

Strukturelle Untersuchungen zum
Wirkmechanismus von DCD-1L,
einem anionischen antimikrobiellen Peptid

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Maren Paulmann

aus Dresden

Tübingen

2013

Tag der mündlichen Qualifikation: 30.04.2014

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Birgit Schittek

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Peschel

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Paulmann, M., Arnold, T., Linke, D., Özdirekcan, S., Kopp, A., Gutschmann, T., Kalbacher, H., Wanke, I., Schuenemann, V.J., Habeck, M., Bürck, J., Ulrich, A. S. and Schitteck, B.: 2012, Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-IL, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat, *J Biol Chem* **287**(11), 8434-43.

Danksagung

Ein besonders großer Dank geht an Frau Prof. Dr. Birgit Schittek für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die zahlreichen und hilfreichen Hinweise und Ratschläge sowie für die Unterstützung beim Erstellen der Publikationen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Peschel möchte ich für die unkomplizierte Übernahme meiner Doktorarbeit als Berichterstatter danken.

Für die Bereitstellung der Peptide, die Möglichkeiten seine Anlagen für Versuche zu nutzen sowie für anregende Diskussionen möchte ich Herrn Dr. Hubert Kalbacher ganz herzlich danken.

Für die Möglichkeit, Versuche am MPI Tübingen durchführen zu können, danke ich Dirk Linke. Verena danke ich für die Einarbeitung in die CD-Spektroskopie. Bei Thomas möchte ich mich für die Einarbeitung in die Liposomenherstellung und in die Leitfähigkeitsmessungen bedanken. Dirk und Thomas haben mich mit vielen hilfreichen theoretischen und praktischen Ratschlägen unterstützt.

Imke Wiedemann am Institut für medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn danke ich für die freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Messungen zum K^+ -Ausstrom.

Des Weiteren danke ich allen Kooperationspartnern ohne deren Hilfe einige Experimente nicht möglich gewesen wären:

Herrn Prof. Dr. Thomas Gutschmann und Frau Annika Kopp vom Forschungszentrum Borstel

Herrn Dr. Suat Özdirekcan vom MPI Tübingen

Frau Prof. Dr. Anne Ulrich und Herrn Dr. Jochen Bürck vom KIT

Frau Dr. Tanja Schneider und Frau Daniela Münch von der Universität Bonn

An die Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Schittek und Meier geht ein herzliches Dankeschön für das sehr angenehme Arbeitsklima, für die Diskussionsbereitschaft und die gegenseitige Hilfe bei methodischen Fragestellungen. Vor allem die gemeinschaftlichen Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeit haben mir eine tolle Abwechslung beschert. Insbesondere bei Ilknur möchte ich mich bedanken. Sie hat mich in das Thema und die Methoden eingearbeitet und um es mit ihren Worten zu sagen - „*for walking with me along the Dermcidin-way*“.

Insbesondere meiner Familie und Daniel möchte ich vom ganzen Herzen danken. Sie haben mir stets den notwendigen Rückhalt gegeben und mich bei all meinen Entscheidungen unterstützt.

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie
AMP	antimikrobielles Peptid/antimikrobielle Peptide
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
BS ³	Bis(sulfonsuccinimidyl)suberat
CD-Spektroskopie	Cirkulardichroismus-Spektroskopie
CFU	<i>colony-forming-unit</i>
CL	Cardiolipin
DDM	Dodecyl- β -maltosid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol
DOSY-NMR	<i>diffusion ordered spectroscopy - nuclear magnetic resonance</i>
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DSS	Disuccinimidylsuberat
Em	Emission
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Ex	Anregung
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GLnNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
KbE	Kolonie-bildende Einheit
LB	<i>Luria Bertani</i>
LDAO	Lauryldimethylamin-oxid
LPG	Lysylphosphatidylglycerol
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethanolsulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NHS-Ester	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidester
OCD	orientierte Circular dichroismus-Spektroskopie
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P/L	Peptid-zu-Lipid-Verhältnis
PA	Phosphatidsäure

PBS-T	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
POPC	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
POPE	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
POPG	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol
PS	Phosphatidylserin
RP-HPLC	<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SM	Sphingomyelin
TA	Teichonsäuren
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
UDP	Uridinphosphat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden	1
1.2	Antimikrobielle Peptide und Biomembranen	2
1.3	Eigenschaften von AMPs und deren Einfluss auf die Aktivität	5
1.4	Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden	10
1.4.1	Membranpermeabilisierung	10
1.4.2	Interaktion mit der Membran über einen Rezeptor	12
1.4.3	Intrazelluläre Wirkung	12
1.4.4	<i>Nutritional Immunity</i>	13
1.5	Resistenzmechanismen	13
1.5.1	Extrazelluläre Moleküle und Proteasen	14
1.5.2	Modifikation der Zelloberfläche und/oder der bakteriellen Zellmembran	14
1.5.3	Transporter	15
1.6	Das humane antimikrobielle Peptid DCD-1L	15
1.7	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikaliennachweis	19
2.2	Geräte	19
2.3	Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen	20
2.4	Phospholipide	21
2.5	Antikörper	22
2.6	Synthetische Peptide	22
2.7	Peptidsynthese	22
2.8	Analytische und präparative Umkehrphasen-Chromatographie	23
2.9	Massenspektrometrie	23
2.10	Antimikrobieller Test	23
2.11	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen/Peptiden	24
2.11.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.11.2	<i>Clear native</i> PAGE	25
2.12	Western Blotting	26
2.12.1	Proteintransfer	26
2.12.2	Immundetektion	26
2.13	Größenausschlusschromatographie	27
2.14	Herstellung von Liposomen	28

2.15	<i>Cross-Linking</i>	28
2.15.1	<i>Cross-Linker</i> DSS	29
2.15.2	<i>Cross-Linker</i> BS ³	29
2.15.3	Durchführung des <i>Cross-Linking</i> -Versuches	29
2.16	CD-Spektroskopie	30
2.16.1	CD-Spektroskopie mit Detergenzien	31
2.16.2	CD-Spektroskopie mit Liposomen	31
2.16.3	CD-Spektroskopie mit TFE	32
2.17	Orientierte CD-Spektroskopie	32
2.18	Leitfähigkeitsmessung am Bilayer	33
2.18.1	Einzelkanalmessungen	34
2.18.2	Statistik	35
2.18.3	Messung der Ionenselektivität	35
2.18.4	Messung der pH-Abhängigkeit	35
2.19	DOSY-NMR	35
2.20	Rasterkraftmikroskopie	36
2.20.1	AFM mit Bakterien	36
2.20.2	AFM mit Liposomen	37
2.21	Bestimmung der Ionenselektivität	37
2.21.1	H ⁺ -Indikator Pyranin	37
2.21.2	Herstellung der mit Pyranin gefüllten Liposomen	38
2.21.3	Messung des H ⁺ -Austauschs	39
2.22	Messung des Kaliumausstroms	40
2.22.1	Kalibrierung der Elektroden	40
2.22.2	K ⁺ -Ausstrom aus Bakterien	40
2.23	Einfluss von Dermcidin auf die Zellwandbiosynthese	41
2.23.1	<i>In vitro</i> Synthese und Reinigung von Lipid II	41
2.23.2	Inhibierung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II <i>in vitro</i>	42
2.23.3	Dünnschichtchromatographie	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Strukturelle Untersuchungen von DCD-1L	43
3.1.1	Strukturvorhersage	43
3.1.2	Einfluss von Detergenzien auf die Sekundärstruktur	44
3.1.3	Einfluss von TFE auf die Sekundärstruktur	45
3.1.4	Einfluss von artifiziellen Liposomen auf die Sekundärstruktur	46
3.1.5	Intramolekulare Wechselwirkungen von DCD-1L	47

3.2	Antimikrobielle Aktivität des Peptids DCD-1L	48
3.2.1	Einfluss der oligomeren Struktur	48
3.2.2	Einfluss von Ionen	49
3.3	Bestimmung der Orientierung von DCD-1L mittels Lipidsystemen	52
3.3.1	<i>Cross-Linking</i> an Liposomen	52
3.3.2	Orientierte CD-Spektroskopie an Bilayern	54
3.4	Bildung von Ionenkanälen in Lipidbilayern	55
3.4.1	Ionenselektivität	57
3.4.2	pH-Abhängigkeit	59
3.5	Bestimmung der Ionenselektivität mittels Liposomen	60
3.6	Effekte von DCD-1L auf bakterielle Membranen	62
3.6.1	Messung des K ⁺ -Ausstroms zur Bestimmung der Membranschädigung durch DCD-1L	63
3.6.2	Einfluss von DCD-1L auf die Zellwandbiosynthese	65
4	Diskussion	67
4.1	Interaktion mit der bakteriellen Membran	67
4.2	Strukturelle Parameter und deren Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität	69
4.2.1	Konformation	69
4.2.2	Amphiphilie	70
4.2.3	Hydrophobizität	71
4.2.4	Orientierung des Peptids zur Membrannormalen	71
4.2.5	Oligomere Strukturen und Leitfähigkeit	72
4.3	Modell zur antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L	74
4.4	Ausblick	75
5	Zusammenfassung	77
6	Literatur	78

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden

Am Anfang stand der Zufall. Im Jahre 1928 entdeckte Sir Alexander Fleming (1881 - 1955), der in einem britischen Krankenhaus als Bakteriologe arbeitete, eine Substanz, die Bakterien im Wachstum hemmte. Bei seinen Experimenten mit Staphylokokken wurde eine der Petrischalen mit dem Schimmelpilz der Gattung *Penicillium* kontaminiert. Nach kurzer Zeit beobachtete Sir A. Fleming, dass Kolonien transparent wurden und lysierten. Bei weiteren Experimenten fand er heraus, dass der Pilz verschiedene pathogene Bakterien, insbesondere eitererregende Bakterien, im Wachstum inhibierte. Die entdeckte Substanz bezeichnete er als „Penicillin“ [44]. Diese Entdeckung war für die Bekämpfung von bakteriellen Infektionen wie Scharlach, Lungen- und Hirnhautentzündung von großer Bedeutung. Allerdings war zum damaligen Zeitpunkt die Isolierung des Penicillins schwierig, so dass der erste Einsatz am Menschen erst im Jahre 1941 erfolgte. Für die Entdeckung des Antibiotikums und dessen Isolierung für die Anwendung erhielten Sir A. Fleming, Sir H. W. Florey und E. B. Chain 1945 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Mit der Entdeckung des Penicillins war der Grundstein für die Antibiotikaforschung gelegt, in deren Verlauf viele weitere Substanzen mit antibiotischer Wirkung identifiziert und einige von ihnen als Medikament eingesetzt wurden. Antibiotika werden in verschiedene Substanzklassen (z.B. β -Lactame, Glykopeptide, Sulfonamide und Chinolone), nach Wirksamkeit oder nach Wirkmechanismus eingeteilt. Gemeinsam haben die Antibiotika, dass sie lebensnotwendige Stoffwechselprozesse von Mikroorganismen inhibieren. Zielstrukturen sind entweder die Zellwandbiosynthese (Penicillin), die zytoplasmatische Membran (Polymyxin), die Nukleinsäurebiosynthese (Quinolone), die Proteinbiosynthese (Tetracyclin) oder der Folsäure-Metabolismus (Sulfonamide) [116].

Anfangs zeigte die Therapie mit Antibiotika große Wirkung: die Säuglings- und Kindersterblichkeit sank, Krankheiten, die früher eine hohe Sterblichkeitsrate mit sich brachten, konnten behandelt werden. Zum Beispiel reduzierte der Einsatz von Sulfanilamid die Sterblichkeitsrate bei akuter Meningokokken-Meningitis von 70-90% auf 10% [144]. Trotz aller Vorteile, welche die Antibiotika mit sich brachten, führten sie schon kurz nach ihrem ersten Einsatz zu einem Problem: viele Mikroorganismen entwickelten gegen die eingesetzten Substanzen Resistenzen. Neben den biologischen Ursachen wie Mutationen, Gentransfer oder das Vorhandensein eines Resistenzmechanismus, spielen vor allem der übermäßige und fehlerhafte Gebrauch von Antibiotika (z.B. in Futtermittel für Nutztiere) eine entscheidende Rolle [28, 118, 121]. Beispielsweise werden ein Großteil der heutigen Krankenhausinfektionen durch „Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*“-Stämme (MRSA) verursacht. Erstmals traten diese vor 60 Jahren in England auf und spielen heute weltweit eine große Rolle

[118, 158]. So stieg die Anzahl der resistenten *S. aureus* Isolate in amerikanischen Krankenhäusern in einem Zeitraum von 1992-2003 von 35,9% auf 64,4% [89]. In Deutschland lag der Anteil der MRSA-Isolate im Jahre 1991 bei 1,1% und stieg auf 20,3% im Jahre 2007 und hält sich seitdem auf diesem Niveau [91].

Für die Zukunft muss ein verantwortungsvoller und effektiver Gebrauch der traditionellen Antibiotika umgesetzt und die Suche nach weiteren Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen vorangetrieben werden [110, 118]. Vor diesem Hintergrund nehmen Peptidantibiotika, welche dem natürlichen Immunsystem zuzuordnen sind, eine bedeutende Rolle ein [93, 182].

1.2 Antimikrobielle Peptide und Biomembranen

1922 veröffentlichte A. Fleming seine Entdeckungen über eine Substanz, die in Geweben und Sekreten des menschlichen Körpers vorkommt. Im Experiment konnte er zeigen, dass diese Substanz gegenüber dem Bakterium *Micrococcus lysodeikticus* inhibierend und lytisch wirkte. Er benannte seine Entdeckung „Lysozym“ [43]. Mit dieser Veröffentlichung wurde das erste Peptidantibiotikum bzw. antimikrobielle Peptid (AMP) beschrieben. Mittlerweile finden einige Forscher die Bezeichnung „AMP“ irreführend, da die Peptide neben ihrer antimikrobiellen Eigenschaft weitere Funktionen (z.B. immunmodulatorisch, anti-inflammatorisch) im Immunsystem übernehmen. Daher findet der Begriff „*host defense peptide*“ (HDP) seit kurzem eine breite Anwendung [136, 156].

Die intensive Erforschung der Peptidantibiotika begann erst in den 1980er Jahren um den schwedischen Forscher H.G. Boman. Seine Gruppe isolierte antimikrobielle Peptide (Lysozym und sog. Cecropine) nach Injektion von Bakterien in die Hämolymphe der Raupe des Seidenspinners *Hyalophora cecropia* [74]. In späteren Experimenten konnten weitere AMPs aus der Puppe isoliert und charakterisiert werden. Gemeinsam ist den Insekten-Cecropinen, dass sie amphipatische, helikale Moleküle mit einer Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sind [10, 73]. Im weiteren Verlauf der Erforschung konnten antimikrobielle Peptide nicht nur in Insekten, sondern auch in Pflanzen, in anderen Invertebraten und in Vertebraten nachgewiesen und charakterisiert werden [188]. Besonders die Invertebraten sind auf AMPs zum Schutz gegen invasive Pathogene angewiesen, da diese kein adaptives Immunsystem besitzen. Bis zum heutigen Tag sind über 2000 antimikrobielle Peptide und Proteine bekannt (Datenbank: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> [169]) und Hunderte wurden *de novo* konstruiert und synthetisiert. Beispiele von antimikrobiellen Peptiden aus unterschiedlichen Organismen sind in der untenstehenden Tabelle 1.1 aufgelistet.

Tabelle 1.1: Beispiele für antimikrobielle Peptide

Peptid	Spezies	Aktivität	Referenz
Snakin-1	Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	Gram+, Gram-, Pilz	[145]
Ginkobilobin	Ginko (<i>Ginko biloba</i>)	Gram+, Gram-, Pilz	[170]
Gomesin	Vogelspinne (<i>Acanthoscurria gomesiana</i>)	Gram+, Gram-, Pilz, Säugerzellen	[151]
Mytilin A	Miesmuschel (<i>Mytilus edulis</i>)	Gram+, Gram-	[19]
Chrysopsin-1	Brasse (<i>Chrysophrys major</i>)	Gram+, Gram-, Säugerzellen	[76]
Bombinin	Gelbbauchunke (<i>Bombina variegata L.</i>)	Gram+, Gram-, Säugerzellen	[31]
Lethal peptide I	Lanzenotter (<i>Trimeresurus wagleri</i>)	Säugerzellen	[172]
Spheniscin-2	Königspinguin (<i>Aptenodytes patagonicus</i>)	Gram+, Gram-, Pilz	[163]
HANP-1	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Gram+, Pilz	[105]
RMAD-1	Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	Gram+, Pilz	[161]

Gram+: Gram-positive Bakterien; Gram-: Gram-negative Bakterien

Im Gegensatz zu den klassischen Antibiotika, die Sekundärmetabolite sind, liegen AMPs genkodiert vor und können konstitutiv oder nach Induktion (z.B. durch Bakterien, Zytokine) exprimiert werden [78]. Das primäre Translationsprodukt ist ein Präproprotein und wird erst durch weitere Prozessierungen zum reifen, antimikrobiell wirksamen Peptid/Protein.

Antimikrobielle Peptide zeigen hinsichtlich ihres Aktivitätsspektrum Unterschiede und können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1. Peptide, die auf Mikroorganismen, aber nicht auf normale Säugetierzellen, toxisch wirken.

In dieser Gruppe zusammengefasst findet man AMPs, welche gegen Gram-positive und Gram-negative gleichermaßen wirksam sind wie zum Beispiel Pleurocidin, ein in der Haut des Fisches *Pleuronectes americanus* vorkommendes Peptid [25]. Auch gibt es Peptide, die gegen Bakterien und Pilze Aktivität zeigen wie Magainin 2, welches aus der Haut des Krallenfroschs *Xenopus laevis* isoliert wurde [187]. Seltener zeigen Peptide nur eine antimykotische Aktivität wie Drosomycin aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welches gegen verschiedene Pilze inhibierend wirkt, aber nicht gegen Bakterien [41]. Weiterhin sind Peptide mit einer selektiven Aktivität gegenüber bestimmten Bakterien dieser Gruppe zuzuordnen. Beispielsweise ist die Wirksamkeit

des humanen β -Defensins 2 (hBD2) gegenüber Gram-positiven Bakterien kaum vorhanden (nur in sehr hohen Konzentrationen) während Gram-negative schon in sehr geringen Peptidkonzentrationen abgetötet werden [60].

2. Peptide, die auf Mikroorganismen und Säugetierzellen toxisch wirken.

Beispielsweise zeigt Indolicidin, ein kationisches Peptid aus Rinderneutrophilen, neben der antimikrobiellen Wirkung auch einen zytotoxischen Effekt auf humane und murine T-Lymphozyten [141, 146]. Auch das kationische Mellitin, was ein Hauptbestandteil des Bienengiftes der Honigbiene *Apis mellifera* ist, zeigt hämolytische Aktivität gegen humane Erythrozyten [39].

Die Ursache dafür, dass die Peptidantibiotika seltener toxische Aktivität gegen die Membranen des Wirtes zeigen, könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Membranen von pro- und eukaryotischen Zellen liegen. Im Allgemeinen sind alle biologischen Membranen aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut, welche aus amphiphilen Phospholipiden mit hydrophiler Kopfgruppe und hydrophober Schwanzgruppe bestehen. Je nach Membrantyp befinden sich in dem Bilayer eingelagerte Proteine in unterschiedlicher Menge. Dieses Modell wurde 1972 als „*fluid mosaic*“ („flüssiges Mosaik“) vorgestellt [152].

An die Kopfgruppe der Phospholipide kann zusätzlich eine polar geladene oder ungeladene Gruppe über einen Phosphodiester gebunden sein. Grundsätzlich tragen Phosphoglyceride und Sphingolipide eine negative Ladung aufgrund ihrer Phosphatgruppe. Die Gesamtladung der Kopfgruppe wird durch die angehangene Gruppe definiert, wobei zwitterionische oder anionische Phospholipide entstehen. Beispielsweise entsteht durch das Anhängen eines positiv geladenen Cholins ein zwitterionisches Phosphatidylcholin (PC). Weitere zwitterionische Phospholipide sind Phosphatidylethanolamin (PE) und Sphingomyelin (SM). Auch die in Eukaryoten vorkommenden Sterine zeigen eine neutrale Ladung. Im Allgemeinen bestehen Biomembranen eukaryotischer Zellen aus zwitterionischen Phospholipiden, während diese in Prokaryoten eher selten anzutreffen sind (Tab. 1.2). Membranen prokaryotischer Zellen sind aus anionischen Phospholipiden wie Phosphatidylglycerol (PG), Cardiolipin (CL; Dimer aus PG) und Phosphatidylserin (PS) aufgebaut. Dadurch unterscheiden sich die Biomembranen nicht nur in der Zusammensetzung der Phospholipide, sondern daraus resultierend in ihrer Nettoladung und im elektrochemischen Gradienten (Transmembranpotenzial $\Delta\psi$). In normalen Säugerzellen liegt $\Delta\psi$ im Bereich von -90 bis -110 mV, wohingegen der Bereich bei Bakterien zwischen -130 und -150 mV (logarithmische Phase) liegt. Auch dieser Unterschied im Transmembranpotenzial könnte eine Ursache für die Spezifität von Peptidantibiotika sein. Zusammenfassend können (a) ein hoher Anteil negativ-geladener Phospholipide, (b) ein niedrigeres $\Delta\psi$ und (c) das Fehlen von Sterinen ursächlich für die höhere toxische Aktivität von AMPs gegenüber prokaryotischen Membranen im Vergleich zu eukaryotischen Membranen sein [59, 149, 182].

Tabelle 1.2: Lipidzusammensetzung in den Membranen von *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* und humanen Erythrozyten [modifiziert nach [162]].

Lipid	Ladung	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Erythrozyten	
		iM	äM			iL	äL
CL	anionisch	+	+	+	-	-	-
LPG	kationisch	-	-	++	-	?	?
PA	anionisch	*	*	-	-	-	-
PC	zwitterionisch	-	-	-	+++	+++	++
PE	zwitterionisch	+++	+++	-	+++	++	+++
PG	anionisch	+	+	+++	-	-	-
PI	anionisch	-	-	-	-	*	*
PS	anionisch	-	-	-	*	+++	-
SM	zwitterionisch	-	-	-	-	+	+++
Sterin	zwitterionisch	-	-	-	Ergosterin	Cholesterin	

iM: innere Membran (Zytoplasmamembran). äM: äußere Membran. iL: nach innen gerichtete Lipidschicht. äL: nach außen gerichtete Lipidschicht.

Anteil des Lipids an der Gesamtlipidkonzentration: + = gering. ++ = mittel. +++ = hoch. * = in Spuren vorhanden.

1.3 Eigenschaften von AMPs und deren Einfluss auf die Aktivität

AMPs sind meist kleine (6 - 100 Aminosäuren (AS)) Peptide mit unterschiedlicher AS-Zusammensetzung. Die Gemeinsamkeit von AMPs liegt in der Ausbildung amphipathischer Strukturen (hydrophober und hydrophiler Bereich). Innerhalb des physiologischen pH-Bereiches besitzen die Peptide häufig eine positive Nettoladung, wobei in den letzten Jahren auch anionische Peptide entdeckt wurden.

Die AS-Zusammensetzung bestimmt nicht nur die biochemischen Eigenschaften wie beispielsweise Ladung und Amphiphilie, sondern ebenso die Struktur von AMPs (z.B. Konformation). Diese verschiedenen strukturellen Parameter, welche die antimikrobielle Wirkung beeinflussen, werden untenstehend näher erklärt.

1. Konformation (χ)

Anhand der Sekundärstruktur können AMPs in drei Gruppen unterteilt werden:

a) α -Helix

Beispiel: LL-37 [168], Magainin 2 [47], Pleurocidin [159]

b) β -Faltblatt

Beispiel: hBD-2 [4], Gomesin [106], Thanatin [107]

c) lineare Peptide mit 1-2 dominierenden AS

Beispiel: Drosocin [108], Indolicidin [133]

Den beiden strukturellen Gruppen α -Helix und β -Faltblatt werden der Großteil der antimikrobiellen Peptide zugeordnet. α -helikale Peptide liegen in wässriger Lösung meist ungefaltet vor. Eine Ausbildung der α -Helix - komplett oder in Teilen - erfolgt nach Kontakt mit einer intakten amphipathischen Phospholipidmembran bzw. durch das Vorhandensein eines Detergenz (z.B. SDS), einer organische Verbindung (z.B. TFE) oder Phospholipid-Liposomen. Auch konnte gezeigt werden, dass das humane Cathelicidin LL-37 unter physiologischen Salzbedingungen eine α -Helix ausbildet (Abb. 1.1(A)), während das Peptid in Wasser ungefaltet ist [80].

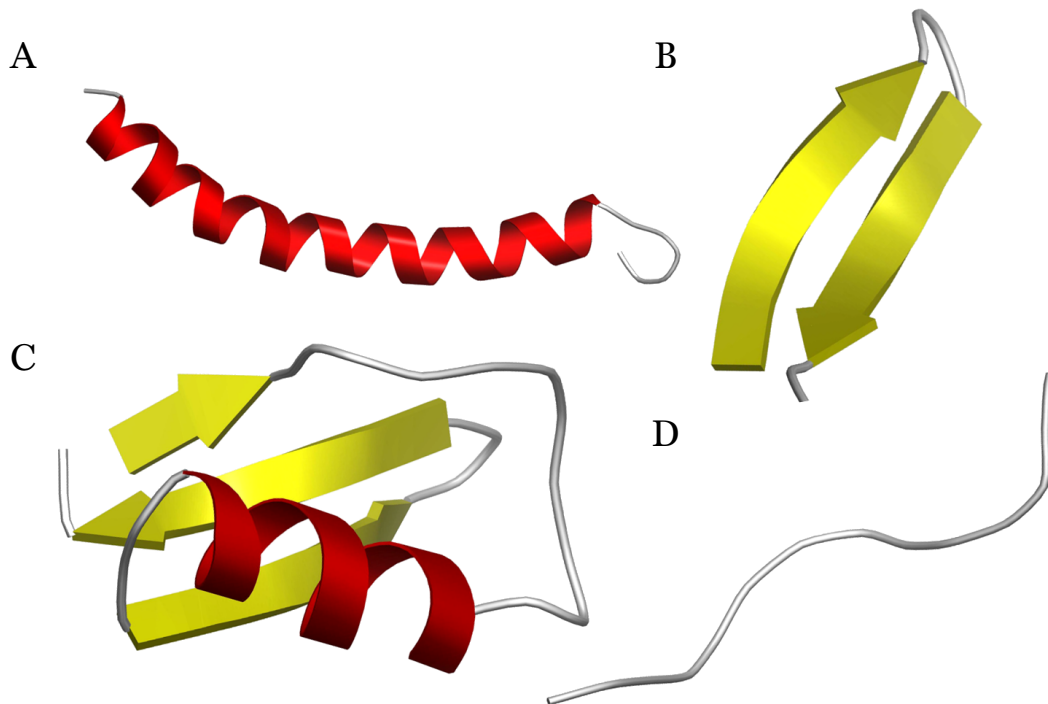


Abbildung 1.1: Beispiele für die strukturelle Einteilung der AMPs. (A) α -helikales LL-37 (PDB-Nr. 2k6o) [168], (B) Gomesin mit 2 anti-parallelen β -Faltblatt-Strukturen (PDB-Nr. 1kfp) [106], (C) Drosomycin besitzt eine Mischstruktur aus α -Helix und 3 anti-parallelen β -Faltblättern (PDB-Nr. 1myn) [98], (D) lineares Indolicidin (PDB-Nr. 1g89) [133]. Die Strukturen wurden mit der *Protein Data Bank Europe* (PDBe) des EMBL-EBI erstellt (www.ebi.ac.uk/pdbe/) [166].

Peptide mit einer β -Faltblatt-Struktur besitzen Cysteine, die Disulfidbrücken ausbilden und somit die Struktur stabilisieren. Innerhalb dieser Gruppe besitzen die Peptide eine unterschiedliche Anzahl an amphipathischen β -Faltblättern. Beispielsweise besitzt Gomesin, ein kationisches AMP der Vogelspinne *A. gomesiana*, zwei anti-parallele

Faltblätter, die über 2 Disulfidbrücken (Cys2 → Cys15, Cys6 → Cys11) verbunden sind (Abb. 1.1(B)) [106].

Die dritte Gruppe der linearen Peptide weist keine klassische Sekundärstruktur auf. Hierzu zählen Peptide, die viele Prolin-, Arginin-, Phenylalanin-, Glycin- und/oder Tryptophanreste besitzen. Indolicidin aus dem Rind enthält viele Trp-Reste und zeigt in Anwesenheit von anionischem SDS oder zwitterionischem Dodecylphosphocholin eine lineare Struktur (Abb. 1.1(D)) [134].

Nicht alle AMPs können diesen Gruppen zugeordnet werden. Zum Beispiel Drosomycin, ein Fungizid aus *Drosophila*, zeigt eine gemischte Sekundärstruktur mit einer α -Helix und 3 anti-parallelen β -Faltblättern (Abb. 1.1(C)) [98].

Die Ausbildung einer amphipathischen Struktur ist von Bedeutung, denn dies ist der erste Schritt für die Interaktion mit einer Membran und daraus resultierend für die antimikrobielle Aktivität [149, 182].

2. Ladung (Q)

Ein Großteil der bislang entdeckten AMPs besitzt eine positive Nettoladung im physiologischen pH-Bereich. Bei der Verteilung der Ladung innerhalb des Peptids treten in der Regel definierte kationische Bereiche auf. Die positive Nettoladung scheint für die Interaktion der Peptidantibiotika mit der negativ-geladenen Phospholipidmembran von Bakterien eine größere Rolle zu spielen, da die Interaktion über elektrostatische Kräfte verstärkt wird. Des Weiteren erhöhen anionische Komponenten wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Teichonsäuren (TA), welche auf der Zelloberfläche von Bakterien vorkommen, die initiale Bindung [149, 182].

Die Größe der positiven Nettoladung spielt für die Toxizität eine bedeutende Rolle. Bei der Steigerung der Nettoladung durch Austausch bestimmter AS, wobei Hydrophobizität und hydrophobes Moment annähernd gleich bleiben, konnten Giangaspero *et al.* eine Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität eines synthetisch erzeugten Peptids erzielen [48]. Bei einem Wert von +9 wurde die maximale Aktivität erreicht, welche durch eine größere Nettoladung (+11) nicht gesteigert werden konnte. Versuche mit einer erhöhten Nettoladung von +3 auf +5 bei Magainin 2 führte ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivität des Peptids gegenüber Bakterien. Allerdings führte auch hier eine größere Nettoladung (+6, +7) nicht zu einer weiteren Steigerung, sondern zu einer niedrigeren antimikrobiellen und einer höheren hämolytischen Aktivität [34].

Interessanterweise wurden in den letzten Jahren immer wieder neue Peptidantibiotika mit einer negativen Nettoladung entdeckt [64]. Wie die Interaktion mit einer anionischen Bakterienmembran verläuft, ist für viele der anionischen AMPs noch nicht

geklärt. Für das humane DEFBI18, ein β -Defensin mit definiertem kationischen und anionischen Bereich, konnte gezeigt werden, dass bei Reduktion der Cystein-Reste die antimikrobielle Aktivität verloren geht. Somit wird eine Interaktion mit der Membran über die positiv-geladenen Aminosäuren induziert [184]. Bei dem bovinen Kappacin wird angenommen, dass eine Interaktion über die Ausbildung von Salzbrücken zwischen Membran und zweiwertigen Kationen, welche am Peptid gebunden sind, erfolgt. Denn in Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen konnte eine erhöhte antimikrobielle Aktivität des Peptids gegen *Streptococcus mutans* beobachtet werden [33].

3. Amphiphilie (A) und hydrophobes Moment (μ)

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, ist die Ausbildung einer amphipathischen Struktur durch die Interaktion mit der bakteriellen Membran bedeutend. Als Maß für die Amphiphilie einer Helix wurde 1982 das hydrophobe Moment (μ) von Eisenberg *et al.* beschrieben [40]. Dabei wird die Vektorsumme der einzelnen AS-Hydrophobizitäten berechnet und auf eine ideelle Helix normalisiert, wobei die Anwendung sich nicht nur auf helikale Peptide beschränkt.

Den Einfluss des hydrophoben Moments (μ) auf die Membranaktivität von Peptidantibiotika wurde von Wieprecht *et al.* erstmals untersucht. Die Gruppe untersuchte verschiedene Magainin 2 Analoga, bei denen μ verändert wurde, während die anderen Parameter konstant blieben. Obwohl μ nur leicht erhöht wurde, konnte eine Steigerung der antibakteriellen Aktivität erreicht werden. Zusätzlich aber sank die Selektivität gegenüber PG-Vesikeln deutlich, während die Permeabilisierung von Vesikeln bestehend aus PC oder aus PC/PG (3:1) stieg. Auch eine verstärkte Hämolyse wurde beobachtet [177]. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Amphiphilie eine wichtige Größe in der Selektivität der AMPs gegenüber anionischen Phospholipiden ist.

4. Hydrophobizität (H)

Als Hydrophobizität wird der prozentuale Anteil an hydrophoben AS am Gesamtpeptid definiert. Der Wert liegt für die meisten AMPs um die 50% und ist entscheidend für die Membranpermeabilisierung [182].

Der Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität des Peptids und der Membranpermeabilisierung wurde ebenfalls durch Wieprecht *et al.* untersucht. In dieser Studie wurden modifizierte Magainin 2 Analoga mit unterschiedlicher Hydrophobizität (Basis ist die Skala von Eisenberg [39]) synthetisiert, wobei die anderen Parameter unverändert blieben. Die Arbeit zeigt, dass die unterschiedliche Hydrophobizität der Analoga keinen Einfluss auf die Permeabilisierung von Vesikeln bestehend aus PG

oder PC/PG (1:1) besitzt. Aber auch hier zeigt sich, dass die Selektivität gegenüber den anionischen Phospholipiden sinkt und es zu einer gesteigerten Permeabilisierung von PC:PG-Vesikeln (3:1) kommt, wobei der Effekt bei PC-Vesikeln noch deutlicher ist [175]. Für die Selektivität der AMPs gegenüber bakteriellen Membranen spielt die Hydrophobizität ebenso wie die Amphiphilie eine entscheidende Rolle.

5. Polarer Winkel (θ)

Bei der Ausbildung einer amphipathischen Helix kommt es zu einer Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Bereiche. Bei einer ideellen Helix würde die eine Seite aus hydrophoben AS und die andere Seite aus geladenen AS bestehen, wobei das Winkelmaß (θ) 180° betragen würde [182]. Dieser Winkel gibt Aufschluss über die Bindung und Penetration von AMPs an bzw. in Membranen. Beispielsweise assoziieren Peptide mit einem kleineren polaren Winkel und einer größeren Gesamt-Hydrophobizität zu Poren innerhalb der Membran, während Peptide mit gleichverteilten hydrophilen und hydrophoben Bereichen sich parallel zur Membrannormalen anlagern [11, 35].

