac)GLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV	4733,3
DCD-1L	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSVL	4818,5
DCD-1L via DmbGly	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSVL	4818,5
DCD-1L D9E	SSLLEKGL E G AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSVL	4832,5
DCD-1L „A“	SSLLEKGLDG AK D AVGGL G E LGKDAV K KLE SVGKGAVHDV KDVLDVSVL	4818,5
DCD-1L „P“	SSL L K KGL K G AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SV G E GAVHDV E DVLDVSVL	4832,5
DCD-1L allK	SSL L K KGL K G AKKAVGGLGK LG K KAV K K L K SVGKGAVH K V K K V L K SVL	4894,1

Die in Tabelle 4.3 aufgeführten Peptide dienen in Festkörper-NMR-Experimenten dazu die Orientierung in Relation zu einer Membran zu bestimmen. In Kapitel 4.2.3 sind die entsprechenden Ergebnisse aus diesen Untersuchungen aufgezeigt. Die Positionen der ¹⁵N-markierten Aminosäuren wurden so gewählt, dass diese einerseits in Bereichen liegen, die anhand Chou-Fasman-Berechnungen α -helikal sind [45] und andererseits auf der hydrophoben Seite der DCD-1L-Helix (Abb. 1.6) liegen.

Tab. 4.3 Sequenzen aller Peptide für die ¹⁵N-FestkörperNMR-Spektroskopie. Die ¹⁵N-markierten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die unterstrichenen Bereiche markieren die α -helikalen Bereiche nach Chou-Fasman-Berechnungen [45].

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
DCD-1L ¹⁵ N-L8	<u>SSLLEKGL</u> L DG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE <u>SVGKGAVHDV</u> <u>KDVLDVSVL</u>	4819,5
DCD-1L ¹⁵ N-L29	<u>SSLLEKGLDG</u> AKKAVGGLGK LGKDAVED L E <u>SVGKGAVHDV</u> <u>KDVLDVSVL</u>	4819,5
DCD-1L ¹⁵ N-V40	<u>SSLLEKGLDG</u> AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE <u>SVGKGAVHDV</u> <u>KDVLDVSVL</u>	4819,5

Für Bindungsexperimente (Kapitel 4.2.4) wurde eine Markierung an den Peptiden benötigt, deren Fluoreszenz stark von ihrer Umgebung abhängt. Daher wurden die N-Termini von SSL-25 und DCD-1L mit NBD-Cl markiert.

Tab. 4.4 Sequenzen aller Peptide für den NBD-Bindungstest

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
NBD-SSL-25	NBD- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA	2575,9
NBD-DCD-1L	NBD- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV	4981,6

Für anschließende Messungen des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) wurden Peptide mit zwei zueinander kompatiblen Fluoreszenzmarkern, in diesem Fall Tryptophan und Dansyl, benötigt. Um zu unterscheiden, ob eine eventuelle Oligomerisierung mehr parallelen oder antiparallelen Charakter aufweist wurden sowohl der N-Terminus von DCD-1L als auch der C-Terminus mit einem zusätzlichen Tryptophan versehen. Da die Synthese von DCD-1L auf die Verwendung eines Leucin-beladenen Harzes beruhte, wurde das C-terminale Trp an vorletzter Stellen der Sequenz eingefügt. Um einen eventuellen intramolekularen FRET nachzuweisen wurde ebenfalls ein doppelt markiertes DCD-1L-Analogon hergestellt. Alle Peptide aus den Tabellen 4.2 - 4.5 konnten mittels Festphasensynthese hergestellt, mit HPLC gereinigt und an einer LC/MS charakterisiert werden.

Tab. 4.5 Sequenzen aller Peptide für die FRET-Oligomerisierungsstudien

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
W-DCD-1L	W SSLLEKGLD GAKKAVGGLG KLGKDAVEDL ESVGKGAVHD VKDVLDVSVL	5004,7
DCD-1WL	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV WL	5004,7
Dansyl-DCD-1L	Dansyl- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSVL	5051,8
Dansyl-DCD-1WL	Dansyl- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDVSV WL	5238,0

Für den vesikelbasierten Translokationstest wurden Peptide mit einer Erkennungssequenz für eine optimale Chymotrypsin-Abspaltung (Gly-Gln-Phe, GQF), sowie das detektierbare Fluorophor Aca an C-Terminaler Stellen inkorporiert. Da die Synthese von DCD-1L auf die Verwendung eines Leucin-beladenen Harzes beruhte, wurde diese Sequenz an vorletzter Stellen der Sequenz eingefügt. Die Synthese der in Tabelle 4.6 aufgelisteten Peptide erwies

sich als herausfordernd. Die manuelle Kupplung des Fmoc-geschützten Aca erfolgte auch unter Verwendung optimierter Kupplungsreagenzien (3.1.1.4) und Bedingungen meist nur unvollständig. Nach einer dreifachen Kupplung wurde alle noch freien Aminotermini acetyliert und die Synthese fortgesetzt. Auch die nächsten beiden Aminosäuren wurden manuell gekuppelt. Die Kupplung von Phe erwies sich als sehr reaktionsträge. Selbst eine dreifache Kupplung mit 10 Äq und dem reaktiven Kupplungsreagenz TFFH hatte nur eine unvollständige Umsetzung zur Folge, sodass erneut alle noch freien Aminotermini des Harzes acetyliert wurden. Die manuelle Kupplung der nächsten Aminosäure Glutamin konnte wieder unter Standardbedingungen durchgeführt werden, sodass ab der darauffolgenden Kupplung die Synthese automatisch an dem Multiplen Peptidsynthesizer fortgesetzt werden konnte. Die Peptide aus Tabelle 4.6 konnten daher zwar alle mittels Festphasensynthese hergestellt, mit HPLC gereinigt und an einer LC/MS charakterisiert werden, dennoch waren die erhaltenen Peptidmengen meist ca. 80 % geringer, als bei den Synthesen der Wildtyppeptide.

Tab. 4.6 Sequenzen aller Peptide für den Vesikel-Translokationstest. Helikale-Netz-Darstellungen der DCD-1L wt-, „A“- , „P“- , „C“- , „P2“- und „P3“-Sequenzen befinden sich im Anhang (Kapitel 9.5)

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
SSL-24-GQF-Aca-A	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDGQF -Aca-A	2946,5
DCD-1-GQF-Aca-L	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVGQF -Aca-L	5352,2
DCD-1-GQF-Aca-L „A“	SSLLEKGLDG AKDAVGGLGE LGKDAVKKLE SVGKGAVHDV KDVLDSVGQF -Aca-L	5352,2
DCD-1-GQF-Aca-L „C“	SSLLKEGLDG AKDAVGGLGK LGKKAVEDLK SVGEGAVHDV KDVLDSVGQF -Aca-L	5352,2
DCD-1-GQF-Aca-L „P“	SSLLKKGLKG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGEGAVHDV EDVLDSVGQF -Aca-L	5366,2
DCD-1-GQF-Aca-L H38A	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVADV KDVLDSVGQF -Aca-L	5286,2
DCD-1-GQF-Aca-L „P2“	SSLLEKGLDK AGDKAVGGLG EKLGDKAVLE KSVGDKGAVH VDVLDSVGQF -Aca-L	5352,2
DCD-1-GQF-Aca-L „P3“	SSLLKEGLKD AGKDAVGGLG KELGKDAVLK ESVGKDGAVH VDVLDSVGQF -Aca-L	5352,2

Die Peptide in den Tabellen 4.7 und 4.8 wurden hauptsächlich für Translokations- und Lokalisationsstudien benötigt. Da Peptide mit Rhodamin B-markierten N-Termini im Verlauf dieser Arbeit zu einigen Problemen führen wurden einige Dermcidin-Peptide ebenfalls mit Carboxyfluorescein markiert. Alle Peptide aus Tabelle 4.7 und 4.8 konnten mittels automatisierter Festphasensynthese hergestellt, mit HPLC gereinigt und an einer LC/MS charakterisiert werden.

Tab. 4.7 Sequenzen aller Rhodamin B-markierten Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
Rh-SSL-25	Rh- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA	2837,3
Rh-SSL-25-Lifeact	Rh- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAMGVAD LIKKFESISK EE	4743,5
Rh-Lifeact	Rh- MGVADLIKKF ESISKEE	2348,7
Rh-DCD-1L	Rh- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL	5243,0
Rh-DCD-1L „A“	Rh- SSLLEKGLDG AKDAVGGLGE LGKDAVKKLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL	5243,0
Rh-DCD-1L „P“	Rh- SSLLKKGKLG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGEGAVHDV EDVLDSVL	5257,0
Rh-DCD-1L „C“	Rh- SSLLKEGLDG AKDAVGGLGK LGKKAVEDLK SVGEGAVHDV KDVLDSVL	5243,0

Tab. 4.8 Sequenzen aller Carboxyfluorescein-markierten Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	M _w / g/mol
CF-SSL-25	CF- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA	2771,1
CF-DCD-1L	CF- SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL	5176,8

4.2 Strukturuntersuchungen

4.2.1 CD-Spektroskopie

Mit CD-spektroskopischen Methoden sollte untersucht werden welche Sekundärstrukturen Dermcidin-Peptide unter bestimmten Umgebungsbedingungen aufweisen. Bereits die ersten CD-Spektren zeigten, dass sich DCD-1L wt bezüglich seiner Sekundärstruktur nicht deutlich von SSL-25 unterscheidet, was etwa aufgrund seiner negativen Ladung erwartet wurde. Beide Peptide waren in Phosphatpuffer und in Gegenwart von zwitterionischen Lipidvesikeln wie DMPC-Vesikeln weitgehend unstrukturiert. Sie weisen nur in anionischen Detergenzien wie SDS und in Gegenwart von anionischen Lipidvesikeln wie DMPC/DMPG (7:3)-Vesikeln eine α -helikale Sekundärstruktur auf.

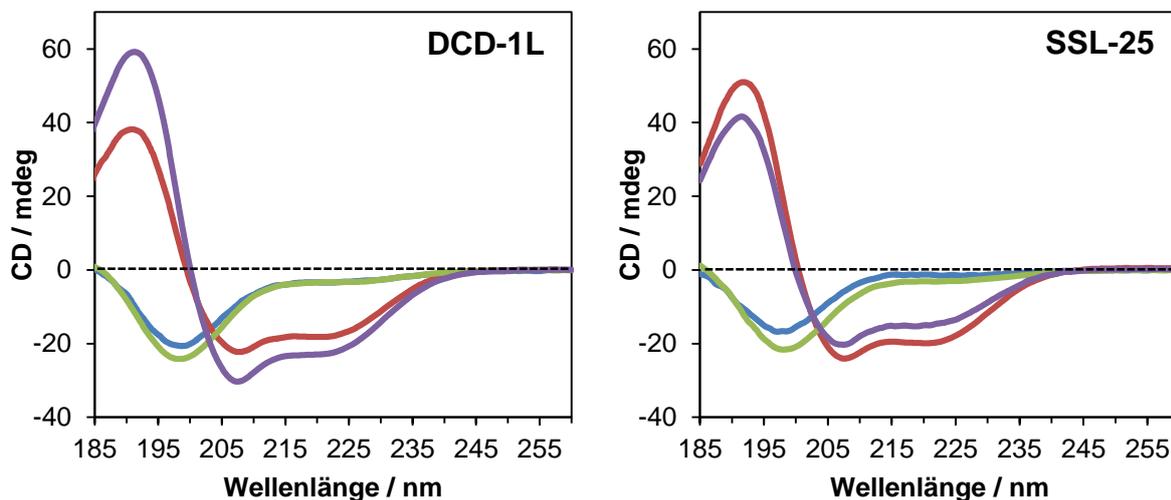


Abb. 4.1 CD-Spektren von 150 $\mu\text{g/mL}$ (ca. 31,1 μM) DCD-1L wt (links) und (ca. 62,2 μM) SSL-25 wt (rechts) in unterschiedlichen Umgebungen. In 10 mM Phosphatpuffer (grün) und in Gegenwart von ungeladenen Lipidvesikeln wie DMPC (blau, P/L 1:50) liegen DCD-1L und SSL-25 unstrukturiert vor. In anionischen Detergenzien wie 25 mM SDS (violett) und in Gegenwart von anionischen Lipidvesikeln (rot, DMPC/DMPG 7:3) liegt es überwiegend α -helikal vor. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Der Einfluss der Salzkonzentration in den Proben auf die Konformation der Dermcidin-Peptide wurde untersucht, da das Peptid in seiner natürlichen Umgebung, im menschlichen Schweiß, meist in ca. 50 millimolarer Salzlösung (ca. 40 mM NaCl, 5 mM KCl neben weiteren Salzen) vorliegt [82]. Die CD-Spektren wurden zunächst mit variierenden NaF-Konzentrationen gemessen (Abb. 4.2, links) um abzuschätzen, welchen Einfluss auf die Sekundärstruktur Salze besitzen. NaF wurde verwendet, da Cl^- aufgrund seiner hohen Eigenabsorption die CD-Messungen im niederwelligen Bereich stört und eine genaue Betrachtung des Maximums eines α -Helix-Spektrums bei ca. 190 nm in höheren

Konzentrationen unmöglich macht. Nichtsdestotrotz wurde eine vergleichbare Messreihe mit NaCl durchgeführt (Abb. 4.2, rechts) um durch Vergleich der nichtgestörten Bereiche abzuschätzen, ob DCD-1L unterschiedlich durch F^- und Cl^- beeinflusst wurde. Beide Versuchsreihen, NaF- und NaCl-Titration, in Gegenwart von DMPC/DMPG (7:3)-Vesikeln zeigten ähnliche Tendenzen in der Spektren-Serie. In beiden Fällen wurde durch erhöhte Salzkonzentration die α -helikale Sekundärstruktur zunehmend entfaltet und das Peptid nahm eine ungeordnete Struktur an. Die zunehmende Störung des CD-Signals durch Cl^- konnte auch beobachtet werden (Abb. 4.2, rechts). Die Spektren wurden bei steigendem Salzgehalt bereits bei längeren Wellenlängen gestört. Bei 150 mM NaCl schließlich waren die Spektren nur bis ca. 200 nm aussagekräftig. Der Übergang zwischen beiden Sekundärstrukturen verlief graduell mit der Salzkonzentration und alle Spektren schneiden sich genau in einem Punkt, den sogenannten isodichroitischen Punkt. Es sind also keine weiteren dominanten Intermediat-Sekundärstrukturen vorhanden, welche beim Übergang von ungeordneter zu α -helikaler Sekundärstruktur auftreten. Der Einfluss von NaF auf die Entfaltung von DCD-1L ist höher. So wird bei 50 mM NaF eine fast ungeordnete Struktur beobachtet, bei 50 mM NaCl jedoch ist noch ein deutlich helikaler Anteil zu erkennen.

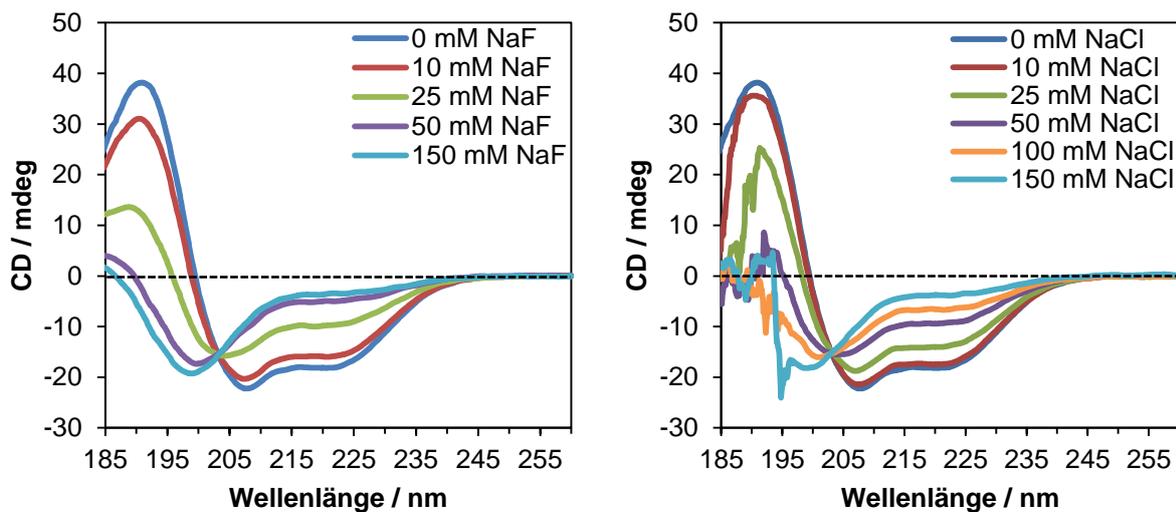


Abb. 4.2 CD-Spektren von 31,1 μ M DCD-1L wt in DMPC/DMPG (7:3)-Vesikeln mit 10 mM PB bei P/L 1:50 und pH 7,0. Es wurde sowohl mit NaF (links) als auch mit NaCl (rechts) titriert und für jede Konzentration eine separates Spektrum samt Referenz gemessen. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Mit dem Einfluss von Zn^{2+} -Ionen auf Dermcidin-Peptide haben sich bereits einige Studien beschäftigt. Diese Studien konzentrierten sich entweder auf die antimikrobielle Wirkung und deren Verstärkung durch Zn^{2+} -Ionen oder beschäftigten sich mit der Zn^{2+} -abhängigen Oligomerisierung [45, 47]. Um den direkten Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur zu untersuchen wurden CD-Messungen in Gegenwart von Zn^{2+} durchgeführt. Für alle CD-Experimente ist eine Kontrolle des pH-Wertes von großer Bedeutung, da einerseits das

Verhalten vieler Peptide stark pH-abhängig ist und andererseits die in diesen Experimenten verwendeten Peptide unter HCl-sauren Bedingungen auf der HPLC gereinigt wurden und in Wasser gelöst sauer reagierten. Der bisher verwendete Phosphatpuffer konnte jedoch nicht verwendet werden um in Gegenwart von Zn^{2+} Messungen durchzuführen, da Zn^{2+} in Gegenwart des Phosphats als unlösliches $Zn_3(PO_4)_2$ ausfallen würde und so weder Zn^{2+} in Lösung anwesend noch die Lösung ausreichend gepuffert wäre. Die meisten gängigen Puffer stören jedoch bei CD-Messungen erheblich. Als Puffersystem wurde auf 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) ausgewichen, was Vergleiche in Bereichen < 195 nm unmöglich machte. Es wurden CD-Spektren mit zunehmender NaF-Konzentration ähnlich wie in Abb. 4.2 gemessen bis DCD-1L völlig unstrukturiert bei 150 mM vorlag (Abb. 4.3, links). Nun wurde unter diesen Bedingungen Zn^{2+} zugegeben, was zu einer Rückfaltung in eine α -helikale Struktur führte (Abb. 4.3, rechts). Dieser Effekt konnte dadurch begründet werden, dass Zn^{2+} die Bindung von DCD-1L an eine Lipiddoppelschicht durch Interaktion mit den Phosphatgruppen der Lipide und der Histidin-Seitengruppe des Peptids verstärkte (siehe Kapitel 4.2.4) [83].

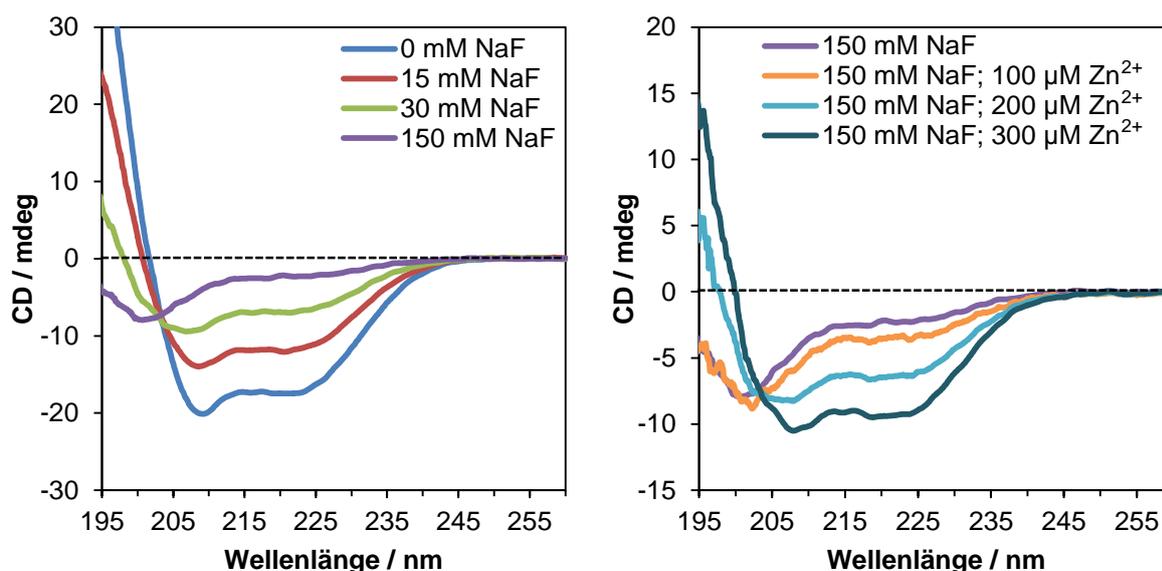


Abb. 4.3 CD-Spektren von 31,1 μ M DCD-1L wt in DMPC/DMPG (3:1)-Vesikeln mit 10 mM MES bei P/L 1:50 und pH 6,0. Es wurde zunächst die NaF-Zugabe erhöht (links) bis DCD-1L wt fast völlig unstrukturiert vorlag bei 150 mM NaF (violett). Unter diesen Bedingungen wurde nun die Zn^{2+} -Konzentration stetig erhöht (rechts). Die Ausbildung einer α -helikalen Struktur mit charakteristischen Minima bei 208 und 220 nm war spätestens bei 300 μ M Zn^{2+} deutlich zu erkennen. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in Kapitel 4.2.4 ausführliche Bindungsuntersuchungen von Dermcidin-Peptiden an Lipiddoppelschichten durchgeführt und der Einfluss von Salzen und besonders Zn^{2+} untersucht.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Ausbildung der Sekundärstruktur bzw. auf die damit einhergehende Bindung an eine Lipiddoppelschicht wurde in separaten CD-Experimenten mit ungeladenen DMPC-Vesikeln untersucht (Abb. 4.4). Es zeigte sich, dass eine Absenkung des pH-Wertes auf 5,0 eine deutliche Helixstruktur und somit anscheinend eine Bindung des Peptids an die zwitterionische Lipiddoppelschicht zur Folge hatte.

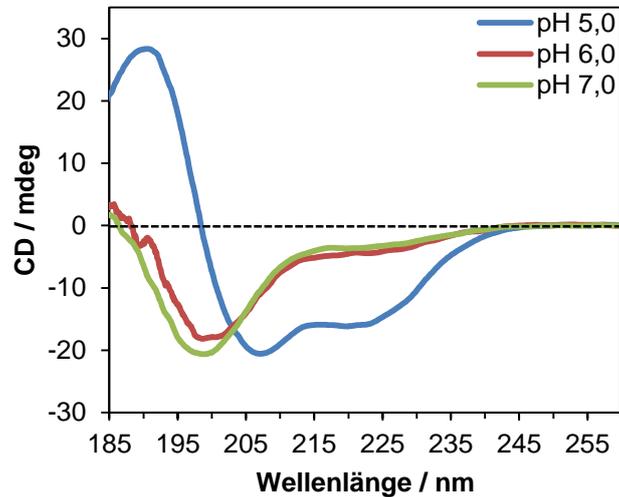


Abb. 4.4 CD-Spektren von 31,1 µM DCD-1L wt in DMPC-Vesikeln bei P/L 1:50. Der pH-Wert wurde durch 10 mM PB auf pH 7, durch 10 mM MES auf pH 6 und durch Probenvorbereitung in H₂O auf pH 5 eingestellt. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Im Folgenden wurde untersucht, bei welchen SDS-Konzentrationen DCD-1L eine überwiegend α-helikale Struktur annimmt, da für weiterführende Experimente sichergestellt werden sollte, dass das Peptid bereits bei Zugabe einer SDS-haltigen Stammlösung seine Helixstruktur besitzt. Es wurden SDS-Konzentrationen bis 50 mM gemessen (Abb. 4.5).

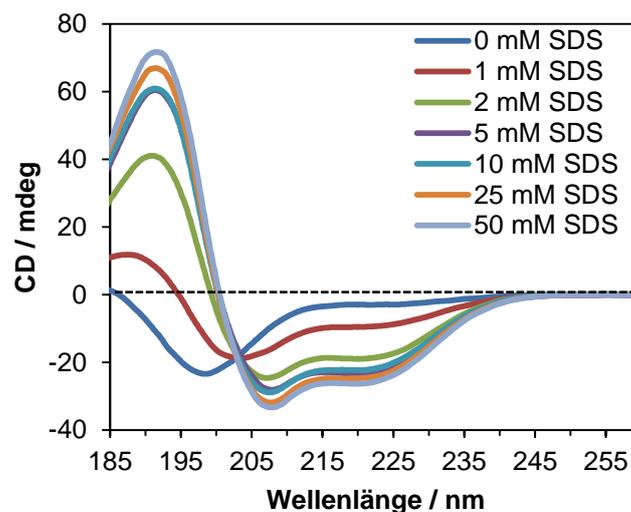


Abb. 4.5 CD-Spektren von 34,7 µM DCD-1L wt in SDS-Lösungen von 1-50 mM SDS mit 10 mM PB und bei pH 7,0. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Bei 5 mM SDS war DCD-1L bereits zu weiten Teilen helikal, jedoch erst bei 25 mM wurden nahezu keine Veränderungen bei weiterer Erhöhung der SDS-Konzentration mehr festgestellt. Diese Erkenntnisse wurden in weiteren Experimenten dazu verwendet DCD-1L-Analoga von besonderem Interesse zu charakterisieren.

Es wurden die Sekundärstrukturen ausgewählter DCD-1L-Analoga, auf deren Funktion im folgenden Kapitel 4.3 genauer eingegangen wird, untersucht. Dies erfolgte in 10 mM PB und in 25 mM SDS, welches in 10 mM PB gepuffert vorlag. In Lösung lagen alle untersuchten DCD-1L-Analoga ungeordnet vor (Abb. 4.6, links). In Gegenwart von SDS-Micellen jedoch waren alle Peptide außer DCD-1L „P“ weitgehend α -helikal (Abb. 4.6, rechts). Alleine DCD-1L „P“ zeigte nur einen sehr schwach α -helikalen Charakter.

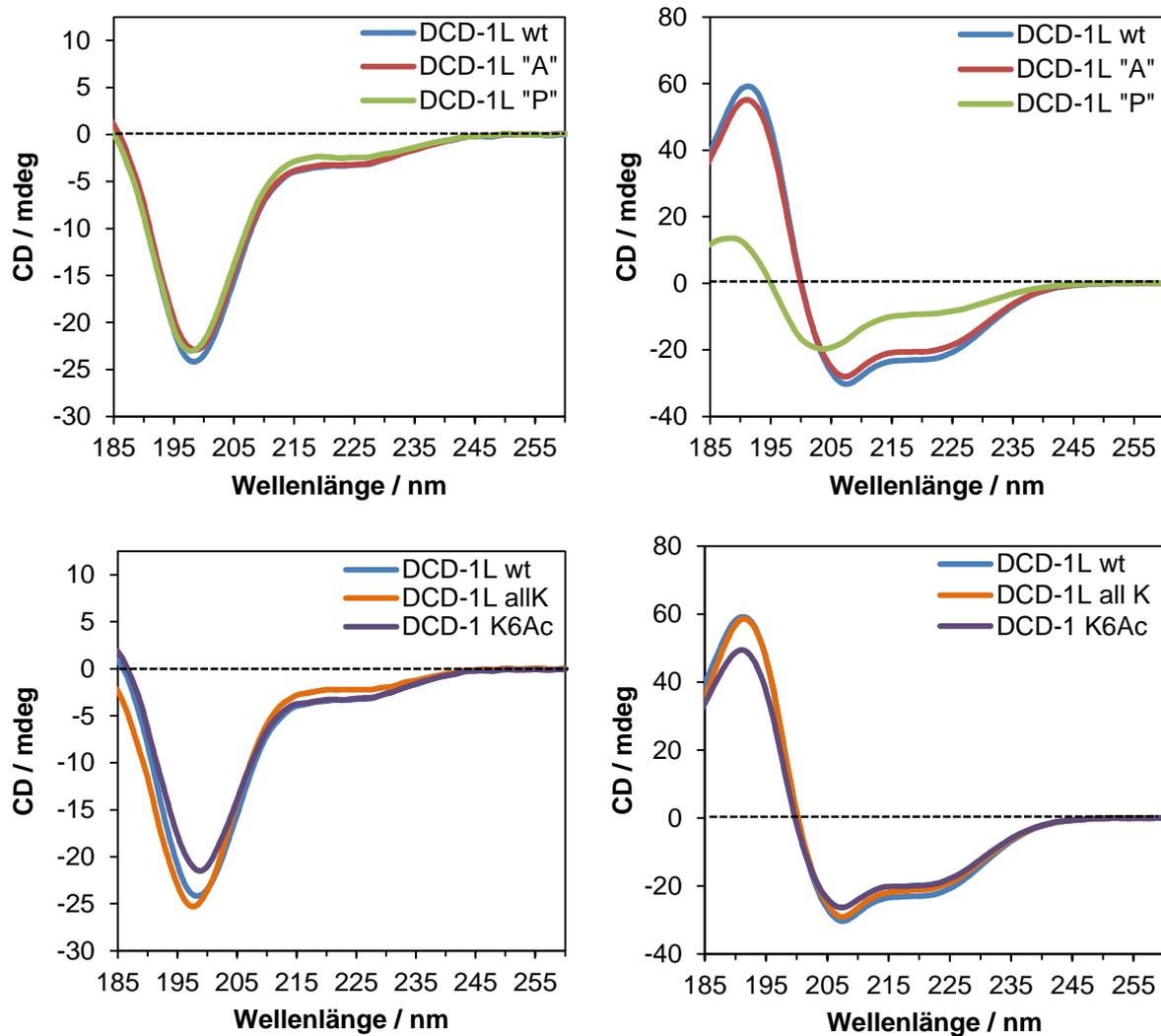


Abb. 4.6 CD-Spektren von 34,7 μ M DCD-1L wt, DCD-1L „A“, DCD-1L „P“, DCD-1L allK und DCD-1 K6Ac in 10 mM PB bzw. 25 mM SDS mit 10 mM PB bei pH 7,0. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

4.2.2 OCD-Spektroskopie

Mit Orientierter CD-Spektroskopie wurde die membrangebundene Ausrichtung der α -helikalen Struktur der Dermcidin-Peptide untersucht. Das Ziel dieser Experimente war es Bedingungen aufzuzeigen, die eine klar membrandurchspannende (transmembrane) Orientierung aufweisen und somit die Grundlage für eines der postulierten Porenmodelle der Dermcidin-Peptide dargestellt hätten.

Untersuchungen an SSL-25 wt zeigten, dass seine Helix an DMPC/DMPG (7:3)-Membranen mit einer leichten Schräglage nahezu parallel zur Membranoberfläche gebunden vorliegt (Abb. 4.7). SSL-25 wt verhält sich analog zu bereits früher charakterisierten amphiphilen Peptiden wie PGLa und MSI-103, denn je mehr Lipid in den untersuchten Proben vorliegt, desto ausgeprägter wird die negative Bande bei 208 nm und dies weist auf die zunehmende Ausrichtung parallel zur Membranoberfläche hin (Abb. 4.7, links)[70]. Auch DCD-1L wurde in der gleichen Lipidmischung charakterisiert. Trotz seiner fast doppelten Länge zeigte es keine Tendenz zur Membraninsertion (Abb. 4.7 rechts), wie an Hand der ebenfalls stark ausgeprägten negativen Bande bei 208 nm festgestellt werden kann.

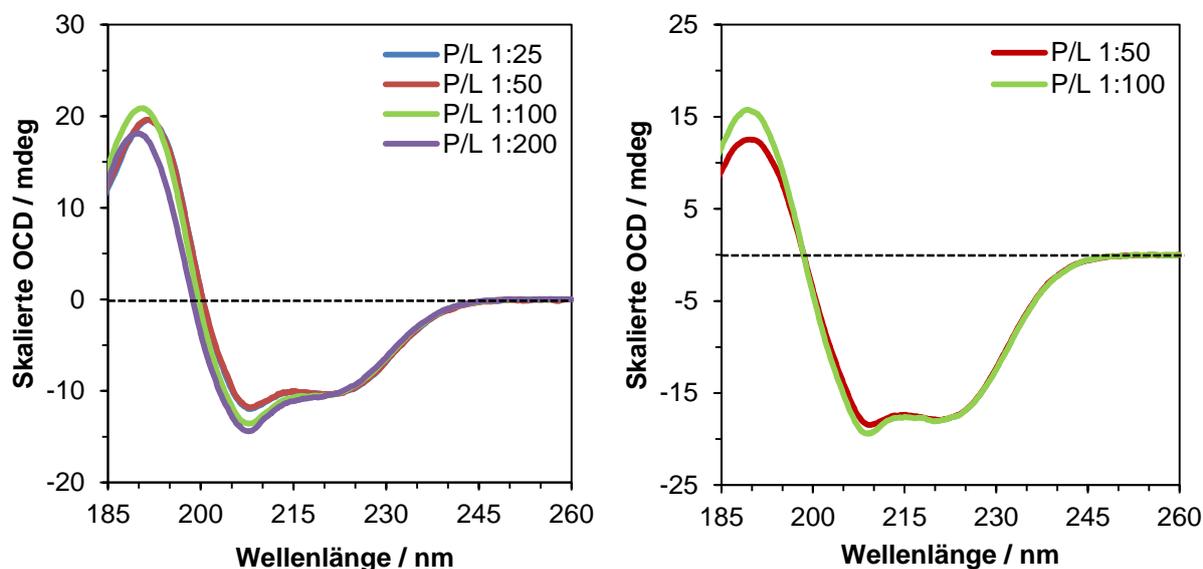


Abb. 4.7 Orientierte CD-Spektren von SSL-25 wt (links) und DCD-1L wt (rechts) in DMPC/DMPG (7:3) bei variierenden P/L-Verhältnissen. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Wie bereits in Kapitel 4.2.1 wurde der Einfluss von Salzen in der Probe studiert. Hierbei musste jedoch beachtet werden, dass die orientierten Proben nur sehr wenig Wasser bei der Messung enthielten und daher Salze schnell die Messung stören konnten. Für die Messungen wurde aus denselben Gründen wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben auf die

Verwendung von NaCl verzichtet und stattdessen auf NaF ausgewichen. Bereits wenige Äquivalente NaF hatten eine sehr stark ausgeprägte Verringerung der CD-Signalintensität über den gesamten Wellenlängenbereich zur Folge, was aufgrund der Bildung von helikalen Peptid-Aggregaten und der damit einhergehenden Lichtstreuung hervorgerufen worden sein konnte. Bei Anwesenheit von 13,5 Äq NaF zeigte sich eine langwellige Verschiebung und Verringerung der 208 nm-Bande. Eine weitere Erhöhung der NaF-Konzentration zeigte jedoch wieder eine nahezu parallel zur Oberfläche gebundene Orientierung (Abb. 4.8). Die Signalqualität und -intensität dieser OCD-Messungen war jedoch insgesamt sehr gering und Absorptionsabflachungs-Artefakte waren bei steigender NaF-Konzentration vermehrt zu beobachten.

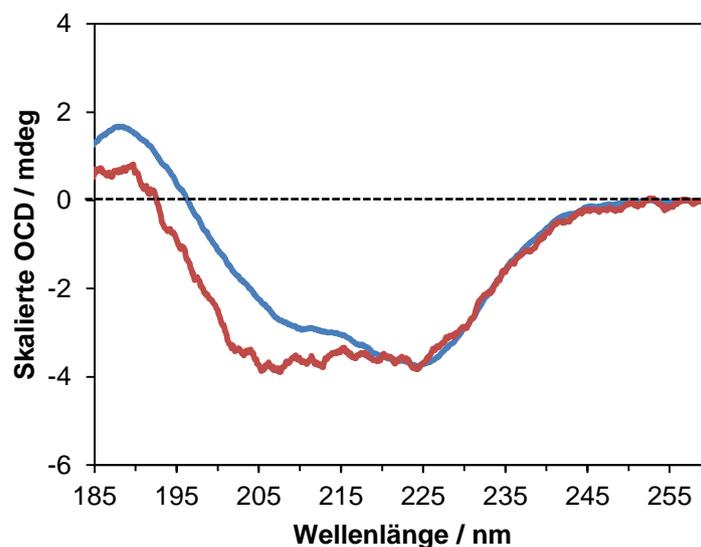


Abb. 4.8 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DMPC/DMPG (7:3) mit 13,5 Äq NaF (blau) und 27 Äq NaF (rot), bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:50. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Bei den Versuchen eine membrandurchspannende Orientierung zu identifizieren wurde ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss von Zn^{2+} -Ionen gelegt, da der Einfluss auf die Ausbildung der helikalen Sekundärstruktur von DCD-1L bereits in Kapitel 4.2.1 gezeigt wurde und überdies die Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen die antimikrobielle Aktivität von DCD-1L gesteigert hatte, wie in früheren Veröffentlichungen dargelegt wurde [45]. Es wurden orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DMPC- und DMPC/DMPG (7:3)-Membranen gemessen. Die Ausrichtung dieser Proben lag trotz der Zugabe von 10 Äq Zn^{2+} im Bereich einer leicht schräg in die Membran geneigten Orientierung (T-Zustand). Ein eindeutig inserierter Zustand kann ausgeschlossen werden, da hierbei das CD-Signal bei 208 nm hätte positive Werte annehmen müssen.

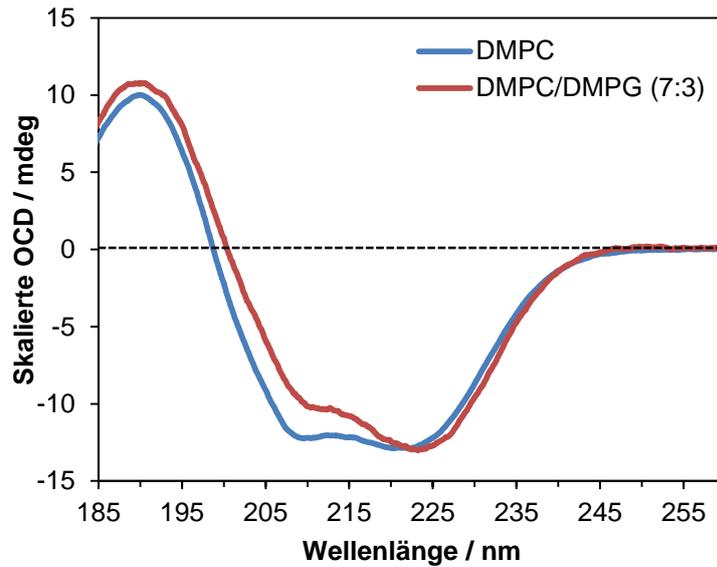


Abb. 4.9 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DMPC und DMPC/DMPG (7:3) mit 10 Äq Zn^{2+} , bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:50. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

Parallel zu meinen OCD-Experimenten hatte ein Kollege, Dr. Sebastian Prock, Festkörper-NMR-Messungen mit exprimiertem, vollständig ^{15}N -markiertem DCD-1L durchgeführt. Es wurden daher auch Experimente mit diesem Peptid durchgeführt. Bei der nächsten NMR-Probenvorbereitung wurde etwas Peptid-Lipidlösung entnommen und als OCD-Probe aufgetragen um die Ergebnisse beider Messungen zu vergleichen. Das OCD-Spektrum dieser Probe zeigte allerdings trotz 5 Äq Zn^{2+} in der Probe keine Tendenz zu Membraninsertion (Abb. 4.10).

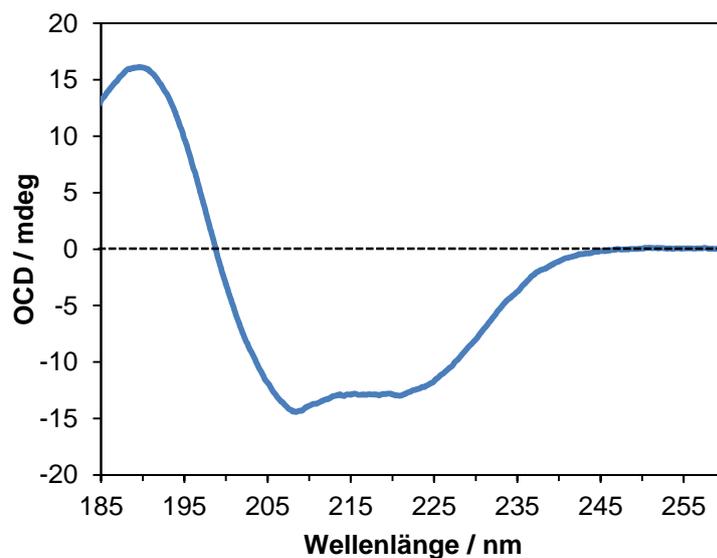


Abb. 4.10 Orientiertes CD-Spektrum von vollständig ^{15}N -markiertem DCD-1L wt in DMPC mit 5 Äq Zn^{2+} , bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:50. Die Messung erfolgte bei 35 °C, wie die entsprechende NMR-Probe derselben Zusammensetzung.

Sollte DCD-1L wt in der Natur als AMP eine membraninsertierte Orientierung als Pore annehmen, so wäre die beste Lipidmischung um dies zu beobachten eine Lipidmischung, die aus Bakterien isoliert wurde. Hierzu wurden OCD-Proben mit *E. coli*-Lipidextrakt vorbereitet. Es wurden Proben ohne und mit Zn^{2+} gemessen (Abb. 4.11). Es wurde keine verstärkte Membraninsertion beobachtet.

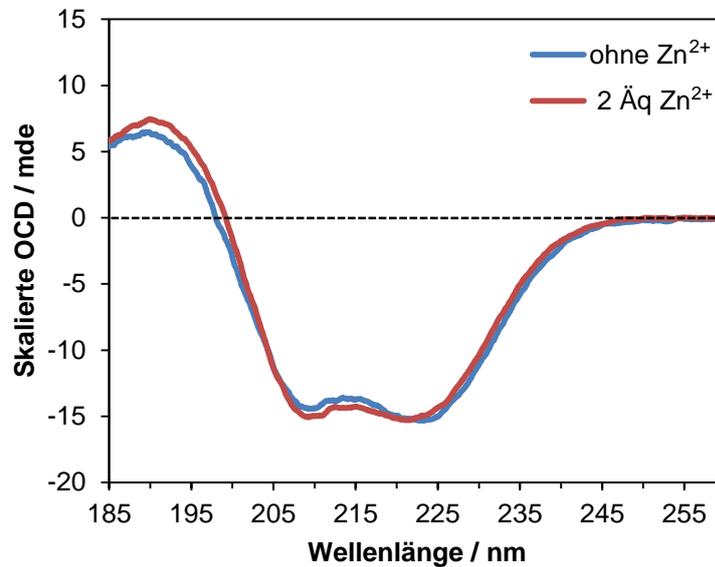


Abb. 4.11 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in *E. coli* Lipidextrakt ohne Zn^{2+} und mit 2 Äq Zn^{2+} , bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:50. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messung erfolgte bei 30 °C.

Da mit den bis dahin verwendeten Lipidmischungen keine transmembrane Orientierung beobachtet werden konnte wurden für weitere Experimente die Membranzusammensetzung und die Schichtdicke der Membranen variiert. Außerdem wurden Proben hohem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis gemessen, da DCD-1L, ähnlich wie SSL-25 und andere Peptide [70], eine zunehmende Insertion mit zunehmender Peptidkonzentration aufweisen sollte. Es wurde ebenfalls das Verhalten von DCD-1L während des Lipid-Phasenübergangs untersucht. Aufgrund der Länge von DCD-1L wurden auch langkettige Lipide, die einen sehr großen Membransuchmesser aufweisen, eingesetzt. Dazu wurde eine Probe mit dem langkettigen Lipid DErPC (PC(22:1(13Z)/22:1(13Z)); 1,2-Dierucoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) bei Temperaturen unterhalb, oberhalb und bei seiner Phasenübergangstemperatur von ca. 12 °C gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 4.12 gezeigt. Es wurde bei P/L 1:10 und in Gegenwart von 1 Äq Zn^{2+} gemessen. Eine leichte Veränderung des orientierten CD-Spektrums ist zu erkennen, aber eine von der Temperatur abhängige Insertion konnte nicht beobachtet werden. Bei tiefen Temperaturen war der Effekt der Absorptionsabflachung deutlich schwächer ausgeprägt.

