

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig

Isolierung und Charakterisierung von antimykotisch wirksamen Peptiden aus
humanem Plazentagewebe

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Johann Schneider
aus Mühldorf/Inn
2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. H. C. Korting

**Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Ebel
Prof. Dr. K.-S. Boos**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. M. Schaller**

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2005

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG	6
1.1 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE.....	6
1.2 CANDIDA ALBICANS	10
1.2.1 Klassifizierung.....	10
1.2.2 Epidemiologie.....	11
1.2.3 Struktur von <i>Candida albicans</i>	12
1.2.4 Pathogenitätsfaktoren von <i>Candida albicans</i>	13
1.2.5 Die sekretorische Aspartatprotease (<i>Sap</i>) von <i>Candida albicans</i>	15
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 HERSTELLUNG EINER PLACENTA PEPTIDBANK	18
2.1.1 Peptidextraktion	18
2.1.2 Präparative Kationenaustausch-Chromatographie	18
2.1.3 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie.....	19
2.2 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	20
2.2.1 Reversed-Phase HPLC.....	20
2.2.2 Kationenaustausch-HPLC.....	21
2.2.3 Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie.....	21
2.2.4 Gefriertrocknen von Peptiden	22
2.3 ANALYTISCHE METHODEN	22
2.3.1 Massenspektrometrie.....	22
2.3.2 Kapillarzonenelektrophorese	22
2.3.3 Edman Sequenzierung.....	23
2.3.4 Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin.....	23
2.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.4.1 Synchronisation von <i>Candida albicans</i>	24
2.4.2 <i>In vitro</i> Modell der oralen Candidose.....	24
2.4.3 Fixierung und Einbettung.....	25
2.4.4 Lichtmikroskopische Untersuchungen	26
2.4.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen	27
2.4.6 Mikrodilutionsassay	27
2.4.7 Vorbereitung der <i>Candida albicans</i> -Enzym-Lösung (<i>Sap</i>).....	28
2.4.8 <i>Sap</i> -Aktivitäts-Assay.....	29
3. ERGEBNISSE	32
3.1 ANTIMYKOTISCHES SCREENING	32
3.1.1 Wirkung von Plazentapeptiden auf das Wachstum von <i>Candida albicans</i>	32
3.1.2 Bestätigung der Peptidstruktur ausgewählter Peptidbank-Fractionen durch Hydrolyse	34
3.1.3 Isolierung antimykotischer Peptide.....	36
3.2 SAP – INHIBITIONS-SCREENING	40
3.2.1 Wirkung von Plazentapeptiden auf die <i>Sap</i> von <i>Candida albicans</i>	40
3.2.2 Isolierung eines aktiven Peptids.....	41
3.2.3 Charakterisierung von humanem Hämoglobin β (111-146).....	50
3.3 WIRKUNG BEKANNTER PEPTIDE AUF CANDIDA ALBICANS.....	51
3.3.1 <i>Sap</i> -Hemmung durch humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (1-31) (<i>hGAPDH</i> (1-31)).....	51
3.3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen von <i>C. albicans</i> durch <i>hGAPDH</i> (1-31).....	53

3.3.3 <i>In vitro</i> Untersuchungen am Modell der oralen Kandidose	55
4. DISKUSSION	58
4.1 DAS ANTIMIKROBIELLE PEPTID HUMANES HÄMOGLOBIN B (111-146)	59
4.2 DAS ANTIMIKROBIELLE PEPTID HUMANE GLYCERINALDEHYD-3-PHOSPHAT- DEHYDROGENASE (1-31).....	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. ANHANG	67
6.1. TABELLEN DER VERSUCHSERGEBNISSE DES SAP-INHIBITIONSASSAYS	67
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	78
8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....	80
9. VERZEICHNIS DER TABELLEN.....	83
10. LITERATURVERZEICHNIS	85
11. DANKSAGUNG	98
12. LEBENS LAUF	99

1. Einleitung

Durch die steigende Anzahl immungeschwächter Patienten zum Beispiel durch AIDS, Organtransplantationen und Drogenabhängigkeit, erhöhte sich auch die Inzidenz von Infektionen mit der opportunistischen Hefe *Candida albicans* (Ruhnke et al., 1994). Diese meist oropharyngealen Infektionen werden weitgehend mit Fluconazol behandelt. Die Langzeitbehandlung mit Azolen führte in den letzten Jahren jedoch zum Auftreten azolresistenter *Candida albicans* Stämme (Morschhäuser, 2002). Azole inhibieren ein Schlüsselenzym der Ergosterolbiosynthese, die Cytochrom P-450 abhängige Lanosterol-14 α -Demethylase. Bei resistenten Stämmen wird dieses Enzym in vermindertem Maße gebildet, zudem wird die Bioverfügbarkeit durch Effluxpumpen gemindert (Vanden Bossche et al., 1994; Sanglard et al. 1995-97).

Die Resistenzentwicklung bei Pilzen, aber auch bei Bakterien, gegen bisher wirksame Medikamente stellt ein ernstzunehmendes globales Problem dar. Ein Lösungsansatz ist die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen. In den letzten Jahren rückten antimikrobielle Peptide als neue, vielversprechende Wirkstoffklasse in den Blickpunkt des Interesses.

Gegenstand dieser Dissertation ist die Charakterisierung von neuen antimikrobiellen Peptiden (AP) aus humaner Plazenta und humanem Blut, die antimykotische Wirksamkeit gegen *Candida albicans* zeigen, und potentiell einen wesentlichen Bestandteil der unspezifischen Abwehr des angeborenen Immunsystems darstellen.

1.1 Antimikrobielle Peptide

Multizelluläre Organismen schützen sich durch AP vor dem Eindringen von Mikroorganismen (Schröder, 1999). Diese Peptide zeichnen sich durch ihre schnelle und unspezifische Wirkung aus und können aufgrund ihrer geringen Größe mit relativ geringem Energieaufwand in großen Mengen hergestellt werden (Rao, 1995). Sie werden aber nicht nur durch de novo Synthese, sondern auch durch Proteolyse von schon vorhandenen Proteinen gebildet, wie z.B. Lactoferrin oder Hämoglobin (Bellamy et al., 1993; Fogaca et al., 1999).

In Pflanzen, Amphibien, Insekten und Säugetieren konnten bisher mehr als 70 derartige Substanzen charakterisiert werden. Diese lassen sich an Hand ihrer Peptidstruktur und ihrer Disulfidbrücken in vier Gruppen einteilen (Tab 1).

Tab. 1: Strukturelle Gruppen kationischer, antimikrobieller Peptide (Hancock, 1997)

Gruppe	Vorkommen	Beispiel
<u><i>β-Faltblatt</i></u> Defensine Thionine, Protegrine	Pflanzen, Insekten, Schlangen, Säugerzellen, Trachea, Intestinaltrakt, etc.	Humane β-Defensine
<u><i>α-Helix</i></u> Cecropine Megainine	Insekten, Amphibien, Säugetiere, Bakterien	Cecropin A Megainin II
<u><i>Extended coil</i></u> Indolicidin, bac 5	Bovine neutrophile Zellen, Insekten	Indolicidin
<u><i>Loops</i></u> Bactenecin	Bovine neutrophile Zellen, Schlangen, Bakterien	Bactenecin

Beim Menschen wurden die meisten AP unmittelbar auf epithelialen Oberflächen des Darms und der Haut sowie in Körperflüssigkeiten, wie Tränenflüssigkeit und Blut, nachgewiesen. Diese Peptide lassen sich durch Entzündung, durch Botenstoffe, wie zum Beispiel TNF- α , und durch abgetötete Bakterien in ihrer Expression hochregulieren (Gallo et al., 1994; Frohm et al., 1997; Zhao et al., 1996).

Verschiedene Studien zeigen, daß AP durch enzymatische Hydrolyse von Proteinen wie Lactoferrin, Hämoglobin und Histonen entstehen. Diese Proteinfragmente zeigen eine größere antimikrobielle Aktivität als die Vorläuferproteine (Kim et al., 2000; Fogaca et al., 1999; Andreu, Rivas, 1998). Allerdings können auch antimikrobielle Peptide aus Proteinen entstehen, die ursprünglich keine Wachstumshemmung auf Mikroorganismen zeigen, wie das für mehrere antimikrobiell wirksame Fragmente von Casein gezeigt werden konnte, die nach Proteolyse aus Milch isoliert wurden (Liepke et al., 2001; Zucht et al., 1995).

AP beim Menschen sind, neben der zellulären unspezifischen Abwehr durch natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, ein Teil des angeborenen unspezifischen Abwehrsystems. Mit ihnen schützt sich der Körper, durch Expression von Enzymen, Proteinen und Peptiden, vor dem Eindringen von Bakterien, Pilzen und Viren. Zwar hat das unspezifische Immunsystem kein Gedächtnis, aber durch ihre sofortige Wirkung (schon nach wenigen Sekunden) hat es einige Vorteile im Gegensatz zur spezifischen Abwehr, bei der die Immunantwort, bedingt durch die Bildung von Antikörpern, erst nach bis zu einer Woche am effektivsten ist. Neben den AP, wie z.B. den Defensinen, gehören noch das Komplementsystem, Akutphaseproteine und die Interferone zu dieser Gruppe (Hänsch, 1986; Casey, 2000; Picker et Butcher, 1992; Collins, 1979).

Eine der wichtigsten Gruppen der menschlichen AP ist die Gruppe der Defensine. Sie finden sich auf Chromosom 8p23. Die Grundstruktur der Defensine besteht aus β -Faltblatt „Haarnadeln“ und einer α -Helix. Diese Struktur wird durch 3 Disulfidbrücken stabilisiert (Abb.1)(Skalicky, 1994). Defensine bestehen aus etwa 30-40 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von ca. 3-4 kDa. Desweiteren sind alle Defensine und die meisten der

antimikrobiellen Peptide kationisch, amphiphil und haben eine positive Nettoladung von etwa +2. Sie zeigen somit eine kationische und hydrophobe Oberfläche (Ganz et Lehrer, 1994; Huttner et Bevins, 1999; Müller et al., 1999). In Abhängigkeit ihrer Zysteinreste und somit der Position ihrer Disulfidbrücken, können die Defensine in α -, β - und θ -Defensine (Tang et al., 1999) eingeteilt werden. α -Defensine finden sich vor allem in den azurophilen Granula der Granulozyten und in den Panethschen Körnerzellen der Lieberkühnschen Krypten des Dünndarms (Ouellete et Selsted, 1996). β -Defensine, von denen bisher 4 charakterisiert wurden (Conejo et al. 1, 2001), finden sich in verschiedenen epithelialen und nicht epithelialen Zelltypen, so z.B. im Atem-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt, sowie auf der Haut (Conejo et al. 2, 2001; Diamond et Bevins, 1998; Fehlbaum et al., 2000).

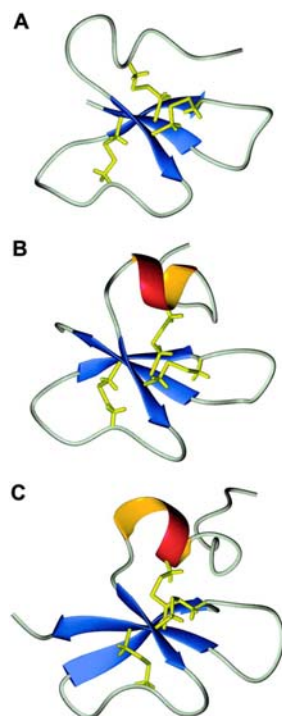


Abb. 1: Struktur der Peptide: A: HBD1; B: HBD2; C: HBD3 (Schibli et al., 2002)

Die meisten der AP sind wirksam gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, verschiedene humanpathogene Pilze (auch gegen azolresistente *Candida albicans* Stämme), und sogar gegen einige Viren (Boman, 1995; DeLuca et Walsh, 1999; Hancock, 1997/99; Lehrer et Ganz, 1999; Schröder et Harder, 1999).

Der Wirkmechanismus der Peptide ist noch nicht vollständig geklärt. Da die AP überwiegend positiv geladen sind, binden diese an die negativ geladenen Bestandteile der Bakterienmembran. Dies sind vor allem Lipopolysaccharide bei Gram-negativen Bakterien, Polysaccharide und Teichonsäure bei Gram-positiven Bakterien, und Phospholipide der inneren Membran Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Da die Zytoplasmamembran eukaryontischer Zellen, bedingt durch Phosphatidylcholin, in der Struktur verschieden ist, lässt sich, zumindest elektrostatisch, die Selektivität der AP für Bakterien herleiten (Ganz et Lehrer, 1994; Weinberg et al., 1998; Quayle et al., 1998). Zudem zeigen Mutanten von *Staphylococcus aureus*, welche veränderte Strukturen der Teichonsäure besitzen, eine erhöhte Sensitivität für HNP-1, HNP-2 und HNP-3 (Peschel et al., 2002).

Ein weiterer Mechanismus besteht in der Bildung von Poren in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. AP können, durch ihre Affinität zu Lipopolysacchariden, divalente Kationen, wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} , welche als Brücke zwischen den Lipopolysacchariden dienen, kompetitiv austauschen. Dieser Mechanismus wird als „self-promoted uptake“ beschrieben. In ähnlicher Weise formen monomere Peptide multimere Kanäle, welche durch das elektrische Potential elektrophoretisch in die Bakterienmembran gelangen. Diese Kanäle funktionieren spannungabhängig und erhöhen die Permeabilität der Membran. Ein daraus resultierender Kaliumverlust führt zu einer Membranepolarisation (Lehrer et al., 1989; Kagan et al., 1990; Fujii et al., 1993; Wimley et al., 1994; Lohner et al., 1997; Cociancich et al., 1993). Lipid-Peptid Interaktionsstudien unterstützen dieses Modell der transmembranären Kanäle nicht (Schröder, 1999). Es wird aber angenommen, dass die AP als Monomere an die Oberflächen der bakteriellen Phospholipidmembran binden, dort eine „teppichähnliche“ Hülle bilden, um die Oberfläche wie ein Detergens zu lösen (Hancock et Nair, 2000).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass AP neben dem direkten Effekt auf die Erreger auch die Zellen des Wirts beeinflussen. Hier werden verschiedene Mechanismen des Entzündungsprozesses und der Immunantwort induziert. Es wurden zum Beispiel Interaktionen von β -Defensinen mit dem Chemokinrezeptor CCR 6 und mit dendritischen Zellen gezeigt (Yang et al., 2001; Biragyn et al., 2001).