Wieprecht *et al.* untersuchten auch den Einfluss von θ mit Magainin 2 Analoga [176]. In dieser Studie wurden 6 verschiedene Analoga mit einem Winkel von 80° - 180° untersucht, wobei auch hier die anderen Parameter konstant blieben. Es zeigte sich, dass die Peptide mit steigendem polarem Winkel eine signifikant reduzierte Membranpermeabilisierende Aktivität gegenüber PG-Vesikeln besitzen. Das Gegenteil zeigte sich bei Vesikeln aus PC/PG (3:1) bzw. PC allein. Mit steigender Winkelgröße erhöhte sich die permeabilisierende Aktivität. Zusätzlich konnte eine erhöhte antibakterielle und hämolytische Aktivität bei den Peptiden mit größerem θ beobachtet werden, wobei die spezifische Selektivität gegenüber Bakterien verloren ging. Die Stereogeometrie zwischen hydrophilen und hydrophoben Bereichen ist ebenso wichtig für die Interaktion von AMPs mit Membranen wie die bereits obengenannten Parameter.

Wie eben beschrieben, kann die Veränderung eines Parameters das Struktur-Aktivitäts-Verhältnis entscheidend beeinflussen. Aufgrund dessen müssen alle beschriebenen Faktoren in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander stehen, um eine optimale antimikrobielle Aktivität zu erzielen. Sobald ein Faktor in diesem Gleichgewicht sich stark verändert (Minimum kann kompensiert werden), geht die spezifische Toxizität gegenüber Bakterien verloren und die Wirtszelle kann zum Ziel werden [182].

1.4 Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden

Wenn alle im vorhergehenden Abschnitt (Vgl. 1.3) erwähnten Parameter im richtigen Verhältnis zueinander vorliegen, können die Peptide antimikrobiell wirken. Der Wirkmechanismus ist nicht einheitlich, sondern unterscheidet sich zwischen den Peptiden. Dabei kann vereinfacht zwischen zwei Mechanismen unterschieden werden: (a) Aktivität über die Membran und (b) intrazelluläre Wirkung.

Eine Gemeinsamkeit fast aller Wirkmechanismen ist die initiale Interaktion des AMPs mit der Membran, wobei es zu elektrostatischen Anziehungskräften zwischen positiv geladenen AS der Peptide und negativ geladenen Molekülen der bakteriellen Membran (TA, LPS) kommt. Dabei verstärken die anionischen Phospholipide die Anziehungskraft durch Erhöhung der negativen Nettoladung der Membran. Bei Gram-negativen Bakterien muss die äußere Membran überwunden werden, bevor die initiale Interaktion mit der Zytoplasmamembran erfolgen kann. Dieser Vorgang des Überwindens der äußeren Membran wird als *self-promoted uptake* bezeichnet [15, 59, 78, 149].

Wenn die Interaktion mit den Molekülen an der Oberfläche der Membran erfolgt, wandern die AMPs durch die Peptidoglykanschicht zum eigentlichen Ziel - die Zytoplasmamembran. An der Phospholipidschicht erfahren die Peptide eine Konformationsänderung. Dabei kommt es zur Ausbildung einer amphipathischen Struktur, wobei der hydrophobe Bereich zur Membran zeigt und die Interaktion mit dem Bilayer erfolgen kann. In einigen Fällen kann es auch zur Ausbildung von oligomeren Strukturen kommen. Hierbei zeigt der hydrophobe Bereich in wässriger Lösung ins Lumen, doch bei Kontakt mit den Phospholipiden ändert sich diese Struktur [182, 149].

1.4.1 Membranpermeabilisierung

Der genaue Vorgang einer Membranpermeabilisierung ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, aber es wird angenommen, dass zwei entscheidende Prozesse ablaufen müssen [71, 149]:

1. Die Bindung des AMPs an der Membranoberfläche bis eine Schwellenkonzentration erreicht wird.

Bei einem niedrigen Peptid-zu-Lipid-Verhältnis (P/L) orientieren sich die Peptide parallel zur Membrannormalen, sind eingelagert in den Kopfgruppenbereich und funktionell inaktiv (*S state*).

2. Peptide führen zu einer Permeabilisierung.

Mit steigendem P/L beginnen die Peptide sich senkrecht zur Membrannormalen zu orientieren, insertieren in den Bilayer und bilden transmembrane Poren aus (*I state*).

Für den Vorgang der Permeabilisierung gibt es verschiedene Modellmechanismen (Abb. 1.2). Einige der Peptidantibiotika bilden Poren nach dem *barrel-stave*-Mechanismus (Fassdauben-Modell) aus (Abb. 1.2(A)). Der Name leitet sich von den Dauben der Fässer ab, da die Pore eine ebensolche Struktur aufweist. Im ersten Schritt erfolgt eine Anlagerung der Peptidmoleküle in Form eines Monomers an die Zielstruktur. Nach Veränderung der Konformation und Erreichen einer Schwellenkonzentration, kommt es zur Oligomerisierung der Peptide gefolgt von einer Insertion. Die hydrophoben Bereiche zeigen zum hydrophoben Raum des Bilayers, während die polaren Bereiche das Innere der Pore bilden [15, 78, 149, 182]. Strukturelle Voraussetzungen für ein *barrel-stave*-Mechanismus sind eine minimale Anzahl von 22 AS für helikale Peptide oder 8 AS für β -Faltblatt Strukturen [149]. Desweiteren ist die Porengröße stets unterschiedlich, da die Pore selbst ein dynamisches System ist [49]. Das Peptid Alamethicin ist ein Beispiel für einen Fassdauben-induzierten Mechanismus [181].

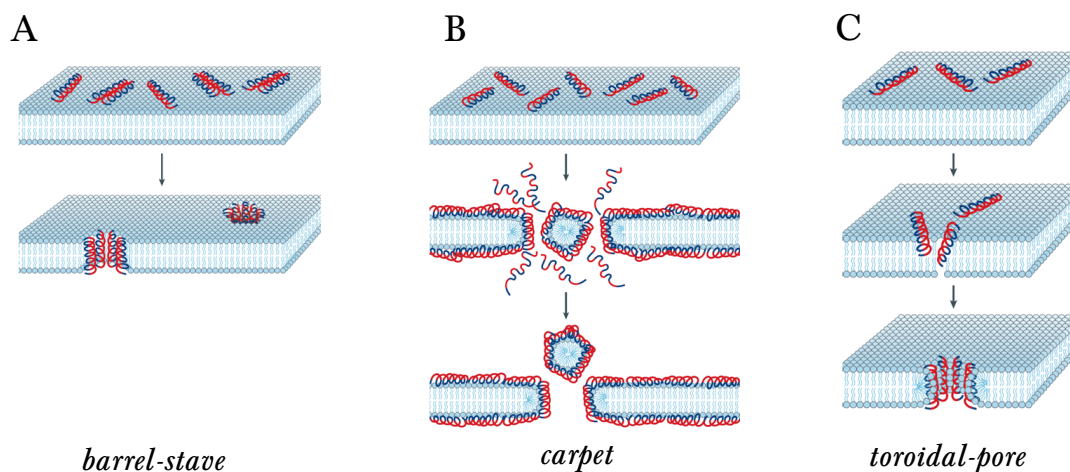


Abbildung 1.2: Modelle der Membranpermeabilisierung durch antimikrobielle Peptide. Nach der initialen Bindung können die Peptidantibiotika die bakterielle Membran auf unterschiedlicher Art permeabilisieren: (A) *barrel-stave*-Mechanismus (Fassdauben-Modell), (B) *carpet*-Mechanismus (Teppich-Modell), (C) *toroidal-pore*- oder auch *wormhole*-Mechanismus (toroidale Pore oder Wurmloch-Modell). Hydrophiler Bereich: rot, hydrophober Bereich: blau [modifiziert nach [15]].

Peptide, die nach dem *carpet*-Mechanismus (Teppich-Modell) zum bakteriellen Zelltod führen, benötigen keine besonderen Voraussetzungen [149]. Zuerst lagern sich die AMPs parallel an der Membranoberfläche an und bedecken diese wie ein „Teppich“ (Abb. 1.2(B)). Wird eine gewisse Konzentration überschritten, dringen die Peptide in den Bilayer ein und zerstören diesen, wobei es zum Verlust der Membranstabilität kommt. Hierbei erfolgt aber keine Einlagerung der Peptide in den hydrophoben Kern der Membran [15, 78, 149, 182]. Als Beispiel für solch ein AMP ist LL-37 zu nennen [120].

Beim *toroidal-pore*-Mechanismus (toroidale Pore-Modell; auch: *wormhole*-Modell) wird ähnlich wie beim *barrel-stave* eine Pore durch die Peptide induziert (Abb. 1.2(C)). Der Unterschied

liegt darin, dass hier die polaren Kopfgruppen der Phospholipide zusammen mit den polaren Bereichen der Peptide das Innere der Pore ausbilden [15, 78, 149, 182]. Melittin ist ein AMP, welches toroidale Poren verursacht [181].

Die beschriebenen Mechanismen können durch die Permeabilisierung eine Membrandestabilisierung verursachen, die zur Depolarisierung und somit zum Verlust der Energie und schließlich zum Tod der Zelle durch Osmolyse führt [149].

1.4.2 Interaktion mit der Membran über einen Rezeptor

In wenigen Ausnahmefällen interagieren AMPs nicht über elektrostatische Kräfte, sondern binden an einen Rezeptor innerhalb der Membran. Der Großteil dieser Peptidantibiotika werden von Bakterien gebildet, wobei die Synthese chemisch oder genkodiert über eine RNA erfolgen kann [149, 186]. Die AMPs bestehen in der Regel aus 2 Domänen: (a) Rezeptor-Bindedomäne und (b) porenbildende Domäne [149].

Nisin, ein von *Lactococcus lactis* gebildetes Peptidantibiotikum, bindet mit dem N-Terminus an Lipid II, ein in der Membran verankertes Molekül der Peptidoglykansynthese. Im Anschluss an die Bindung kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Komplexes Nisin/Lipid II, der C-terminale Teil des AMPs dringt in die Zytoplasmamembran ein und bildet eine Pore aus, wobei Lipid II ein Bestandteil der Pore ist [12, 70, 174]. Vor kurzer Zeit wurde eine Bindung von Nisin an Lipid III und Lipid IV, Zwischenprodukte in der WTA-Synthese, beobachtet. Allerdings findet die WTA-Synthese im Zytoplasma statt, so dass eine entscheidene Rolle in der Abtötung fraglich ist [114]. Aber nicht alle in diese Klasse gehörenden AMPs bilden eine Pore aus. Mersacidin, synthetisiert von dem Bakterium *Bacillus subtilis*, bindet ebenfalls an Lipid II. Dabei kommt es zur Inhibierung der Peptidoglykansynthese, in dem die Transglykosylierung des MurNAC-(ppGly₅)-GlcNAC Restes des Lipid II unterbunden wird [13].

Es wäre möglich, dass sich in den nächsten Jahren für einige andere Peptidantibiotika eine rezeptorassoziierte Bindung nachweisen lässt. Zum Beispiel wurde 9 Jahre nach der ersten Erwähnung des hBD-3 eine Bindung an Lipid II und die Inhibierung der Zellwandbiosynthese beschrieben [138]. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde lediglich die membranpermeabilisierende Eigenschaft beobachtet [61].

1.4.3 Intrazelluläre Wirkung

Nicht alle AMPs weisen einen Mechanismus der Membranpermeabilisierung auf. Für einige konnte nachgewiesen werden, dass sie intrazelluläre, essenzielle Prozesse inhibieren und dadurch zum Zelltod führen. Zudem ist nicht auszuschließen, dass es eine kombinierte Wirkungsweise aus Permeabilisierung und Inhibierung zytoplasmatischer Prozesse bei einigen

Peptiden vorliegt [182].

Vor der eigentlichen intrazellulären Wirkung muss die Zytoplasmamembran überquert werden. Für diese Translokation haben die Peptide einzigartige Mechanismen entwickelt. Innerhalb der Zelle akkumulieren die Peptide und inhibieren die Nukleinsäure-, Protein- und/oder Zellwandsynthese, die enzymatische Aktivität oder binden an Nukleinsäuren [15].

Buforin II, ein AMP aus der Kröte *Bufo bufo gargarizans*, kann dieser Gruppe von Peptiden zugeordnet werden. Buforin II durchdringt die Membran von *E. coli* ohne sie zu permeabilisieren und bindet intrazellulär an DNS und RNS [123]. Für eine effektive Translokation wird das Pro¹¹ benötigt, denn ein Austausch dieser AS gegen ein Ala führte zum Verlust der intrazellulären Interaktion und zu einer permeabilisierenden Aktivität [124]. Mittels NMR konnte gezeigt werden, dass das Pro¹¹ zu einem Knick in der α -Helix führt, wodurch die amphipathische Eigenschaft des N-Terminus (Pro¹¹ bis Lys²¹) auch auf AS des C-Terminus übertragen wird (Arg⁵) [185]. Kobayashi *et al.* postulierten einen *toroidal-pore*-Mechanismus für die Translokation des Buforin II, wobei die Pore durch das Clustern von 5 positiv geladenen AS so instabil wird, dass nur eine kurze Lebensdauer vorliegt [90].

1.4.4 *Nutritional Immunity*

Der Begriff *nutritional immunity* wurde ursprünglich für den Entzug von Eisen durch die Wirtszelle geprägt, um eine Besiedlung mit Pathogenen zu vermeiden [171]. Mittlerweile findet der Begriff auch bei der Chelatbildung mit anderen Metallionen Anwendung [69]. Im Zusammenhang mit der antimikrobiellen Wirksamkeit von Peptiden, bedeutet es, dass durch die Chelatbildung dem Mikroorganismus essenzielle Ionen für das Wachstum bzw. Überleben entzogen werden. S100A7 (auch: Psoriasin), ein von Keratinozyten gebildetes AMP, tötet *E. coli* durch den Entzug von Zn²⁺, welches eine wichtige Rolle in der Funktion der *E. coli* CuZn-Superoxiddismutase spielt [50, 52]. Ein weiteres Mitglied der S100-Familie, S100A8/S100A9-Heterodimer Calprotectin, entzieht den Mikroorganismen Mn²⁺ und Zn²⁺ und inhibiert somit deren Wachstum. Auch hier führt der Entzug des Zinks zum Verlust der Superoxiddismutase-Funktion bei *S. aureus*. Es konnte gezeigt werden, dass der Entzug von Mangan die Superoxid-Abwehr in *S. aureus* inhibiert, so dass bei Entzug von beiden Ionen eine deutlich stärkere Inhibierung des Zellwachstums erzielt werden kann [27, 32, 87].

1.5 Resistenzmechanismen

Im Vergleich der Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobiellen Peptiden sind Bakterien bislang weniger erfolgreich als bei Antibiotika. Da die häufigste Zielstruktur von AMPs die bakterielle Membran ist, müsste zur Abwehr der Peptide eine Umstrukturierung der Membran (z.B. Veränderung der Phospholipide) erfolgen, welche nicht einfach umzusetzen

ist [188]. Trotzdem sind einige Resistenzmechanismen in Mikroorganismen bekannt, welche die Bindung, die Insertion und/oder die Permeabilität der AMPs beeinflussen [15, 92].

1.5.1 Extrazelluläre Moleküle und Proteasen

Die Produktion von extrazellulären Molekülen, die AMPs binden und abfangen, stellt eine Resistenzstrategie von Bakterien dar [15, 92, 182]. Beispielsweise produziert *S. aureus* das Exoprotein Staphylokinase, welches die Freisetzung von α -Defensinen aus humanen Lymphozyten induziert. Darüber hinaus besitzt die Staphylokinase mehrere Bindestellen für α -Defensine, so dass beide Moleküle einen Komplex eingehen. Aufgrund dieser Komplexbildung wird die antimikrobielle Wirkung der α -Defensine gegenüber *S. aureus* stark herabgesetzt [79].

Eine weitere Strategie ist die Produktion von Proteasen, welche sezerniert oder an die Zellmembran gebunden vorliegen können [15, 92, 182]. Aureolysin, eine sezernierte Protease von *S. aureus*, inaktiviert durch Spaltung das humane Cathelicidin LL-37 [150]. Guina *et al.* konnte zeigen, dass die membranständige Protease PgtE des Bakteriums *Salmonella enterica* α -helikale kationische Peptide spaltet und das Bakterium vor dem Zelltod schützt [56].

1.5.2 Modifikation der Zelloberfläche und/oder der bakteriellen Zellmembran

Eine Veränderung der Zelloberflächenstruktur kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, wobei das primäre Ziel bei allen Strategien die Abschwächung der elektrostatischen Anziehungskraft ist [15, 92, 182].

S. epidermidis synthetisiert bei der Biofilmbildung ein Exopolymer (interzelluläre Polysaccharid-Adhäsine, PIA), welches zwischen den bakteriellen Zellen eine interzelluläre Adhäsion bewirkt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Exopolymere in der Resistenz des Bakteriums gegenüber kationischen und anionischen Peptiden eine Rolle spielen [167].

Um die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen kationischen Peptiden und der anionischen bakteriellen Membran zu reduzieren, modifizieren einige Bakterien ihre anionischen Moleküle, um die Gesamtnettoladung der Zelloberfläche bzw. Zellmembran zu erhöhen. Die dabei verwendeten Modifikationen unterscheiden sich zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung der Zelloberfläche. Das Gram-positive Bakterium *S. aureus* minimiert die negative Nettoladung durch die Veresterung von D-Alanin mit den Teichonsäuren [126]. Bei Gram-negativen Bakterien erfolgt eine Modifikation der Lipopolysaccharide über ein Zwei-Komponenten-System. Beispielsweise erfolgt in *Salmonella enterica* eine PmrA/PmrB-abhängige Modifikation an Lipid A durch Anlagerung von Phosphoethanolamin und L-4-Aminoarabinose, wodurch die Phosphate des Lipids A neutralisiert werden und zu Resistenzen gegenüber AMPs füh-

ren [55, 57, 101]. Ein weiterer Mechanismus zur Reduktion der negativen Nettoladung ist die Modifikation von PG mit der positiv-geladenen Aminosäure L-Lysin. Die Synthese der Lysyl-PGs erfolgt durch das MprF-Protein, welches in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorkommt [125].

Nicht nur die Neutralisierung der negativen Ladung von Membranen, sondern auch die Veränderung der Membranfluidität führt zu einer Resistenz gegen AMPs. Bei der Untersuchung von resistenten *S. aureus* gegenüber tPMP-1 zeigte sich, dass eine stark erhöhte Membranfluidität vorlag. Im Vergleich zu den sensitiven Stämmen enthielten die Membranen der resistenten Stämme einen deutlich höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche die Fluidität erhöhen [6]. Aber nicht nur die Erhöhung führt zu einer Resistenz, sondern auch die Verringerung der Membranfluidität. Die verstärkte Einlagerung von Carotinoiden in die bakterielle Membran von *S. aureus* führte zu einem Absinken der Membranfluidität und schützte das Bakterium vor AMPs, so dass beide Extreme (stark flüssig und stark starr) vor der antimikrobiellen Wirkung von Peptiden schützen können [111, 157].

1.5.3 Transporter

In der Zytoplasmamembran eingelagerte *multi drug resistance* (MDR)-Transporter können Bakterien ebenso vor antimikrobiellen Peptiden schützen, indem sie die AMPs aus dem Zytoplasma exportieren. In *Yersinia* wurde ein System bestehend aus den Proteinen RosA und RosB beschrieben. Dabei wird vermutet, dass die Resistenz über zwei Wege erreicht wird: (a) RosA, ein Membrantransporter, pumpt das AMP aus dem Zytoplasma in das Periplasma und (b) RosB, ein K^+/H^+ -Antiporter, steigert die Übersäuerung im Zytoplasma [7]. Ein weiterer MDR-Transporter wurde in *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass MtrCDE verschiedene Antibiotika und kationische AMPs aus der Zelle transportieren [148].

1.6 Das humane antimikrobielle Peptid DCD-1L

Die Haut als Grenzflächenorgan (Fläche von 1-2 m²) spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion der Umwelt mit dem Körperinneren. Sie übernimmt Funktionen in der Temperaturregulierung, der Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts, in der Sinneswahrnehmung sowie in der Kommunikation [102]. Des Weiteren schützt die Haut den Körper vor der Invasion von Pathogenen über verschiedene Abwehrstrategien. Die Haut ist ein sich ständig erneuerndes Organ, weshalb einer übermäßigen Kolonisierung durch Mikroorganismen durch das regelmäßige Abschuppen der oberen Epidermisschicht (*Stratum corneum*) verhindert wird. Zusätzlich wirkt ein starker Zellverband im *Stratum corneum* einer Invasion von Pathogenen in die Epidermis entgegen. Die beschriebenen Mechanismen werden als „physikalische Bar-

riere“ bezeichnet. Darüber hinaus wird der Körper mit Hilfe einer „chemischen Barriere“ geschützt. Dazu gehört zum einen der „natürliche Säureschutzmantel“ mit einem sauren pH-Wert ($\approx 4,7$), welcher das übermäßige Wachstum von Mikroorganismen verhindert und das Wachstum vieler Pathogene inhibiert [54, 96]. Zum anderen zählen hierzu antimikrobielle Lipide sowie antimikrobielle und antivirale Peptide, welche von Keratinozyten, Mastzellen, Neutrophilen, Talgdrüsen und Schweißdrüsenzellen exprimiert und anschließend sezerniert werden und gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen wirksam sind [36, 115, 143]. Diese Moleküle werden der angeborenen Immunabwehr zugeordnet und deren Expression erfolgt entweder konstitutiv und/oder induziert durch die Anwesenheit eines Stimulus. Beispielsweise RNase-7, ein Peptidantibiotikum mit einem breiten Wirkspektrum, wird in Keratinozyten konstitutiv exprimiert und zusätzlich konnte *in vitro* eine Erhöhung der Expression durch Stimuli (Bakterien, Interferon- γ) erzielt werden [63]. Im Gegensatz dazu ist hBD-2 in gesunder Haut nicht zu finden. Dieses AMP, welches hauptsächlich gegen Gram-negative Bakterien wirksam ist, wird erst durch Stimuli wie Zytokine (z.B. IL-1 β , TNF- α , IL-17) und Bakterien in Keratinozyten bei psoriatischer Erkrankung der Haut, Wunden oder Infektionen exprimiert [37, 62, 86, 104].

Im Jahre 2001 wurde erstmals das konstitutiv exprimierte AMP Dermcidin (DCD) beschrieben, wobei mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung und immunhistologischen Färbung eine spezifische Expression in den ekkrinen Schweißdrüsen nachgewiesen werden konnte [129, 140]. Des Weiteren konnte durch die Zugabe von inflammatorischen Stimuli (LPS, TNF- α) oder durch oxidativen Stress keine gesteigerte Expression induziert werden [129].

Das *DCD* Gen (3714bp) ist auf dem Chromosom 12q13.1 lokalisiert, besteht aus 5 Exons und 4 Introns (Abb. 1.3(A)) und kodiert für eine cDNA bestehend aus 458bp (offenes Leseraster: 330bp) [140]. Bei der Expression wird ein Vorläuferprotein aus 110 AS mit einem N-terminalen Signalpeptid (AS 1- 19) erzeugt (Abb. 1.3(B)). Am C-terminalen Ende ist die AMP-Domäne (AS 63 - 110) lokalisiert, welche vom Vorläuferprotein durch postsekretorische Prozessierung abgespaltet wird. Baechle *et al.* konnten zeigen, dass Cathepsin D (Aspartat-Protease) und eine 1,10-Phenanthrolin-sensitive Carboxypeptidase an der Prozessierung beteiligt sind [3]. Das bei der Prozessierung erzeugte Peptid ist 48 AS lang und wird als DCD-1L bezeichnet. DCD-1L selbst unterliegt weiteren Prozessierungen am C- und/oder N-Terminus, so dass verschiedene DCD-abgeleitete Peptide erzeugt werden, welche man in LEK-Peptide und SSL-Peptide unterteilen kann (Abb. 1.3(B)). Im ekkrinen Schweiß wurden 14 DCD-abgeleitete Peptide mittels SELDI-TOF-MS identifiziert, wobei 13 dem C-terminalen Ende (AS 63 - 110) und ein Peptid dem N-Terminus (AS 20 - 62) zugeordnet werden konnten [130].

Die prozessierten C-terminalen Peptide unterscheiden sich in der Anzahl der AS und der Nettoladungen. Für die anionischen Peptide DCD-1L (48 AS) und DCD-1 (47 AS) wurde

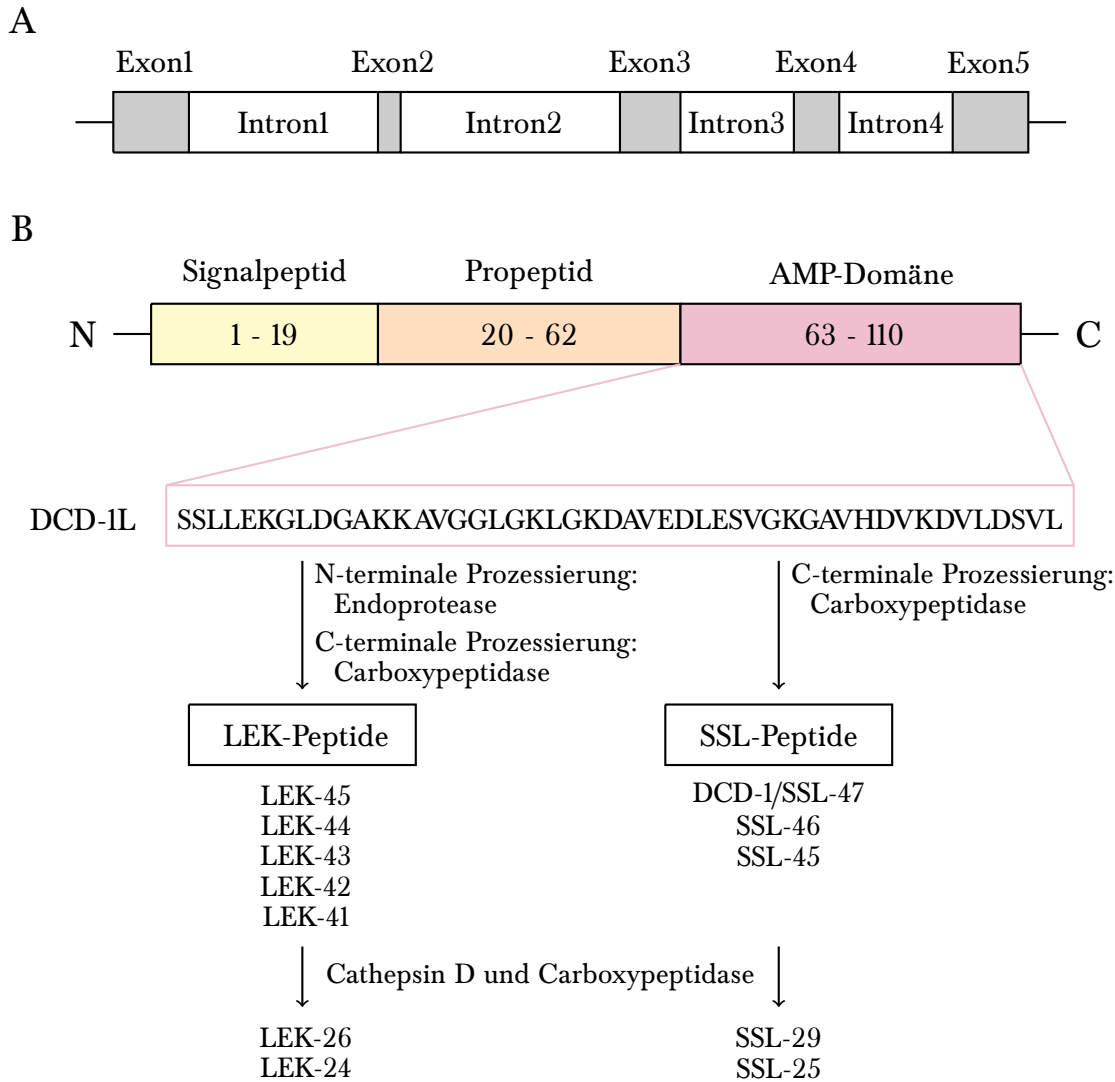


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung (A) der genomischen Struktur des Gens von Dermcidin, (B) des Vorläuferproteins aus 110 AS, wobei sich am C-Terminus die AMP-Domäne bestehend aus 48 AS befindet. Diese Domäne wird als DCD-1L bezeichnet. Durch weitere Prozessierungen entstehen verschiedene DCD-abgeleitete Peptide, die in LEK-Peptide und SSL-Peptide unterteilt werden [modifiziert nach [139]].

antimikrobielle Aktivität gegen Pathogene wie *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. faecalis* und *C. albicans* unter schweißähnlichen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, niedriger pH) nachgewiesen [95, 140, 167]. Dabei wurden die Mikroorganismen in Peptidkonzentrationen abgetötet wie sie auch im Schweiß zu finden sind (DCD-1: 1 - 10 µg/ml) [42]. In einer späteren Studie konnte auch den kationischen Peptiden SSL-23 (23 AS) und SSL-25 (25 AS) antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* nachgewiesen werden, so dass die antimikrobielle Aktivität unabhängig von der Nettoladung ist. Allerdings wurde für SSL-29, ein Peptid mit neutraler Nettoladung, keine antimikrobielle Aktivität beobachtet [155]. Für die sogenannten LEK-Peptide konnte *in vitro* keine antimikrobielle Wirksamkeit gezeigt werden. Dies

lässt den Schluss zu, dass die ersten beiden Serine von entscheidender Bedeutung für die antimikrobielle Aktivität sind [155].

In verschiedenen Untersuchungen sollte der Wirkmechanismus genauer charakterisiert werden. Dabei konnte eine Bindung an die bakterielle Zelloberfläche von *S. aureus* beobachtet werden [103, 155]. Dabei scheinen für die Interaktion Phospholipide von Bedeutung zu sein. Denn eine reduzierte Menge an Cardiolipin bei einer *S. aureus*-Mutante (*dak2*) führte im Vergleich zum Wildtyp zu weniger gebundenen DCD-1 an der Zelloberfläche [103]. Interessanterweise konnte aber bei keiner dieser Studien nach der Bindung des Dermcidins eine Membranpermeabilisierung beobachtet werden [103, 147, 155]. Senyürek *et al.* beobachteten eine intrazelluläre Wirkung von DCD-1L und SSL-23, bei welcher die intrazelluläre Makromolekülsynthese in *S. aureus* beeinflusst wird, insbesondere die Protein- und RNS-Synthese. Eine direkte Bindung der Peptide an DNS oder RNS wurde allerdings nicht nachgewiesen [147].

Wie bereits für RNase-7 erwähnt, können AMPs auch bei Erkrankungen der Haut eine Rolle spielen. Rieg *et al.* zeigten, dass Patienten mit atopischer Dermatitis eine signifikant reduzierte Konzentration an DCD-1 und DCD-1L im Schweiß besitzen. Weiterhin wurde beobachtet, dass der Schweiß bei den Patienten *in vitro* weniger bakterizid gegen *S. aureus* war als der Schweiß von gesunden Probanden. Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit der erhöhten Besiedlung mit dem pathogenen Keim *S. aureus* bei Atopikern [131].

1.7 Zielsetzung

Dermcidin spielt in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut eine wichtige Rolle. Bislang konnte der Mechanismus, welcher zum Zelltod führt, nicht geklärt werden. Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Untersuchung zum Wirkmechanismus des DCD-abgeleiteten Peptids DCD-1L. Zuerst sollten strukturelle Eigenschaften des Peptids mittels CD-Spektroskopie unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden. Da die Struktur eines Peptids für die Interaktion mit der Membran von großer Bedeutung ist, sollte in Bezug zur Struktur die Bindung von DCD-1L an Membranen untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Techniken eingesetzt wie orientierte CD-Spektroskopie, Messung der elektrischen Leitfähigkeit an Membranen sowie die Etablierung eines Liposomen-Modells. Zusätzlich sollte die „native“ Konformation des DCD-1L analysiert werden, wobei Methoden wie native Gelelektrophorese und Gelfiltration zur Anwendung kamen. Da bekannt ist, dass einige anionische AMPs für ihre Aktivität zweiwertige Kationen benötigen, wurde auch der Einfluss von Ionen auf die Wirksamkeit von DCD-1L untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikaliennachweis

Für diese Arbeit wurden die Chemikalien und Enzyme, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Fermentas (St. Leon-Roth), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und Roth (Karlsruhe).

2.2 Geräte

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Geräte

AFM	MFP-3D (Asylum Research, USA)
Digitalisierer	Axon Digidata 1440A (Molecular Devices, USA)
Elektroden	MI-409F reference electrode (Microelectrodes Inc., USA) MI-422 potassium electrode (Microelectrodes Inc., USA)
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Deutschland)
Elektrophysiologie	Planar Lipid Bilayer (BLM) Workstation (Warner Instruments, USA)
Gaschromatograph	6890N GC System, G2614A Autosampler, G2613A Injector, 5973N Mass Selective Detector (Agilent, USA)
Gelfiltration	L-6200A Intelligent Pump, L-4000 UV Detector, D-2500 Chromato-Integrator (Merck-Hitachi, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-4 LSC (CHRIST, Deutschland)
Heizblock	Dri-Block DB-2D (Techne, Großbritannien)
Inkubator	Brutschrank Function Line (Heraeus, Deutschland) Certomat [®] H (Sartorius, Deutschland) Schüttelinkubator (INFORS AG, Schweiz)
Massenbestimmung	MALDI-TOF, Q-ToF, Micromass, ReflexIV Spektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Deutschland)
NMR Spektrometer	600 MHz Bruker US Plus AVANCE III (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland)
Peptidsynthese	Syro II MultiSynTech (Deutschland)
pH-Meter	pH Microprocessor 213 (Hanna Instruments, Deutschland)
Photometer	Photometer SmartSpec [™] Plus (Bio-Rad, Deutschland) 150-20 Spectrophotometer (Hitachi, Deutschland)
Proteintransfer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Deutschland)
RP-HPLC	L-6200 control, L4000A UV-detector (Merck-Hitachi, Deutschland)

Spektrofluorometer	Jasco FP-6500 (Jasco Tools Inc., Deutschland)
Spektropolarimeter	Jasco J-810 (Jasco Tools Inc., Deutschland)
Ultraschallbad	UTR200 (Hielscher, Deutschland)
Zentrifugen	Biofuge A (Heraeus, Deutschland)
	Biofuge 28RS (Heraeus, Deutschland)
	Megafuge 1.0R (Heraeus, Deutschland)

2.3 Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen

Bakterien wurden auf Medium-Platten ausgestrichen und bei 4°C gelagert. Vor jedem Versuch wurde eine Vorkultur angesetzt. Hierzu wurde von der Platte eine Kolonie gepickt und in Flüssigmedium überführt. Das Wachstum der Bakterien erfolgte unter den Spezies-abhängigen Bedingungen wie in Tabelle 2.2 beschrieben. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur 1:100 in frischem Medium verdünnt und erneut bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,8 (logarithmische Phase) inkubiert.

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Bakterien und deren Kultivierungsbedingungen

Bakterium	Kultivierung		
	Medium	Temperatur	Schütteln
<i>Staphylococcus aureus</i> 113 WT	LB	37°C	180 Upm
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> HP	GM17	30°C	-
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 1790	TSB	30°C	180 Upm

LB-Medium: 1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt

GM17: M17-Medium (Oxoid, Großbritannien), 0,5% Glucose

TSB (Merck, Deutschland)

Für die Herstellung von Agarplatten wurde das jeweilige Medium mit 1,5% Agar versetzt.