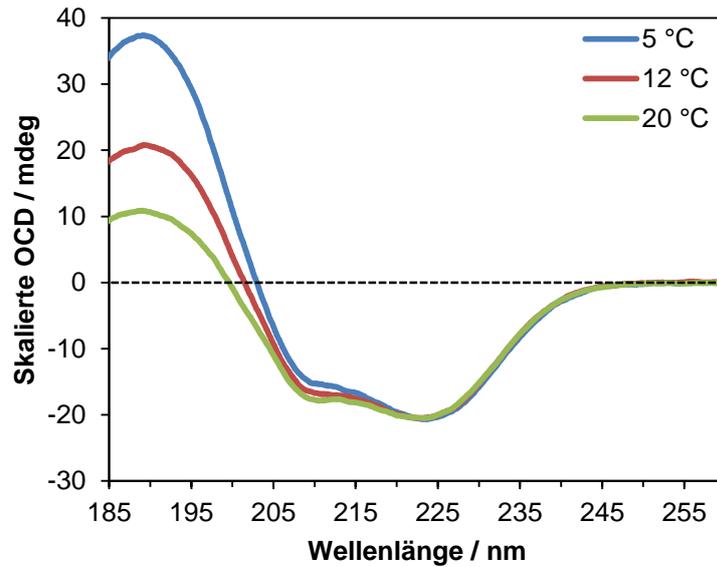


Abb. 4.12 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DErPC mit 1 Åq Zn²⁺ bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:10. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 5 °C (blau), bei 12 °C (rot) und 20 °C (grün).

Die in DErPC-Lipidmembranen deutlich sichtbare, schräger in die Membran gedrehte Orientierung führte zu Experimenten mit etwas mehr Zn²⁺ in den Proben und mit veränderten Lipiden. Es wurden Messungen mit 5 Åq Zn²⁺ in der Probe in Lipiden mit noch längeren hydrophoben Seitenketten, DNPC (PC(24:1(15Z)/24:1(15Z)); 1,2-Dinervonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) durchgeführt. Auch hier wurden die Proben oberhalb und unterhalb der Phasenübergangstemperatur von ca. 25 °C gemessen.

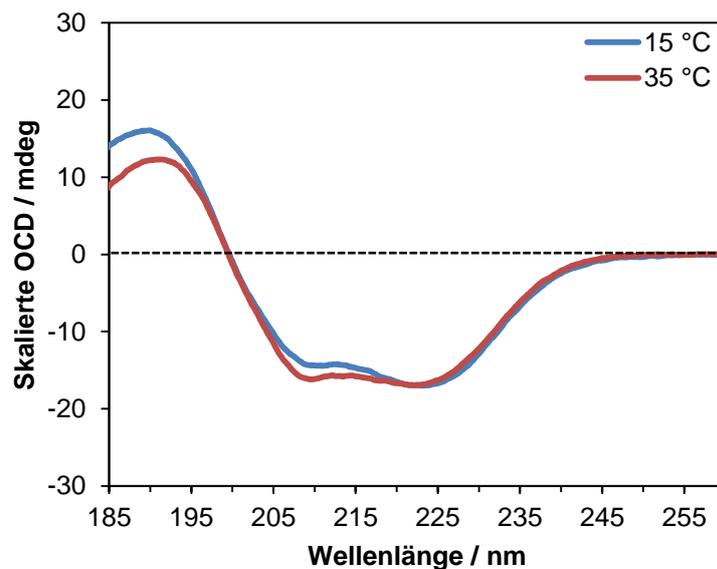


Abb. 4.13 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DNPC mit 5 Åq Zn²⁺ bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:10. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 15 °C und bei 35 °C.

Jedoch zeigt sich auch für diese langkettigen Lipide keine insertierte Ausrichtung der DCD-1L-Helix. Um die Bindung des Peptides an die Membran weiter zu erhöhen wurden Messungen mit anionischen Lipiden und langen hydrophoben Seitenketten in Form einer 1:1-Mischung aus DErPC und DErPG (PG(22:1(13Z)/22:1(13Z)); 1,2-Dierucoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerin), ebenfalls ohne Zn^{2+} und mit 5 μ M Zn^{2+} durchgeführt (Abb. 4.14).

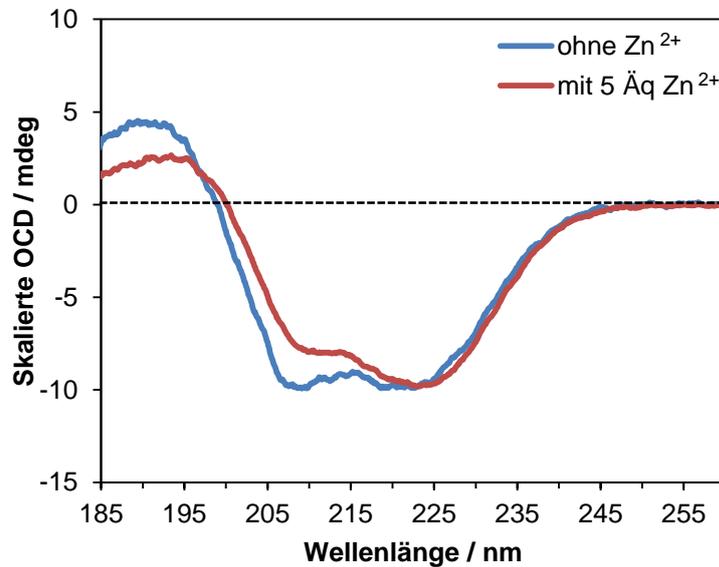


Abb. 4.14 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DErPC/DErPG ohne Zn^{2+} und mit 5 μ M Zn^{2+} bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:20. Die Spektren wurden bei 223 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 25 °C.

Diese orientierten CD-Spektren zeigten jedoch eine geringfügige Zn^{2+} -abhängige Neigung der DCD-1L-Helix in die Membran. Jedoch vergrößerte sich die Absorptionsabflachung durch die Verwendung von DErPG deutlich, sodass fast keine positive Bande bei 195 nm mehr vorlag.

Bereits an anderen Peptiden und Peptidsystemen wurde in der Vergangenheit festgestellt, dass die anteilige Verwendung von Lysolipiden mit einer positiven Membrankrümmung zu einer verbesserten Insertion von Peptiden in Membranen führen kann [84]. Da langkettige Lipide bisher keinen signifikanten Einfluss auf die Membraninsertion hatten wurden im Folgenden Lipide mit Kettenlängen von ca. 18 C-Atomen, wie DOPC und DOPG, zusammen mit den entsprechenden Lysolipiden wie Lyso-OPC oder Lyso-OPG verwendet. Weder neutrale Membranen aus DOPC/ Lyso-OPC noch anionische Membranen mit DOPG zeigten signifikante Veränderungen der Spektren bei ca. 208 nm (Abb. 4.15).

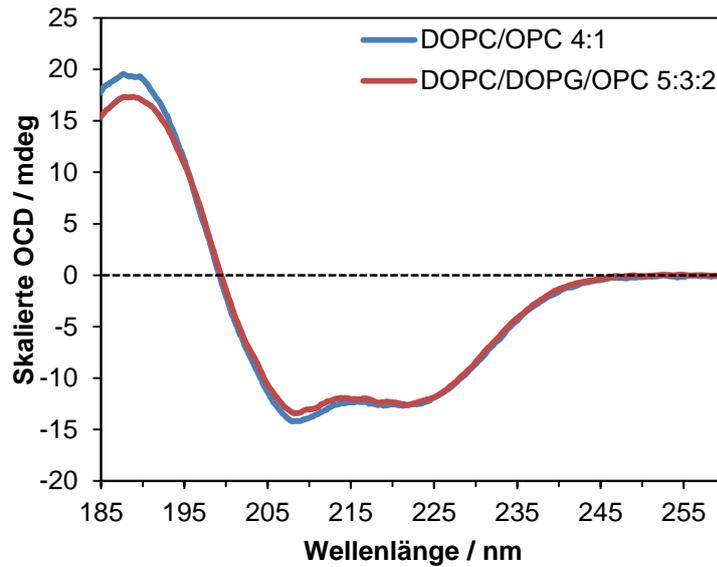


Abb. 4.15 Orientierte CD-Spektren von DCD-1L wt in DOPC/Lyso-OPC 4:1 und DOPC/DOPG/Lyso-OPC 5:3:2 mit 2 Äq Zn^{2+} , bezogen auf das Peptid, bei P/L 1:10. Die Spektren wurden bei 222 nm skaliert. Die Messungen erfolgten bei 20 °C.

Alle orientierten CD-Experimente deuteten nicht auf eine insertierte Orientierung hin, welche die Existenz einer transmembranen Pore bewiesen hätte. Trotz einer Variation vieler Parameter, wie der Zn^{2+} -Konzentration, Temperatur, Membrandicke und Membranzusammensetzung, konnten stets nur parallel zur Oberfläche gebundene bis leicht in die Membran geneigte Ausrichtungen der DCD-1L-Helix festgestellt werden. Da mit Hilfe orientierter CD-Spektroskopie nur die gemittelte Orientierung einer Sekundärstruktur ermitteln kann wurden Festkörper-NMR-Experimente an isopenmarkierten DCD-1L-Peptiden durchgeführt um die lokale Orientierung der DCD-1L-Helix auf einer Lipiddoppelschicht zu ermitteln (Kapitel 4.2.3).

4.2.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Orientierte CD-Spektroskopie erlaubte nur eine globale Betrachtung der Orientierung im Bezug zur Membranoberfläche. Zur Betrachtung der Orientierung lokaler Helixabschnitte wurden ^{15}N -markierte DCD-1L Analoga hergestellt. Mittels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie konnten bereits in der Vergangenheit die Orientierung von vielen membranaktiven, α -helikalen Peptiden aufgeklärt werden [12, 84]. Die Auswahl der markierten Positionen erfolgte anhand von Vorhersagen eines Chou-Fasman-Algorithmus, der drei unabhängige α -helikale Regionen vorhersagte [45]. Die markierten Positionen, L8, L29 und V40, befanden sich inmitten der drei vorhergesagten α -helikalen Regionen (vergl. Tab. 4.3).

In orientierenden Messungen wurde der Einfluss der Peptidkonzentration durch eine P/L-Serie der Position L8 unter Standardbedingungen (Kapitel 3.5) gemessen (Abb. 4.16). Hierzu wurden orientierte Festkörper-NMR-Proben in DMPC/DMPG (7:3) bei Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen (P/L) von 1:50, 1:100 und 1:200 gemessen. Alle aufgenommenen Spektren wiesen genau einen Peak auf, d.h. alle Peptide in den Proben nahmen genau eine Orientierung, und zwar eine oberflächlich gebundene, an. Die Peaks der P/L 1:100 und 1:200 Proben lagen beide bei 98 ppm. Im Vergleich zur 1:50 Probe mit dem Peak bei 96 ppm quasi unverändert.

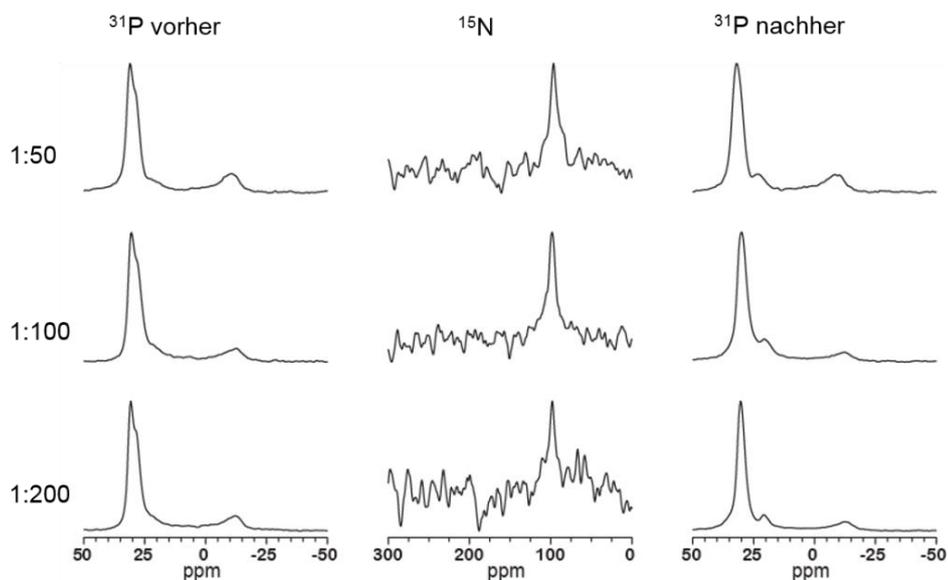


Abb. 4.16 ^{31}P - und ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektren von DCD-1L ^{15}N -L8 in DMPC/DMPG (7:3) bei P/L 1:50, 1:100, 1:200 und 35 °C.

Für alle markierten Peptide wurden in DMPC/DMPG (7:3), ohne und mit 10 Äq Zn^{2+} , Proben bei P/L 1:50 vorbereitet, da bei anderem P/L kein signifikanter Unterschied auftrat. Zn^{2+} hatte keinen Einfluss auch die Chemische Verschiebung der Peaks (Abb. 4.17). Für die erste markierte Position L8 wurde mit und ohne Zn^{2+} ein Peak bei 96 ppm gemessen. Für L29 ohne Zn^{2+} wurde ein Peak bei 70 ppm und mit Zn^{2+} bei 72 ppm detektiert. Für V40 ohne Zn^{2+} wurde ein Peak bei 68 ppm und mit Zn^{2+} bei 72 ppm beobachtet.

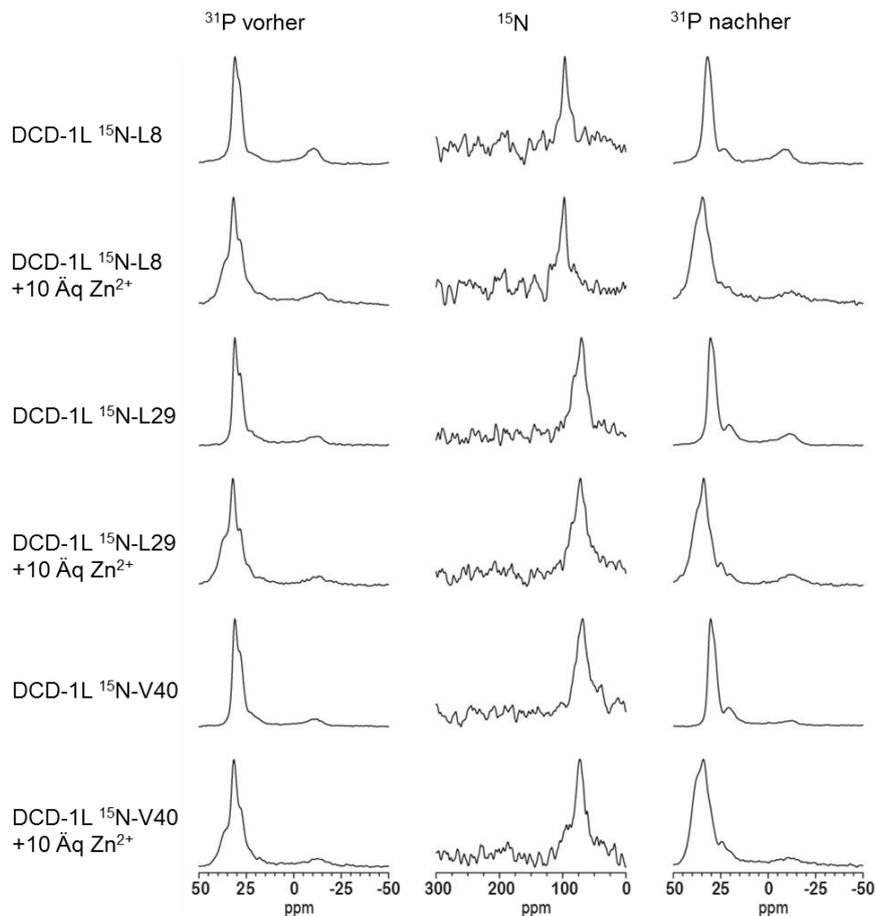


Abb. 4.17 ^{31}P - und ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektren der DCD-1L-Analoga in DMPC/DMPG (7:3) bei P/L 1:50 und 35 °C. Die drei Analoga wurden ohne Zn^{2+} Zugabe und mit 10 Äq. Zn^{2+} gemessen.

Die Zugabe von Zn^{2+} -Ionen hatte wie bereits in den orientierten CD-Experimenten nur sehr geringen Einfluss auf die Orientierung des DCD-1L auf der Membran. Eine chemische Verschiebung von ca. 70 ppm entspricht einer vollständig oberflächlich gebundenen Orientierung. 96 ppm, wie sie für die markierte Aminosäure L8 beobachtet wurde entspricht einer leicht in die Membran eintauchende Orientierung. Durch Verwendung von Lyso-Lipiden, und der hiermit einhergehenden Veränderung der Oberflächenkrümmung der Lipide,

trat ebenfalls keine signifikante Änderung der beobachteten chemischen Verschiebung auf (Abb. 4.18). Es wurde für L8 in eine chemische Verschiebung von 97 ppm mit Lyso-Lipiden detektiert. Im Vergleich zu der Messung in DMPC/DMPG (7:3) trat keine relevante Änderung auf.

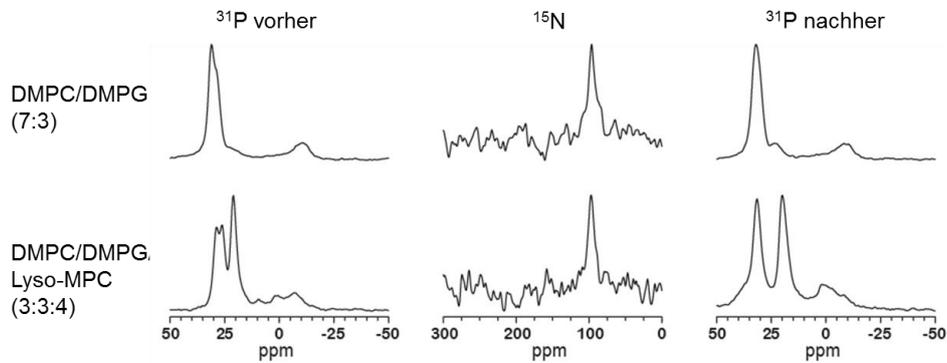


Abb. 4.18 ^{31}P - und ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektren von DCD-1L ^{15}N -L8 in DMPC/DMPG (7:3) und DMPC/DMPG/Lyso-MPC (3:3:4) bei P/L 1:50 und 35 °C.

Die Orientierung von DCD-1L ließ sich in allen durchgeführten Festkörper-NMR-Experimenten weder durch Zn^{2+} -Zugabe, durch die Anwesenheit von Lysolipiden noch durch eine Variation des P/L-Verhältnisses signifikant beeinflussen.

4.2.4 NBD-Bindungsexperimente

Erste Versuche mit neutralen POPC-Vesikeln und anionischen POPC/POPG (7:3)-Vesikeln in Puffer mit hoher Ionenstärke (10 mM PIPES, 150 mM NaCl) und in Puffer mit niedriger Ionenstärke (10 mM PIPES, 300 mM Saccharose) ergaben die in Abb. 4.19 dargestellten Bindungsisothermen. Die Bestimmungen wurden ohne und in Anwesenheit von 1 mM Zn^{2+} durchgeführt. NBD-DCD-1L zeigte nur eine geringe Affinität zu ungeladenen Lipid-Doppelschichten, während seine Bindung an anionische Membranen deutlich ausgeprägter war. Die Verwendung eines Puffers mit hoher Ionenstärke hatte nur geringen Einfluss auf die Bindung an neutrale Vesikel, die Bindung an anionische Vesikel wurde jedoch durch höhere Salzkonzentrationen merklich reduziert. Die Zugabe von Zn^{2+} steigerte in allen Fällen die Bindung an die Vesikel.

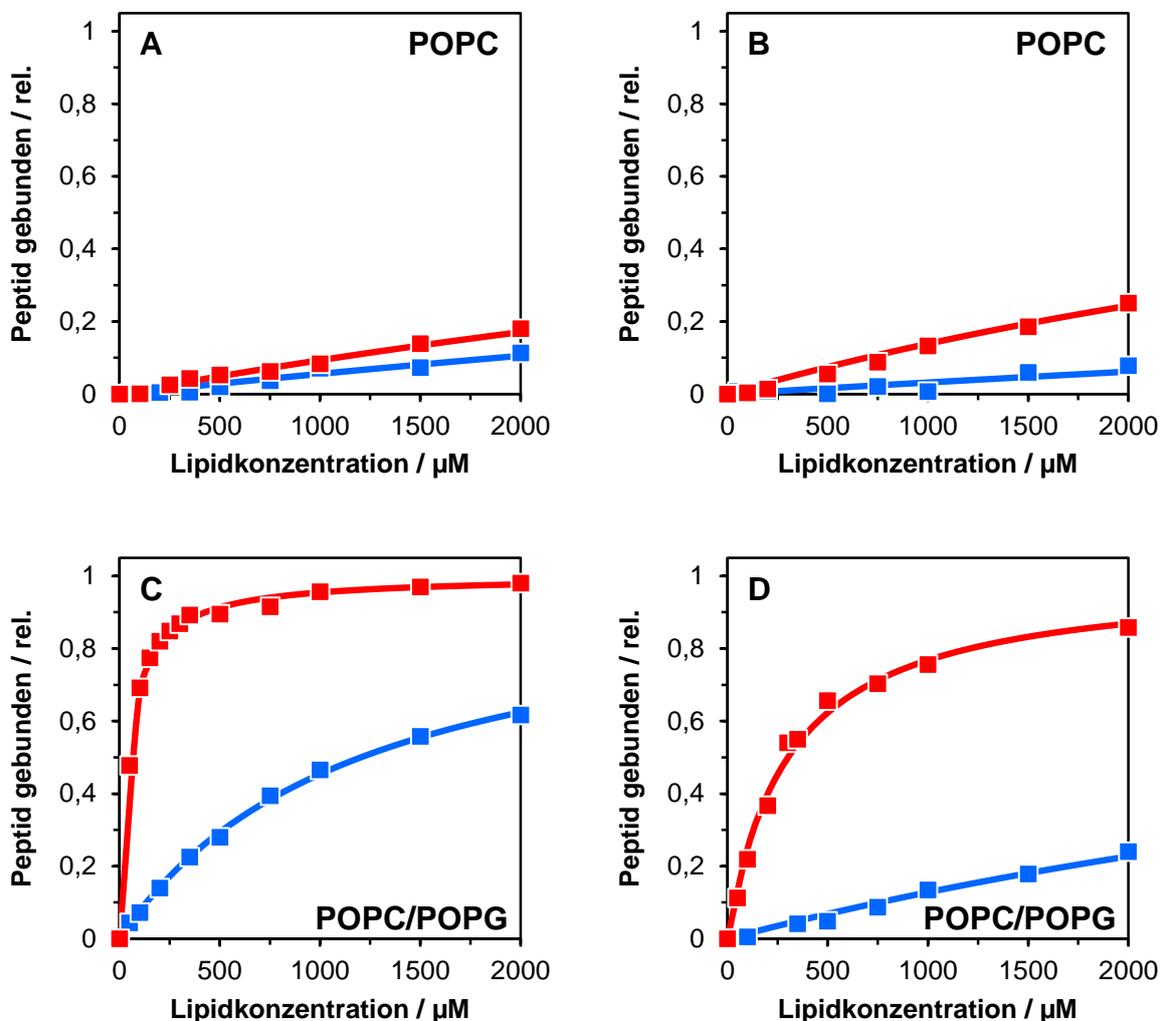


Abb. 4.19 Gebundenes NBD-DCD-1L in Abhängigkeit der Lipidkonzentration. Untersucht wurde die Bindung an POPC-Vesikel (**A** und **B**) und an POPC/POPG (7:3)-Vesikel (**C** und **D**) in Puffern mit niedriger Ionenstärke (**A** und **C**, 10 mM PIPES, 300 mM Saccharose) und mit hoher Ionenstärke (**B** und **D**, 10 mM PIPES, 150 mM NaCl). Es wurden jeweils Messreihen ohne Zn^{2+} (blau) und mit 1 mM Zn^{2+} (rot) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C.

Alle weiteren Bindungsexperimente wurden in Puffer mit niedriger Ionenstärke durchgeführt, um Bedingungen aufzuzeigen, bei denen eine möglichst vollständige Bindung des Peptids an Lipiddoppelschichten erfolgt. Des Weiteren der positive Effekt des Zn^{2+} auf die Bindung näher betrachtet.

Wie aus Abb. 4.20 ersichtlich, wird die Bindung durch Zn^{2+} -Zugabe graduell gesteigert, wobei selbst geringe Zn^{2+} -Konzentrationen die Bindung des NBD-DCD-1L an die Lipidvesikel merklich steigert.

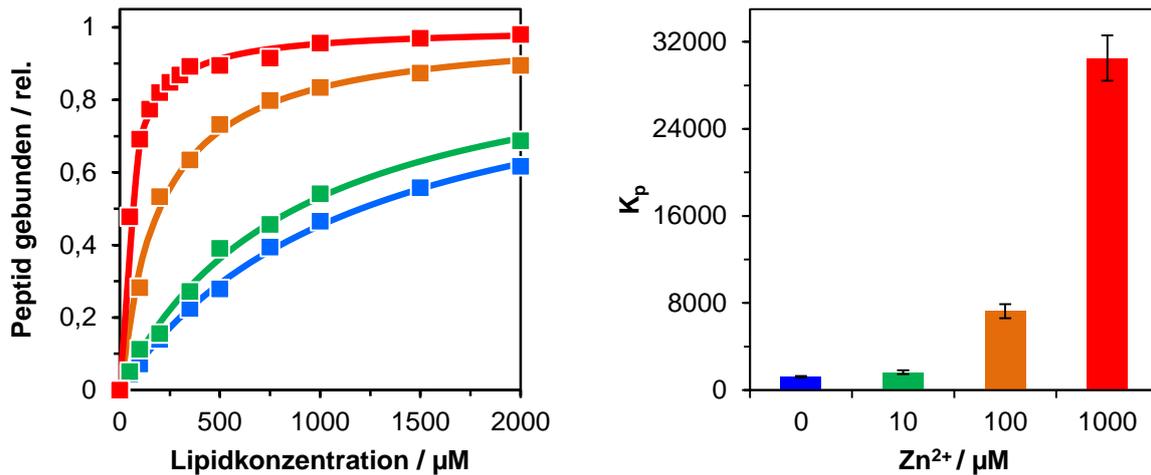


Abb. 4.20 Bindungsisothermen von NBD-DCD-1L 1L (links) und die entsprechenden Verteilungskoeffizienten K_p (rechts) in POPC/POPG (7:3)-Vesikeln. Gemessen wurde in Puffer mit niedriger Ionenstärke. Eine deutliche, graduelle Zn^{2+} -Abhängigkeit war zu beobachten. Es wurden Messungen ohne Zn^{2+} (blau), mit 10 μM (grün), mit 100 μM (orange) und mit 1000 μM (rot); Die Datenpunkte wurden gemessen, die durchgezogene Linie wurde gefittet.

Die verstärkenden Effekte auf die Bindung – einerseits Lipidzusammensetzung, andererseits Zn^{2+} -Zugabe – wurden in drei weiteren Lipidsystemen im Detail untersucht. Hierzu verwendet wurden POPC/POPG (3:1), (1:1) und (1:3)-Mischungen wurden ohne und mit Zn^{2+} -Zugabe. Die erhaltenen Bindungsisothermen sind in Abb. 4.21 links dargestellt und die berechneten Verteilungskoeffizienten K_p als Balkendiagramm rechts aufgetragen. Eine Zn^{2+} -Zugabe erhöhte die Bindung des Peptids in allen Systemen deutlich, wobei der Unterschied zwischen hohen Zn^{2+} -Konzentrationen (100 μM) und sehr hohen (1000 μM) mit steigender Ladung abnahm (vergl. Abb. 4.21, rechts). Bemerkenswert ist, dass die Bindung des anionischen Peptids DCD-1L (Nettoladung: -2) mit steigender negativen Ladung der Membran, auch ohne Zn^{2+} -Zugabe, zunahm (vergl. Abb. 4.21, links).

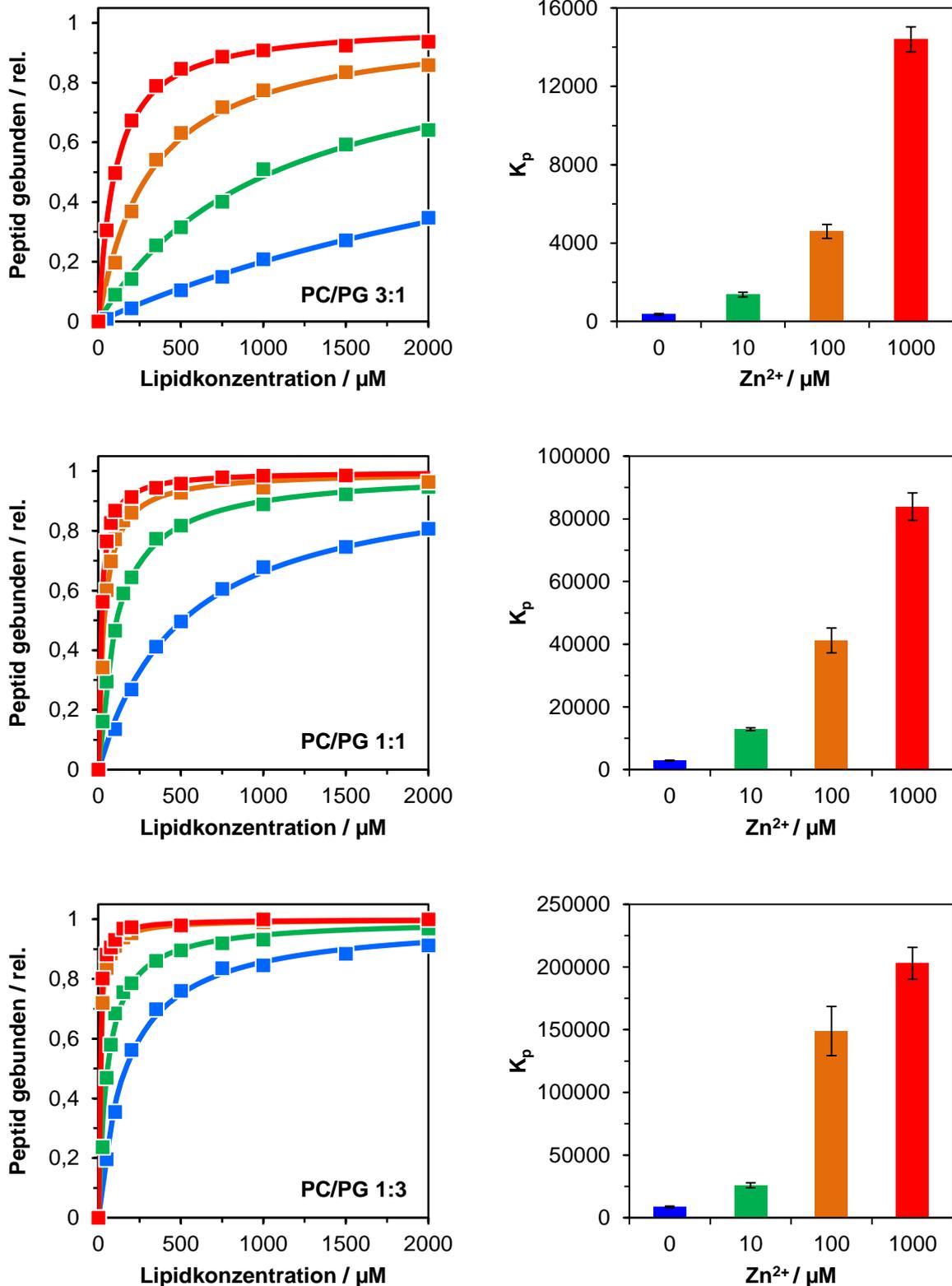


Abb. 4.21 Bindungsisothermen von NBD-DCD-1L (links) und die entsprechenden Verteilungskoeffizienten K_p (rechts). Für POPC/POPG (3:1) zeigte das Peptid die geringste Affinität (oben), bei POPC/POPG (1:1) kam es zu einer deutliche erhöhten Bindung (Mitte) und bei POPC/POPG (1:3) war die stärkste Bindung zu beobachten. Die Bestimmungen erfolgten jeweils ohne Zn^{2+} (blau), mit 10 μM Zn^{2+} (grün), mit 100 μM Zn^{2+} (orange) und mit 1000 μM Zn^{2+} (rot). Die Messungen erfolgten bei 20 °C und in Puffer niedriger Ionenstärke.

Zum besseren Vergleich wurden die ermittelten Verteilungskoeffizienten aller drei Lipidzusammensetzungen in Abb. 4.22 zusammengefasst. Deutlich zu erkennen ist, dass je nach Lipidzusammensetzung und Zn^{2+} -Konzentration die Verteilungskoeffizienten um bis zu drei Größenordnungen variierten.

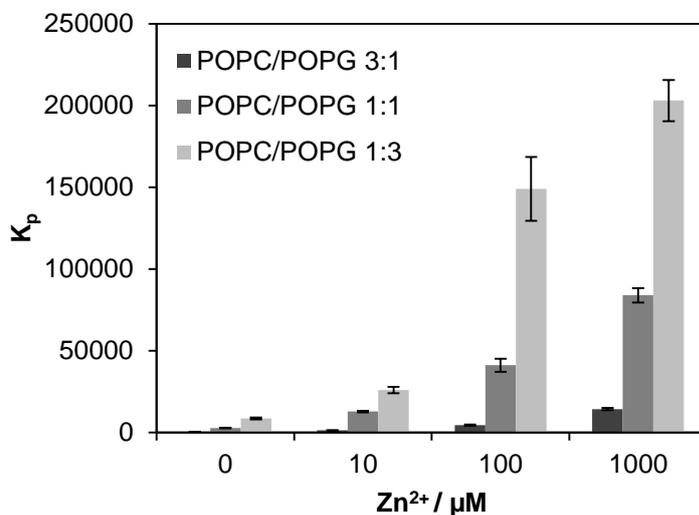


Abb. 4.22 Verteilungskoeffizienten K_p von NBD-DCD-1L in den Lipidsystemen POPC/POPG (3:1), (1:1) und (1:3) mit unterschiedlichen Zn^{2+} -Konzentrationen

Aus Abb. 4.21 ist erkennbar, dass bei einer Lipidkonzentration von 200 μM , bei welcher viele Fluoreszenzexperimente, wie beispielsweise FRET-Experimente, durchgeführt wurden, ohne Zn^{2+} lediglich 56 % des Peptids an die Membran gebunden vorlägen. Gerade für FRET-Experimente ist es jedoch essentiell, dass eine nahezu vollständige Bindung vorliegt, deren Bedingungen aus den oben dargestellten Isothermen entnommen werden kann. Weiterhin ist darauf zu achten, dass die verwendete Zn^{2+} -Konzentration möglichst unterhalb der Lipidkonzentration liegt, da Zn^{2+} -Ionen die Phosphatkopfguppen der Phospholipide beeinflussen [85].

Das Bindungsverhalten von NBD-SSL-25 wurde ebenfalls untersucht (Abb. 4.23). Diese Experimente wurden in zwei Lipidsystemen, POPC/POPG (3:1) und (1:3) sowie ohne Zn^{2+} und mit 100 μM Zn^{2+} durchgeführt. Da die Sequenz von SSL-25 nicht über den Histidinrest von DCD-1L (His38) verfügt, sollte der Einfluss von Zn^{2+} geringer ausfallen. Ohne Zn^{2+} zeigte NBD-SSL-25 eine deutlich höhere Affinität als DCD-1L (Abb. 4.23). Wie erwartet war der Einfluss der Zn^{2+} -Ionen für NBD-SSL-25 deutlich geringer. Für die schwach anionische Lipidmischung, POPC/POPG (3:1), zeigte sich eine Verringerung der Bindung durch Zn^{2+} -Zugabe.

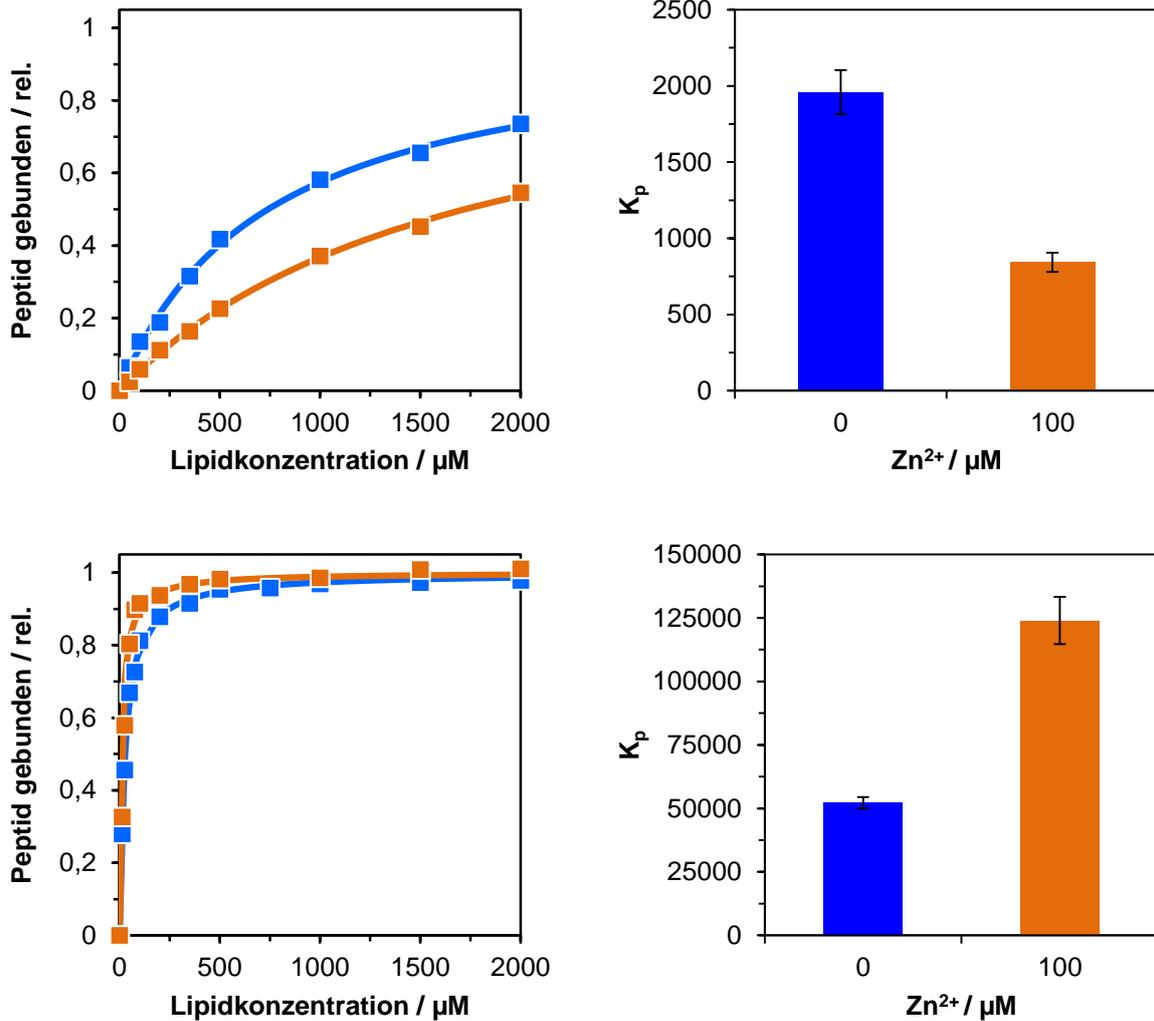


Abb. 4.23 Bindungsisothermen von NBD-SSL-25 (links) und die entsprechenden Verteilungskoeffizienten K_p (rechts). Unter Variation der Zn^{2+} -Konzentration wurden die Bindungsisothermen für zwei unterschiedliche Lipidsysteme erstellt. Für POPC/POPG (3:1) zeigte das Peptid lediglich geringe Affinität (oben), bei POPC/POPG (1:3) jedoch war eine starke Affinität zu beobachten (unten). Es wurde jeweils ohne Zn^{2+} (blau) und mit 100 μM Zn^{2+} (orange) gemessen. Die Messungen erfolgten bei 20 °C und in Puffer niedriger Ionenstärke.

4.2.5 FRET-Experimente zur Assemblierung

Mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Experimenten wurde das Assemblierungsverhalten von DCD-1L untersucht. Hierzu wurden Experimente mit modifizierten DCD-1L-Peptiden durchgeführt. Aus den Emissionsspektren der Peptide W-DCD-1L bzw. DCD-1WL mit Dansyl-DCD-1L wurden die Werte des Donor-Quenchung und der Akzeptor-Emission bestimmt und gegen den Molenbruch des Akzeptors X_A bzw. des Donors X_D aufgetragen. Da bei derartigen Experimenten durch räumliche Nähe auf einem weitestgehend mit Peptiden besetzten Vesikel die tatsächliche Assemblierung verfälscht werden kann, wurde mit einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis (P/L) von 1:400 gearbeitet.

Verwendet wurden POPC/POPG (1:3)-Vesikeln mit $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$, was eine Bindung von mindestens 80 % gewährleisten sollte (Kapitel 4.2.4).

Das Ergebnis war eindeutig, es fand kein nennenswerter Energietransfer statt. DCD-1L lag unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen als Monomer vor.

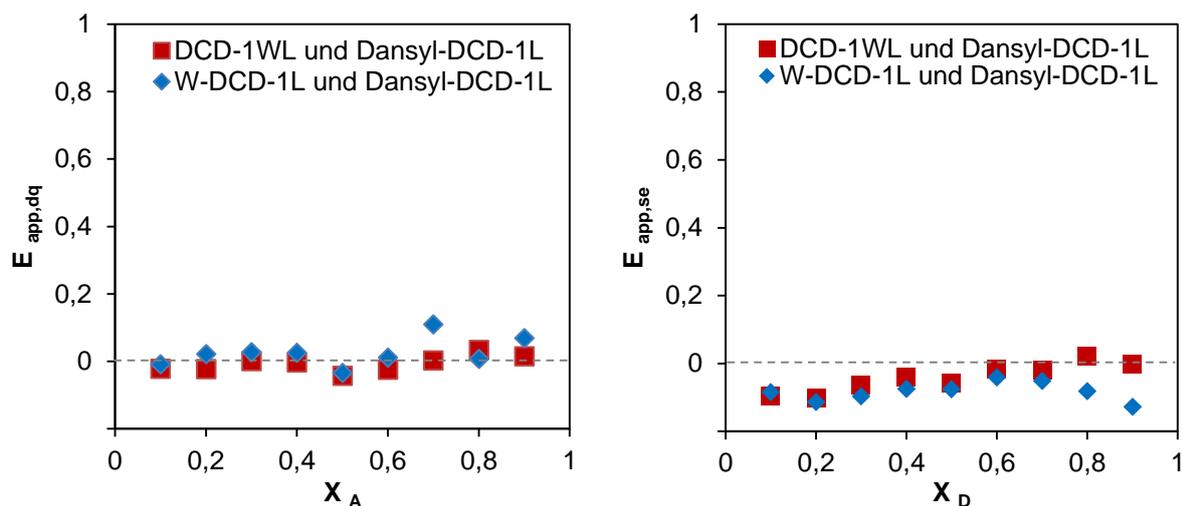


Abb. 4.24 Auftragung der Donor-Quenching (links) und der Akzeptor-Emission (rechts) in Abhängigkeit des Molenbruchs X_A bzw. X_D aus den Messungen in POPC/POPG (1:3)-Vesikeln mit $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$ bei P/L 1:400. Gemessen wurden bei 20°C .

Um zu ermitteln, ob mit den eingesetzten Peptiden ein Resonanzenergietransfer generell möglich war, wurden weitere Messungen bei P/L 1:50 durchgeführt. Hier wurde nun ein geringer Energietransfer festgestellt und der angedeutete lineare Verlauf entspräche einem Dimer. Jedoch lässt sich der beobachtete Energietransfer durch die räumliche Nähe von statistisch verteilten Monomeren auf der Vesikeloberfläche zwanglos erklären. Darüber hinaus müsste bei einer tatsächlich erfolgten Dimerisierung der Energietransfer deutlich höher ausfallen.

Mittels der beiden DCD-1L-Trp-Analoga, W-DCD-1L und DCD-1WL, sollte unterschieden werden können, ob eine gegebenenfalls auftretende Assemblierung parallel oder antiparallel

erfolgt. Wie jedoch in Abb. 4.25 ersichtlich, ist eine Präferenz weder zu einer parallelen (W-DCD-1L und Dansyl-DCD-1L) noch zu antiparallelen (DCD-1WL und Dansyl-DCD-1L) Assemblierung zu erkennen.