In die Klinik haben bisher 2 Gruppen AP Einzug gehalten. Zum einen sind es die Lipopeptide, wie Gramacidin und Polymyxin, zum andern die Glykopeptidantibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin (Hancock, 1997). Welche Bedeutung die AP bekommen, zeigt sich schon daran, dass die Bemühungen auf diesem Gebiet immer mehr werden. So befinden oder befinden sich schon einige neue Peptidantibiotika in Phase II und III der klinischen Erprobung. Zu nennen sind das Protegrinanalogen IB-367 der Firma Intrabiotic, welches zur Behandlung von Mukosiden entwickelt wurde, das rBPI-21 für Akne vulgaris (Xoma), und Megaininderivate für diabetische Fußulzerationen (Megainin Pharmaceuticals) (Chen et al., 2000; Bush et Macielag, 2000; Garred, 2000; Hancock et Nair, 2000; Latham, 1999; Scannon, 1999). Ein Problem aber stellt auch auf diesem Gebiet schon wieder das Problem der Resistenzen dar. Erreger wie *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, und andere konnten durch Veränderung ihrer anionischen Oberflächenmoleküle die Wirksamkeit kationischer antimikrobieller Peptide deutlich mindern (Peschel 2002). Desweiteren sind z.B. *Shigellen* in der Lage, durch Adhäsion an die Epithelzelle des Wirts eine Herunterregulierung der Expression der antimikrobiellen Peptide LL-37 und humanes β -Defensin 1 zu induzieren. Dadurch wird der Wirt einer Invasion pathogener Keime zunächst schutzlos ausgeliefert, da die Aktivierung des spezifischen Immunsystems mehrere Tage in Anspruch nimmt (Islam et al., 2001).

1.2 Candida albicans

1.2.1 Klassifizierung

Nach traditioneller Auffassung wurden Pilze der Botanik zugeordnet. Diese Zuordnung ist aber nicht haltbar, da den Pilzen einige Pflanzen-typische Merkmale fehlen. So zum Beispiel Plastide und photosynthetische Pigmente. Daher sind Pilze darauf angewiesen, organisches Material als Nährstoffquelle zu nutzen, und leben somit heterotroph, saprophytär, carnivor, parasitisch und symbiontisch. Da Pilze eukariontisch sind, also eine Zellkernmembran, Mitochondrien, Diktyosomen und ein endoplasmatisches Retikulum besitzen, lassen sie sich auch nicht dem Reich der Bakterien zuordnen. Auch der Aufbau der Pilzzellmembran aus Chitin spricht gegen die Zurechnung zu den Bakterien (Preusser, 1982; Rieth, 1975; Oethinger, 1997). Im Gegensatz zur normalen systematischen Einteilung in Reich, Abteilung, Klasse usw. ist die gängige klinische Einteilung der Pilze das sogenannte D-H-S-System nach

Rieth. Bei diesem auf ontogenetischen, physiologischen und somatisch-morphologischen Merkmalen aufbauenden System steht „D“ für *Dermatophyten*, „H“ für *Hefen*, und „S“ für *Schimmel*. Zu den *Dermatophyten* gehören die *Trichophyton*-, *Microsporum*-, und *Epidermophyton*-Arten, zu den *Hefen* z.B. die *Candida* - Arten, *Cryptosporum neoformans* und *Malassezia furfur* (auch *Pityrosporum ovale* genannt), und zu den *Schimmelpilzen* z.B. die *Aspergillus*-Arten. Als weitere klinische relevante, aber nicht in das D-H-S-System integrierte Pilze sind u.a. *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatitidis* zu nennen (Jung, 1998; Oethinger, 1997; Nolting et Fegeler, 1993; Qadripur, 1996).

1.2.2 Epidemiologie

Die größte klinische Bedeutung unter den Pilzen besitzt die Gattung *Candida* (lat. candidus: glänzend weiß; albicare: weiß werden/sein), und unter den etwa 150 bekannten *Candida*-Arten, *Candida albicans*. Die fakultativ pathogene Hefe *Candida albicans* ist für ca. 50-70 % der Candidamykosen verantwortlich, während *Candida tropicalis* 10-20 %, *Candida parapsilosis* und *Candida glabrata* jeweils 10 % und andere *Candida spezies* 5 % ausmachen. *Candida albicans* ist Teil der Normalflora des Orogastrointestinal- und des weiblichen Genital-Trakts, und bei etwa 20 % der Gesunden ist die Mundhöhle mit diesem Keim besiedelt (Deslauriers et al., 1997). Die Anzahl der Candidainfektionen ist seit 1960 stark gestiegen, vor allem bei immunsupprimierten Leukämiepatienten (Bodey, 1966). Spätestens seit den 1980ern und der dramatischen Ausbreitung des HI-Virus wurden Kandidosen zu einem wichtigen Problem der modernen Medizin. Das Auftreten von Candidämien hat sich in diesen Jahren mehr als verdoppelt und *Candida spezies* waren die viert häufigste Ursache einer Sepsis (Jarvis, 1995).

Als Risikofaktoren, die das Auftreten, das klinische Bild, die Schwere und letztlich die Letalität einer Kandidose bestimmen, gelten auf Seiten des Wirtes die physikalische Schädigung der Haut oder Schleimhaut und ein zellulär bzw. humoral bedingter Immundefekt. Hierher gehören z.B. zentralvenöse Katheter, Prothesen, parenterale Ernährung, starke Verbrennungen und chirurgische Eingriffe, bei denen die Oberflächenintegrität verletzt wird (Bross et al., 1989; Karabinis et al., 1988; Komshian et al., 1989; Beck-Sague et Jarvis, 1993). Zu den Risikofaktoren, welche das Immunsystem negativ beeinflussen, gehören u.a. onkologische Erkrankungen, AIDS, angeborene Immundefekte, Alkoholmissbrauch, Medikamente (z.B. Corticosteroide, Immunsuppressiva,

Chemotherapeutika, Kontrazeptiva, Antibiotika, Trichomonadenmittel), Diabetes mellitus, Stress, Alter, Adipositas. Zudem wird eine *Candida*-Infektion begünstigt durch gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Enterokokken* (Korting, 1982; Ollert et al., 1995; Senet, 1997).

Die zweite wichtige Determinante der Pilzkrankungen ist die Virulenz des Pilzes.

1.2.3 Struktur von *Candida albicans*

Candida albicans ist eine dünnwandiger, gram-positiver, kapselloser Hefepilz, der in rundlicher bis ovaler Sprosspilzform vorliegt, und eine Länge von 5-10 μm und einen Durchmesser von 3-6 μm erreicht. Zudem entstehen nach längerem Wachstum zahlreiche fadenförmige, verzweigte Strukturen, die als Pseudohyphen oder -myzel bezeichnet werden. Pseudohyphen weisen unter dem Mikroskop eine große Ähnlichkeit mit echten Hyphen auf, sind jedoch im Gegensatz zu diesen nicht septiert, sondern nur aus einzelnen Sprosszellen bzw. Blastosporen zusammengesetzt, die sich nach der Teilung nicht voneinander getrennt haben (Odds, 1988; Preusser, 1982; Shepherd, 1991; Winner et Hurley, 1964). *C. albicans* ist aber, da es ein dimorpher Pilz ist, durchaus in der Lage, echtes, aus Hyphen zusammengesetztes Myzel zu bilden. Als einzige Hefe ist *C. albicans* außerdem in der Lage, Chlamydosporen zu bilden. Dies kann z.B. für diagnostische Zwecke nützen. Die Hefezelle besteht im Mittel aus 20-40 % Proteinen, 30-50 % Polysacchariden, und unterschiedlichen Mengen an Lipiden. Das diploide Genom besteht in der Regel aus acht Chromosomenpaaren. In der sich asexuell vermehrenden Hefe findet man für eukaryontische Zellen typische Organellen wie z.B. ein endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, rund bis oval geformte Mitochondrien, welche von einer Doppelmembran umgeben sind, und einen ebenfalls von einer Doppelmembran umgebenen, elektronendichtes, granuläres Material enthaltenden Zellkern (Odds, 1975, 1994; Ghannoum et al., 1986; Sentandreu et al., 1991).

Die hydrophobe Zellwand ist ca. 250-260 nm dick und wird aus 3 Hauptbestandteilen gebildet. Die $\beta(1-3)$ -Glucane und $\beta(1-6)$ -Glucane sorgen zusammen mit Chitinketten der Zellwand für die Zellintegrität. Weiterhin befinden sich in der Zellwand von *C. albicans* Mannanpolysaccharide, die auch als *Tsuchia*-Faktoren bezeichnet werden und als Matrixpolymere wichtige Antigene des Pilzes darstellen. Mannane setzen sich aus einem Grundgerüst von $\alpha(1-6)$ linear verknüpften Mannose-Einheiten zusammen, an das zusätzlich in Position $\alpha(1-2)$, seltener in Position $\alpha(1-3)$, weitere Mannose-Monomere glykosidisch gebunden sind. Lipide finden sich in fast gleichmäßiger Verteilung in allen Schichten der Zellwand (Evron et Drewe, 1984; Stewart et Ballou, 1968; Summers et al., 1964; Tsuchia et

al., 1961; Gopal et al., 1984). Zu spezifischer Rezeptorbindung sind ebenfalls Fimbrien und Pili an der Zelloberfläche befähigt. Diese sind aber meist nur dann vorhanden, wenn der Hefepilz auf einem festen Nährmedium gezüchtet wird oder dem Medium bestimmte Kohlenhydrate zugesetzt sind. Die fibrilläre Schicht kann leicht entfernt werden und scheint in großem Maße die Adhärenz des Erregers an menschliche Haut oder Schleimhäute zu bedingen (Kulkarni et al., 1980; McCourtie et Douglas, 1981). Insgesamt ist die Zellwand von *Candida albicans* von großer Bedeutung, da sie bezüglich Formerhalt, Diagnostik und Virulenz von großer Wichtigkeit zu sein scheint (Odds, 1988).

1.2.4 Pathogenitätsfaktoren von *Candida albicans*

Faktoren, die das Entstehen, das klinische Bild, die Schwere und letztlich die Prognose einer Mykose bestimmen, umfassen Wechselwirkungen zwischen den Determinanten der Pathogenität der Pilze auf der einen und den Mechanismen der Abwehr des Wirts auf der anderen Seite. Für eine Infektion ist nicht nur ein Faktor, sondern eine komplizierte Symphonie verschiedenster Komponenten verantwortlich. Die wesentlichen Virulenzfaktoren sind im folgenden Schema zusammengefasst (Abb.2).

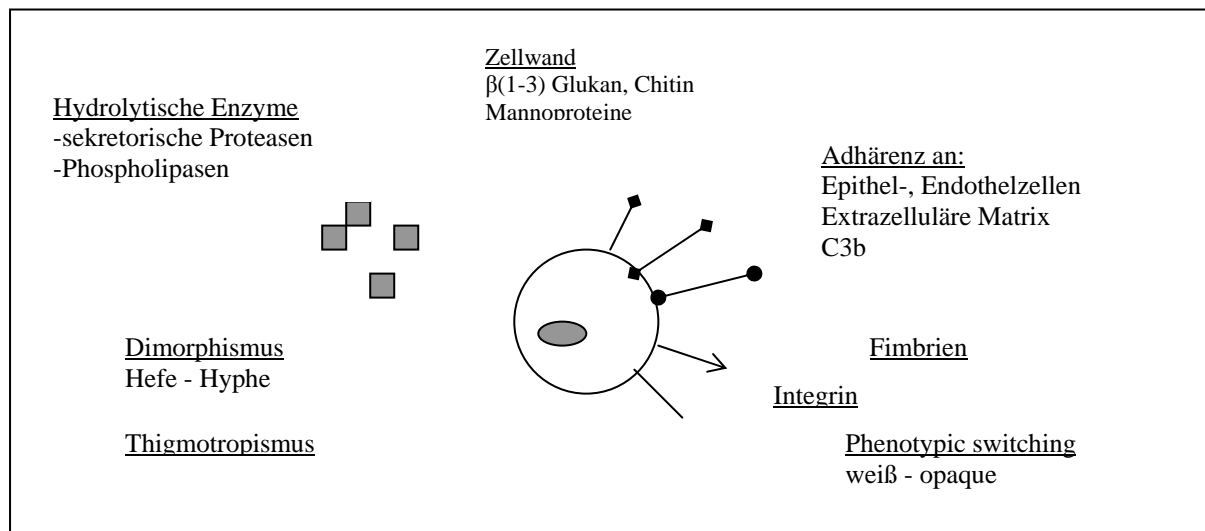


Abb. 2: Schematische Darstellung möglicher Virulenzfaktoren von *Candida albicans* (nach Morschhäuser et al., 1997)

Am Anfang einer Infektion stehen die Adhärenz und Kolonisation des Erregers an Oberflächen. So kann *Candida albicans* an Epithel- und Endothelzellen, extrazelluläre Matrix, C3b-Moleküle des Komplementsystems, aber auch an nicht organische Oberflächen wie PVC binden. Ermöglicht wird dies mit Hilfe von Koaggregation, Protein-Protein-, Lektin-Kohlenwasserstoff-, und Mukopolysaccharid-Interaktion, z.B. durch Pili, Mannan- und

Membranproteine und Fimbrien (Hostetter, 1998; Kimura et Pearsall, 1978; Ray et al., 1984; Rotrosen et al., 1985; Calderone et Braun, 1991; Ollert et al., 1993).