Indirekte Lebendzellzahlbestimmung

Für den antimikrobiellen Test wurde eine definierte Zellzahl eingesetzt (siehe 2.10), welche über die Bestimmung der Trübung (OD₆₀₀ = 1) ermittelt wurde. Grundlage ist der proportionale Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zellzahl bei einzelligen Mikroorganismen.

Von *S. aureus* 113 WT wurde eine wie oben beschriebene Vorkultur in LB-Medium angelegt und über Nacht inkubiert (180 Upm, 37°C). Am folgenden Tag wurde eine Hauptkultur aus der Vorkultur angefertigt und bis zur $OD_{600} = 1$ bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Wenn der Wert erreicht wurde, kam es zur Herstellung einer 1:10-Verdünnungsreihe in LB-Medium. Von den Verdünnungen im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-7} wurden jeweils 100 µl auf einer LB-Platte in Dreifachbestimmung ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 18 - 22 h bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt und die Zellzahl über folgende Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (CFU/ml)} = \text{Koloniezahl} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10$$

Abschließend wurden die ermittelten Zellzahlen über die verschiedenen Verdünnungsstufen gemittelt.

2.4 Phospholipide

Die verwendeten Phospholipide für die Herstellung artifizierlicher Liposomen und Bilayer wurden von Avanti® Polar Lipids Inc. (USA) bezogen.

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Phospholipide

Phospholipid	Abkürzung	Ladung	Phasenübergangstemperatur [°C]
1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin	DPhPC	zwitterionisch	keine zwischen -120 - +80
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin	POPC	zwitterionisch	-2
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin	POPE	zwitterionisch	+25
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol	POPG	negativ	-2
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin	DMPC	zwitterionisch	+23
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol	DMPG	negativ	+23

2.5 Antikörper

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Antikörper

Einsatz	Bezeichnung	Antikörper-Typ	Spezifität	Bezugsquelle
Primär	G-81	Maus monoklonal	DCD	Kimura (Japan) [135]
Sekundär	AP Conjugate	Ziege polyklonal AP gekoppelt	Maus	Applied Biosystems (Deutschland)

2.6 Synthetische Peptide

DCD-1L wurde bei der Firma Peptide2.0 (USA) mit einer Reinheit > 95% erworben, Gramidicin bei der Firma Sigma-Aldrich (Deutschland) mit einer Reinheit > 90%.

Zusätzlich wurde DCD-1L von Herrn Dr. H. Kalbacher (Medizinisch-Naturwissenschaftliches Forschungszentrum, Tübingen) synthetisiert (siehe 2.7).

2.7 Peptidsynthese

Das Peptid DCD-1L wurde mittels der Festphasenpeptidsynthese in Tübingen synthetisiert [109]. Hierbei wird beginnend am C-Terminus, welcher über einen Linker (Esterbindung) an ein Trägerharz gebunden ist, das Peptid um jeweils eine Aminosäure verlängert. Fmoc-Schutzgruppen an den Amino- und Carboxygruppen verhindern dabei irreversible Nebenreaktionen.

Die Synthese mit Hilfe des Synthesizers Syro II MultiSynTech wurde nach dem Protokoll von Atherton & Sheppard durchgeführt [1]. Das Anhängen von einer Aminosäure umfasst zwei Schritte:

1. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus mit einem sekundären Amin, dem Piperidin.
2. Die Ausbildung der Peptidbindungen, welche durch Kopplungsreagenzien beschleunigt wurden.

Das Entfernen von seitlichen Schutzgruppen sowie die Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz erfolgten mit 92% TFA, 5% Thioansiol, 3% Triisopropylsilan und Phenol. Mittels der präparativen RP-HPLC (siehe 2.8) wurde das Peptid gereinigt.

2.8 Analytische und präparative Umkehrphasen-Chromatographie

Für die Reinigung der synthetisierten Peptide wurde die präparative Umkehrphasen-Chromatographie (*reversed-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) verwendet. Hierbei werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität getrennt.

Die Auftrennung erfolgte über eine 150/10 Reprosil 100 C8-Säule (Dr. Maisch GmbH, Deutschland) mit Hilfe eines Gradienten aus Puffer A und Puffer B mit einer Flussrate von 2,5 ml/min. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 214 nm (L-4000A). Die Säule wurde für 8 min in 20% Puffer B äquilibriert. In den folgenden 40 min stieg der Anteil an Puffer B linear auf 80% an. Anschließend wurde die Säule für mindestens 3 min in 100% Puffer B gespült. Die gesammelten Fraktionen wurden im Massenspektrometer auf die genaue Masse hin untersucht (siehe 2.9) und anschließend lyophilisiert.

Puffer A: 0,055% (v/v) TFA in H₂O

Puffer B: 0,045% (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril

2.9 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Masse erfolgte über die Ionisierungstechnik MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight*) im ReflexIV (Bruker Daltonik GmbH). Die zu untersuchende Probe wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit der DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure; 10 mg/ml) auf einem stahllosen Träger gemischt und getrocknet. Vor der Probenmessung erfolgte eine Kalibrierung mit Hilfe eines Peptid-Standards (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonik GmbH, Deutschland). Der Aufnahmebereich wurde auf 500 - 5500 m/z festgesetzt. Mittels dem ReflexIV Spektrometer wurden die Massenspektren erzeugt und über die FlexControl Software (Bruker Daltonik GmbH, Deutschland) ausgewertet.

2.10 Antimikrobieller Test

Um die antibakterielle Wirkung des Peptids zu testen, wurde der CFU-Assay (*colony-forming unit*, Kolonie-bildende Einheit) nach Ganz *et al.* in abgewandelter Form durchgeführt [45].

Eine Einzelkolonie von *S. aureus* 113 WT diente zur Inokulation einer LB-Flüssigvorkultur, welche bei 37°C unter Schütteln (180 Upm) über Nacht inkubiert wurde (siehe 2.3). Die Hauptkultur wurde mit 1/100 Volumen der Vorkultur in frischem LB-Medium angeimpft und bis zur logarithmischen Phase bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Danach wurden die Bakterien zentrifugiert (5000 Upm, 5 min), 2x mit Puffer gewaschen und die OD₆₀₀ im

gleichen Puffer bestimmt. Die Bakterien wurden auf 3×10^6 CFU/ml in Puffer eingestellt.

In Reaktionsgefäßen wurden die verschiedenen Peptidverdünnungen in Wasser oder Puffer vorbereitet. Zu diesen wurde die Bakteriensuspension pipettiert, wobei die Bakterien im Gesamtansatz 1:3 verdünnt wurden (1×10^6 CFU/ml im Reaktionsansatz). Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Im Anschluss wurde ein Teil des Reaktionsansatzes 1:100 in Puffer verdünnt. Davon wurden je 100 μl auf LB-Agarplatten ausplattiert (Dreifachbestimmung) und nach einer Inkubationszeit von 18 - 22 h bei 37°C die Kolonien ausgezählt. Als Kontrolle wurden stets unbehandelte Bakterien mitgeführt.

Puffer: 100 mM Natriumphosphat (pH 6,0)

Ionen-Versuch: 100 mM Natriumphosphat (pH 6,0), je 10 μM CaCl_2 , MgCl_2 oder ZnCl_2

EDTA-Versuch: 75 mM Tris (pH 6,5), 50 μM EDTA

K^+ -Ausstrom: 300 mM Cholinchlorid, 30 mM MES, 20 mM Tris (pH 6,5)

Trübungsmessung

Um die antimikrobielle Aktivität gegen *L. lactis ssp. cremoris HP* zu testen, wurde die Trübungsmessung angewendet. Eine Einzelkolonie des Bakteriums diente zur Inokulation einer GMI7-Flüssigvorkultur, welche bei 30°C und ohne Schütteln über Nacht inkubiert wurde (siehe 2.3). Am nächsten Tag wurde mit 1/100 Volumen der Vorkultur eine Hauptkultur angeimpft und bis zur logarithmischen Phase bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert (5000 Upm, 5 min), 2x mit Puffer gewaschen, die OD_{600} im gleichen Puffer ermittelt und auf 3×10^6 CFU/ml in Puffer eingestellt.

In einer 96-Well-Platte wurde ein Puffer-GMI7-Gemisch (1:1) ohne bzw. mit Peptid vorgelegt. Dazu wurde die Bakteriensuspension pipettiert, wobei die Bakterien auf 1×10^6 CFU/ml im Reaktionsansatz eingestellt wurden. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 30°C inkubiert und die OD_{600} wurde über die Zeit gemessen.

Puffer: 300 mM Cholinchlorid, 30 mM MES, 20 mM Tris (pH 6,5)

2.11 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen/Peptiden

2.11.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht kam die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate-PAGE*) zur Anwendung. Hierbei lagert sich das anionische SDS an die Proteine und überdeckt deren Eigenladung. Die

entstandenen Komplexe mit konstanter negativer Ladung pro Massenanteil Protein bewegen sich mit der gleichen Beschleunigung durch ein elektrisch geladenes Feld und werden nur aufgrund ihrer Größe aufgetrennt.

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli mit einem 15%igem Polyacrylamidgel als Trenngel (Dicke: 1,5 mm) durchgeführt sowie mit einem Sammelgel, um schärfere Banden zu erzielen [94]. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert sowie in eine Tasche ein Längenmarker mit Proteinen definierter Größe (Rainbow-Marker RPN755, Amersham, Deutschland). Die Probenauftrennung in einem Elektrodenpuffer erfolgte im Sammelgel für 5 - 10 min bei 60 V, im Trenngel für 40 - 60 min bei 120 V.

Sammelgel: 5% (v/v) Acrylamid, 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED

Trenngel: 15% (v/v) Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED

2x Laemmli-Puffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β -Mercapto-ethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Elektrodenpuffer: 24,8 mM Tris-Base, 191,8 mM Glycin, 3,5 mM SDS

2.11.2 *Clear native* PAGE

Der Vorteil einer nativen Gelelektrophorese ist, dass die Auftrennung der Proteine und Peptide über die Ladung und Größe erfolgt. Zusätzlich sollten keine Konformationsänderungen durch das Gel erzeugt werden. Da normalerweise keine Substanzen, die die Eigenladung der Proteine überdecken, zugesetzt werden, wandern positiv geladene Proteine in Richtung der Kathode und gehen verloren.

Die *clear native* PAGE wurde von Frau Dr. I. Wanke, Tübingen, durchgeführt.

Sammelgel: 0,5 M 6-Aminocaprinsäure (pH 7,0), 50 mM Bis-Tris (pH 7,0), 3,8% (v/v) Acrylamid, 0,08% (w/v) APS, 0,2% (v/v) TEMED

Trenngel: 0,5 M 6-Aminocaprinsäure (pH 7,0), 50 mM Bis-Tris (pH 7,0), 13% (v/v) Acrylamid, 0,0625% (w/v) APS, 0,03125% (v/v) TEMED

Anodenpuffer: 50 mM Bis-Tris (pH 7,0)

Kathodenpuffer: 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris

2x Probenpuffer: 1 M 6-Aminocaprinsäure, 100 mM Bis-Tris (pH 7,0), 100 mM NaCl, 20%

(v/v) Glycerol

2.12 Western Blotting

Mit dieser Methode werden Proteine, welche auf eine Trägermembran übertragen (Blotting) wurden, nachgewiesen. Nach dem Auftrennen der Proteine/Peptide in einem gelelektrophoretischen Verfahren werden diese auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran übertragen. Vor dem Einsatz der Antikörper werden mit Hilfe einer Blockierungslösung freie Bindungsstellen der Membran blockiert. Der Nachweis des gewünschten Proteins/Peptids erfolgt mit einem primären Antikörper. Im Anschluss wird die Membran mit einem sekundären Antikörper, welcher den Primärantikörper erkennt und bindet, behandelt. Für die Detektion der Proteinbanden ist der Sekundärantikörper mit einem Enzym gekoppelt. Dieses Enzym führt zu einer Farb- oder Chemilumineszenzreaktion, welche die Banden sichtbar macht.

2.12.1 Proteintransfer

Nach der Auftrennung der Peptide mittels Gelelektrophorese wurden die Gele für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Peptide mit dem Semi-Dry Blotter für 1 h bei einer Stromstärke von 150 mA/Gel auf eine PVDF Membran (Roche, Deutschland) transferiert.

Vor dem Proteintransfer wurde die Membran in Methanol aktiviert (10 sek) und in Transferpuffer inkubiert.

Transferpuffer: 38,6 mM Glycin, 47,9 mM Tris-Base, 1,3 mM SDS, 20% Methanol

2.12.2 Immundetektion

Die Membran, auf welche die Peptide transferiert wurden, wurde kurz in 1x PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte das Absättigen von unspezifischen Bindestellen durch Zugabe der Blockierungslösung für mindestens 1 h bei RT. Die Inkubation mit dem Primärantikörper G-81 (1:3500 Verdünnung; siehe 2.5) erfolgte bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für mindestens 10 min bei RT mit 1x PBS-T gewaschen und anschließend mit dem AP-konjugierten Sekundärantikörper (1:10 000 Verdünnung; siehe 2.5) für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut 3x für mindestens 10 min mit 1x PBS-T gewaschen und folgend kurz im Äquilibriumspuffer geschwenkt. Anschließend wurde auf die Membran CDP-Star (1:200 in Äquilibriumspuffer; Roche, Deutschland) pipettiert, für 10 min inkubiert und danach wurde die restliche Flüssigkeit entfernt. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert das CDP-Star, wobei Chemilumineszenz freigesetzt wird. Diese kann über

Autoradiografie (SuperRX, Fujifilm, Deutschland) nachgewiesen werden.

Die verwendeten Antikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt.

1x PBS-T: 0,13 M NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4), 0,05% (v/v) Tween20

Blockierungslösung: 10% Milchpulver (w/v) in 1x PBS-T

Äquilibrierungspuffer: 0,1 M Tris-Base, 0,1 M NaCl (pH 9,5)

2.13 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*) beruht auf Unterschiede in der Molekülgröße, wobei eine Trennung der Moleküle in einem porösen Material erfolgt. Größere Moleküle wandern schneller durch das Material und werden früher eluiert, weil sie nicht in den Poren aufgehalten werden. Je kleiner das Molekül, desto langsamer wandern die Teilchen und die Elution verzögert sich.

Für die Größenausschlusschromatographie wurde die SuperdexTM Peptide (10/300 GL) Säule (GE Healthcare, Deutschland) verwendet. Diese Säule ist besonders für eine gute Auftrennung von niedermolekularen Peptiden/Proteinen geeignet.

Die Säule wurde über Nacht mit dem Laufpuffer äquilibriert. Vor der Charakterisierung des Molekulargewichts von DCD-IL wurde die Säule unter Verwendung von Eichsubstanzen (Tabelle 2.5) mit bekanntem Molekulargewicht kalibriert. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min und die Detektion erfolgte bei 214 nm (L-4000 UV Detector, Merck-Hitachi, Deutschland).

Tabelle 2.5: Übersicht der Eichsubstanzen

Substanz	Myoglobin	Cytochrom C	Vitamin B12
Molekulargewicht [kDa]	16,9	12,4	1,35

Nach der Kalibrierung wurden verschiedene DCD-Peptide unter identischen Bedingungen chromatographiert und mit Hilfe eines Schreibers (D-2500 Chromato-Integrator, Merck-Hitachi, Deutschland) dokumentiert.

Laufpuffer: Dulbecco's PBS (Biochrom AG, Deutschland)

2.14 Herstellung von Liposomen

Liposomen sind kleine, kugelförmige Vesikel aus einer Phospholipid-Doppelschicht. Diese Struktur ist der von Zellmembranen ähnlich und ist daher als Modell für biologische Membranen geeignet.

Lipide, die als Pulver gekauft wurden, wurden zuerst in einem Gemisch aus Chloroform:Methanol (1:1, v/v) gelöst. Einige Lipide wurden in Chloroform gelöst erworben. Zur Erzeugung von Lipid-Gemischen wurden Aliquots der jeweiligen Lipide miteinander vermischt und gründlich gevortext.

Zur Herstellung der Liposomen wurden die Lösungsmittel mit einem sanften N₂-Strom entfernt bis ein feiner Lipidfilm entstand. Der Film wurde über Nacht zur kompletten Trocknung unter Vakuum gestellt. Am folgenden Tag wurden die Lipidfilme in Puffer - je nach Methode - gelöst und durch Vortexen homogenisiert (7 - 10x für 1 min). Um Vesikel zu formen, wurde 7x der *freeze-thaw*-Zyklus durchgeführt. Dabei werden die Liposomen im Wechsel schnell erwärmt (45°C im Heizblock) und abgekühlt (flüssiger N₂). Im Anschluss wurden die Proben ins Ultraschallbad gestellt.

Für die Ionenefflux-Experimente wurden die Lipide zusätzlich mit einem Extruder (Avanti[®] Mini-Extruder, Avanti[®] Polar Lipids Inc., USA) behandelt. Hierzu wurde die Lipidlösung 1lx nach der Avanti-Anleitung extrudiert, wobei ein MF-Millipore[™] Membranfilter (Millipore, Deutschland) mit einem Durchmesser von 0,1 µm verwendet wurde.

2.15 *Cross-Linking*

Beim *Cross-Linking* (deutsch: Quervernetzung) werden mindestens zwei Moleküle über eine kovalente Bindung miteinander vernetzt. Als Initiator werden sogenannte *Cross-Linker* eingesetzt. Diese chemischen Substanzen besitzen reaktive Enden, die spezifisch an funktionellen Gruppen von Aminosäuren (z.B. Amine, Sulfhydryl) von Proteinen oder Peptiden ansetzen. Die reaktiven Enden sind in der Regel durch einen *Spacer* unterschiedlicher Länge voneinander getrennt. Die Methode des *Cross-Linking* wurde ein bedeutendes Werkzeug zur Untersuchung von intra- und intermolekularen Protein-Protein-Interaktionen. Beim intramolekularem *Cross-Linking* können Rückschlüsse auf die Konformation des Proteins oder Peptids gezogen werden, beim intermolekularem *Cross-Linking* auf interagierende Sequenzen innerhalb eines Proteinkomplexes [68, 127, 179].

Die verwendeten *Cross-Linker* wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. (Pierce Protein Biology Products, USA) bezogen.

2.15.1 *Cross-Linker* DSS

DSS (Suberinsäurebis-(N-hydroxysuccinimidester) bzw. Disuccinimidylsuberat) ist ein wasserunlöslicher und somit membranpermeabler *Cross-Linker*. An beiden Enden des *Spacers* befinden sich reaktive N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester, Abb. 2.1), welche mit primären Aminogruppen von Proteinen und Peptiden bei pH 7 - 9 reagieren und dabei stabile Amidbindungen ausbilden. Aufgrund der lipophilen Eigenschaft können intrazelluläre oder membranständige Proteine quervernetzt werden.

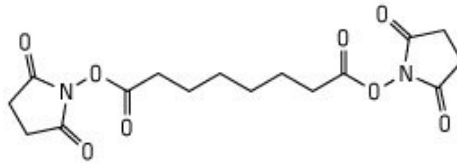


Abbildung 2.1: Strukturformel des *Cross-Linkers* DSS.

Vor jedem Versuch wurde DSS frisch in DMSO nach Herstellerangaben gelöst.

2.15.2 *Cross-Linker* BS³

Bei BS³ (Suberinsäurebis(3-sulfon-N-Hydroxysuccinimidester) bzw. Bis(sulfonsuccinimidyl) suberat) handelt es sich um das wasserlösliche Analog zu DSS. Dieser *Cross-Linker* besitzt wegen den Sulfon-NHS-Estern (Abb. 2.2) die gleiche Reaktivität gegenüber primären Aminogruppen. Aufgrund der Wasserlöslichkeit kann BS³ Membranen nicht durchdringen und wird somit für die Quervernetzung von Proteinen und Peptiden an der Oberfläche von Membranen verwendet. Zusätzlich können diese Reaktionen unter physiologischen Bedingungen ablaufen.

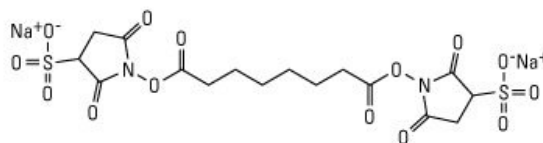


Abbildung 2.2: Strukturformel des *Cross-Linkers* BS³.

Vor jedem Versuch wurde BS³ frisch in Aqua dest. nach Herstellerangaben gelöst.

2.15.3 Durchführung des *Cross-Linking*-Versuches

Das *Cross-Linking* Experiment sollte bei der Aufklärung folgender Fragen beitragen: (A) Gibt es eine bevorzugte Konformation von DCD-1L? (B) Kann eine Aussage über die Orientierung von DCD-1L an artifiziellen Membranen getroffen werden?

Um die Fragen zu beantworten wurden zwei *Cross-Linker* mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet (DSS: lipophil; BS³: hydrophil). Die Durchführung des Versuches erfolgte einerseits ohne Zugabe eines Lipids als Kontrolle sowie mit Lipid (POPG). Zur Anwendung kamen POPG-Liposomen, welche wie unter 2.14 beschrieben, hergestellt wurden. Im Reaktionsansatz wurde ein Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1:50 eingestellt und der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei RT inkubiert. Die beiden *Cross-Linker* wurden entsprechend der Herstellerangaben stets frisch gelöst und ebenfalls auf ein Peptid-zu-*Cross-Linker*-Verhältnis von 1:50 eingestellt und zum Reaktionsansatz pipettiert. Die Reaktion wurde bei RT durchgeführt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt. Hierbei wurde 50 mM Tris (pH 7,5) verwendet, um einen Überschuss an freien Aminen zu erzeugen. Zusätzlich wurde das Reaktionsgefäß sofort auf Eis überführt. Um das *Cross-Linking* sichtbar zu machen, wurde eine SDS-PAGE und Western Blotting (Vgl. 2.11.1 & 2.12) durchgeführt.

Puffer: 20 mM Natriumphosphat (pH 7,0), 150 mM NaCl

2.16 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie können Konformation sowie Sekundärstrukturelemente (z.B. α -Helix, β -Faltblatt) von Peptiden bestimmt werden. Hierbei wird die unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisierendem Licht durch eine optisch aktive Substanz genutzt. Im fernen UV-Bereich (170 - 250 nm) kann die Sekundärstruktur aufgrund der Peptidbindung bestimmt werden, wobei die einzelnen Strukturelemente unterschiedliche Spektren aufzeigen (Abb. 2.3).

Die Messung der CD-Spektren erfolgte in einem Spektropolarimeter Model J-810 von Jasco in einer Küvette (0,01 cm) innerhalb eines Wellenlängenbereichs von 190 - 250 nm, wobei vom Probenspektrum das entsprechende Referenzspektrum (ohne Peptid) abgezogen wurde. Folgende Parameter wurden für die Messungen eingestellt:

Empfindlichkeit:	niedrig
Wellenlängen-Messbereich:	190 - 250 nm
Messgeschwindigkeit:	200 nm/min
Messmodus:	kontinuierlich
Response-Zeit Detektor:	2 sek
Abstand Datenpunkte:	0,1 nm
Bandbreite:	1 nm
Mittelung von 10 Spektren	

Die Proben wurden bei einer Temperatur von 25°C, welche oberhalb des Phasenübergangs

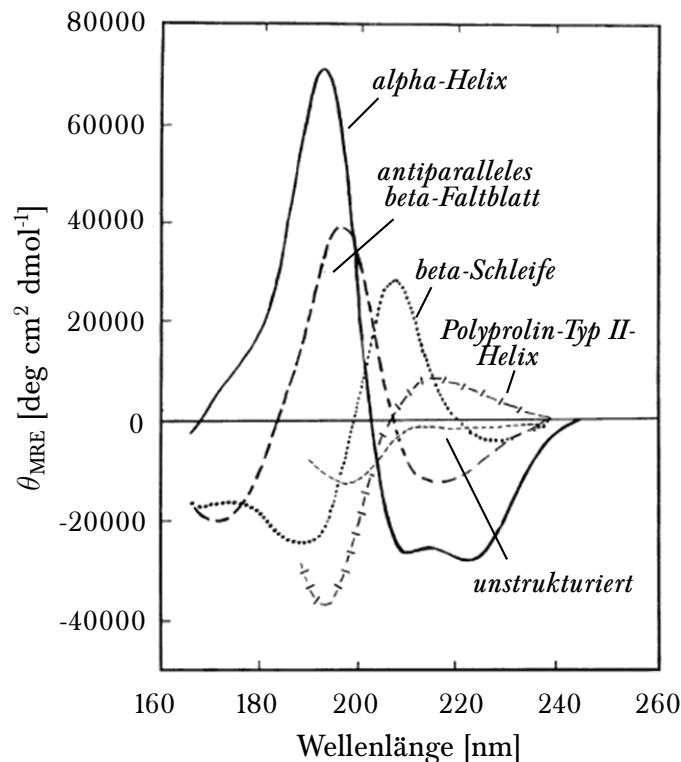


Abbildung 2.3: Charakteristische CD-Spektren der verschiedenen Sekundärstrukturen von Proteinen [modifiziert nach [88]].

der verwendeten Lipide liegt, vermessen.

2.16.1 CD-Spektroskopie mit Detergenzien

Die Detergenzien Dodecyl- β -maltosid (DDM; w/v) und Lauryldimethylamin-oxid (LDAO; v/v) wurden auf 0,3% in H₂O verdünnt und gut durchmischt. Anschließend wurden je 40 μ M DCD-1L zu den Lösungen gegeben, gevortext und gemessen (2.16).

2.16.2 CD-Spektroskopie mit Liposomen

Die Phospholipide POPG und POPE wurden im Verhältnis 3:7 (mol/mol) gemischt. DCD-1L wurde zu den Lipiden POPG, DPhPC und POPG/POPE in einem Verhältnis von 1:50 (P/L) pipettiert und gevortext. Das Chloroform, in dem die Phospholipide gelöst waren, wurde mit einem sanften N₂-Strom entfernt. Um ein vollständiges Entfernen des organischen Lösungsmittels zu erreichen, wurden die Proben über Nacht lyophilisiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in 50 mM Natriumphosphat (pH 6,0) und 20 mM NaCl resuspendiert und 10x 1 min gevortext. Im Anschluss erfolgte die Messung am Spektropolarimeter (2.16).

2.16.3 CD-Spektroskopie mit TFE

Dieser Versuch wurde in Anlehnung an die DOSY-NMR (2.19) durchgeführt. Je 50 μM DCD-1L wurden in 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) gelöst und unter einem sanften N_2 -Strom sowie zusätzlich über Nacht unter Vakuum getrocknet. Am nächsten Tag wurde das Peptid in 0% - 70% TFE resuspendiert und im Spektropolarimeter gemessen (2.16).

Zusätzlich wurde ein weiterer Ansatz angefertigt, bei dem der Einfluss von Ionen getestet werden sollte. Dazu wurde zu DCD-1L 500 μM ZnSO_4 gegeben und wie oben beschrieben verfahren.

0% - 70% TFE in deionisiertem Wasser

2.17 Orientierte CD-Spektroskopie

Bei der OCD-Spektroskopie, welche auf den Prinzipien der CD-Spektroskopie basiert, erhält man eine Aussage zur räumlichen Anordnung von helikalen Peptiden in orientierten Lipidmembranen [20]. Sie beruht darauf, dass für die in einer α -Helix vorkommenden elektronischen Übergänge Übergangsdipolmomente der Peptidbindungen existieren, die entweder senkrecht oder parallel zur Helixachse polarisiert sind. Aufgrund der Orientierung der Helix zum zirkular polarisierten Lichts kommt es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen dem Übergangsdipolmoment und dem elektrischen Feld des Lichtes (Feldvektor \vec{E}). Diese Wechselwirkungen spiegeln sich im OCD-Spektrum wider (Abb. 2.4).

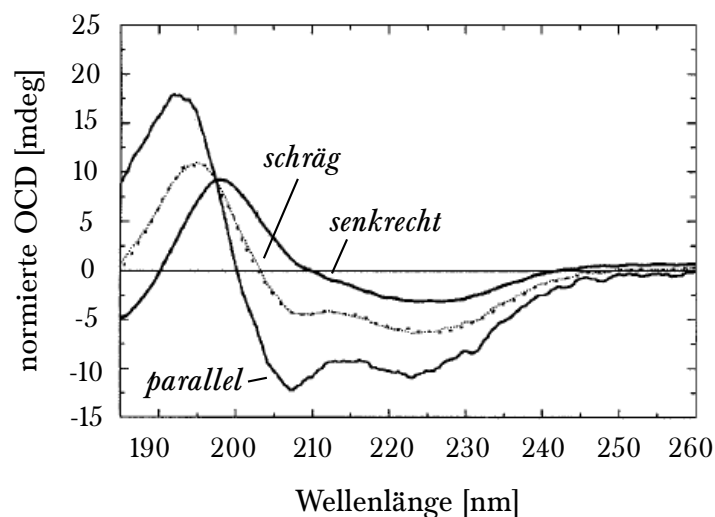


Abbildung 2.4: OCD-Spektren von helikalen Peptiden in orientierten Membranen. Aufgrund des „Fingerabdrucks“ bei 208 nm können die Orientierungen parallel, senkrecht (transmembran) oder schräg zur Membrannormalen unterschieden werden [modifiziert nach [180]].

Die Messungen für die OCD-Spektroskopie wurden von Herrn Dr. J. Bürck (AG Prof. A.S. Ulrich, KIT) mit einer eigens für diese Messung konstruierten OCD-Zelle durchgeführt [18]. Zum einen kann die Temperatur kontrolliert werden, zum anderen kann die Probe durch Rotation der OCD-Zelle um den Lichtstrahl unter 8 verschiedenen Winkeln (in 45° Schritten [20]) gemessen werden, wobei pro Winkel 3 Messungen gemittelt wurden. Abschließend wurden die Spektren über alle Winkel gemittelt, so dass Artefakte abgeschwächt wurden. Vom gemittelten Probenpektrum wurde das Referenzspektrum (ohne Peptid) abgezogen.

Für die OCD-Spektroskopie wurden SUVs (*small unilamellar vesicles*) aus POPG und DMPC/DMPG (1:1, mol/mol) hergestellt (Vgl. 2.14), wobei die Lipidfilme in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gelöst wurden. DCD-1L wurde ebenfalls in 10 mM Na-phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst (Stocklösung: 0,2 mM). Je ein Aliquot der Peptid-Stammlösung wurde zu je einem Aliquot der Lipid-Liposomen in einem Verhältnis von 1:50 (P/L, mol/mol) pipettiert. Das Gemisch wurde auf eine Quartzplatte (Durchmesser \sim 20 mm; Suprasil QS, Hellma Optik GmbH Jena, Deutschland) pipettiert und vollständig im Luftstrom getrocknet. Die Rehydratisierung bei einer Luftfeuchtigkeit von 97% (gesättigte K_2SO_4 -Lösung) und einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur erfolgte innerhalb der OCD-Zelle für ca. 15 h. Die OCD-Zelle wurde in das Spektropolarimeter Model J-810 von Jasco eingebracht und folgende Parameter für die Messung eingestellt:

Empfindlichkeit:	niedrig
Wellenlängen-Messbereich:	185 - 260 nm
Messgeschwindigkeit:	10 nm/min
Messmodus:	kontinuierlich
Response-Zeit Detektor:	8 sek
Abstand Datenpunkte:	0,1 nm
Bandbreite:	1 nm
Mittelung von 3 Spektren pro Winkel	

Die Temperatur während der Messung lag konstant bei 20°C (POPG) bzw. 30°C (DMPC/DMPG).

2.18 Leitfähigkeitsmessung am Bilayer

Die porenbildende Aktivität von DCD-1L wurde mit Hilfe von künstlichen Lipidbilayermembranen (*black lipid bilayers*) gemessen. Hierbei wird über ein Loch in der Trennwand zweier wässriger Kompartimente ein Lipidfilm erzeugt. Der entstandene Bilayer besitzt die Dicke einer natürlichen Membran (ca. 6 nm) und erscheint schwarz [173]. In die Kompartimente wird eine Elektrolytlösung gefüllt und mit Ag/AgCl-Elektroden kann der Stromfluss gemessen werden (Abb. 2.5). Bauen sich nach der Zugabe eines Porenbildners Kanäle in die Membran

ein, erhöht sich der Stromfluss, die Leitfähigkeit verändert sich und mittels entsprechender Messapparatur können diese Veränderungen registriert und ausgewertet werden.

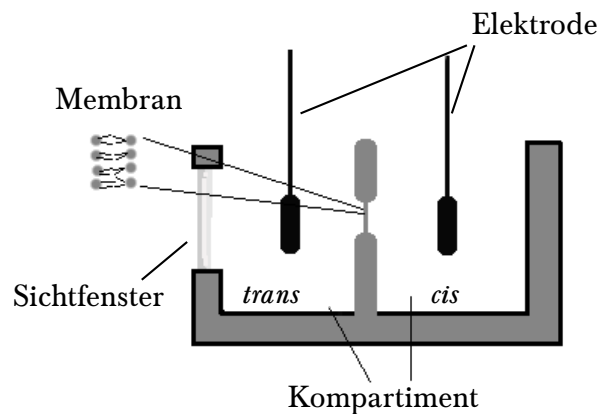


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau der Bilayer-Messapparatur.

Zur Messung der Leitfähigkeit und damit der kanalbildenden Aktivität von DCD-IL in DPhPC-Membranen wurde die *painting*-Methode verwendet [113]. Eine 1%ige DPhPC-Lösung (w/v) in einem 1:1-Gemisch (v/v) aus Methanol und Chloroform wurde über die kleine Öffnung ($\varnothing 150 \mu\text{m}$) in der Teflonküvette, welche die beiden Kompartimente trennt, gezogen. Nach dem Trocknen wurden die Kompartimente mit einer Elektrolytlösung gefüllt. Das Peptid wurde zur *cis* Kammer pipettiert und die Lösung wurde kurz gerührt. Anschließend wurde mit einem Pinsel die zweite Schicht des Bilayers aufgetragen, welche aus 1% DPhPC (w/v) in einem 9:1-Gemisch (v/v) aus n-Decan und Butanol bestand.

In die elektrolytgefüllten Kammern wurden Ag/AgCl-Elektroden gehängt, wobei eine Elektrode an die Spannungsquelle angeschlossen war, der durch die Membran fließende Strom wurde durch die zweite Elektrode abgeleitet. Diese ist mit der BLM workstation (Warner Instruments) verbunden, wo das Stromsignal verstärkt (BC-535 Amplifier) und gefiltert (LPF-8 Bessel Filter) wurde. Anschließend konnte das Signal mittels einem Digitalisierer sichtbar gemacht und die erhaltenen Daten mit Hilfe der pCLAMP10.0 Software (Molecular Devices) ausgewertet werden.

Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und mit frisch angesetzten Lösungen.

2.18.1 Einzelkanalmessungen

Die Bestimmung der Einzelkanalfähigkeit von DCD-IL wurde in 1 M KCl und 10 mM MES (pH 6,0) durchgeführt. Die Richtungsabhängigkeit wurde durch das Anlegen von Spannungen zwischen -100 mV bis +100 mV ermittelt. Um eine hinreichend große Anzahl an Ereignissen für die statistische Auswertung zu bekommen, wurden mindestens 75 Ereignisse (Veränderung der Leitfähigkeit) ausgewertet.