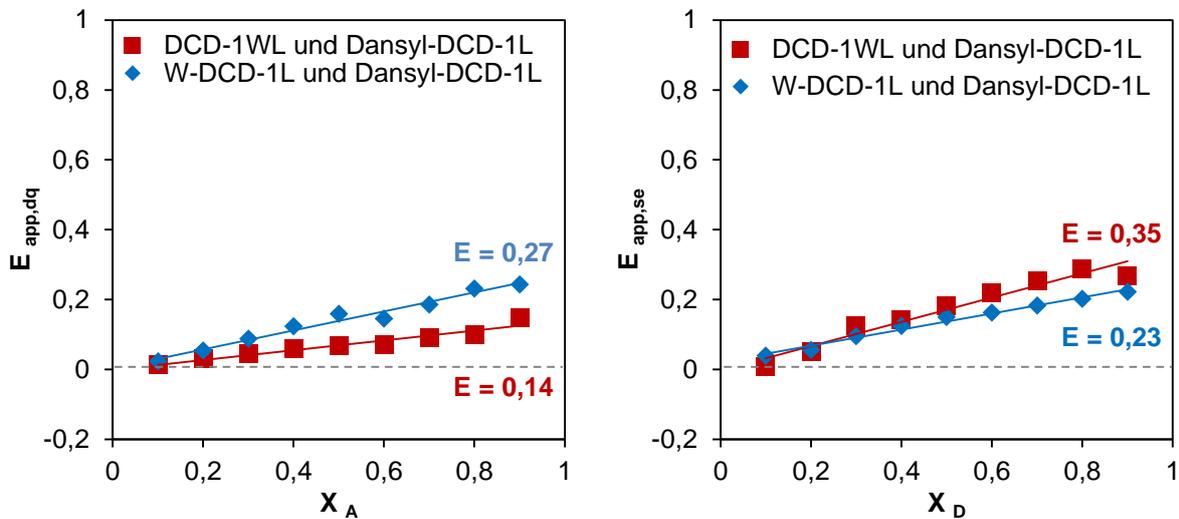


Abb. 4.25 Auftragung der Donor-Quenching (links) und der Akzeptor-Emission (rechts) in Abhängigkeit des Molenbruchs X_A bzw. X_D aus den Messungen in POPC/POPG (1:3)-Vesikeln mit $10 \mu\text{M Zn}^{2+}$ bei P/L 1:50

Eine weitere Möglichkeit, wie sich DCD-1L mit Hilfe des Ladungsreißverschlusses in bzw. auf der Membran falten könnte, wäre eine Rückfaltung des C-Terminus auf den N-Terminus. (Abb. 4.26)

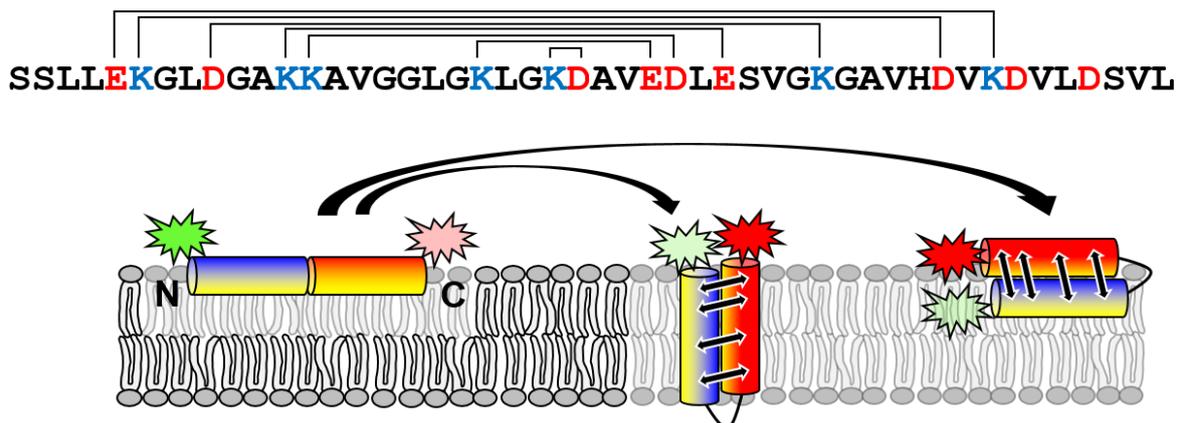


Abb. 4.26 Mögliche Rückfaltung eines DCD-1L-Monomers und resultierende Resonanzenergietransfer. Für den Energietransfer spielt es keine Rolle, ob das Peptid oberflächlich gebunden oder in die Membran eintaucht.

In Experimenten bei P/L 1:400 mit dem doppelmarkierten Peptid Dansyl-DCD-1WL konnte jedoch kein Energietransfer beobachtet werden (Abb. 4.27, links). Lediglich Experimente bei hohen Peptidkonzentrationen zeigen einen geringen Energietransfer, (Abb. 4.27, rechts) der sich wie bereits oben durch eine statistische Verteilung von Monomeren auf einer nahezu vollständig belegter Oberfläche erklären lässt.

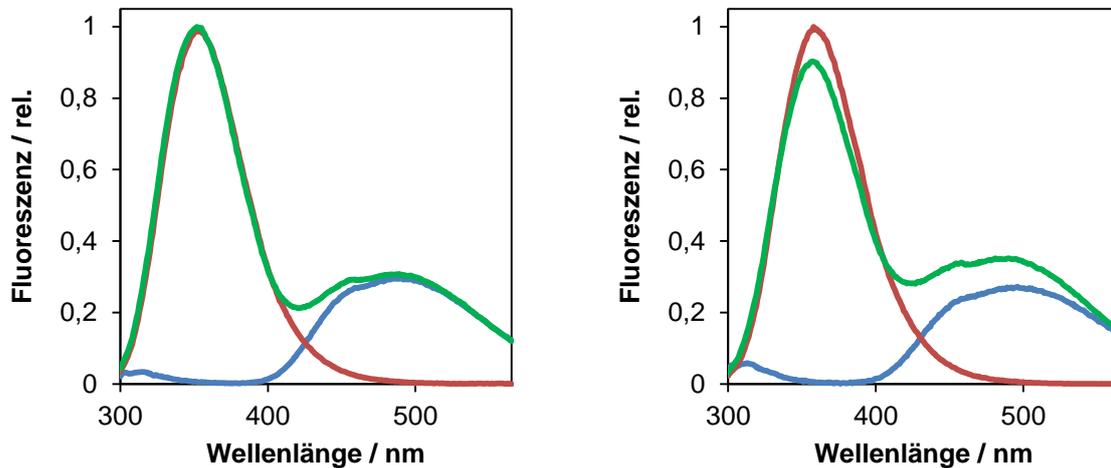


Abb. 4.27 Fluoreszenzspektren von Dansyl-DCD-1WL (grün), DCD-1WL (rot) und Dansyl-DCD-1L (blau) bei P/L 1:400 links und 1:50 rechts. Im Vergleich zu den einfach markierten Peptiden zeigt das doppelmarkierte Peptid bei P/L 1:400 keinen FRET, bei 1:50 jedoch beobachtete man eine geringe Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz bei 351 nm und eine Erhöhung der Dansyl-Fluoreszenz bei ca. 480 nm.

4.3 Funktionsuntersuchungen Teil 1:

Antimikrobielle Wirkung und Membranschädigung

4.3.1. MHK-Test zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L wt und diverser Analoga

Zur Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität wurde DCD-1L wt und SSL-25 wt zunächst dem etablierten Standardtest [86], dem Minimalen-Hemmkonzentrations(MHK)-Test, unterzogen. Dieser Test ergab bisher bei anderen AMPs immer zuverlässige Werte für die MHK und wurde in dieser Form seit 2007 nicht nur in unserer Arbeitsgruppe [87], sondern auch in zahlreichen Veröffentlichungen eingesetzt [86, 88, 89].

Umso erstaunlicher war, dass MHK-Tests mit DCD-1L wt und SSL-25 wt keine Inhibition des bakteriellen Wachstums der beiden Teststämme *S. aureus* DSM 1104 und *E. coli* DSM 1103 ergaben (Tab. 4.9), obwohl in der ersten Veröffentlichung von DCD-1L (2001) es bereits bei Konzentrationen von 1 µg/mL, was etwa 0,2 µM entspricht, eine 90 %ige Abtötung von *S. aureus* und *E. coli* beobachtet wurde [5]. In den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen bis zu 256 µM im MHK-Test eingesetzt. Die Gegenwart von Zn²⁺ sollte die antimikrobielle Aktivität von DCD-1L positiv beeinflussen, wie bereits in einer Veröffentlichung von Paulmann et al. gezeigt wurde [45]. Dies wäre im Einklang mit den zuvor beschriebenen Experimenten zur Strukturuntersuchung und Membranbindung, in denen durch Zugaben von Zn²⁺ die Bindung von DCD-1L an Lipidmembranen deutlich erhöht wurde. Jedoch zeigten MHK-Experimente mit DCD-1L selbst mit Zn²⁺-Zugaben bis zu 1000 µM (als ZnSO₄) keinerlei Hemmung des bakteriellen Wachstums.

Experimente mit höheren Zn²⁺-Konzentrationen konnten aufgrund der bakteriotoxischen Wirkung von Zink nicht durchgeführt werden. Ab ca. 1500 µM Zn²⁺ wurde das Wachstum vieler Bakterien gehemmt oder zumindest negativ beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

In nachfolgenden Experimenten wurde weiterhin versucht, eine antimikrobielle Aktivität von DCD-1L nachzuweisen. Es wurden drei separat, im Abstand von mehreren Monaten synthetisierten Chargen DCD-1L wt eingesetzt, jedoch wurde nie eine Inhibition des bakteriellen Wachstums der beiden Stämme *S. aureus* DSM 1104 und *E. coli* DSM 1103 durch DCD-1L wt oder SSL-25 wt beobachtet. Auch für alle weiteren getesteten Stämme, inklusive *C. albicans*, ließen sich keine MHK-Werte bestimmen (Tab. 4.10).

Auch die Ladungsreißverschlussanaloga DCD-1L „A“ und DCD-1L „P“ zeigten keine Hemmung des bakteriellen Wachstums (Tab. 4.9).

Es wurde vermutet, dass das um ein C-terminales Leucin verkürzte Analogon DCD-1 die tatsächlich aktive Spezies darstellt. Doch diese Vermutung ließ sich nicht bestätigen. In einer

Publikation über acetylierte Lysin-Seitenketten wurde vermutet, dass das erste Lysin der DCD-1L-Sequenz acetyliert vorliegen sollte [81].

Tabelle 4.9 Ausgewählte DCD-Peptide und deren Hemmkonzentration. Diese wurden durch einen Mikroverdünnungstest ermittelt. Hervorzuheben ist hierbei, dass für kein Analogon welches der Sequenz des Wildtyps ähnlich ist, eine Hemmwirkung auf jeden der getesteten Bakterienstämme hatte (MHK-Werte >128 μM bzw. >256 μM). Die Gegenwart von 1000 μM ZnSO_4 hatte keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum der beiden Stämme.

Peptid\ Stamm	<i>S. aureus</i> DSM 1104	<i>E. coli</i> DSM 1103
SSL-25 wt	>256 μM	>256 μM
DCD-1L wt	>256 μM	>256 μM
DCD-1L wt mit 1000 μM ZnSO_4	>128 μM	>128 μM
DCD-1L D9E	>256 μM	>256 μM
DCD-1L wt (via dmbGly)	>256 μM	>256 μM
DCD-1L „A“	>128 μM	>128 μM
DCD-1L „A“ mit 1000 μM ZnSO_4	>128 μM	>128 μM
DCD-1L „P“	>128 μM	>128 μM
DCD-1L „P“ mit 1000 μM ZnSO_4	>128 μM	>128 μM
DCD-1 wt	>128 μM	>128 μM
DCD-1 K6Ac	>128 μM	>128 μM
DCD-1L allK	>128 μM	4 μM

Obwohl die zugehörige molare Masse in keiner Dermcidin-Veröffentlichung in menschlichem Schweiß nachgewiesen werden konnte [5, 42, 90], wurde das zugehörige Peptid, DCD-1 K6Ac, synthetisiert und getestet. Auch dieses Peptid zeigte keine MHK gegen alle getesteten Stämme. Weiterhin wurde mit zwei weiteren Analoga, DCD-1L via DmbGly und DCD-1L D9E, überprüft, ob während der Synthese bzw. nach der Synthese eine Umlagerung über eine Succinimid-Übergangsstruktur an den Aminosäuren 9 und 10 (Asp9-Gly10) stattfindet [91], welche die antimikrobielle Inaktivität synthetischer Peptide hätte erklären können. Beide Analoga zeigten jedoch dasselbe Verhalten als der Wildtyp; sie zeigten keine Inhibition des bakteriellen Wachstums.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit kationischen AMPs, z.B. in der Helikalen-Rad-Darstellung (Kapitel 1.4 und 1.5) wurde ein weiteres Analogon, DCD-1L allK, synthetisiert. Dieses Analogon zeigt zwar in seiner Sekundärstruktur immer noch amphiphilen Charakter (Abb. 4.6), ist jedoch im Vergleich zu DCD-1L wt extrem positiv geladen (Nettoladung +16,

Sequenz Kapitel 4.1, Tab. 4.2). Die mit diesem Peptid beobachtete antimikrobielle Wirkung gegen das gramnegative Bakterium *E. coli* DSM 1103 sollte jedoch bezüglich der Frage nach dem Verständnis der Wirkweise von DCD-1L wt nicht überbewertet werden, da nicht nur das Ladungsreißverschlussmotiv, sondern auch der schwach anionische Charakter des Wildtyp-Peptides durch die Veränderung nicht mehr gegeben ist.

Tabelle 4.10 Hemmkonzentration von DCD-1L und SSL-25. Es wurden keine Hemmkonzentrationen für die hier beschriebenen Stämme beobachtet.

Stamm\Peptid	DCD-1L wt	SSL-25 wt
<i>S. aureus</i> DSM 1104	>256 μ M	>256 μ M
<i>S. xylosus</i> DSM 20266	>256 μ M	>256 μ M
<i>S. epidermidis</i> DSM 1198	>128 μ M	>128 μ M
<i>K. rhizophila</i> DSM 348	>256 μ M	>256 μ M
<i>E. coli</i> DSM 1103	>256 μ M	>256 μ M
<i>E. coli</i> DSM 498	>128 μ M	>128 μ M
<i>E. faecalis</i> DSM 2570	>256 μ M	>256 μ M
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	>128 μ M	>128 μ M
<i>B. subtilis</i> DSM 347	>128 μ M	>128 μ M
<i>C. albicans</i>	>256 μ M*	>256 μ M*

* für *C. albicans* wurde CASO-Bouillon (17 g/L Pepton aus Casein, 3 g/L Pepton aus Soja, 2,5 g/L di-Kaliumhydrogenphosphat, 5 g/L NaCl, 2,5 g/L Glucose-Monohydrat, pH 7,3) zur Kultivierung und für den MHK-Test verwendet.

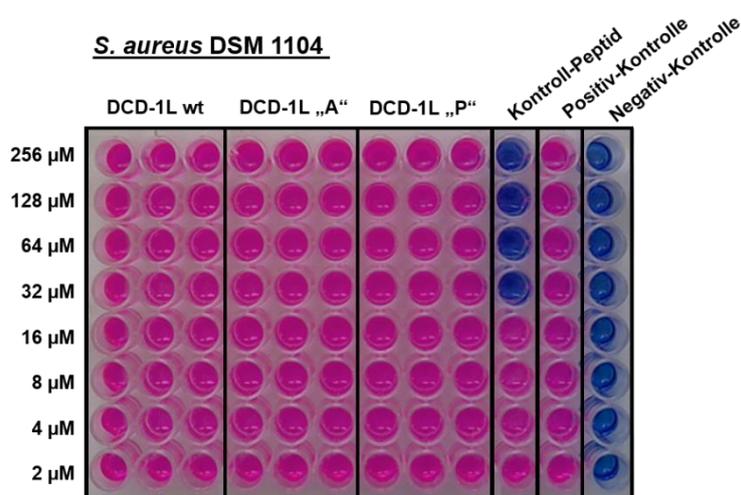


Abb. 4.28 Beispielhaftes Ergebnis eines MHK-Tests. Getestet wurde die Wirkung der Dermcidin-Peptide DCD-1L wt, DCD-1L „A“ und DCD-1L „P“ auf *S. aureus* DSM 1104. Die Mikrotiterplatte wurde nach 20 h Inkubation bei 37 °C mit Resazurinlösung angefärbt. Nach 2 h bei 37 °C wurde das Ergebnis ausgelesen. Die niedrigste Konzentration, bei der das Resazurin nicht reduziert wurde (Farbumschlag blau → pink), stellt den MHK-Wert dar. Als Kontroll-Peptid diente PGLa [92].

4.3.2 Weitere Tests zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität

4.3.2.1 Atmungstests

Da der MHK-Test erst nach ca. 24 h ausgewertet wird, die antimikrobielle Wirkung in den meisten Veröffentlichungen aber meist nach bereits 1-4 h beschrieben wurde [5, 40], stellte sich die Frage, ob die Inhibition des bakteriellen Wachstums nur von kurzer Dauer ist. Wenn das Peptid bereits nach 24 h seine antimikrobielle Wirkung durch z.B. proteolytischen Abbau vollständig verloren haben sollte, dann wäre eine Detektion mit dem MHK-Test nicht möglich. Um gegebenenfalls erfolgende Einflüsse auf Bakterien innerhalb weniger Stunden zu untersuchen, wurde der Standard-MHK-Test abgewandelt (Kapitel 3.6.2.1), indem die Inkubation der Bakterien direkt nach der Inokulation erfolgte. In Abb. 4.29 sind beispielhaft inkubierte Zellen gezeigt. Der Farbumschlag des Resazurins (Resazurin → Resorufin, blau → pink) war innerhalb weniger Stunden vollständig erfolgt. Eine Inhibition des bakteriellen Stoffwechsels von *S. aureus* DSM 1104 oder *E. coli* DSM 1103 wurde weder durch SSL-25 noch durch DCD-1L beobachtet. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass hohe Konzentrationen von SSL-25 (> 256 µg/mL) zu einem früher erfolgenden Farbumschlag führen, den Stoffwechsel der Bakterien also erhöhten.

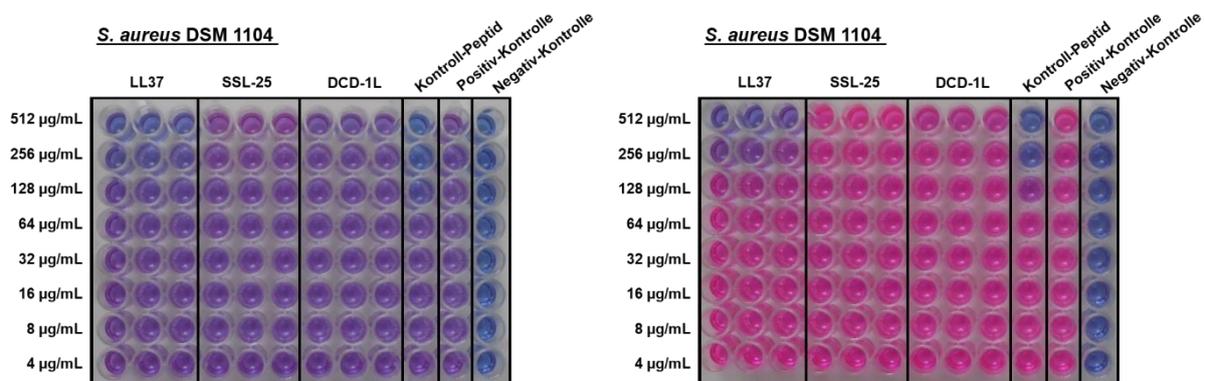


Abb. 4.29 Beispielhaftes Ergebnis eines Atmungstests nach 1 h (links) und nach 3 h (rechts). Getestet wurde die Wirkung der Peptide LL37 (Sequenz: **LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLLVPRTE**S), SSL-25 und DCD-1L auf *S. aureus* DSM 1104. Als Kontrollpeptid diente PGLa [92].

4.3.2.2 Radialdiffusionstests

Der Radialdiffusionstest ist eine weitere Methode, um antimikrobielle Aktivität nachzuweisen [93]. Es erschien sinnvoll auch diese Methoden anzuwenden, da hierbei die Bakterien im Agarmedium vorlagen und nicht in Lösung, wie bei den oben beschriebenen Experimenten zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität. Wiederum wurden die beiden Bakterienstämme *S. aureus* DSM 1104 und *E. coli* DSM 1103 eingesetzt. Als Agarmedien wurden LB-Agar, salzfreier LB-Agar, MH-Agar, MH-Agar mit 2 % KCl, TSB-Agar und Difco Antibiotic Medium 2 verwendet. Es wurden Peptidlösungen von bis zu 5 mg/mL DCD-1L wt und SSL-25 wt eingesetzt. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen wurden die Peptidlösungen abwechselnd in H₂O, 50% EtOH oder in „Schweiß-Puffer“ (10 mM KH₂PO₄, 40 mM NaCl, pH 6,0) gelöst. In allen Experimenten konnten keine Hemmhöfe für Dermcidin-Peptide beobachtet werden. Lediglich der Einsatz anderer AMPs, wie beispielsweise PGLa, führte zur Ausbildung von Hemmhöfen (Abb. 4.30).

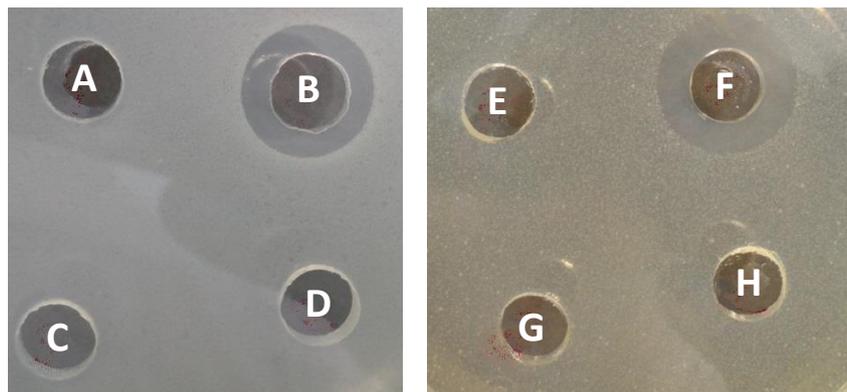


Abb. 4.30 Ausschnitte zweier Agarplatten. Zugegeben wurden: Jeweils 50 μ L DCD-1L wt (5000 μ g/mL A und E), PGLa (200 μ g/mL, B und F), H₂O (D und H) und SSL-25 wt (5000 μ g/mL, C und G). Lediglich PGLa führte zu einem Hemmhof, also einem kreisförmigen Bereich, in dem das bakterielle Wachstum gehemmt wurde.

Die Platten wurden aus salzfreiem LB-Agar (links) oder Difco Antibiotic Medium 2 (rechts), inkubiert mit *S. aureus* DSM 1104, hergestellt. Die Vertiefungen wurden ausgestanzt, mit jeweils 50 μ L Lösung gefüllt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3.2.3 Abtötungskinetik

Mit einem Experiment zur Visualisierung der Verringerung der, hier als Abtötungskinetik bezeichnet, sollte der zeitabhängige Einfluss der Dermcidin-Peptide SSL-25 und DCD-1L

Getestet wurde hierbei mit demselben Bakterienstamm *S. aureus* DSM 1104 bzw. ATCC 25923 bei derselben Peptidkonzentration von 50 µg/mL wie bereits 2009 von Senyurek et al. beschrieben [40]. Anders als in dieser Publikation gezeigt, wies weder DCD-1L wt noch SSL-25 wt eine antibakterielle Wirkung nach 60 min auf. Die Kolonien bildenden Einheiten (KbE) der Kontrolle nahmen wie zu erwarten zu. Durch die Gegenwart der Peptide veränderte sich dieses Wachstum nur geringfügig.

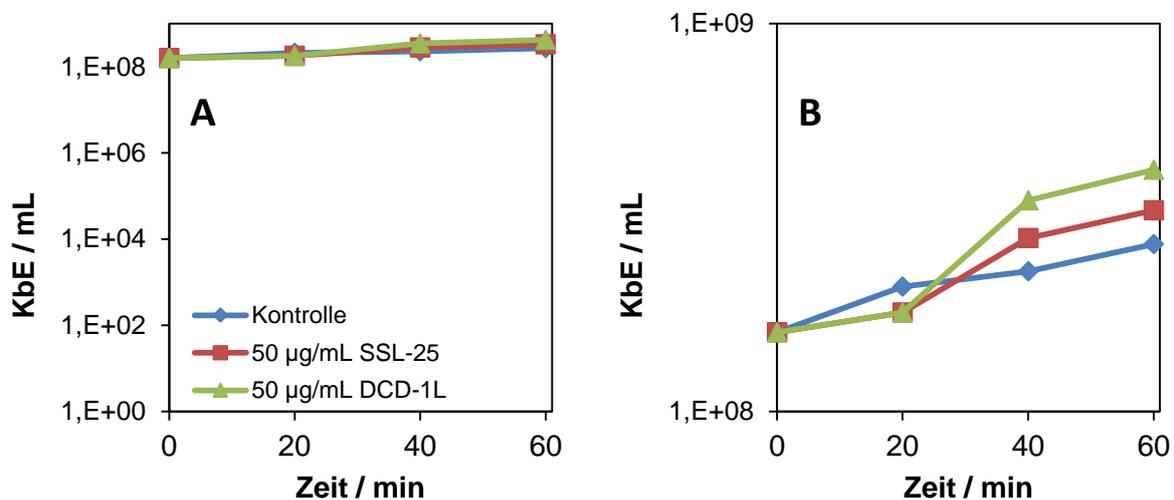


Abb. 4.31 Die kolonienbildenden Einheiten (KbE) der Bakterien steigen an (A). Es wurde auf denselben Bakterienstamm *S. aureus* DSM 1104 getestet, welcher in bereits veröffentlichten Ergebnissen von den Peptiden SSL-25 und DCD-1L innerhalb von 60 min abgetötet wurde [40]. Rechts dargestellt ist eine Vergrößerung der linken Grafik. Eine Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstums war nicht festzustellen.

4.3.3 Leakage-Experimente

Nach den in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 dargestellten Ergebnissen, konnte keinerlei antimikrobielle Aktivität festgestellt werden. Daher wurde die gegebenenfalls auftretende membranschädigende Wirkung der Dermcidin-Peptide mit einem etablierten, Vesikel-basierten fluoreszenzspektroskopischen Verfahren, dem Vesikel-Leakage, untersucht. Um bakterielle Membranen zu simulieren, wurden Lipid-Vesikel eingesetzt die 30 % das anionische POPG enthielten. Das in unserer Gruppe häufig verwendete ANTS/DPX-Leakage (Kapitel 3.7.1.1) zeigte bei denen für AMPs üblichen Peptid-zu-Lipid Verhältnissen (P/L) von ca. 1:50 keinerlei Leakage weder für DCD-1L noch für SSL-25. Bei einer um den Faktor 10 erhöhen Peptidkonzentration (P/L 1:5) konnte dann ein gering ausgeprägtes Leakage beobachtet werden (Abb. 4.32), auf dessen Niveau sich der Einfluss von Zn^{2+} qualitativ untersuchen ließ. Ein positiver Einfluss durch Zn^{2+} war zu erkennen: Während ohne Zn^{2+} für SSL-25 und DCD-1L innerhalb von 900 s etwa 2,5 % Leakage beobachtet wurde, kam es durch Zugabe von 1000 μM Zn^{2+} zu einer Erhöhung des Leakage auf etwa 5,0 %.

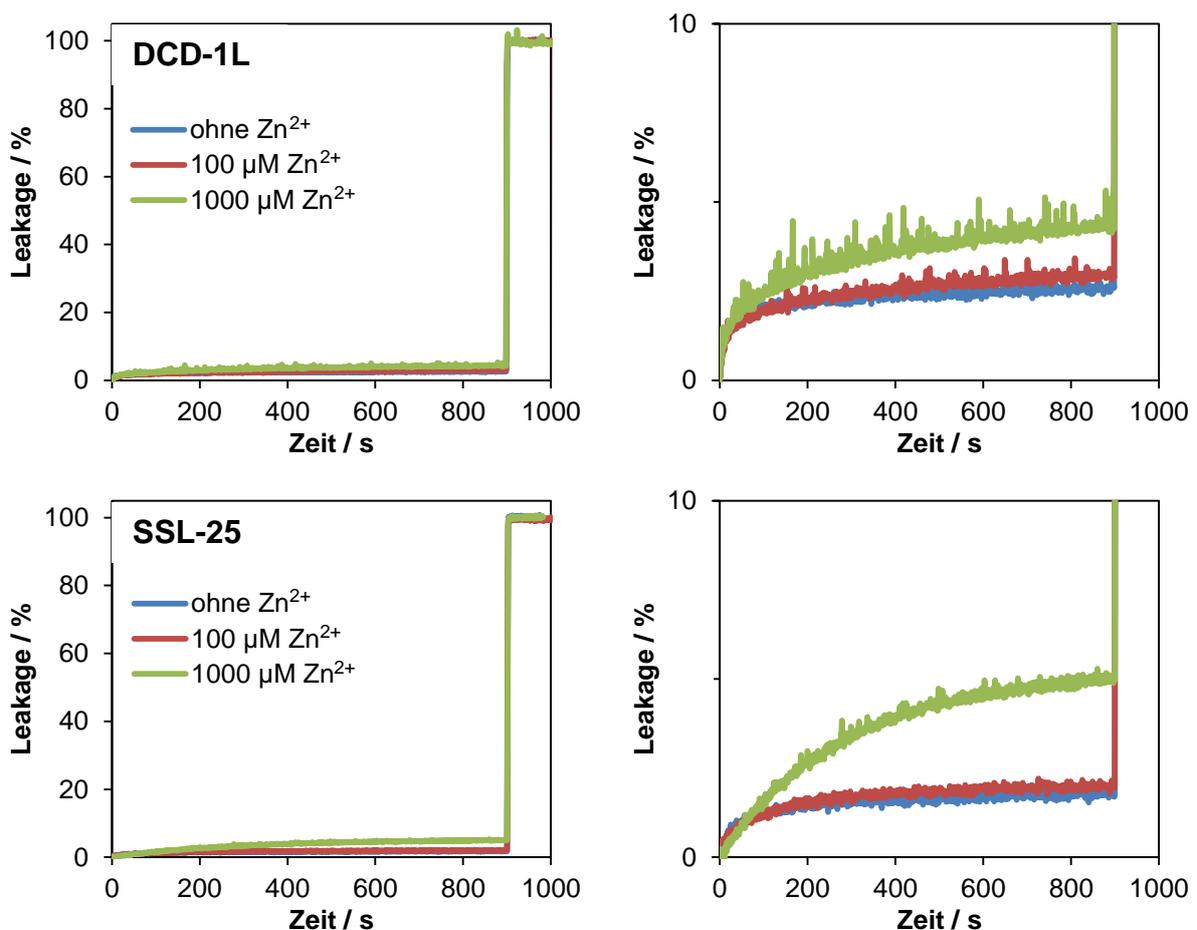


Abb. 4.32 ANTS-DPX-Leakage von POPC/POPG 7:3-Vesikeln durch DCD-1L (oben) und SSL-25 (unten), jeweils bei P/L 1:5. Die Messungen fanden in Puffer niedriger Ionenstärke (10 mM PIPES-Dinatriumsalz, 300 mM Saccharose) bei 30 °C statt. Ein Zn^{2+} -Einfluss ist zu erkennen. Links ist jeweils das Leakage bis 100 % und rechts eine Vergrößerung der linken Grafik aufgetragen.

Dieses oben beobachtete Vesikel-Leakage ist untypisch für ein AMP. Da das ANTS/DPX-Leakage den Austritt des Farbstoffs ANTS ($M_w = 381,3 \text{ g/mol}$) nach Störungen oder Porenbildung in der Vesikelmembran erfasst, könnten gegebenenfalls geringe Störungen bzw. kleine Poren nicht detektiert werden. Dies sollte jedoch bei Verwendung eines kleineren Fluorophors wie Tb^{3+} möglich sein.

Jedoch zeigten auch Messungen mit Tb^{3+} /DPA-Leakage bei P/L 1:50 sehr geringe Signale (< 2 %, Daten nicht gezeigt). Bei P/L 1:5 konnten sodann ein merkliches Leakage beobachtet werden, das es ermöglichte, die Unterschiede durch verschiedene Puffer und Zn^{2+} -Zugaben darzustellen. (Abb. 4.33)

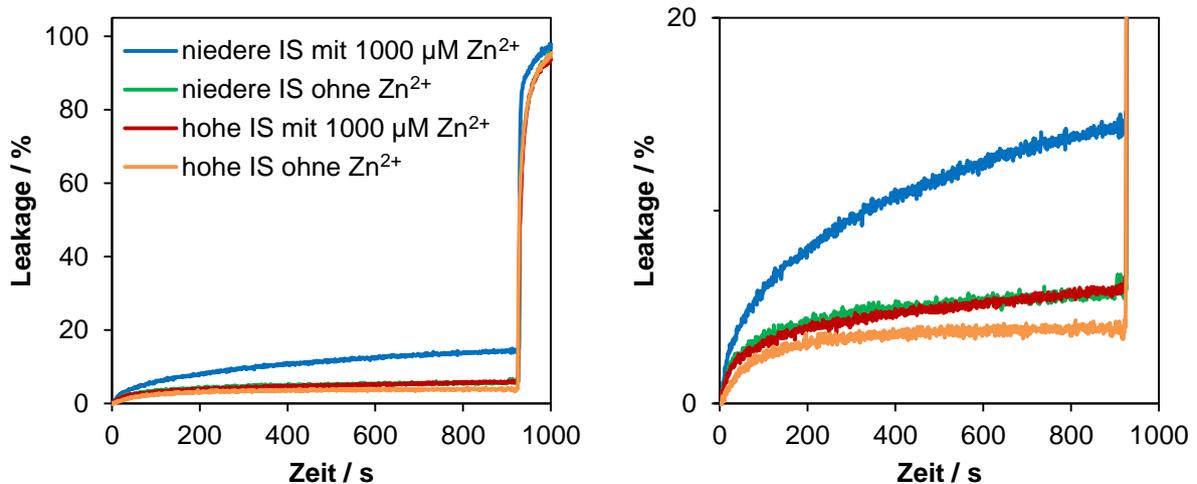


Abb. 4.33 Tb^{3+} /DPA-Leakage von POPC/POPG 7:3-Vesikeln durch P/L 1:5 DCD-1L wt. Gemessen wurde in Außenpuffer hoher und niederer Ionenstärke (IS). Die exakte Zusammensetzung der Puffer kann Kapitel 3.7.1.2 entnommen werden. Die Messungen erfolgten jeweils ohne und mit $1000 \mu\text{M Zn}^{2+}$ bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Auch hier war ein positiver Einfluss durch Zn^{2+} zu erkennen: Während ohne Zn^{2+} für DCD-1L innerhalb von 900 s etwa 4 % bzw. 6 % Leakage beobachtet wurde, kam es durch Zugabe von $1000 \mu\text{M Zn}^{2+}$ zu einer Erhöhung des Leakage auf bis zu 14 %.

Da bei Song et al. [47] beschrieben wurde, dass DCD-1L in Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen Poren ausbildet wurde versucht dies zu verifizieren. Hierzu wurden die Versuchsbedingungen der Leakage-Experimente den elektrophysiologischen Untersuchungen der genannten Veröffentlichung angepasst, indem zu einen mit neutralem Lipid gearbeitet wurde und zum anderen ein Potential über die Vesikelmembran angelegt wurde.

Durch Variation der K^+ -Konzentration im Innen- und Außenpuffer der Vesikel und durch Zugabe des K^+ -selektiven Ionophors Valinomycin wird ein Potential über die Vesikel-Membran aufgebaut. Die Konzentrationen der Puffer wurden so gewählt, dass ca. 100 mV anlagen. Es wurden Leakage Experimente mit Membranpotential in beiden Richtungen

(positives und negatives Potential außen bzw. innen) durchgeführt. Zum Vergleich wurden Leakage-Experimente ohne Potential durchgeführt.

Diese Messungen waren mit ANTS/DPX-Leakage realisiert, da die beim Tb^{3+} /DPA-Leakage im Vesikelinneren Citrat als Komplexbildner zugesetzt werden muss, um Citrat als schwache Säure durch die Membran permeieren kann [94] und so ein angelegtes Potential abbaut. Um die Leakage-Werte vergleichen zu können, wurden diese Messungen ebenfalls bei P/L 1:5 durchgeführt. In Abb. 4.34 sind die erhaltenen Leakage-Werte nach 15 min in % als Balkendiagramm dargestellt.

Das angelegte Potential hatte Einfluss auf das beobachtete Leakage. Ein positiver Zn^{2+} -Effekt ist zwar klar zu erkennen, aber die erwartete sehr deutlich ausgeprägte Steigerung des Leakage, die auf das Ausbilden von Poren hätte schließen lassen, wurde nicht beobachtet. Die relativ höchsten Leakage-Werte wurden mit negativem Potential außen erzielt, obwohl DCD-1L als anionisches Peptid höhere Affinität zu einem positiven Potential auf der Vesikel-Außenseite zeigen sollte.

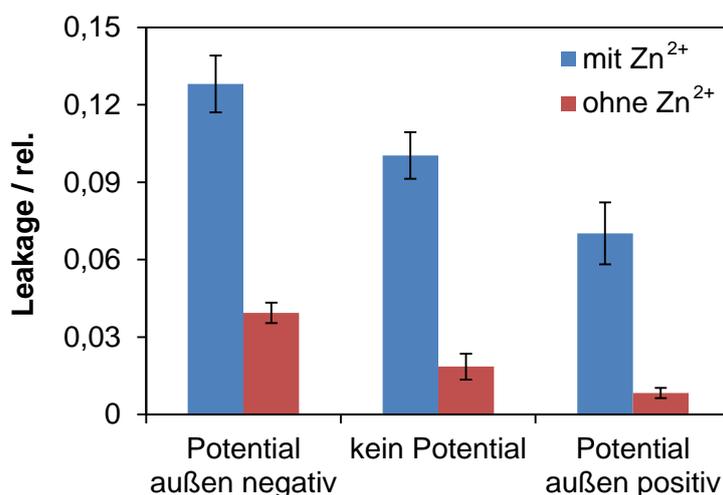


Abb. 4.34 ANTS/DPX-Leakage von POPC-Vesikeln durch DCD-1L in Puffer mit hoher Ionenstärke (10 mM PIPES, 150 mM NaCl bzw. KCl) bei 30 °C. Die Messungen fanden bei P/L 1:5 statt. Gezeigt ist das Leakage nach 15 min. Es wurden Messungen ohne Zn^{2+} und mit 1000 μM Zn^{2+} durchgeführt. Das Membranpotential der Vesikel wurde durch unterschiedliche K^+ -Konzentrationen im Inneren und Äußeren und durch Zugabe von Valinomycin erzeugt.

Alle durchgeführten Leakage-Experimente zeigten, dass DCD-1L die Lipiddoppelschichten von Vesikeln nur geringfügig störte. Ein deutliches und AMP-typisches Vesikel-Leakage wurde unter keiner der getesteten Bedingungen beobachtet. Die Ergebnisse waren nicht mit den veröffentlichten antimikrobiellen Eigenschaften oder der Porenbildung von DCD-1L in Einklang zu bringen. In der vorliegenden Arbeit korrelierte jedoch die nicht beobachtete antimikrobielle Aktivität mit den Ergebnissen der Leakage-Experimente sehr gut.

4.3.4 Hämolyse

Nachdem die Schädigung bakterieller Membranen, wie oben beschrieben, nicht signifikant war, wurde die membranschädigende Wirkung der Dermcidin-Peptide auf eukaryotische Membranen untersucht, indem Hämolyse-Experimente durchgeführt wurden. Hierbei wurden die Bedingungen so gewählt, dass die Erythrozyten sehr anfällig für Membranschädigungen waren: Die Erythrozyten wurden stark verdünnt (0,25 % Hämatokrit) und es wurde in Abwesenheit von stabilisierenden Zusätzen wie BSA im Puffer gearbeitet. Trotz dieser Bedingungen war die für SSL-25 wt und DCD-1L wt beobachtete Hämolyse sehr gering. Besonders DCD-1L zeigte selbst in sehr hohen Konzentrationen annähernd keine Hämolyse (Abb. 4.35). Da nach den zuvor gezeigten Ergebnissen DCD-1L an neutrale Membranen in hoher Ionenstärke (Kapitel 4.2.4) nur schwach bindet, kann dieses Ergebnis unmittelbar nachvollzogen werden.

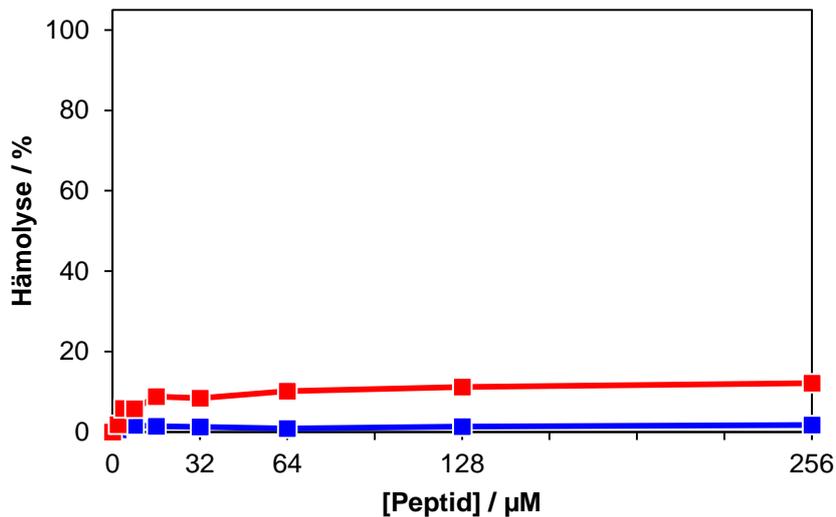


Abb. 4.35 Hämolyse von DCD-1L wt (blau) und SSL-25 wt (rot) nach Inkubation von 0,25 % Hämatokrit mit dem entsprechenden Peptid für 30 min bei 37 °C.

4.3.5 RAW Makrophagen-Inkubation

Für einige antimikrobielle Peptide wurde eine indirekte Wirkweise aufgezeigt, indem sie Entzündungsreaktionen auslösen. Dadurch wurde die körpereigene Immunantwort frühzeitig aktiviert um schädliche Bakterien zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu bekämpfen [95, 96]. Eine ähnliche Wirkweise hätte erklären können, warum in den Kapiteln 4.3.1 bis 4.3.4 keine antimikrobielle Wirkung bzw. direkte Membranschädigung gefunden wurde. Um diesen für Dermcidin-Peptide gegebenenfalls alternativen Wirkmechanismus zu untersuchen, wurden Versuche mit Makrophagen (Kapitel 4.3.5 und 4.3.6) in Kooperation mit dem Institut für Toxikologie und Genetik im Arbeitskreis von Dr. Carsten Weiss durchgeführt.

Es wurden RAW 264.7 Makrophagen über Nacht mit den Peptiden PGLa, SSL-25, DCD_1L und Gramicidin S in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 μM , 5 μM , 20 μM und 50 μM für PGLa, SSL-25 und DCD-1L; 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM für Gramicidin S) inkubiert. Dieses Experiment diente einerseits der eigentlichen Inkubation der Zellen und andererseits als Vortest um eine ungerichtete Immunantwort auszuschließen. Sollten die Zellen bereits durch die Inkubation mit den Peptiden Schaden nehmen, so wäre eine Erhöhung der TNF α -Antwort beispielsweise auch durch diese willkürliche Schädigung zu erklären gewesen. Die Zellen inkubierten 24 h mit den Peptiden.

4.3.5.1 LDH-Freisetzung

Als ersten Vortest fungierte die Freisetzung der Laktat-Dehydrogenase (LDH). Um die maximal mögliche Freisetzung zu beobachten wurde den Zellen der Positivkontrolle Triton X-100 zugesetzt, welches die Zellen vollständig lysierte und die maximal mögliche Menge LDH freisetzte.

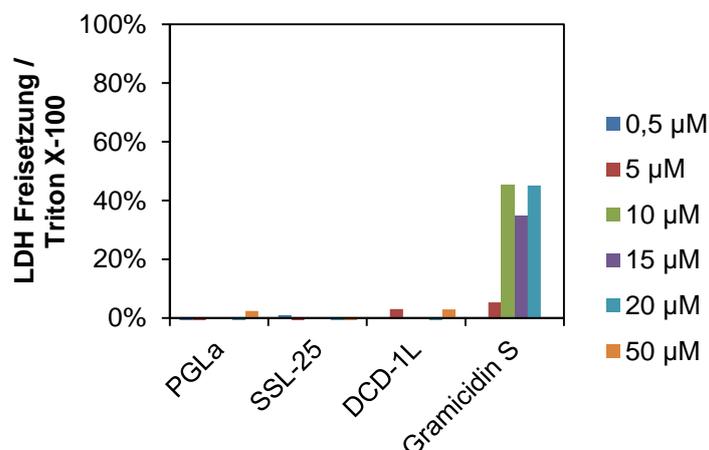


Abb. 4.36 Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung nach 24 h Inkubation der RAW 264.7 Makrophagen mit PGLa, SSL-25, DCD-1L und Gramicidin S. Lediglich die mit Gramicidin S inkubierten Zellen zeigten eine signifikante Freisetzung von LDH.