Dimorphismus bezeichnet die schnelle Umwandlung von der Hefe zur Hyphe. Die Ausbildung einer der beiden Formen hängt ab von den vorherrschenden Bedingungen. So wird der Hyphenform im Anfangsstadium einer Infektion eine besondere Rolle zugesprochen, da sie aufgrund ihrer Form und biochemischen Eigenschaften besser an Wirtsgewebe binden und dieses penetrieren kann, und aus phagozytierenden Zellen zu entkommen vermag (Anderson et Odds, 1985; Arai et al., 1977; Borg-von Zepelin et al., 1998; Cutler, 1991; Richardson et Smith, 1981).

Da *Candida albicans* mit einer Häufigkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} seine Morphologie und Zelleigenschaften, wie z.B. die Antigenstruktur verändern kann, nennt man dieses Phänomen phänotypisches *switching*. Aus dieser Veränderung resultieren verschieden gefärbte Kolonien, die als *weiß*-Form oder *opaque*-Form bezeichnet werden. Bei der *weiß*-Form finden sich glatte, runde Zellen, sowie eine pH-abhängige Hefe-Hyphen-Transformation. Im Gegensatz dazu sind die Zellen der *opaque*-Form flacher und größer, und zeigen eine veränderte Lipidzusammensetzung. Es wurde weiterhin beobachtet, dass bei Patienten mit einer manifesten oralen Kandidose die Switching-Frequenz deutlich höher war als bei gesunden Probanden (Ghannoum et al., 1986; Morschhäuser et al., 1996/97; Odds, 1988).

Die Fähigkeit, sich der Oberflächenbeschaffenheit der Wirtszelle anzupassen und so gezielt mikroskopische Defekte zur Penetration des Gewebes zu nutzen, nennt man Thigmotropismus. Diese Eigenschaft konnte bei *Candida albicans* experimentiell an porösen Filtern gezeigt werden (Morschhäuser et al., 1997; Odds, 1994).

Candida albicans besitzt als wichtigste Gruppe der Pathogenitätsfaktoren eine Reihe von hydrolytischen Enzymen, wie Lipasen, Phospholipasen und Proteasen. Diese Enzyme sind an allen Schritten der Infektion, der Epithel-Adhäsion, der Epithel-Penetration, der Gefäßinvasion, der Endotheladhäsion und Gewebspenetration, beteiligt. Besonders hervorzuheben ist hier die Gruppe (Isoenzyme) der sekretorischen Aspartatproteasen (Barrett et al., 1985; Cutler, 1991; Hube, 1996; Hoegl et al., 1996; Rüchel et Böning, 1983).

1.2.5 Die sekretorische Aspartatprotease (Sap) von *Candida albicans*

Die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *Candida albicans* wurde, nachdem sie 1965 erstmals beschrieben wurde (Staib, 1965), kurze Zeit später als Virulenzfaktor vorgeschlagen (Staib, 1969). 1968 konnte eine extrazelluläre Protease erstmals aufgereinigt werden und 1981 detailliert charakterisiert werden (Remold et al., 1968; Rüchel, 1981). Bei Sap handelt es sich um eine Aspartyl-Protease mit einem Molekulargewicht von 40 000 bis 45 000 D und, mit Ausnahme von Sap4-6, mit einem pH-Optimum von 2,5-5,5 (Negi et al., 1984; Hoegl et al., 1999). Diese Proteasen besitzen ein breites Substratspektrum und hydrolysieren unter anderem Immunglobuline, Kollagen, Komplementfaktoren, Enzyme der Blutgerinnungskaskade, Muzin, Laminin, Fibronectin und den natürlichen Proteaseinhibitor α -Makroglobulin (Rüchel, 1983; Hube, 1998).

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten von 1991-1999 zehn Sap-Isoenzyme identifiziert werden (Hube et al., 1991; Felk et al., 1999). Die SAP-Gen-Familie lässt sich in definierte Untergruppen einteilen (Abb. 3).

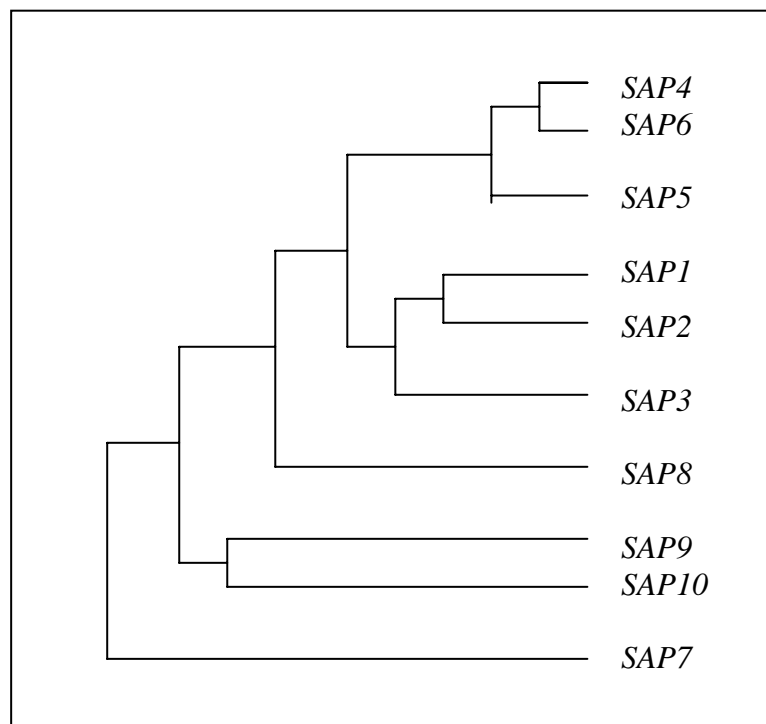


Abb. 3: Dendrogramm der SAP Gen-Familie (nach Hube, 1996)

Die Gene *SAP1-3* stellen eine eigene Untergruppe dar und sind auf Aminosäureebene ungefähr zu 75 % zueinander homolog. Weite Bereiche von *SAP4-6* sind zu mehr als 90 % homolog und *SAP8* ist den beiden ersteren Gruppen nahe verwandt. *SAP9* und *10* sind sich sehr ähnlich, haben jedoch nur geringe Homologien zu *SAP1-6* und *8*, während *SAP7* noch

geringere Homologien zu allen *SAP*-Genen aufweist. *SAP9* und *10* weisen beide typische Merkmale für Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine auf und sind somit nicht extrazellulär sezerniert (Monod et al., 1994/98; Felk et al., 1999).

Bei *in-vitro* Untersuchungen von *C. albicans* Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Regulation der verschiedenen *SAP*-Gene abhängig ist vom pH-Wert, der Temperatur, dem Phenotypic switching, und der Hefe-Hyphen-Form (Hube et al., 1994; Felk et al., 1999; Borg-von Zepelin et al, 1998) (Abb. 4).

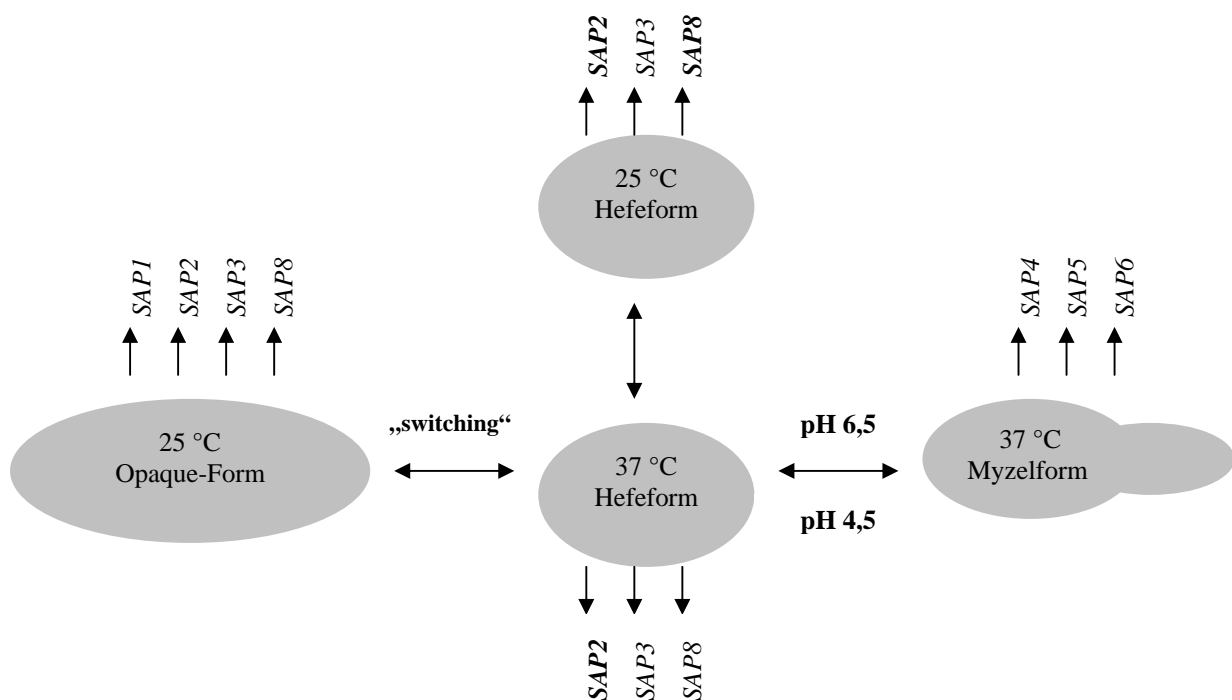


Abb. 4: Expression der *SAP*-Gen-Familie (*SAP1-8*) von *C. albicans*. *SAP1* und *SAP3* werden vor allem während des phänotypischen switchings reguliert. *SAP2* ist das dominante Gen der Hefeform in allen Medien mit Protein als einziger Stickstoffquelle. Die Gene *SAP4-6* werden ausschließlich während des Übergangs von der Hefe- zur Myzelform exprimiert. *SAP8* ist Temperatur-reguliert und wird überwiegend bei 25 °C transkribiert. Transkripte von *SAP7* wurden mit Hilfe der Northern-Blot-Technik bisher nicht nachgewiesen (Hube et al., 1994). Die konstitutive Expression der beiden mutmaßlichen regulatorischen Protease-Gene *SAP9* und *SAP10* (Felk et al., 1999) ist nicht dargestellt.

Es zeigte sich auch, dass proteolytische *C. albicans* Stämme weitaus virulenter sind und in Tierversuchen mit einer größeren Morbidität und Mortalität einhergehen als proteasenegative Mutanten (Hube et al., 1997; Ross et al., 1990; Sanglard et al., 1997). Desweiteren war die proteolytische Aktivität bei *C. albicans*-Isolaten von Patienten mit einer manifesten genitalen Kandidose fast doppelt so hoch wie bei denjenigen von gesunden Vergleichspersonen.

Entsprechende Resultate fand man auch bei HIV-Patienten mit oraler Kandidose (Ollert et al., 1995; Cassone et al., 1987). Wurde die Sap durch einen Proteaseinhibitor wie z.B. Pepstatin A gehemmt, so zeigte sich eine geminderte Adhärenz von *C. albicans* an Zellen wie bukkale Schleimhautzellen oder epidermale Korneozyten (Borg et Rüchel, 1988; Ollert et al., 1993; Watts et al., 1998). Zudem ist die Virulenz des Pilzes stark vermindert, was man anhand eines Tierversuches zeigen konnte (Rüchel et al., 1990). Aufgrund dieser Ergebnisse folgerte man, dass die Sap von *Candida albicans* einen sehr wichtigen Pathogenitätsfaktor dieser Hefe darstellt und man durch die Hemmung dieses Enzyms die Virulenz deutlich reduzieren kann.

2. Material und Methoden

2.1 Herstellung einer Placenta Peptidbank

Die Herstellung der Peptidbank und die Auftrennung der Peptide wurde in der Abteilung „Präparative Peptidchemie“ IPF PharmaCeuticals, Hannover, Deutschland, durchgeführt.

2.1.1 Peptidextraktion

Humane Plazenten, welche vom Oststadtkrankenhaus Hannover zur Verfügung gestellt wurden, wurden unmittelbar nach der Gewinnung weiterverarbeitet. Die Extraktion der Peptide und Proteine erfolgte mit einfach konzentriertem Extraktionspuffer, bestehend aus 0,5 M Essigsäure, 10 mM Ascorbinsäure und 0,5 mM EDTA. Der Extrakt wurde mit dem Mixer Hälde SB-4 (SARO, Emmerich, Deutschland) für 2 min homogenisiert. Aus dem Zellhomogenisat wurden über Nacht unter ständigem Rühren bei 4 °C die Peptide und Proteine extrahiert. Nach anschließendem Zentrifugieren (Sigma, 6K10 Rotor 12.500, 15600 g, 35-40 min, Heraeus, Hanau, Deutschland) wurde der Überstand filtriert (12 – 25 µm und 7 – 12 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland). Die nachfolgende Ultrafiltration des Filtrats wurde auf einer Sartocoon Mini Crossflow Anlage (Sartorius, Göttingen, Deutschland), bestückt mit 4 Ultrasart Modulen, durchgeführt. Bei einem Fluß von 155 – 200 l/h und einem Flux von 8 l/h wurde die Proteinlösung über Ultrafiltrationsmembranen (Polysulfon-Membran) mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa filtriert. Zur weiteren Aufkonzentrierung wurde das Retentat mit Extraktionspuffer diafiltriert (Seiler et al., 1999).