2.18.2 Statistik

Für die statistische Auswertung der Einzelkanalmessungen wurden zwei verschiedene Modelle angewandt und gegeneinander verglichen. Als 1. Modell wurde der Zusammenhang zwischen Spannung und Stromstärke (Ohm'sche Gesetz) ermittelt, wobei die lineare Kurve durch den Nullpunkt geht. Bei dem 2. Modell handelt es sich um ein Sättigungsmodell mit einem Hyperbeltangens in Form einer um den Ursprung symmetrischen sigmoidalen Kurve. Die Statistik wurde von Herrn Dr. M. Habeck (Max-Planck-Institut, Tübingen) durchgeführt.

2.18.3 Messung der Ionenselektivität

Die Messung der Ionenselektivität erfolgte in 1 M LiCl und 10 mM MES (pH 6,0) sowie in 1 M Kaliumacetat und 10 mM MES (pH 6,0). Es wurde eine Spannung von +20 mV angelegt und mindestens 100 Ereignisse ausgewertet.

2.18.4 Messung der pH-Abhängigkeit

Der Einfluss des pH-Wertes auf die kanalbildende Aktivität von DCD-IL wurde unter Verwendung verschiedener Puffer getestet. Untersucht wurde die Aktivität in Anwesenheit von 1 M KCl sowie 10 mM MES (pH 6,0), 10 mM MOPS (pH 7,0) oder 10 mM Tris (pH 8,0). Bei der Messung wurde eine Spannung zwischen -100 mV bis +100 mV angelegt und mindestens 75 Ereignisse ausgewertet.

2.19 DOSY-NMR

Für die dreidimensionale Bestimmung der Struktur von Proteinen mit atomarer Auflösung ist die Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) eine häufig verwendete Methode. Auch die dynamische Seite der Struktur wie Konformationsänderungen können bestimmt werden. Ein großer Vorteil der NMR-Spektroskopie liegt in der Möglichkeit, Proteine unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu betrachten.

Das Prinzip der NMR-Spektroskopie beruht auf dem Vorhandensein eines Kernspins (Eigenrotation) in einigen Atomkernen. Wird ein externes Magnetfeld angelegt, kann sich das magnetische Moment des Kernspins parallel (niedrige Energie) oder anti-parallel (hohe Energie) orientieren. Durch das Einstrahlen von Radiowellen (Puls) wird ein Übergang zwischen den Energieniveaus induziert, Energie wird beim Übergang in den hoch energetischen Zustand absorbiert und gemessen, wobei ein NMR-Spektrum erzeugt wird [8].

Bei der hier verwendeten DOSY-NMR (*diffusion ordered spectroscopy*) handelt es sich um eine zweidimensionale NMR. Die erste Dimension betrachtet die chemische Verschiebung, die

zweite das Diffusionsverhalten, welches in Abhängigkeit von individuellen Moleküleigenschaften (z.B. Größe, Ladung) sowie von der Umgebung ist [75, 81, 112].

Die Messungen wurden von Herrn Dr. S. Özdirekcan am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Abteilung Proteinevolution, Tübingen durchgeführt.

Für die Erstellung der NMR Proben wurden 0,5 mM DCD-1L in TFE gelöst, mit einem sanften N₂-Strom und zusätzlich über Nacht unter Vakuum getrocknet. Das Peptid wurde am nächsten Tag entweder in 10% Deuteriumoxid (²H₂O 99,9%; Sigma-Aldrich) oder in 20% - 70% deuteriertem TFE (TFE-²H₃ 99%; Cambridge Isotope Laboratories Inc.) in einem Probenvolumen von 0,5 ml resuspendiert. Ein gleicher Probenansatz wurde mit dem Zusatz von 5 mM ZnSO₄ angefertigt, um den Einfluss von Ionen zu testen. Dazu wurde das Salz zusammen mit dem Peptid in dem jeweiligen Lösungsmittel resuspendiert.

Die NMR Spektren wurden bei 298,15 K mit einem 600 MHz Bruker US Plus AVANCE III (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland) erstellt. Das NMR Spektrometer ist mit einer 5 mm dreifach-Resonanz invers TXI Sonde (¹H, ¹³C, ¹⁵N) ausgerichtet an einer Gradienten-Magnetspule (Z-Achse) ausgestattet. Die Aufbereitung und Analyse der Daten erfolgte mit der TopSpin Software (TopSpin V.2.1.1, Bruker BioSpin GmbH).

10% Deuteriumoxid in deionisiertem Wasser

20% - 70% deuteriertes TFE in deionisiertem Wasser

2.20 Rasterkraftmikroskopie

Mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (*atomic force microscope*, AFM) wird eine zu untersuchende Probenoberfläche zeilenweise mit einer feinen Spitze abgetastet. Diese Spitze ist an einem Federbalken (*cantilever*) befestigt, welcher sich je nach Oberflächenbeschaffenheit verbiegt. Diese Verbiegung wird von einem Detektor registriert, die Information von der Steuerelektronik ausgewertet und bildlich dargestellt.

Die Rasterkraftmikroskopie wurde am Forschungszentrum Borstel - Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften von Frau A. Kopp (AG Prof. T. Gutschmann) durchgeführt.

2.20.1 AFM mit Bakterien

S. aureus 113 WT wurde in LB-Medium bei 37°C und 150 Upm über Nacht inkubiert. Von der Übernachtskultur wurde eine 1:100-Verdünnung in frischem LB-Medium angesetzt und bis zur exponentiellen Phase inkubiert. 2 ml der Kultur wurden zentrifugiert, mit Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in Puffer auf eine Zellzahl von 6x10⁸ Zellen/ml eingestellt. Ein Teil der Bakterien wurde ohne Peptid bei 37°C inkubiert, ein weiterer Teil mit

62,3 μM DCD-IL bei 37°C. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 30 min. Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf ein Mica-Plättchen überführt, luftgetrocknet, die restliche Flüssigkeit nach 15 - 20 min mit einem feinen Tuch entfernt und für 24 h bei RT komplett getrocknet. Die Bakterien wurden mit dem MFP-3D Mikroskop (Asylum Research, USA) ausgewertet, wobei die Betriebsart im Kontaktmodus lief (CSG11-A *cantilever*, $k = 0,1$ N/m; NT-MDT, Russland). Die Aufbereitung der Bilder erfolgte mit der MFP-3D Software unter IGOR Pro (WaveMetrics, USA).

Puffer: 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7,0)

2.20.2 AFM mit Liposomen

Für die Herstellung von Liposomen kam das Lipid POPC zur Anwendung (siehe 2.14). 100 μl der POPC Liposomen (0,1 mg/ml) wurden auf ein Mica-Plättchen überführt und luftgetrocknet. Nach 30 min wurden 2 ml Puffer auf die Liposomen pipettiert. Die Auswertung erfolgte mit dem MFP-3D Mikroskop unter Verwendung des AC Modus (OMCL RC800 PSA *cantilever*; Olympus, Japan) sowie der MFP-3D Software unter IGOR Pro.

DCD-IL wurde in einer Endkonzentration von 2 μM eingesetzt.

Puffer: 50 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaCl (pH 6,0)

2.21 Bestimmung der Ionenselektivität

Für die Identifizierung der Ionen, welche durch einen potenziellen Kanal wandern können, wurde mit der Etablierung eines Liposomenexperiments mit eingeschlossenem Ionenindikator begonnen. Liposomen sind aufgrund ihrer zellmembranähnlichen Struktur ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Ionenselektivität von kanalbildenden Proteinen.

2.21.1 H^+ -Indikator Pyranin

Pyranin (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäuretrinitriumsalz, Abb. 2.6) ist ein wasserlösliches Fluorophor, welches nicht membranpermeabel ist. Pyranin ist ein Indikator für Protonen, deren Konzentration abhängig vom pH-Wert ist. In sauren Lösungen ist die H^+ -Konzentration höher als in basischen Lösungen. Aufgrund der unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsspektren in Abhängigkeit des vorhandenen pH-Wertes ist Pyranin ein häufig verwendeter H^+ -Indikator zur Bestimmung von pH-Veränderungen im Bereich von 5 bis 8 in intrazellulären und intravesikulären Systemen [2, 58, 85].

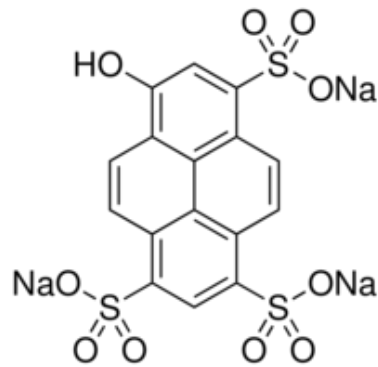


Abbildung 2.6: Strukturformel des Fluorophors Pyranin.

Vor Beginn des Versuches mit Liposomen wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Pyranins am Spektropolarimeter FP-6500 von Jasco ermittelt, da es zu Abweichungen kommen kann. Hierzu wurden je 500 μM Pyranin in 10 mM MES (pH 6.0), 10 mM MOPS (pH 7.0) und 10 mM Tris (pH 8.0) eingestellt. Die Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren erfolgte bei den in der Literatur angegebenen Wellenlängen ($\lambda_{\text{Ex1}} = 415$ nm; $\lambda_{\text{Ex2}} = 460$ nm; $\lambda_{\text{Em}} = 507$ nm) und die Wellenlängen für das Spektropolarimeter FP-6500 wurden aus den Spektren ermittelt [2]. Für die Messung wurden folgende Parameter eingestellt:

Messmodus:	Anregungs- oder Emissionsspektrum
Empfindlichkeit:	normal
Wellenlängenbereich:	300 - 500 nm
Bandbreite (Ex)	3 nm
Bandbreite (Em)	3 nm
Messgeschwindigkeit:	500 nm/min
Response-Zeit Detektor:	1 sek
Abstand Datenpunkte:	1 nm

2.21.2 Herstellung der mit Pyranin gefüllten Liposomen

Für die Etablierung eines Systems wurden Liposomen aus Phosphocholin und Phosphatid-säure (PC:PA) in einem Verhältnis von 1:20 angefertigt. Die Membranbestandteile stammen aus dem Hühnereigelb.

Die Substanzen wurden eingewogen, vermischt und in Aqua dest. gelöst. Dabei wurde eine Stocklösung von 10 mg/ml hergestellt. Diese Mischung konnte über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

Zur Herstellung der Liposomen wurde ein Aliquot (250 μl) des Lipidgemischs aufgetaut und mit Pyranin, Salz und Puffer versetzt. Im Anschluss wurde das Gemisch im Ultraschallbad

für 30 min bei 4°C und danach 8x im *freeze-thaw*-Zyklus behandelt. Um überschüssiges Pyranin abzutrennen wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde eine Sephadex-G75-Säule selbst hergestellt. Das Säulenmaterial wurde in Aqua dest. quellen gelassen, anschließend in eine entleerte PD10-Säule gefüllt, gewaschen und mit 80% Ethanol bei 4°C gelagert. Vor dem Auftragen der Probe wurde das Säulenmaterial für mindestens 1 h im Puffer äquilibriert, danach wurde die Probe auf das Material gleichmäßig pipettiert und die Liposomen aufgefangen.

Liposomengemisch: 5 mg/ml PC:PA, 250 µM Pyranin, 150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat (pH 8.0)

Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat (pH 8.0)

2.21.3 Messung des H⁺-Austauschs

Für die Untersuchung des Ionenaustauschs durch von DCD-1L induzierte Kanäle musste ein pH-Unterschied zwischen dem Puffer innerhalb bzw. außerhalb der Liposomen erzeugt werden. Dabei wurde der pH innerhalb der Liposomen auf pH 8,0 eingestellt, der äußere auf pH 6,0.

Vor der eigentlichen Messung wurde der äußere Puffer vermessen, um Störsignale auszuschließen. Im Anschluss wurden die Liposomen ohne Zugabe von Peptiden gemessen, um einen durch den pH-Gradienten induzierten H⁺-Strom auszuschließen. Dazu wurden die Liposomen 1:8 in den äußeren Puffer vermischt und im Spektropolarimeter FP-6500 von Jasco gemessen. Zur Kontrolle der Membranstabilität wurden die Messungen der Liposomen ohne Peptide auch zu späteren Zeitpunkten durchgeführt. Für die Messungen mit Peptid wurden DCD-1L und Gramicidin in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Zugabe des jeweiligen Peptids erfolgte 80 sek nach Beginn der Messung, wobei eine komplette Messung 580 sek dauerte. Es wurden folgende Parameter am Spektropolarimeter eingestellt:

Messmodus:	festgelegte Wellenlänge
Empfindlichkeit:	medium
Wellenlänge _{Ex1} :	404 nm
Wellenlänge _{Ex2} :	455 nm
Wellenlänge _{Em} :	511 nm
Bandbreite (Ex)	3 nm
Bandbreite (Em)	3 nm
Response-Zeit Detektor:	1 sek
Zyklusanzahl:	30
Zyklusintervall:	20 sek

Puffer innen: 10 mM Natriumphosphat (pH 8,0), 150 mM NaCl

Puffer außen: 50 mM Natriumphosphat (pH 6,0), 150 mM NaCl

2.22 Messung des Kaliumausstroms

Da der Anteil an Kalium (K^+) in Zellen relativ hoch ist, stellt die Messung des K^+ -Ausstroms nach Behandlung mit einem antimikrobiellen Peptid einen guten Indikator für die Störung der Membranstabilität dar [122, 174].

2.22.1 Kalibrierung der Elektroden

Die Kalibrierung der K^+ -Elektroden (MI-442 *potassium electrode*, MI-409F *reference electrode*, Microelectrodes Inc.), welche mit einem pH-Meter (pH 213, Hanna Instruments) verbunden waren, wurde stets vor jeder Messung mit frisch angesetzten Standard-Lösungen durchgeführt. Als Standards wurden 0,01 mM KCl, 0,1 mM KCl und 1 mM KCl - jeweils in Messpuffer angesetzt - verwendet. Zunächst wurden die Elektroden mindestens 1 h vor Beginn der Messung in Messpuffer gestellt, anschließend mit Aqua dest. gespült und mit einem feinen Tuch getrocknet. Die Elektroden wurden für 40 sek in die Standard-Lösungen getaucht, beginnend bei der niedrigsten Konzentration und direkt in die nächsthöhere überführt. Nach der letzten Messung wurden die Elektroden gespült und die Messung der Proben begonnen. Gemessen wurde der Stromfluss, welcher in einem linearen Zusammenhang zur Kaliumkonzentration im gemessenen Bereich steht.

Messpuffer: 300 mM Cholinchlorid, 30 mM MES, 20 mM Tris (pH 6,5)

Für einen weiteren Versuch wurde der Messpuffer zusätzlich mit 1,25 mM $MgCl_2$ und 1,25 mM $CaCl_2$ versetzt.

2.22.2 K^+ -Ausstrom aus Bakterien

Für den Versuch wurden die Bakterien *L. lactis ssp. cremoris HP* und *S. aureus* 113 WT verwendet. Die Übernachtskultur wurde je nach Spezies angesetzt und inkubiert (siehe 2.3). Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in 50 ml frisches Medium überführt und bis zu einer $OD_{600} = 1$ bis 1,5 inkubiert. Dann wurden die Zellen über Zentrifugation (4000 Upm, 3 min, 4°C) geerntet, mit 25 ml kaltem Messpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in Messpuffer auf eine $OD_{600} = 3$ resuspendiert und auf Eis gelagert.

Für die Messung wurden 200 μ l der Bakteriensuspension in 1800 μ l Messpuffer verdünnt. Die Zugabe des Peptids erfolgte 30 sek nach Beginn der Messung. Als Kontrollen wurden

unbehandelte Bakterien mitgeführt sowie Bakterien, welche mit den Positivkontrollen Nisin oder Gramicidin behandelt wurden.

Die Aufzeichnung der erhaltenen Daten erfolgte mit der HI92000 Software (Hanna Instruments, Deutschland), welche nach Orlov *et al.* ausgewertet wurden [122].

2.23 Einfluss von Dermcidin auf die Zellwandbiosynthese

Dieser Versuch wurde an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn von Frau D. Münch (AG Prof. H.-G. Sahl) durchgeführt.

2.23.1 *In vitro* Synthese und Reinigung von Lipid II

Die Lipid II-Synthese und Reinigung wurde durchgeführt wie bei Schneider *et al.* beschrieben [142]. Dabei handelt es sich um ein Protokoll basierend auf der Synthese von ^{14}C -Lipid II und dessen Modifikation zur Verbesserung der Ausbeute durch Zugabe von Undecaprenylphosphat ($\text{C}_{55}\text{-P}$) zum Reaktionsansatz [12, 14].

Die *in vitro* Synthese erfolgte in Anwesenheit einer Membranpräparation von *M. luteus* DSM 1790. Die Membran wurde gewonnen, indem die Zellen mit Lysozym behandelt, zentrifugiert (40 000 g) und das Pellet 2x mit 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 (pH 7.5) gewaschen wurde. Da die erhaltenen Membranen in ihren Syntheseleistungen variieren, wurden zuerst die optimalen Bedingungen durch Titration in einem analytischen Maßstab bestimmt. 200 μg der Membranpräparation wurden mit 5 nmol $\text{C}_{55}\text{-P}$, 50 nmol UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid und 50 nmol UDP-GLcNAc in 60 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 (pH 7,5) und 0,5% (w/v) Triton X-100 für 1 h bei 30°C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 50 μl . Für die Extraktion wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen n-Butanol/6 M Pyridinacetat (pH 4,2) versetzt und anschließend zentrifugiert (13 000 Upm, 3 min). Die lipidhaltige Butanol-Phase wurde abgenommen, auf eine Kieselgelplatte gespottet, getrocknet und dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (siehe 2.23.3).

Für die Synthese von Lipid II im mg-Bereich wurde der analytische Ansatz um das 250-fache gesteigert. Für die Extraktion wurde der Ansatz 2x mit dem Gemisch aus n-Butanol/Pyridinacetat (pH 4,2) versetzt und die abgenommenen Phasen vereint. Diese wurde anschließend mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Aqua dest. (pH 4,2) gewaschen. Die Reinigung erfolgte im Anschluss über einen Anionenaustauscher (HiTrap DEAE FF, Amersham Bioscience, Deutschland), wobei das Lipid II über einen linearen Gradienten (5 ml/min, in 3 h auf 25% Puffer B) eluiert wurde. Die Lösungsmittel wurden im Rotationsverdampfer abgetrennt, die wässrige Lösung über Nacht lyophilisiert und anschließend in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Konzentration der gereinigten Lipide wurde über die Messung des Phosphatgehalts nach Behandlung mit

Perchlorsäure bestimmt [132].

Für die Synthese von radioaktivem Lipid II wurde ^{14}C -UDP-GLcNAc verwendet.

Puffer A: Chloroform, Methanol, Wasser (2:3:1)

Puffer B: Chloroform, Methanol, 300 mM Ammoniumbicarbonat (2:3:1)

2.23.2 Inhibierung der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II *in vitro*

PBP2 ist ein essenzielles, bifunktionales Enzym der Zellwandbiosynthese in *S. aureus*. Es katalysiert sowohl die Transglykosilierung als auch die Transpeptidierung der Lipid II-Monomere zu polymeren Peptidoglykan.

Der Einfluss von Dermcidin auf die Reaktion wurde in einem *in vitro* Assay untersucht. Die PBP2-katalysierte Reaktion fand in einem Endvolumen von 50 μl statt und enthielt 7,5 μg PBP2-His6, 100 mM MES (pH 5,5) und 2 nmol Lipid II bzw. 2 nmol ^{14}C -markiertes Lipid II. Die Zugabe von DCD-IL erfolgte in unterschiedlichen molaren Verhältnissen bezogen auf Lipid II. Der Ansatz wurde für 2 h in einem Wasserbad (30°C) inkubiert und anschließend über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe 2.23.3).

Da einige antimikrobielle Peptide zweiwertige Ionen für ihre Aktivität benötigen, wurde der Versuch auch in Anwesenheit von 1,25 mM CaCl_2 durchgeführt.

2.23.3 Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurden Kieselgelplatten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 nm, Merck, Deutschland) zur Detektion von Lipid II verwendet. Für die Auftrennung kam das Laufmittel nach Rick *et al.* zum Einsatz, wobei die Auftrennung über polare Wechselwirkungen erfolgte [128]. Nach der Trocknung wurde die Kieselgelplatte in ein Färbebad überführt, danach bei 150°C für kurze Zeit bis zur Blaufärbung entwickelt.

Bei Versuchen mit radioaktiv-markierten Lipid II konnte eine quantitative Auswertung der Reaktion erfolgen. Hierzu wurden nach der Auftrennung die Kieselgelplatten über Nacht auf einen *Phosphor Storage Screen* (Amersham Biosciences, Deutschland) gelegt, mit einem Scanner ausgelesen und anschließend mittels der ID-Analyse Software ausgewertet.

Laufmittel: Chloroform, Methanol, Aqua dest., konzentriertes Ammonium-hydroxid (88:48:10:1 (v/v))

Färbebad: 2,5% Molybdätophosphorsäure (w/v) und 1% Cer(IV)-Sulfat (w/v) in 6% Schwefelsäure (v/v)

Wie der Abbildung 3.1(A) zu entnehmen ist, zeigen alle Algorithmen, dass DCD-1L α -helikale Bereiche aufweist. Hierbei handelt es sich um drei helikale Abschnitte, welche sich zwischen den einzelnen Algorithmen in der Länge unterscheiden. Andere Strukturen wie β -Faltblatt oder *Loops* wurden bei den Analysen nicht ermittelt.

DCD-1L besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,07, eine negative Ladung ($Q = -2$) bei pH 7,4 und besteht aus 29 polaren AS (60,42% inklusive Glycin) und 19 unpolaren AS (39,58%). Ob das Peptid in der Lage ist eine amphipathische Struktur einzugehen, wurde mit heliQuest untersucht (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) [46]. Dabei werden die Aminosäuren in einem sogenannten „*helical wheel plot*“ in Form einer Helix angeordnet. Der Abbildung 3.1(B) ist eine deutliche Unterteilung des Peptids in einen hydrophilen und hydrophoben Bereich zu entnehmen, was auf eine α -helikale amphipathische Struktur hinweist. Des Weiteren berechnet das heliQuest-Programm physiko-chemische Parameter eines Peptids (Abb. 3.1(C)). Die berechnete Hydrophobizität von $H = 0,206$ läßt auf einen geringen hydrophoben Charakter schließen. Dafür besitzt DCD-1L ein relativ hohes hydrophobes Moment ($\mu H = 0,453$).

3.1.2 Einfluss von Detergenzien auf die Sekundärstruktur

Detergenzien werden neben TFE häufig bei der CD-Spektroskopie zur Aufklärung der Sekundärstruktur verwendet.

Je 40 μM DCD-1L wurden entweder in Aqua dest., in 0,3% DDM oder 0,3% LDAO gelöst. Die aufgenommenen Spektren sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Das Spektrum mit DCD-1L gelöst in H_2O weist ein charakteristisches Minimum bei 198 nm auf. Dieses Spektrum entspricht dem ungefalteter Proteine/Peptide.

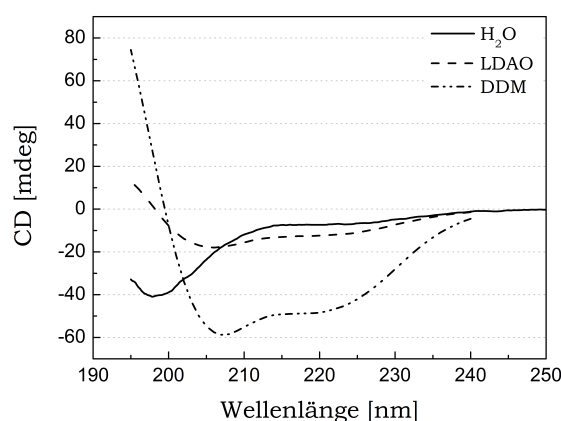


Abbildung 3.2: CD-Messung von DCD-1L (40 μM) in Anwesenheit von Detergenzien. In H_2O wurde ein charakteristisches Minimum bei 198 nm detektiert, welches sich in Anwesenheit von Detergenzien (je 0,3% DDM und LDAO in H_2O) in Richtung 208 nm und 222nm verschiebt.

Im Gegensatz dazu wurden nach der Zugabe von Detergenzien Spektren mit den charakteristischen Minima bei 208 nm und 222 nm detektiert, welche auf die Ausbildung einer α -helikale Sekundärstruktur schließen lassen.

3.1.3 Einfluss von TFE auf die Sekundärstruktur

Ein häufig verwendetes membranimitierendes Lösungsmittel, mit dem man eine Sekundärstruktur bei kleinen Proteinen und Peptiden induzieren kann, ist 2,2,2-Trifluorethanol (TFE). 50 μ M DCD-1L wurde entweder in Aqua dest. oder in TFE verschiedener Konzentrationen (10%, 30%, 50%, 70%) gelöst und vermessen. In H₂O gelöstes DCD-1L zeigte erneut das Spektrum ungefalteter Peptide (Abb. 3.3(A)). Die Zugabe von TFE führte zu einer dosisabhängigen Verschiebung der Minima in Richtung 208 nm und 222 nm, was auf die Induktion einer α -helikalen Sekundärstruktur von DCD-1L hinweist. Allerdings ist die Ausprägung bei 10% TFE sehr gering wie aus der Abbildung 3.3(A) ersichtlich ist. Der Hauptteil des Peptids liegt hier noch ungefaltet vor. Bei höheren TFE-Konzentrationen verschiebt sich das Minimum mehr zu 208 nm, welches bei 30% TFE noch nicht vollständig ausgeprägt ist (204 nm).

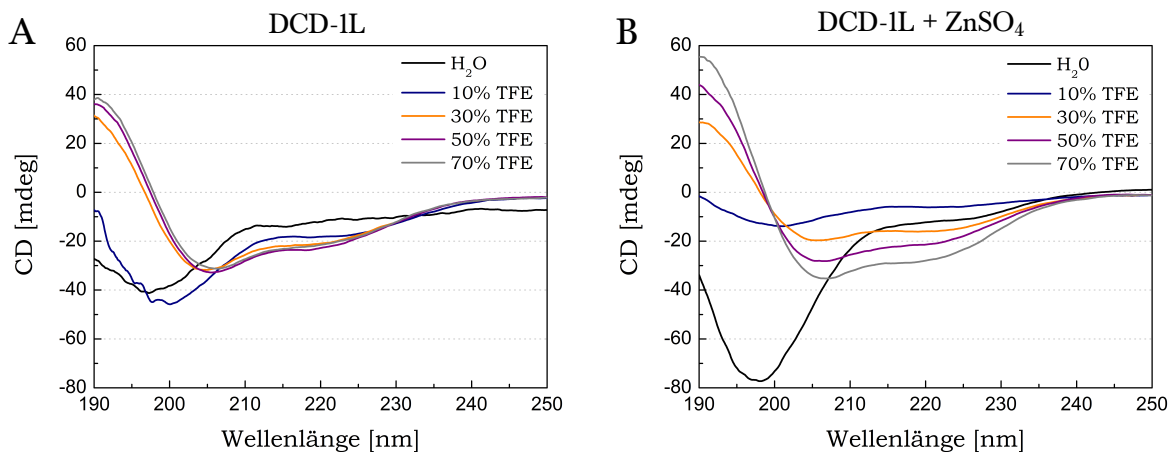


Abbildung 3.3: CD-Messung von DCD-1L in Anwesenheit von TFE. (A) 50 μ M DCD-1L wurden in verschiedenen TFE-Konzentrationen (10%, 30%, 50%, 70%) gelöst und das Spektrum vermessen, (B) 50 μ M DCD-1L wurde mit 500 μ M ZnSO₄ inkubiert, anschließend in TFE (10%, 30%, 50%, 70%) gelöst und das Spektrum vermessen. Durch das membranimitierende Lösungsmittel verschiebt sich das Minimum konzentrationsabhängig von 198 nm in Richtung 208 nm und 222 nm.

Im zweiten Ansatz wurde DCD-1L (50 μ M) mit je 500 μ M ZnSO₄ inkubiert und anschließend in den unterschiedlichen TFE-Konzentrationen gelöst und vermessen. Eine Inkubation des Peptids mit ZnSO₄ allein erzeugte erneut das Spektrum für ungefaltete Peptide mit einem Minimum bei 198 nm (Abb. 3.3(B)). Mit steigender TFE-Konzentration verschiebt sich das Spektrum in Richtung eines α -helikalen Spektrums, wobei das Minimum bei 208 nm erst

bei einem Anteil von über 30% TFE erreicht wird.

Die Ausprägung der Spektren in den zwei verschiedenen Ansätzen zeigt keine großen Unterschiede. Somit erfolgt eine vergleichbare Ausbildung der Sekundärstruktur unabhängig von der Zugabe eines Salzes (ZnSO_4).

3.1.4 Einfluss von artifiziellen Liposomen auf die Sekundärstruktur

Neben der Ausbildung einer α -helikalen Struktur in Anwesenheit von Detergenzien oder Lösungsmitteln, ist für die antimikrobielle Wirkung entscheidend, dass die Sekundärstruktur auch in Anwesenheit von Membranbestandteilen (z.B. Phospholipide) ausgebildet wird.

Hierfür wurde DCD-1L mit verschiedenen Liposomen in einem Verhältnis von 1:50 (P/L) inkubiert. Der Versuch wurde in 50 mM NaPO_4 (pH 6.0) und 20 mM NaCl durchgeführt, was die natürlichen Bedingungen imitieren sollte. Zum Einsatz kamen DPhPC (Bilayer-Versuch (3.4); zwitterionisch), ein Gemisch aus POPE/POPG (7:3; elektronegativ) sowie POPG (elektronegativ). Das Spektrum der Messung von DCD-1L allein in Puffer entspricht dem Spektrum ungefalteter Proteine (Minimum 198 nm), welches sich durch die Anwesenheit der Liposomen in ein α -helikales Spektrum veränderte (Abb. 3.4). Weiterhin ist zu erkennen, dass es zu einer unterschiedlich starken Ausprägung des α -helikalen Spektrums kam. Dieses war bei Verwendung von POPG-Liposomen am stärksten und bei DPhPC-Liposomen am schwächsten ausgeprägt.

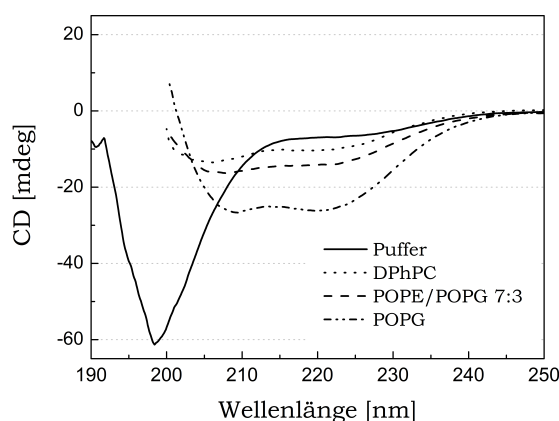


Abbildung 3.4: CD-Messung von DCD-1L in Anwesenheit von Liposomen. In Puffer wurde ein charakteristisches Minimum bei 198 nm detektiert. Die Anwesenheit verschiedener Liposomen (DPhPC, POPE/POPG 7:3, POPG; P/L 1:50) führte zu einer Veränderung der Minima in Richtung 208 nm und 222 nm, wobei das Spektrum bei POPG am stärksten ausgeprägt war. Der Versuch wurde unter Pufferbedingungen (50 mM NaPO_4 (pH 6.0), 20 mM NaCl) durchgeführt.

3.1.5 Intramolekulare Wechselwirkungen von DCD-1L

In früheren Untersuchungen zum Wirkmechanismus von DCD-1L wurde gezeigt, dass die Ursache für die antimikrobielle Wirkung vermutlich nicht in der Inhibierung von intrazellulären, essentiellen Prozessen liegt, da die beobachtete Inhibierung der Protein-, DNA- und RNA-Synthese ein Sekundäreffekt des Zelltods ist [147]. Aufgrund dessen wurde die Möglichkeit der Membranpermeabilisierung genauer untersucht. Für die Ausbildung einer transmembranen Pore nach dem *barrel-stave*- oder *toroidal-pore*-Mechanismus benötigt ein Peptid die Fähigkeit intramolekulare Wechselwirkungen (Oligomerisierung) einzugehen. Mittels der DOSY-NMR, welche von Dr. Özdirekcan am MPI Tübingen durchgeführt wurde, sollte unter Zusatz des membranimitierenden Lösungsmittels TFE die Oligomerisierung von DCD-1L charakterisiert werden.

Interessanterweise liegt DCD-1L in Lösung ($^2\text{H}_2\text{O}$, 0% TFE- $^2\text{H}_3$) unabhängig von der ZnSO_4 -Zugabe als Trimer vor (Abb. 3.5). Durch Erhöhung des Lösungsmittels auf bis zu 30% konnte eine deutliche Steigerung der Oligomer-Anzahl erzielt werden, wobei der Effekt bei dem Peptid ohne ZnSO_4 stärker ausgeprägt war (DCD-1L: Oktamer, Zn^{2+} -DCD-1L: Hexamer).

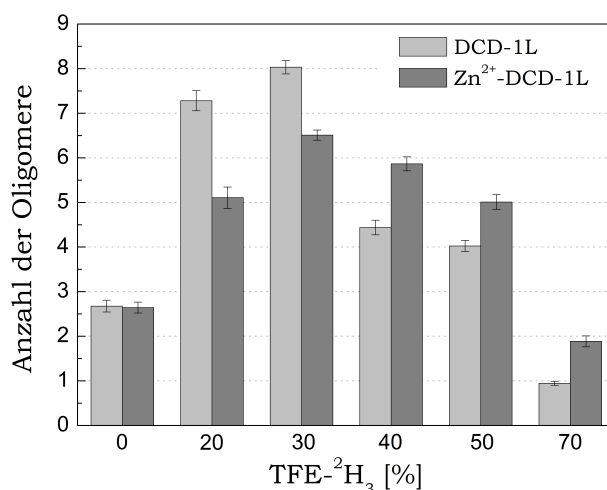


Abbildung 3.5: DOSY-NMR von DCD-1L zur Messung der Oligomerisierung. Es wurden je 0,5 mM DCD-1L mit verschiedenen Konzentrationen TFE- $^2\text{H}_3$ oder mit $^2\text{H}_2\text{O}$ allein vermessen. Ein Ansatz wurde zusätzlich mit 5 mM ZnSO_4 durchgeführt. Die Anwesenheit des membranimitierenden Lösungsmittel führt zu einer Steigerung der Oligomerisierung, aber zu einem Verlust bei einem Anteil von 70% TFE- $^2\text{H}_3$. Im Vergleich wirkt sich bei niedrigeren Konzentrationen von TFE- $^2\text{H}_3$ die Anwesenheit des Salzes weniger stabilisierend auf die Anzahl der Oligomere aus als bei höheren Konzentrationen.