SSL-25, DCD-1L und PGLa zeigten keine signifikante LDH-Freisetzung. Das ebenfalls untersuchte Peptid Gramicidin S zeigte ab 10 μM eine deutliche Freisetzung. Die Zellen waren durch das Peptid geschädigt worden. Eine eventuell positive Reaktion während der ELISA-Experimente (Kapitel 4.3.6) wäre zu vernachlässigen gewesen.

4.3.5.2 Propidiumiodid-Färbung

Nachdem die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und Hoechst 33342 angefärbt worden waren, wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Hierzu wurde an einem automatisierten Mikroskop Aufnahmen der Zellen im Hellfeld und direkt im Anschluss fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit für die beiden verwendeten Fluorophore optimierten Filtern erstellt. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzwerte erlaubte Rückschlüsse, ob die Zellen lebensfähig waren. Es wurde unterteilt in lebensfähige Zellen, frühapoptotische Zellen, spätapoptotische Zellen und nekrotische Zellen. Die Inkubation von bis zu 50 μM SSL-25 und DCD-1L zeigten keine signifikante Beeinträchtigung der Zellen. Es blieben nach der Inkubation immer mindestens 95 % der Zellen lebensfähig (Abb. 4.37). Membranschädigende Peptide wie Gramicidin S führten durch Inkubation der Zellen zum Zelltod.

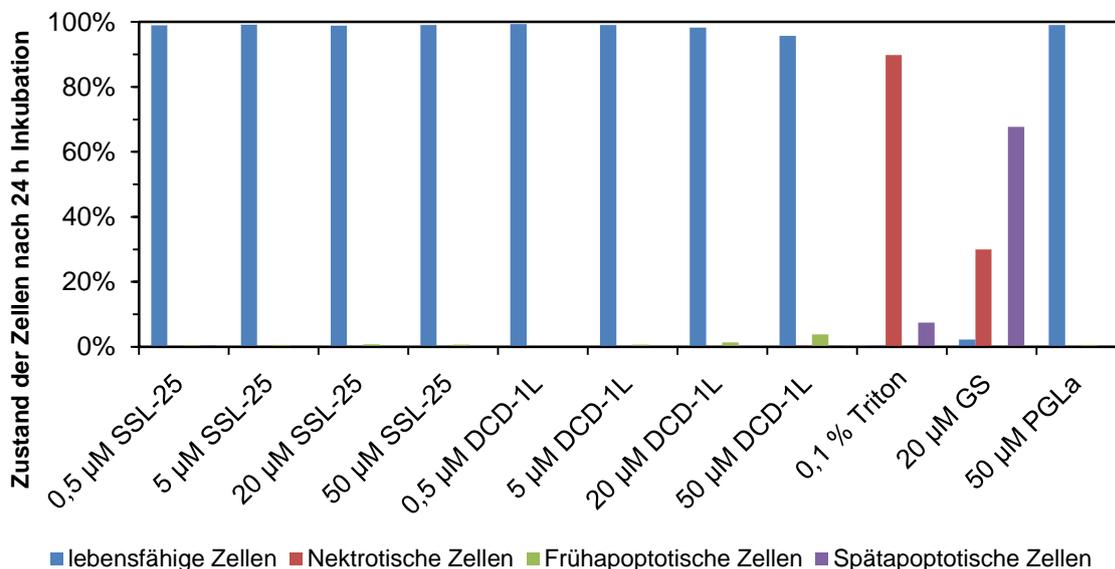


Abb. 4.37 Auswertung der PI-Färbung. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität in den Zellkernen der Zellen wurde mit einer Software abgeschätzt, in welchem Zustand sich die Zellen befanden. Niedere PI- und Hoechst-Fluoreszenz zeigten nur lebensfähige Zellen. Frühapoptotische Zellen zeigten eine erhöhte Hoechst-Fluoreszenz, spätapoptotische Zellen zeigten eine erhöhte PI- und Hoechst-Fluoreszenz und nekrotische Zellen zeigten lediglich eine erhöhte PI-Fluoreszenz.

Diese Einflüsse auf die Zellen waren unter dem Mikroskop auch ohne die zusätzliche Quantifizierung durch die Analysesoftware klar zu erkennen. (Abb. 4.38) Eine Veränderung der Zellmorphologie wurde im Lichtfeld nach der Inkubation mit Triton X-100 oder Gramicidin S beobachtet. Durch Vergleiche der beiden Fluoreszenzkanäle für Hoechst 33342 und PI konnten ebenfalls Rückschlüsse über den Zustand der Zellen geschlossen werden. Nur wenn im PI-Kanal viele Zellkerne angefärbt waren, so wie durch Triton X-100 oder durch Gramicidin S, konnte PI in die DNA des Zellkerns interkalieren und stark fluoreszieren.

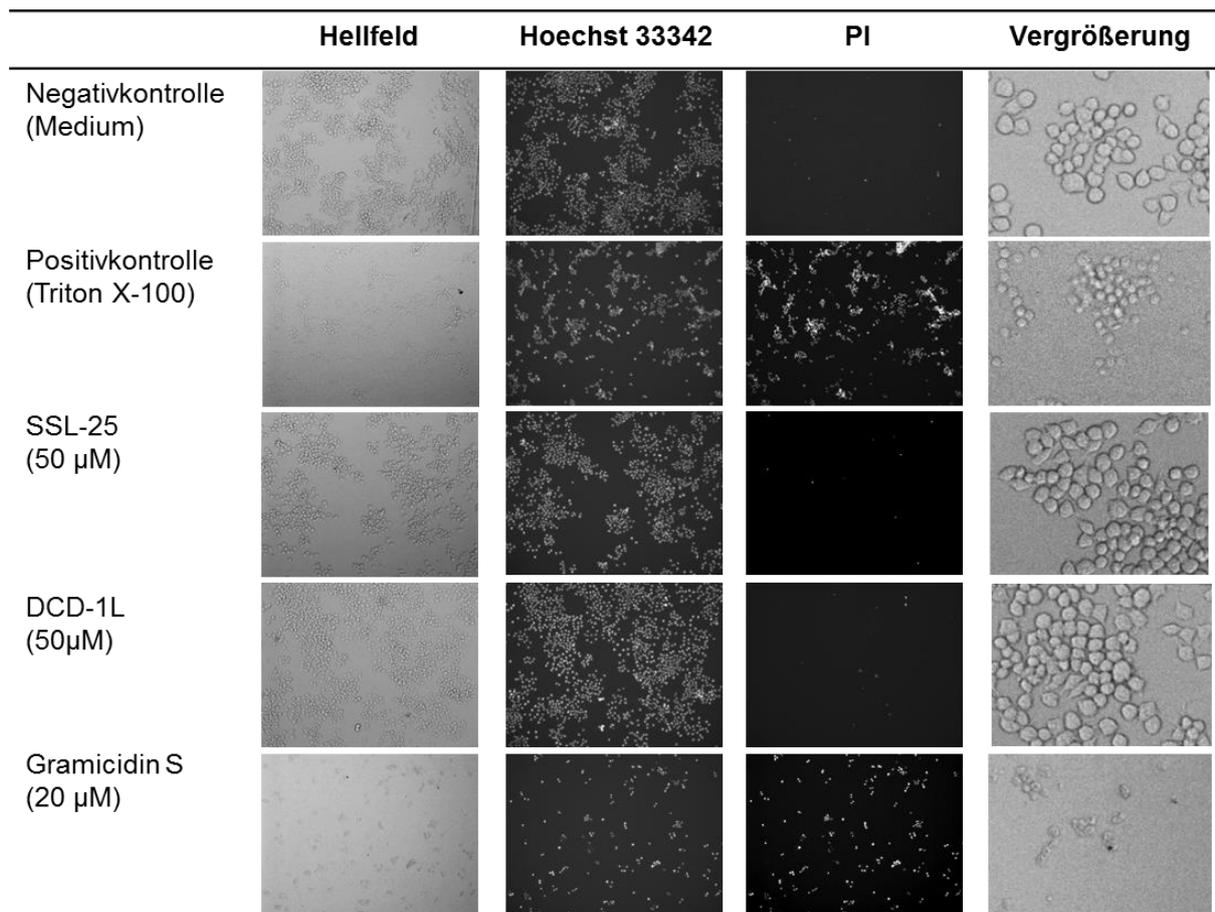


Abb. 4.38 RAW 264.7 Makrophagen nach 24 h Inkubation in handelsüblichem Medium oder in Medien, denen Peptide, hier SSL-25 und DCD-1L, zugesetzt wurden. Für die Positivkontrolle wurden den Zellen 30 min vor Ende der 24 h Inkubation Triton X-100 zugesetzt. Nach der Inkubation mit membranschädigenden Peptiden wie Gramicidin S waren nur Zelltrümmer im Hellfeld sichtbar.

Die Inkubation mit SSL-25 und DCD-1L schädigte die Zellen nicht. Eine ungewollte Immunantwort der Zellen war hierdurch ausgeschlossen.

4.3.6 Immunantwort von RAW Makrophagen

In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass die Inkubation der RAW 264.7 Makrophagen mit den zu testenden Peptiden keine irrtümliche positive Erhöhung der zu testenden Proteine Tumornekrosefaktor- α (TNF α), Interleukin 1 β (IL1 β) und Interleukin 6 (IL6) ergab. Nachfolgend wurden erneut Makrophagen mit den Peptiden in einem größeren Ansatz in 12-Well-Platten inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde nach 24 h entnommen und mittels enzymverknüpften Immunosorbensuntersuchungen (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) eine eventuelle Erhöhung der drei Proteine detektiert. Das Medium aller mit Peptiden inkubierten, lebensfähigen Zellen enthielt keine erhöhten Konzentrationen an IL1 β und IL6. Das Medium der Zellen, welche mit hohen Konzentrationen PGLa und SSL-25 inkubiert wurden, enthielt deutlich erhöhte Konzentrationen an TNF α . (Abb. 4.39 & 4.40)

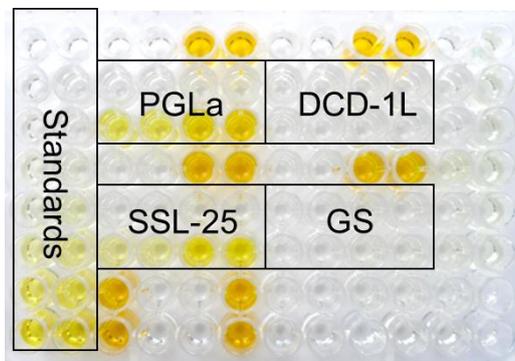


Abb. 4.39 Mikrotiterplatte eines durchgeführten TNF α -ELISA. Die vorausgegangene Inkubation der RAW 264.7 Makrophagen mit PGLa und SSL-25 führte zu erhöhten TNF α -Werten.

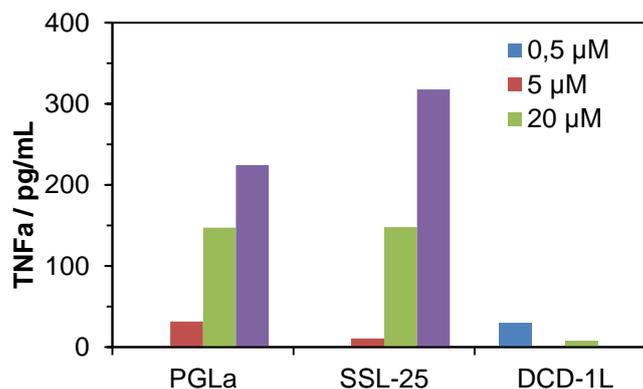


Abb. 4.40 Quantifizierung der TNF α -Konzentrationen des in Abb. 4.39 gezeigten TNF α -ELISA. Während sich bei DCD-1L keine signifikante Erhöhung der TNF α -Werte ergab, waren durch SSL-25 und PGLa deutliche Erhöhungen festzustellen.

Zwei wiederholte Inkubationen der RAW 264.7 Makrophagen mit anschließendem ELISA zeigten jedoch, dass sich die oben dargestellten Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Insofern sind die oben gezeigten Daten nicht repräsentativ und sollten nicht überbewertet werden.

4.4 Funktionsuntersuchungen Teil 2: Translokationsexperimente

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 stimmten nicht mit den bisher veröffentlichten und allgemein akzeptierten Eigenschaften der Dermcidin-Peptide überein, sowohl für DCD-1L als auch für SSL-25 konnte keinerlei antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Jedoch weisen beide Peptide amphiphile Eigenschaften auf, in ihrer Helikalen-Rad-Darstellung (Abb. 1.6) sind klar abgegrenzte hydrophobe und hydrophile Seiten zu erkennen. Eine weitere Gruppe α -helikaler Peptide, die strukturelle Ähnlichkeit mit Dermcidin-Peptiden aufweist sind sekundäre amphipatische zellpenetrierende Peptide (saCPPs), wie sie in Kapitel 1.7 eingeführt wurden. Sie sind beide in Lösung unstrukturiert, binden an Lipiddoppelschichten unter Ausbildung einer amphipatischen Helix und benötigen eine initiale Interaktion mit einer Membran um ihre eigentliche Funktion auszuüben. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten wurden Dermcidin-Peptide in diesem Kapitel hinsichtlich ihrer zellpenetrierenden Eigenschaften ausführlich untersucht.

4.4.1 Translokation in Vesikel

Orientierende Messungen der Translokation erfolgten mit Vesikeln der Lipidzusammensetzung POPC/POPG (7:3). Als Referenz wurde ein Peptid, welches aus einer Optimierungsstudie für CPPs hervorging, TP1 (Sequenz: **PLILLRLLR**), verwendet [80]. Zunächst wurde eine nur sehr geringe, aber klar vorhandene Translokation für das DCD-1L-Analogon DCD-1-GQF-Aca-L (ca. 2 %) beobachtet. Jedoch konnte durch die Zugabe von $1000 \mu\text{M Zn}^{2+}$ wurde die Translokation erheblich gesteigert werden (Abb. 4.41).

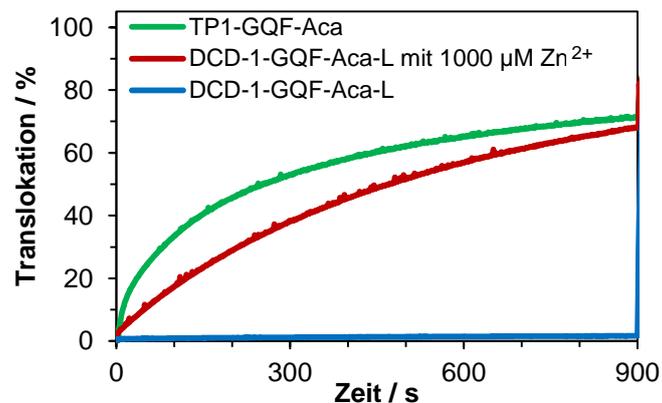


Abb. 4.41 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L und TP1-GQF-Aca in POPC/POPG (7:3)-Vesikel bei P/L 1:50. Die geringe Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L konnte mit $1000 \mu\text{M Zn}^{2+}$ beachtlich gesteigert werden. Die Messungen erfolgten in Puffer niedriger Ionenstärke bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.1.1 Zn²⁺-Abhängigkeit

Entsprechend den Ergebnissen der Bindungsexperimente (Kapitel 4.2.4) wurden für die nachfolgend dargestellten Messungen der Translokation die beiden Lipidsysteme POPC/POPG (3:1) – moderate Bindung – und POPC/POPG (1:3) – starke Bindung – eingesetzt. Um die Auswirkungen von Zn²⁺ auf die Stabilität der Vesikel zu gering zu halten, wurde mit einer maximalen Zn²⁺-Konzentration von 100 µM gearbeitet. Wie bereits bei den Bindungsexperimenten wurde überprüft, ob der Zn²⁺-Einfluss stetig erfolgt oder oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes die Translokation des Peptids abrupt ansteigt. Hierzu wurde der zeitliche Verlauf der Translokation über einen Zeitbereich von 900 s detektiert (Abb. 4.42).

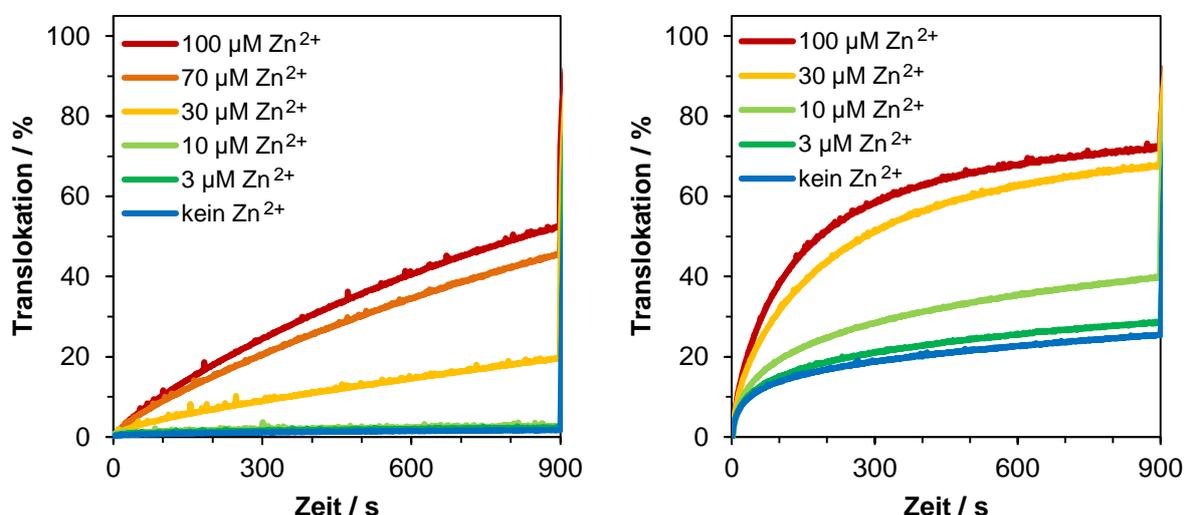


Abb. 4.42 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L in POPC/POPG (3:1)-Vesikel (links) oder in POPC/POPG (1:3)-Vesikel bei P/L 1:50. Bis zu 100 µM Zn²⁺ wurde den Proben vor Beginn der Messung zugesetzt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C.

Die beobachtete Steigerung der Translokation mit steigenden Zn²⁺-Konzentrationen verlief stetig und kann als direktes Abbild der Bindungseffizienz des Peptids an die verwendeten Lipidmembranen (vergl. Kapitel 4.2.4) interpretiert werden.

Deutlich zu erkennen war, dass die Translokation in die stärker negativ geladenen Vesikel deutlich schneller verlief und auch ohne Zn²⁺-Zugabe nach 900 s bereits Werte um 25 % erreichte. Der Einfluss des Zn²⁺ war bei diesen Vesikeln auch bei geringeren Konzentrationen zu bemerken. So hatten 10 µM Zn²⁺ (grüne Kurve) bei den POPC/POPG (1:3)-Vesikeln eine deutliche Erhöhung der Translokation zu Folge (ca. 40 % nach 900 s), während bei den POPC/POPG (3:1) Vesikeln nur eine marginale Verbesserung erkennbar war.

Mit diesen Experimenten wurde deutlich, dass ein sehr ausgeprägter Zn²⁺-Einfluss auf die Translokation vorhanden ist und somit mit der Funktion des Peptids korrelieren sollte.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die beobachtete Steigerung der Translokation lediglich durch Zn^{2+} -Ionen oder auch andere 2-wertige Ionen erfolgt.

Zn^{2+} ist einerseits ein Ion eines Übergangsmetalls, daher wurden Co^{2+} und Ni^{2+} untersucht, da sie einen ähnlichen Ionenradius aufweisen, andererseits ist die d-Schale des Zn^{2+} vollständig gefüllt, was ihm einen Pseudo-Hauptgruppen-Charakter verleiht. Daher wurden auch die beiden zweiwertigen Hauptgruppenelement-Ionen, nämlich Ca^{2+} und Mg^{2+} , mit dem ähnlichsten Ionenradius untersucht [97]. Darüber hinaus wurde von einem positiven Effekt für Ca^{2+} und Mg^{2+} in einer Publikation von 2012 berichtet [45], in der DCD-1L als antimikrobiell aktiv beschrieben wurde. Der zeitliche Verlauf der Translokation wurde sowohl in POPC/POPG (3:1)-Vesikeln als auch in POPC/POPG (1:3)-Vesikeln untersucht. (Abb. 4.43)

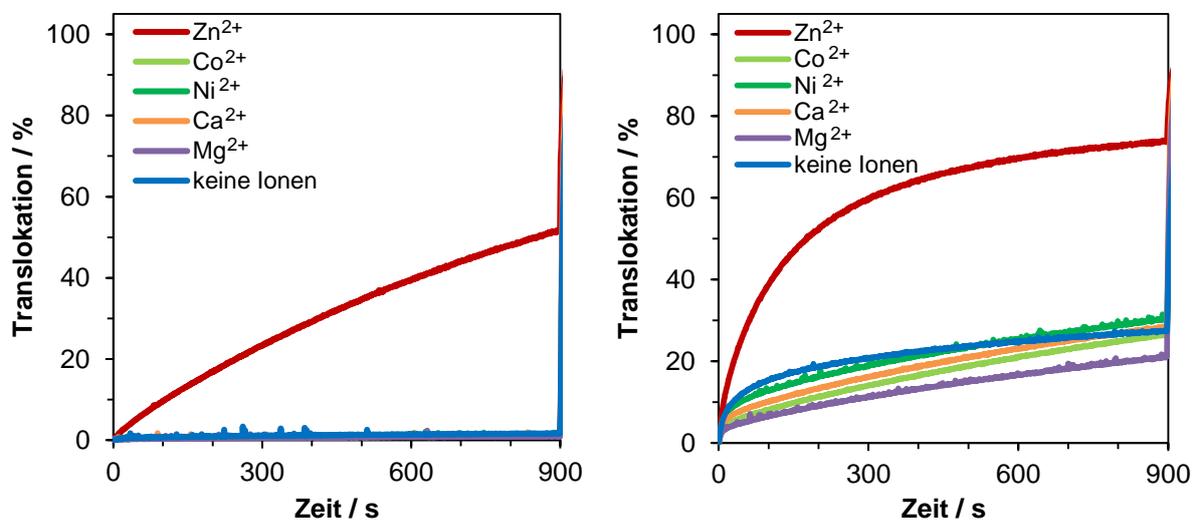


Abb. 4.43 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L in POPC/POPG (3:1)-Vesikel (links) oder in POPC/POPG (1:3)-Vesikel bei P/L 1:50. Das Experiment wurde ohne Zugabe 2-wertiger Ionen und mit Zugabe von 100 μM Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+} durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Puffer niedriger Ionenstärke und bei 20 °C.

Wie in Abb. 4.43 klar zu erkennen ist zeigte ausschließlich Zn^{2+} einen deutlichen Einfluss auf die Translokation in beiden Lipidsystemen. In POPC/POPG (3:1) zeigten alle anderen untersuchten 2-wertigen Ionen keine signifikante Erhöhung der Translokation. Es wurde nach 900 s eine geringe Translokation von ca. 1,5 % erzielt, mit Zn^{2+} hingegen ca. 50 %. In POPC/POPG (1:3) war das Ausmaß der Translokation bei Anwesenheit aller weiteren 2-wertigen Ionen leicht unterschiedlich und nur durch Zn^{2+} -Zugabe war eine signifikante, geradezu sprunghaft erhöhte Translokation zu beobachten. Somit erfolgte in beiden untersuchten Lipidsystemen ausschließlich mit Zn^{2+} -Ionen eine signifikante und sehr markante Translokationssteigerung.

Zn^{2+} -Ionen sollten, wie in Veröffentlichungen diskutiert, an His38 der DCD-1L-Sequenz binden und somit entweder die Oligomierisierung [47] oder die Bindung der Peptid-Helix an

Phosphatkopfgruppen [83] unterstützen. Kürzere Dermcidin-Peptide wie SSL-25 weisen diesen Aminosäurerest (His38) nicht auf. Daher lag nahe, dass die Translokation dieser Peptide nicht durch Zn^{2+} -Ionen erhöht werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde das SSL-25 Analogon SSL-24-GQF-Aca-A in beiden zuvor verwendeten Lipidsystemen und in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen untersucht. (Abb. 4.44)

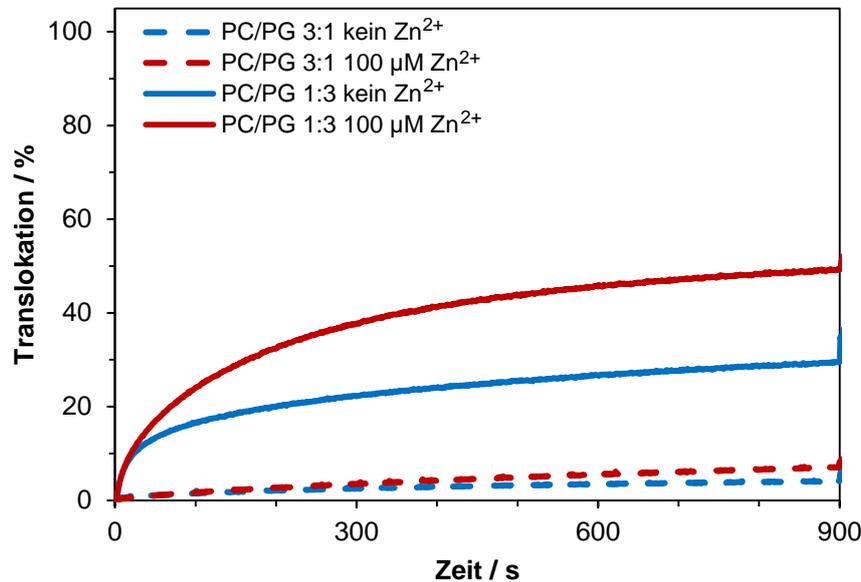


Abb. 4.44 Zeitlicher Verlauf der Translokation von SSL-24-GQF-Aca-A in POPC/POPG (3:1) (gestrichelte Linien) und in POPC/POPG (1:3) (durchgezogene Linien) ohne Zn^{2+} (rote Linien) und mit 100 μM Zn^{2+} (blaue Linien) bei P/L 1:50. Die Messungen erfolgten in Puffer niedrigerer Ionenstärke und bei 20 °C.

Für das SSL-25-Analogon SSL-24-GQF-Aca-A wurde ebenfalls eine Translokation in POPC/POPG-Vesikel festgestellt, wobei auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Lipidsystemen zu verzeichnen war. Ähnlich wie bei dem DCD-1L Analogon war die Translokation bei den stark anionischen Membranen deutlich erhöht. Jedoch war ebenfalls ein positiver Einfluss von Zn^{2+} -Ionen auf die Translokation in beiden Lipidsystemen deutlich zu erkennen. Dieser Zn^{2+} -Einfluss ist zwar geringer ausgeprägt, als bei dem DCD-1L Analogon DCD-1-GQF-Aca-L, er ist jedoch signifikant.

In Abwesenheit der Zn^{2+} -Ionen waren nach 900 s ca. 4 % des Peptides in die POPC/POPG (3:1)-Vesikel transloziert, mit 100 μM Zn^{2+} waren in derselben Zeit ca. 6 % des Peptids eingedrungen. Die Translokation in POPC/POPG (1:3)-Vesikel konnte bei analogem Vorgehen von ca. 30 % (ohne Zn^{2+}) auf etwa 50 % (mit 100 μM Zn^{2+}) erhöht werden.

4.4.1.2 Analoga zur His-Abhängigkeit und zum Ladungsreißverschluss-Motiv

Diverse DCD-1L Analoga mit den entsprechenden Veränderungen und GQF-Aca als C-Terminale Sequenz wurden untersucht, um den Einfluss des His38 in der DCD-1L-Sequenz und den Einfluss des Ladungsreißverschluss-Motives zu untersuchen. Da zu erwarten war, dass die einige Analoga eine effektive Translokation senken, wurde mit POPC/POPG (1:3)-Vesikeln gearbeitet, da hierbei bereits ohne Zn^{2+} -Ionen eine signifikante Translokation beobachtet wurde (Kapitel 4.4.1.1).

Durch Ersetzen des His38 in der DCD-1L-Sequenz durch einen Alaninrest, sollte die Zn^{2+} -abhängige Translokation des Analogons DCD-1-GQF-Aca-L H38A deutlich reduziert werden. Es wurde erwartet, dass die Translokation ohne Zn^{2+} annähernd unverändert bleibt.

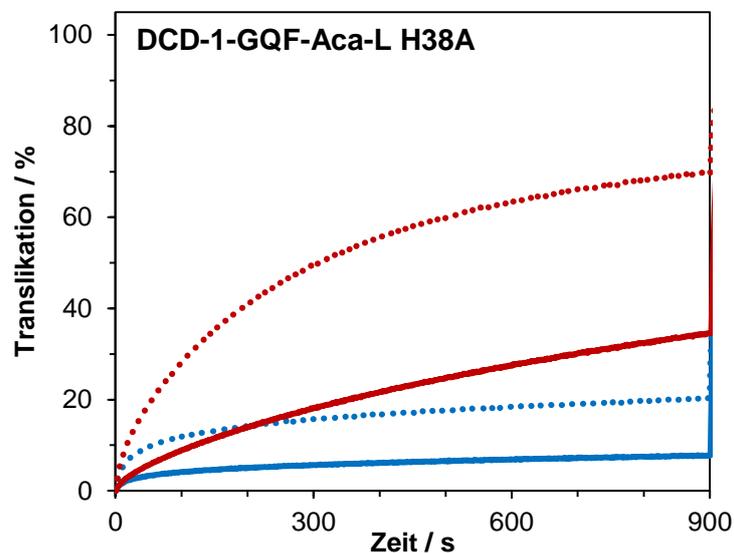


Abb. 4.45 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L und DCD-1-GQF-Aca-L H38A in POPC/POPG (1:3)-Vesikel bei P/L 1:50. Die durchgezogenen Linien entsprechen DCD-1-GQF-Aca-L H38A, während die gepunkteten Kurven die Translokation des DCD-1-GQF-Aca-L darstellen. Die roten Kurven wurden mit 100 μM Zn^{2+} , die blauen Kurven ohne Zn^{2+} erhalten. Die Messungen erfolgten in Puffer niedrigerer Ionenstärke und bei 20 °C. DCD-1-GQF-Aca-L H38A zeigte eine deutlich geringere Translokation als DCD-1-GQF-Aca-L.

Durch Ersetzen des His38 wurde die Translokation generell vermindert, sowohl in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen als auch in Abwesenheit dieser. Im Falle des DCD-1-GQF-Aca-L H38A wurde zum einen eine deutliche Zn^{2+} -Abhängigkeit festgestellt, zum anderen war – etwas unerwartet – die Translokation in Abwesenheit von Zn^{2+} deutlich geringer als bei DCD-1-GQF-Aca-L.

Die bereits in Experimenten zur antimikrobiellen Aktivität eingesetzten Analoga mit modifiziertem Ladungsreißverschlussmotiv, DCD-1L „A“ und DCD-1L „P“ (Tab. 4.1) wurden, mit GQF-Aca-Sequenz versehen, in weiteren Translokationsexperimenten verwendet. Die Translokation dieser Peptide – DCD-1-GQF-Aca-L „A“ und DCD-1-GQF-Aca-L „P“ – wurden

aus bereits oben angeführten Gründen in POPC/POPG (1:3)-Vesikeln untersucht (Abb. 4.46).

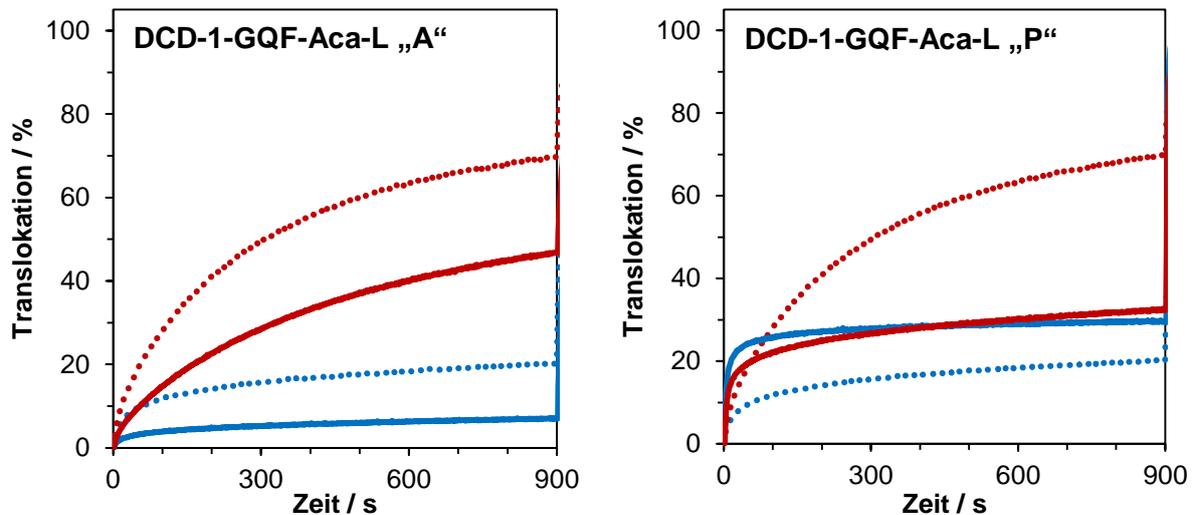


Abb. 4.46 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L und DCD-1-GQF-Aca-L „A“ (links) bzw. DCD-1-GQF-Aca-L „P“ (rechts) in POPC/POPG (1:3)-Vesikel bei P/L 1:50. Die durchgezogenen Linien entsprechen DCD-1-GQF-Aca-L „A“ bzw. DCD-1-GQF-Aca-L „P“, während die gepunkteten Kurven die Translokation des DCD-1-GQF-Aca-L darstellen. Die roten Kurven wurden mit $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$, die blauen Kurven ohne Zn^{2+} erhalten. Die Messungen erfolgten in Puffer niedriger Ionenstärke und bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die Ergebnisse waren überraschend: DCD-1-GQF-Aca-L „A“ translozierte deutlich geringer als die entsprechende Wildtyp-Sequenz in die Vesikel. Dennoch zeigte es hierbei eine starke Zn^{2+} -Abhängigkeit. DCD-1-GQF-Aca-L „P“ hingegen zeigte innerhalb der ersten Sekunden eine schnelle Translokationsrate, relativ unabhängig von der Zn^{2+} -Konzentration. Nach ca. 100 s Sekunden stagnierte diese Translokation und kam auf einem etwa konstanten Niveau zum Erliegen. Beide Analoga weisen zwar veränderte Ladungsreißverschluss-Motive auf, doch sollte deren Anordnung intramolekulare Ladungskompensation ermöglichen. Die Befähigung zur Translokation hätte hierdurch – wenn überhaupt – nur in einem geringen Ausmaß beeinflusst werden sollen.

Analog zu der Sequenz DCD-1L „C“ (Kapitel 4.1) wurde ein Peptid mit GQF-Aca-Sequenz synthetisiert, DCD-1-GQF-Aca-L „C“, das kein direktes Ladungsreißverschluss-Motiv aufweist, und sollte daher, wenn ein ungestörtes Motiv für die Translokation eine notwendige Voraussetzung darstellt, eine deutlich reduzierte Translokation aufweisen. Die entsprechenden Experimente (Abb. 4.47) zeigten, dass die Translokation dieser Sequenz tatsächlich geringer ausfiel als die Wildtypsequenz, sie war jedoch vergleichbar mit der Translokation, die für DCD-1-GQF-Aca-L „A“ zuvor beobachtet wurde (Abb. 4.46 links). Somit schien ein gestörtes Ladungsreißverschluss-Motiv keinen gravierenden Einfluss auf die eigentliche Translokation zu haben.

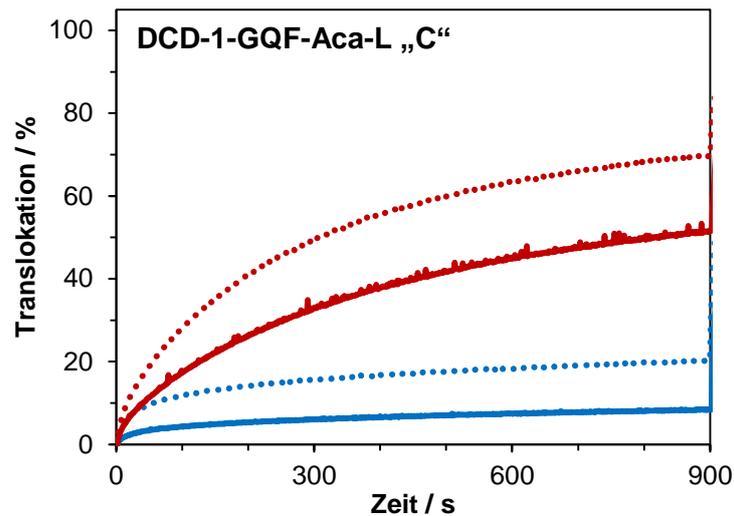


Abb. 4.47 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L und DCD-1-GQF-Aca-L „C“ in POPC/POPG 1:3-Vesikel bei P/L 1:50. Die gepunkteten Kurven entsprechen DCD-1-GQF-Aca-L, die durchgezogenen Linien entsprechen DCD-1-GQF-Aca-L „C“. Die roten Kurven wurden mit 100 μM Zn^{2+} , die blauen Kurven ohne Zn^{2+} erhalten. Die Messungen erfolgten in Puffer niedriger Ionenstärke und bei 20 °C.

Zwei weitere Peptide, DCD-1-GQF-Aca-L „P2“ und DCD-1-GQF-Aca-L „P3“, wurden synthetisiert, die eine stark modifizierte Sequenz aufweisen und die nicht mehr zur Translokation in der Lage sein sollten, da möglichst viele Ladungen der Seitenketten durch die Ladungen ihrer Nachbarn kompensiert wurden (vergl. Anhang 9.5). Die entsprechenden Experimente ergaben eine sehr geringe, aber dennoch messbare Translokation, sowie eine deutlich sichtbare Zn^{2+} -Abhängigkeit (Abb. 4.48).

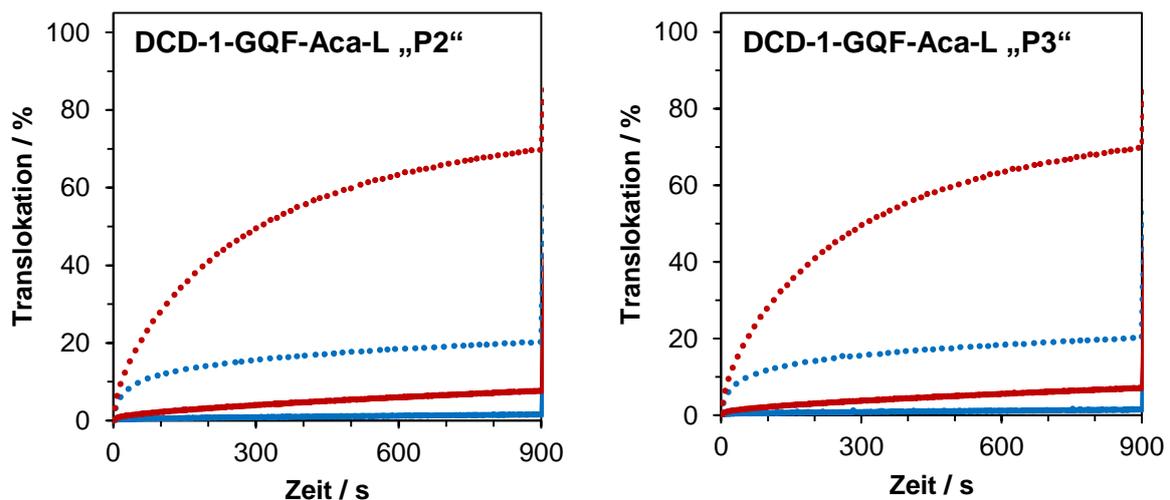


Abb. 4.48 Zeitlicher Verlauf der Translokation von DCD-1-GQF-Aca-L und DCD-1-GQF-Aca-L „P2“ (links) bzw. DCD-1-GQF-Aca-L „P3“ (rechts) in POPC/POPG (1:3)-Vesikel bei P/L 1:50. Die gepunkteten Kurven entsprechen DCD-1-GQF-Aca-L, die durchgezogenen Linien entsprechen DCD-1-GQF-Aca-L „P2“ bzw. DCD-1-GQF-Aca-L „P3“. Die roten Kurven wurden mit 100 μM Zn^{2+} , die blauen Kurven ohne Zn^{2+} erhalten. Die Messungen erfolgten in Puffer niedriger Ionenstärke und bei 20 °C.

4.4.2 Konzentrationsabhängigkeit der Translokation

Die Transferrate, ausgedrückt in Stoffmenge pro Zeit, stellt eine Größe dar, die der Geschwindigkeit einer (enzymatischen) Reaktion entspricht. Aus dem hierzu bekannten Formalismus, der Auftragung der initialen Geschwindigkeit in Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentration, wird nach Hill [98] der Kooperativitätsgrad erhalten. Dieses Verfahren wird im Folgenden genutzt, um über die Bestimmung der initialen Transferrate in Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentrationen Hinweise auf das Oligomerisierungsverhalten während des Membrandurchtritts zu erhalten.

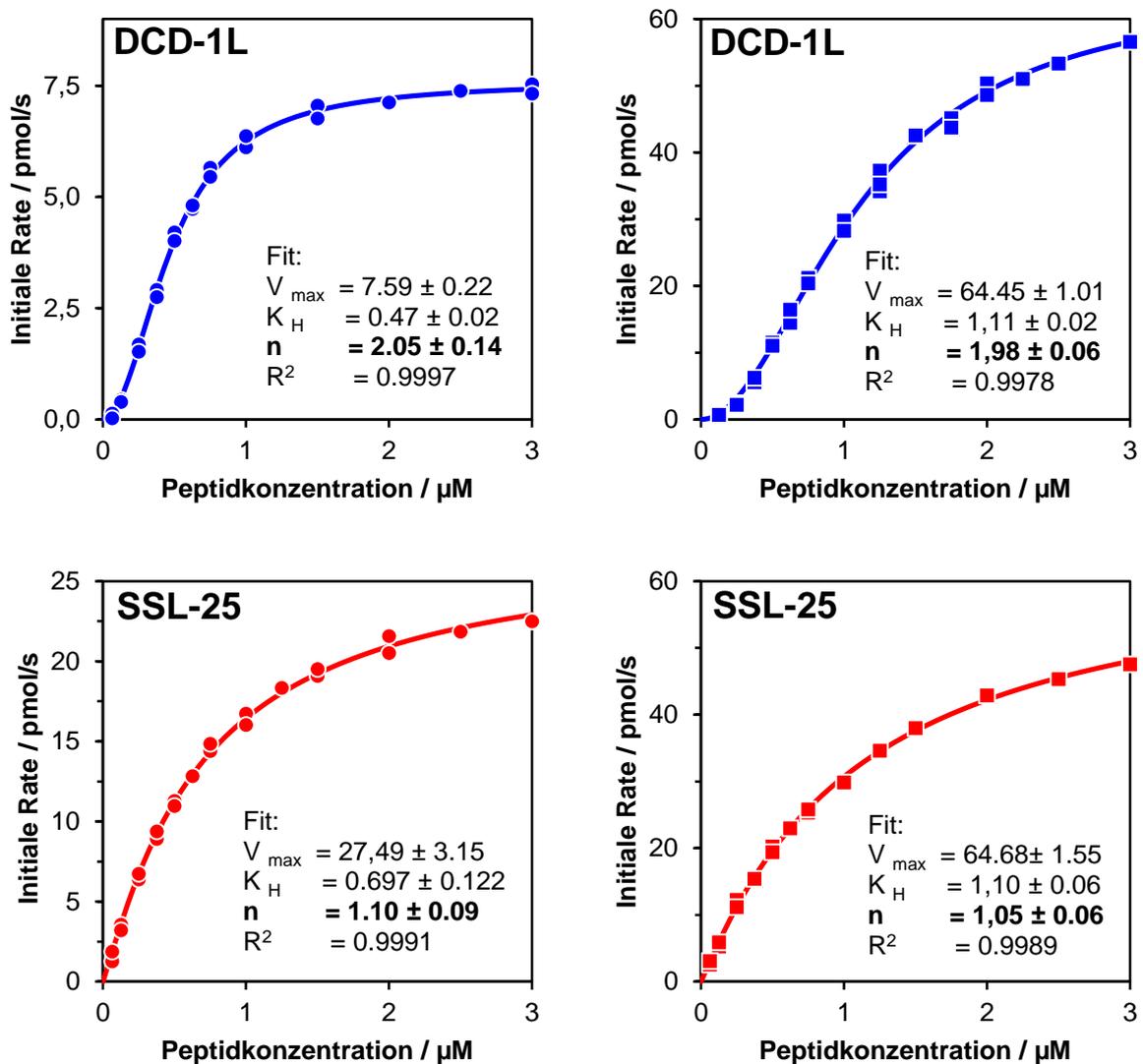


Abb. 4.49 Initiale Transferrate von DCD-1-GQF-Aca-L (oben) und SSL-24-GQF-Aca-A (unten) in POPC/POPG (1:3)-Vesikel in Abhängigkeit der Peptidkonzentration. Dargestellt sind die erhaltenen Transferraten ohne Zn^{2+} (links) und mit $100 \mu\text{M}$ Zn^{2+} (rechts). Die Messungen erfolgten bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassungen nach Hill.