2.1.2 Präparative Kationenaustausch-Chromatographie

Die extrahierten Peptide wurden mit Hilfe einer Kationenaustausch-Chromatographie ein erstes Mal fraktioniert. Das Ultrafiltrat wurde auf ca. 4 °C abgekühlt und auf einen pH-Wert von 2,47 und einer Leitfähigkeit von 3,2 mS/cm eingestellt. Für die präparative Chromatographie wurde als Säulenmaterial ein starker Kationenaustauscher (Fraktogel TSK SP 650 (M) 32 x 250 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als

Chromatographiesystem diente ein Autopilot der Firma PerSeptive Biosystems (Framingham, MA, USA), der mit einer Flussrate von 1 l/min betrieben wurde.

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der Lösungen, die als Eluenten für die pH-Stufenelution verwendet wurden. Die Peptide wurden im Batchverfahren (pH-Stufengradient) durch Lösungen mit aufsteigenden pH-Wert eluiert. Nach dem Absinken der UV- Absorption auf einen Minimalwert erfolgte der Wechsel der Eluenten. Dadurch war es möglich, das Ausgangsmaterial in 7 pH-Pools aufzutrennen. Die Peptidlösungen der einzelnen pH-Pools, welche zur Vermeidung von Proteolyseaktivität nachfolgend auf pH-Werte von 2,5 – 3,5 eingestellt wurden, dienten als Ausgangsmaterial für eine weitere Auftrennung durch Reversed-Phase-Chromatographie (Schulz-Knappe et al., 1997).

Puffer	Zusammensetzung	pH-Wert	Eluate-Pool	Bemerkung
A	VE-Wasser mit HCL	2,50	0	
B	0,1 M Citronensäure-1-hydrat	3,30	1	
C	0,1 M Hac + 0,1 M NaAc	4,50	2	
D	0,1 M Apfelsäure	5,00	3	
E	0,5 M Ammoniumacetat	7,00	4	
H	VE-Wasser	7,20	5	
I	0,1 M Natronlauge	13,00	6	Eluate der Pools 4-6 zusammengefasst

Tab. 2: Zusammensetzung der Puffer, die für die Kationenaustausch-Chromatographie bei der Herstellung der Placenta-Peptidbank verwendet wurden.

2.1.3 Präparative Reversed-Phase-Chromatographie

Als nächster Aufreinigungsschritt schloß sich an die Kationenaustausch-Chromatographie eine RP-Chromatographie an. Die Peptidlösungen der einzelnen pH-Pools wurden auf eine Reversed-Phase-Säule (RP C15 Source, 125 x 200 mm, 15 µm Partikelgröße, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Nach der Equilibrierung der Säule mit Puffer A (10 mM HCl-Puffer) wurden die Peptide mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0% bis 50% B (10mM HCl in 80% ACN) in 60 min eluiert. Als Chromatographiesystem diente die BioCad 60 HPLC-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems (Freiburg, Deutschland). Die Fraktionen jedes pH-Pools wurden in Anschluß bei –80 °C eingefroren und lyophilisiert. Die Lagerung

der Lyophilisate erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diese HPLC-Fractionen werden als Peptidbank bezeichnet und stehen für Tests auf biologische Aktivität zur Verfügung.

2.2 Chromatographische Methoden

2.2.1 Reversed-Phase HPLC

Die Peptidfraktionen wurden in bidestilliertem Wasser verdünnt und auf die RP-Säule aufgetragen. Die auf der Säule gebundenen Peptide wurden durch einen linearen Anstieg von Puffer B im Elutionsmittel eluiert. Gradient, Flussgeschwindigkeit und Detektionswellenlänge sind bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben.

Folgende in Tab. 3 benannte selbstgepackte Säulen und Fertigsäulen wurden für die Trennung verwendet:

Tab. 3: RP-Chromatographiesäulen, die für die Isolierung antimikrobieller Peptide verwendet wurden

A	PrepPak, 47 x 300 mm, Bakerbond, 300 Å Porengröße, 15 – 300 µm Partikelgröße, RP C-18 (Biotek, Östringen, Deutschland)
B	Source, 10 x 250 mm, Pharmacia, 120 Å Porengröße, 15 µm Partikelgröße, RP C-15
C	PrepPak, 47 x 300 mm, YMC Gel Basic, 15 – 30 µm Partikelgröße
D	Reprosil-Pur, 1 x 250 mm, C-18-AQ, 100 Å Porengröße, 3 µm Partikelgröße

Die Säulen wurden in 30% Methanol gelagert. Die verwendeten Fließmittel wurden entweder mit VE-Wasser bzw. mit bidestilliertem Wasser aus der Reinstwasseranlage angesetzt. Für die analytische Chromatographie war es notwendig, die Puffer vor der Verwendung mit einem Heliumstrom 10 min zu entgasen. Als Elutionsmittel wurden die in Tab. 4 aufgeführten Puffer verwendet.

Tab. 4: Elutionspuffer, die für die Reinigung von antimikrobiellen Peptiden verwendet wurden

	Puffer A	Puffer B
1	10 mM HCl	80% ACN / 10 mM HCl
2	20% MeOH / 10 mM HCl	100% MeOH / 10 mM HCl
3	0,1% TFA	100% ACN / 0,1% TFA
4	0,1% TFA	80% ACN / 0,1% TFA
5	0,06% TFA	100% ACN / 0,1% TFA

2.2.2 Kationenaustausch-HPLC

Für die Kationenaustausch (KatEx) -HPLC wurden die in Tab.5 genannten Säulen verwendet.

Tab. 5: KatEx-Chromatographiesäulen, die für die Isolierung der Antimikrobiellen Peptide verwendet wurden

A	PrepPak, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm (Biotek, Östringen, Deutschland)
B	PepKat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm (Biotek)

Als Fließmittel dienen folgende Elutionspuffer, welche vor ihrer Verwendung 10 min mit Heliumstrom entgast wurden.

Tab. 6: Elutionspuffer, die für die Isolierung der antimikrobiellen Peptide verwendet wurden

	Puffer A	Puffer B
1	50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0	1,5 M KCl / 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0
2	10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4,5	1M NaCl / 10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4,5

2.2.3 Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustausch-Chromatographie

Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Dazu wurden 3M EmporeTM 96 Well Extraction Disks (3M Filtration Products, St. Paul, MN, USA) verwendet. Die Kavitäten der 96 Well-Platte enthielten zwischen 2 Fritten RP C-18-Material. Jede Probelösung wurde in eine der Kavitäten pipettiert. Enthaltene Peptide binden an das Reversed-Phase-Material. Durch dreimaliges Auftragen von 300 µl Puffer A (0,1% TFA) wurde das gelöste Salz, welches nicht an das RPC-Material bindet, herausgespült. Anschließend wurden die Peptide durch dreimaliges Auftragen von 200 µl Puffer B (0,1% TFA / 80% ACN) eluiert. Die entsalzten Proben wurden lyophilisiert und für die spätere Anwendung in bidestilliertem Wasser resuspendiert.

2.2.4 Gefriertrocknen von Peptiden

Zum Lyophilisieren wurden die Peptidlösungen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Als Probengefäße dienten je nach benötigten Volumen entweder 0,5, 1,5, bzw. 2 ml Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) oder Microtube-Racks (Greiner, Nürtingen, Deutschland). Die Peptidlösungen wurden unter Vakuum in einer Speedvac-Zentrifuge (Speedvac Univapo 150 H, Uniequip, Martinsried, Deutschland) gefriergetrocknet. Dabei sollten die Probelösungen ständig gefroren bleiben.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Bestimmungen erfolgten mit einem Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometer (LaserTec RBT II, PerSeptive / Vestec, Houston,Tx, USA). Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte im linearen Modus mit einem Stickstofflaser (377 nm). Jeweils 1 μl Matrix und 1 μl salzfrei Probe wurden auf den Probenträger pipettiert, gemischt und an der Luft getrocknet. Als Matrixsubstanz wurde eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHC) und Fucose (1:1) verwendet. (Schulz-Knappe, 1997) Die Steuerung des Spektrometers und die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Voyager Biospectrometry Workstation Version 3.07.1 (PerSeptive Biosystems, Vestec, Houston,Tx, USA). Bei der MALDI-Massenbestimmung treten überwiegend einfach geladene Ionen auf. Dies macht es möglich, komplexe Peptidmischungen mit dem MALDI-TOF auf ihre Massenzusammensetzung zu analysieren. Die Genauigkeit der Massenbestimmung beträgt 0,5%.

2.3.2 Kapillaronenelektrophorese

Die Kapillaronenelektrophorese diente als eine hochauflösende Analysemethode zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden. Dabei erfolgt die Trennung der Analytionen aufgrund von Mobilitätsunterschieden, die durch Größen- und Ladungsunterschiede der Ionen entstehen.

Als Elektrophoresesystem wurde ein Gerät der Firma Beckman (P/ACETM MDQ, Beckman, München, Deutschland) verwendet. Die Auswertung der Elektropheroprogramme erfolgte mit

einer Software „P/ACE System MDQ“ (Beckman). Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm. Zur Trennung der Peptide wurde eine 57 cm lange, unbeschichtete „fused silica“ Kapillare (Typ TSP 075375, Composite Metal Services Ltd., UK) verwendet.

Durch Anlegen eines geringen Überdrucks für 10 s wurde in die Kapillare ein Injektionsvolumen von 6 nl der Probe injiziert. Die Peptidkonzentration betrug 0,2 mg/ml. Bei geringer konzentrierten Lösungen wurde proportional länger injiziert. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 120 μ A, die aus einer angelegten Hochspannung von 22 bis 27 kV resultierte. Die Kapillartemperatur wurde mit einer Flüssigkeitskühlung bei 25 °C konstant gehalten. Als Puffer wurde 100 mM NaH_2PO_4 mit 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose verwendet, der auf einen pH-Wert von 2,5 mit Phosphorsäure eingestellt wurde.

2.3.3 Edman Sequenzierung

Die Peptidsequenzierung erfolgte durch die klassische Aminosäuresequenzanalyse auf der Basis des Edman-Abbaus. Als Sequenziergerät diente ein automatischer Edman-Sequenzierer (Applied Biosystems Modell 473A, ABI, Weiterstadt). Die Aufnahme der Daten und deren Auswertung erfolgte mittels der „Model 610A Data Analysis Software“ (Version 1.2.1, ABI, Weiterstadt).

Zwischen zwei Filterplättchen aus BioPrenTM wurden zwischen 10 pmol und 100 pmol Peptid appliziert. Das eigentliche Reaktionsvolumen bildete sich zwischen den Filterplättchen aus. Dort wurden die Reagenzien (Phenylisothiocyanat, TFA, Chlorbutan) appliziert. Die Analyse und Detektion der Aminosäuren erfolgte mittels Reversed-Phase-Chromatographie bei einer Wellenlänge von 256 nm.

2.3.4 Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin

Zur enzymatischen Hydrolyse von Peptiden wurden Aliquots von zu untersuchenden Fraktionen der Peptidbank entnommen, lyophilisiert und in Tris-HCl Puffer (100 mM, pH 7,4) resuspendiert. Subtilisin (Boehringer, Mannheim, Deutschland), eine Protease aus *Bacillus subtilis*, wurde der Lösung im Enzym / Peptid-Verhältnis 1:10 zugesetzt. Die Protease spaltet Peptidbindungen unspezifisch.

Die Proben wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 2 min gestoppt (Zucht et al., 1995).

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Synchronisation von *Candida albicans*

Der verwendete *Candida albicans* Stamm SC 5314 (Gillum et al., 1984) wurde zum Anzüchten auf eine Sabouraud-Glukose-Agar Platte (Sabouraud-Glukose-Agar, Difco, Detroit, Michigan, USA) aufgetragen. Die Platte wurde dann bei 37 °C für 24 h in den Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) gegeben. Mit einer Impföse wurden Teile der dabei gebildeten Kolonien abgetragen und in 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung (Natriumchlorid, Fluka, Buchs, Schweiz) suspendiert. Die Pilze wurden, durch dreimaliges Zentrifugieren für 10 min bei 1500 rpm (Rotanta/S, Hettich, Tuttlingen, Deutschland; Rotor 6775064) und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Der Zellrückstand wurde jeweils in 5 ml Aqua destillata resuspendiert. Anschließend wurde mittels der Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm²) die Zellzahl bestimmt und 20x10⁵ Zellen in 10 ml YPD-Medium (Yeast-Extract-Peptide-Dextrose, Hefeextrakt-Pepton Glukose, Difco) eingimpft. Im Folgenden wurde der Ansatz für 16 Stunden bei 25 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator (HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Daraufhin wurden die Hefezellen erneut gezählt und entsprechend viele Zellen in neues YPD-Medium geimpft, um eine Zellzahl von 4x10⁶ Zellen / ml zu gewinnen. Dieser Ansatz musste nun für 24 Stunden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml steriler PBS-Lösung (Phosphate-Buffered-Saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) und Verwerfen des Überstandes konnte der Ansatz mit TSB (3 g/l Tryptic Soy Broth (Sigma, St. Luis, MO, USA), in 10 mM Natriumphosphat Puffer, pH 7,2) auf die gewünschte Inokulum-Größe eingestellt werden. Ziel der Synchronisation ist es, dass alle *Candida albicans* Zellen die morphologische Struktur der Hefe annehmen.