Weiterhin kann man der Abb. 3.5 entnehmen, dass bei einem Anteil von mehr als 30% TFE- $^2\text{H}_3$ die Oligomer-Zahl reduziert wird. Dieser Effekt ist in Abwesenheit von ZnSO_4 deutlicher ausgeprägt als in Gegenwart des Salzes (bei 50% TFE: DCD-1L: Tetramer, Zn^{2+} -DCD-1L: Pentamer). Bei 70% TFE- $^2\text{H}_3$ konnten bei DCD-1L allein lediglich Monomere nachgewiesen

werden, während mit Zn^{2+} noch Dimere vorlagen. Somit könnte Zn^{2+} eine stabilisierende Wirkung auf den Oligomerstatus von DCD-1L ausüben und die antimikrobielle Aktivität beeinflussen.

Die Oligomerisierung von DCD-1L wird nicht nur durch membranimitierende Lösungsmittel beeinflusst, sondern auch durch die Anwesenheit des Phospholipids POPG. DCD-1L und POPG wurden in einem P/L-Verhältnis von 1:50 über verschiedene Zeitpunkte inkubiert und anschließend mit Hilfe einer *Clear native*-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Wanke, Hautklinik Tübingen). Dabei ist zu sehen, dass über die Zeit die Oligomerisierung des Peptids in Anwesenheit des Phospholipids zunimmt (Abb. 3.6).

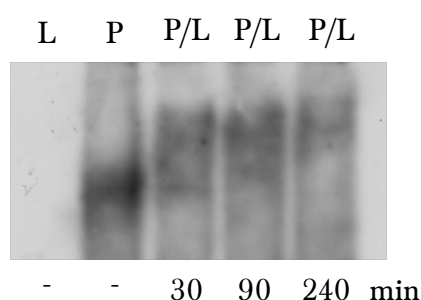


Abbildung 3.6: Oligomerisierung von DCD-1L durch POPG. DCD-1L wurde über verschiedene Zeitpunkte mit POPG (P/L 1:50) inkubiert, über eine *Clear native*-PAGE aufgetrennt und im Western Blot (1. AK: G-81) detektiert. P: Peptid, L: Lipid.

Dieser Versuch zeigt, dass DCD-1L in Anwesenheit von Phospholipiden und membranimitierenden Lösungsmitteln die Fähigkeit besitzt, intramolekulare Wechselwirkungen einzugehen. Diese Eigenschaft könnte auf einen Wirkmechanismus der Membranpermeabilisierung hinweisen.

3.2 Antimikrobielle Aktivität des Peptids DCD-1L

Die antimikrobielle Wirkung des DCD-1Ls und anderer Dermcidin-abgeleiteten Peptiden wurde in verschiedenen Arbeiten dokumentiert. So konnte gezeigt werden, dass DCD-1L (48 AS) und DCD-1 (47 AS) verschiedene Pathogene wie *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. faecalis* und *C. albicans* unter schweißähnlichen Bedingungen abtöten [95, 140, 167]. Dabei konnte bislang der genaue Mechanismus der zum Zelltod der Mikroorganismen führt, nicht beschrieben werden.

3.2.1 Einfluss der oligomeren Struktur

Zwischen den Peptidchargen schwankt die antimikrobielle Aktivität von DCD-1L. Die Abbildung 3.7(A) zeigt einen solchen Unterschied in der Wirksamkeit von 10,4 μ M DCD-1L gegen

S. aureus 113 WT in 33,3 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,0). Das inaktive Peptid führt dabei zu einem besseren Wachstum des Bakteriums im Vergleich zur Kontrolle während 65,9% der Bakterien in Anwesenheit eines aktiven Peptids nicht überleben. Interessanterweise zeigten sich beim Vergleich der beiden Peptide in der Größenausschlusschromatographie unterschiedliche Auftrennungsmuster (Puffer: PBS). Beim Peptid, welches keine antimikrobielle Aktivität aufwies, konnte lediglich ein Peak detektiert werden (Abb. 3.7(B)).

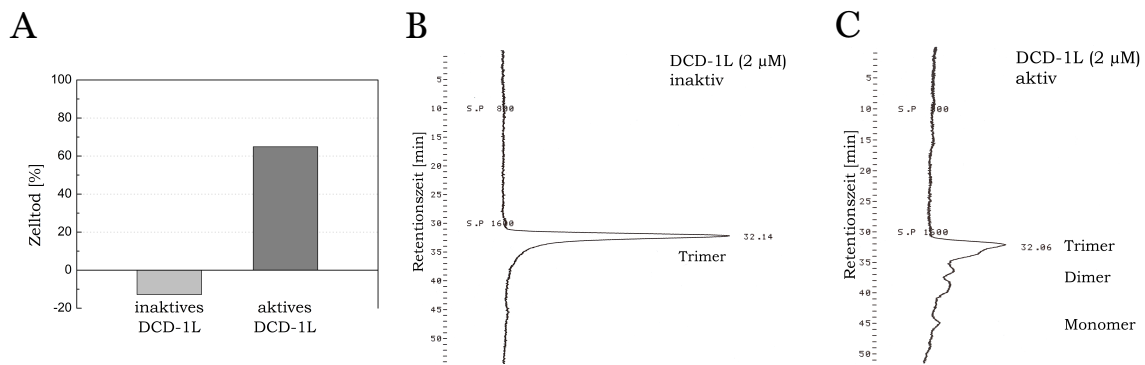


Abbildung 3.7: Größenausschlusschromatographie von DCD-1L. (A) Gegenüberstellung des prozentualen Zelltods von *S. aureus* 113 WT nach Inkubation mit 10,4 µM DCD-1L, chromatographische Auftrennung eines (B) antimikrobiell inaktiven Peptids, (C) eines antimikrobiell aktiven Peptids. Puffer Größenausschlusschromatographie: PBS; Puffer AMT: 33,3 mM NaPO₄ (pH 6,0).

Ein anderes Muster zeigte sich bei Betrachtung des aktiven DCD-1L in der Größenausschlusschromatographie (Abb. 3.7(C)). Neben dem Peak für das Trimer traten weitere auf, welche einem Dimer und Monomer des Peptids entsprechen.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass das Vorkommen von Monomeren oder auch dimeren Strukturen in wässriger Lösung die antimikrobielle Aktivität des AMPs DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT begünstigt. Dies bedeutet, dass die Stabilität der Oligomere die antimikrobielle Aktivität beeinflusst.

3.2.2 Einfluss von Ionen

Für einige anionische AMPs ist bekannt, dass zweiwertige Ionen wie Ca²⁺ oder Zn²⁺ für die antimikrobielle Aktivität essenziell sind. Ob solche Ionen auch die antimikrobielle Wirksamkeit von DCD-1L beeinflussen, sollte in einem Experiment untersucht werden. Hierzu wurde *S. aureus* 113 WT mit DCD-1L allein (10,4 µM) oder mit der Zugabe von je 10 µM CaCl₂, MgCl₂ oder ZnCl₂ für 2 h inkubiert. Von den überlebenden Kolonien wurde anschließend der prozentuale Zelltod von *S. aureus* 113 WT berechnet, wobei jeder Ansatz auf die eigene Kontrolle bezogen wurde.

Die Abbildung 3.8(A) zeigt eine deutliche Erhöhung des prozentualen Zelltods von *S. aureus*

113 WT in Anwesenheit der Ionen im Vergleich zu DCD-1L allein. Bei Zugabe von 10 μM CaCl_2 stieg der Anteil von 10,6% (ohne Ionen) auf 41,7%. Die Zugabe von MgCl_2 (52,8%) und ZnCl_2 (67,8%) führte sogar zu einer signifikanten Steigerung des prozentualen Zelltods.

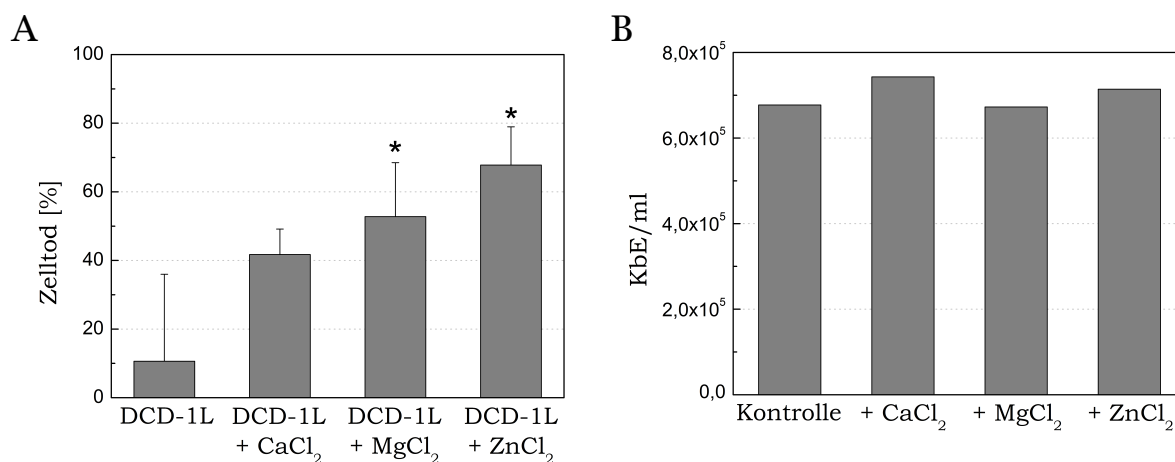


Abbildung 3.8: Einfluss von Ionen auf die antimikrobielle Aktivität von DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT. (A) Die Zugabe von verschiedenen Ionen (je 10 μM) führte zu einer Steigerung des prozentualen Zelltods von *S. aureus* 113 WT durch 10,4 μM DCD-1L, (B) Die Zugabe der Ionen hatte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* 113 WT in der jeweiligen Kontrollgruppe. Puffer: 33,3 mM Natriumphosphat (pH 6,0); * $p < 0,05$.

Die Anwesenheit der Ionen im Puffer im Ansatz ohne DCD-1L wirkte sich nicht auf das Wachstum von *S. aureus* 113 WT aus (Abb. 3.8(B)). Die dabei gewachsene Koloniezahl entsprach der Koloniezahl von *S. aureus* 113 WT im Puffer ohne Ionen und DCD-1L. Somit ist der teilweise signifikante Anstieg der Zelltodrate auf eine Interaktion der Ionen mit dem AMP zurückzuführen. Denkbar wäre auch eine Interaktion der Ionen mit den anionischen Komponenten der bakteriellen Zelloberfläche und das dadurch eine bessere Wirkung des AMPs DCD-1L erzielt wird.

Im folgenden Versuchsansatz wurde der obige Ansatz umgekehrt, indem antimikrobiell aktives DCD-1L mit EDTA inkubiert wurde. Zusätzlich wurde Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) durchgeführt, um einen strukturellen Zusammenhang zu identifizieren. Die Abbildung 3.9(A) zeigt die antimikrobielle Wirkung eines hochaktiven DCD-1Ls gegen *S. aureus* 113 WT. Schon in Anwesenheit von 2,1 μM DCD-1L wurden 85,8% aller Bakterien abgetötet. Bei 10-facher Konzentration konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Bei der Bestimmung der Masse fiel auf, dass neben dem klassischen Monomerpeak viele weitere Peaks auftraten (Abb. 3.9(B)). Diese können einem Vielfachen der molaren Masse des DCD-1Ls zugeordnet werden, entsprechen somit verschiedenen Oligomerisierungsstufen.

Wenn man dieses hochaktive Peptid mit EDTA inkubiert, kommt es zum Verlust der antimi-

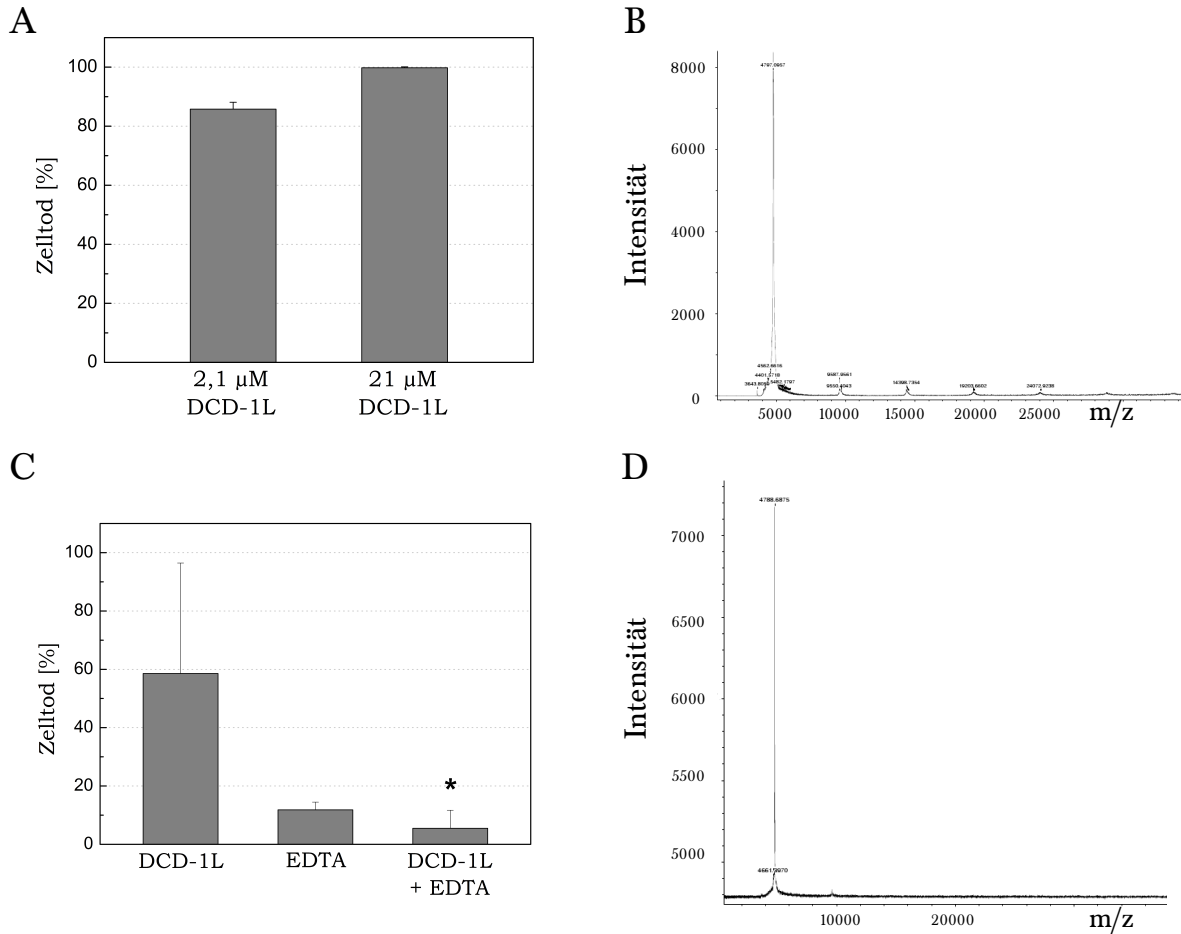


Abbildung 3.9: Einfluss von EDTA auf die antimikrobielle Aktivität von DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT. (A) prozentualer Zelltod von *S. aureus* 113 WT in Anwesenheit von 2,1 μM bzw. 21 μM DCD-1L, (B) massenspektrometrische Aufnahme des aktiven DCD-1Ls, (C) prozentualer Zelltod von *S. aureus* 113 WT in Anwesenheit von 6,2 μM DCD-1L und 50 μM EDTA, (D) MALDI-TOF-MS des mit EDTA inkubierten DCD-1Ls. Bei Inkubation des AMPs mit EDTA sank die antimikrobielle Aktivität und die Fähigkeit zur Oligomerisierung ging verloren. Puffer: 25 mM Tris (pH 6,5); * p < 0,05.

krobiellen Aktivität (Abb. 3.9(C)). Dabei sank die Aktivitätsrate von 6,2 μM DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT durch die Zugabe von 50 μM EDTA signifikant von 58,6% auf 5,5%. Dass die niedrigere Zelltodrate nicht auf die Anwesenheit von EDTA zurückzuführen ist, zeigt die EDTA-Kontrolle. Interessanterweise geht neben der antimikrobiellen Aktivität auch die Fähigkeit zur Oligomerisierung verloren, wie die Abbildung 3.9(D) zeigt.

Diese Daten verdeutlichen, dass positive zweiwertige Ionen eine wichtige Rolle bei der antimikrobiellen Aktivität des anionischen AMPs DCD-1L spielen können. Denn durch die Addition von zweiwertigen Ionen konnte eine deutlich höhere Zelltodrate gegen *S. aureus* 113 WT erreicht werden während der Verlust von Ionen zu einer verringerten Zelltodrate führte. Zusätzlich ist die Fähigkeit, verschiedene oligomere Formen ausbilden zu können, ein wichtiger Punkt in der antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT.

Darauf scheinen auch Ionen einen großen Einfluss zu besitzen.

3.3 Bestimmung der Orientierung von DCD-1L mittels Lipidsystemen

Antimikrobielle Peptide können sich parallel oder transmembran zur Membrannormalen orientieren. Dabei entscheidet die Art der Anlagerung über den spezifischen Mechanismus, welcher zum Zelltod der Mikroorganismen führt (Vgl. 1.4).

DCD-1L weist die Fähigkeit zur Ausbildung einer α -helikalen Struktur auf, welche die Interaktion mit der bakteriellen Membran erlaubt (Vgl. 3.1). Im Folgenden sollte der antimikrobielle Mechanismus des AMPs DCD-1L mit Hilfe von Lipidsystemen genauer charakterisiert werden. Dass DCD-1L auch einen destabilisierenden Einfluss auf Lipidsysteme besitzt, zeigt die Abbildung 3.10. Dabei wurden POPC-Bilayer mittels der Rasterkraftmikroskopie von Frau Kopp am Forschungszentrum Borstel untersucht. Die mit DCD-1L behandelten Lipidmembranen wiesen im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutliche Veränderungen der Oberflächenstruktur auf.

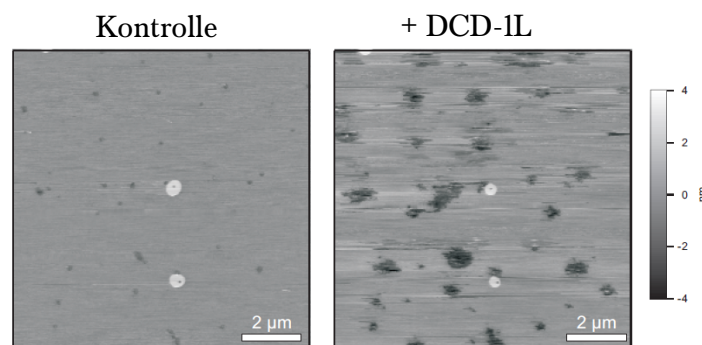


Abbildung 3.10: AFM-Aufnahmen von POPC-Bilayern mit und ohne DCD-1L. Der Bilayer mit $2 \mu\text{M}$ DCD-1L weist eine Destabilisierung der Membran auf. Puffer: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 20 mM NaCl (pH 6,0).

Mit der Hilfe von Lipidsystemen sollte zunächst die Orientierung des AMPs DCD-1L zur Membrannormalen über *Cross-Linking* und orientierte CD-Spektroskopie untersucht werden.

3.3.1 *Cross-Linking* an Liposomen

Mit Hilfe von *Cross-Linkern* werden Moleküle über eine kovalente Bindung miteinander vernetzt. Dabei können intramolekulare (Konformation) und intermolekulare (interagierende Sequenzen) Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden [68, 127, 179].

Mit Hilfe von zwei *Cross-Linkern* sollte die Orientierung von DCD-1L an Liposomen untersucht werden. DSS ist ein wasserunlöslicher *Cross-Linker* und kann aufgrund seines lipophilen Charakters intrazelluläre oder membranständige Proteine vernetzen. Es ist der Abbildung 3.11 (DSS+P) zu entnehmen, dass eine fast vollständige Quervernetzung des Peptids DCD-1L schon nach 5 min erfolgte. Diese Quervernetzung kam auch dann zustande, wenn DCD-1L mit POPG-Liposomen (P/L 1:50) vorinkubiert wurde (Abb. 3.11 (DSS+P+L)). Nach 5 min konnte noch eine schwache Bande in der Höhe von 20,1 kDa detektiert werden, was einem Pentamer ($\sim 20,9$ kDa) entsprechen würde.

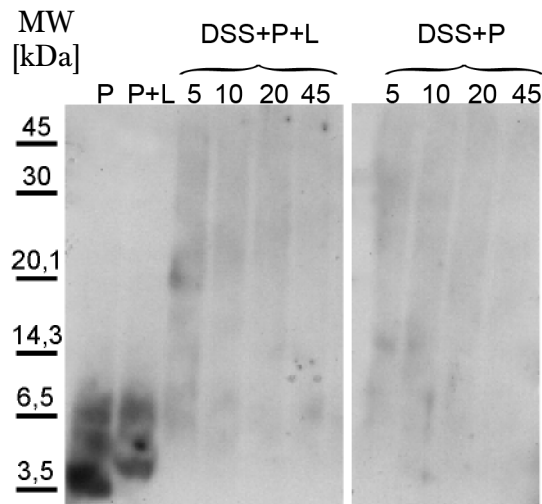


Abbildung 3.11: *Cross-Linking* von DCD-1L durch DSS. DSS vernetzt DCD-1L allein als auch in Anwesenheit von Liposomen (POPG; P/L 1:50). Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 10 min, 20 min und 45 min) mit 50 mM Tris (pH 7,5) abgestoppt und die Proben über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot (1. AK: G-81) detektiert. P: Peptid, L: Lipid.

Bei einem *Cross-Linking* durch DSS kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Peptide nicht ausschließlich membranständig oder im Lumen des Liposoms vorliegen. Daher wurde ein zweiter *Cross-Linker* mit einem hydrophilen Charakter eingesetzt. BS³, wasserlöslich, kann aufgrund seiner Eigenschaft Membranen nicht durchdringen. Eine Quervernetzung von Proteinen kann daher nur auf der Oberfläche einer Membran erfolgen. Wie der Abbildung 3.12 (BS³+P) zu entnehmen ist, wurde DCD-1L allein schon nach kurzer Zeit (5 min) sofort quervernetzt, so dass keine Bande mehr zu detektieren war. Bei zusätzlicher Anwesenheit der Liposomen aus POPG (Abb. 3.12 (BS³+P+L)) konnte nach 5 min noch eine schwache Bande zwischen 6,5 kDa und 14,3 kDa detektiert werden, was einem Trimer (12,5 kDa) entspricht.

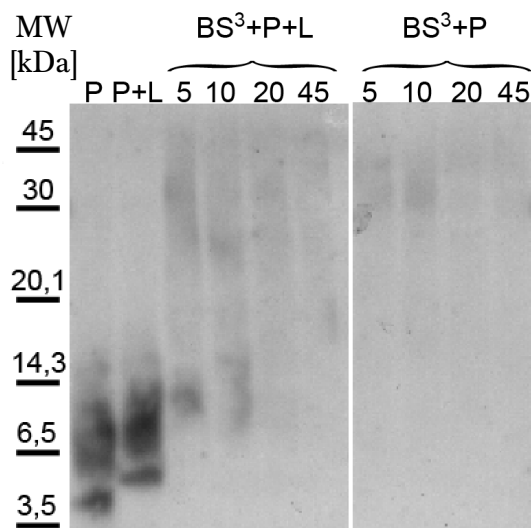


Abbildung 3.12: *Cross-Linking* von DCD-1L durch BS³. BS³ vernetzt DCD-1L allein als auch in Anwesenheit von Liposomen (POPG; P/L 1:50). Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 10 min, 20 min und 45 min) mit 50 mM Tris (pH 7,5) abgestoppt und die Proben über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot (1. AK: G-81) detektiert. P: Peptid, L: Lipid.

Der Einsatz der beiden *Cross-Linker* mit unterschiedlichen Eigenschaften, führte zu keinem Unterschied in der Quervernetzung des AMPs DCD-1L. Auch in Anwesenheit des Phospholipids erfolgte eine vollständige Quervernetzung des Peptids, so dass von einer parallelen Orientierung des DCD-1Ls zur Membrannormalen ausgegangen werden kann.

3.3.2 Orientierte CD-Spektroskopie an Bilayern

Die Methode der OCD-Spektroskopie erlaubt eine Aussage über die Anordnung von α -helikalen Peptiden zur Membrannormalen bei orientierten Lipidbilayern [18, 20, 178, 180]. Anhand des „Fingerabdrucks“ bei 208 nm kann deutlich zwischen parallel, senkrecht (transmembran) oder schräg zur Membrannormalen unterschieden werden (Vgl. 2.17). Die Untersuchung wurde von Dr. Bürck, KIT, durchgeführt.

Für die Untersuchung der Orientierung von DCD-1L wurden zwei Lipidsysteme verwendet: POPG und DMPC/DMPG (1:1 mol/mol) in einem Peptid-zu-Lipid-Verhältnis von 1:50 (mol/mol). Bei Letzterem handelt es sich um ein häufig verwendetes Lipidsystem zur Messung der Orientierung verschiedenster Peptide in Lipidbilayer. DMPC/DMPG bilden sehr stabile, hochqualitative orientierte Bilayer aus [53]. Wegen der deutlichen Ausprägung der α -Helix bei der CD-Spektroskopie wurde zusätzlich POPG verwendet (3.1.4).

Die Intensität bei 208 nm ist bei Verwendung von POPG als Lipidsystem deutlich schwächer als bei 222 nm (Abb. 3.13(A)). Hier liegt DCD-1L parallel zur Membranoberfläche und ist nicht transmembran.

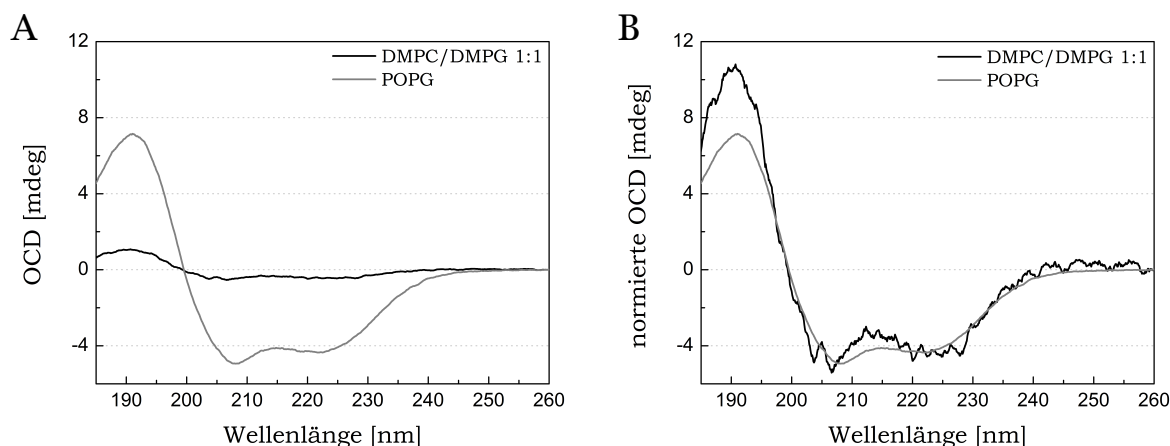


Abbildung 3.13: OCD-Messung von DCD-IL in zwei unterschiedlich orientierten Lipidsystemen. POPG und DMPC/DMPG (1:1 mol/mol) mit P/L (1:50 mol/mol) unter Pufferbedingungen: 10 mM Natriumphosphat (pH 7,0). (A) DCD-IL zeigt eine parallele Orientierung zur Membrannormalen bei POPG-Bilayer, (B) Wegen der geringeren Intensität bei DMPC/DMPG wurden die OCD Spektren auf das Minimum bei 222 nm normiert, wobei das DMPC/DMPG-Spektrum ebenfalls eine parallele Orientierung zeigt.

Die Intensität des Spektrums bei Verwendung von DMPC/DMPG war deutlich niedriger. Dies ist auf mögliche Peptid-Peptid-Interaktionen (Oligomerisierungen) an den Phospholipidbilayern zurückzuführen. Um beide Lipidsysteme vergleichen zu können, wurden die OCD Spektren auf das Minimum bei 222 nm normiert (Abb. 3.13(B)). Dabei zeigte sich, dass auch im DMPC/DMPG-Lipidsystem DCD-IL sich parallel zur Membranoberfläche orientierte, da die Intensität bei 208 nm deutlich negativer war als bei 222 nm.

Die beiden Experimente (*Cross-Linking*, OCD) zur Bestimmung der Orientierung des AMPs DCD-IL an bzw. in Bilayern zeigen, dass sich das α -helikale Peptid, unabhängig vom oligomeren Status, parallel zur Membranoberfläche orientiert.

3.4 Bildung von Ionenkanälen in Lipidbilayern

Die Ausbildung von Poren in der mikrobiellen Membran ist ein weitverbreiteter Mechanismus von AMPs. Um die Bildung von AMP-induzierten Kanälen sowie deren Stabilität zu bestimmen, kann die Leitfähigkeit der Poren in Lipidbilayern gemessen werden. Für die Untersuchung der porenbildenden Aktivität von DCD-IL wurde das Phospholipid DPhPC verwendet. Es ist ein zwitterionisches Phospholipid und bildet stabile Membranen aus. KCl wurde eingesetzt, da beide Ionen eine vergleichbare molare Grenzleitfähigkeit (siehe Tab. 3.1 unter 3.4.1) aufweisen.

In der Abbildung 3.14 sind zwei Messungen dargestellt, welche exemplarisch auch für andere

Spannungen stehen. Beide Aufzeichnungen zeigen den Beginn der Insertion von DCD-1L in die DPhPC-Membran, wobei die Stromstärke bei +50 mV (A) positiv und bei -70 mV (B) negativ war. Das erste Insertionsereignis des Peptids benötigte einige Minuten. Aber einmal in die Membran eingelagert, kam es zu einem schnellen Anstieg des Stromflusses aufgrund weiterer Insertionsereignisse bis hin zum Zerstören der Membran. Diese erste Insertion könnte man als „Initialzündung“ für weitere Ereignisse bezeichnen, was bedeutet, dass bei DCD-1L die Poren nach einem *self-enhancing, cooperative* Mechanismus ausgebildet werden.

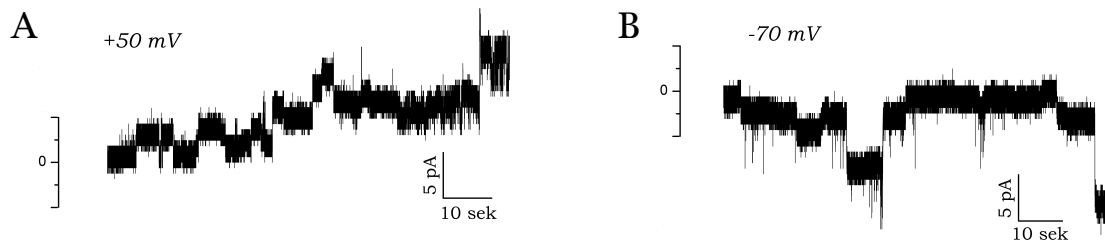


Abbildung 3.14: Beginn der Insertion von DCD-1L in DPhPC-Bilayer. (A) Spannung von +50 mV, (B) Spannung von -70 mV. Die Messungen erfolgten in 10 mM MES (pH 6,0) und 1 M KCl.

Um ein genaueres Verhalten über die Kanalbildung von DCD-1L zu erfahren, wurden Messungen über einen Spannungsbereich von +100 mV bis -100 mV durchgeführt. Dabei wurden mindestens 75 Ereignisse pro Spannung ermittelt und in die statistische Auswertung einbezogen. In der Abbildung 3.15(A) sind die einzelnen Ereignisse (graue Punkte) über die jeweilige Spannung dargestellt. Anhand dieser Einzelkanalmessungen wurden die Wahrscheinlichkeiten für zwei Modelle überprüft: 1. Ohm'sches Modell (blaue Kurve), bei dem sich die Stromstärke mit steigender Spannung um den gleichen Wert erhöht (auch: lineares Modell), 2. sigmoidales Modell (grüne Kurve), bei dem es zu einer Sättigung in der Leitfähigkeit kommt. Der ermittelte Anstieg für das lineare Modell liegt bei $0,029 \text{ pA mV}^{-1}$. Die ermittelten Werte des Anstiegsparameters und der Amplitude für das sigmoidale Modell liegen bei $0,028 \text{ mV}^{-1}$ und $2,14 \text{ pA}$. Aus der statistischen Auswertung ergibt sich, dass das sigmoidale dem Ohm'schen Modell vorgezogen werden sollte. Zum einen ist die Summe absoluter Abweichungen S signifikant kleiner für das sigmoidale Modell ($S = 1384$) als für das lineare ($S = 1558$). Zum anderen gibt das Bayes'sche Informationskriterium (*Bayesian Information Criterion, BIC*) einen kleineren Wert für das sigmoidale Modell ($BIC = 2782$) an als für das Ohm'sche Modell ($BIC = 3123$).

Dass das sigmoidale Modell vorzuziehen ist, kann auch der Abbildung 3.15(B) entnommen werden. Hier ist eine spannungsabhängige Abnahme der Leitfähigkeit von DCD-1L zu beobachten. Hohe Leitfähigkeiten wurden bei Spannungen von 10 mV (98 pS) und -10 mV (151 pS) ermittelt. Mit der Erhöhung der Spannung auf bis zu 100 mV bzw. -100 mV sinkt

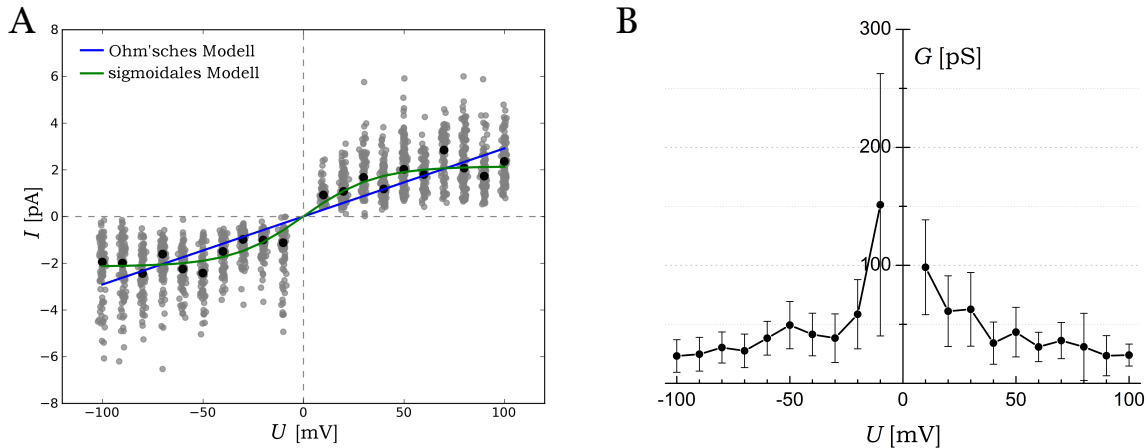


Abbildung 3.15: Einzelkanalmessungen von DCD-1L in DPhPC-Bilayer. Die Messungen wurden in 10 mM MES (pH 6,0) und 1 M KCl durchgeführt, wobei 400 pg/ml DCD-1L eingesetzt wurden. (A) Statistische Auswertung aller Einzelereignisse, wobei die grauen Punkte den Rohdaten und die schwarzen den Median-Werten entsprechen (blau: Ohm'sches Modell, grün: sigmoidales Modell)., (B) Spannungsabhängige Abnahme der Leitfähigkeit von DCD-1L bis zu einem Sättigungsbereich von 20-30 pS.

die Leitfähigkeit auf 20 - 30 pS, wobei eine Sättigung der Leitfähigkeit bei einer Spannung zwischen 30 und 40 mV bzw. -30 und -40 mV erzielt wird. Die hier ermittelten Leitfähigkeiten sind sehr klein und lassen den Schluss zu, dass nur wenige Ionen den Kanal in einem bestimmten Zeitraum passieren. Diese Erkenntnisse stimmen mit den früher beobachteten Ergebnissen des langsamen Zusammenbruchs des Membranpotenzials überein [147].