In den oben dargestellten Kurven (Abb. 4.49) wurden die ermittelten initialen Transferraten (< 10 s) gegen die eingesetzte Peptidkonzentration aufgetragen und an eine Hill-Funktion angepasst. Die entsprechenden Messungen wurden mit dem jeweiligen Analogon zu DCD-1L (DCD-1-GQF-Aca-L) und zu SSL-25 (SSL-24-GQF-Aca-A) durchgeführt, sowohl ohne Zn^{2+} wie auch mit $100 \mu M Zn^{2+}$. Um auch ohne Zn^{2+} eine ausreichend hohe Translokation zu erhalten wurden POPC/POPG (1:3)-Vesikel eingesetzt.

Die Hill-Funktion unterschied sich deutlich zwischen DCD-1-GQF-Aca-L (DCD-1L) und SSL-24-GQF-Aca-A (SSL-25), während bei DCD-1L ein Hill-Koeffizient n von $2,05 \pm 0,14$ bzw. $1,98 \pm 0,06$ gefunden wurde, lag dieser bei SSL-25 bei $1,10 \pm 0,09$ bzw. $1,05 \pm 0,06$. In beiden Fällen waren die Koeffizienten mit und ohne Zn^{2+} nahezu identisch. Weiterhin erhöhte die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen die Transferraten deutlich, wobei der Zn^{2+} -Einfluss bei DCD-1L ausgeprägter ausfiel. Anzumerken ist, dass alle Anpassungen als sehr gut zu bezeichnen sind, die Regressionskoeffizienten lagen zwischen $0,9978$ und $0,9997$.

Der Hill-Koeffizient n stellt einen Wert für die Kooperativität dar. Die erhaltenen Koeffizienten von $n \approx 2$ bei DCD-1L und $n \approx 1$ bei SSL-25 ist ein Hinweis, dass der Membrandurchtritt im Falle des DCD-1L als Dimer erfolgt, während SSL-25 als Monomer transloziert.

4.4.3 Translokation in BY-2 Tabakzellen

Mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Nick am Botanischen Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) besteht eine langjährige Kooperation, welche die Translokation von Peptiden in Tabakzellen zum Thema hatte [75, 99].

Die in diesem Kapitel gezeigten Aufnahmen sowie die Vorbereitungen hierzu wurden von Dr. Ningning Gao, Dr. Jan Maisch oder Irina Peshatova durchgeführt. Die hierfür erforderlichen Peptide wurden synthetisiert, gereinigt, lyophilisiert, aliquantiert und gebrauchsfertig bereitgestellt.

Zur Untersuchung der Translokation der Dermcidin-Peptide wurden BY-2 Tabakzellen mit 1 μM bzw. 10 μM Rhodamin B-markiertem SSL-25 (Rh-SSL-25) und DCD-1L (Rh-DCD-1L) für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation konnten durch die Rotfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie festgestellt werden, ob die Peptide translozierten und wo sie sich in den Zellen anreicherten. Schon die Ergebnisse der ersten Experimente zeigten deutlich, dass beide Peptide, Rh-SSL-25 sowie Rh-DCD-1L sowohl an der Zellmembran, im Cytosol und in den Vakuolen der Zellen aufzufinden waren (Abb. 4.50).

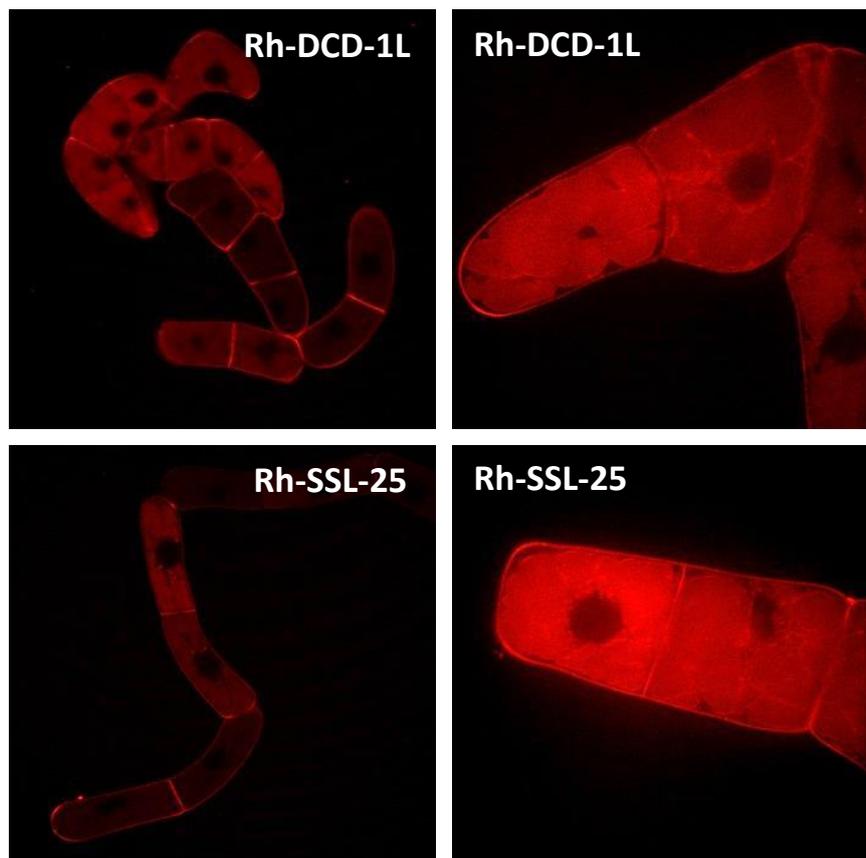


Abb. 4.50 BY-2 Tabakzellen nach 24 h Inkubation mit Rh-DCD-1L (oben) und Rh-SSL-25 (unten). Die Zellen wurden mit 1 μM Peptid (links) bzw. mit 10 μM (rechts) für 24 h inkubiert. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

Um sicherzugehen, dass die zellpenetrierenden Eigenschaften der Rhodamin B-markierten Peptide nicht von der Markierung selbst stammten, wurden in einem weiteren Experiment die Zellen nur mit Rhodamin B inkubiert. Bereits nach 2 h zeigte sich, dass Rhodamin B zwar in den Zellen aufzufinden war, aber nur in Endosomen lokalisiert vorlag und auch nach 24 h diese nicht verlassen hatte (Abb. 4.51). Somit liegt hier eine Endozytose vor und keine direkte Translokation. Es kann somit gefolgert werden, dass die zellpenetrierenden Eigenschaften der Dermcidin-Peptide nicht durch das N-terminale Rhodamin B verursacht wurden, es fungiert nicht als Transportmolekül.

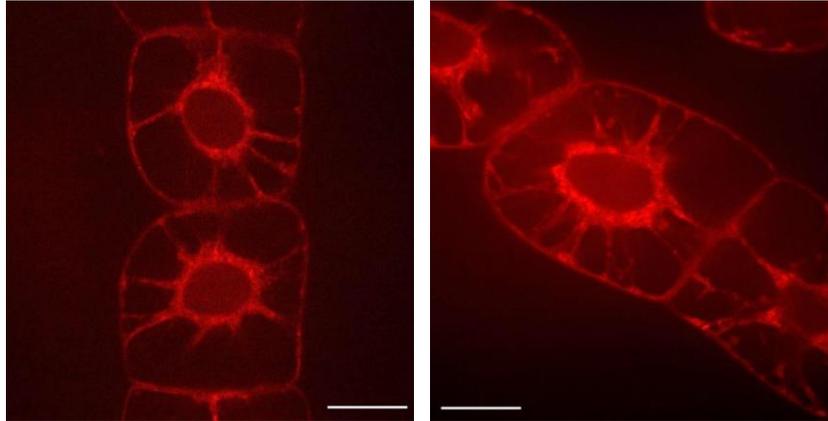


Abb 4.51 BY-2 Tabakzellen nach 2 h (links) bzw. 24 h (rechts) Inkubation mit Rhodamin B. Der Farbstoff war nur in Endosomen lokalisiert, d. h. er translozierte nicht direkt. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

Im Inkubationsmedium der Zellen lagen in den oben gezeigten Experimenten stets ca. 30 μM Zn^{2+} (aus den Murashige-Skoog-Salzen) vor. Ein speziell hergestelltes, wurde für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde ein Zn^{2+} -freies Medium sowie eine Standard-Medium (mit Zn^{2+}) verwendet. Für die Experimente ohne Zn^{2+} inkubierten die Zellen vorab eine Woche in Zn^{2+} -freiem Medium. Die Zellen wurden jeweils mit Rh-SSL-25 und Rh-DCD-1L für 2 h, 6 h und 20 h inkubiert. Die Translokation beider Peptide zeigte eine deutliche Zn^{2+} -Abhängigkeit. Innerhalb der ersten Stunden war dieser Unterschied sehr deutlich zu erkennen, nach 20 h Inkubation waren die Unterschiede weniger ausgeprägt (Abb. 4.52).

Wie in Abb. 4.50 und 4.52 gezeigt translozierte Rh-SSL-25, also der Rhodamin B-markierte N-Terminus von DCD-1L, sehr effektiv, sodass sich die Frage stellte, ob im Falle von DCD-1L die gesamte Sequenz zellpenetrierende Eigenschaften hat, oder ob der N-Terminus (= SSL-25) die eigentliche zur Translokation erforderliche Sequenz darstellt und der C-Terminus des DCD-1L „mitgezogen“ wird.

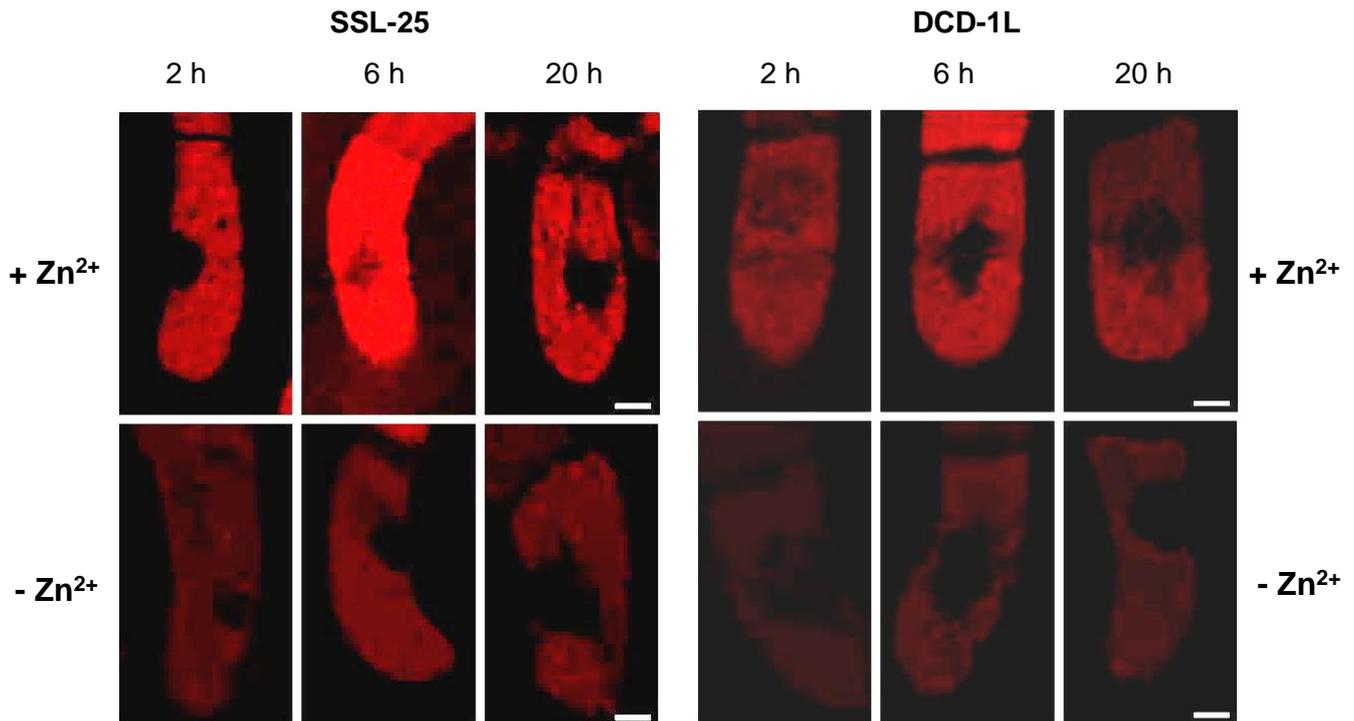


Abb. 4.52 BY-2 Tabakzellen nach 2 h , 6 h und 20 h Inkubation mit Rh-SSL-25 (links) und Rh-DCD-1L (rechts) jeweils in Gegenwart von ca. 30 μM Zn^{2+} (oben) und in Abwesenheit von Zn^{2+} (unten). Die Translokation wurde in Abwesenheit von Zn^{2+} für beide Peptide geringer. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

Um diese zu testen wurde ein Rhodamin B-markiertes Peptid, das aus den 23 C-terminalen Aminosäureresten von DCD-1L bestand, VED-23, ebenfalls für 24 h mit den Zellen inkubiert. Nach der Inkubation war dieses Peptid weder im Cytosol noch in den Vakuolen aufzufinden. Es wurden lediglich die äußeren Bereiche der Zellen markiert (Abb. 4.53).

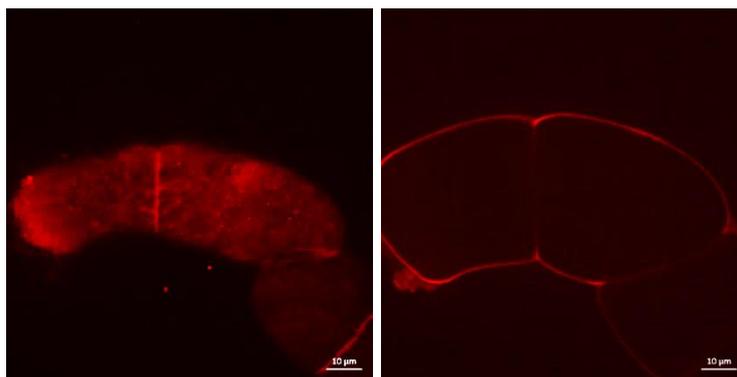


Abb.4.53 BY-2 Tabakzellen nach 24 h Inkubation mit Rh-VED-23, der Rhodamin B-markierten, N-terminalen Sequenz des DCD-1L wt. Das Peptid war an der Außenseite bzw. der Zellmembran lokalisiert. Links ist ein oberflächlicher und rechts ein mittiger Schnitt der Zelle abgebildet. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

In weiteren Experimenten wurden die Translokation der drei bereits erwähnten Ladungsreißverschluss-Analoga (A, P und C) untersucht, jeweils mit Rhodamin B-

markiertem N-Terminus. Hierbei wurde erwartet, dass Rh-DCD-1L „A“ und Rh-DCD-1L „P“, bei denen das Ladungreißverschluss-Motiv intakt war, sich ähnlich dem Rh-DCD-1L wt verhalten würden. Rh-DCD-1L „C“ sollte hingegen ohne intaktes Motiv nicht translozieren. Alle drei Analoga jedoch translozierten in die Zellen und lokalisierten sich. Mittels MitoTracker® Green Farbstoff wurden die Mitochondrien der Zellen mit einem grünen Fluorophor markiert. Wurden beide Fluoreszenzkanäle, grün und rot, fusioniert, war festzustellen, dass alle drei Peptide im Zellinneren an den Mitochondrien lokalisiert waren (Abb. 4.54). Rh-DCD-1L „P“ hatte sich nur teilweise an die Mitochondrien angelagert. Weiterhin schienen die Zellen durch dieses Peptid insgesamt beeinträchtigt zu werden, da die Morphologie der Zelloberflächen sich verändert hatte, sie wurden rauer (Daten nicht gezeigt).

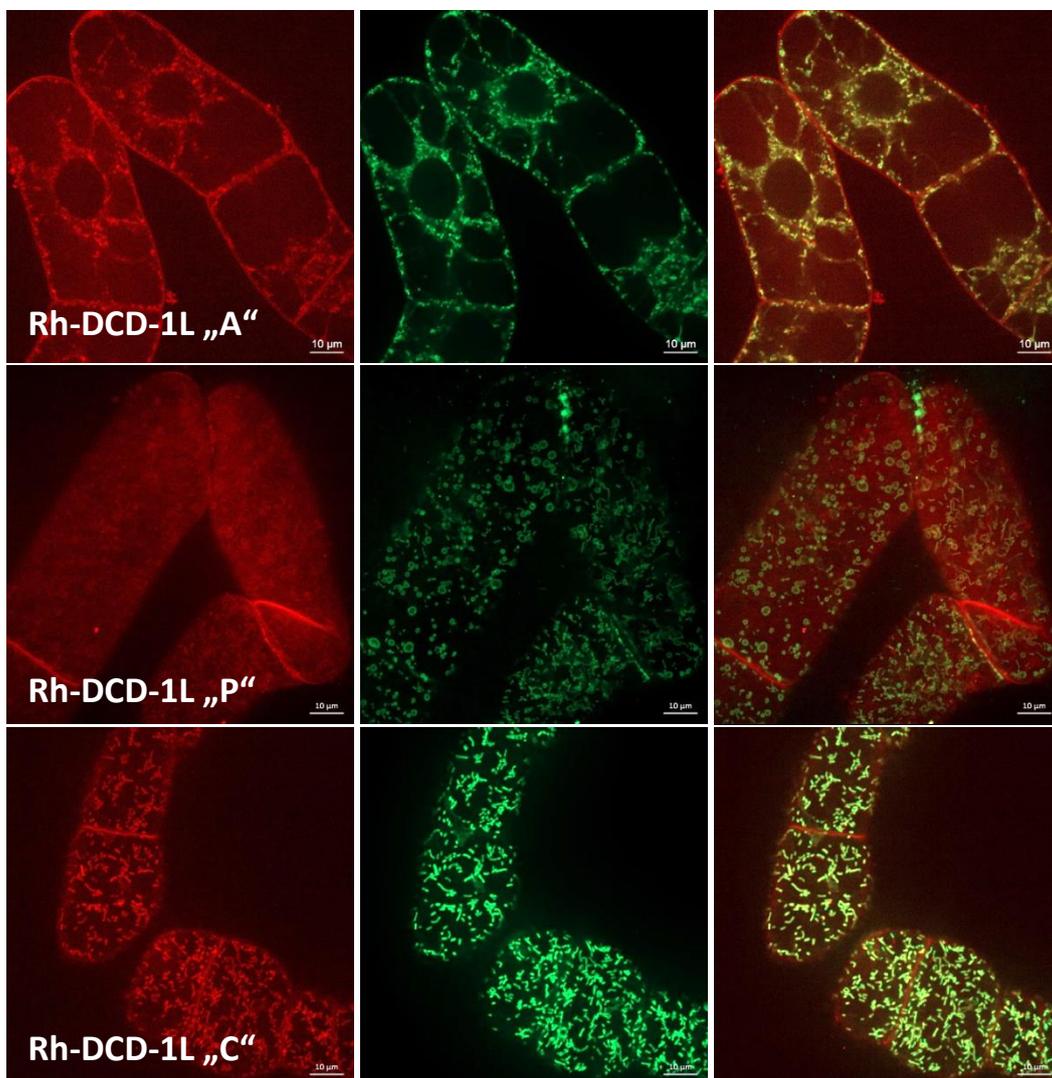


Abb. 4.54 BY-2 Tabakzellen nach 24 h Inkubation mit Rh-DCD-1L „A“ (oben), Rh-DCD-1L „P“ (mitte) oder DCD-1L „C“ (unten). Die Peptide lokalisierten sich nach der Translokation in die Zellen (links). Die Mitochondrien der Zellen wurden mit MitoTracker® Green grün angefärbt (Mitte). Beide Fluoreszenzkanäle, rot und grün, fusioniert zeigten, dass sich die Peptide an den Mitochondrien der Zellen lokalisiert hatten. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

Bereits in einer früheren Veröffentlichung gelang es, durch die Fusionierung einer Rhodamin B-markierten Translokationssequenz und der sogenannten Lifact-Sequenz eine Translokation mit anschließender Lokalisation an den Aktin-Filamenten der Zellen nachzuweisen [75]. Die damals verwendete Translokationssequenz war BP100 (Sequenz: **KKLFKKILKYL-NH₂**), ein undekamerer Peptid, welches jedoch bei höheren Konzentrationen (> 10 µM) toxisch auf die Zellen wirkte. Es wurde ein analoges Konstrukt aus Rhodamin B, der SSL-25-Sequenz und der Lifact-Sequenz (**MGVADLIKKFESISKEE**) für diese Experimente bereitgestellt. Verwendet wurden transgene BY-2 Zellen, GF11-Zellen, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert mit AtFim1 [100] exprimieren. Dieses Protein bindet an die Aktin-Filamente und erlaubte eine Detektion dieser auch in Abwesenheit anderer Aktin-bindender Fluoreszenzmarker.

Die Experimente mit Rh-SSL-25-Lifact ergaben, dass das Peptid nicht translozierte. Nach 6 h Inkubation befand es sich entweder auf der Zellhülle oder in den Vakuolen der Zellen (Abb. 4.55).

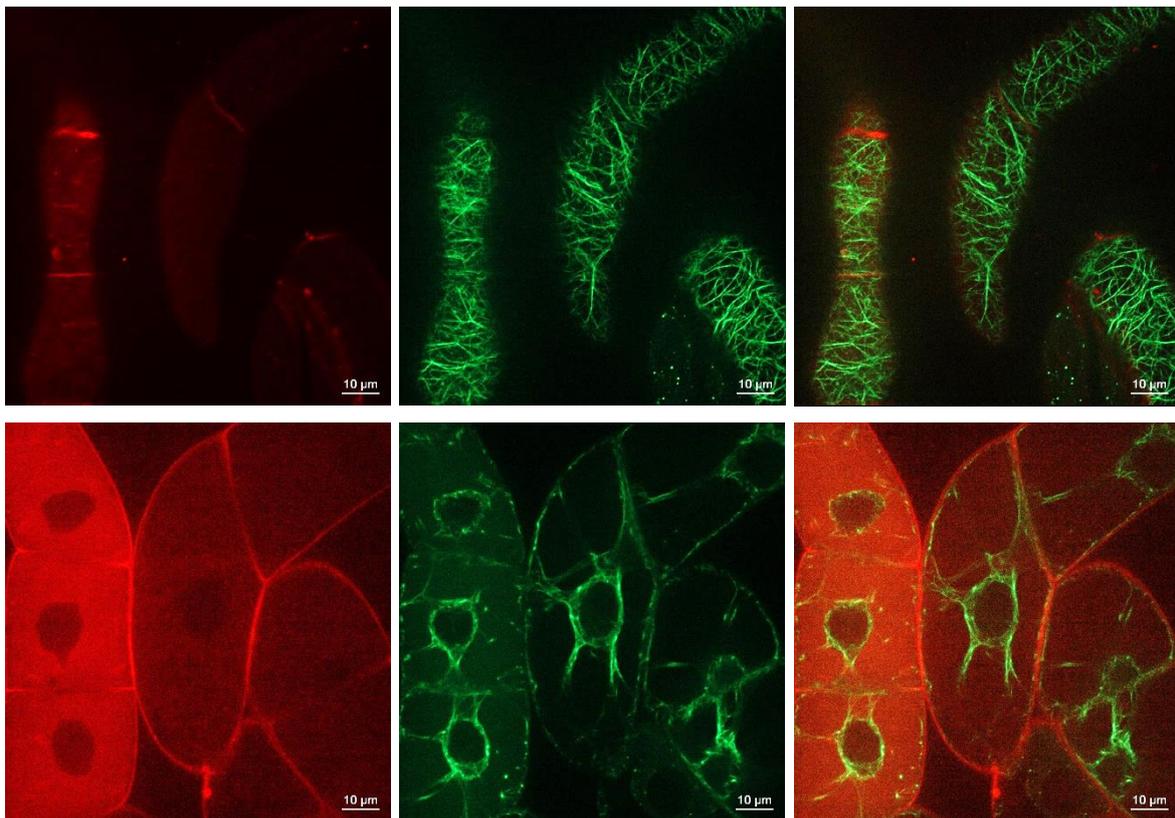


Abb. 4.55 BY-2 Tabakzellen (GF11-Mutanten) nach 6 h Inkubation mit 1 µM Rh-SSL-25-Lifact. Links ist das Rhodamin B-markierte Peptid rot fluoreszierend abgebildet, mittig dargestellt sind die grün gefärbten Aktin-Filamente und rechts die Überlagerung beider Aufnahmen. Das Peptid befand sich nach der Inkubation auf der Zellwand und teilweise in den Vakuolen. Es translozierte nicht und war nicht an die Aktin-Filamente gebunden. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

Eine weitere Möglichkeit, wie ein Dermcidin-Peptid als Transporter fungieren könnte, wäre durch nicht-kovalente Bindung an oder Umschließung der zu transportierenden Sequenz, in diesem Fall die Rhodamin B-markierte Sequenz Rh-Lifeact. Hierzu wurden die BY-2-Zellen mit 1 μM Rh-Lifeact und 100 μM SSL-25 wt inkubiert (Abb. 4.56). Es wurden Aufnahmen nach 2 h, 6 h und 24 h gemacht, die jedoch eine Translokation des Rh-Lifeact in die Zellen nicht zeigten.

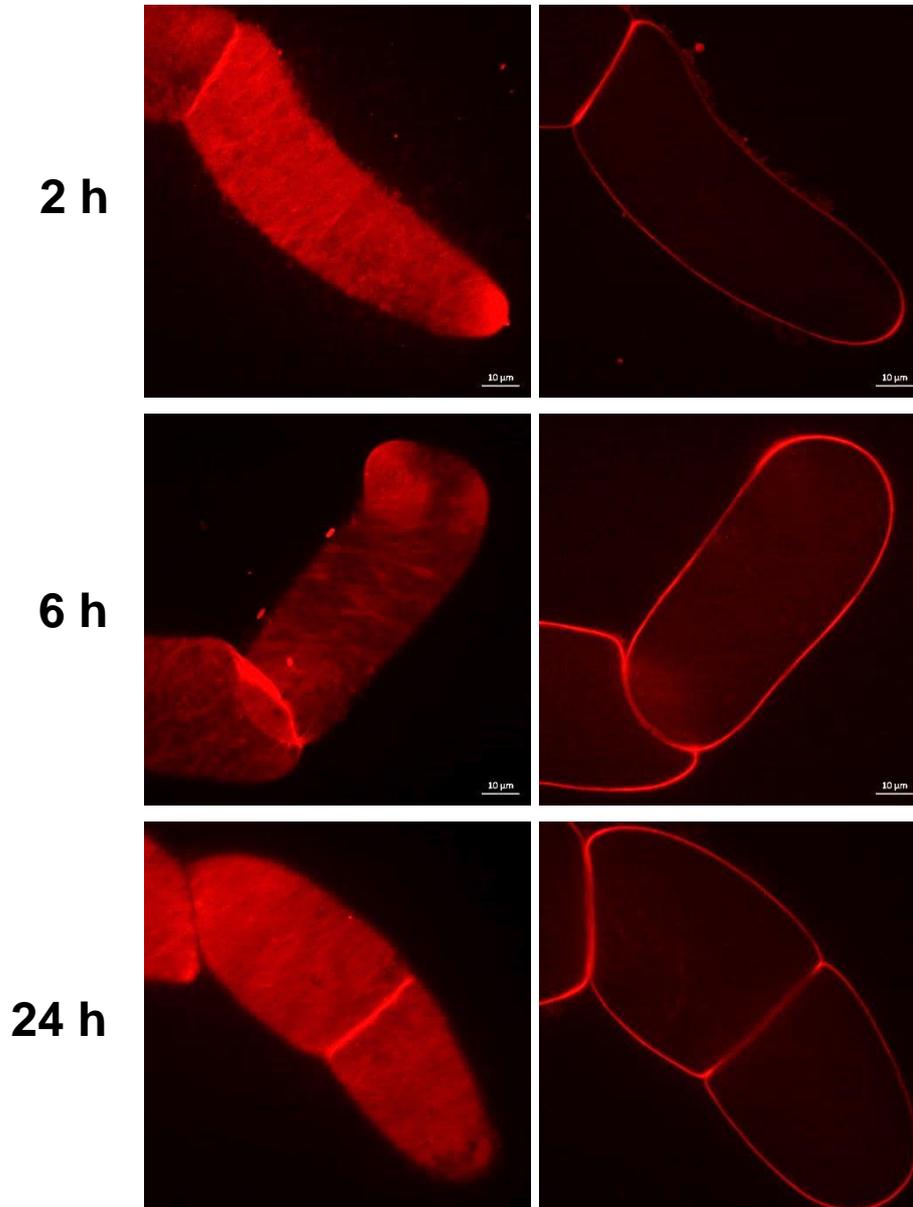


Abb. 4.56 BY-2 Tabakzellen nach 2 h (oben) nach 6 h (Mitte) und nach 24 h (unten) Inkubation mit 1 μM Rh-Lifeact und 100 μM unmarkiertem SSL-25 wt. Rh-Lifeact war lediglich auf den Zellhüllen lokalisiert. Die Mikroskopiebilder wurden von Prof. Dr. P. Nick zur Verfügung gestellt.

4.4.4 Translokation in HaCaT-Zellen

Das Vorkommen eines CPPs in menschlichem Schweiß auf der Haut legt nahe, dass seine Wirkung dort lokalisiert sein sollte. Das „Ziel“ dieser Peptide müsste sich entweder auf der Haut oder in den oberen Hautschichten befinden. Da es nicht antimikrobiell wirkt (Kapitel 4.3.1 – 4.3.2), erschien es folgerichtig, dass die Zellen auf der Hautoberfläche selbst dieses Ziel darstellen könnten. Um die Translokation in Hautzellen zu untersuchen, wurden HaCaT-Keratinocyten (abgekürzt von engl. Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes) benutzt. Diese immortalisierte, nicht maligne Zelllinie wurde entwickelt um Regulationsmechanismen in einem sehr einfachen Hautmodell zu untersuchen [101]. Diese Zellen eigneten sich für unsere Experimente, da sie in konventioneller Kultur, also ohne organotypische Co-Kulturbedingungen, wachsen und dennoch viele Gemeinsamkeiten mit natürlichen Keratinocyten aufweisen [101].

Diese Experimente wurden im Arbeitskreis von Dr. Cornelia Lee-Thedieck am Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) von Saskia Kraus durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.9). Auch die Abbildungen dieses Kapitels basieren auf ihren Messungen. Die Zellen wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin gefärbt, wobei DAPI die DNA im Zellkern blau und Alexa Fluor® 488 die Aktin-Filamente grün färbte. Erste Experimente in Zn^{2+} -haltigem Puffer zeigten bereits nach 15 min eine deutliche Translokation von Rh-SSL-25 in HaCaT-Zellen, jedoch nicht gleichmäßig in alle Zellen (Abb. 4.57). Rh-SSL-25 schien bevorzugt in einzelne Zellen zu translozieren. Wuchsen die Zellen im Verband, war nur in wenigen dieser Zellen Rh-SSL-25 zu erkennen. Wie Abb. 4.58 links zu entnehmen ist, schien Rh-SSL-25 im Zellinneren und zum Teil mit dem Zellkern colokalisiert zu sein.

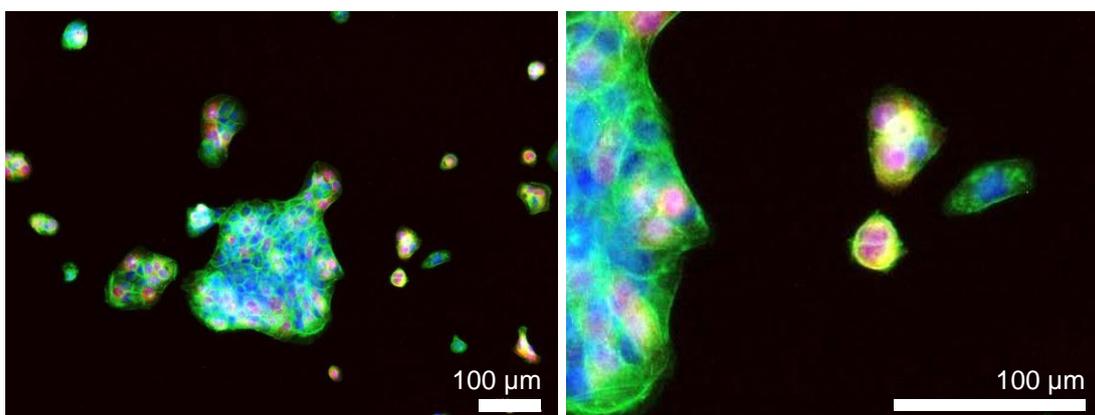


Abb. 4.57 HaCaT-Zellen nach 15 min Inkubation mit Rh-SSL-25 in Zn^{2+} -haltigem Puffer. Die DNA der Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt und Alexa Fluor® 488 färbte die Aktin-Filamente der Zellen grün. Einige Zellen fluoreszierten aufgrund des translozierten Peptids Rh-SSL-25 rot. Das Peptid translozierte bevorzugt in einzelne Zellen. Die Mikroskopiebilder wurden von Dr. C. Lee-Thedieck zur Verfügung gestellt.

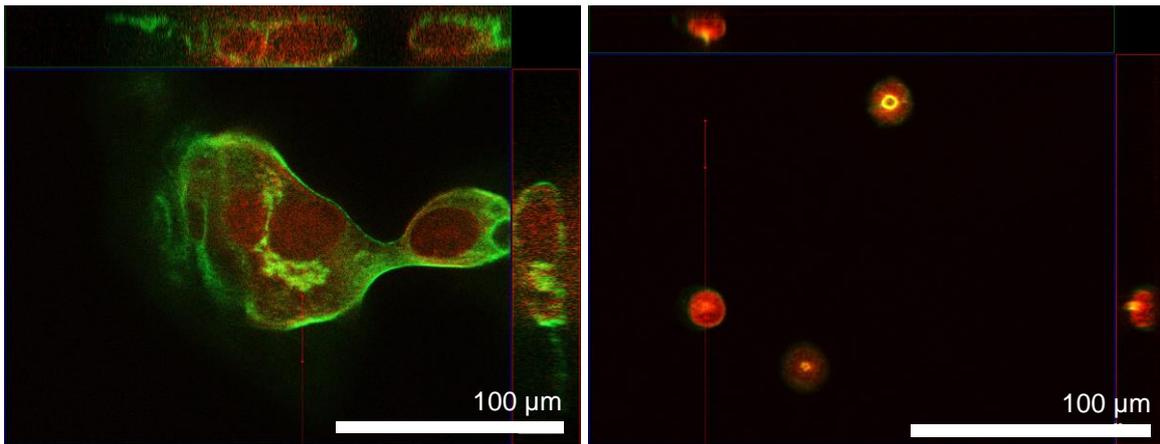


Abb. 4.58 HaCaT-Zellen nach 15 min Inkubation in Zn^{2+} -haltigem Puffer. Alexa Fluor® 488 färbte die Aktin-Filamente der Zellen grün. Rh-SSL-25 erscheint rot.

Jeweils oben und rechts ist ein vertikaler Schnitt entlang der grünen (horizontale, etwa mittig) bzw. entlang der roten (vertikale, etwa mittig) Linien dargestellt. Die Mikroskopiebilder wurden von Dr. C. Lee-Thedieck zur Verfügung gestellt.

Zur Negativkontrolle wurden die Zellen einerseits nur in dem Zn^{2+} -haltigen Inkubationspuffer ohne Peptid (Daten nicht gezeigt) und andererseits mit nicht-markiertem SSL-25 wt Inkubiert. Die Zellen wiesen nach SSL-25 wt-Inkubation und anschließender DAPI/ Alexa Fluor® 488-Färbung keine besonderen Merkmale auf (Abb. 4.59).

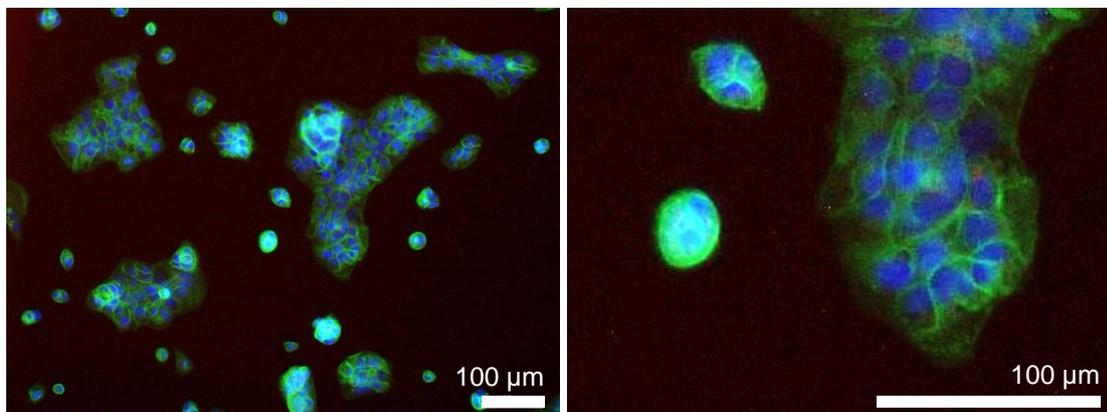


Abb. 4.59 HaCaT-Zellen nach 15 min Inkubation in Zn^{2+} -haltigem Puffer und nicht-markiertem SSL-25 wt. Die DNA der Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt und Alexa Fluor® 488 färbte die Aktin-Filamente der Zellen grün. Die Mikroskopiebilder wurden von Dr. C. Lee-Thedieck zur Verfügung gestellt.

4.4.5 Translokation in Bakterien

In den vorigen Kapiteln 4.4.3 und 4.4.4 wurde die Translokation in eukaryoischen Zellen eindeutig nachgewiesen, jedoch sollten die Dermcidin-Peptide entsprechend ihrem Bindungsverhalten (Kapitel 4.2.4) und der daraus korrelierenden Translokation in Lipidvesikel (Kapitel 4.4.1) auch über anionische Membranen translozieren. Insofern erscheint eine Translokation durch anionische bakterielle Membranen durchaus denkbar zu sein. Daher wurde in orientierenden Versuchen diese gegebenenfalls mögliche Translokation in Bakterien aufzuzeigen.

Rhodamin B zeigte in Vorversuchen eine eigenständige Einlagerung in die bakterielle Zellmembran von *S. aureus* DSM 1104. Carboxyfluorescein (CF) hingegen lagerte sich nur wenig in der bakteriellen Membran an. Daher wurden für weitere Experimente mit Bakterien CF-markierte Peptide eingesetzt. Für diese Experimente wurde ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss) verwendet und es konnte eine An- oder Einlagerung von CF-DCD-1L in die bakterielle Membran von *S. aureus* DSM 1104 beobachtet werden. Eine eindeutige Aussage, ob das Peptid auf oder in dem Bakterium lokalisiert war, ließ sich aufgrund der Auflösung nicht eindeutig feststellen. Bei genauer Betrachtung konnten eine gewisse Akkumulation des Peptids in bzw. an den Zellen beobachtet werden (Abb. 4.60, links). Zum Vergleich wurden mit Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester (CFSE) lediglich die Zellwände der Zellen angefärbt, eine Akkumulation auf den Zellen ist hier zu erkennen (Abb. 4.60, rechts).

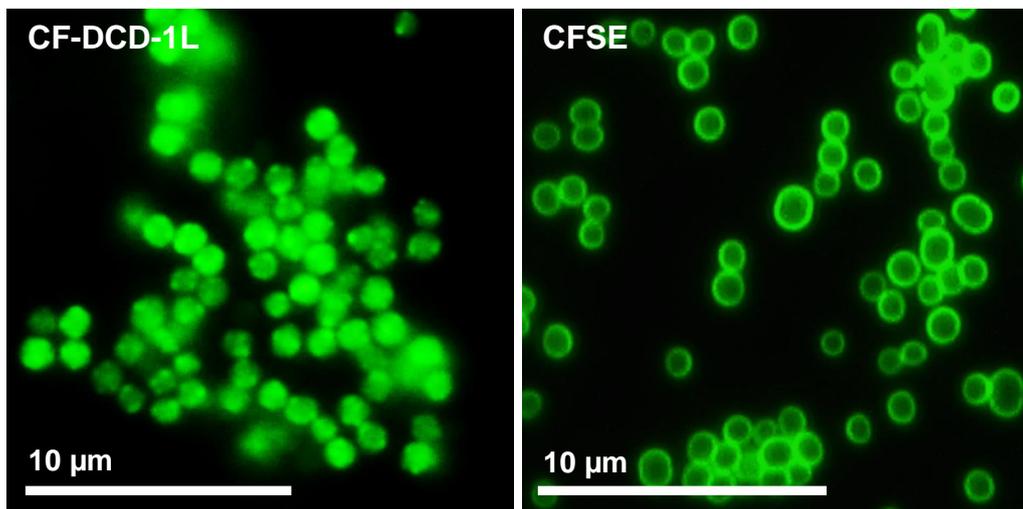


Abb. 4.60 *S. aureus* DSM 1104 nach 30 min Inkubation mit CF-DCD-1L in Schweißpuffer (10 mM KH_2PO_4 , 40 mM NaCl, pH 6,0) bzw. Carboxyfluorescein-*N*-succinimidylester (CFSE) in Mueller-Hinton-Medium bei 37 °C. Das rechte Mikroskopiebild der CFSE-Markierung wurde von Dr. M. Berditsch zur Verfügung gestellt.

5. Diskussion

5.1 Synthesen

Die Synthesen der Dermcidin-Peptide konnten bis auf wenige Ausnahmen mit ausreichenden Ausbeuten synthetisiert und mit Standard-HPLC-Gradienten und Laufmitteln (AN/H₂O) gereinigt werden (Kapitel 9.3). N-terminale Farbstoffmarkierungen beeinträchtigten die Ausbeuten kaum. Die Ausnahmen stellten die Peptide für den vesikelbasierten Translokationstest dar (Kapitel 4.4.1), bei denen ein Aminosäureanalogon – Fmoc-Aca-OH – zu Beginn der Synthese gekuppelt werden musste, was nur unter Verwendung sehr reaktiver Kupplungsreagenzien wie HOAt/HATU bzw. TFFH gelang. Der freie Aminoterminus des gekuppelten Aca-Restes konnte zwar ohne Probleme entschützt werden, die Kupplung der nächsten Aminosäure - Fmoc-Phe-OH - jedoch konnte nur mit TFFH als Kupplungsreagens erreicht werden. Nach dreifacher Kupplung mit 5 Äq war der freie N-Terminus des Aca-Restes noch immer nicht vollständig umgesetzt. Diese beiden Kupplungsschritte führten zu deutlich reduzierten Ausbeuten der Peptide mit GQF-Aca-Sequenz (Kapitel 9.3).

Die Synthesen der DCD-1L-Peptide fanden stets mit niedrigbeladenem Wang-Harz statt. Das zunächst verwendete mit Fmoc-Leu vorbeladene Harz hatte eine Beladung von 0,35 mmol/g. Mit diesem Harz wurden je 50 mmol-Synthese ca. 12-15 mg gereinigtes Peptid (5,0 % – 6,2 % Ausbeute) erhalten. Das später eingesetzte Harz desselben Herstellers war lediglich mit 0,28 mmol/g beladen. Je 50 mmol-Synthese wurde bei unveränderter automatischer Synthese (Kapitel 3.1.1) und HPLC-Gradienten nun 22-28 mg gereinigtes Peptid erhalten (9,1 % – 11,6 %). Dies ist auch nachvollziehbar, da ein 48-meres Peptid im Verlauf seiner Synthese aufgrund seiner Kettenlänge benachbarte naszierende Peptide zunehmend behindern wird.