2.4.2 *In vitro* Modell der oralen Candidose

Das *in vitro* Modell der oralen Candidose wurde geschaffen mit rekonstituiertem humanem Epithel der Firma Skinethic Laboratory (Nizza, Frankreich). Dieses besteht aus menschlichen Keratinozyten, einer chirurgisch entfernten Hautprobe. Es handelt sich hier um eine kutane

Karzinom Zelllinie, TR 146. Die Zellen wurden 7 Tage in einem serum-, antibiotika-, und antimykotikafreien MCDB-Spezialmedium (Clonetics, San Diego, Kalifornien, USA) kultiviert. Anschließend mussten die Zellen abgeerntet und in einem modifizierten MCDB-Medium, das zusätzlich noch 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml Wachstumsfaktor und 5×10^{-7} M Hydrokortison enthielt, resuspendiert werden. Auf 0,5 cm² großen Polykarbonatunterlagen wurden Inokula von 5×10^5 Zellen/ml gesät, die dann 5 d bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in dem zuvor beschriebenen, modifizierten Medium an der Luft-Medium-Grenze inkubiert werden mussten, damit sich eine 55 µm dicke orale Schleimhaut bilden konnte.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte in Anlehnung an Schaller et al. (Schaller et al., 1998/99/2000) Die einzelnen Inserts des oralen Epithels wurden mit je 2×10^6 *Candida* Zellen in 50 µl TSB in einer Laminar-Air-Flow-Box (Lamin Air, Heraeus, Hanau, Deutschland) infiziert. Außer den Kontrollen, welche nur TSB enthielten, wurden den 50 µl TSB noch die antimikrobiellen Peptide in den entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Alle Proben wurden für 18 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂, und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus) inkubiert. Nach der Infektionszeit wurde das Epithel mit einem Skalpell aus dem Insert entfernt und für die lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen weiterverarbeitet.

2.4.3 Fixierung und Einbettung

In Anlehnung an Karnovsky (Karnovsky, 1965) wurde eine 0,1 M Phosphatpufferlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland), die auf einen pH von 7,3 eingestellt wurde und 2 % Formaldehyd (Merck) und 2,5 % Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland) enthielt, hergestellt. In dieser Lösung wurden die Proben für 4 Tage bei 4 °C vorfixiert. Daraufhin wurden die Proben zweimal 30 min mit einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) gespült. Anschließend mussten die Proben gemäß der Methode nach Dalton (Dalton, 1955) für 90 min nachfixiert werden. Die verwendete Lösung enthielt 1 % Osmiumtetroxid (OsO₄; Serva), 0,85 % NaCl (Fluka) und 1 % wässrigen Chromatpuffer. Zur Herstellung des Chromatpuffers wurden 80 ml einer 5 % wässrigen Kaliumdichromat-Lösung (Kaliumdichromat, Merck) mittels einer 2,5 M KOH-Lösung (Merck) auf pH 7,2 eingestellt und anschließend mit Aqua dest. ad 100 ml aufgefüllt. Es folgte erneutes zweimaliges Spülen in 0,1 M Phosphatpuffer für 30 min. Die Dehydratation erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 35-, 50-, 70, und 90 % sowie absolutem Ethanol (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU,

München, Deutschland). Die Einbettung erfolgte in Glycidether nach Luft (Luft, 1961). Dafür musste zunächst eine flüssige Kunstharzlösung hergestellt werden, die sich aus mehreren Bestandteilen zusammensetzte. Komponente A enthielt 62 ml Glycidether (Serva) und 100 ml Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (Serva). Komponente B setzte sich aus einer Mischung von 100 ml Glycidether (Serva) und 89 ml Methylnadicanhydrid (Serva) zusammen. Nach intensiver Mischung der beiden Komponenten A und B im Verhältnis 2:3 wurde abschließend noch der Polymerisationsbeschleuniger p-Dimethylaminomethylphenol (Serva) in 1,5 % Konzentration zugesetzt. Zuerst mussten die Proben 1 h lang in diese flüssige Kunstharzlösung, die zuvor 1:1 mit absolutem Ethanol (Apotheke, Klinikum Innenstadt) verdünnt wurde, eingebracht werden. Dann folgten für 2 h ein Kunstharz-Alkoholgemisch im Verhältnis 2:1 und schließlich die reine Kunstharzlösung, die nach zwei weiteren Stunden erneuert werden musste. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Tags darauf konnten die Proben in mit flüssiger Kunstharzlösung gefüllte Einbettungsformen gegeben werden, die dann zur Aushärtung des Harzes für 7 d bei 60 °C im Trockenschrank (WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland) aufbewahrt wurden. Nach erfolgter Aushärtung konnten die einzelnen Kunstharzblöcke auf die optimale Größe getrimmt werden (Ultratrim, Reichert, Wien, Österreich).

2.4.4 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert) und selbst angefertigten Glasmessern die getrimmten Kunstharzblöcke in 1 µm dicke Semidünnschnitte geschnitten. Die Färbung der Semidünnschnitte erfolgte mit einer Lösung, bestehend aus einer 1 % Pyronin G- (Merck, Darmstadt, Deutschland) und einer, mit Natriumtetraborat gepufferten, Toloidinblau Stammlösung (Merck), welche im Verhältnis 1:5 gemischt und filtriert wurden. Mit dieser Farbmischung konnten daraufhin die Schnitte für 5 min bei 60 °C auf einer Heizplatte (Medax, München, Deutschland) angefärbt werden. Im Anschluß konnten die histologischen Veränderungen des rekonstituierten humanen Epithels mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet werden.

2.4.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen

Zum Nachweis eines ultrastrukturellen Schadens nach Behandlung mit hGAPDH (1-31) wurden 0,8 ml TSB (Sigma), mit etwa 5×10^6 *Candida* Zellen/ml und 0,8 ml Aqua dest., mit 125 µg hGAPDH (1-31) / ml gemischt. Dieser Ansatz wurde sodann 24 h bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator (HT, Infors AG) inkubiert. Ein entsprechender Kontrollansatz wurde ohne Peptidlösung angefertigt. Anschließend wurde durch 15 min Zentrifugation bei 2800 rpm (Rotanta/S, Hettich; Rotor 6775064) ein Pallet hergestellt. Nach Fixierung und Einbettung wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zunächst von den getrimmten Kunstharzblöcken Ultradünnschnitte (Dicke 60-80 nm) mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert) und selbst hergestellten Glasmessern angefertigt. Daraufhin erfolgte die Kontrastierung der Schnitte bei 30 °C mit 0,5 % Uranylacetat (Leica, Bensheim, Deutschland) für 20 min sowie 2,7 % Bleicitrat (Leica) für 10 min in einem Ultrastainer (Reichert). Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte mit einem EM 902A-Transmissions-elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 80 kV und einer Vergrößerungsstufe zwischen x1700 und x11000.

2.4.6 Mikrodilutionsassay

Um die antimykotische Aktivität der Peptide zu messen, wurden zuerst die lyophilisierten Peptide mit Aqua dest. in Lösung gebracht, um eine gewünschte Äquivalentmenge zu erreichen. Der Mikrodilutionsassay wurde entsprechend der deutschen Norm für die Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika, Teil 84: Mikrodilutionspezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika (DIN 58940-84), durchgeführt. Zuerst wurde der verwendete *Candida albicans* Stamm SC 5314 (Gillum, 1984) zum Anzüchten auf eine Sabouraud-Glukose-Agar Platte (Difco) aufgetragen. Die Platte wurde dann bei 37 °C über Nacht in den Brutschrank (Heraeus) gegeben. Mit einer Impföse wurden Teile der dabei gebildeten Kolonien abgetragen und in 5 ml 0,9 % NaCl- Lösung (Natriumchlorid, Fluka, Buchs, Schweiz) suspendiert. Die Pilze wurden, durch dreimaliges Zentrifugieren für 10 min bei 1500 rpm (Rotanta/S, Hettich; Rotor 6775064) und Verwerfen des Überstandes, gewaschen. Der Zellrückstand wurde jeweils in 5 ml Aqua dest. resuspendiert. Anschließend wurde mittels der Neubauer-

Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm²) die Zellzahl bestimmt. Die Einsaat für den Test betrug $1\text{-}5 \times 10^3$ Zellen pro ml TSB (Sigma). In eine 96-Napf-Mikrotiterplatte (U-Platte, Greiner, Nürtingen, Deutschland) wurden dann jeweils ein Leerwert, bestehend aus 100 µl TSB-Medium, ein Kontrollwert, bestehend aus 50 µl TSB-Medium und 50 µl Pilzsuspension, und der Testwert, bestehend aus 50 µl Pilzsuspension und 50 µl der jeweiligen Verdünnung der antimikrobiellen Peptide, pipettiert. Die Peptide wurden 5mal, ausgehend von ihrer jeweiligen Anfangskonzentration, im Verhältnis 1:2 verdünnt. Um die Validität des Testes zu gewährleisten, wurde parallel zum Test, als Kontrolle, eine Verdünnungsreihe mit dem Antimykotikum Amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) angefertigt. Der MHK Sollwert von Amphotericin B liegt bei 0,125-0,5 µg/ml. Nachdem die Testplatten 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert wurden, konnte die MHK abgelesen werden. Als Minimale Hemmkonzentration wurde die niedrigste Konzentration angesehen, bei der kein sichtbares Pilzwachstum zu sehen war.

2.4.7 Vorbereitung der *Candida albicans*-Enzym-Lösung (Sap)

Da *Candida albicans* in einem Medium, dessen einzige Stickstoffquelle ein Protein enthält, vermehrt Sap sezerniert (Remold et al., 1968; Banerjee et al., 1991), wurde die verwendete Hefe 7 d in einem albuminhaltigen Medium inkubiert. Albumin ist sowohl eines der meist verwendeten als auch eines der unspezifischsten Induktionsmaterialien und Substrate für proteolytische Enzyme (Negi et al., 1984).

Die Herstellung der *Candida albicans*-Enzymlösung erfolgte in Anlehnung an die Methode von MacDonald und Odds (MacDonald et Odds, 1980), Ollert et al. (Ollert et al., 1995).

Nach 48 h Bebrütung des *Candida*-Isolates SC 5314 (Gillum et al., 1984) im Brutschrank (Heraeus) bei 36,5 °C wurden von der Agarplatte 2-3 deutlich abgrenzbare Randkolonien abgenommen und zur weiteren Vermehrung in je 10 ml autoklavierte Sabouraud-Dextrose-Brühe (Difco) überimpft. Dieser Ansatz wurde für 2d bei 27 °C und 150 rpm in den Schüttelinkubator (Infors) gegeben. Daraufhin wurde von der *Candida*-Suspension 0,1 ml in je 10 ml 0,1% BSA-Remold-Medium (Bovines Serum Albumin) (Remold, 1968) pipettiert und das Gemisch für sieben Tage wiederum bei 27 ° und 150 rpm in den Schüttelinkubator gegeben. Hierbei wird die Sekretion von Sap stark induziert. Der pH-Wert sinkt dabei ab.

Das 0,1 % BSA-Remold-Medium wurde hergestellt mittels 20 g (= 2 %) Glukose (Merck), 1 g (= 0,1 %) KH₂PO₄ (Merck), 0,5 g (= 0,05 %) MgSO₄ (Merck), 1,25 ml Minimum Essential Medium Vitamine (Sigma) und 10 g (= 1 %) Serum-Albumin, gewonnen aus Rinderserum

(Sigma). Dies wurde unter ständigem Rühren in 1 l Aqua dest. aufgelöst und dann sterilfiltriert.

Nach 7d wurde mit der Neubauer-Zählkammer die Dichte der Hefezellen ermittelt. Die Suspension wird nun 30 min bei 4 °C und 1500 g zentrifugiert und anschließend der das Enzym enthaltende Überstand mit Natronlauge (Apotheke, LMU) und einem pH-Meter (pH Digi 520, WTW, Weilheim, Deutschland) auf pH 6,5 eingestellt, um einer Autodegradation entgegenzuwirken (Negi et al., 1984; MacDonald et Odds, 1980; Ray et Payne, 1990). Sap2 mRNA, das dominante Transkript bei *in vitro* Versuchen, wird bei diesem pH-Wert kaum noch induziert, so dass die zu ermittelnden Ergebnisse so wenig wie möglich verfälscht werden (Hube, 1996/98). Abschließend wurde die Enzymlösung mit 500 ml Sterilfiltereinheiten, Porengröße 0,22 µm (Millipore Corporation), sterilfiltriert und bis zum unmittelbaren Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

2.4.8 Sap-Aktivitäts-Assay

Die Durchführung des Sap-Aktivitäts-Assays erfolgte nach den Beschreibungen von Capobianco (Capobianco, 1992), Matayohsi (Matayoshi, 1990) und Wang (Wang, 1992). Die Vertiefungen einer 96 Napf-Flachboden-Mikrotiterplatte (Greiner) wurden befüllt mit 73,1 µl Natriumcitratpuffer (0,2 M, pH 4,5)(Merck), 20 µl Testsubstanz (in Aqua dest. gelöste Peptide) und 1,9 µl einer 500 µM Renin-Substrat-Lösung (R-2931, Molecular Probes Inc., Leiden, Niederlande), welche in DMSO gelöst wurde. Pro Platte lief eine Kontrollreihe ohne Testlösung, bestehend aus 93,1 µl Natriumcitratpuffer und 1,9 µl Renin-Substrat-Lösung, mit. Nun wurden in alle Testansätze 5 µl der zuvor bei Raumtemperatur aufgetauten Sap-Enzymlösung pipettiert, die Platte kurz geschüttelt und sofort im Fluoreszenzscanner (CytoFluor 2300, Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) bei 490 nm gescannt (T₀). Die Messung wurde nach 60 Minuten wiederholt (T₆₀).

Das Renin-Substrat R-2931 ist ein Peptid (MG = 2281 Dalton), welches das normale Substrat der physiologischen Aspartatprotease Renin, das Decapeptid Angiotensinogen, darstellt. Es wurde an einem Ende mit einer fluoreszierenden Gruppe [5-(Aminoethyl) Aminonaphthalensulfat, EDANS] und am anderen Ende mit einer chromophoren Gruppe [4'-Dimethylazobenzen-4-Carboxylat, DABCYL) verbunden.