3.4.1 Ionenselektivität

Viele der kanalbildenden AMP zeigen eine Ionenselektivität. So konnte gezeigt werden, dass Magainin I und NP-1 anionenselektive und Tritrpticin kationenselektive Kanäle ausbilden [38, 84, 137].

Ob eine Ionenselektivität bei DCD-1L vorliegt, sollte unter Verwendung verschiedener Elektrolyte analysiert werden. Hierzu wurden Leitfähigkeitsmessungen bei pH 6,0 (10 mM MES) und +20 mV durchgeführt, wobei die gewählte Spannung unterhalb des Sättigungsbereiches lag (3.4). Bei den getesteten Salzen handelte es sich um 1 M KCl, 1 M LiCl oder 1 M KCH₃COO. Bei K⁺ und Cl⁻ handelt es sich um Ionen mit ähnlicher molarer Grenzleitfähigkeit Λ^0 wie auch Λ^0 bei Li⁺ und CH₃COO⁻ vergleichbar ist (Tabelle 3.1).

Das häufigste Ereignis bei der Leitfähigkeitsmessung in Anwesenheit von 1 M KCl betrug 60 pS (27,78%; Abb. 3.16(C)). Nach dem Austauschen von K⁺ gegen ein weniger mobiles Kation (Li⁺; Abb. 3.16(A)) sank die Leitfähigkeit auf 40 pS mit einer Häufigkeit von 55,66%. Das gleiche Ergebnis konnte beim Austauschen der beiden Anionen beobachtet werden, wo die Leitfähigkeit in 1 M KCH₃COO auf 40 pS (53,15%) sank (Abb. 3.16(B)). Die statisti-

Tabelle 3.1: Übersicht der molaren Grenzleitfähigkeit der verwendeten Ionen bei 25°C [29].

Kation	Λ^0_+ (S cm ² /mol)	Anion	Λ^0_- (S cm ² /mol)
Li ⁺	38,7	CH ₃ COO ⁻	40,9
K ⁺	73,5	Cl ⁻	76,35

sche Auswertung aller vermessenen Ereignisse ergibt eine stark signifikante Reduktion der Leitfähigkeit G (***) $\leq 0,001$) bei Austausch eines weniger mobilen Kat- bzw. Anions (Abb. 3.16(D)) im Vergleich zu KCl.

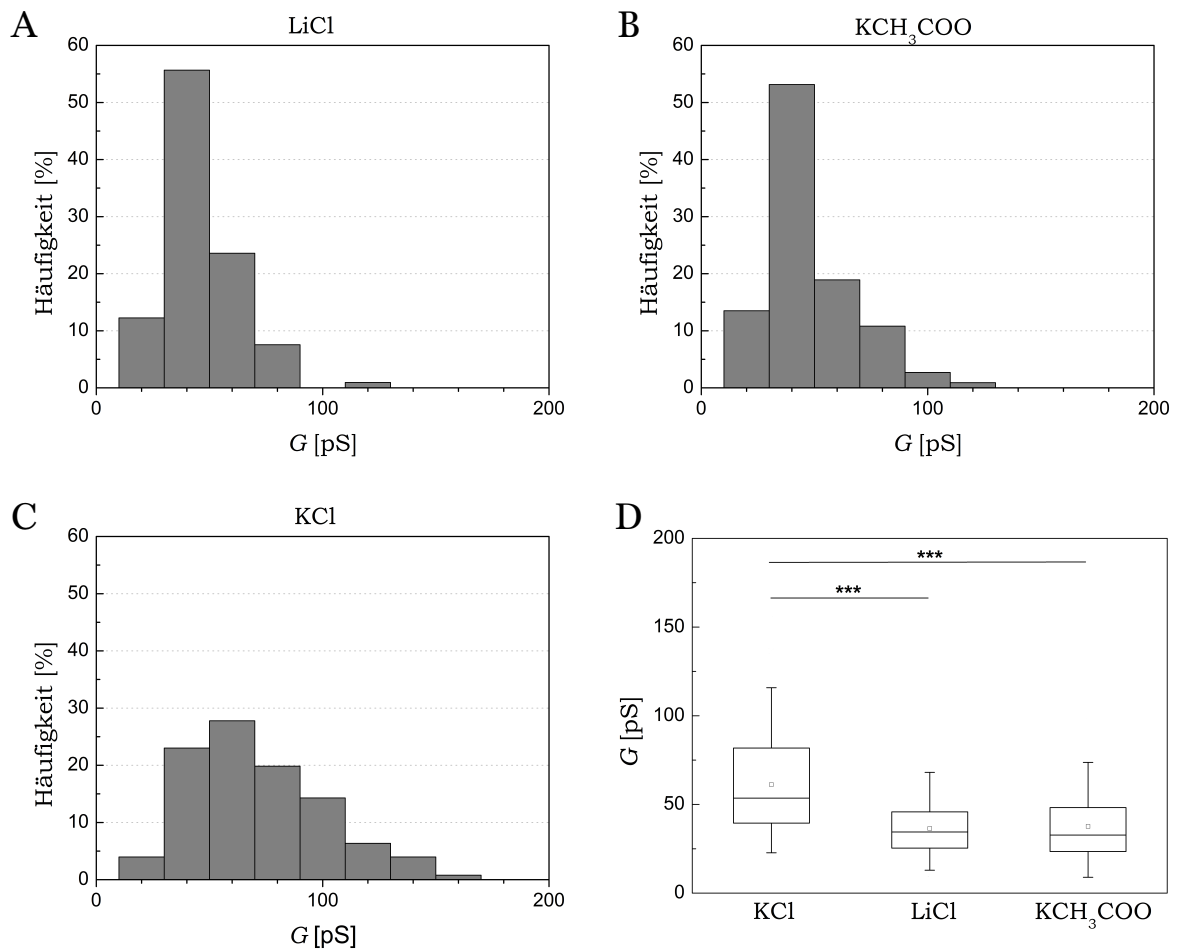


Abbildung 3.16: Leitfähigkeitsmessungen von DCD-1L unter verschiedenen Elektrolytbedingungen. (A) 1 M LiCl, (B) 1 M KCH₃COO, (C) 1 M KCl, (D) statistische Auswertung der Leitfähigkeit von DCD-1L. Die Versuche wurden unter Pufferbedingungen (10 mM MES (pH 6,0)) und bei +20 mV durchgeführt; *** $p < 0,001$.

Die Abnahme der Leitfähigkeit G von DCD-1L in 1 M LiCl oder 1 M KCH₃COO sank bei beiden Bedingungen auf 40 pS. Somit konnte beim Austausch der Kat- bzw. Anionen kein Unterschied in der Leitfähigkeit beobachtet werden. Aufgrund dessen kann hier keine Aussage getroffen werden, ob es sich bei DCD-1L um einen kationen- oder anionenselektiven

Kanal handelt.

3.4.2 pH-Abhängigkeit

Die Leitfähigkeitsmessungen von DCD-1L in 1 M KCl und 10 mM MES (pH 6,0) ergaben, dass es sich vermutlich um einen kleinen Kanal handelt, der nur wenige Ionen passieren lässt (siehe 3.4). Zusätzlich konnte keine Ionenselektivität mit den in dieser Arbeit getesteten Elektrolyten nachgewiesen werden.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Leitfähigkeit besitzt und somit Protonen eine Rolle spielen. Dazu wurden Einzelkanalmessungen in einem Spannungsbereich von -100 mV bis +100 mV unter Pufferbedingungen und 1 M KCl durchgeführt. Die Ergebnisse für 10 mM MES (pH 6,0) bzw. 10 mM MOPS (pH 7,0) sind in der Abbildung 3.17 dargestellt.

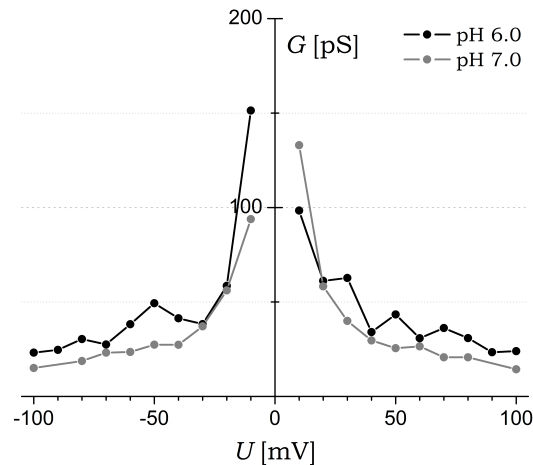


Abbildung 3.17: Einzelkanalmessungen von DCD-1L in DPhPC-Bilayer unter verschiedenen pH-Bedingungen. Die Messungen wurden über einen Spannungsbereich von -100 mV bis +100 mV durchgeführt und erfolgten in 1 M KCl mit 10 mM MES (pH 6,0) oder 10 mM MOPS (pH 7,0). In beiden Puffersystemen ist eine spannungsabhängige Abnahme der Leitfähigkeit zu beobachten.

Es ist deutlich zu sehen, dass eine spannungsabhängige Abnahme der Leitfähigkeit von DCD-1L in DPhPC-Bilayer in beiden Puffersystemen vorliegt. Weiterhin kommt es bei beiden Systemen zu einer Sättigung der Leitfähigkeit, wobei diese bei pH = 7,0 mit 10 - 20 pS deutlich unterhalb der von pH = 6,0 (20 - 30 pS) liegt. Dieser Unterschied ist für fast alle angelegten Spannungen stark signifikant mit $p < 0,001$, vor allem im beginnenden Sättigungsbereich ab 50 mV bzw. -50 mV (außer für die Spannungen von 60 mV und -70 mV $p < 0,05$). Um eine deutlichere Aussage zu erhalten, sollten auch Messungen mit 10 mM Tris (pH 8,0) durchgeführt werden. Interessanterweise konnten keine Einzelkanalereignisse bei diesem pH-Wert gemessen werden. Somit kann von einer deutlichen Reduktion der Leit-

fähigkeit mit Erhöhung des pH-Werts ausgegangen werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass es sich um einen protonenabhängigen Kanal handeln könnte.

3.5 Bestimmung der Ionenselektivität mittels Liposomen

Die elektrophysiologischen Messungen an DPhPC-Bilayern ergaben, dass es sich bei DCD-IL-induzierten Poren um protonenselektive Kanäle handeln könnte (Vgl. 3.4). Zur Bestimmung der Ionenselektivität sollte ein Liposomenexperiment mit eingeschlossenem Ionenindikator etabliert werden. Dabei wurde Pyranin, ein wasserlösliches, nicht membranpermeables Fluorophor, in Liposomen eingeschlossen und mit einem Spektropolarimeter (FP-6500 von Jasco) vermessen.

Im ersten Schritt wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Pyranins (500 μM) bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt. Die Abbildung 3.18 zeigt die ermittelten Wellenlängen des Pyranins über einen pH-Bereich von 6,0 bis 8,0. Bei der Erzeugung des Emissionsspektrums (Abb. 3.18(C)) konnten die Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{Ex1}} = 404 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Ex2}} = 455 \text{ nm}$ bestimmt werden. Die Erzeugung der Anregungsspektren führten zu $\lambda_{\text{Em}} = 511 \text{ nm}$.

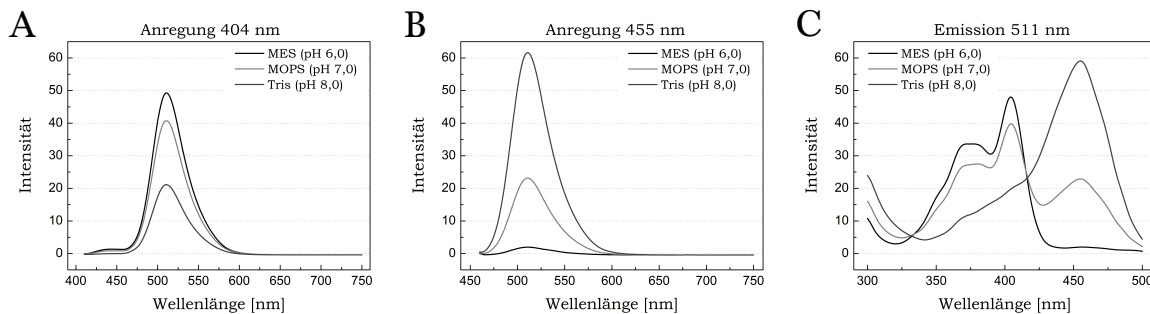


Abbildung 3.18: Anregungs- und Emissionswellenlängen von Pyranin bei unterschiedlichen pH-Werten. (A) $\lambda_{\text{Ex1}} = 404 \text{ nm}$, (B) $\lambda_{\text{Ex2}} = 455 \text{ nm}$, (C) $\lambda_{\text{Em}} = 511 \text{ nm}$. Je nach pH-Wert ergibt sich ein charakteristisches Spektrum bei den jeweiligen Wellenlängen. Bedingungen: 500 μM Pyranin in entweder 10 mM MES (pH 6,0), 10 mM MOPS (pH 7,0) oder 10 mM Tris (pH 8,0).

Bei Verwendung von $\lambda_{\text{Ex1}} = 404 \text{ nm}$ nimmt die Intensität der Emission mit steigendem pH-Wert ab (Abb. 3.18(A)), während bei $\lambda_{\text{Ex2}} = 455 \text{ nm}$ mit steigendem pH die Intensität gesteigert wird (Abb. 3.18(B)). Aufgrund der pH-abhängigen Spektren kann Pyranin als Indikator für pH-Änderungen verwendet werden.

Im nächsten Schritt wurde die Herstellung der pyraninhaltigen Liposomen und deren Stabilität untersucht. Um eine bessere Stabilität zu erreichen, wurden Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Saccharose bzw. Polyethylenglycol (PEG) durchgeführt. Hier führte

keines der beiden Moleküle zu einer gesteigerten Stabilität, so dass im weiteren Verlauf ohne die Zugabe von Saccharose oder PEG gearbeitet wurde. Bei der Suche nach einem geeigneten Puffersystem zeigte sich, dass Natriumphosphat (pH 6,0 und 8,0) sich besser eignet als MES (pH 6,0) und Tris (pH 8,0). Zusätzlich wurde eine geeignete Methode zum Entfernen von überschüssigem Pyranin etabliert. Durch Zentrifugation wurden die Liposomen zu stark beeinträchtigt, so dass schon ohne Zugabe von AMPs ein starker H^+ -Strom gemessen wurde. Als schonendes Verfahren stellte sich die Größenausschlusschromatographie heraus und wurde im weiteren Vorgehen angewandt.

Die Liposomen wurden mit 250 μM Pyranin, 150 mM NaCl und 10 mM Natriumphosphat (pH 8,0) hergestellt. Für die Messung wurde ein pH-Gradient erzeugt, in dem die erzeugten Liposomen in 50 mM Natriumphosphat (pH 6,0) und 150 mM NaCl 1:8 verdünnt wurden. Dass der pH-Gradient nur geringfügig Einfluss auf die Liposomen besitzt, zeigt die Abbildung 3.19. Kontrollen ohne Peptid wurden zu Beginn, während der Messperiode und nochmals zum Schluss durchgeführt, um die Stabilität über den gesamten Zeitraum der Messreihe zu beobachten.

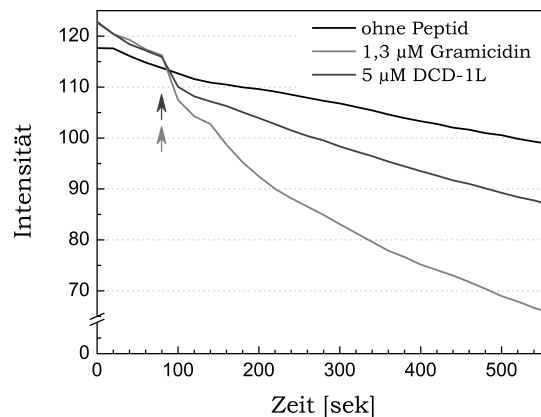


Abbildung 3.19: H^+ -Strom an Liposomen bei $\lambda_{455 \text{ nm}}$. Liposomen, gefüllt mit 250 μM Pyranin, 150 mM NaCl und 10 mM Natriumphosphat (pH 8,0) wurden 1:8 in 50 mM Natriumphosphat (pH 6,0) und 150 mM NaCl verdünnt. Ohne Zugabe eines AMPs erfolgt ein minimaler H^+ -Strom an den Liposomen, während Gramicidin den pH innerhalb der Liposomen deutlich erniedrigt. Bei DCD-1L kommt es ebenfalls zu einer Erniedrigung des pH-Wertes, jedoch schwächer ausgeprägt als bei Gramicidin.

Die Peptide wurden zu den Liposomen jeweils nach 80 sek hinzupipettiert, um eine gleiche Ausgangssituation zu erhalten. Der Abbildung 3.19 ist zu entnehmen, dass das porenbildende AMP Gramicidin die Intensität bei $\lambda_{455 \text{ nm}}$ deutlich reduziert und somit den pH-Wert innerhalb des Liposoms senkt. Ein kurzer starker Abfall ist nach der Zugabe des Peptids zu beobachten. Auch DCD-1L weist einen kurzen starken Abfall nach der Zugabe auf. Allerdings verläuft die weitere Abnahme der Intensität weniger deutlich als bei Gramicidin. Dennoch liegt ein Unterschied zur Kontrolle (ohne Peptid) vor, so dass von einem DCD-

IL-induzierten H^+ -Strom ausgegangen werden kann. Der weniger stark ausgeprägte Verlauf deckt sich mit den bisher ermittelten Resultaten eines langsameren Zusammenbruchs des Membranpotenzials und daraus resultierend ein langsamerer Zelltod.

3.6 Effekte von DCD-1L auf bakterielle Membranen

In dieser als auch in vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das antimikrobielle Peptid DCD-1L Bakterien abtötet [140, 155]. Welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen konnte bislang nicht geklärt werden.

Die Auswirkung einer Inkubation von *S. aureus* 113 WT mit DCD-1L kann mittels Rasterkraftmikroskopie (A. Kopp, Forschungszentrum Borstel, Abb. 3.20) betrachtet werden. Die Kontrollbakterien - ohne Peptid - weisen keine Veränderung in der Morphologie auf (Abb. 3.20(A,B)). Mehrere *S. aureus* 113 WT-Kolonien liegen unter einer Hülle aus extrazellulärer Matrix zusammen. Beim Betrachten eines einzelnen Bakteriums (Größe: $\sim 1 \mu m^2$) zeigt sich ein Bakterium mit einer definierten Struktur und glatter Oberfläche.

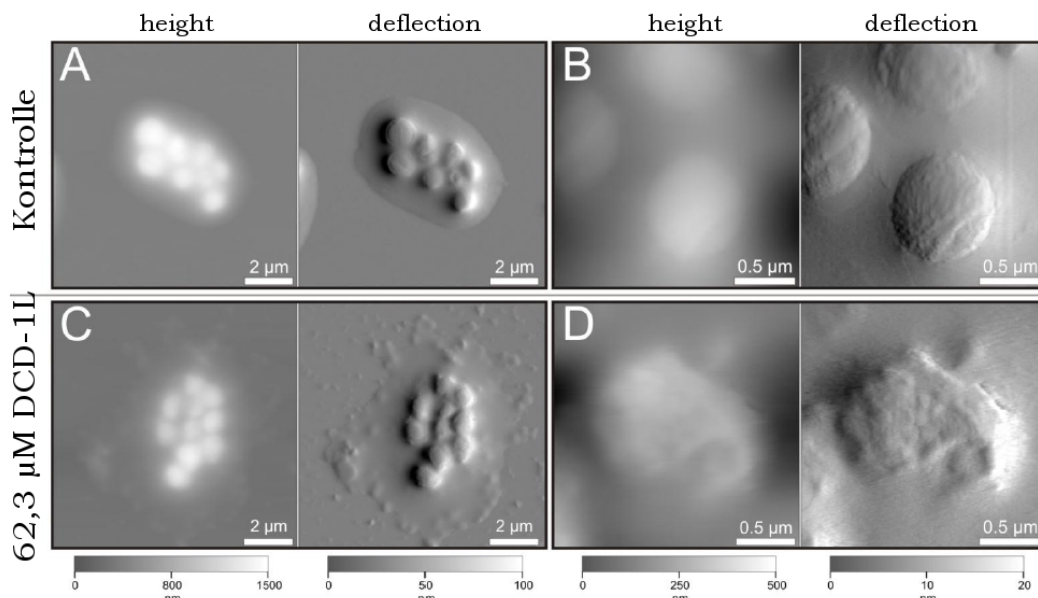


Abbildung 3.20: Effekt von DCD-1L auf die Zellmorphologie von *S. aureus* 113 WT. AFM-Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung (A,B) *S. aureus* 113 WT ohne DCD-1L, (C,D) *S. aureus* 113 WT mit 62,3 μM DCD-1L. Die Messungen wurden im Kontaktmodus durchgeführt.

Bei den für 60 min mit DCD-1L behandelten Bakterien zeigt sich ein anderes Bild. Die Abbildung 3.20(C) zeigt den Zusammenschluss mehrerer Kolonien, wobei die Struktur der Zelloberfläche als auch die extrazelluläre Matrix stark verändert ist. Die Nahansicht zeigt deutlich die undefinierte Struktur des Bakteriums sowie eine Zunahme der Oberflächenrauheit (Abb. 3.20(D)). Bei den Kontrollbakterien war die extrazelluläre Matrix glatt, aber weist

nach DCD-1L-Behandlung eine körnige Struktur auf. Mit Hilfe der AFM konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von *S. aureus* 113 WT mit DCD-1L zu einer veränderten bakteriellen Oberflächenmorphologie führt, welche auf eine mögliche gestörte Membranstabilität zurückzuführen ist.

3.6.1 Messung des K^+ -Ausstroms zur Bestimmung der Membranschädigung durch DCD-1L

Eine Schädigung der Membran in Form von einer Porenbildung durch antimikrobielle Peptide kann an lebenden Zellen über die Messung des K^+ -Ausstroms gemessen werden. Kaliumionen werden nach einer starken Schädigung schnell freigesetzt, so dass ein Ausstrom dieser Ionen als Indikator für die Schädigung der Zytoplasmamembran darstellt [97].

Für diesen Versuch wurden kaliumsensitive Elektroden verwendet, um den K^+ -Ausstrom aus Lebendzellen von *L. lactis ssp. cremoris* HP sowie *S. aureus* 113 WT zu messen. In Abbildung 3.21 ist eine Kinetik des K^+ -Ausstroms für die Bakterien *L. lactis ssp. cremoris* HP (A) und *S. aureus* 113 WT (B) unter Pufferbedingungen (pH 6,5) dargestellt. Um einen Effekt der Kultivierungsbedingungen auszuschließen, wurden unbehandelte Bakterien (Kontrolle) vermessen. Bei beiden Spezies zeigen die Kultivierungsbedingungen keinen Einfluss und der prozentuale K^+ -Anteil bleibt im gemessenen Zeitraum von 350 sek stabil.

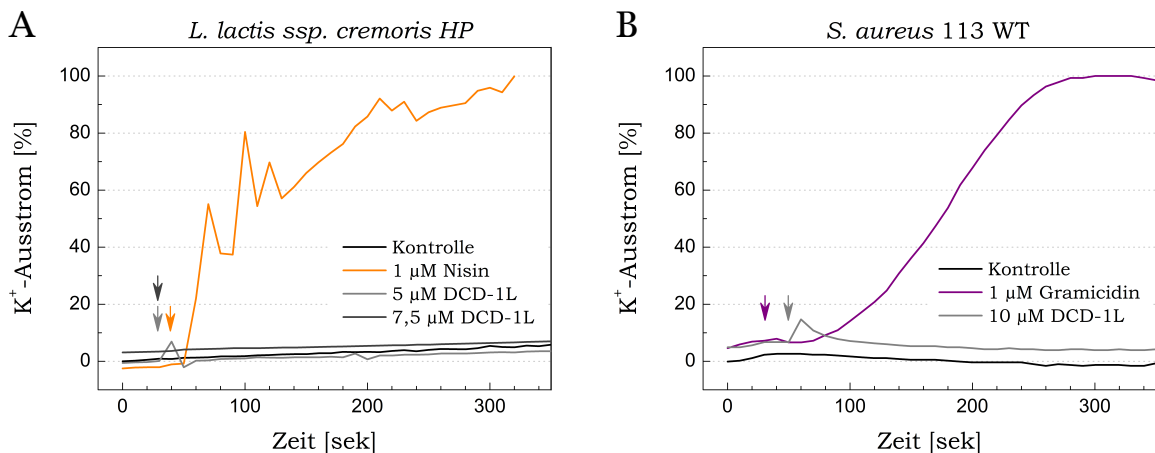


Abbildung 3.21: Messung des K^+ -Ausstroms aus (A) *L. lactis ssp. cremoris* HP, (B) *S. aureus* 113 WT. Im Gegensatz zu Nisin oder Gramicidin führte DCD-1L zu keinem K^+ -Ausstrom über den gemessenen Zeitraum von 350 sek. Die Versuche wurden in Messpuffer (300 mM Cholinchlorid, 30 mM MES, 20 mM Tris (pH 6,5)) durchgeführt. Kontrolle: unbehandelte Bakterien. Pfeile: Zeitpunkt der Zugabe des jeweiligen Peptids.

Im Gegensatz dazu wirken die Positivkontrollen Nisin (Abb. 3.21(A)) und Gramicidin (Abb. 3.21(B)) stark schädigend auf die Membran der Bakterien. Kurz nach der Zugabe dieser porenbildenden Peptide steigt der K^+ -Ausstrom stark an. Im Gegensatz zu den Positivkontrollen kann bei Behandlung mit DCD-1L kein Anstieg des K^+ -Ausstroms beobachtet werden.

Da gezeigt werden konnte, dass zweiwertige Ionen die antimikrobielle Wirkung von DCD-1L steigern und einen Einfluss auf die Konformation besitzen, wurde ein weiterer Ansatz mit der Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 durchgeführt. Das erzielte Resultat unterscheidet sich nicht von dem obigen wie aus der Abbildung 3.22 ersichtlich ist. Dabei führten die hier verwendeten Kultivierungsbedingungen über den gemessenen Zeitraum ebenfalls zu keinem K^+ -Ausstrom. Die Zugabe der beiden AMPs Nisin und Gramacidin führten zu einem sofortigen Anstieg des K^+ -Ausstroms, während bei DCD-1L erneut kein Anstieg zu beobachten ist. Im Verlauf der Kinetik zeigt sich, dass die DCD-1L-behandelten Bakterien im Gegensatz zur Kontrolle einen leichten Anstieg im K^+ -Ausstrom aufweisen. Das könnte auf eine langsamere Schädigung der Membran hindeuten, was mit der Beobachtung einer Depolarisierung als Sekundäreffekt übereinstimmt [147].

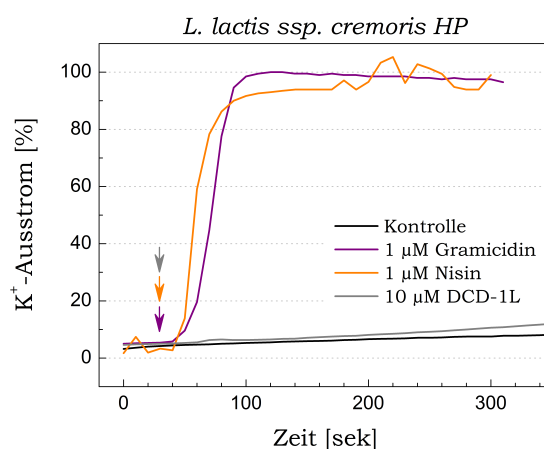


Abbildung 3.22: Messung des K^+ -Ausstroms aus *L. lactis ssp. cremoris HP*. Die Zugabe von 1,25 mM MgCl_2 und 1,25 mM CaCl_2 zum Messpuffer führte zu keiner Veränderung des Kaliumverlustes durch DCD-1L über den gemessenen Zeitraum von 320 sek. Kontrolle: unbehandelte Bakterien. Pfeile: Zeitpunkt der Zugabe des jeweiligen Peptids.

Um auszuschließen, dass kein K^+ -Ausstrom wegen verminderter Aktivität von DCD-1L in Messpuffer gegen *S. aureus* 113 WT oder dem Fehlen einer antimikrobiellen Aktivität gegen *L. lactis ssp. cremoris HP* vorliegt, wurden anschließend antimikrobielle Tests durchgeführt. *L. lactis ssp. cremoris HP* zeigt gegenüber DCD-1L eine deutliche Sensitivität (Abb. 3.23(A)), denn schon in Anwesenheit von 2,1 μM DCD-1L konnte kein Wachstum des Bakteriums beobachtet werden. Auch 1 μM Gramacidin, welches für seine Aktivität gegen *L. lactis ssp. cremoris HP* bekannt ist, zeigt in diesem Testverfahren eine deutliche antimikrobielle Wirksamkeit.

Die Inkubation von *S. aureus* 113 WT in Messpuffer zeigt vergleichbare Ergebnisse wie die Durchführung des Tests im üblichen Puffersystem (Vgl. Abb. 3.9(A)). Ein prozentualer Zelltod von 30,3% wurde mit 2,1 μM DCD-1L erzielt und mit der 10fachen Konzentration an DCD-1L stieg der Anteil auf 95,2% gegen *S. aureus* 113 WT (Abb. 3.23(B)).

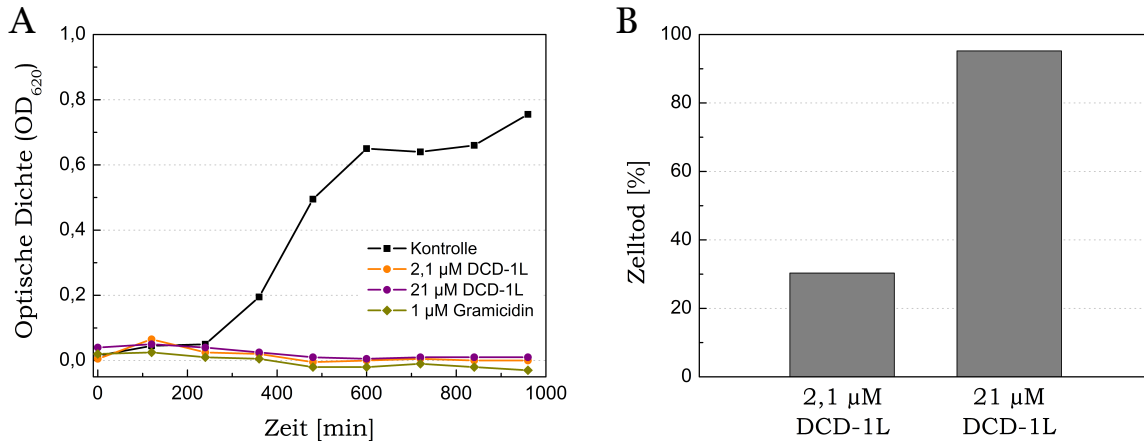


Abbildung 3.23: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L. (A) Trübungsmessung von *L. lactis ssp. cremoris HP* in GM17-Medium, (B) AMT von *S. aureus* 113 WT in Messpuffer. In beiden Testsystemen konnte gegen das jeweilige Bakterium eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

Da bei *L. lactis ssp. cremoris HP* als auch bei *S. aureus* 113 WT Zelltod durch DCD-1L hervorgerufen wird, ist dies nicht die Ursache für das Fehlen eines K^+ -Ausstroms.

3.6.2 Einfluss von DCD-1L auf die Zellwandbiosynthese

Einige der porenbildenden AMPs interagieren über einen Rezeptor mit der Membran. Nisin bindet an Lipid II, ein Molekül der Peptidoglykansynthese, und bildet im Anschluss eine Pore aus [12]. Auch das humane Defensin hBD-3 bindet an Lipid II, inhibiert die Zellwandbiosynthese und permeabilisiert die Membran [61, 138].

Der Einfluss von DCD-1L auf die Zellwandbiosynthese sollte über die Hemmung der PBP2-katalysierten Transglykosilierungsreaktion getestet werden und wurde von D. Münch, Universität Bonn, durchgeführt. In dieser *in vitro* Reaktion dient Lipid II als Substrat, welches durch PBP2 umgesetzt wird. Wie der Abbildung 3.24 deutlich zu entnehmen ist, wird Lipid II durch PBP2 fast vollständig umgesetzt (PK), während im Ansatz ohne das Enzym Lipid II erhalten bleibt (NK). In Anwesenheit des AMPs Nisin kann eine Hemmung der Transglykosylierung (6,89% Umsatz) erreicht werden und die charakteristische Lipid II-Bande bleibt erhalten (Abb. 3.24(B)).

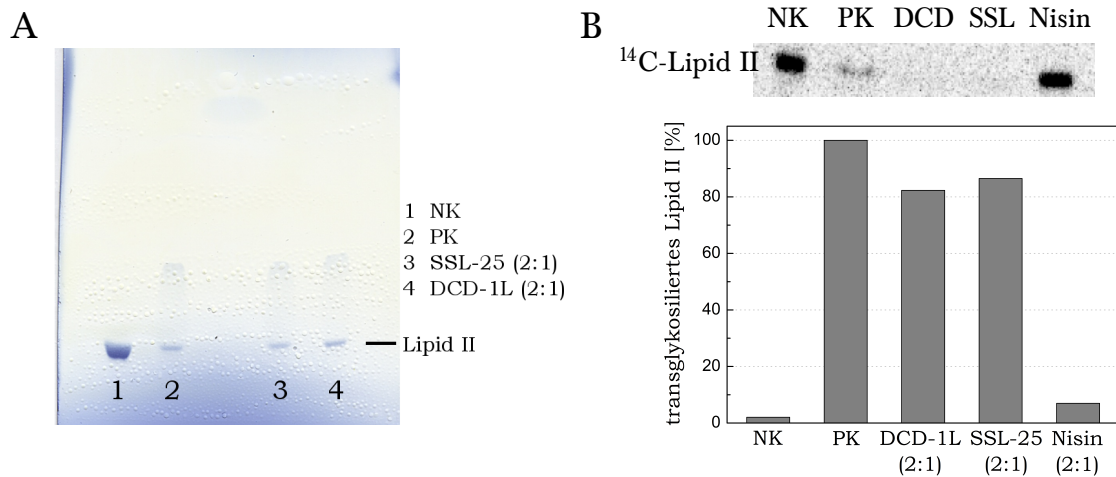


Abbildung 3.24: *in vitro* Reaktion der PBP2-katalysierten Umsetzung von Lipid II. (A) Dünnschichtchromatographische Auftrennung, (B) Transglykosylierung von ^{14}C -Lipid II und Darstellung des prozentualen Anteils ermittelt aus einer densitometrischen Auswertung. Eine Hemmung der Transglykosylierung erfolgt durch Nisin, nicht durch DCD-1L oder die verkürzte Variante (SSL-25). NK: Lipid II ohne PBP2, PK: Lipid II mit PBP2, Peptid:Lipid II (mol/mol) jeweils 2:1.