5.2 Sekundärstruktur und Orientierung in Membranen

Die für Dermcidin-Peptide beobachtete globale α -helikale Sekundärstruktur, bzw. deren Ausbildung nach Bindung an eine anionische Lipiddoppelschicht, war für α -helikale antimikrobielle Peptide bereits häufig beobachtet worden [31, 102].

Wie mittels CD-Spektroskopie festzustellen war, erfolgte die initiale Interaktion mit Lipidmembranen elektrostatisch, da sowohl DCD-1L als auch SSL-25 mit neutralen Lipiddoppelschichten nur begrenzt interagierten und ungeordnet in Lösung verblieben, mit anionischen Membranen hingegen erfolgte eine Bindung unter Ausbildung einer α -helikalen Struktur. Hingegen unterband eine erhöhte Salzkonzentration die Ausbildung dieser helikalen Struktur zunehmend. Ein weiterer Parameter, der die Bindung und Strukturausbildung positiv beeinflusste, war die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen im Puffermedium. Auf die positive Beeinflussung hinsichtlich der Strukturausbildung wurde bereits bei Song et al. hingewiesen, wobei hier eine Stabilisierung der Quartärstruktur durch Zn^{2+} -Ionen diskutiert wurde [47].

In orientierter CD-Spektroskopie (OCD-Spektroskopie) zeigten sowohl DCD-1L wie auch SSL-25 eine oberflächliche Orientierung auf artifiziellen Lipiddoppelschichten. Die Variation diverser Parameter wie Zusammensetzung und Schichtdicke der Lipide, Temperatur und Zn^{2+} -Konzentration hatten kaum Einfluss auf diese Orientierung. Eine membrandurchspannende Insertion, die für die Ausbildung einer oligomeren Pore [45] erforderlich wäre, konnte weder in OCD- noch in Festkörper-NMR-Experimenten beobachtet werden.

Ebenso konnte eine alternative Hypothese, dass lediglich der N-Terminus der Helix die Membran durchspannt und der C-Terminus auf der Membran flach aufliegt, mit Festkörper-NMR-Experimenten widerlegt werden. Denn auch das N-terminal markierte Peptid zeigte keine signifikante Neigung der Helix in die Membran (vergl. Abb. 4.16).

Weiterhin konnte mit OCD- und NMR-Experimenten gezeigt werden, dass sowohl eine erhöhte Krümmung der Lipidoberfläche als auch Erhöhung der Peptidkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Orientierung der Peptide hatte, sie verblieben stets flach bis leicht geneigt auf den Membranen.

Die Verringerung des P/L-Verhältnisses, also die Konzentrationserhöhung des Peptides, hatte in der Vergangenheit für einige Peptide zur Folge, dass sie sich weiter in die Membran neigten, also einen Übergang von einem oberflächlich gebundenen S-Zustand hin zu einem deutlich ausgeprägten T-Zustand vollzogen [70, 103, 104]. Für DCD-1L konnte ein solch deutlicher Übergang nicht beobachtet werden.

In der Vergangenheit zeigten Peptide, die zur transmembranen Orientierung befähigt sind, diese zumeist in Lipidmembranen, deren hydrophobe Schichtdicke dem jeweiligen

transmembranen Helixabschnitt des Peptides entsprach [105]. Eine kontinuierliche α -Helix, wie sie in die beschriebene hexamere Pore vorliegen sollte, benötigt Lipide mit außergewöhnlich langen hydrophoben Seitenketten. Trotz Verwendung dieser Lipide konnte mittels OCD-Spektroskopie keine signifikante Veränderung der vorwiegend oberflächlich orientierten α -Helix beobachtet werden. Variation der Temperatur, und der hieraus resultierte Phasenübergang der Lipide zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Helixorientierung. Selbst die Verwendung von bakteriellen Lipidextrakten, also der Verwendung der exakten Lipidzusammensetzung der postulierten Zielorganismen, führte zu keinen Veränderungen der flach auf der Membran liegenden DCD-1L-Helix.

In einem fluoreszenzspektroskopischen Verfahren wurde das Bindungsverhalten der Dermcidin-Peptide untersucht, und als bestimmende Parameter wurde der anionische Lipidanteil der Membranen und die Zn^{2+} -Konzentrationen identifiziert: Das anionische Peptid DCD-1L bindet bevorzugt an Membranen mit negativ geladenen Lipidkopfgruppen und Zn^{2+} -Ionen verstärken diesen Effekt erheblich. Eine Veränderung der Verteilungskoeffizienten konnte je nach Lipidzusammensetzung, Ionenstärke des Puffers und Zn^{2+} -Konzentration um bis zu vier Größenordnungen erfolgen (vergl. Anhang 9.4). Da der Trend der verstärkten Bindung durch zunehmenden anionischen Lipidgehalt bei DCD-1L auch ohne Zn^{2+} -Einfluss deutlich sichtbar war, dürfte der positiv geladene N-Terminus, also die gemeinsame Sequenz mit SSL-25, für die initiale Interaktion mit Membranen verantwortlich sein.

Die Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen verstärkte die Bindung von DCD-1L immer deutlich. Bei SSL-25 jedoch verringerte die Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen die Bindung an die wenig geladenen POPC/POPG 3:1-Vesikel, während die Bindung an stärker geladene POPC/POPG 1:3-Vesikel schwach zunahm.

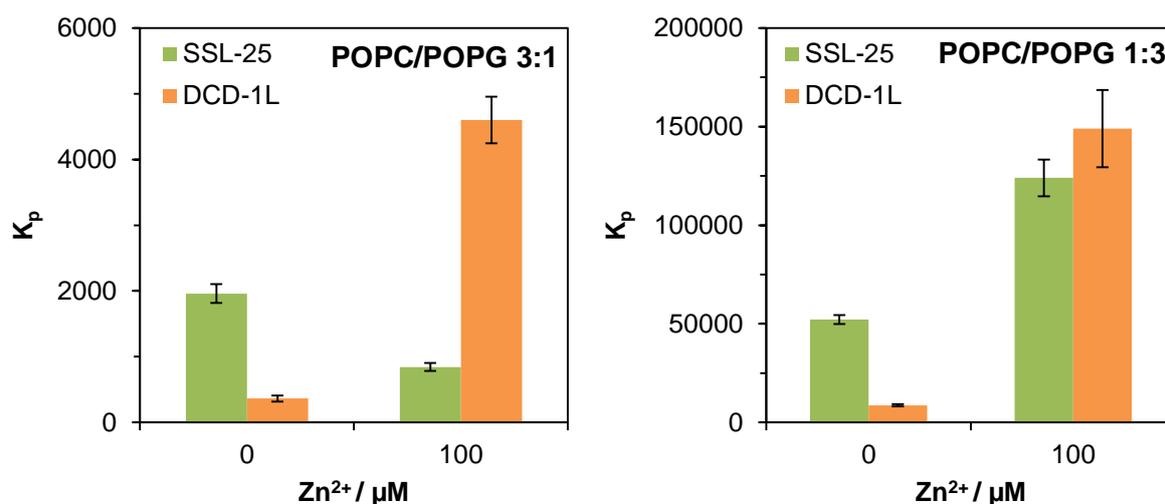


Abb. 5.1 Verteilungskoeffizienten K_p von NBD-SSL-25 und NBD-DCD-1L in POPC/POPG 3:1 (links) und POPC/POPG 1:3 (rechts) ohne und mit 100 μM Zn^{2+} . K_p von DCD-1L wurde durch Zn^{2+} -Zugabe für beide Lipidsysteme deutlich erhöht, während sich K_p für SSL-25 und POPC/POPG 3:1-Vesikel sogar verringerte.

Ein Vergleich der Verteilungskoeffizienten beider Peptide in diesen Systemen zeigte, dass Zn^{2+} -Ionen bei DCD-1L deutlich größeren Einfluss hatte, als dies bei SSL-25 der Fall war (Abb. 5.1).

Die strikte Korrelation einer erhöhten Bindung mit zunehmendem Zn^{2+} -Gehalt war bei DCD-1L immer vorhanden, während sie bei SSL-25 nur im Falle der stark anionischen Membran auftrat. Dies scheint dem fehlenden Histidinrest in der SSL-25-Sequenz und der daher nicht mehr vorhandenen Interaktionsstelle mit Zn^{2+} -Ionen geschuldet zu sein.

Um die postulierten Assemblierungs-Motive des DCD-1L – Rückfaltung und Oligomerisierung über das Ladungsreißverschluss-Motiv [46], Insertion der *N*-terminalen Regionen und Stabilisierung des C-Terminus Mittels Zn^{2+} -Ionen auf der Oberfläche [45] oder eine hexamere Pore [47] – zu überprüfen, wurden FRET-Experimente durchgeführt. Auf Basis der Bindungsdaten wurden für diese Experimente die Bedingungen so eingestellt, dass ca. 90 % des DCD-1L an der Membran gebunden vorlagen.

Die Ergebnisse der FRET-Experimente waren eindeutig, sie zeigten bei niederen Peptidkonzentrationen keinerlei Energietransfer d.h. die Peptide lagen als Monomere vor, sie assemblierten nicht. Bei höheren Peptidkonzentrationen zeigte sich ein gering ausgeprägter Energietransfer, der sich jedoch zwanglos durch die dichtere Packung der Peptide auf der Membran und die daraus resultierenden verringerten Abständen zwischen den Peptiden erklären lässt. Außerdem wiesen die beobachteten Energietransfers vermeintlich auf eine dimere Assemblierung hin, jedoch ohne Präferenz für eine parallele oder antiparallele Anordnung. Weiterhin konnte eine stabile, intramolekulare Rückfaltung, durch Experimente mit einem N- und C-terminal markierten Peptid ausgeschlossen werden.

Somit konnten alle in Kapitel 1.5 aufgezeigten Modelle zur Assemblierung von DCD-1L mit den FRET-Experimenten nicht verifiziert werden, eine stabile Oligomerisierung, wie sie für eine membranaktive Pore zu erwarten gewesen wäre, konnte nicht nachgewiesen werden.

5.3 Antimikrobielle Aktivität und Membranschädigung

Die Dermcidin-Peptide sind in den ersten Publikationen, als sehr effiziente antimikrobielle Peptide beschrieben [5, 33]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die antimikrobielle Aktivität zunächst dieselben Stämme, die in der ursprünglichen Publikation aus dem Jahr 2001 genannt sind, verwendet [5]. Mit diesen Stämmen (*E. coli* DSM 1103 und *S. aureus* DSM 1104) konnte die publizierten antimikrobiell wirksamen Konzentrationen im niederen Mikromolaren Bereich nicht reproduziert werden [42].

Darüber hinaus wurden im MHK-Test Zellen nicht nur 4 h, wie in diversen Veröffentlichungen [5, 33, 42], sondern 20-22 h mit dem Peptid inkubiert und es wurden bis zu 100-fach höhere Konzentrationen eingesetzt, als die beschriebenen und als wirksam bezeichneten. Dennoch konnten nie MHK-Werte für SSL-25 und DCD-1L ermittelt werden.

Die DCD-1L-Sequenz enthält einen DG-Abschnitt (-Asp-Gly-). An dieser Stelle kann eine Umlagerung des Asp zu einem Isospartat, über ein Succinimid-Intermediat mit Gly, auftreten (Abb. 5.2) [91]. Um auszuschließen, dass diese Umlagerung die biologische Aktivität der Dermcidin-Peptide beeinträchtigte, wurden zwei DCD-1L Analoga, DCD-1L D9E und DCD-1L (via dmbGly), synthetisiert und getestet. Bei DCD-1L (via dmbGly) wurde durch die N-Schutzgruppe an Gly die Bildung des Succinimid-Intermediats während der Synthese unterdrückt werden, bei DCD-1L D9E wurde das entsprechende Asp durch Glu ausgetauscht, sodass die Umlagerung auch nach der Synthese nicht ablaufen konnte. Der Austausch dieser zwei Aminosäuren sollte aufgrund derselben Ladung der Seitenketten nur minimalen Einfluss auf den Wirkmechanismus des Peptides haben. Für beide Peptide konnte kein MHK-Wert ermittelt werden, d.h. er lag über der höchsten getesteten Konzentration von 256 μM .

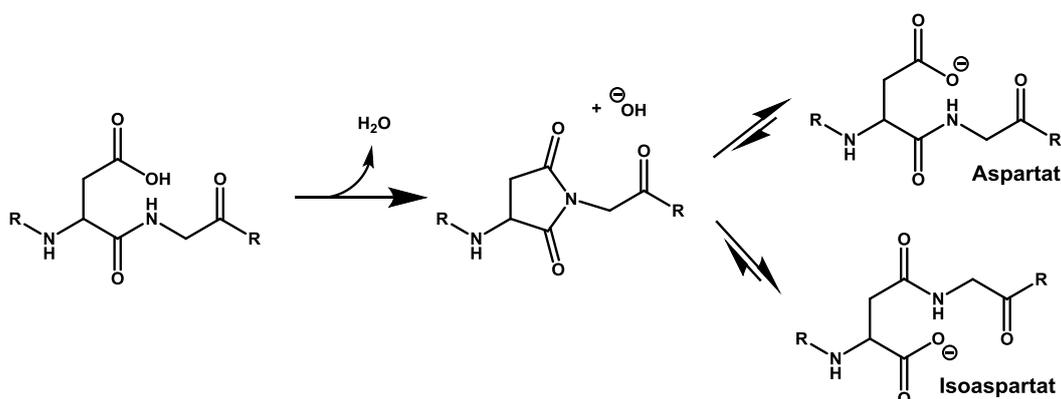


Abb. 5.2 Umlagerung eines Aspartatrests über ein Succinimid-Intermediat. Nach nucleophilem Angriff des Stickstoff-Atoms der Peptidbindung an das benachbarte Carbonyl-C-Atom der Aspartat-Seitenkette bildet sich intermediär ein instabiles Succinimid, welches unter physiologischen Bedingungen schnell hydrolysiert. Es bilden sich Gemische aus Aspartat- und Isoaspartat-Peptiden.

In weiteren MHK-Experimenten wurden bis zu 1 mM ZnSO₄ zugesetzt um die berichtete Steigerung der antimikrobiellen Aktivität zu beobachten [45]. Dennoch konnten keine MHK-Werte für DCD-1L oder SSL-25 ermittelt werden. Da das C-terminale Leu in der Natur recht schnell von einer Carboxypeptidase abgespalten wird [42], wurde ebenfalls DCD-1, ohne diesen Leu-Rest, einem MHK-Test unterzogen. Nachdem auch dieses Peptid keine Aktivität zeigte wurde, aufgrund einer weiteren Publikation [81], ein DCD-1-Analogon mit acetylierter Lys6-Seitenkette synthetisiert, doch dieses Peptid war ebenfalls nicht antimikrobiell aktiv.

Es wurden weitere bakterielle Testmethoden angewandt, die jedoch alle dasselbe ergaben. In keinem Experiment verhielt sich DCD-1L oder irgendein anderes Analogon, dass noch strukturelle Ähnlichkeit mit dem Wildtyp besaß, wie ein antimikrobielles Peptid. Es wurde keine Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstums beobachtet.

Die antimikrobielle Wirkung der Dermcidin-Peptide wurde in der Vergangenheit nur selten in Frage gestellt. Doch bereits kurz nach der ersten Veröffentlichung der Aktivität 2001 durch Schittek et al. zeigten unabhängige Studien, dass die synthetisch hergestellten Dermcidin-Peptide DCD-1 und DCD-1L nicht wie zuvor *E. coli* und *S. aureus* in Konzentrationen von ca. 0,2 µM, sondern erst bei viel höheren Konzentrationen abtöteten. Für *E. coli* wurde 80 µM DCD-1L für eine 100 %ige Abtötung benötigt, *S. aureus* hingegen war bei 320 µM DCD-1L noch nicht zu 100 % abgetötet [106]. Weitere Veröffentlichungen zeigten in einigen Fällen gar keine Inhibition des antimikrobiellen Wachstums in den jeweils getesteten Konzentrationen [107, 108].

In einigen Fällen wurde beobachtet, dass die Gegenwart der Dermcidin-Peptide das Wachstum der Bakterien bzw. deren Stoffwechsel sogar leicht zu erhöhen schien. Dieser Effekt konnte für manche Bakterienstämme beim Atmungstest (Kapitel 4.3.2.1), in der Abtötungskinetik (Kapitel 4.3.2.3) und beim Anfärben mancher Mikrotiterplatten nach der Übernacht-Inkubation beobachtet (Abb. 5.3).

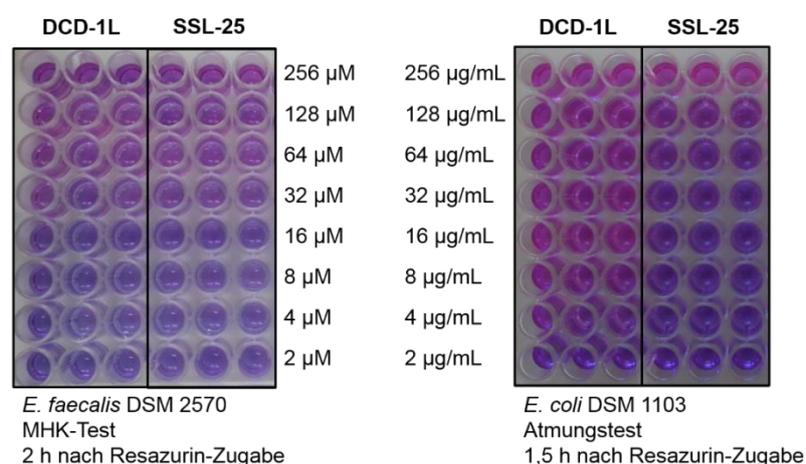


Abb. 5.3 Mikrotiterplatten eines MHK-Tests von *E. faecalis* und eines Atmungstests von *E. coli*. Der Stoffwechsel der Bakterien schien mit mehr Dermcidin-Peptiden aktiver zu sein, denn der Farbumschlag von blau nach rot erfolgte in den Wells mit hohen Peptid-Konzentrationen schneller.

Die Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden konzentrieren sich in der Regel auf die direkte Schädigung der bakteriellen Membran (Kapitel 1.4). Daher sollte ein aktives AMP auch Leakage an bakteriomimetischen, anionischen Vesikeln verursachen. Unter den salzfreien Pufferbedingungen zeigten selbst mäßig aktive AMPs wie beispielsweise PGLa bereits bei P/L 1:50 innerhalb 900 s ein fast vollständiges Vesikel-Leakage, während DCD-1L selbst in der zehnfachen Konzentration kaum Leakage verursachte (Abb. 5.4). Dieses Verhalten war nicht im Einklang mit dem antimikrobiellen Charakter der Dermcidin-Peptide. Selbst mit 1000 μM Zn^{2+} erhöhte sich das Leakage von DCD-1L kaum, obwohl vorausgegangene Bindungsexperimente (vergl. Abb. 4.21) zeigten, dass das Peptid unter diesen Bedingungen zu großen Teilen binden sollte. Bindung und Membranschädigung korrelierten nicht.

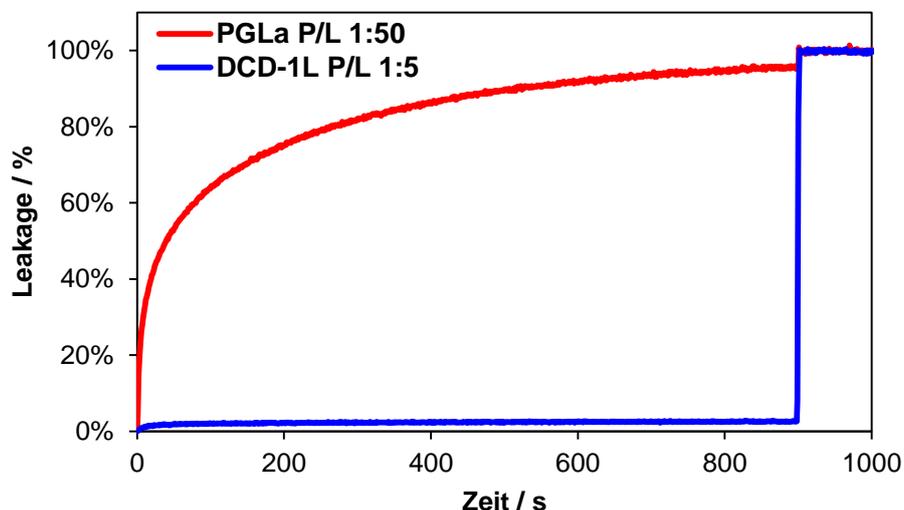


Abb. 5.4 Vergleich des beobachteten Vesikel-Leakage von DCD-1L und PGLa. Die Messungen fanden beide mit POPC/POPG (3:1)-Vesikeln in Saccharose-Puffer bei 30 °C statt. PGLa zeigte als typisches AMP bereits bei einem Zehntel der DCD-1L-Konzentration nach 900 s fast vollständiges Leakage, während DCD-1L kaum einen Effekt zeigte.

An neutralen Membranen mit angelegtem Potential wurde für DCD-1L die Ausbildung von Poren gezeigt [47]. Ein Membranpotential lässt sich auch über Vesikelmembranen anlegen und somit sollte bei einer Ausbildung von Poren ein Leakage deutlich gesteigert auftreten.

In den hierzu durchgeführten Experimenten zeigte DCD-1L jedoch kein markant erhöhtes Leakage, unabhängig davon, ob das Potential mit positiver oder negativer Polarität angelegt wurde. Unter dem Blickpunkt einer Membranschädigung bestätigten und bekräftigten somit alle Leakage-Experimente die Inaktivität der Dermcidin-Peptide wie sie sich bereits bei den antimikrobiellen Tests gezeigt hatte.

Die Schädigung eukaryotischer Zellen wurde zunächst mittels Hämolyse untersucht. Selbst bei Verwendung sehr anfälliger Erythrozyten (hohe Verdünnung und keine stabilisierenden

Zusätze wie FCS oder BSA) wurde für DCD-1L keine Hämolyse festgestellt (Abb. 4.35). SSL-25 verursachte eine geringe Hämolyse, die bei höheren Konzentrationen konstant bei ca. 10 % blieb.

Weitere eukaryotische Zellen, RAW 264.7 Makrophagen, wurden ebenfalls mit DCD-1L bzw. SSL-25 inkubiert um für nachfolgende Untersuchungen der Immunantwort zu validieren. Diese Zellen zeigten nach 24 h Inkubation keine erhöhten LDH-Werte und auch die anschließende Propidiumiodid-Färbung zeigte keine Schädigung der Zellen.

Der ELISA des Makrophagen-Inkubationsmediums zeigte bei genau einer Versuchsreihe einen leicht erhöhten Wert für TNF α . Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht reproduzieren und war eventuell auf eine Kontamination der Zellen zurückzuführen. Die erhöhten Werte einzelner Inkubationen könnten durch Verunreinigungen erklärt werden, die synergistisch mit den Peptiden wirken. Erstaunlich war, dass lediglich SSL-25 und PGLa erhöhte TNF α -Konzentrationen ergaben, DCD-1L jedoch nicht. Die exakten Umstände ließen sich nicht reproduzieren und alle weiteren ELISA ergaben keine erhöhten TNF α -, IL1 β oder IL6-Konzentrationen.

5.4 Translokation in Lipid-Vesikel und Zellen

Antimikrobielle Peptide und sekundäre amphiphile CPPs weisen gewisse Gemeinsamkeiten auf: sie sind in Lösung meist unstrukturiert und bilden nach Bindung an Lipidmembranen eine α -helikale amphiphile Struktur aus, welche für ihre jeweilige Aktivität notwendig ist. Dieses ähnliche Verhalten hinsichtlich Strukturbildung führte bereits in der Vergangenheit zur Untersuchungen der zellpenetrierenden Eigenschaften von AMPs [102]. Die Dermcidin-Peptide wurden daher ebenfalls auf ihre Translokationsfähigkeiten untersucht.

Zunächst wurde mit einem CPP-Test, analog zu Marks *et al.*, die Translokation der Dermcidin-Peptide in Lipidvesikel untersucht [80]. Aus den Bindungsexperimenten war bekannt, dass die Dermcidin-Peptide bevorzugt an anionische Membranen binden und diese Bindung durch Zn²⁺-Zugabe deutlich erhöht werden kann. Daher wurden die Versuchsbedingungen für Translokationsexperimente entsprechend ausgewählt. Bereits erste orientierende Experimente zeigten deutlich, dass DCD-1L über zellpenetrierende Eigenschaften verfügte. Für weiterführende Experimente wurden sowohl schwach anionische Vesikel (25 % anionischer Lipidgehalt) als auch stark anionische Vesikel (75 % anionischer Lipidgehalt) eingesetzt.

In Abwesenheit von Zn²⁺-Ionen translozierte nur wenig DCD-1L in schwach anionische Vesikel, in stark anionische Vesikel jedoch deutlich mehr. Ein positiver Einfluss von Zn²⁺-Ionen auf die Translokation konnte sowohl für DCD-1L als auch für SSL-25 beobachtet

werden. Der Einfluss von Zn^{2+} -Ionen auf SSL-25 war schwächer ausgeprägt als für DCD-1L. Ähnliche Einflüsse konnten für Zn^{2+} bereits bei anderen Experimenten wie beispielsweise bei den Bindungsexperimenten beobachtet werden. Die Interaktion des Zn^{2+} -Ions mit den Dermcidin-Peptiden verläuft wahrscheinlich über das den einzelnen Histidinrest (His38), welcher in der SSL-25-Sequenz fehlte. Da dennoch ein positiver Effekt bei SSL-25 beobachtet wurde, kann diese Interaktion nicht alleine für diesen Effekt verantwortlich sein. Die Abhängigkeit der Translokation von der Vesikel-Ladung und der Zn^{2+} -Konzentration korrelierte mit den Ergebnissen der Bindungsexperimente.

Andere zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Translokation von DCD-1L, obwohl sowohl Ca^{2+} als auch Mg^{2+} in einer Veröffentlichung von Paulmann et al. vergleichbaren Einfluss auf DCD-1L bescheinigt worden war [45].

Es stellte sich die Frage, ob Zn^{2+} -Ionen allgemein die Translokation von CPPs verstärkt bzw. beschleunigt. Es wurden analoge Messungen mit TP1 durchgeführt, die zeigten, dass Zn^{2+} keinen Einfluss auf die initiale Transferrate des TP1 hatte und die Translokation über 900 s sogar verringerte (Abb. 5.5, rechts). Zn^{2+} -Ionen stellen also kein universelles Werkzeug dar um die Translokation von CPPs zu verbessern. Dieser Effekt schien exklusiv für die Dermcidin-Peptide zu sein (Abb. 5.5, links). Die Translokation spiegelt unmittelbar das Bindungsverhalten wider, wird DCD-1L gebunden erhöht sich die Translokation entsprechend dem Verteilungskoeffizienten.

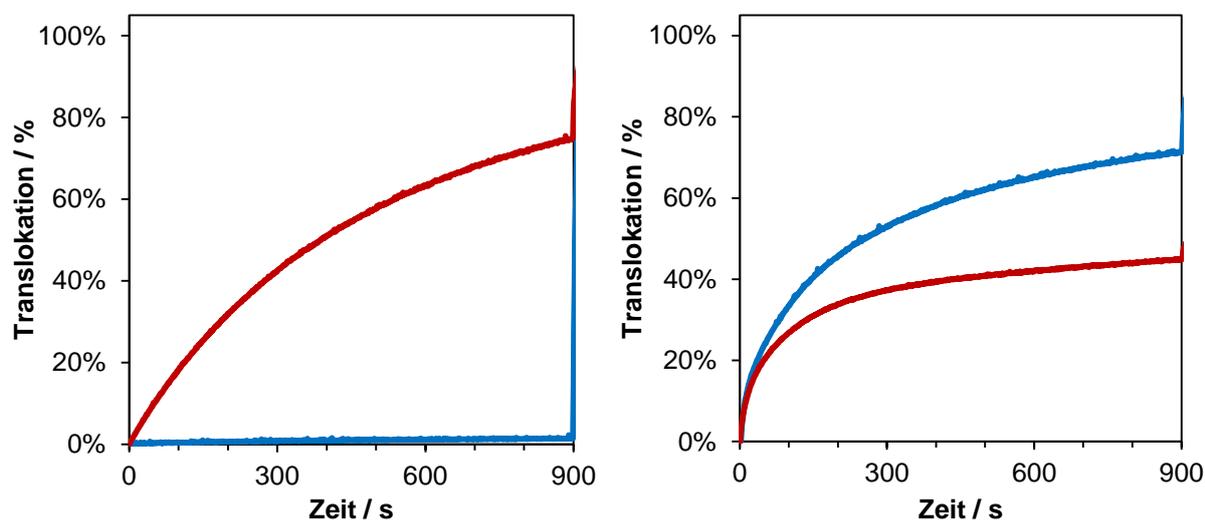


Abb. 5.5 Translokation von DCD-1L (links) und TP1 (rechts) in POPC/POPG (7:3)-Vesikel bei P/L 1:50, jeweils ohne Zn^{2+} -Ionen (blau) und in Gegenwart von $1000 \mu M Zn^{2+}$ (rot). Die initiale Transferrate war unabhängig der Zn^{2+} -Konzentration annähernd gleich. Die Translokation über 900 s wurde durch Zn^{2+} -Zugabe von 2 % auf ca. 75 % erhöht (DCD-1L) bzw. von 70 % auf 45 % reduziert (TP1).

Das DCD-1L-Analoga ohne Histidinrest, DCD-1-GQF-Aca-L H38A, zeigte eine geringere Translokation in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen (Abb. 4.45), jedoch war die Translokation auch in Abwesenheit von Zn^{2+} -Ionen deutlich geringer. Daher scheint der Histidinrest auch in Abwesenheit von Zn^{2+} essentiell für eine optimierte Translokationsrate zu sein.

Die Experimente der DCD-1L-Analoga mit verändertem Ladungsreißverschluss-Motiv zeigten nicht die erwarteten Ergebnisse. DCD-1-GQF-Aca-L „C“ sollte aufgrund des gestörten Motives nicht translozieren, während DCD-1-GQF-Aca-L „A“ und DCD-1-GQF-Aca-L „P“ mit ihrem intakten, aber veränderten Motiv zumindest eine ähnliche Translokation als die entsprechende Wildtypsequenz von DCD-1-GQF-Aca-L aufweisen sollte. Letztlich translozierten alle drei Analoga. Die Translokation von „A“ und „C“ war deutlich schlechter als bei dem Wildtyp-Peptid beobachtet, wobei beide Peptide vergleichbar schnell translozierten. Das Ladungsreißverschluss-Motiv hatte quasi keinen Einfluss auf die Translokation dieser Peptide. DCD-1-GQF-Aca-L „P“ hingegen zeigte nur eine geringe Zn^{2+} -Abhängigkeit. Auch der zeitliche Verlauf der Translokation verlief ungewöhnlich. Innerhalb weniger Sekunden translozierte sehr viel Peptid, doch die Aufnahme stagnierte anschließend bis zum Ende der Messung bei 900 s fast vollständig. Was genau die Aufnahme des Peptids so rasant verringert konnte nicht eindeutig aufgeklärt werden. Denkbar wäre jedoch, dass das bereits translozierte Peptid mit seinem sehr stark positiv geladenen N-Terminus (Tabelle 4.1) zu stark an die Vesikelmembran band und auf diese Weise die Bindung weiterer Moleküle verhinderte. Die beiden Mutanten DCD-1-GQF-Aca-L „P2“ und „P3“ zeigten wie erwartet nur eine sehr geringe Translokation. Obwohl diese Peptide kaum amphiphilen Charakter besaßen war eine Zn^{2+} -abhängige Steigerung der Translokation zu beobachten.

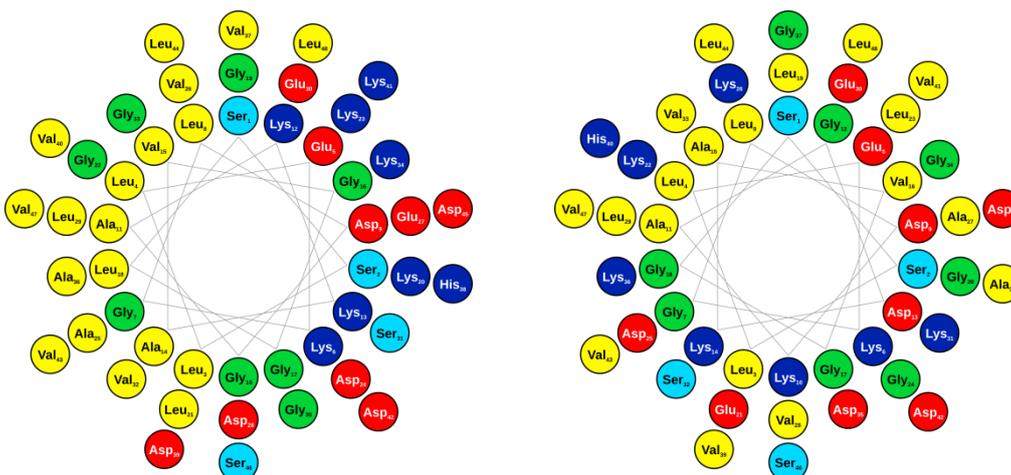


Abb. 5.6 Helikale-Rad-Darstellung von DCD-1L wt (links) und DCD-1L „P2“ (rechts). Der amphiphile Charakter des Wildtyps ist bei dem „P2“-Analogon nicht mehr vorhanden. Die Abbildungen wurden mit „Protein ORIGAMI“ erstellt [41].

Durch Messung der konzentrationsabhängigen initialen Transferraten der Dermcidin-Peptide in Lipidvesikel konnte gezeigt werden, dass der Membrandurchtritt von DCD-1L kooperativ verläuft, ungeachtet der Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen. Der ermittelte Hill-Koeffizient ergab den Wert 2 und weist somit auf eine dimere Assemblierung des Peptids während des eigentlichen Translokationsvorgangs hin. SSL-25 hingegen zeigte keine sichtbare Kooperativität, der ermittelte Hill-Koeffizient verblieb bei nahezu 1. Die Kooperativität der Peptide während des Translokationsvorgangs scheint entweder dem vorhandenen Histidinrest in der DCD-1L-Sequenz, oder dem vollständigen Ladungsreißverschluss-Motiv bei DCD-1L geschuldet. Eine eindeutige Aussage, wodurch die Kooperativität entsteht, konnte nicht getroffen werden.

Bereits Anfang der 1990er Jahre etablierten sich BY-2 Tabakzellen als pflanzliches Gegenstück zu den HeLa-Zellen bei Säugern [76]. Die langjährige Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Nick am Botanischen Institut [75, 99] ermöglichte Translokationsexperimente mit den Dermcidin-Peptiden, die zur Lokalisation N-terminal Rhodamin B-markiert wurden.

Die Experimente mit BY-2 Tabakzellen zeigten, dass für eine erfolgreiche Translokation vor allem der positiv geladene N-Terminus, also SSL-25, von Bedeutung war. Der C-Terminus, VED-23, konnte nicht selbstständig translozieren.

Auch die Translokation von SSL-25 und DCD-1L in die BY-2 Zellen war Zn^{2+} -abhängig. Im üblicherweise verwendeten Inkubationsmedium der Zellen sind stets ca. 30 μM Zn^{2+} zugegen. Ohne Zn^{2+} -Ionen – in einem hierfür separat angesetzten Medium – war die Translokation in die Zellen zwar geringer, aber dennoch vorhanden. Diese Ergebnisse stimmten mit dem Ergebnis der Vesikel-basierten Translokationsexperimente überein.

Sollte die Befähigung zur Translokation in direktem Zusammenhang mit dem Ladungsreißverschluss-Motiv stehen, dann sollten die Analoga Rh-DCD-1L „A“ und Rh-DCD-1L „P“ vergleichbar mit Rh-DCD-1L translozieren, während eine Translokation von Rh-DCD-1L „C“ nicht erwartet wurde, da das Ladungsreißverschluss-Motiv in diesem Fall vollständig gestört ist. Es wurde dennoch eine Translokation des „C“-Analogons in die BY-2 Zellen festgestellt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der Translokation in Vesikel (siehe oben). Die Rolle des Ladungsreißverschluss-Motives auf die Translokation wurde überschätzt, da alle Analoga, „A“, „C“ und „P“, zwar translozierten, sich jedoch in den Zellen an den Mitochondrien lokalisierten. Die Gründe für diese Lokalisation aller Ladungsreißverschluss-Analoga an den Mitochondrien konnten nicht eindeutig geklärt werden.

Da Mitochondrien jedoch, wie Bakterien, über eine anionische Oberfläche verfügen, erscheint hier eine Lokalisation aufgrund des Bindungsverhaltens des DCD-1L sinnvoll. Die Translokation der drei Ladungsreißverschluss-Analoga konnte analog zu den Experimenten mit BY-2-Zellen in den Vesikel-Experimenten beobachtet werden. Warum jedoch die Wildtyp-Sequenz von DCD-1L, mit unverändertem Ladungsreißverschluss-Motiv, sich nicht an den Mitochondrien der BY-2-Zellen lokalisierte kann hierdurch nicht erklärt werden.

Das Lifeact-Konstrukt Rh-SSL-25-Lifeact sollte als Analogon zu dem bereits erfolgreich eingesetzten, aber in höheren Konzentrationen toxischen Peptid Rh-BP100-Lifeact fungieren [75]. Die Fähigkeit zur Translokation jedoch für Rh-SSL-25-Lifeact nicht gegeben. Da lediglich die Sequenz des BP100 durch SSL-25 ersetzt wurde, konnte nicht vollständig nachvollzogen werden, weshalb das Peptid nicht translozierte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Lifeact-Sequenz die korrekte Faltung des SSL-25-Abschnitts verhindert und so die Translokationsfähigkeit verloren ging. Für zukünftige Experimente sollten die Sequenzen mit zusätzlichen Aminosäuren oder einem anderen Linker zwischen SSL-25 und Lifeact synthetisiert werden.

Dermcidin-Peptide haben als Peptide im menschlichen Schweiß primär mit Zellen der oberen Hautschichten Kontakt. Der am häufigsten vorzufindende Zelltyp der oberen Hautschichten sind Keratinozyten. Als sehr einfaches Hautmodell wurden immortalisierte, nicht-maligne Keratinozyten, sog. HaCaT-Zellen, eingesetzt [101].

Orientierende Translokationsexperimente mit den HaCaT-Zellen wurden in Kapitel 4.4.4 präsentiert und diese ersten Experimente wurden mit Rh-SSL-25 in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen durchgeführt. Es zeigte sich, dass das Peptid bereits nach 15 min in den Zellen vorlag. Scheinbar konzentrierte es sich im Zellkern (siehe Abb. 4.58), war aber auch im Cytosol erkennbar. Es wurden nicht alle Zellen uniform angefärbt, das Peptid translozierte also nicht gleichmäßig in alle Zellen. Die Zellen befanden sich eventuell in unterschiedlichen Wachstumsphasen, was für die Translokation von SSL-25 wichtig sein könnte. Einzelne Zellen schienen bevorzugt zu sein, während in kleineren Anhäufungen von Zellen das Peptid nur in wenigen Zellen vorlag (siehe Abb. 4.57). Weitere Versuchsreihen mit Rh-DCD-1L und in Zn^{2+} -freier Umgebung sind aktuell im Gange.

Als Peptid im menschlichen Schweiß haben Dermcidin-Peptide ebenfalls Kontakt zu allen Mikroorganismen auf der menschlichen Haut. *S. aureus*, als weit verbreitetes Bakterium auf der Haut warmblütiger Tiere, wurde neben den antimikrobiellen Experimenten ebenfalls für Translokationsexperimente verwendet. Zunächst traten für derartige Experimente gewisse Probleme auf, da beispielsweise Rhodamin B an die bakterielle Membran bindet und Rh-markierte Peptide somit hierfür nicht verwendet werden konnten. Nach der Synthese der

Carboxyfluorescein-markierten Peptide zeigte sich, dass die Inkubation in regulärem Mueller-Hinton Medium oder in typischen Inkubationspuffern (PB oder TRIS-Puffer) zu keiner sichtbaren Färbung der Zellen führte. Lediglich Versuche mit Schweiß-artigem Phosphatpuffer bei pH 6 zeigten eine sichtbare Färbung der Zellen. Aufgrund der Größe der Bakterien und der Verwendung eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops war, konnte ein eindeutiger Nachweis einer Translokation bisher nicht geführt werden. Die Zellen waren nicht uniform markiert, kleine, punktförmige Regionen hoher Peptidkonzentration wiesen auf eine Lokalisation auf oder in den Zellen hin. Bei Verwendung eines Mikroskops mit höherer Auflösung sollte es jedoch möglich sein, eine definitive Aussage über die Translokation in Bakterien zu treffen.

Die intrazellulären Ziele bzw. die Wirkung der Dermcidin-Peptide sind noch nicht in Gänze verstanden. Einer aktuellen Publikation ist jedoch zu entnehmen, dass exprimiertes DCD (91-mer) wohl eine wichtige Rolle bei der Regulation des angeborenen Immunsystems und dessen Reaktionen auf Infektionen und Verletzungen spielt [109]. So reduzierte DCD die durch LPS oder andere entzündungsfördernde Substanzen erhöhten Stickstoffmonoxid-Konzentrationen bzw. die Chemokin-Ausschüttung bereits in geringen Konzentrationen deutlich. Die oben beschriebenen, jedoch nicht reproduzierbaren Experimente mit den Makrophagen sollten eine Erhöhung bzw. Beschleunigung der Entzündungsreaktion durch DCD-1L untersuchen. Dies konnte zwar bisher nicht bestätigt werden, doch auf Basis der neuen Erkenntnisse [109] ist eine mögliche Vorgehensweise aufgezeigt zu ermitteln, ob auch das kürzere Peptid DCD-1L (48-mer) Entzündungsreaktionen bzw. die Ausschüttung hierzu relevanter Chemokine nicht erhöht, sondern hemmt.

6. Zusammenfassung

Vor etwa 15 Jahren wurden die Dermcidin-Peptide DCD-1L und SSL-25 auf der menschlichen Haut entdeckt. Dermcidin wird in humanen ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert, in den Schweiß sezerniert, auf die Hautoberfläche transportiert und hier weiter proteolytisch gespalten. Die Dermcidin-Peptide wurden in diversen Publikationen als antimikrobiell wirksam beschrieben, im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eindeutig belegt werden, dass dies nicht der Fall ist.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Peptide wurden nach Standardprotokollen synthetisiert und chromatografisch gereinigt. Die erhaltenen Ausbeuten waren für die vergleichsweise langen Peptide (mit bis zu 52 Aminosäuren) durchweg akzeptabel, im Falle der teilweise benötigten C-terminalen Modifikationen waren sie ausreichend.

Obwohl die Dermcidin-Peptide antimikrobiell nicht aktiv sind, wurden mit Zirkulardichroismus-(CD-)Spektroskopie Strukturmerkmale aufgefunden, die für antimikrobielle Peptide (AMPs) typisch sind: in Lösung sind die Peptide unstrukturiert, nach der Bindung an anionische Lipidmembranen bilden sie eine α -helikale Struktur aus, aufgrund derer sie einen amphiphilen Charakter aufweisen.

Orientierte CD- und Festkörper-NMR-Messungen ergaben, dass die Dermcidin-Peptide flach auf der Membran aufliegen und auch bei Änderung diverser Parameter (wie Ionenkonzentration, Temperatur und Lipidbeschaffenheit) keine signifikanten Veränderungen aufzeigen. Auch bei erhöhter Peptidkonzentration war lediglich eine marginale Tendenz zur Membran-Insertion erkennbar, ein im Vergleich zu AMPs eher untypisches Verhalten, denn diese insertieren meist deutlich mit zunehmender Peptidkonzentration.

Die Affinität des anionischen Peptids DCD-1L erhöhte sich mit zunehmendem anionischen Lipidgehalt in den Modell-Membranen sowie mit zunehmender Zn^{2+} -Konzentration, wobei der Zn^{2+} -Einfluss auf das kürzere SSL-25 weniger ausgeprägt war als bei DCD-1L.

Die für DCD-1L postulierte Assemblierung könnte möglicherweise durch wechselseitige Kompensation der Ladungen entlang der Helix, durch ein sogenanntes Ladungsreißverschluss-Motiv zustande kommen. Resonanzenergietransfer-Experimente ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine solche Assemblierung, es wurden nur monomer gebundene Peptide beobachtet. Auch auf eine monomere Haarnadelstruktur-Rückfaltung, die ebenfalls über dieses Motiv verlaufen würde, wurde kein Hinweis gefunden.

Aufgrund ihrer fehlenden antimikrobiellen Funktion und angesichts ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten mit zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Dermcidin-Peptide möglicherweise zellpenetrierende Eigenschaften aufweisen. Es zeigte sich, dass diese Peptide nicht nur spontan in Lipidvesikel translozieren, sondern auch nach Inkubation in eukaryotische Zellen eindringen können. Die Translokation

erfolgte entsprechend ihrer Bindungseffizienz an die Lipidmembran und war mit zunehmender anionischer Ladung der Vesikel und Zn^{2+} -Konzentration teilweise drastisch gesteigert. Auch bei der Translokation in Tabakzellen wurde ein positiver Zn^{2+} -Effekt sowohl für SSL-25 als auch für DCD-1L festgestellt.