DABCYL besitzt eine ideale Überlappung seiner Absorption mit dem Emissionsspektrum der fluoreszierenden Gruppe EDANS. Nach der Abspaltung von DABCYL durch die Protease (Sap) fluoresziert das Produkt (Peptid-EDANS) (Abb. 5).

Struktur: Arg-Glu(EDANS)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys(DABCYL)-Arg

Excitation: λ_{\max} : 340 nm

Emission: λ_{\max} : 490 nm (nach Spaltung) (Molecular Probes, 1999)

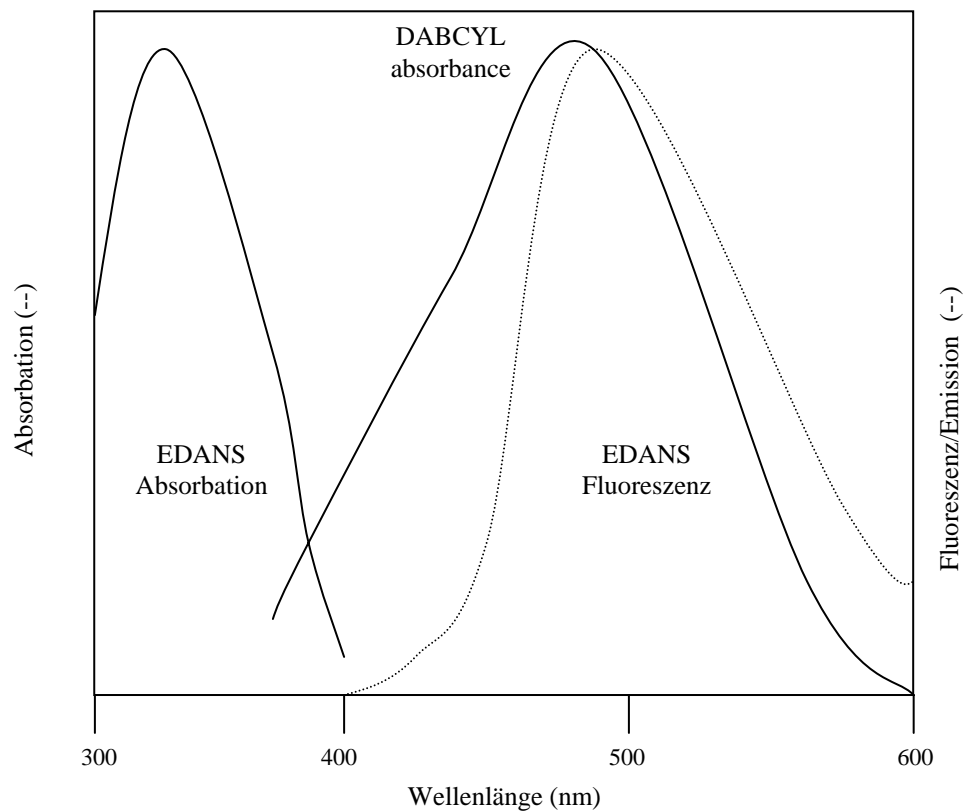


Abb. 5: Spektrum, das den Überlappungsbereich der Absorption von DABCYL mit der Fluoreszenz des EDANS zeigt.

Datenauswertung:

Die jeweilige Proteinaseaktivität lässt sich aus der Differenz der Messergebnisse nach 60 min (T60) und der Messergebnisse unmittelbar nach Zugabe der Enzymlösung (T0) als Ausdruck der Änderung der Fluoreszenz bei 490 nm und damit der Reninsubstratspaltung als indirektes Maß berechnen. Die absolute Proteinaseaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

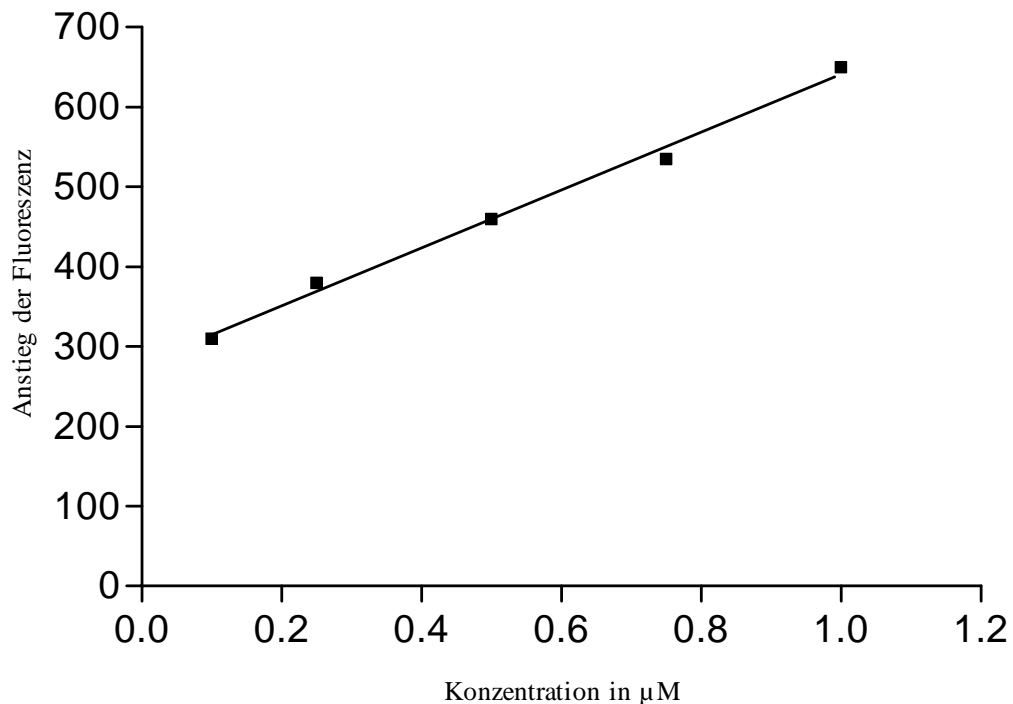
Proteinaseaktivität [U/lxh] = $(\Delta T_{60}-T_0) \times \text{Verdünnungsfaktor } 20 \times 10^5 \times \text{Steigungsfaktor } 1/308$
/(Hefenzahl/1 ml Suspension)

Den Verdünnungsfaktor 20 erhält man durch die Verdünnung im Versuchsablauf:

$5 \mu\text{l Enzymlösung} / (5 \mu\text{l Enzymlösung} + 73,1 \mu\text{l Natriumcitratpuffer} + 1,9 \mu\text{l Renin-Substrat} + 20 \mu\text{l Testsubstanz}) = 1 : 20$

Der Steigungsfaktor ergibt sich aus der Steigung der Geraden im Diagramm der Abb. 6

Abbildung 6: Eichkurve von Reninsubstrat (R-2931)



Hierfür wurde das Renin-Substrat in der entsprechenden Konzentration, ohne Zugabe einer Testsubstanz oder einer Sap-Lösung, gemessen.

Jeder Test wurde 10mal durchgeführt. Für die Berechnung der Hemmung wurden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Ergebnisse verwendet. Die relative Zunahme der Aktivität ohne Inhibitor entspricht 100 %. Als Kontrolle diente ein universeller Hemmstoff der sekretorischen Aspartatproteinase, Pepstatin A (Davies, 1990; Schönborn et al., 1984), welcher auch die Sap-Isoenzyme pathogener Pilze, wie *Candida albicans*, inhibiert (de Bernadis et al., 1997; Högl et al., 1996; Rüchel et al., 1990; Zotter et al., 1990; Borg-von Zepelin et al., 1997). Pepstatin A wird von verschiedenen Streptomyces-Arten produziert, hat ein Molekulargewicht (MG) von 685,9 und die Summenformel $C_{34}H_{63}N_5O_9$. Die im Test eingesetzte Konzentration beträgt 100 µM, eine Konzentration, bei der auch die HIV1-Proteinase-Aktivität zu 90 % inhibiert wird. (Mansfeld et al., 1993) Für *in vitro* Versuche wird Pepstatin A in Methanol gelöst. Trotz dieser Eigenschaften verbietet sich der Einsatz beim Menschen, da Pepstatin A eine starke inhibitorische Wirkung auf Körper-eigene Aspartatproteinasen, wie Renin, Pepsin oder Kathepsin D, zeigt. (Sato et al., 1994) Überdies besitzt Pepstatin A eine geringe Bioverfügbarkeit (Sato et al., 1994; Högl et al., 1996). Am Menschen wurde Pepstatin A ursprünglich auf seine Wirkung bei Magengeschwür getestet (Rüchel et al., 1990).

3. Ergebnisse

3.1 Antimykotisches Screening

3.1.1 Wirkung von Plazentapeptiden auf das Wachstum von *Candida albicans*

Im folgenden wurde geprüft, ob in der humanen Plazenta Substanzen vorhanden sind, welche das Wachstum von Hefepilzen inhibieren bzw. diese abtöten. Um diese Substanzen zu detektieren, wurde die MHK der verschiedenen Fraktionen der Plazenta Peptidbank mittels des Mikrodilutionsassays ermittelt. Dieser Test stellt eine sehr sensitive Methode zur Charakterisierung antimykotischer Substanzen dar (Deutsche Norm, 1999). Als Testorganismus diente der Hefepilzstamm *Candida albicans* SC 5314. Der Test wurde mit 220 mg Gewebeäquivalent der Plazenta-Peptidbank durchgeführt und zum Validieren der Ergebnisse reproduziert. Abbildung 7 zeigt die Herstellung der Peptidbank aus humaner Plazenta. Zur Kationenaustausch-Chromatographie von 11 kg humaner Placenta wurden Puffer mit ansteigendem pH-Wert eingesetzt. Die pH-Pools wurden durch RP-HPLC fraktioniert. 42 Fraktionen wurden pro pH-Pool gesammelt und lyophilisiert. Diese Fraktionen bilden die Placenta-Peptidbank.

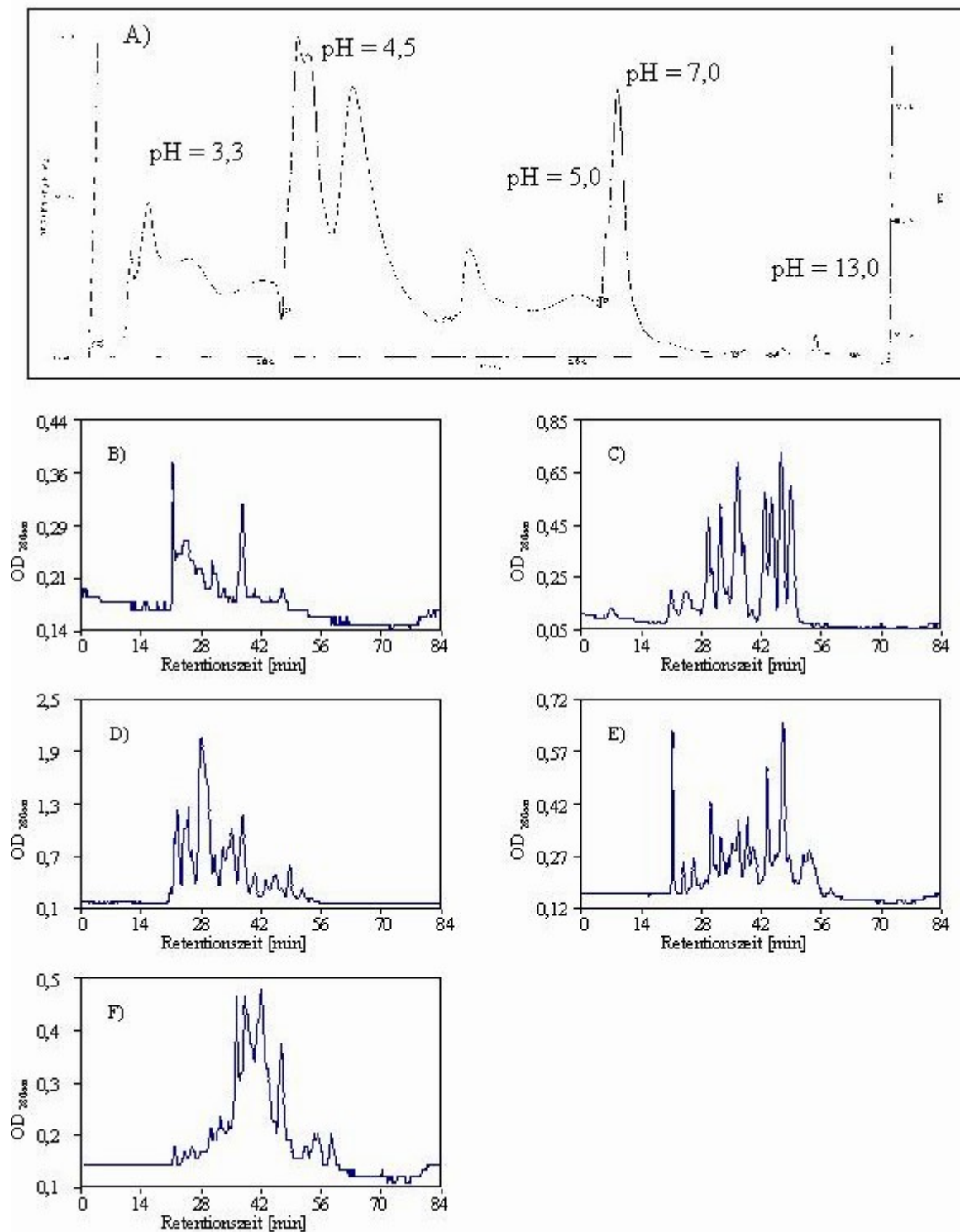


Abbildung 7: Herstellung der Placenta-Peptidbank. (A) Zur Kationenaustausch-Chromatographie von 11 kg humaner Placenta wurden Puffer mit ansteigendem pH-Wert eingesetzt (8,3 l Säule, Vantage, TSK SP 650 M). Die pH-Pools wurden durch RP-HPLC fraktioniert. (B) - (F) zeigen die RP-Chromatogramme (RP C15 Source, 125 x 200 mm, 15 μ m, Pharmacia, Freiburg) der einzelnen pH-Pools. 42 Fraktionen wurden pro pH-Pool gesammelt und lyophilisiert. Diese Fraktionen bilden die Placenta-Peptidbank.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis des initialen Screenings der Peptidbank nach antimykotischen Substanzen. In pH-Pool 1-3 konnten keine wachstumsinhibierenden Substanzen gefunden werden. In pH-Pool 4 wurde antimykotische Aktivität unterschiedlicher Intensität detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die detektierten Substanzen einen stark kationischen Charakter besitzen, was auch bei den meisten bereits identifizierten antimikrobiell wirksamen Peptiden festgestellt wurde (Hancock et Lehrer, 1998).