Im Gegensatz zu Nisin kann weder DCD-1L noch das kationische SSL-25 eine Inhibierung erreichen. Beide DCD-abgeleiteten Peptide führen zu einer PBP2-katalysierten Umsetzung mit über 80%, was auch an der deutlich schwächeren Bande in der DC abgelesen werden kann.

Dieses Ergebnis zeigt, dass DCD-abgeleitete Peptide keine Hemmung der PBP2-katalysierten Umsetzung induzieren und die Zellwandbiosynthese nicht über eine Lipid II-Interaktion inhibieren kann.

4 Diskussion

DCD-1L ist ein antimikrobielles Peptid, welches gegen verschiedene Pathogene wie *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. faecalis* und *C. albicans* unter schweißähnlichen Bedingungen wirksam ist [95, 140, 167]. Dieses konstitutiv exprimierte AMP (48 AS) wird spezifisch in den ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert und durch postsekretorische Prozessierungen am C-Terminus eines Vorläuferproteins (110 AS) generiert [3, 140]. Neben DCD-1L sind weitere DCD-abgeleitete Peptide im Schweiß vorhanden, wobei sich diese in Ladung, Peptidlänge und antimikrobieller Aktivität unterscheiden [130, 155]. In verschiedenen Arbeiten wurde der Wirkmechanismus genauer untersucht, konnte allerdings bislang nicht komplett aufgeklärt werden [147, 155].

4.1 Interaktion mit der bakteriellen Membran

Der initiale Schritt für die antimikrobielle Aktivität von Peptiden ist die Interaktion des AMPs mit der Ziellmembran. Dabei erfolgt die Anziehung häufig über elektrostatische Interaktionen zwischen kationischen Bereichen des Peptids und anionischen Phospholipiden und Oberflächenstrukturen (LPS, TA) der bakteriellen Membran [15, 182]. Im Vergleich zu kationischen AMPs wie Magainin 2, LL-37 oder Ceratotoxin erscheint eine elektrostatische Interaktion zwischen anionischen Peptiden wie DCD-1L und anionischen Ziellmembranen schwierig.

Bislang wurden zwei mögliche Wege der Interaktion anionischer Peptide (meist bei neutralem pH) mit der anionischen Membran beschrieben. DEFB118, ein humanes β -Defensin im Sperma, weist eine Nettoladung von -1 (pH 7,0) auf und zeigt eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*, welche selbst unter hohen Salzkonzentrationen (300 mM NaCl) erhalten bleibt [184]. Strukturell auffällig ist die Ladungsverteilung bei DEFB118, denn N-terminal befinden sich 6 Cysteine, welche bei den β -Defensinen konserviert sind. Damit besitzt der N-Terminus einen ausgeprägten kationischen Charakter und bildet eine amphipathische β -Faltblattstruktur aus. Im Gegensatz dazu ist der C-terminale Bereich (68 AS) anionisch, was für β -Defensine untypisch ist. Man vermutet, dass die Interaktion von DEFB118 mit der Membran über elektrostatische Anziehungskräfte zwischen der kationischen β -Faltblattdomäne und den anionischen Oberflächenstrukturen der bakteriellen Membran erfolgt [65, 184]. Bei neutralem pH ist die Nettoladung von DCD-1L negativ (-2; pI 5,07) und das Peptid weist wie DEFB118 eine ungleichmäßige Ladungsverteilung auf. Diese kann ebenfalls in zwei Abschnitte unterteilt werden: der N-terminale Bereich (AS 1-23) ist überwiegend positiv, während C-terminal die negativ geladenen AS dominieren (AS 24-48). Somit könnte die initiale Interaktion bei DCD-1L ebenfalls elektrostatisch zwischen dem kationischen N-Terminus und der anionischen Membran erfolgen. Dagegen spricht die Beobachtung von

Jung *et al.* Die Gruppe führte Interaktionsstudien von DCD-1L sowie verschiedener DCD-Fragmente mit Modellmembranen (POPC/POPG 1:1 (mol/mol)) durch. Dabei zeigen DCD-1L und DCD(17-47) ähnlich große Werte für den Verteilungskoeffizienten, das heißt, sie interagieren in vergleichbarer Stärke mit den Modellmembranen [83]. Ein weiterer Hinweis für eine elektrostatische Interaktion könnte die Beobachtung von Li *et al.* sein. Die Gruppe konnte zeigen, dass eine Mutante von *S. aureus* (*dak2*) eine veränderte Phospholipidzusammensetzung aufweist und dadurch die Bindung von DCD-1L an die Zelloberfläche reduziert ist. Bei der *dak2*-Mutante ist vor allem das anionische Diphosphatidylglycerol (Cardiolipin) in deutlich reduzierter Menge vorhanden [103]. Dadurch könnte eine reduzierte elektrostatische Interaktion zwischen DCD-1L und der bakteriellen Membran vorliegen.

Nicht viele anionische AMPs weisen eine kationische Domäne auf. Diese Peptide binden zweiwertige Ionen wie Zn^{2+} und Ca^{2+} . Hierbei erfolgt die Interaktion mit der Membran über die Ausbildung von Salzbrücken zwischen kationischen Ionen und anionischen Membranoberflächenstrukturen [15, 65]. Zum Beispiel weisen drei isolierte anionische SAAPs (*Surfactant-associated anionic peptides*) aus der Lunge des Schafes antimikrobielle Aktivität gegen *Mannheimia haemolytica* auf. Diese Aktivität kann durch die Anwesenheit von $ZnCl_2$ gesteigert werden, nicht aber durch $MgCl_2$ [17, 66]. Für SAAPs konnte gezeigt werden, dass sie an die Oberfläche des Bakteriums binden und die Struktur zerstören [66]. Aber in der Anwesenheit von Zn^{2+} kam es nicht zur Zerstörung der Morphologie, sondern intrazelluläre Komponenten wurden beschädigt [17]. Anhand dieser Daten geht man von der Interaktion des Zn^{2+} mit der Zielmembran über Salzbrücken aus. Daraufhin kommt es zur Translokation des Peptids durch die Zellhülle ins Zytoplasma und intrazelluläre Prozesse werden beeinträchtigt [16]. In dieser Arbeit konnte eine teils signifikante Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität gegen *S. aureus* 113 WT durch die Zugabe von zweiwertigen Ionen (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) beobachtet werden. Auch in der Arbeit von Song *et al.* wurde in elektrophysiologischen Messungen eine deutliche Steigerung der durchschnittlichen Leitfähigkeit von DCD-1L durch die Zugabe von $ZnCl_2$ erzielt (von 31 ± 8 pS auf 81 ± 14 pS bei pH 7,1). Des Weiteren führte der Austausch von His38 zu Ala, welches für die Interaktion des Zn^{2+} mit DCD-1L hauptsächlich verantwortlich ist, zum Verlust der Leitfähigkeit [154]. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen überein, dass durch die Anwendung von EDTA im antimikrobiellen Testsystem die Aktivität von DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT signifikant reduziert wurde. Anhand dieser Ergebnisse kann auch die initiale Interaktion über Salzbrücken zwischen Ionen und Membran in Betracht gezogen werden.

Einige wenige AMPs können auch über einen Rezeptor mit der Membran interagieren. Der bislang bekannteste Rezeptor ist Lipid II, ein in der Membran verankertes Molekül der Peptidoglykansynthese. Beispielsweise bindet Nisin mit dem N-Terminus an Lipid II und bildet zeitgleich mit dem C-Terminus innerhalb der Zytoplasmamembran eine Pore aus

[12, 70, 174]. In dieser Arbeit konnte keine Bindung von DCD-IL an Lipid II nachgewiesen werden, da keine Inhibierung der PBP2-katalysierten Umsetzung beobachtet werden konnte. Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse kann man derzeit davon ausgehen, dass Lipid II nicht als Rezeptor für DCD-IL fungiert und eine der beiden anderen Interaktionsvarianten wahrscheinlicher ist.

4.2 Strukturelle Parameter und deren Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität

4.2.1 Konformation

Nach der initialen Interaktion mit der Membran bzw. den Membranstrukturen wie LPS oder TA wandern die Peptide durch die Peptidoglykanschicht zur Phospholipidmembran. Dort erfahren die AMPs eine Konformationsänderung, das heißt, eine amphipathische Struktur wird ausgebildet. Die am häufigsten vorkommenden Sekundärstrukturen sind α -Helix und β -Faltblatt, welche durch die Interaktion mit der Membran ausgebildet oder verstärkt werden [9, 78, 182]. Während α -helikale Peptide keine Sekundärstruktur in Lösung zeigen, besitzen β -Faltblattpeptide die Struktur auch in Lösung, sind aber vermutlich kaum amphipathisch. Denn beispielsweise ist das CAMP Tachyplesin I in wässriger Lösung nicht amphipathisch trotz der starren β -Faltblattstruktur. In ihren Studien konnte die Gruppe um Oishi *et al.* zeigen, dass bei Kontakt mit Biomembranen strukturelle Veränderungen geschehen, welche das Peptid amphipathisch machen [119]. Im Gegensatz zu Tachyplesin I zeigt LL-37 in Puffer keine Sekundärstruktur. Allerdings kann durch die Zugabe von 30% TFE oder 20 mM SDS ein Spektrum beobachtet werden, welches α -helikaler Peptide entspricht. Dabei kann durch die Zugabe von POPG der α -helikale Anteil sogar nochmal verstärkt werden [165]. Somit verhält sich DCD-IL wie ein typisches α -helikales Peptid: in Lösung (Wasser oder Puffer) liegt ein Spektrum vor, welches dem ungefalteter Peptide entspricht. Durch membranimitierende Umgebungen (TFE, Detergenzien) verschiebt sich das erhaltene Spektrum in Richtung von Peptiden mit α -helikaler Konformation. Eine deutlichere Ausprägung der Konformationsänderung wurde durch die Anwesenheit von Phospholipiden, vor allem durch das anionische POPG, erzielt. Auch bei Jung *et al.* wurde dieses Verhalten von DCD-IL beobachtet, denn in NaPO_4 entsprach das Spektrum einem ungefalteten Peptid und veränderte sich durch die Zugabe von entweder TFE oder SDS zu einem α -helikalen Spektrum [83]. Weiterhin zeigte die Gruppe mittels NMR in Lösung, dass die α -helikale Struktur nicht über das gesamte Peptid vorliegt, sondern aus vier Helixabschnitten besteht. Dabei weist der N-Terminus mit zwei kürzeren Helices (Glu5 bis Gly7, Gly10 bis Lys12) eine besonders hohe Flexibilität auf, während die C-terminalen helikalen Abschnitte geordnet vorliegen (Glu27 bis Ser31, Val37 bis Val43) [83]. Im Gegensatz dazu zeigt die kürzlich ver-

öffentliche Kristallstruktur von DCD-1L eine geordnete α -Helix über die Gesamtlänge des Peptids [154]. Vermutlich wird die reale Sekundärstruktur eine Mischung aus den beiden Strukturen sein, da beide Methoden ihre Schwächen hinsichtlich der Konformationsermittlung haben. Daher sollten beide Methoden als sich gegenseitig ergänzend betrachtet werden [153, 183].

4.2.2 Amphiphilie

Aufgrund der Konformationsänderung kommt es zur Ausbildung einer amphipathischen Struktur, wobei eine polare (hydrophile) und eine unpolare (hydrophobe) Seite entstehen. Dabei kommt der amphipathischen Struktur der AMPs eine Schlüsselrolle zu, denn die hydrophobe Seite interagiert direkt mit den Lipiden der Membran, während die hydrophile Region mit den Kopfgruppen der Phospholipide interagiert oder das Lumen der entstehenden Pore ausbildet [78]. Jung *et al.* zeigten, dass bei DCD-1L eine typische Aufteilung zwischen polarer und unpolarer Seite entsteht, was auf eine erhöhte Amphiphilie deutet. Auch der ermittelte Wert des hydrophoben Moments als Maß für die Amphiphilie von $\mu H = 0,453$ deutet auf eine erhöhte Amphiphilie hin. Dieser Wert ist vergleichbar mit anderen helikalen Peptiden wie LL-37 ($\mu H = 0,521$), Magainin 1 ($\mu H = 0,492$) und Melittin ($\mu H = 0,394$) (Werte mit heliQuest ermittelt [46]). Ein Nachteil erhöhter Amphiphilie ist, dass die Selektivität gegenüber anionischen Lipiden verloren geht. Untersuchungen mit Magainin 2 Analoga, welche veränderte μH aufweisen während die anderen Parameter konstant gehalten werden, zeigen, dass schon bei minimaler Erhöhung von μH die Permeabilisierung von Liposomen mit hohem PC-Anteil stark erhöht ist. Zusätzlich wurde auch die antibakterielle Wirkung, aber auch die hämolytische Aktivität deutlich gesteigert [177]. Somit ist die Interaktion der AMPs nicht mehr auf elektrostatische Interaktionen mit den zwitterionischen PC-Lipiden zurückzuführen, sondern auf hydrophobe Interaktionen. Diese hydrophoben Interaktionen mit Membranen sind hauptsächlich für zyklische AMPs (z.B. Katala B1) bekannt. Denn einige der *loops* besitzen eine stark hydrophobe Eigenschaft, welche die Gesamthydrophobizität des Peptids erhöhen und dadurch an die Membran binden und mit dieser interagieren [65, 77]. Dem AMP LL-37 mit seinem sehr hohen Amphiphilie-Wert wurde der zytotoxische Effekt gegenüber verschiedenen eukaryontischen Zellen nachgewiesen [80, 120]. Da der N-Terminus von LL-37 stark hydrophob ist und das Entfernen des N-Terminus (2 AS bzw. 6 AS) die hämolytische Aktivität signifikant reduziert ohne die antimikrobielle Aktivität zu beeinflussen, wird die Interaktion des CAMPs mit den PC-haltigen Membranen durch hydrophobe Interaktionen hervorgerufen [24, 120]. Trotz der erhöhten Amphiphilie scheint die Selektivität gegen PC-haltige Membranen bei DCD-1L nicht erhöht zu sein, denn bislang konnte keine hämolytische Aktivität gegen Erythrozyten trotz hoher Peptidkonzentrationen (bis 100 $\mu\text{g/ml}$) nachgewiesen werden [155]. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass

bei den elektrophysiologischen Messungen an DPhPC-Bilayern Leitfähigkeit gemessen wurde, welche erst durch eine Interaktion des Peptids mit dem Phospholipid und einer damit einhergehenden Porenausbildung erfolgen kann. Da es sich hierbei allerdings um Messungen an Modellmembranen handelt, wird die *in vivo* Situation mit der Komplexität der verschiedenen Biomembranen nicht widerspiegelt.

4.2.3 Hydrophobizität

Für die effektive Membranpermeabilisierung spielt neben der Amphiphilie auch die Hydrophobizität eine Rolle. Dabei entscheidet die Hydrophobizität über die Stärke der Interaktion der unpolaren Seite mit dem hydrophoben Bereich der Phospholipidmembran [72, 182]. Ist die Hydrophobizität zu hoch, kommt es zur Aggregation oder zur Präzipitation des Peptids in Lösung, weshalb es nicht mehr zur Zielmembran gelangen kann. Ein Peptid mit einer zu geringen Hydrophobizität besitzt eine nicht ausreichende Affinität zur Lipidschicht [35]. Durchschnittlich weisen AMPs einen hydrophoben Anteil von rund 50% auf [182]. Der hydrophobe Anteil bei DCD-1L liegt bei 39,58% und ist relativ gleichmäßig über das Peptid verteilt, wodurch die Gesamthydrophobizität des Peptids etwas schwächer ist. Auch LL-37 zeigt eine ähnliche Hydrophobizität (38%), welche aber bei Magainin 1 (43,5%) oder Melittin (50%) deutlich mehr ausgeprägt ist (Werte mit heliQuest ermittelt [46]). Auch eine höhere Hydrophobizität führt zu einer verstärkten Interaktion mit PC-haltigen Membranen (z.B. eine verstärkte hämolytische Aktivität), da diese Peptide tiefer in den hydrophoben Bereich der Membran eindringen und Poren ausbilden [22, 160]. Chen *et al.* postulieren, dass eine niedrige Hydrophobizität Peptide vor dem Eindringen in die Zytoplasmamembran von Erythrozyten bewahrt und es dadurch zu keiner Hämolyse kommt [22]. Somit könnte die etwas niedrigere Hydrophobizität der Grund sein, dass DCD-1L eine höhere Selektivität gegen bakterielle Membranen zeigt und Erythrozyten nicht lysiert [155].

4.2.4 Orientierung des Peptids zur Membrannormalen

Es wird angenommen, dass während der Ausbildung der amphipathischen Struktur die Peptide als Monomer an der Membran liegen und sich dort parallel zur Membrannormalen orientieren (*S state*) [15, 21, 182]. Während dieser parallelen Anordnung und dem Eindringen des Peptids in den hydrophoben Bereich der Lipidschicht kommt es dazu, dass die Membran an diesen Stellen schmaler wird (*membrane thinning effect*) [21]. Das Ausmaß des Effektes ist peptidspezifisch und steht in direkter Korrelation mit der Peptidkonzentration [15]. Erst durch bestimmte Faktoren wie z.B. das Erreichen einer Schwellenpeptidkonzentration, der Neigung zur Oligomerisierung orientieren sich die Peptide senkrecht zur Membrannormalen und bilden eine Pore aus (*I state*) [15, 21, 182]. Zum Beispiel zeigt Magainin 2 in niedriger

Konzentration eine parallele Orientierung an POPG-Bilayern, wechselt aber mit steigender Konzentration zu einer transmembranen Orientierung mit einem Winkel von 20° , was für ein AMP mit *toroidal-pore*-Mechanismus charakteristisch ist. So ist die Orientierung zum einen konzentrationsabhängig, zum anderen aber auch lipidabhängig. Denn in POPC-Bilayern blieb die Orientierung auch mit steigender Konzentration parallel [117]. Bei LL-37 wiederum bleibt die parallele Orientierung in anionischen oder zwitterionischen Bilayern erhalten, auch wenn die Peptidkonzentration oder Temperatur verändert wird [67]. Doch eine neuere Studie mit verbesserter OCD-Methodik zeigt auch für LL-37, dass sich dieses kationische AMP bei einem hohen P/L-Verhältnis ebenfalls transmembran orientiert und damit wie Magainin 2 über den *toroidal-pore*-Mechanismus wirksam ist [99]. In den durchgeführten Studien zur Bestimmung der Orientierung von DCD-1L in orientierten Lipidsystemen (POPG und DMPC/DMPG (1:1 mol/mol)) und mit POPG-Liposomen (*Cross-Linking*) wurde ebenfalls eine Orientierung parallel zur Membrannormalen beobachtet. Dieses Ergebnis wurde auch in der Arbeit von Song *et al.* unter Verwendung von POPE/POPG (3:1) bestätigt. Das für die elektrophysiologischen Leitfähigkeitsmessungen so wichtige Zn^{2+} führte hier bei Anwesenheit im Puffersystem zu keiner Veränderung der Orientierung von DCD-1L [154]. Allerdings zeigt die Gruppe in ihren *Molecular Dynamics*-Studien, dass sich DCD-1L in die Bilayer transmembran in Form eines Hexamers aus drei antiparallelen Dimeren einbaut, wobei die Struktur von Zn^{2+} stabilisiert wird. Die Gruppe postuliert, dass sich entweder DCD-1L Monomere an die Membran anlagern und erst in Anwesenheit von Zn^{2+} und einer Spannung oligomerisieren und sich anschließend in die Membran als Pore einlagern. Die zweite Möglichkeit ist die parallele Orientierung der DCD-1L Peptide als Hexamer an der Membran (stabilisiert durch Zn^{2+}), wobei die Insertion als transmembrane Pore anschließend ebenfalls spannungsinduziert erfolgt [154].

4.2.5 Oligomere Strukturen und Leitfähigkeit

Eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer transmembranen Pore nach dem *barrel-stave*- oder *toroidal-pore*-Mechanismus ist die Fähigkeit des AMPs zu oligomerisieren [72, 182]. Wenn eine bestimmte Schwellenkonzentration der Peptide erreicht ist, aggregieren die Monomere aufgrund von Interaktionen zwischen den polaren Seiten der amphipathischen Peptidstrukturen, so dass die unpolare Seite tiefer in den hydrophoben Kern der Membran eindringt und letztlich eine Pore ausbildet. Die entstandene wässrige Pore ist nicht mit den polaren Köpfen der Membranlipide ausgekleidet und weist eine hohe Dynamik auf. Das bedeutet, dass die Pore Monomere verliert, aber auch wieder aufnehmen kann, so dass Poren mit unterschiedlicher Größe entstehen [72, 182]. In elektrophysiologischen Messungen mit Alamethicin, welches *barrel-stave*-Poren ausbildet, wurde gezeigt, dass Einzelkanäle mit verschiedenen, deutlich voneinander trennbaren Leitfähigkeiten gemessen

wurden und es keine definierte Leitfähigkeit gibt [5, 51, 105]. Poren nach dem *toroidal-pore*-Mechanismus entstehen in ähnlicher Weise wie die *barrel-stave*-Poren. Der Unterschied liegt darin, dass beim *toroidal-pore*-Modell die Pore aus der polaren Seite des Peptids und den Kopfgruppen der Phospholipide gebildet wird [15, 72, 182]. Magainin 1, ein AMP mit toroidaler Porenbildung, zeigt in elektrophysiologischen Messungen keine verschiedenen, sondern eine klar definierte Leitfähigkeit [38]. Dass DCD-1L die Fähigkeit besitzt, oligomere Strukturen in Lösung auszubilden, wurde schon in früheren Arbeiten beobachtet [155]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen eine funktionelle Abhängigkeit von Oligomerisierung und antimikrobieller Aktivität. In Lösung liegt DCD-1L häufig als Trimer vor (Größenausschlusschromatographie, DOSY-NMR). Ist diese Strukturausbildung zu stark, geht die antimikrobielle Aktivität verloren. In der Regel wurde diese Fähigkeit zur starken Strukturausbildung für Peptide mit hoher Hydrophobizität beobachtet, welche bei DCD-1L aber nicht vorliegt. Dabei ist die Bindung zwischen den Monomeren in Lösung so stark, dass die Fähigkeit zur Dissoziation und damit die antimikrobielle Aktivität verloren geht [22, 100]. Wenn neben dem Trimer weitere Strukturen (Monomer und Dimer) in der Größenausschlusschromatographie beobachtet werden, zeigt DCD-1L eine gute antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* 113 WT in geringer Molarität. Somit lagert sich DCD-1L vermutlich auch wie die meisten α -helikalen Peptide als Monomer an die bakterielle Membran an. Bei helikalen Peptiden wie Magainin 2 oder Melittin findet ab einem bestimmten P/L-Verhältnis eine Oligomerisierung in der Membran statt [117, 181]. Dass DCD-1L die Fähigkeit besitzt unter membranimitierenden Bedingungen (verschiedene TFE-Konzentrationen) ebenfalls oligomere Strukturen auszubilden, wurde mit Hilfe der DOSY-NMR gemessen. Die Anzahl der Oligomere war abhängig von der TFE-Konzentration und wurde zusätzlich durch die Anwesenheit von Zn^{2+} stabilisiert wie es auch bei Song *et al.* beobachtet wurde [154]. Mit der Fähigkeit in membranimitierenden Umgebungen zu oligomerisieren, scheint auch die Fähigkeit Poren in Membranen auszubilden gegeben. Um dies zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Messungen an DPhPC-Bilayern durchgeführt. Die gemessene Leitfähigkeit ist spannungsinduziert (Bereich von -100 mV bis +100 mV) und verhält sich nicht nach dem Ohm'schen Modell (lineares Verhalten von $I-U$), sondern sigmoidal mit einer Sättigung im Bereich von 20-30 pS. Vermutlich können nur wenige Ionen den Kanal in einem bestimmten Zeitraum passieren, was mit einem langsamen Zusammenbruch des Membranpotenzials übereinstimmt [147]. Das den Kanal nur wenige Ionen passieren könnten, deckt sich auch mit früheren Studien, wo keine Membranpermeabilisierung beobachtet wurde [103, 147, 155]. Bei den verwendeten Methoden wurden Substanzen wie Carboxyfluorescein für den Nachweis verwendet, die den Kanal vermutlich aufgrund ihrer Größe nicht passieren können. Auch scheint der Kanal nicht für K^+ durchlässig zu sein, da im gemessenen Zeitraum kein K^+ -Ausstrom aus *S. aureus* 113 WT und *L. lactis ssp. cremoris* HP ermittelt wurde. Möglicherweise ist auch der gemessene Zeitraum von 320 sek zu kurz, da die Aktivität von DCD-1L

später einsetzt [147]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen keinen Schluss hinsichtlich eines kationen- oder anionenselektiven Kanals zu. Denn der Austausch der Kat- bzw. Anionen führte zu jeweils der gleichen Reduktion in der Leitfähigkeit, so dass eine Selektivität mit den hier verwendeten Ionen nicht gemessen werden konnte. Allerdings wurde eine pH-abhängige Leitfähigkeit beobachtet, die auf einen H^+ -Kanal hinweisen könnte wie auch der Versuch mit pyraninhaltigen Liposomen zeigt. Jedoch wurde in *Molecular Dynamics*-Studien mit der hexameren Struktur von DCD-1L eine ausgeprägte Anionenselektivität simuliert [154]. Leitfähigkeitsuntersuchungen von DCD-1L in POPE/POPG-Bilayer (3:1) zeigen in Abwesenheit von Zn^{2+} eine Leitfähigkeit von $G = 31 \pm 8$ (pH 7,1), welche mit der in DPhPC-Bilayern vergleichbar ist. Durch die Zugabe von Zn^{2+} ins Puffersystem wurde eine deutlich erhöhte Leitfähigkeit beobachtet ($G = 81 \pm 14$). Die Leitfähigkeit von AMPs hängt von den verwendeten Lipidbilayern, der Temperatur und den Pufferbedingungen ab. Beispielsweise zeigt das AMP Tritrpticin, bei dem es sich um einen kationenselektiven Kanal handelt, in dem zwitterionischen DPhPC-Bilayer eine schwache Leitfähigkeit ($G = 445$ pS), während in Azolectin-Bilayern Leitfähigkeiten mit verschiedenen definierten Werten zwischen 500 bis 2000 pS vorliegen und ein nicht lineares $I-U$ Verhalten aufweisen [137]. Das $I-U$ -Verhältnis ist bei Magainin 2 im negativen Spannungsbereich linear und die Leitfähigkeit weist zwei definierte Werte auf ($G = 366$ pS & 683 pS) [38]. Bei den Messungen von Duclouhier *et al.* wurde ein anionenselektiver Kanal ermittelt, wobei in neueren Arbeiten festgestellt wurde, dass der Kanal Kationen den Anionen vorzieht (5:1-Verhältnis) [30, 38]. Bei Melittin wurden Leitfähigkeitswerte von 7-10 pS in Azolectin-Bilayern (pH 6,0) gemessen und eine Ionenselektivität von Anionen über Kationen beobachtet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mit steigender Melittinkonzentration die Leitfähigkeit steigt [164].

4.3 Modell zur antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L

Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann ein Modell zur Wirkungsweise von DCD-1L gegen Mikroorganismen erstellt werden (Abb. 4.1). Wenn DCD-1L in den Schweiß sezerniert wird, liegt es ungefaltet und wahrscheinlich als Monomer vor (Abb. 4.1(A)). Über den kationischen N-Terminus von DCD-1L kann eine elektrostatische Interaktion mit den negativ geladenen Oberflächenstrukturen der bakteriellen Membran erfolgen. Denkbar wäre auch, dass die Interaktion über die Ausbildung von Salzbrücken zwischen divalenten Ionen wie Zn^{2+} oder Mg^{2+} , welche auch im humanen Schweiß vorhanden sind, und der bakteriellen Membran erfolgt. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung und DCD-1L bildet eine amphipathische Struktur (α -Helix) aus, welche sich mit der unpolaren Seite in den Bilayer einbettet (Abb. 4.1(B)).

Vermutlich führt auch hier eine Schwellenkonzentration dazu, dass sich DCD-1L tiefer in den hydrophoben Bereich der Membran einlagert, sich oligomerisiert und eine Pore ausbildet.

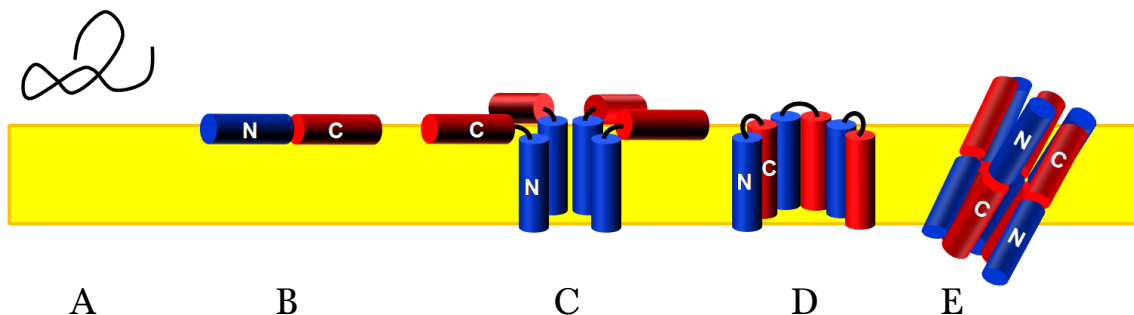


Abbildung 4.1: Modell zur antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L. (A) In Lösung liegt das anionische AMP DCD-1L ungefaltet vor, (B) Der Kontakt mit einer bakteriellen Phospholipidmembran führt zur Ausbildung einer amphipathischen α -Helix, welche parallel zur Membrannormalen orientiert ist, (C - E) DCD-1L besitzt die Fähigkeit sich zu oligomerisieren und Poren auszubilden.

Über die Form der Pore kann derzeit nur spekuliert werden. Die Kristallstruktur und die Modellierungen wiederum zeigen, dass ein Hexamer bestehend aus drei antiparallelen Dimeren, welche durch Zn^{2+} stabilisiert werden, die Pore ausbildet. Dabei soll sich die Pore geneigt in die Membran einbauen (Abb. 4.1(E)) [154]. Gegen dieses Modell spricht, dass die berechnete Länge eines Monomers ~ 8 nm beträgt, während eine Membran durchschnittlich 3 nm aufweist. Aufgrund dessen wären andere Varianten der Porenbildung durchaus möglich. Eine Möglichkeit wäre, dass der hydrophobe C-Terminus im hydrophoben Kern der Membran verankert bleibt und der N-Terminus eine Pore nach dem *toroidal-pore*-Mechanismus ausbildet (Abb. 4.1(C)). Denkbar ist auch, dass sich der kationische N-Terminus von DCD-1L neben dem C-Terminus anordnet, wobei ein intramolekularer *hairpin* gebildet wird (Abb.4.1(D)). Diese Form der Pore würde sich mit den Beobachtungen von Jung *et al.* decken, die anhand ihrer NMR-Daten in Lösung eine *helix-hinge-helix* Struktur, wie sie auch bei anderen helikalen AMPs vorkommt, bei denen der N-Terminus eine hohe Flexibilität besitzt, postulieren [83].

Zusammenfassend kann anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten auf einen Wirkmechanismus geschlossen werden, der zu einer Permeabilisierung der bakteriellen Membran durch DCD-1L führt. Das Peptid weist die für eine Permeabilisierung notwendigen strukturellen Fähigkeiten auf und verhält sich in membranimitierenden Umgebungen bzw. in Anwesenheit von Phospholipiden wie ein klassisches antimikrobielles Peptid mit membranpermeabilisierendem Wirkmechanismus.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das anionische DCD-1L die Fähigkeit besitzt, über Permeabilisierung der bakteriellen Membran zu wirken. Der genaue Wirkme-

chanismus konnte dabei nicht komplett aufgeklärt werden und sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Zusätzlich ist die Frage zu klären, ob die kationischen DCD-abgeleiteten Peptide über den gleichen Mechanismus zum Zelltod der Bakterien führen oder ob bei diesen Peptiden ein anderer Wirkmechanismus vorliegt. Dabei kann mit Hilfe der *solid-state*-NMR die dreidimensionale Struktur der Pore innerhalb von Phospholipiden bestimmt werden. Auch die Orientierung von DCD-Peptiden an Membranen sollte unter weiteren Bedingungen untersucht werden, da die Orientierung zur Membrannormalen von verschiedenen Faktoren wie P/L-Verhältnis, Zeit und Temperatur abhängig ist. Zur Charakterisierung der Pore gehören auch weitere Untersuchungen zur Ionenselektivität. Dafür könnte das Liposomenexperiment für andere Ionenindikatoren ausgebaut werden. Zusätzlich muss der Einfluss der Ionen auf die antimikrobielle Aktivität sowie auf die Stabilisierung von Oligomeren genauer verifiziert werden. Dabei können mit Mutationsanalysen funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden.

Des Weiteren kann man anhand der Erstellung eines Transkriptionsprofils von *S. aureus* nach Behandlung mit DCD-abgeleiteten Peptiden Erkenntnisse darüber erlangen, was innerhalb einer Bakterienzelle passiert. Zeitgleich kann das Transkriptionsprofil einen Hinweis auf mögliche Resistenzmechanismen des Bakteriums gegen die DCD-abgeleiteten AMPs liefern. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob DCD-Peptide Biofilmbildung bzw. einen bereits bestehenden Biofilm inhibieren können.

Da viele AMPs neben der antimikrobiellen Aktivität auch immunmodulatorische Funktionen aufweisen, sollte dies für DCD-abgeleitete Peptide nochmals näher untersucht werden. Möglicherweise kann die antimikrobielle Aktivität additiv oder synergistisch durch verschiedene DCD-Peptide oder andere AMPs erhöht werden.

5 Zusammenfassung

Dermcidin-abgeleitete Peptide werden in den ekkrinen Schweißdrüsen konstitutiv exprimiert und in den Schweiß sezerniert. Diese Peptide unterscheiden sich in Länge, Nettoladung und einigen konnte eine antimikrobielle Aktivität gegen pathogene Bakterien nachgewiesen werden. Mit Hilfe des anionischen DCD-1L sollte der antimikrobielle Wirkmechanismus, der zum bakteriellen Zelltod führt, genauer untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sowie in vorhergehenden Arbeiten konnte eine Interaktion des Peptids mit der bakteriellen Zelloberfläche beobachtet werden, wobei die Oberflächenstruktur gestört wird. Die Interaktion zwischen DCD-1L und bakteriellen Phospholipiden oder DCD-1L in membranimitierenden Umgebungen (TFE, Detergenzien) führen zu einer strukturellen Veränderung des Peptids. DCD-1L bildet dabei eine amphipathische α -helikale Struktur aus und orientiert sich parallel zur Membrannormalen in Lipidsystemen aus POPG oder DMPC/DMPG (1:1) in einem P/L von 1:50 (mol/mol). Eine Interaktion mit Lipid II als Zielstruktur konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DCD-1L oligomere Strukturen in membranimitierenden Umgebungen sowie in Anwesenheit von Phospholipiden ausbildet, welche durch die Anwesenheit von Zn^{2+} stabilisiert werden. Auch eine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität von DCD-1L gegen *S. aureus* 113 WT konnte *in vitro* durch die Zugabe von divalenten Kationen (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) erzielt werden. Des Weiteren konnte in elektrophysiologischen Messungen DCD-1L eine spannungsabhängige porenbildende Aktivität in Phospholipidbilayern aus DPhPC nachgewiesen werden. Die Leitfähigkeit verhält sich über einen Spannungsbereich von -100 mV bis 100 mV sigmoidal (Sättigung zwischen 30 und 40 pS bzw. -30 und -40 pS) und wird durch den pH-Wert beeinflusst, da die Leitfähigkeit mit steigendem pH-Wert deutlich gesenkt wurde. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Elektrolyten konnte keine Selektivität des Kanals gegenüber Kat- bzw. Anionen gemessen werden.