Beim Versuch, SSL-25 als Transportsequenz für Tabakzellen einzusetzen, musste festgestellt werden, dass eine direkte Verknüpfung des Transporters mit dem Cargo nicht erfolgreich war, und eine Lösung hierfür in einer flexibleren Verbindung liegen dürfte. In weiteren Versuchen zur Translokation in humane Keratinozyten war SSL-25 bereits nach 15 min in die Zellen eingedrungen, wahrscheinlich lokalisiert am oder im Zellkern.

In quantitativen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Transfer von DCD-1L in Lipidvesikel kooperativ erfolgt, denn der ermittelte Hill-Koeffizient ergab den Wert 2, was auf eine dimere Assemblierung des Peptids während des eigentlichen Translokationsvorgangs hinweist. Für die verkürzte Sequenz SSL-25 lag der Hill-Koeffizient bei 1, was für dieses Peptid auf einen monomeren Mechanismus hindeutet.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals aufgezeigt werden, dass Dermcidin-Peptide der Klasse der zellpenetrierenden Peptide zuzuordnen sind. Insbesondere die gezeigte Translokation in humane Keratinozyten eröffnet für diese Peptide ein weites und vielversprechendes Anwendungspotential, beispielsweise im Bereich der Kosmetik oder Dermatologie.

7. Ausblick

Wie bereits erwähne, konnten die publizierten antimikrobiellen Eigenschaften der Dermcidin-Peptide im Rahmen dieser Arbeit nicht verifiziert werden.

Nachdem feststeht, dass DCD-1L kein antimikrobielles, sondern ein zellpenetrierendes Peptid ist, wäre es von Grundlegenden Interesse, dessen Eigenschaften hinsichtlich Translokationsmechanismus und Interaktion bzw. synergistische Effekte mit Zn^{2+} -Ionen im Detail zur untersuchen. Hierzu müssten die genauen Interaktionsstellen identifiziert werden und alle für die Wechselwirkungen zwischen Peptid, Zn^{2+} -Ionen und der Membran relevanten Parameter bestimmt und bewertet werden. Durch sukzessive Entfernung möglicher Interaktionsstellen der Dermcidin-Peptide können durch anschließende Quantifizierung der Zn^{2+} -Abhängigkeit in vesikelbasierten Translokationsexperimenten diese wichtlich bewertet werden. Dermcidin-Peptide benötigen wahrscheinlich einen flexiblen Linker zwischen Translokationssequenz und transportiertem Cargo, um ihre zellpenetrierenden Eigenschaften beizubehalten. Die Art des Linkers, die genauen Translokationsbedingungen sowie die Kompatibilität mit unterschiedlich beschaffenen Cargo-Molekülen wären weitere zu untersuchende Fragestellungen.

Wenn die exakten Translokationsbedingungen der Dermcidin-Peptide im Detail verstanden und die Translokation in relevante Zelltypen – also Hautzellen oder auch Bakterien auf der Haut – nachvollzogen sind, könnten die Dermcidin-Peptide konkrete Anwendungen finden. Naheliegend wäre eine Verwendung als Transporter für Medikamente oder andere Wirkstoffe, die sie als Cargo in die entsprechenden Zellen einschleusen. Dermcidin-Peptide bieten hier zwei markante Vorteile im Vergleich zu anderen CPPs: sie sind humanen Ursprungs, sollten also keine oder nur geringe Immunreaktionen auslösen, was eine Zulassung für medizinische oder kosmetische Anwendungen erleichtern wird und sie sind nicht toxisch, selbst in sehr hohen Konzentrationen.

8. Literaturverzeichnis

- [1] A. Fleming, On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology*, 10 (1929) 226-236.
- [2] R.I. Lehrer, T. Ganz, Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence, *Curr Opin Immunol*, 11 (1999) 23-27.
- [3] K.A. Brogden, M. Ackermann, P.B. McCray, B.F. Tack, Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences, *Int J Antimicrob Ag*, 22 (2003) 465-478.
- [4] D. Phoenix, S.R. Dennison, F. Harris, *Antimicrobial peptides*, Wiley-VCH, Weinheim, 2013.
- [5] B. Schittek, R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner, C. Garbe, Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands, *Nat Immunol*, 2 (2001) 1133-1137.
- [6] W. Müller-Esterl, *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.
- [7] The University of Tokyo - Life Science Web Textbook, Zugriff am 24.02.2016, http://csls-text.c.u-tokyo.ac.jp/active/05_03.html.
- [8] S.J. Singer, G.L. Nicolson, Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes, *Science*, 175 (1972) 720-&.
- [9] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 7. Auflage ed., Springer Spektrum, 2013.
- [10] D. Boujard, B. Anselme, C. Cullin, C. Raguénès-Nicol, *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, 2014.
- [11] H.C. Gram, Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten, *Fortschritte der Medizin*, 2 (1884) 185-189.
- [12] E. Strandberg, A.S. Ulrich, NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concept Magn Reson A*, 23A (2004) 89-120.
- [13] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389-395.
- [14] R.J. Dubos, Studies on bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro, *Journal of Experimental Medicine*, 70 (1939) 1-10.
- [15] R.J. Dubos, Studies on bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: II. Protective effect of the vactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice, *Journal of Experimental Medicine*, 70 (1939) 11-17.
- [16] G.F. Gause, Gramicidin S - Review of Recent Work, *Lancet*, 251 (1946) 46-47.
- [17] H.L. Van Epps, Rene Dubos: unearthing antibiotics, *Journal of Experimental Medicine*, 203 (2006) 259-259.
- [18] B. Stec, Plant thionins - the structural perspective, *Cell Mol Life Sci*, 63 (2006) 1370-1385.
- [19] M.L. Katz, L.V. Mueller, M. Polyakov, S.F. Weinstock, Where have all the antibiotic patents gone?, *Nat Biotechnol*, 24 (2006) 1529-1531.
- [20] T. Nakatsuji, R.L. Gallo, Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas, *J Invest Dermatol*, 132 (2012) 887-895.
- [21] G. Kiss, H. Michl, Über das Gift der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L., *Toxicon*, 1 (1962) 33-34.
- [22] O. Levy, Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes, *J Leukocyte Biol*, 76 (2004) 909-925.
- [23] D. Hultmark, H. Steiner, T. Rasmuson, H.G. Boman, Insect Immunity - Purification and Properties of 3 Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora-Cecropia*, *Eur J Biochem*, 106 (1980) 7-16.
- [24] H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, H.G. Boman, Sequence and Specificity of 2 Anti-Bacterial Proteins Involved in Insect Immunity, *Nature*, 292 (1981) 246-248.

- [25] M. Zasloff, Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin - Isolation, Characterization of 2 Active Forms, and Partial Cdna Sequence of a Precursor, *P Natl Acad Sci USA*, 84 (1987) 5449-5453.
- [26] K.A. Brogden, M. Ackermann, K.M. Huttner, Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial, *Antimicrob Agents Ch*, 41 (1997) 1615-1617.
- [27] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat Rev Microbiol*, 3 (2005) 238-250.
- [28] T. Ganz, The role of antimicrobial peptides in innate immunity, *Integr Comp Biol*, 43 (2003) 300-304.
- [29] Y.P. Lai, R.L. Gallo, AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense, *Trends Immunol*, 30 (2009) 131-141.
- [30] M. Cassone, L. Otvos, Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics, *Expert Rev Anti-Infe*, 8 (2010) 703-716.
- [31] E. Strandberg, J. Zerweck, D. Horn, G. Pritz, M. Berditsch, J. Burck, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, Influence of hydrophobic residues on the activity of the antimicrobial peptide magainin 2 and its synergy with PGLa, *J Pept Sci*, 21 (2015) 436-445.
- [32] E. Strandberg, P. Tremouilhac, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, Synergistic transmembrane insertion of the heterodimeric PGLa/magainin 2 complex studied by solid-state NMR, *Bba-Biomembranes*, 1788 (2009) 1667-1679.
- [33] S. Rieg, S. Seeber, H. Steffen, A. Humeny, H. Kalbacher, S. Stevanovic, A. Kimura, C. Garbe, B. Schitteck, Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites, *J Invest Dermatol*, 126 (2006) 354-365.
- [34] B. Schitteck, The Multiple Facets of Dermcidin in Cell Survival and Host Defense, *J Innate Immun*, 4 (2012) 349-360.
- [35] C. Vuong, J.M. Voyich, E.R. Fischer, K.R. Braughton, A.R. Whitney, F.R. DeLeo, M. Otto, Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system, *Cell Microbiol*, 6 (2004) 269-275.
- [36] Y.P. Lai, Y.F. Peng, Y. Zuo, J. Li, J. Huang, L.F. Wang, Z.R. Wu, Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide, *Biochem Biophys Res Commun*, 328 (2005) 243-250.
- [37] I. Cipakova, J. Gasperik, E. Hostinova, Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in *Escherichia coli*, *Protein Expression Purif*, 45 (2006) 269-274.
- [38] H. Steffen, S. Rieg, I. Wiedemann, H. Kalbacher, A. Deeg, H.G. Sahl, A. Peschel, F. Gotz, C. Garbe, B. Schitteck, Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge, *Antimicrob Agents Ch*, 50 (2006) 2608-2620.
- [39] M. Burian, B. Schitteck, The secrets of dermcidin action, *Int J Med Microbiol*, 305 (2015) 283-286.
- [40] I. Senyurek, M. Paulmann, T. Sinnberg, H. Kalbacher, M. Deeg, T. Gutschmann, M. Hermes, T. Kohler, F. Gotz, C. Wolz, A. Peschel, B. Schitteck, Dermcidin-Derived Peptides Show a Different Mode of Action than the Cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Ch*, 53 (2009) 2499-2509.
- [41] IBG-2 Protein ORIGAMI, Zugriff am 25.01.2016, http://www.ibg.kit.edu/protein_origami/.
- [42] D. Baechle, T. Flad, A. Cansier, H. Steffen, B. Schitteck, J. Tolson, T. Herrmann, H. Dihazi, A. Beck, G.A. Mueller, M. Mueller, S. Stevanovic, C. Garbe, C.A. Mueller, H. Kalbacher, Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L, *J Biol Chem*, 281 (2006) 5406-5415.
- [43] I. Senyurek, G. Doring, H. Kalbacher, M. Deeg, A. Peschel, C. Wolz, B. Schitteck, Resistance to dermcidin-derived peptides is independent of bacterial protease activity, *Int J Antimicrob Ag*, 34 (2009) 86-90.
- [44] K. Sakurada, T. Akutsu, H. Fukushima, K. Watanabe, M. Yoshino, Detection of dermcidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA, *Forensic Sci Int*, 194 (2010) 80-84.
- [45] M. Paulmann, T. Arnold, D. Linke, S. Ozdirekcan, A. Kopp, T. Gutschmann, H. Kalbacher, I. Wanke, V.J. Schuenemann, M. Habeck, J. Burck, A.S. Ulrich, B. Schitteck, Structure-Activity

- Analysis of the Dermcidin-derived Peptide DCD-1L, an Anionic Antimicrobial Peptide Present in Human Sweat, *J Biol Chem*, 287 (2012) 8434-8443.
- [46] T.H. Walther, C. Gottselig, S.L. Grage, M. Wolf, A.V. Vargiu, M.J. Klein, S. Vollmer, S. Prock, M. Hartmann, S. Afonin, E. Stockwald, H. Heinzmann, O.V. Nolandt, W. Wenzel, P. Ruggerone, A.S. Ulrich, Folding and Self-Assembly of the TatA Translocation Pore Based on a Charge Zipper Mechanism, *Cell*, 152 (2013) 316-326.
- [47] C. Song, C. Weichbrodt, E.S. Salnikov, M. Dynowski, B.O. Forsberg, B. Bechinger, C. Steinem, B.L. de Groot, U. Zachariae, K. Zeth, Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel, *P Natl Acad Sci USA*, 110 (2013) 4586-4591.
- [48] S.D. Conner, S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature*, 422 (2003) 37-44.
- [49] A. Prochiantz, Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others, *Curr Opin Cell Biol*, 12 (2000) 400-406.
- [50] Ü. Langel, Cell-penetrating peptides : methods and protocols, Second Edition ed., Humana Press, 2015.
- [51] A.D. Frankel, C.O. Pabo, Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus, *Cell*, 55 (1988) 1189-1193.
- [52] M. Green, P.M. Loewenstein, Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein, *Cell*, 55 (1988) 1179-1188.
- [53] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostinibazin, A. Prochiantz, Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis, *P Natl Acad Sci USA*, 88 (1991) 1864-1868.
- [54] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The 3rd Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological-Membranes, *J Biol Chem*, 269 (1994) 10444-10450.
- [55] F. Milletti, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape, *Drug Discov Today*, 17 (2012) 850-860.
- [56] G. Tunnemann, R.M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer, M.C. Cardoso, Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells, *Faseb J*, 20 (2006) 1775-1784.
- [57] D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J Pept Res*, 56 (2000) 318-325.
- [58] I. Nakase, H. Hirose, G. Tanaka, A. Tadokoro, S. Kobayashi, T. Takeuchi, S. Futaki, Cell-surface Accumulation of Flock House Virus-derived Peptide Leads to Efficient Internalization via Macropinocytosis, *Mol Ther*, 17 (2009) 1868-1876.
- [59] A. Ziegler, Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans, *Adv Drug Deliver Rev*, 60 (2008) 580-597.
- [60] F. Madani, S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki, A. Graslund, Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides, *J Biophys*, 2011 (2011) 414729.
- [61] M. Rojas, J.P. Donahue, Z.J. Tan, Y.Z. Lin, Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability, *Nat Biotechnol*, 16 (1998) 370-375.
- [62] M.M. Fretz, N.A. Penning, S. Al-Taei, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, G. Storm, A.T. Jones, Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34(+) leukaemia cells, *Biochem J*, 403 (2007) 335-342.
- [63] C. Bechara, S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?, *FEBS Lett*, 587 (2013) 1693-1702.
- [64] J.D. Ochocki, D.G. Mullen, E.V. Wattenberg, M.D. Distefano, Evaluation of a cell penetrating prenylated peptide lacking an intrinsic fluorophore via in situ click reaction, *Bioorg Med Chem Lett*, 21 (2011) 4998-5001.
- [65] J.W. Wollack, N.A. Zeliadt, J.D. Ochocki, D.G. Mullen, G. Barany, E.V. Wattenberg, M.D. Distefano, Investigation of the sequence and length dependence for cell-penetrating prenylated peptides, *Bioorg Med Chem Lett*, 20 (2010) 161-163.
- [66] F. Bernal, A.F. Tyler, S.J. Korsmeyer, L.D. Walensky, G.L. Verdine, Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide, *J Am Chem Soc*, 129 (2007) 2456-+.

- [67] L.D. Walensky, A.L. Kung, I. Escher, T.J. Malia, S. Barbuto, R.D. Wright, G. Wagner, G.L. Verdine, S.J. Korsmeyer, Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix, *Science*, 305 (2004) 1466-1470.
- [68] C.J. Brown, S.T. Quah, J. Jong, A.M. Goh, P.C. Chiam, K.H. Khoo, M.L. Choong, M.A. Lee, L. Yurlova, K. Zolghadr, T.L. Joseph, C.S. Verma, D.P. Lane, Stapled Peptides with Improved Potency and Specificity That Activate p53, *Acs Chem Biol*, 8 (2013) 506-512.
- [69] G.B. Fields, R.L. Noble, Solid-Phase Peptide-Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Acids, *Int J Pept Prot Res*, 35 (1990) 161-214.
- [70] J. Burck, S. Roth, P. Wadhvani, S. Afonin, N. Kanithasen, E. Strandberg, A.S. Ulrich, Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism, *Biophys J*, 95 (2008) 3872-3881.
- [71] M. Rance, R.A. Byrd, Obtaining High-Fidelity Spin-1/2 Powder Spectra in Anisotropic Media - Phase-Cycled Hahn Echo Spectroscopy, *J Magn Reson*, 52 (1983) 221-240.
- [72] M.H. Levitt, D. Suter, R.R. Ernst, Spin Dynamics and Thermodynamics in Solid-State Nmr Cross Polarization, *J Chem Phys*, 84 (1986) 4243-4255.
- [73] S.H. Park, A.A. Mrse, A.A. Nevzorov, M.F. Mesleh, M. Oblatt-Montal, M. Montal, S.J. Opella, Three-dimensional structure of the channel-forming trans-membrane domain of virus protein "u" (Vpu) from HIV-1, *J Mol Biol*, 333 (2003) 409-424.
- [74] B. Herigstad, M. Hamilton, J. Heersink, How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria, *J Microbiol Meth*, 44 (2001) 121-129.
- [75] K. Eggenberger, C. Mink, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, P. Nick, Using the Peptide Bp100 as a Cell-Penetrating Tool for the Chemical Engineering of Actin Filaments within Living Plant Cells, *Chembiochem*, 12 (2011) 132-137.
- [76] T. Nagata, Y. Nemoto, S. Hasezawa, Tobacco by-2 Cell-Line as the HeLa-Cell in the Cell Biology of Higher-Plants, *Int Rev Cytol*, 132 (1992) 1-30.
- [77] P. Nick, A. Heuing, B. Ehmann, Plant chaperonins: a role in microtubule-dependent wall formation?, *Protoplasma*, 211 (2000) 234-244.
- [78] E. Gazit, W.J. Lee, P.T. Brey, Y. Shai, Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study, *Biochemistry-U.S.*, 33 (1994) 10681-10692.
- [79] M.N. Melo, M.A.R.B. Castanho, Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation, *Bba-Biomembranes*, 1768 (2007) 1277-1290.
- [80] J.R. Marks, J. Placone, K. Hristova, W.C. Wimley, Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening, *J Am Chem Soc*, 133 (2011) 8995-9004.
- [81] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, M. Mann, Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions, *Science*, 325 (2009) 834-840.
- [82] S.J. Montain, S.N. Chevront, H.C. Lukaski, Sweat mineral-element responses during 7 h of exercise-heat stress, *Int J Sport Nutr Exe*, 17 (2007) 574-582.
- [83] L. Becucci, D. Valensin, M. Innocenti, R. Guidelli, Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: influence of lipid charge, pH and Zn²⁺ on its interaction with a biomimetic membrane, *Soft Matter*, 10 (2014) 616-626.
- [84] E. Strandberg, J. Zerweck, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, Synergistic Insertion of Antimicrobial Magainin-Family Peptides in Membranes Depends on the Lipid Spontaneous Curvature, *Biophys J*, 104 (2013) L09-L11.
- [85] D.R. Bevan, W.J. Worrell, K.D. Barfield, The Interaction of Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺ with Phospholipid-Bilayer Vesicles, *Colloid Surface*, 6 (1983) 365-376.
- [86] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat Protoc*, 3 (2008) 163-175.
- [87] M. Berditsch, S. Afonin, A.S. Ulrich, The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation, *Appl Environ Microb*, 73 (2007) 6620-6628.

- [88] D.A. Steinberg, M.A. Hurst, C.A. Fujii, A.H.C. Kung, J.F. Ho, F.C. Cheng, D.J. Loury, J.C. Fiddes, *Protegrin-1: A broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity*, *Antimicrob Agents Ch*, 41 (1997) 1738-1742.
- [89] C. Hasselmann, E.S.C. Microbiology, *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution*, *Clin Microbiol Infec*, 9 (2003).
- [90] S. Rieg, H. Steffen, S. Seeber, A. Humeny, H. Kalbacher, K. Dietz, C. Garbe, B. Schitteck, *Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo*, *J Immunol*, 174 (2005) 8003-8010.
- [91] R.C. Stephenson, S. Clarke, *Succinimide Formation from Aspartyl and Asparaginyl Peptides as a Model for the Spontaneous Degradation of Proteins*, *J Biol Chem*, 264 (1989) 6164-6170.
- [92] D. Andreu, H. Aschauer, G. Kreil, R.B. Merrifield, *Solid-Phase Synthesis of Pyla and Isolation of Its Natural Counterpart, PglA[Pyla-(4-24)] from Skin Secretion of Xenopus-Laevis*, *Eur J Biochem*, 149 (1985) 531-535.
- [93] F. Kavanagh, *Microbiological Diffusion Assay .2. Design and Applications*, *J Pharm Sci*, 64 (1975) 1224-1229.
- [94] A. Walter, D. Hastings, J. Gutknecht, *Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. Role of chemical reactions in the unstirred layer*, *J Gen Physiol*, 79 (1982) 917-933.
- [95] S. Attoub, M. Mechkarska, A. Sonnevend, G. Radosavljevic, I. Jovanovic, M.L. Lukic, J.M. Conlon, *Esculentin-2CHa: A host-defense peptide with differential cytotoxicity against bacteria, erythrocytes and tumor cells*, *Peptides*, 39 (2013) 95-102.
- [96] J.M. Conlon, M. Mechkarska, J.M. Pantic, M.L. Lukic, L. Coquet, J. Leprince, P.F. Nielsen, A.C. Rinaldi, *An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog Discoglossus sardus (Alytidae)*, *Peptides*, 40 (2013) 65-71.
- [97] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, 6 ed., Walter de Gruyter, Berlin, 2004.
- [98] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of enzyme kinetics*, 4th rev. ed. ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- [99] N. Gao, P. Wadhvani, P. Muhlhauser, Q. Liu, M. Riemann, A.S. Ulrich, P. Nick, *An antifungal protein from Ginkgo biloba binds actin and can trigger cell death*, *Protoplasma*, (2015).
- [100] T. Sano, T. Higaki, Y. Oda, T. Hayashi, S. Hasezawa, *Appearance of actin microfilament 'twin peaks' in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-fimbrin*, *Plant J*, 44 (2005) 595-605.
- [101] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N.E. Fusenig, *Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell-Line*, *J Cell Biol*, 106 (1988) 761-771.
- [102] P. Wadhvani, E. Strandberg, J. van den Berg, C. Mink, J. Burck, R.A.M. Ciriello, A.S. Ulrich, *Dynamical structure of the short multifunctional peptide BP100 in membranes*, *Bba-Biomembranes*, 1838 (2014) 940-949.
- [103] E. Strandberg, N. Kanithasen, D. Tiltak, J. Burck, P. Wadhvani, O. Zwernemann, A.S. Ulrich, *Solid-state NMR analysis comparing the designer-made antibiotic MSI-103 with its parent peptide PGLa in lipid bilayers*, *Biochemistry-U.S.*, 47 (2008) 2601-2616.
- [104] P. Tremouilhac, E. Strandberg, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, *Conditions affecting the re-alignment of the antimicrobial peptide PGLa in membranes as monitored by solid state H-2-NMR*, *Bba-Biomembranes*, 1758 (2006) 1330-1342.
- [105] C. Muhle-Goll, S. Hoffmann, S. Afonin, S.L. Grage, A.A. Polyansky, D. Windisch, M. Zeitler, J. Burck, A.S. Ulrich, *Hydrophobic Matching Controls the Tilt and Stability of the Dimeric Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR) beta Transmembrane Segment*, *J Biol Chem*, 287 (2012) 26178-26186.
- [106] M. Murakami, T. Ohtake, R.A. Dorschner, B. Schitteck, C. Garbe, R.L. Gallo, *Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin*, *J Invest Dermatol*, 119 (2002) 1090-1095.

- [107] M. Murakami, B. Lopez-Garcia, M. Braff, R.A. Dorschner, R.L. Gallo, Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense, *J Immunol*, 172 (2004) 3070-3077.
- [108] B. Lopez-Garcia, P.H.A. Lee, R.L. Gallo, Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor, *J Antimicrob Chemoth*, 57 (2006) 877-882.
- [109] E. Wang, X.L. Qiang, J.H. Li, S. Zhu, P. Wang, The in Vitro Immune-Modulating Properties of a Sweat Gland-Derived Antimicrobial Peptide Dermcidin, *Shock*, 45 (2016) 28-32.
- [110] R.B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide, *J Am Chem Soc*, 85 (1963) 2149-&.
- [111] W.C. Chan, P.D. White, Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach, Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [112] S. Bräse, J. Bülle, A. Hüttermann, Organische und Bioorganische Chemie, Wiley VCH, Weinheim, 2008.
- [113] S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Bba-Proteins Proteom*, 1751 (2005) 119-139.
- [114] Y. Wu, H.W. Huang, G.A. Olah, Method of Oriented Circular-Dichroism, *Biophys J*, 57 (1990) 797-806.
- [115] F.Y. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang, Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: A case study on alamethicin, *Biophys J*, 82 (2002) 908-914.
- [116] A.S. Ulrich, Solid state (19)F NMR methods for studying biomembranes, *Prog Nucl Mag Res Sp*, 46 (2005) 1-21.
- [117] B. Zimpfer, Struktur- und Funktionsanalyse des membranaktiven bakterientoxischen Peptids TisB aus *Escherichia coli*, in: Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie, KIT - Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2015.
- [118] J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed., Springer, New York, 2006.
- [119] H. Ellens, J. Bentz, F.C. Szoka, Ph-Induced Destabilization of "Phosphatidylethanolamine-Containing Liposomes - Role of Bilayer Contact, *Biochemistry-U*s, 23 (1984) 1532-1538.
- [120] A.S. Ladokhin, W.C. Wimley, S.H. White, Leakage of membrane vesicle contents: Determination of mechanism using fluorescence reuquenching, *Biophys J*, 69 (1995) 1964-1971.
- [121] L. Stryer, Fluorescence Energy-Transfer as a Spectroscopic Ruler, *Annu Rev Biochem*, 47 (1978) 819-846.
- [122] T. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annalen der Physik*, 6 (1948) 55-75.
- [123] B.D. Adair, D.M. Engelman, Glycophorin-a Helical Transmembrane Domains Dimerize in Phospholipid-Bilayers - a Resonance Energy-Transfer Study, *Biochemistry-U*s, 33 (1994) 5539-5544.
- [124] B.H. Meyer, J.M. Segura, K.L. Martinez, R. Hovius, N. George, K. Johnsson, H. Vogel, FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells, *P Natl Acad Sci USA*, 103 (2006) 2138-2143.
- [125] K. Kawano, Y. Yano, K. Omae, S. Matsuzaki, K. Matsuzaki, Stoichiometric Analysis of Oligomerization of Membrane Proteins on Living Cells Using Coiled-Coil Labeling and Spectral Imaging, *Anal Chem*, 85 (2013) 3454-3461.
- [126] P.W. Atkins, J. De Paula, Physical chemistry, 7th ed., W.H. Freeman, New York, 2002.

9. Anhang

9.1 Theorie

9.1.1 Festphasenpeptidsynthese

Die Basis der heutigen chemischen Synthesetechniken zur Darstellung von Peptiden bildet die von Robert Bruce Merrifield 1963 veröffentlichte Methode zur Peptidsynthese an der festen Phase [110]. Hierbei werden die Peptide schrittweise, Aminosäure für Aminosäure, vom C- zum N-Terminus aufgebaut (Abb. 9.1). Die erste N-terminal geschützte Aminosäure wird dazu über ihre Carboxygruppe an einen funktionalisierten Träger (z.B. Polystyrolharz) gekuppelt. Dann wird die N-terminale Schutzgruppe der gebundenen Aminosäure abgespalten. Die nun ungeschützte endständige Aminogruppe kann an die nächste Aminosäure binden. Diese wird am C-Terminus mit Hilfe von Kupplungsreagenzien aktiviert, um dann eine Amidbindung mit dem freien N-Terminus zu bilden. Durch wiederholtes Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe und Kupplung weiterer Aminosäuren entsteht ein Peptid mit der gewünschten Aminosäuresequenz. In einem letzten Schritt werden zunächst die Seitenschutzgruppen des Peptids, und schließlich das Peptid selbst, vom polymeren Träger unter definierten Reaktionsbedingungen abgespalten. Dabei entsteht am C-Terminus je nach Art des eingesetzten Linkers entweder eine Carbonsäure oder ein Amid. Diese Synthesemethode konnte sich durchsetzen, da durch einen Überschuss an Aminosäure-Monomeren in der Reaktionslösung erstmalig sehr hohe Kupplungsausbeuten bei chemischen Peptidsynthesen erzielt werden konnten ($\geq 99\%$). Zudem ermöglicht die Immobilisierung der Reaktionsprodukte an der Festphase eine einfache Reinigung der Zwischenprodukte, da die überschüssigen Reaktanden einfach von der Trägermatrix abgespült werden können. Nach Abschluss der Synthese können die Produkte von der Festphase abgespalten und die gewünschten Peptide isoliert werden.

Die verbesserte Peptidsynthese, die Merrifield 1964 veröffentlichte, verwendet sowohl für den N-Terminus als auch für die funktionellen Seitengruppen säurelabile Schutzgruppen, auf Benzyl- oder t-Butylbasis. Die selektive Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe (Boc) erfolgt mittels TFA. Die stabileren Seitenschutzgruppen (Benzylgruppen) benötigen jedoch eine stärkere Säure zur Abspaltung und werden im letzten Schritt mit HF abgespalten. Diese Methode erzielt jedoch keine vollständige Abspaltung aller Benzylschutzgruppen. Zusätzlich führt die aggressive HF bei einigen empfindlichen Peptiden zu Degradationen. Daher wurden die stabilen Benzyl-Linker und Seitenschutzgruppen durch labilere Systeme ersetzt, die unter Säureeinfluss in höheren Ausbeuten abgespalten werden können [111].

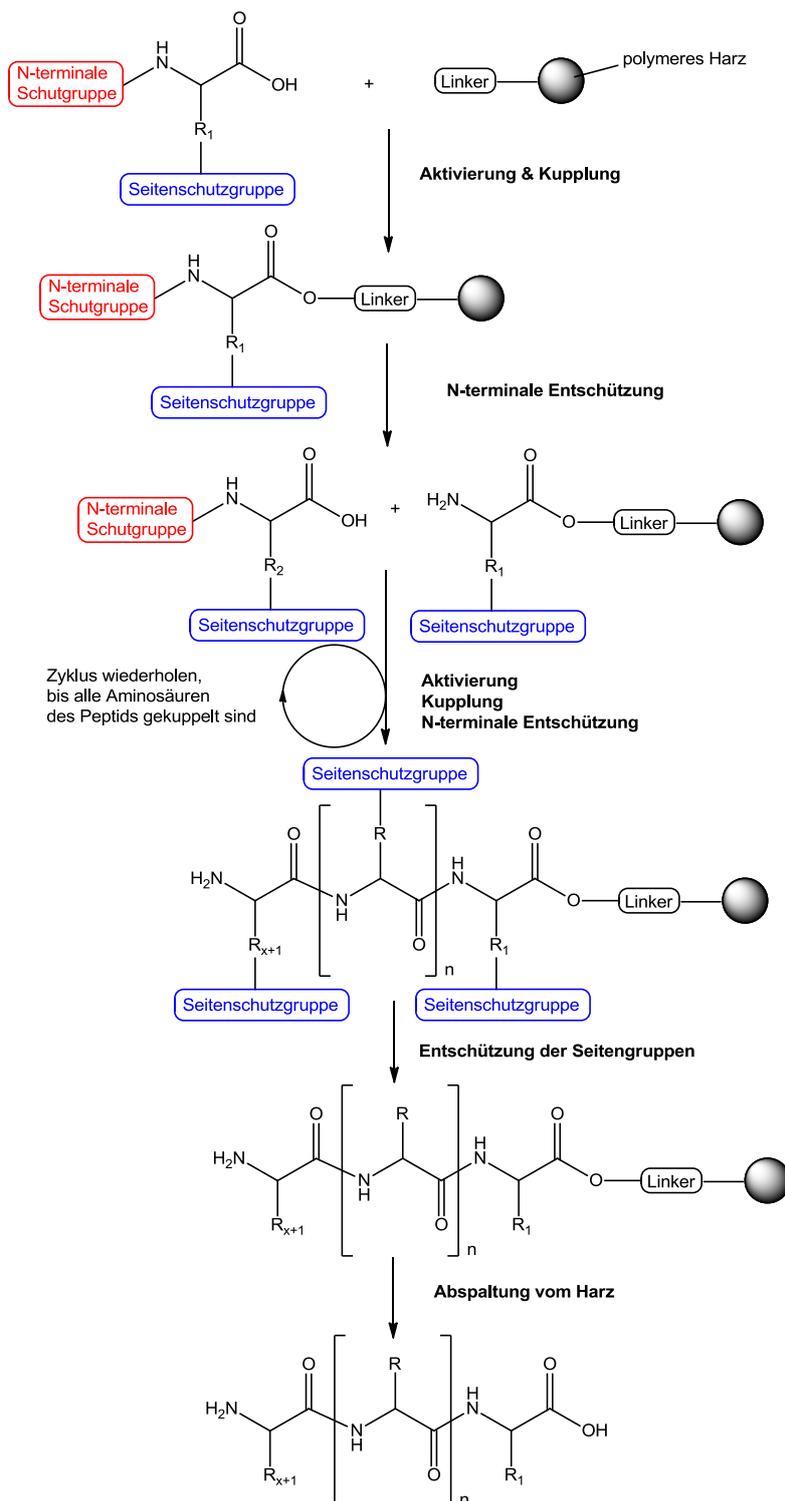


Abb. 9.1 Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield.

Als Alternative zu den säurelabilen Schutzgruppen werden für den Schutz der N-terminalen Aminogruppen heute auch basenlabile Schutzgruppen verwendet, die in Kombination mit säurelabilen Schutzgruppen für die Seitenketten milde Reaktionsbedingungen ermöglichen. Die von Carpino 1972 entwickelte 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) ist die

heute gebräuchlichste Schutzgruppe für N-terminale Aminogruppen. Die Fmoc-Schutzgruppe wird mittels Piperidin abgespalten, wodurch ein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (PDFA) entsteht (Abb. 9.2) [111].

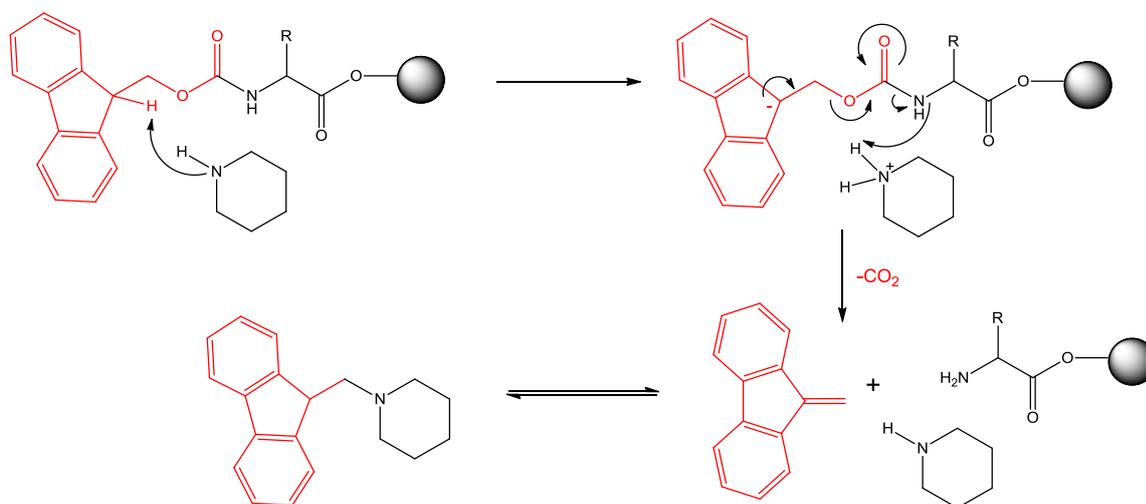


Abb. 9.2 Abspaltung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc)

Der Schutz der N-terminalen Aminogruppe mit einer basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe und der Schutz der Seitengruppen mit säurelabilen Schutzgruppen wie *t*-Butyl- oder Tritylgruppen ist ein Beispiel für das orthogonale Syntheseprinzip (Abb. 9.3). Dieses Prinzip beruht auf der Verwendung von Schutzgruppen, die durch unterschiedliche Mechanismen abgespalten werden. Heute hat die auf diesem Prinzip basierende Fmoc/*t*Bu-Synthesestrategie die klassische Merrifield-Synthese abgelöst [112].

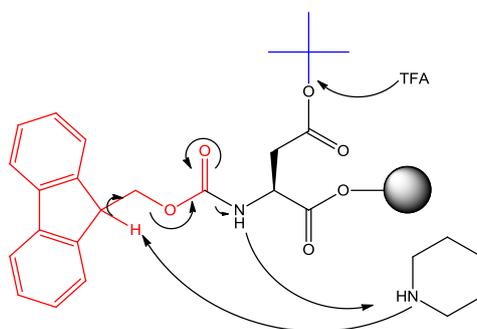


Abb. 9.3 Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen am Beispiel von L-Aspartat(OtBu); die basenlabile Fmoc-Gruppe (rot) wird durch Piperidin, die säurelabile *t*-Butylester-Gruppe (blau) wird durch TFA abgespalten.

Diese Strategie, die vergleichsweise einfach parallelisiert werden konnte, führte zur Entwicklung von automatischen Peptidsynthesizern, wie beispielsweise dem SYRO II von MultiSynTech, mit denen sich Peptide heutzutage schnell und effizient darstellen lassen.

9.1.2 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Mit Zirkulardichroismus-(CD-)Spektroskopie lassen sich die Sekundärstrukturen von Proteinen in Lösung bestimmen. Über ein Analyseverfahren, die computergestützte Dekonvolution, ist es möglich die prozentualen Sekundärstrukturen eines Proteins zu ermitteln [113].

CD-Spektroskopie nutzt linear polarisiertes Licht. Dieses entsteht durch die Überlagerung von zwei gegenläufigen, zirkular polarisierten Strahlen mit gleicher Frequenz und Phase.

Durchdringt linear polarisiertes Licht eine chirale Substanz, wirken zwei unterschiedliche physikalische Phänomene auf das Licht. Die Chiralität bewirkt eine Drehung der optischen Achse. Hierauf beruht die optische Rotationsdispersion. Zirkulardichroismus hingegen basiert auf einer unterschiedlichen Absorption der links (L) bzw. rechts (R) zirkular polarisierten Komponenten des linear polarisierten Lichts (Abb. 9.4).

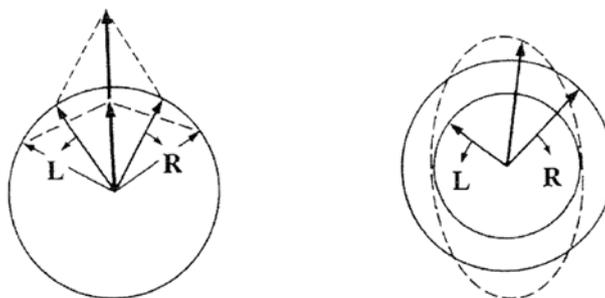


Abb. 9.4 Ursache des CD-Effekts: Die Überlagerung der unterschiedlich absorbierten polarisierten Komponenten (R und L) sorgt für eine elliptische Polarisation des Lichts (rechts). Hierbei entstehen positive Signale, wenn die links polarisierte Komponente stärker absorbiert wird und negative Signale wenn die rechts polarisierte Komponente starker absorbiert wird [113].

Die Messgröße der CD-Spektroskopie ist die Absorptionsdifferenz von links und rechts zirkular polarisiertem Licht und wird in Millidegree (mdeg) angegeben.

Damit eine chirale Probe vermessen werden kann ist ein Chromophor in der Nähe des Chiralitätszentrums nötig. Bei Proteinen sind das die Peptidbindungen des Proteinrückgrats. Die Messung erfolgt im Wellenlängenbereich zwischen 180 und 260 nm. In diesem fernen UV-Bereich werden die Bindungselektronen der Peptidbindungen angeregt. Durch die hier entstehenden $n-\pi^*$ bzw. $\pi-\pi^*$ Übergänge der Bindungselektronen werden spezifische CD-Spektren für die verschiedenen Sekundärstrukturen der Proteine erzeugt.

Um verschiedene Sekundärstrukturanteile eines Proteins zu ermitteln muss das Spektrum dekonvolviert werden. Ein Spektrum ist idealerweise stets eine Linearkombination der reinen Sekundärstrukturspektren. Diese werden bei einer Dekonvolution entsprechend ihres Anteils an der Sekundärstruktur gewichtet. Hierzu wurden verschiedene rechnerische Methoden entwickelt, die sich jedoch hauptsächlich in den verwendeten Basisspektren

unterscheiden. Zur Anfangszeit der rechnergestützten Dekonvolution wurde meist CD-Spektren von synthetischen Homopolypeptiden als Basissatz benutzt. Diese Basisspektren waren allerdings nur begrenzt praxistauglich. Neuere Methoden basieren auf Spektrensätzen von nativen Vergleichsproteinen, deren Sekundärstruktur durch Röntgenbeugung bzw. NMR-Messungen bekannt ist. Mit mathematischen Algorithmen lassen sich aus diesen Spektren die Basissätze berechnen (Abb. 9.5).

Im Vergleich zu anderen hochauflösenden Methoden, wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenbeugung, besitzt CD-Spektroskopie einen entscheidenden Nachteil. Die ermittelten Sekundärstrukturen können nicht bestimmten Bereichen des Moleküls zugeordnet werden.

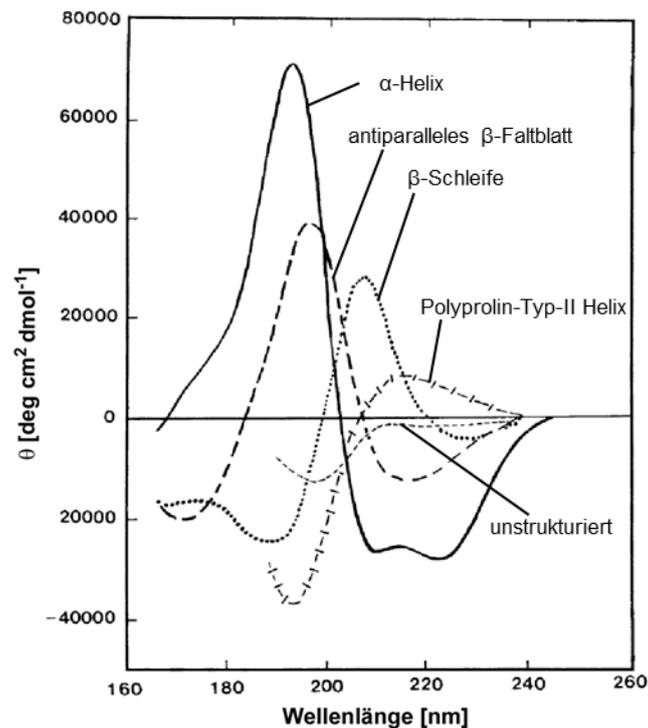


Abb. 9.5 Berechnete CD-Basisspektren der reinen Proteinstrukturen. Das ideale Spektrum einer reinen α -Helix zeigt im Bereich von 208 nm und 220 nm negative Minima und bei 190 nm ein positives Maximum [113].

9.1.3 Orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Auf der CD-Spektroskopie basierend, kann orientierte CD-Spektroskopie dazu verwendet werden um die Ausrichtung von α -helikalen Proteinen in orientierten Membranen zu bestimmen [114]. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen den Übergangsdipolmomenten der Peptidbindungen und dem zirkular polarisierten Licht. Das führt zu einer dreifachen Aufspaltung der Energieniveaus bei den π - π^* -Übergängen. Jedem Übergang kann hierbei ein bestimmtes Übergangsdipolmoment zugeordnet werden. Einer dieser Übergänge liegt parallel und die beiden anderen senkrecht zur Helixachse.

Liegt ein α -helikales Protein parallel zur Membranoberfläche, also senkrecht zum einfallenden Licht, kommt es zu einer starken Wechselwirkung zwischen dem ersten π - π^* -Übergang und dem elektrischen Feld des Lichts. In Folge dessen entsteht eine stark negative Bande bei 207 nm (Abb. 9.6). Die anderen π - π^* -Übergänge sind entartet und liefern eine stark positive Bande bei ca. 190 nm.

Weicht die Orientierung des Proteins von der parallelen Anordnung ab, werden die drei beschriebenen Wechselwirkungen zunehmend schwächer. Dadurch nimmt die Intensität der negativen Bande bei 207 nm ab, bis sie bei einer vollständig senkrechten Orientierung zur Membranoberfläche nicht mehr vorhanden ist. Die Region bei ca. 207 nm dient daher als „Fingerabdruck“ für die Orientierung eines α -helikalen Proteins in orientierten Lipidmembranen. Die quantitative Analyse von OCD-Spektren kann, analog zur CD-Spektroskopie, anhand von Referenzspektren durchgeführt werden. Da ein OCD-Spektrum nur die gemittelte Summe aus allen Orientierungen einer Probe enthält, können evtl. gleichzeitig auftretende Orientierungen der Proteine nicht unterschieden werden [115].