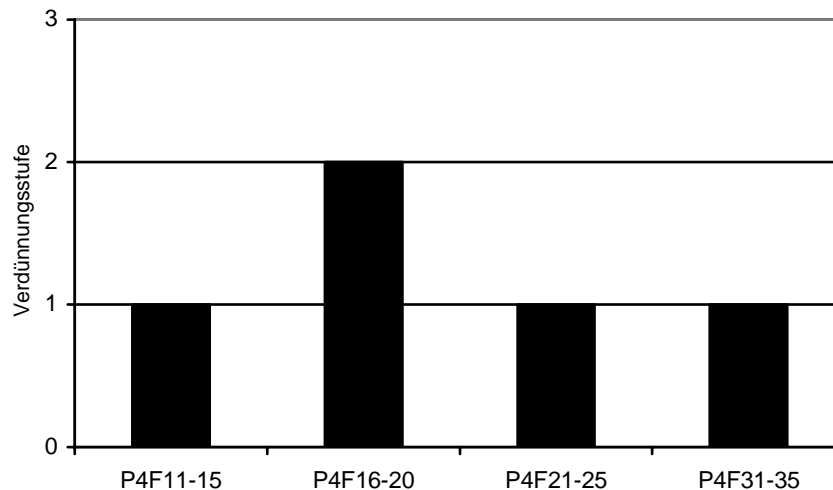


Abbildung 8: Initiales Screening der Plazenta Peptidbank auf antimykotische Substanzen. 220 mg Gewebeäquivalent der 48 gepoolten Fraktionen der einzelnen pH-Pools wurden im Mikrodilutionstest auf antimikrobielle Aktivität untersucht. „P“ ist der pH-Pool, „F“ sind die Fraktionen. In Verdünnungsstufe 2 wurden 110 mg Gewebeäquivalent und in Verdünnungsstufe 3,55 mg Gewebeäquivalent eingesetzt.

3.1.2 Bestätigung der Peptidstruktur ausgewählter Peptidbank-Fractionen durch Hydrolyse

Im Rahmen der Isolierung antimikrobieller Peptide aus Plazenta wurde zunächst der peptidische Charakter der aktiven Substanzen überprüft. Dies war notwendig, um ausschließen zu können, dass die antimykotische Aktivität z.B. von klassischen Antimykotika, Antibiotika oder anderen Plazentabestandteilen wie Lipiden hervorgerufen sein könnte. Zu diesem Zweck wurden Peptidbank-Fractionen ausgewählt, die im antimykotischen Screening ein Maximum an Aktivität aufwiesen, und eine Substanz, die 220 mg Gewebe

entspricht, mit der Endoprotease Subtilisin hydrolysiert (Kapitel 2.3.4.). Subtilisin spaltet Peptidbindungen unspezifisch in kurze Fragmente. Sollte die im Mikrodilutionstest nachgewiesene antimikrobielle Aktivität durch Peptide hervorgerufen werden, wird diese auf Grund der Degradation dieser Peptide durch die Protease nicht mehr nachweisbar sein. Die enzymatische Spaltung mittels Hydrolyse durch Subtilisin lässt somit Rückschlüsse auf die chemische Struktur der aktiven Substanz zu (Zucht et al., 1991).

Als Kontrolle für die antimikrobielle Aktivität der getesteten Fraktionen wurde ein entsprechender Teil der Fraktionen analog den Hydrolysebedingungen, allerdings ohne Zusatz des Enzyms, behandelt. Zum Nachweis der Aktivität der Protease wurde ein bekanntes antimykotisch wirksames Peptid (Lysozym (Sigma), 100 µg/ml) hydrolysiert.

Bei anschließender Überprüfung der biologischen Aktivität konnte bei allen hydrolysierten Peptidbank-Fractionen ein vollständiger Aktivitätsverlust festgestellt werden (Abb. 9). Die unbehandelten Proben dagegen wiesen eine eindeutige antimykotische Aktivität im Mikrodilutionstest auf. Lysozym, welches als Positivkontrolle verwendet wurde, wies keine antimykotische Aktivität nach erfolgter Hydrolyse auf. Weiterhin zeigten der verwendete Puffer und Enzym keine wachstumshemmende Aktivität. Der vollständige Verlust der antimikrobiellen Aktivität nach Hydrolyse mit Subtilisin weist folglich auf den peptidischen Charakter der biologisch aktiven Substanzen hin.

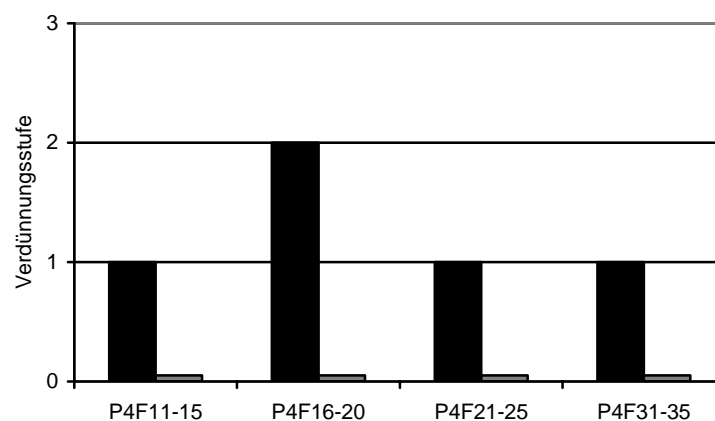


Abbildung 9: Antimykotische Aktivität von ausgewählten Peptidbank-Fractionen nach Hydrolyse durch die Protease Subtilisin.

- antimikrobielle Aktivität der Fraktionen ohne Enzymbehandlung
- antimikrobielle Aktivität nach Inkubation mit Subtilisin

3.1.3 Isolierung antimykotischer Peptide

Die Fraktionen 16-20 des pH-Pools 4 der Plazenta-Peptidbank waren Ausgangspunkt für die weitere Isolierung von bislang unbekanntem antimikrobiell wirksamen Peptiden. Für die Reinigung von wachstumshemmenden Peptiden aus Plazentagewebe waren mehrere RP-Chromatographieschritte notwendig (Abb.10 a-e). Den resultierenden Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte wurden Aliquots entnommen, lyophilisiert und im Mikrodilutionstest zur Detektion antimykotischer Aktivität eingesetzt. Die bei der Chromatographie entstehenden Fraktionen mit der höchsten antimikrobiellen Aktivität wurden vereinigt, um eine Aufkonzentrierung der aktiven Substanzen zu erreichen. Diese dienten als Ausgangsmaterial für die weitere Trennung. Die zum Test eingesetzte Gewebeäquivalentmenge wurde nach jedem Reinigungsschritt erhöht, um die Detektion antimykotischer Peptide im Mikrodilutionstest zu gewährleisten.

Den ersten Schritt der Reinigung von Plazentapeptiden stellte die Reversed Phase Chromatographie dar. Mit ihr konnte eine erste Fraktionierung erreicht werden. Die HPLC-fraktionen wurden auf ihre antifungale Aktivität gegen *Candida albicans* untersucht. Von den 7 aktiven Fraktionen zeigte Fraktion 18 die größte Aktivität. Initial wurden 220 mg Plazentagewebeäquivalent eingesetzt. Die antifungale Aktivität ergibt sich aus der Verdünnungsstufe der Testlösung. Bei jeder Stufe wurde die initial eingesetzte Äquivalentmenge 1:2 verdünnt (Abb 10 a).

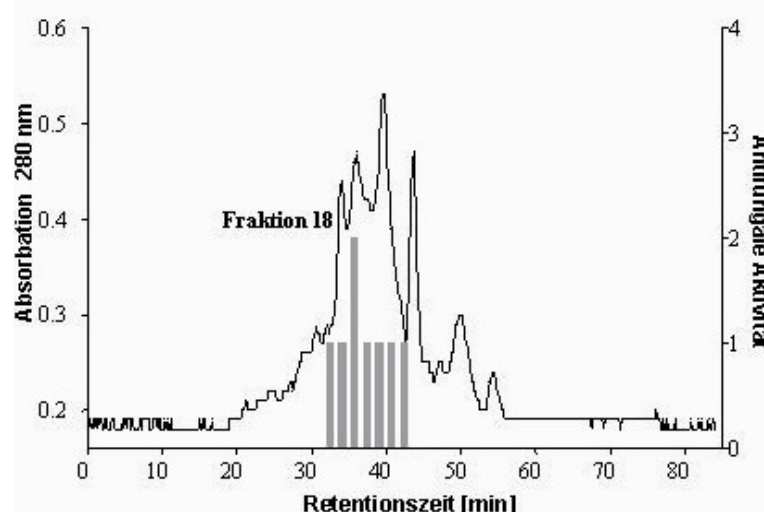


Abb. 10a: RP-Chromatographie des pH-Pool 4 der Plazenta-Peptidbank. In 7 Fraktionen sind Substanzen enthalten, die das Wachstum von *Candida albicans* hemmen. Initial wurden 220 mg Gewebeäquivalent eingesetzt. Die Balken zeigen die antimikrobielle Aktivität der Fraktionen. Die Fraktionen mit höchster Aktivität wurden jeweils für die weitere Aufreinigung genutzt.

Die im MHK-Test biologisch aktivste Fraktion 18 wurde im zweiten Aufreinigungsschritt mittels HPLC rechromatographiert. Es wurden 8 Wachstums-hemmende Fraktionen detektiert, mit 2 sehr aktiven Fraktionen 20 und 21. Die eingesetzte Äquivalentmenge betrug 13,75 g (Abb: 10 b).

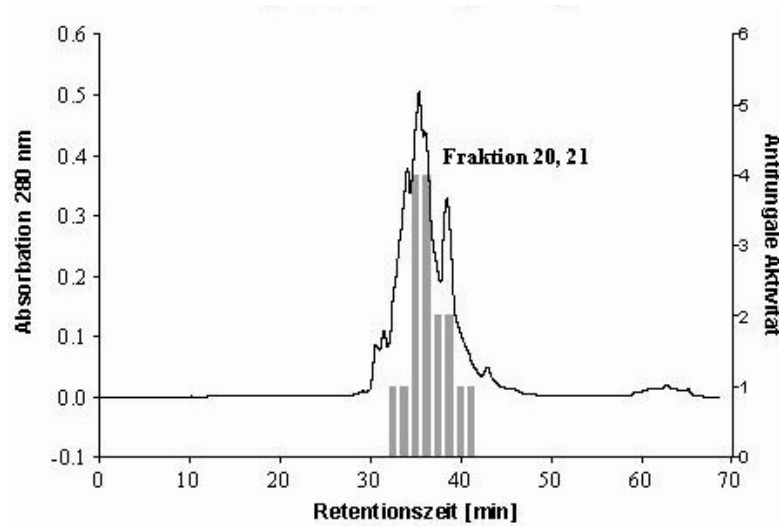


Abb. 10b: RP-Chromatographie der Fraktion 18 des pH-Pool 4 der Plazenta-Peptidbank. In 8 Fraktionen sind Substanzen enthalten, die das Wachstum von *C. albicans* hemmen. Es wurden 13,75 g Gewebeäquivalent eingesetzt.

Säule: 4,7 x 30 Vydac Cartusche C18 15-20 µm Nr. 17, Fließmittel A: 10 mM HCL, B: 10 mM HCL in 80 % MeCN.

Fraktion 20 und 21 wurden zur weiteren Reinigung vereinigt und rechromatographiert. Fraktion 12 und 13 waren, bei einer eingesetzten Äquivalentmenge von 55 g, die aktivsten Fraktionen von 4 aktiven (Abb. 10c).