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann ein Modell zur Wirkungsweise von DCD-1L aufgestellt werden. Die initiale Interaktion zwischen DCD-1L und den Phospholipiden der bakteriellen Membran erfolgt wahrscheinlich über elektrostatische Kräfte oder über Salzbrücken zwischen Ionen und der Membran. Dabei führt der Kontakt von DCD-1L mit der Ziellmembran zur Ausbildung einer amphipathischen α -Helix, welche sich parallel zur Membran orientiert. Beim Erreichen einer Schwellenkonzentration kommt es zu einer Oligomerisierung der Peptide und zur Permeabilisierung der Membran.

6 Literatur

- [1] Atherton, E. and Sheppard, R. C.: 1989, *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*, The Practical approach series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England ; New York.
- [2] Avnir, Y. and Barenholz, Y.: 2005, pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction, *Anal Biochem* **347**(1), 34–41.
- [3] Baechle, D., Flad, T., Cansier, A., Steffen, H., Schittek, B., Tolson, J., Herrmann, T., Dihazi, H., Beck, A., Mueller, G. A., Mueller, M., Stevanovic, S., Garbe, C., Mueller, C. A. and Kalbacher, H.: 2006, Cathepsin d is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide dcd-11, *J Biol Chem* **281**(9), 5406–15.
- [4] Bauer, F., Schweimer, K., Kluever, E., Conejo-Garcia, J. R., Forssmann, W. G., Roesch, P., Adermann, K. and Sticht, H.: 2001, Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity, *Protein Sci* **10**(12), 2470–9.
- [5] Baumann, G. and Mueller, P.: 1974, A molecular model of membrane excitability, *J Supramol Struct* **2**(5-6), 538–57.
- [6] Bayer, A. S., Prasad, R., Chandra, J., Koul, A., Smriti, M., Varma, A., Skurray, R. A., Firth, N., Brown, M. H., Koo, S. P. and Yeaman, M. R.: 2000, In vitro resistance of staphylococcus aureus to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity, *Infect Immun* **68**(6), 3548–53.
- [7] Bengoechea, J. A. and Skurnik, M.: 2000, Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in yersinia, *Mol Microbiol* **37**(1), 67–80.
- [8] Bloch, F.: 1946, Nuclear induction, *Phys Rev* **70**, 460–474.
- [9] Blondelle, S. E., Lohner, K. and Aguilar, M.: 1999, Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity, *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2), 89–108.
- [10] Boman, H. G.: 1996, Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity?, *Scand J Immunol* **43**(5), 475–82.
- [11] Brasseur, R.: 1991, Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations, *J Biol Chem* **266**(24), 16120–7.
- [12] Breukink, E., van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J. and de Kruijff, B.: 2003, Lipid ii is an intrinsic component of the

- pore induced by nisin in bacterial membranes, *J Biol Chem* **278**(22), 19898–903.
- [13] Broetz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E. and Sahl, H. G.: 1998, The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid ii, *Antimicrob Agents Chemother* **42**(1), 154–60.
- [14] Broetz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. and Sahl, H. G.: 1995, Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism?, *Antimicrob Agents Chemother* **39**(3), 714–9.
- [15] Brogden, K. A.: 2005, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat Rev Microbiol* **3**(3), 238–50.
- [16] Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., J. and Tack, B. F.: 2003, Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences, *Int J Antimicrob Agents* **22**(5), 465–78.
- [17] Brogden, K. A., De Lucca, A. J., Bland, J. and Elliott, S.: 1996, Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *pasteurella haemolytica*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1), 412–6.
- [18] Buerck, J., Roth, S., Wadhvani, P., Afonin, S., Kanithasen, N., Strandberg, E. and Ulrich, A. S.: 2008, Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism, *Biophys J* **95**(8), 3872–81.
- [19] Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Bulet, P.: 1996, Innate immunity. isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *mytilus edulis*, *J Biol Chem* **271**(36), 21808–13.
- [20] Chen, F. Y., Lee, M. T. and Huang, H. W.: 2002, Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin, *Biophys J* **82**(2), 908–14.
- [21] Chen, F. Y., Lee, M. T. and Huang, H. W.: 2003, Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation, *Biophys J* **84**(6), 3751–8.
- [22] Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T. and Hodges, R. S.: 2007, Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides, *Antimicrob Agents Chemother* **51**(4), 1398–406.
- [23] Chou, P. Y. and Fasman, G. D.: 1974, Prediction of protein conformation, *Biochemistry* **13**(2), 222–45.
- [24] Ciornei, C. D., Sigurdardottir, T., Schmidtchen, A. and Bodelsson, M.: 2005, Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin ll-37, *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7), 2845–50.
- [25] Cole, A. M., Weis, P. and Diamond, G.: 1997, Isolation and characterization of pleu-

- rocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder, *J Biol Chem* **272**(18), 12008–13.
- [26] Cole, C., Barber, J. D. and Barton, G. J.: 2008, The jpred 3 secondary structure prediction server, *Nucleic Acids Res* **36**(Web Server issue), W197–201.
- [27] Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., Anderson, K. L., Dattilo, B. M., Dunman, P. M., Gerads, R., Caprioli, R. M., Nacken, W., Chazin, W. J. and Skaar, E. P.: 2008, Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses, *Science* **319**(5865), 962–5.
- [28] Courvalin, P.: 2008, Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance, *J Intern Med* **264**(1), 4–16.
- [29] Coury, L.: 1999, Conductance measurements part i: Theory, *Current Separations* **18**(3), 91–6.
- [30] Cruciani, R. A., Barker, J. L., Durell, S. R., Raghunathan, G., Guy, H. R., Zasloff, M. and Stanley, E. F.: 1992, Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes, *Eur J Pharmacol* **226**(4), 287–96.
- [31] Csordas, A. and Michl, H.: 1970, Isolierung und strukturaufklaerung eines haemolytisch wirkenden polypeptides aus dem abwehrsekret europaeischer unken, *Monatsh Chem* **101**(1), 182–189.
- [32] Damo, S. M., Kehl-Fie, T. E., Sugitani, N., Holt, M. E., Rathi, S., Murphy, W. J., Zhang, Y., Betz, C., Hench, L., Fritz, G., Skaar, E. P. and Chazin, W. J.: 2013, Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(10), 3841–6.
- [33] Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Cross, K. J., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Catmull, D. V., Malkoski, M. and Reynolds, E. C.: 2005, Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin, *Antimicrob Agents Chemother* **49**(6), 2322–8.
- [34] Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. and Bienert, M.: 2001, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett* **501**(2-3), 146–50.
- [35] Dathe, M. and Wieprecht, T.: 1999, Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2), 71–87.
- [36] Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V. and Wertz, P. W.: 2008, Thematic review series: skin lipids. antimicrobial lipids at the skin surface, *J Lipid Res* **49**(1), 4–11.
- [37] Dressel, S., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Meyer-Hoffert, U., Sunderkoetter, C.

- and Glaeser, R.: 2010, Differential expression of antimicrobial peptides in margins of chronic wounds, *Exp Dermatol* **19**(7), 628–32.
- [38] Duclouhier, H., Molle, G. and Spach, G.: 1989, Antimicrobial peptide magainin i from xenopus skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers, *Biophys J* **56**(5), 1017–21.
- [39] Eisenberg, D.: 1984, Three-dimensional structure of membrane and surface proteins, *Annu Rev Biochem* **53**, 595–623.
- [40] Eisenberg, D., Weiss, R. M. and Terwilliger, T. C.: 1982, The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix, *Nature* **299**(5881), 371–4.
- [41] Fehlbauer, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C. and Hoffmann, J. A.: 1994, Insect immunity. septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides, *J Biol Chem* **269**(52), 33159–63.
- [42] Flad, T., Bogumil, R., Tolson, J., Schitteck, B., Garbe, C., Deeg, M., Mueller, C. A. and Kalbacher, H.: 2002, Detection of dermcidin-derived peptides in sweat by proteinchip technology, *J Immunol Methods* **270**(1), 53–62.
- [43] Fleming, A.: 1922, On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, *Proc R Soc Lond* **93**(653), 306–317.
- [44] Fleming, A.: 1929, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of b. influenzae, *Br J Exp Pathol* **10**(3), 226–36.
- [45] Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F. and Lehrer, R. I.: 1985, Defensins. natural peptide antibiotics of human neutrophils, *J Clin Invest* **76**(4), 1427–35.
- [46] Gautier, R., Douguet, D., Antony, B. and Drin, G.: 2008, Heliquet: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties, *Bioinformatics* **24**(18), 2101–2.
- [47] Gesell, J., Zasloff, M. and Opella, S. J.: 1997, Two-dimensional 1h nmr experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution, *J Biomol NMR* **9**(2), 127–35.
- [48] Giangaspero, A., Sandri, L. and Tossi, A.: 2001, Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides, *Eur J Biochem* **268**(21), 5589–600.
- [49] Giuliani, A., Pirri, G. and Nicoletto, F.: 2007, Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics, *Cent Eur J Biol* **2**(1), 1–33.
- [50] Glaeser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E. and Schroeder, J. M.: 2005, Antimicrobial psoriasin (s100a7) protects human skin from escherichia coli infection,

- Nat Immunol* **6**(1), 57–64.
- [51] Gordon, L. G. and Haydon, D. A.: 1972, The unit conductance channel of alamethicin, *Biochim Biophys Acta* **255**(3), 1014–8.
- [52] Gort, A. S., Ferber, D. M. and Imlay, J. A.: 1999, The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of escherichia coli, *Mol Microbiol* **32**(1), 179–91.
- [53] Grage, S. L., Afonin, S. and Ulrich, A. S.: 2010, Dynamic transitions of membrane-active peptides, *Methods Mol Biol* **618**, 183–207.
- [54] Grice, E. A. and Segre, J. A.: 2011, The skin microbiome, *Nat Rev Microbiol* **9**(4), 244–53.
- [55] Groisman, E. A., Kayser, J. and Soncini, F. C.: 1997, Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-mg²⁺ environments, *J Bacteriol* **179**(22), 7040–5.
- [56] Guina, T., Yi, E. C., Wang, H., Hackett, M. and Miller, S. I.: 2000, A phop-regulated outer membrane protease of salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides, *J Bacteriol* **182**(14), 4077–86.
- [57] Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M. and Miller, S. I.: 1998, Pmra-pmrb-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid a modification and polymyxin resistance, *Mol Microbiol* **27**(6), 1171–82.
- [58] Han, J. and Burgess, K.: 2010, Fluorescent indicators for intracellular ph, *Chem Rev* **110**(5), 2709–28.
- [59] Hancock, R. E.: 1997, Peptide antibiotics, *Lancet* **349**(9049), 418–22.
- [60] Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schroeder, J. M.: 1997, A peptide antibiotic from human skin, *Nature* **387**(6636), 861.
- [61] Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schroeder, J. M.: 2001, Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic, *J Biol Chem* **276**(8), 5707–13.
- [62] Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. and Schroeder, J. M.: 2000, Mucoid pseudomonas aeruginosa, tnf-alpha, and il-1beta, but not il-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia, *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**(6), 714–21.
- [63] Harder, J. and Schroeder, J. M.: 2002, Rnase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin, *J Biol Chem* **277**(48), 46779–84.
- [64] Harris, F., Dennison, S. R. and Phoenix, D. A.: 2009, Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms, *Curr Protein Pept Sci* **10**(6), 585–606.
- [65] Harris, F., Dennison, S. R. and Phoenix, D. A.: 2011, Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms and their mechanisms of action, *Curr Chem Biol* **5**(2), 143–53.

- [66] Heidari, M., Hamir, A., Cutlip, R. C. and Brogden, K. A.: 2002, Antimicrobial anionic peptide binds in vivo to mannheimia (pasteurella) haemolytica attached to ovine alveolar epithelium, *Int J Antimicrob Agents* **20**(1), 69–72.
- [67] Henzler Wildman, K. A., Lee, D. K. and Ramamoorthy, A.: 2003, Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, ll-37, *Biochemistry* **42**(21), 6545–58.
- [68] Hermanson, G.: 1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press Inc., San Diego CA, USA.
- [69] Hood, M. I. and Skaar, E. P.: 2012, Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface, *Nat Rev Microbiol* **10**(8), 525–37.
- [70] Hsu, S. T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. and van Nuland, N. A.: 2002, Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution nmr: the nisin z and lipid ii interaction in sds micelles, *Biochemistry* **41**(24), 7670–6.
- [71] Huang, H. W.: 2000, Action of antimicrobial peptides: two-state model, *Biochemistry* **39**(29), 8347–52.
- [72] Huang, Y., Huang, J. and Chen, Y.: 2010, Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function, *Protein Cell* **1**(2), 143–52.
- [73] Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Kapur, R. and Boman, H. G.: 1982, Insect immunity: isolation and structure of cecropin d and four minor antibacterial components from cecropia pupae, *Eur J Biochem* **127**(1), 207–17.
- [74] Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. and Boman, H. G.: 1980, Insect immunity. purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of hyalophora cecropia, *Eur J Biochem* **106**(1), 7–16.
- [75] Huo, R., Wehrens, R., van Duynhoven, J. and Buydens, L.: 2003, Assessment of techniques for dosy nmr data processing, *Anal Chim Acta* **490**(1-2), 231–251.
- [76] Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T. and Nakai, T.: 2003, Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, chrysophrys major, *Eur J Biochem* **270**(4), 675–86.
- [77] Ireland, D. C., Wang, C. K., Wilson, J. A., Gustafson, K. R. and Craik, D. J.: 2008, Cyclotides as natural anti-hiv agents, *Biopolymers* **90**(1), 51–60.
- [78] Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E.: 2006, Peptide antimicrobial agents, *Clin Microbiol Rev* **19**(3), 491–511.
- [79] Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J. and Tarkowski, A.: 2004, Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel

- bacterial evasion mechanism, *J Immunol* **172**(2), 1169–76.
- [80] Johansson, J., Gudmundsson, G. H., Rottenberg, M. E., Berndt, K. D. and Agerberth, B.: 1998, Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide ll-37, *J Biol Chem* **273**(6), 3718–24.
- [81] Johnson Jr., C.: 1999, Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: Principles and applications, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **34**(3-4), 203–256.
- [82] Jones, D. T.: 1999, Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices, *J Mol Biol* **292**(2), 195–202.
- [83] Jung, H. H., Yang, S. T., Sim, J. Y., Lee, S., Lee, J. Y., Kim, H. H., Shin, S. Y. and Kim, J. I.: 2010, Analysis of the solution structure of the human antibiotic peptide dermcidin and its interaction with phospholipid vesicles, *BMB Rep* **43**(5), 362–8.
- [84] Kagan, B. L., Selsted, M. E., Ganz, T. and Lehrer, R. I.: 1990, Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(1), 210–4.
- [85] Kano, K. and Fendler, J. H.: 1978, Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles, *Biochim Biophys Acta* **509**(2), 289–99.
- [86] Kao, C. Y., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Huang, F., Kim, C., Harper, R. W. and Wu, R.: 2004, Il-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via jak and nf-kappab signaling pathways, *J Immunol* **173**(5), 3482–91.
- [87] Kehl-Fie, T. E., Chitayat, S., Hood, M. I., Damo, S., Restrepo, N., Garcia, C., Munro, K. A., Chazin, W. J. and Skaar, E. P.: 2011, Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of staphylococcus aureus, *Cell Host Microbe* **10**(2), 158–64.
- [88] Kelly, S. M., Jess, T. J. and Price, N. C.: 2005, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim Biophys Acta* **1751**(2), 119–39.
- [89] Klevens, R. M., Edwards, J. R., Tenover, F. C., McDonald, L. C., Horan, T. and Gaynes, R.: 2006, Changes in the epidemiology of methicillin-resistant staphylococcus aureus in intensive care units in us hospitals, 1992-2003, *Clin Infect Dis* **42**(3), 389–91.
- [90] Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., Yano, Y. and Matsuzaki, K.: 2004, Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2, *Biochemistry* **43**(49), 15610–6.
- [91] Kock, R., Mellmann, A., Schaumburg, F., Friedrich, A. W., Kipp, F. and Becker, K.: 2011, The epidemiology of methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) in germany, *Dtsch Arztebl Int* **108**(45), 761–7.

- [92] Koprivnjak, T. and Peschel, A.: 2011, Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides, *Cell Mol Life Sci* **68**(13), 2243–54.
- [93] Kraus, D. and Peschel, A.: 2008, Staphylococcus aureus evasion of innate antimicrobial defense, *Future Microbiol* **3**(4), 437–51.
- [94] Laemmli, U. K.: 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4, *Nature* **227**(5259), 680–5.
- [95] Lai, Y. P., Peng, Y. F., Zuo, Y., Li, J., Huang, J., Wang, L. F. and Wu, Z. R.: 2005, Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-ll, a human antimicrobial peptide, *Biochem Biophys Res Commun* **328**(1), 243–50.
- [96] Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H. and Finkel, P.: 2006, Natural skin surface ph is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int J Cosmet Sci* **28**(5), 359–70.
- [97] Lambert, P. A. and Hammond, S. M.: 1973, Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms, *Biochem Biophys Res Commun* **54**(2), 796–9.
- [98] Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J. and Ptak, M.: 1997, Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects, *Protein Sci* **6**(9), 1878–84.
- [99] Lee, C. C., Sun, Y., Qian, S. and Huang, H. W.: 2011, Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide ll-37, *Biophys J* **100**(7), 1688–96.
- [100] Lee, D. L., Mant, C. T. and Hodges, R. S.: 2003, A novel method to measure self-association of small amphipathic molecules: temperature profiling in reversed-phase chromatography, *J Biol Chem* **278**(25), 22918–27.
- [101] Lee, H., Hsu, F. F., Turk, J. and Groisman, E. A.: 2004, The pmra-regulated pmrc gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid a and polymyxin resistance in salmonella enterica, *J Bacteriol* **186**(13), 4124–33.
- [102] Leonhardt, H.: 1990, Histologie, zytologie und mikroanatomie des menschen, **8. Auflage**, Thieme, Stuttgart.
- [103] Li, M., Rigby, K., Lai, Y., Nair, V., Peschel, A., Schitteck, B. and Otto, M.: 2009, Staphylococcus aureus mutant screen reveals interaction of the human antimicrobial peptide dermcidin with membrane phospholipids, *Antimicrob Agents Chemother* **53**(10), 4200–10.
- [104] Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L. and Ganz, T.: 2002, Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation, *J Invest Dermatol* **118**(2), 275–81.
- [105] Mak, D. O. and Webb, W. W.: 1995, Two classes of alamethicin transmembrane channels: molecular models from single-channel properties, *Biophys J* **69**(6), 2323–36.

- [106] Mandard, N., Bulet, P., Caille, A., Daffre, S. and Vovelle, F.: 2002, The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider, *Eur J Biochem* **269**(4), 1190–8.
- [107] Mandard, N., Sodano, P., Labbe, H., Bonmatin, J. M., Bulet, P., Hetru, C., Ptak, M. and Vovelle, F.: 1998, Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data, *Eur J Biochem* **256**(2), 404–10.
- [108] McManus, A. M., Otvos, L., J., Hoffmann, R. and Craik, D. J.: 1999, Conformational studies by nmr of the antimicrobial peptide, drosocin, and its non-glycosylated derivative: effects of glycosylation on solution conformation, *Biochemistry* **38**(2), 705–14.
- [109] Merrifield, R. B.: 1969, The synthesis of biologically active peptides and proteins, *JAMA* **210**(7), 1247–54.
- [110] Metlay, J. P., Powers, J. H., Dudley, M. N., Christiansen, K. and Finch, R. G.: 2006, Antimicrobial drug resistance, regulation, and research, *Emerg Infect Dis* **12**(2), 183–90.
- [111] Mishra, N. N., Liu, G. Y., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Proctor, R. A., McKinnell, J. and Bayer, A. S.: 2011, Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts staphylococcus aureus susceptibility to host defense peptides, *Antimicrob Agents Chemother* **55**(2), 526–31.
- [112] Morris, K. and Johnson Jr., C.: 1992, Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Am Chem Soc* **114**(8), 3139–3141.
- [113] Mueller, P., Rudin, D., Tien, H. and Wescott, W.: 1962, Reconstitution of excitable cell membrane structure in vitro, *Circulation* **26**, 1167–71.
- [114] Muller, A., Ulm, H., Reder-Christ, K., Sahl, H. G. and Schneider, T.: 2012, Interaction of type a lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors, *Microb Drug Resist* **18**(3), 261–70.
- [115] Nakatsuji, T. and Gallo, R. L.: 2012, Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas, *J Invest Dermatol* **132**(3 Pt 2), 887–95.
- [116] Neu, H. C. and Gootz, T. D.: 1996, *Antimicrobial Chemotherapy*, 4th edn, Galveston (TX).
- [117] Nguyen, K. T., Le Clair, S. V., Ye, S. and Chen, Z.: 2009, Molecular interactions between magainin 2 and model membranes in situ, *J Phys Chem B* **113**(36), 12358–63.
- [118] Nordberg, P., Monnet, D. and Cars, O.: 2005, Antibacterial resistance. background document for the who project: priority medicines for europe and the world - a public health approach to innovation.
- [119] Oishi, O., Yamashita, S., Nishimoto, E., Lee, S., Sugihara, G. and Ohno, M.: 1997,

- Conformations and orientations of aromatic amino acid residues of tachyplesin i in phospholipid membranes, *Biochemistry* **36**(14), 4352–9.
- [120] Oren, Z., Lerman, J. C., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B. and Shai, Y.: 1999, Structure and organization of the human antimicrobial peptide ll-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity, *Biochem J* **341** (Pt 3), 501–13.
- [121] Organization, W. H.: 2001, Who global strategy for the containment of antimicrobial resistance, Geneva: The Organization.
- [122] Orlov, D. S., Nguyen, T. and Lehrer, R. I.: 2002, Potassium release, a useful tool for studying antimicrobial peptides, *J Microbiol Methods* **49**(3), 325–8.
- [123] Park, C. B., Kim, H. S. and Kim, S. C.: 1998, Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions, *Biochem Biophys Res Commun* **244**(1), 253–7.
- [124] Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S. and Kim, S. C.: 2000, Structure-activity analysis of buforin ii, a histone h2a-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin ii, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15), 8245–50.
- [125] Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K. P. and van Strijp, J. A.: 2001, Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor mprf is based on modification of membrane lipids with l-lysine, *J Exp Med* **193**(9), 1067–76.
- [126] Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G. and Goetz, F.: 1999, Inactivation of the dlt operon in staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides, *J Biol Chem* **274**(13), 8405–10.
- [127] Pierce, T. S.: 2009, *Crosslinking Technical Handbook*, Rockford IL, USA.
- [128] Rick, P. D., Hubbard, G. L., Kitaoka, M., Nagaki, H., Kinoshita, T., Dowd, S., Simplaceanu, V. and Ho, C.: 1998, Characterization of the lipid-carrier involved in the synthesis of enterobacterial common antigen (eca) and identification of a novel phosphoglyceride in a mutant of salmonella typhimurium defective in eca synthesis, *Glycobiology* **8**(6), 557–67.
- [129] Rieg, S., Garbe, C., Sauer, B., Kalbacher, H. and Schitteck, B.: 2004, Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions, *Br J Dermatol* **151**(3), 534–9.
- [130] Rieg, S., Seeber, S., Steffen, H., Humeny, A., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Kimura, A., Garbe, C. and Schitteck, B.: 2006, Generation of multiple stable dermcidin-derived

- antimicrobial peptides in sweat of different body sites, *J Invest Dermatol* **126**(2), 354–65.
- [131] Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C. and Schitteck, B.: 2005, 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**(12), 8003–10.
- [132] Rouser, G., Fkeischer, S. and Yamamoto, A.: 1970, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids* **5**(5), 494–6.
- [133] Rozek, A., Friedrich, C. L. and Hancock, R. E.: 2000a, Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles, *Biochemistry* **39**(51), 15765–74.
- [134] Rozek, A., Friedrich, C. L. and Hancock, R. E.: 2000b, Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles, *Biochemistry* **39**(51), 15765–74.
- [135] Sagawa, K., Kimura, A., Saito, Y., Inoue, H., Yasuda, S., Nosaka, M. and Tsuji, T.: 2003, Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat-specific protein and its application for sweat identification, *Int J Legal Med* **117**(2), 90–5.
- [136] Sahl, H. G., Pag, U., Bonness, S., Wagner, S., Antcheva, N. and Tossi, A.: 2005, Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity, *J Leukoc Biol* **77**(4), 466–75.
- [137] Salay, L. C., Procopio, J., Oliveira, E., Nakaie, C. R. and Schreier, S.: 2004, Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritrpticin in planar lipid bilayers, *FEBS Lett* **565**(1-3), 171–5.
- [138] Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Koerner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O. and Sahl, H. G.: 2010, Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci, *Infect Immun* **78**(6), 2793–800.
- [139] Schitteck, B.: 2012, The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense, *J Innate Immun* **4**(4), 349–60.
- [140] Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G. and Garbe, C.: 2001, Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands, *Nat Immunol* **2**(12), 1133–7.
- [141] Schluesener, H. J., Radermacher, S., Melms, A. and Jung, S.: 1993, Leukocytic antimicrobial peptides kill autoimmune T cells, *J Neuroimmunol* **47**(2), 199–202.
- [142] Schneider, T., Senn, M. M., Berger-Baechli, B., Tossi, A., Sahl, H. G. and Wiedemann, I.: 2004, In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing

- cell wall precursor (lipid ii-gly5) of staphylococcus aureus, *Mol Microbiol* **53**(2), 675–85.
- [143] Schroeder, J. M. and Harder, J.: 2006, Antimicrobial skin peptides and proteins, *Cell Mol Life Sci* **63**(4), 469–86.
- [144] Schwentker, F., Gelman, S. and Long, P.: 1937, The treatment of meningococccic meningitis, *JAMA* **108**, 1407–8.
- [145] Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A. and Garcia-Olmedo, F.: 1999, Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens, *Mol Plant Microbe Interact* **12**(1), 16–23.
- [146] Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W. and Cullor, J. S.: 1992, Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils, *J Biol Chem* **267**(7), 4292–5.
- [147] Senyuerek, I., Paulmann, M., Sinnberg, T., Kalbacher, H., Deeg, M., Gutschmann, T., Hermes, M., Kohler, T., Goetz, F., Wolz, C., Peschel, A. and Schitteck, B.: 2009, Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin ll-37 against staphylococcus aureus, *Antimicrob Agents Chemother* **53**(6), 2499–509.
- [148] Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J. and Lehrer, R. I.: 1998, Modulation of neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4), 1829–33.
- [149] Shai, Y.: 2002, Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, *Biopolymers* **66**(4), 236–48.
- [150] Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J. and Potempa, J.: 2004, Degradation of human antimicrobial peptide ll-37 by staphylococcus aureus-derived proteinases, *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12), 4673–9.
- [151] Silva, P. I., J., Daffre, S. and Bulet, P.: 2000, Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider acanthoscurria gomesiana hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family, *J Biol Chem* **275**(43), 33464–70.
- [152] Singer, S. J. and Nicolson, G. L.: 1972, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* **175**(4023), 720–31.
- [153] Snyder, D. A., Chen, Y., Denissova, N. G., Acton, T., Aramini, J. M., Ciano, M., Karlin, R., Liu, J., Manor, P., Rajan, P. A., Rossi, P., Swapna, G. V., Xiao, R., Rost, B., Hunt, J. and Montelione, G. T.: 2005, Comparisons of nmr spectral quality and success in crystallization demonstrate that nmr and x-ray crystallography are complementary methods for small protein structure determination, *J Am Chem Soc* **127**(47), 16505–11.

- [154] Song, C., Weichbrodt, C., Salnikov, E. S., Dynowski, M., Forsberg, B. O., Bechinger, B., Steinem, C., de Groot, B. L., Zachariae, U. and Zeth, K.: 2013, Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(12), 4586–91.
- [155] Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., Peschel, A., Goetz, F., Garbe, C. and Schitteck, B.: 2006, Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge, *Antimicrob Agents Chemother* **50**(8), 2608–20.
- [156] Steinstraesser, L., Kraneburg, U. M., Hirsch, T., Kesting, M., Steinau, H. U., Jacobsen, F. and Al-Benna, S.: 2009, Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance?, *Int J Mol Sci* **10**(9), 3951–70.
- [157] Subczynski, W. K. and Wisniewska, A.: 2000, Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions, *Acta Biochim Pol* **47**(3), 613–25.
- [158] Sutherland, R. and Rolinson, G. N.: 1964, Characteristics of methicillin-resistant staphylococci, *J Bacteriol* **87**, 887–99.
- [159] Syvitski, R. T., Burton, I., Mattatall, N. R., Douglas, S. E. and Jakeman, D. L.: 2005, Structural characterization of the antimicrobial peptide pleurocidin from winter flounder, *Biochemistry* **44**(19), 7282–93.
- [160] Tachi, T., Epand, R. F., Epand, R. M. and Matsuzaki, K.: 2002, Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity, *Biochemistry* **41**(34), 10723–31.
- [161] Tang, Y. Q., Yuan, J., Miller, C. J. and Selsted, M. E.: 1999, Isolation, characterization, cDNA cloning, and antimicrobial properties of two distinct subfamilies of alpha-defensins from rhesus macaque leukocytes, *Infect Immun* **67**(11), 6139–44.
- [162] Teixeira, V., Feio, M. J. and Bastos, M.: 2012, Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes, *Prog Lipid Res* **51**(2), 149–77.
- [163] Thouzeau, C., Le Maho, Y., Froget, G., Sabatier, L., Le Bohec, C., Hoffmann, J. A. and Bulet, P.: 2003, Spheniscins, avian beta-defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *J Biol Chem* **278**(51), 51053–8.
- [164] Tosteson, M. T. and Tosteson, D. C.: 1981, The sting. melittin forms channels in lipid bilayers, *Biophys J* **36**(1), 109–16.
- [165] Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J. and Lehrer, R. I.: 1998, Activities of ll-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils, *Antimicrob Agents Chemother* **42**(9), 2206–14.
- [166] Velankar, S., Best, C., Beuth, B., Boutselakis, C. H., Copley, N., Sousa Da Silva, A. W.,

- Dimitropoulos, D., Golovin, A., Hirshberg, M., John, M., Krissinel, E. B., Newman, R., Oldfield, T., Pajon, A., Penkett, C. J., Pineda-Castillo, J., Sahni, G., Sen, S., Slowley, R., Suarez-Uruena, A., Swaminathan, J., van Ginkel, G., Vranken, W. F., Henrick, K. and Kleywegt, G. J.: 2010, Pdbe: Protein data bank in europe, *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue), D308–17.
- [167] Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R. and Otto, M.: 2004, Polysaccharide intercellular adhesin (pia) protects staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system, *Cell Microbiol* **6**(3), 269–75.
- [168] Wang, G.: 2008, Structures of human host defense cathelicidin ll-37 and its smallest antimicrobial peptide kr-12 in lipid micelles, *J Biol Chem* **283**(47), 32637–43.
- [169] Wang, G., Li, X. and Wang, Z.: 2009, Apd2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design, *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue), D933–7.
- [170] Wang, H. and Ng, T. B.: 2000, Ginkbilobin, a novel antifungal protein from ginkgo biloba seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein, *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2), 407–11.
- [171] Weinberg, E. D.: 1975, Nutritional immunity. host's attempt to withhold iron from microbial invaders, *JAMA* **231**(1), 39–41.
- [172] Weinstein, S. A., Schmidt, J. J., Bernheimer, A. W. and Smith, L. A.: 1991, Characterization and amino acid sequences of two lethal peptides isolated from venom of wagler's pit viper, trimeresurus wagleri, *Toxicon* **29**(2), 227–36.
- [173] White, S.: 1986, *The physical nature of planar bilayer membranes*, Ion channel reconstitution, ed. C. Miller, New York, London.
- [174] Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. and Sahl, H. G.: 2001, Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid ii combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, *J Biol Chem* **276**(3), 1772–9.
- [175] Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. and Bienert, M.: 1997, Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes, *Biochemistry* **36**(20), 6124–32.
- [176] Wieprecht, T., Dathe, M., Epanand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. and Bienert, M.: 1997, Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides, *Biochemistry* **36**(42), 12869–80.
- [177] Wieprecht, T., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. and Bienert, M.: 1997, Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial

- peptides by slight modifications of the hydrophobic moment, *FEBS Lett* **417**(1), 135–40.
- [178] Windisch, D., Hoffmann, S., Afonin, S., Vollmer, S., Benamira, S., Langer, B., Buerck, J., Muhle-Goll, C. and Ulrich, A. S.: 2010, Structural role of the conserved cysteines in the dimerization of the viral transmembrane oncoprotein e5, *Biophys J* **99**(6), 1764–72.
- [179] Wong, S.: 1991, *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press Inc., Boca Raton FL, USA.
- [180] Wu, Y., Huang, H. W. and Olah, G. A.: 1990, Method of oriented circular dichroism, *Biophys J* **57**(4), 797–806.
- [181] Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. and Huang, H. W.: 2001, Barrel-stave model or toroidal model? a case study on melittin pores, *Biophys J* **81**(3), 1475–85.
- [182] Yeaman, M. R. and Yount, N. Y.: 2003, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol Rev* **55**(1), 27–55.
- [183] Yee, A. A., Savchenko, A., Ignachenko, A., Lukin, J., Xu, X., Skarina, T., Evdokimova, E., Liu, C. S., Semesi, A., Guido, V., Edwards, A. M. and Arrowsmith, C. H.: 2005, Nmr and x-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins, *J Am Chem Soc* **127**(47), 16512–7.
- [184] Yenugu, S., Hamil, K. G., Radhakrishnan, Y., French, F. S. and Hall, S. H.: 2004, The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (defb118) (formerly esc42), is an antimicrobial beta-defensin, *Endocrinology* **145**(7), 3165–73.
- [185] Yi, G. S., Park, C. B., Kim, S. C. and Cheong, C.: 1996, Solution structure of an antimicrobial peptide buforin ii, *FEBS Lett* **398**(1), 87–90.
- [186] Yount, N. Y. and Yeaman, M. R.: 2013, Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target, *Ann N Y Acad Sci* **1277**, 127–38.
- [187] Zasloff, M.: 1987, Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(15), 5449–53.
- [188] Zasloff, M.: 2002, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* **415**(6870), 389–95.