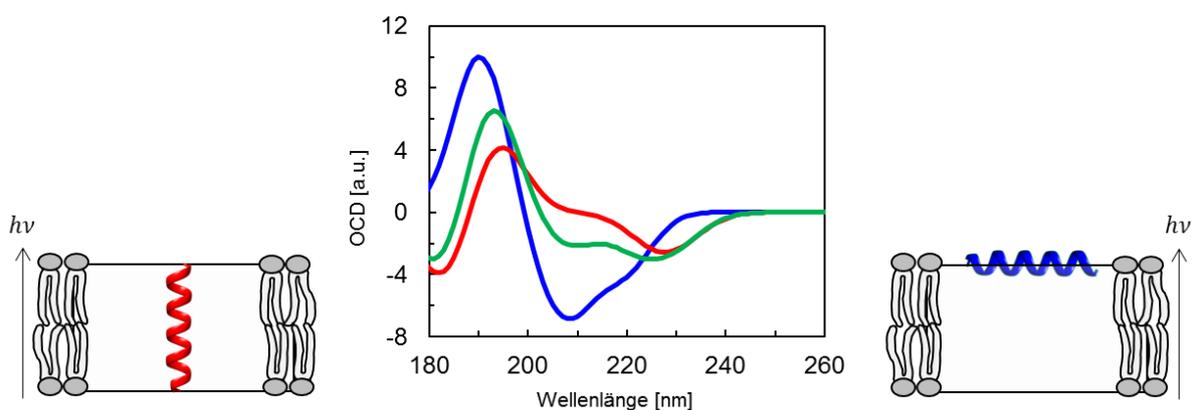


Abb. 9.6 OCD-Spektren α -helikaler Membranproteine im S-Zustand (blau), T-Zustand (grün) und I-Zustand (rot). Die Erkennungsregion liegt zwischen den beiden blauen Linien.

9.1.4 Kernspinresonanz-(NMR-)Spektroskopie

Die in Tabelle 9.1 aufgeführten Kerne haben sich für Untersuchungen an Biomolekülen bewährt und finden weit verbreiteten Einsatz. Die Empfindlichkeit dieser Kerne unterscheidet sich voneinander. ^{19}F nimmt hierbei durch sein hohes Gyromagnetisches Verhältnis, die hohe Empfindlichkeit und 100 % relativer Häufigkeit eine Sonderstellung ein und macht die es für Messungen an Biomolekülen besonders interessant. Hintergrundsignale spielen keine Rolle, das Fluor nicht in biologischen Molekülen vorkommt. Das Einfügen eine Fluor-Sonde kann jedoch die Struktur eines Peptids verändern. Soll dies von vorn heraus ausgeschlossen werden empfiehlt es sich auf Stickstoff auszuweichen, da dieser bereits in jeder Peptidbindung vorkommt. Die Empfindlichkeit des ^{15}N -Kerns ist jedoch deutlich geringer was den Einsatz größerer Peptidmengen notwendig macht.

Um die Struktur von Peptiden und Proteinen in Lipiddoppelschichten zu untersuchen hat sich die Festkörper-NMR-Spektroskopie als besonders geeignet erwiesen. Die Proben bestehen hier aus Peptiden/Proteinen in einer flüssig-kristallinen Lipidmembran. Diese Proben können on vollständig hydratisiertem Zustand unter physiologischen Bedingungen studiert werden.

Tabelle 9.1 Physikalische Eigenschaften ausgewählter Kerne [116].

Isotop	^1H	^2H	^{13}C	^{15}N	^{19}F	^{31}P
Kernspin	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
Gyromagnetisches Verhältnis	42,58	6,53	10,70	-4,31	40,03	17,23
Natürliche Häufigkeit	99,985	0,015	1,1	3,7	100	100
Relative Empfindlichkeit	100	0,96	1,59	0,10	83,3	6,63

In der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie spielen vor allem die isotrope chemische Verschiebung und die J-Kopplung eine wichtige Rolle. Bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie jedoch sind vor Allem die dipolare Kopplung und die anisotrope chemische Verschiebung von Bedeutung.

Bei der dipolaren Kopplung entstehen Wechselwirkungen der magnetischen Dipolmomente zwischen zwei in räumlicher Nähe befindlichen Kernen. Für Kerne mit Spin größer $\frac{1}{2}$ führt diese Wechselwirkung der dipolare Kopplungen im Festkörper zu einer Aufspaltung des NMR-Signals. Die dipolare Kopplungskonstante Δ_{AB} von zwei Spins A und B im Abstand r ist proportional zu r^{-3} .

$$\Delta_{AB} \sim \frac{\gamma_A \gamma_B}{r^3} \quad (9.1)$$

Die Größe dieser Aufspaltung ist also abhängig von dem Abstand r der beiden Kerne A und B voneinander (Abb. 9.7). Durch die Axialsymmetrie des dipolaren Tensors variiert die Aufspaltung Δ_{AB} mit dem Winkel θ des Vektors der Verbindungsachse der Kerne zum äußeren Magnetfeld nach:

$$\Delta_{AB}(\theta) = \Delta_{AB}^0 \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{2} \quad (9.2)$$

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

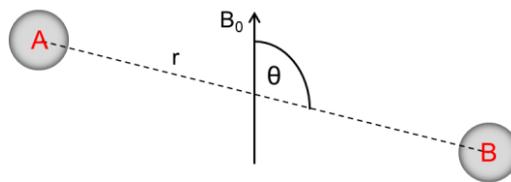


Abb. 9.7 Schema zweier Kerne A und B im Raum. Die Aufspaltung im NMR-Spektrum ist abhängig vom Abstand r und dem Winkel θ .

Die chemische Verschiebung eines Kerns hängt unter anderem von der Orientierung des gesamten Moleküls ab. Man spricht von der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA chemical shift anisotropy). Diese ist vor allem in der Festkörper-NMR von Bedeutung, da hier die Orientierungsabhängigkeit, anders als in Lösung, nicht durch schnelle Bewegung der Moleküle ausgemittelt werden kann. Mathematisch wird diese Anisotropie durch einen CSA-Tensor (3x3-Matrix) beschrieben. Dieser lässt sich als Ellipsoid mit drei Hauptachsen ($\sigma_{11}\sigma_{22}\sigma_{33}$) darstellen (Abb. 9.8 A). Hierbei ist σ_{33} das am besten abgeschirmte und σ_{11} das am geringsten abgeschirmte Tensor-Element und somit auch die höchste Resonanzfrequenz. Die zugehörigen Resonanzfrequenzen sind δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} . Der isotrope Wert der chemischen Verschiebung ergibt sich nach:

$$\delta_{iso} = \frac{\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}}{3} \quad (9.3)$$

Ein Pulverspektrum entsteht, wenn sich alle möglichen Orientierungen im Frequenzbereich Ω überlagern (Abb. 9.8 B).

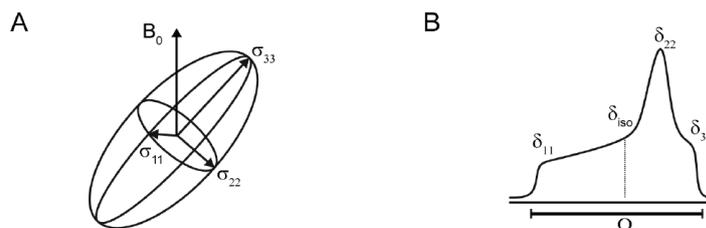


Abb. 9.8 (A) Ellipsoide Darstellung eines CSA-Tensors mit drei Hauptachsen $\sigma_{11}\sigma_{22}\sigma_{33}$. (B) Skizze eines Pulverspektrums verursacht durch die Anisotropie der chemischen Verschiebung [117].

Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie lässt sich der Grad der Orientierung der Lipiddoppelschicht in einer Probe vor (und nach) ^{15}N -Festkörper-NMR-Experimenten überprüfen. Durch ausreichend hohe Empfindlichkeit aufgrund seines natürlichen Vorkommens von 100 % eignet sich der ^{31}P -Kern gut für kurzzeitige NMR-Experimente. Er ist in allen Phospholipiden enthalten, wodurch eine Markierung nicht notwendig ist. Die chemische Verschiebung des ^{31}P -Kerns in den Phosphatgruppen in Phospholipiden ist abhängig von deren Orientierung zum äußeren Magnetfeld. Eine Tieffeldverschiebung tritt dann ein, wenn die Lipide parallel zu dem äußeren Magnetfeld ausgerichtet sind. Eine Hochfeldverschiebung tritt ein, wenn die Lipide orthogonal zu dem äußeren Magnetfeld ausgerichtet sind. Ein Pulverspektrum entsteht, wenn die Lipide nicht in einer bevorzugten Richtung ausgerichtet sind [12].

Ein häufig bei Strukturuntersuchungen an Peptiden und Proteinen eingesetzter Kern ist der ^{15}N -Kern. Ein ^{15}N -NMR-Spektrum eines selektiv isotopenmarkierten markierten Peptids erlaubt qualitative Aussagen zur Orientierung eines strukturierten Peptids. Markiert wird hier bevorzugt das Peptidrückgrad, die Struktur des Peptids wird nicht beeinträchtigt. Das σ_{33} -Element des CSA-Tensors ist hierbei etwa entlang der N-H-Bindung ausgerichtet. In α -helikalen Peptiden ist der Vektor dieser Bindung annähernd parallel zur Helixachse und somit auch der Tensor. So lässt sich aus der chemischen Verschiebung des ^{15}N -Signals qualitativ die Orientierung des Peptids bestimmen. Ein ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektrum erstreckt sich von etwa 50 bis 230 ppm (Abb. 9.9). Ein Signal bei ca. 210 ppm entsteht durch ein transmembran orientiertes und ein Signal bei ca. 70 ppm entsteht durch ein oberflächlich gebundenes α -helikales Peptid [12, 116].

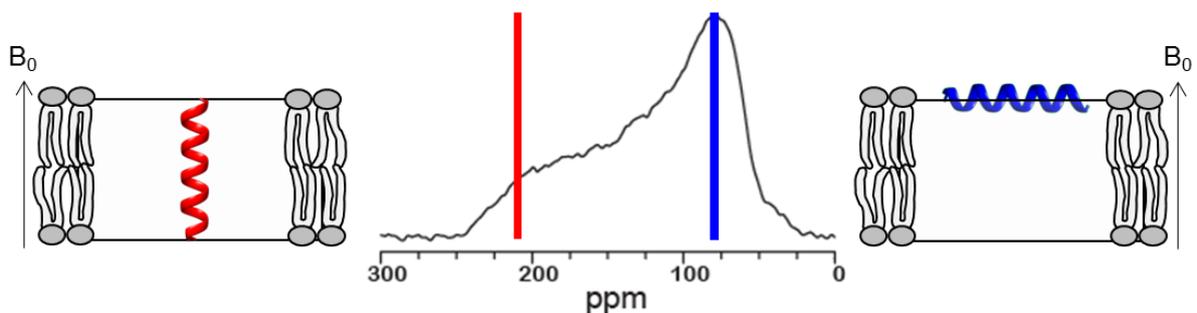


Abb. 9.9 ^{15}N -Festkörper-NMR-Pulverspektrum von SSL-25 L18. Das Spektrum erstreckt sich über einen Bereich von 250 bis 25 ppm. Ein Signal bei ca. 210 ppm zeigt eine transmembrane Orientierung, ein Signal bei ca. 70 ppm eine oberflächliche Orientierung an.

9.1.5 Fluoreszenzspektroskopie

9.1.5.1 Farbstoff Leakage

Bei dieser fluoreszenzspektroskopischen Methode wird die Fluoreszenzlöschung genutzt. Hierbei wird die Fluoreszenz eines Fluorophors durch ein anderes Molekül, den Löscher, gelöscht, solange sich beide Moleküle in räumlicher Nähe befinden, also die lokale Konzentration beider Moleküle sehr hoch ist [118].

Die Fluoreszenzlöschung erfolgt bei dem hier eingesetzten System, ANTS und DPX, statisch. Die Stern-Vollmer-Gleichung beschreibt hierbei den Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des Fluoreszenzlöschers:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} * [Q] \quad (9.4)$$

Wobei F_0 die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Löschers und F selbige in Anwesenheit beschreibt. K_{SV} ist die Konstante der Löschreaktion und $[Q]$ die Konzentration des Quenchers. Der Quencher DPX bindet stark an den Fluorophor ANTS ($K_{SV} = 490 \text{ M}^{-1}$) und bildet einen nicht-fluoreszierenden Komplex. Aus der oben aufgeführten Beziehung kann abgeschätzt werden, dass bei einer Quencherkonzentration von ca. 50 mM die Fluoreszenz fast vollständig gequencht wird (>95 %). Bei einer Beschädigung der Vesikel treten Fluorophor und Quencher aus. Je nach Verdünnung der Vesikel verringert sich die Quencherkonzentration um ca. das 1000-fache, wodurch ANTS annähernd frei fluoreszieren kann [119, 120].

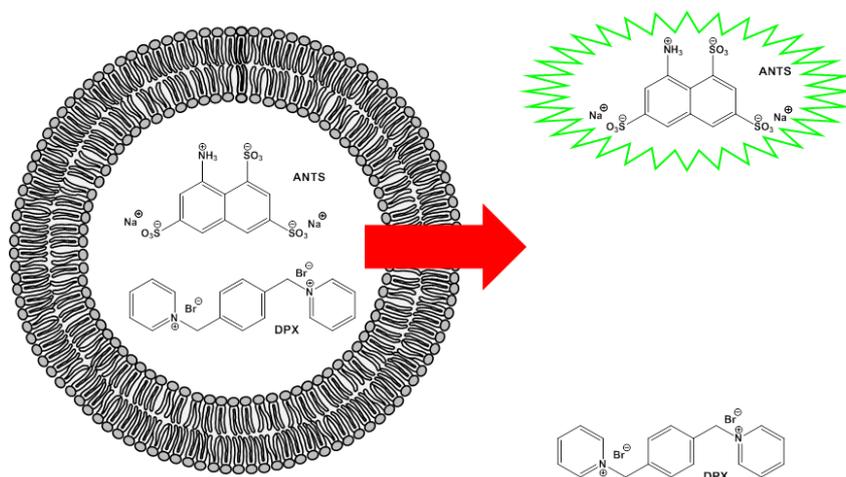


Abb. 9.10 Schematische Darstellung des ANTS/DPX-Leakage. Durch das Austreten des Fluorophors und des Quenchers vergrößert sich der Abstand drastisch, da sich der Inhalt der Vesikel um ein vielfaches verdünnt.

9.1.5.2 Förster-Resonanzenergietransfer

Unter Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) versteht man die Energieübertragung eines angeregten Fluorophors (Donor) auf einen anderen Fluorophor (Akzeptor) anstatt diese direkt zu emittieren. FRET entsteht durch elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen einem angeregten Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor. Ein Energietransfer setzt die räumliche Nähe beider Moleküle und eine Überlappung des Excitationsspektrums des Akzeptors A, mit dem Emissionsspektrum des Donors D (Em_D) voraus (Ex_A , Abb. 9.11).

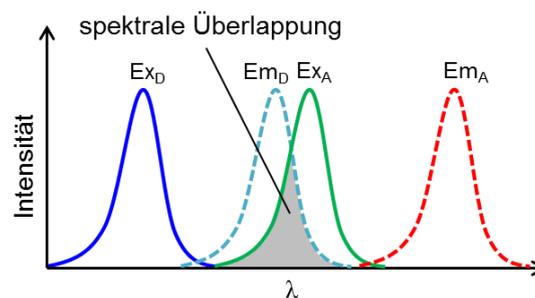


Abb. 9.11 Schematische Darstellung von Excitations- (volle Linien) und Emissionsspektren (gestrichelte Linien) eines Donor-Akzeptor Paares. Aufgrund der spektralen Überlappung kann ein Förster-Resonanzenergietransfer stattfinden.

Der Energietransfer ist hierbei von dem Förster-Radius r_0 eines Donor-Akzeptor-Paares und dem Abstand r zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Er nimmt mit der sechsten Potenz von r ab. Der Förster-Radius r_0 ist definiert als der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bei dem die Effizienz des Energietransfers 50 % beträgt. Für den Energietransfer gilt:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{r_0}\right)^6} \quad (9.5)$$

Jedes Donor-Akzeptor-Paar besitzt einen spezifischen Förster-Radius, welcher bis zu 90 Å betragen kann. Mittels FRET können also Abstände bis zu 9 nm detektiert werden [118, 121, 122]. Das in dieser Arbeit verwendete Donor-Akzeptor-Paar (FRET-Paar) war Tryptophan-Dansyl. Der Förster-Radius dieses Paares beträgt 2,1 - 2,4 nm [118]. Die immensen Vorteile dieses FRET-Paares sind die unkomplizierte Inkorporation von Tryptophan, das als proteinogene Aminosäure mittels standardisierten Syntheseverfahren in Peptide eingebracht werden kann, sollte das zu untersuchende Peptid nicht bereits über ein Trp verfügen, die recht einfache Kupplung des Dansyls und die geringe Größe beider Fluorophore. Aufgrund der geringen Größe von Trp und Dansyl sollte diese nur sehr geringen Einfluss auf die Struktur der zu untersuchenden Peptide haben.

FRET kann jedoch nicht nur zur Untersuchung räumlicher Nähe oder zur Bestimmung molekularer Abstände eingesetzt werden. Mittels FRET kann ebenfalls die Assemblierung bzw. die Oligomerisierung von Proteinen und Peptiden bestimmt werden. Die Bestimmung der Untereinheiten kann durch die Fluoreszenzlöschung des Donors (Donor-Quenching) [123] oder anhand der Akzeptor-Emission [124] erfolgen. Beim Quenchen ist die Intensität der Donor-Emission I_D bei Anwesenheit des Akzeptors verringert, die Akzeptor-Emission I_A ist bei Anwesenheit des Donors erhöht. Es gilt:

$$E_{app,dq} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (9.6)$$

$$E_{app,se} = \left(\frac{I_{AD}}{I_A} - 1 \right) * \frac{\varepsilon_A(\lambda)}{\varepsilon_A(\lambda)} \quad (9.7)$$

Zur Bestimmung der an der Oligomerisierung beteiligten Untereinheiten wird beim Quenchen des Donors die Fluoreszenzlöschung $E_{app,dq}$ als Funktion des Molenbruchs des Akzeptors χ_A aufgetragen und an die Funktion

$$E_{app,dq} = E * [1 - (1 - \chi_A)^{n-1}] \quad (9.8)$$

angepasst. E ist hier die Effizienz des Energietransfers und n die Anzahl der Untereinheiten des Oligomers. Die verstärkte Akzeptor-Emission $E_{app,se}$ wird hingegen als Funktion des Molenbruchs des Donors χ_D aufgetragen und an die folgende Funktion angepasst.

$$E_{app,se} = E * \frac{\chi_D}{1 - \chi_D} (1 - \chi_D)^{n-1} \quad (9.9)$$

Diese Funktionen sind in Abb. 9.12 in Abhängigkeit der Anzahl an Untereinheiten n im Oligomer dargestellt. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Einführung der Fluorophore in das Peptid selbst keinen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten des Peptids hat und alle Wechselwirkungen zufällig erfolgen [123, 125].

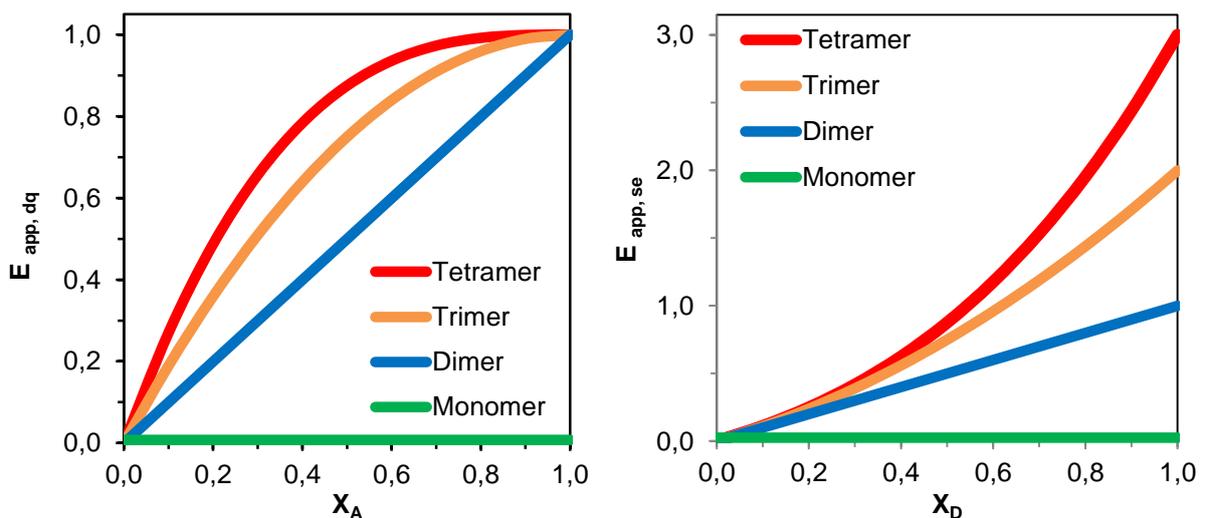


Abb. 9.12 Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung (Quenching) des Donors (links) und der verstärkten Emission des Akzeptors (rechts) in Abhängigkeit des Molenbruchs χ_A bzw. χ_D und der Anzahl an Untereinheiten im Oligomer.

9.1.5.3 Die Hill-Gleichung

Archibald Vivian Hill, britischer Physiologe und Nobelpreisträger, ist im Kontext der Kooperativität hauptsächlich für seine Arbeiten mit Hämoglobin bekannt. Die nach ihm benannte Gleichung basiert auf der Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik. Die Hill-Gleichung ermöglicht einen Zugang zum sog. Hill-Koeffizienten, welcher ein Maß für die Kooperativität bei enzymatischen Prozessen darstellt. Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Bindung eines Substrats an ein Enzym mit anschließender Produktbildung. Es handelt sich um eine Näherung, bei der eine Rückreaktion des Produktes ausgeschlossen wird, da sie den Reaktionsanfang voraussetzt. Die eigentliche Michaelis-Menten-Gleichung [126] ermöglicht die Beschreibung der Produktbildung und lautet:

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{[S] + K_m} \quad (9.10)$$

Wobei v die Geschwindigkeit, v_{max} die Maximalgeschwindigkeit, $[S]$ die Substratkonzentration und K_m die Michaelis-Menten-Konstante ist. Sie ist der Hill-Gleichung [98] sehr ähnlich. Diese lautet:

$$v = \frac{v_{max} * [S]^n}{[S]^n + K_{0,5}^n} \quad (9.11)$$

Wobei n der Hill-Koeffizient und $K_{0,5}$ eine Konstante ist. $K_{0,5}$ definiert auch den Wert der Substratkonzentration, bei dem $v = 0,5 v_{max}$ ist. Für $n = 1$ wird die Hill-Gleichung zur Michaelis-Menten-Gleichung. Die Gleichung bezeichnete A. V. Hill als rein empirisch. Es ist nicht korrekt den Hill-Koeffizienten als Näherung der Bindungsstellen eines Systems zu betrachten, in einigen Fällen gibt er jedoch den unteren Grenzwert für die Anzahl an Bindungsstellen an. Der Hill Koeffizient kann verschiedene, positive Werte annehmen, deren Bedeutung in Tab. 9.2 dargestellt ist.

Tab. 9.2 Typische Werte des Hill-Koeffizienten n und deren Bedeutung für die Kooperativität [98].

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

9.2 Materialien und Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien von den folgenden Firmen verwendet.

9.2.1 Gerätschaften und Verbrauchsmaterial

Tab. 9.3a Gerätschaften und verwendetes Verbrauchsmaterial (A-K)

Gerätschaft	Verwendung	Hersteller
Autoklav VX-65	Sterilisation von Laborgeräten	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Inkubation von Bakterienkulturen	Binder, Tuttlingen
CD-Messküvette (Suprasil QS 0,1 cm)	Messgefäß für CD-Proben	Hellma Optik, Mülheim
CD-Spektropolarimeter J-815	Durchführung von CD-Experimenten	Jasco Industries, Japan
Einmalhandschuhe Touch N'Tuff (Nitril)	Eigenschutz bei Umgang mit Chemikalien	Ansell, München
Feinwaage ME 5	Abwiegen von Lipiden und Peptiden	Satorius, Göttingen
Fluorolog 3	Fluoreszenzexperimente	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Bensheim
FluoroMax-2	Fluoreszenzexperimente	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Bensheim
Frischhaltefolie	Umwickeln der NMR-Proben	Aldi Süd, Mülheim an der Ruhr
Gefrierschrank (-20 °C)	Lagerung von temperaturempfindlichen Chemikalien	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (Herafreeze , -80 °C)	Lagerung von temperaturempfindlichen Chemikalien	Heraeus Instruments, Hanau
Glassplättchen (15 mm x 7,5 mm)	Träger der NMR-Proben	Marienzfeld GmbH, Lauda-Königshofen
HPLC	Aufreinigung der Peptide	Jasco Industries, Japan
HPLC-Säule C18 (analytisch)	Bestimmung der Hydrophobizität der Peptide	The Nest Group Inc., USA
HPLC-Säule Vydac C18 (semipräparativ)	Aufreinigung der ¹⁹ F-markierten SSL-25-Analoga	The Nest Group Inc., USA
HPLC-Säule Vydac C18 (präparativ)	Aufreinigung von SSL-25 wt	The Nest Group Inc., USA
Hydratationsgefäß	Hydratation der NMR-Proben	Lock & Lock, Solingen
Hydratationsofen Heraeus	Hydratation der NMR-Proben	Kendro, Hanau
Inkubator 1000 mit Unimax 1010	Inkubation von Bakterienkulturen	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlschrank	Lagerung von temperaturempfindlichen Chemikalien	Liebherr, Ochsenhausen
Küvetten (Acryl, 1cm)	Messung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 9.3b Gerätschaften und verwendetes Verbrauchsmaterial (L-Z)

Gerätschaft	Verwendung	Hersteller
Labortücher Kimtech Science	Beseitigung von Verunreinigungen	Kimberly-Clark, USA
Lyophilisator Alpha 1-4 LSC	Gefriertrocknung der Peptide	Christ, Osterode am Harz
Lyophilisator Alpha 2-4 LD	Gefriertrocknung der Peptide	Christ, Osterode am Harz
Massenspektrometer LC-MS (mit HPLC) und ESI-TOF	Identifizierung der Peptide	Agilent Technologies, Waldbronn (LC/MS) und Bruker, Rheinstetten (ESI-TOF)
Mikroliterspritze (50 µL)	Aufbringen der NMR-Proben auf Glasplättchen	Hamilton, Schweiz
Mikroskop Axioskop 40	Kontrolle der Bakterienkulturen	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Mikrotiterplatten	MHK-Test, Atmungstest	Thermo Scientific, USA
Ministat cc Thermostat	Temperaturkontrolle der Fluoreszenzexperimente	Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
NMR-Spektrometer Avance 500 MHz	Messung von NMR-Spektren	Bruker, Rheinstetten
OCD-Spektropolarimeter J-810	Messen von OCD-Spektren	Jasco Industries, Japan
OCD-Quarzglas-Plättchen 20 mm Suprasil QS	Träger für OCD-Proben	Hellma Optik, Jena
Parafilm	Abdichten von Gefäßen und Umwickeln von NMR-Proben	Pechiney plastic packaging, USA
Peptidsynthesizer Syro II	Automatisierte Peptidsynthese	Biotage, Schweden
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Flusselfreies Abwischen von Gerätschaften	Kimberly-Clark, USA
Reaktionsgefäß 0,5 mL, 1,5mL und 2,0 mL	Gefäße für Lösungen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (0,5 mL, protein low-bind)	Peptide lösen für NMR-Proben	Eppendorf, Hamburg
Reinraumbank Hera _{safe}	Ermöglicht steriles Arbeiten mit Bakterien	Thermo Scientific, USA
SmartSpec™ Plus Spektrophotometer	Messung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	BioRad, München
Ultraschallbad Sonorex Digital 10P	Auftauen von Vesikelproben	BANDELIN electronic, Berlin
Ultraschallbad Ultrasonic-Cleaner	Reinigung der Deckgläser	VWR, Belgien
Ultraschallprozessor UTR200	Erzeugung von MUVs	Hielscher Ultrasound Technologies, Teltow
Vortex Genie 2T	Durchmischen von Lösungen	Si Scientific Industries, USA
Zentrifuge 2-6	zentrifugieren	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Zentrifuge 3-18K	zentrifugieren	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Zentrifuge 5415R	zentrifugieren	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge MiniSpin	zentrifugieren	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäß 15 mL, 50mL	Gefäße für Lösungen	Sarstedt, Nümbrecht

9.2.2 Chemikalien

In Tab. 9.2 sind die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller aufgeführt.

Tab. 9.4 Lipide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, und deren Hersteller.

Lipid	Hersteller
DErPC	NOF corporation, Tokyo, Japan
DErPG	NOF corporation, Tokyo, Japan
DMPC	NOF corporation, Tokyo, Japan
DMPG	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
DNPC	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
DOPC	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
DOPG	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
E. coli polar lipid extract	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
POPC	NOF corporation, Tokyo, Japan
POPG	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
OPC	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA

Tab. 9.5 Aminosäuren, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, und deren Hersteller.

Lipid	Hersteller
Fmoc-Aca-OH	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Alanin	Merck Millipore, Billerica, USA
Fmoc-Aspartat (OBut)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Glutamat (OBut)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Glutamin (Trt)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Glycin	Merck Millipore, Billerica, USA
Fmoc-Histidin (Trt)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Leucin	Merck Millipore, Billerica, USA
Fmoc-Lysin (Boc)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Lysin (Dde)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Serin (But)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Tryptophan (Boc)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Fmoc-Valin	Merck Millipore, Billerica, USA

Tab. 9.6 Fluorophore, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, und deren Hersteller.

Lipid	Hersteller
5(6)Carboxyfluorescein	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dansylchlorid	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
NBD-Cl	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Rhodamin B	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tab. 9.7 Weitere Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, und deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Agar-Agar	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
α_1 -Antitrypsin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ANTS	Invitrogen, Eugene, USA
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Chloroform	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Chymotrypsin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
2,4,6-Collidin	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
DIC	Iris Biotech GmbH, Marktrechwitz, Deutschland
Dichlormethan	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
Diethylether	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
1,4-Dioxan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DIPEA	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
DMF	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DPA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DPX	Invitrogen, Eugene, USA
Essigsäureanhydrid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäureethylester	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
1,2-Ethandithiol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fmoc-Cl	Iris Biotech GmbH, Marktrechwitz, Deutschland
D-(+)-Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HATU	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HBTU	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
HCl, 1M	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
H ₂ O	Millipore Reinstwasseranlage, Merck Millipore, Billerica, USA
HOAt	GenScript, Piscataway, USA
HOBt	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
K ₂ SO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ SO ₄	VWR, Radnor, USA
MES	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Molekularsieb 3A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mueller-Hinton Broth	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
NaCl	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
NaCl (biochem. grade)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
NaF	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
NaOH, 1M	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NMP	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
Phenol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Piperidin	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
PIPES	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PIPES Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Saccharose	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
SDS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sephacryl® 100-HR	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sephacryl® 500-HR	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TbCl ₃ Hexahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TFA	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande
TFE	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TFFH	Merck Millipore, Billerica, USA
Thioanisol	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
TIS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS(-hydroxymethyl)-aminomethan	VWR, Radnor, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ZnSO ₄	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

9.3 HPLC-Gradienten und Ausbeuten der Peptidsynthese

Tab. 9.8 HPLC-Gradienten, Molmassen der Peptide und Ausbeuten in mg und % aller in dieser Arbeit verwendeten Dermcidin-Peptide.

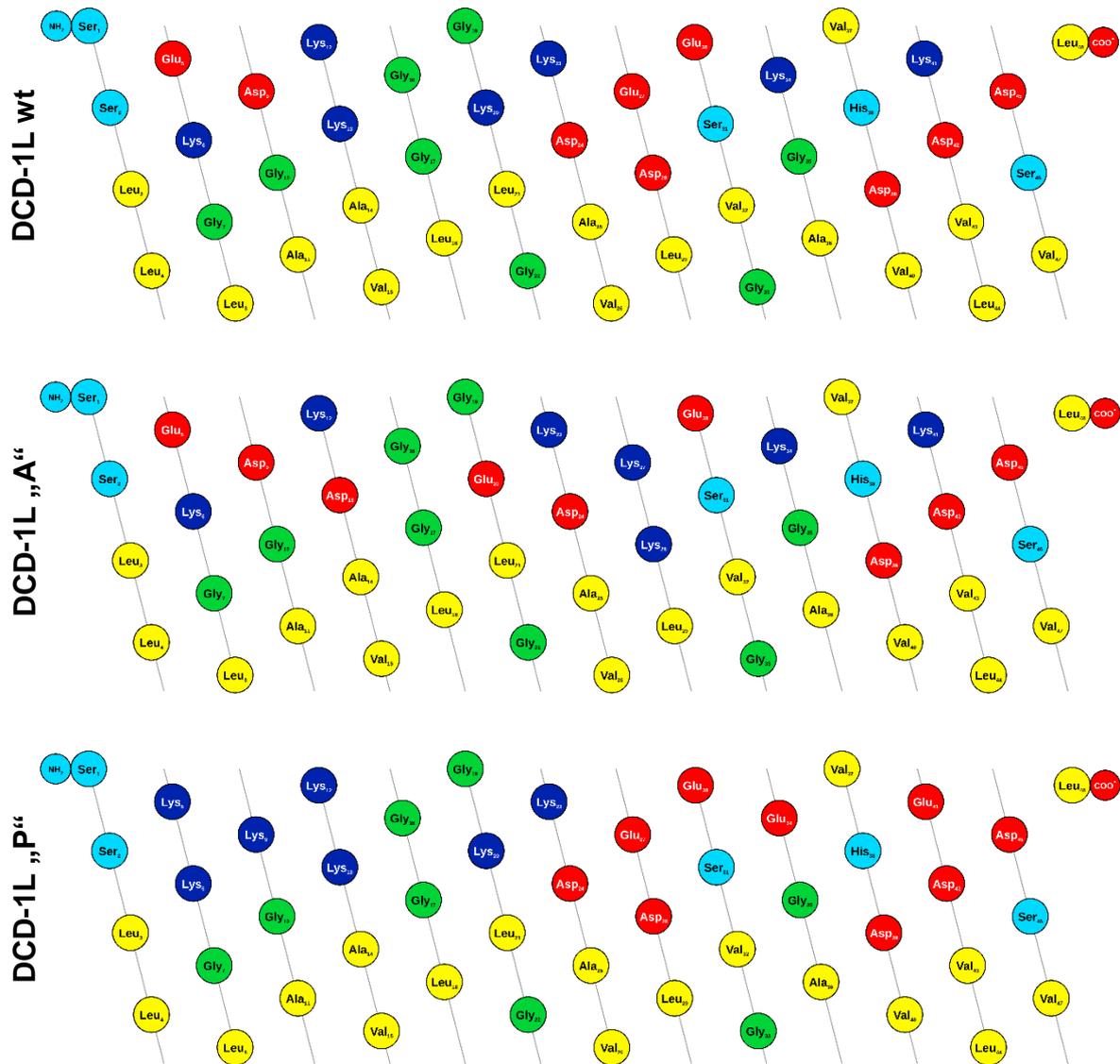
Peptid	HPLC-Gradient	M _w / g/mol	Ausbeute / mg	Ausbeute / %
SSL-25	10-25% B	2412,8	88,0	36,5
DCD-1	25-42% B	4705,3	11,3	4,8
DCD-1 K6Ac	20-50% B	4733,3	9,2	3,9
DCD-1L	25-42% B	4818,5	28,0	11,6
DCD-1L via dmbGly	25-50% B	4818,5	24,0	10,0
DCD-1L D9E	25-50% B	4832,5	22,9	9,5
DCD-1L „A“	25-42% B	4818,5	12,3	5,1
DCD-1L „P“	25-50% B	4832,5	12,7	5,3
DCD-1L allK	25-42% B	4894,1	23,8	9,7
DCD-1L ¹⁵ N-L8	25-42% B	4819,5	12,7	5,3
DCD-1L ¹⁵ N-L29	25-42% B	4819,5	14,6	6,0
DCD-1L ¹⁵ N-V40	25-42% B	4819,5	13,0	5,4
NBD-SSL-25	10-30% B	2575,9	50,8	19,6
NBD-DCD-1L	20-50% B	4981,6	20,5	8,2
W-DCD-1L	30-45% B	5004,7	26,7	10,7
DCD-1WL	30-45% B	5004,7	24,5	9,8
Dansyl-DCD-1L	40-55% B	5051,8	17,0	6,7
Dansyl-DCD-1WL	40-50% B	5238,0	13,0	5,0
SSL-24-GQF-Aca-A	15-30% B	2946,5	3,4	2,3
DCD-1-GQF-Aca-L	30-50% B	5352,2	10,2	3,8
DCD-1-GQF-Aca-L „A“	30-50% B	5352,2	3,8	1,4
DCD-1-GQF-Aca-L „C“	30-45% B	5352,2	3,2	1,2
DCD-1-GQF-Aca-L „P“	30-60% B	5366,2	5,1	1,9
DCD-1-GQF-Aca-L H38A	30-50% B	5286,2	7,4	2,8
DCD-1-GQF-Aca-L „P2“	10-35% B	5352,2	8,6	3,2
DCD-1-GQF-Aca-L „P3“	10-35% B	5352,2	9,5	3,5
Rh-SSL-25	20-60% B	2837,3	43,3	15,3
Rh-SSL-25-Lifeact	30-50% B	4743,5	8,8	3,7
Rh-Lifeact	30-70% B	2348,7	7,2	3,0
Rh-DCD-1L	10-70% B	5243,0	13,6	5,2
Rh-VED-23	25-42% B	2712,2	12,2	4,5
Rh-DCD-1L „A“	35-60% B	5243,0	13,0	5,0
Rh-DCD-1L „P“	40-65% B	5257,0	6,8	2,6
Rh-DCD-1L „C“	35-60% B	5243,0	5,4	2,1
CF-SSL-25	25-40% B	2771,1	58,2	21,0
CF-DCD-1L	10-70% B	5176,8	15,8	6,1

9.4 Verteilungskoeffizienten der NBD-Bindung

Tab. 9.9 Berechnete Verteilungskoeffizienten aus den Anpassungen der Bindungsisothermen. Salzpuffer (Na) bedeutet 150 mM NaCl, Saccharosepuffer (Sa) bedeutet 300 mM Saccharose in den Proben.

Peptid	Lipid(e)	Puffer	Zn ²⁺	Kp
DCD-1L	POPC	Na	-	48 ± 8
DCD-1L	POPC	Na	1000 µM	235 ± 11
DCD-1L	POPC	Sa	-	86 ± 5
DCD-1L	POPC	Sa	1000 µM	149 ± 8
DCD-1L	POPC/POPG 7:3	Na	-	213 ± 9
DCD-1L	POPC/POPG 7:3	Na	1000 µM	4790 ± 480
DCD-1L	POPC/POPG 7:3	Sa	-	1210 ± 69
DCD-1L	POPC/POPG 7:3	Sa	10 µM	1650 ± 168
DCD-1L	POPC/POPG 7:3	Sa	100 µM	7250 ± 655
DCD-1L	POPC/POPG 7:3	Sa	1000 µM	30500 ± 2080
DCD-1L	POPC/POPG 3:1	Sa	-	364 ± 45
DCD-1L	POPC/POPG 3:1	Sa	10 µM	1370 ± 122
DCD-1L	POPC/POPG 3:1	Sa	100 µM	4600 ± 356
DCD-1L	POPC/POPG 3:1	Sa	1000 µM	14400 ± 641
DCD-1L	POPC/POPG 1:1	Sa	-	2850 ± 166
DCD-1L	POPC/POPG 1:1	Sa	10 µM	12900 ± 453
DCD-1L	POPC/POPG 1:1	Sa	100 µM	41200 ± 3990
DCD-1L	POPC/POPG 1:1	Sa	1000 µM	83900 ± 4380
DCD-1L	POPC/POPG 1:3	Sa	-	8680 ± 572
DCD-1L	POPC/POPG 1:3	Sa	10 µM	26000 ± 1980
DCD-1L	POPC/POPG 1:3	Sa	100 µM	149000 ± 19600
DCD-1L	POPC/POPG 1:3	Sa	1000 µM	203000 ± 12600
SSL-25	POPC/POPG 3:1	Sa	-	1960 ± 144
SSL-25	POPC/POPG 3:1	Sa	100 µM	843 ± 62
SSL-25	POPC/POPG 1:3	Sa	-	52200 ± 2300
SSL-25	POPC/POPG 1:3	Sa	100 µM	124000 ± 9260

9.5 Helikale-Netz-Darstellungen wichtiger DCD-1L Analoga



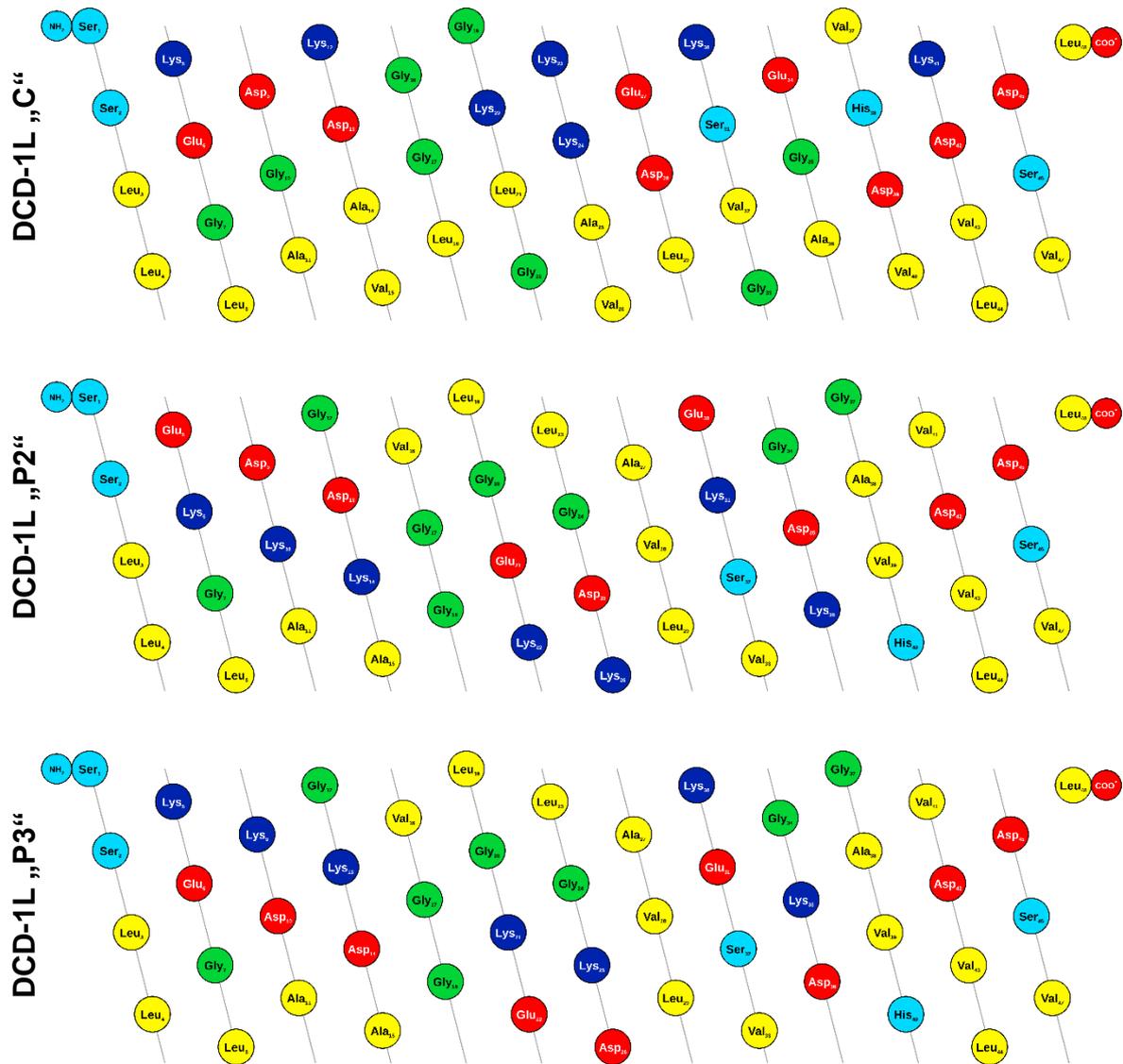


Abb. 9.14 Helikale-Netz-Darstellung von den DCD-1L-Analoga mit intaktem gestörtem Ladungsreißverschluss-Motiv, DCD-1L „C“, DCD-1L „P2“ und DCD-1L „P3“. Die Abbildungen wurden mittels „Protein ORIGAMI“ erstellt [41].