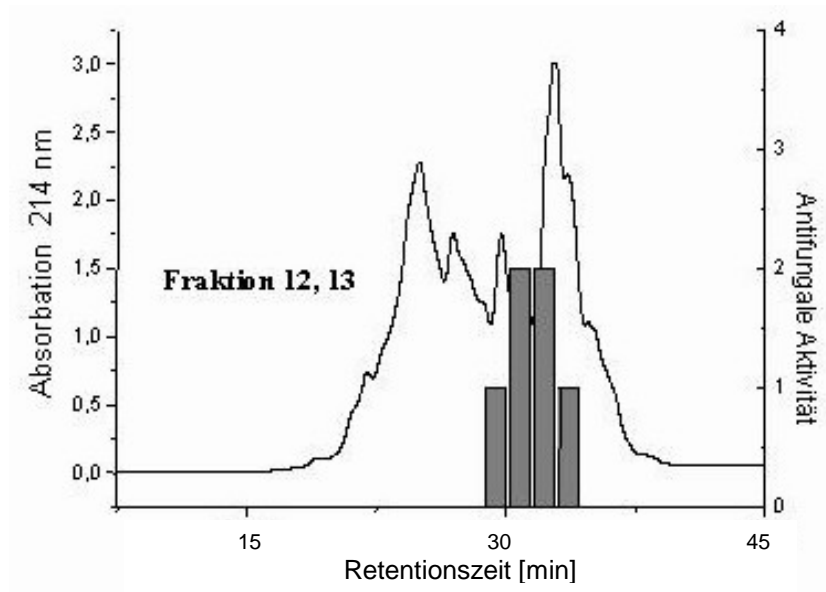


Abb. 10d: RP-Chromatographie der Fraktionen 20 und 21, der Fraktion 18 des pH-Pool 4 der Plazenta-Peptidbank. In 4 Fraktionen sind Substanzen enthalten, die das Wachstum von *C. albicans* hemmen. Es wurden 55 g Gewebeäquivalent eingesetzt.
Säule: 4,7 x 30 Vydac Cartusche C18 15-20 µm Nr. 17, Fließmittel A: 10 mM in 30 % MeOH, B: 10 mM in 100 % MeOH.

Im Mikrodilutionstest der, bei der Rechromatographie von Fraktion 12 und 13 erhaltenen HPLC-Fraktionen, wurde keine weitere antimykotisch wirksame Substanz detektiert (Abb. 10 d-e). Da die Menge der wirksamen Substanz bei jedem Reinigungsschritt, durch die Trennung von aktiven und inaktiven Substanzen, abnimmt, konnte mit der vorhandenen Testmenge keine antimikrobielle Wirkung erzielt werden. Limitiert durch die Menge des Ausgangsmaterials im Plazenta-Pool, konnte keine höhere Gewebeäquivalentmenge eingesetzt werden. Da in den Fraktionen zuvor antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte, benötigt man für eine weitere Reinigung, Detektion und Isolierung mehr Ausgangsmaterial und eine sensitivere Testmethode, da in dem verwendeten MHK Test eine große Menge eingesetzt wird, und dieser Test eine zu geringe Sensitivität aufweist. Die Reinigung wurde an dieser Stelle abgebrochen. Als sensitiveren Test könnte man z.B. einen Radial-Diffusionstest, oder eine MHK-Bestimmung mittels Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) etablieren.

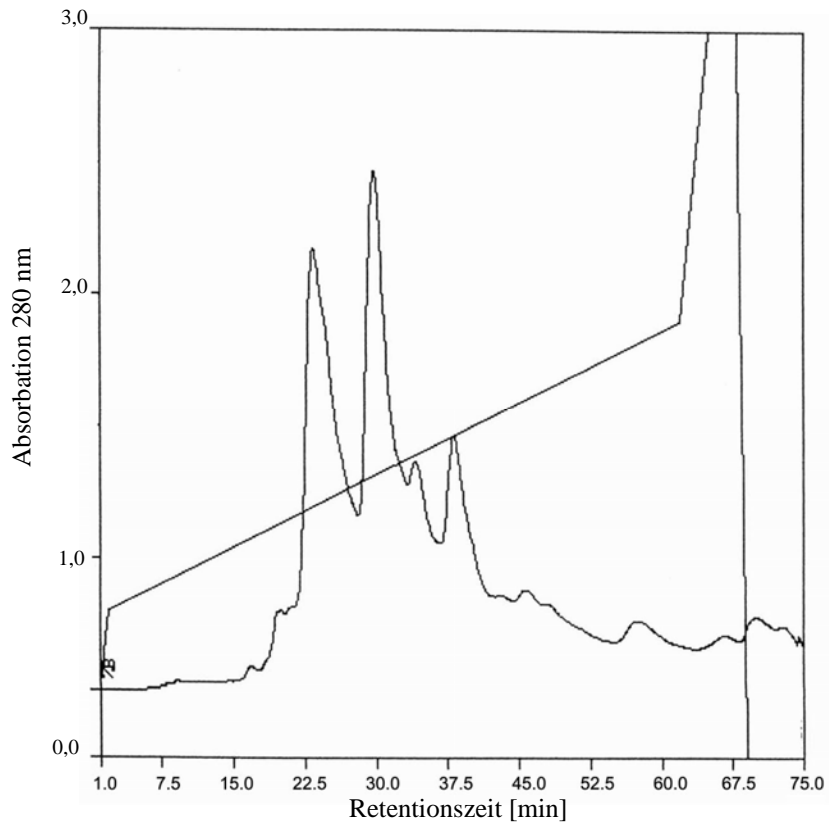


Abb. 10d: RP-Chromatographie der Fraktion 12. Es wurden 100 g Gewebeäquivalent eingesetzt. Säule: 20 x 150 Biotek Pepkat 1000-7 Nr. 64. Fließmittel A: 50 mM NaH_2PO_4 , B: 50 mM NaH_2PO_4 + 1,5 M NaCl.

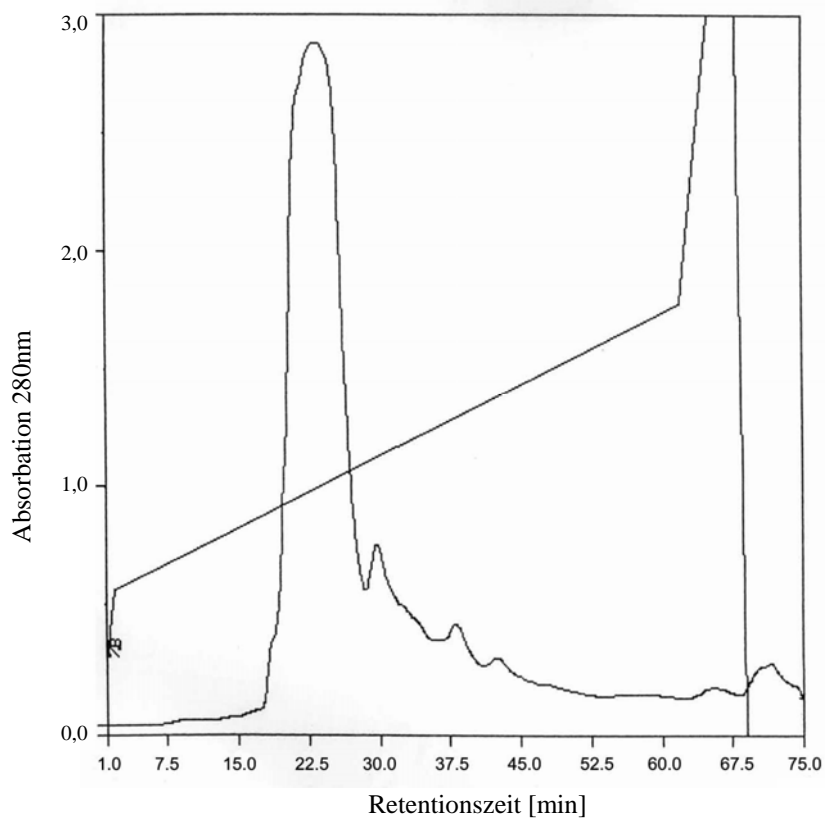


Abb. 10e: RP-Chromatographie der Fraktion 13. Es wurden 100 g Gewebeäquivalent eingesetzt. Säule: 20 x 150 Biotek Pepkat 1000-7 Nr. 64. Fließmittel A: 50 mM NaH_2PO_4 , B: 50 mM NaH_2PO_4 + 1,5 M NaCl.

3.2 Sap – Inhibitions-Screening

3.2.1 Wirkung von Plazentapeptiden auf die Sap von *Candida albicans*

Ziel des folgenden Experimentes war es zu untersuchen, ob in Plazentagewebe Peptide vorhanden sind, welche die Aktivität der sekretorischen Aspartat-Protease, ein hydrolytisches Enzym von *C. albicans*, *in vitro* inhibieren. Als Testenzym diente eine selbsthergestellte *Candida albicans* Enzym Lösung, welche zum größten Teil das Isoenzym 2 der sekretorischen Aspartat-Protease enthält. Zur Detektion der inhibitorischen Wirkung von Peptiden der Plazentabank wurden die einzelnen Peptidbankfraktionen unter Anwendung eines Sap-Aktivitäts-Assay nach Capobianco et al. (1992) getestet.

Zur Validierung des Tests wurde jede Fraktion 10 mal im Sap-Inhibitionsassay getestet. Als Kontrolle diente der Aspartylproteinasen-Inhibitor Pepstatin A. 0 % Sap-Inhibition entspricht der Enzymaktivität ohne Peptid, bei 100 % Sap-Inhibition im Test war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar. Im initialen Screening der Plazenta Peptidbank wurde nur im pH-Pool 4 inhibitorische Aktivität nachgewiesen. In den pH-Pools 1-3 konnten keine aktiven Peptidfraktionen detektiert werden. Für den Sap-Inhibitionsassay wurde eine Gewebeäquivalentmenge von 220 mg eingesetzt. 8 Fraktionen von pH-Pool 4 zeigten eine Sap-Inhibition, wobei die Fraktionen 21 und 22 in der eingesetzten Konzentration die Sap vollständig inhibierten. Der peptidische Charakter der aktiven Substanzen wurde, wie in Kapitel 2.3.4. beschrieben, durch Hydrolyse mit Subtilisin bestätigt (Abb. 11, Anhang: Tab. 7, Tab. 8).

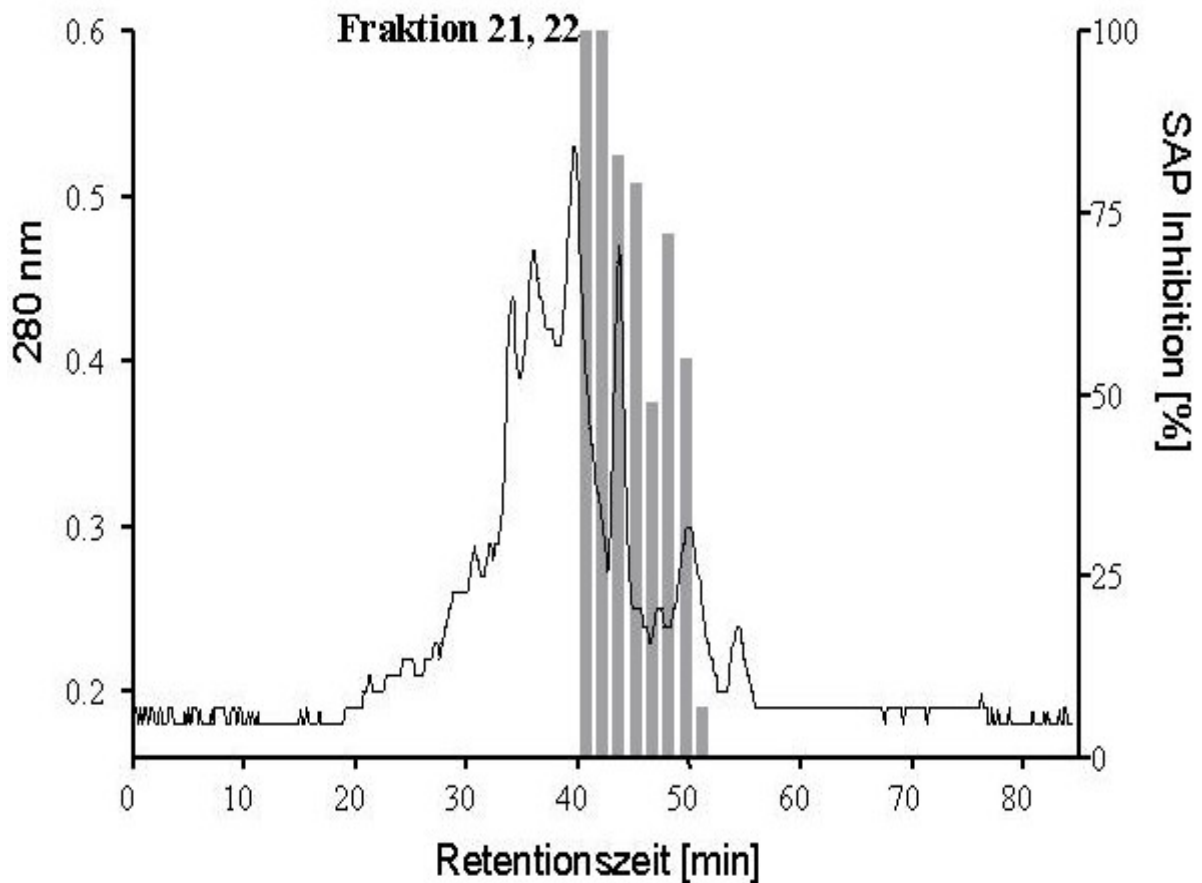


Abb. 11: Screening des pH-Pool 4 der Plazenta-Peptidbank. Die Balken zeigen die relative Sap Inhibition. Plazentaäquivalentmenge 220 mg.

3.2.2 Isolierung eines aktiven Peptids

Das verwendete Reinigungsverfahren zur Isolierung antimikrobieller Peptide aus Plazenta wurde unter Berücksichtigung ihrer chemischen Eigenschaften bei IPF-PharmaCeuticals entwickelt. Dabei erwies sich der Wechsel von RP- und Kationenaustauschchromatographie als sehr effektive Methode und ermöglichte die Reindarstellung eines Peptids in sechs Chromatographieschritten. Mit Hilfe der angewendeten Trennmethode wurde ein Reinheitsgrad von mindestens 95 % erreicht, der für die weitere Strukturaufklärung mittels MALDI-MS und Edman-Sequenzierung erforderlich war.

Abbildung 12 zeigt die schematische Darstellung des im Rahmen dieses Testes verwendeten Reinigungsverfahrens für Plazentapeptide.

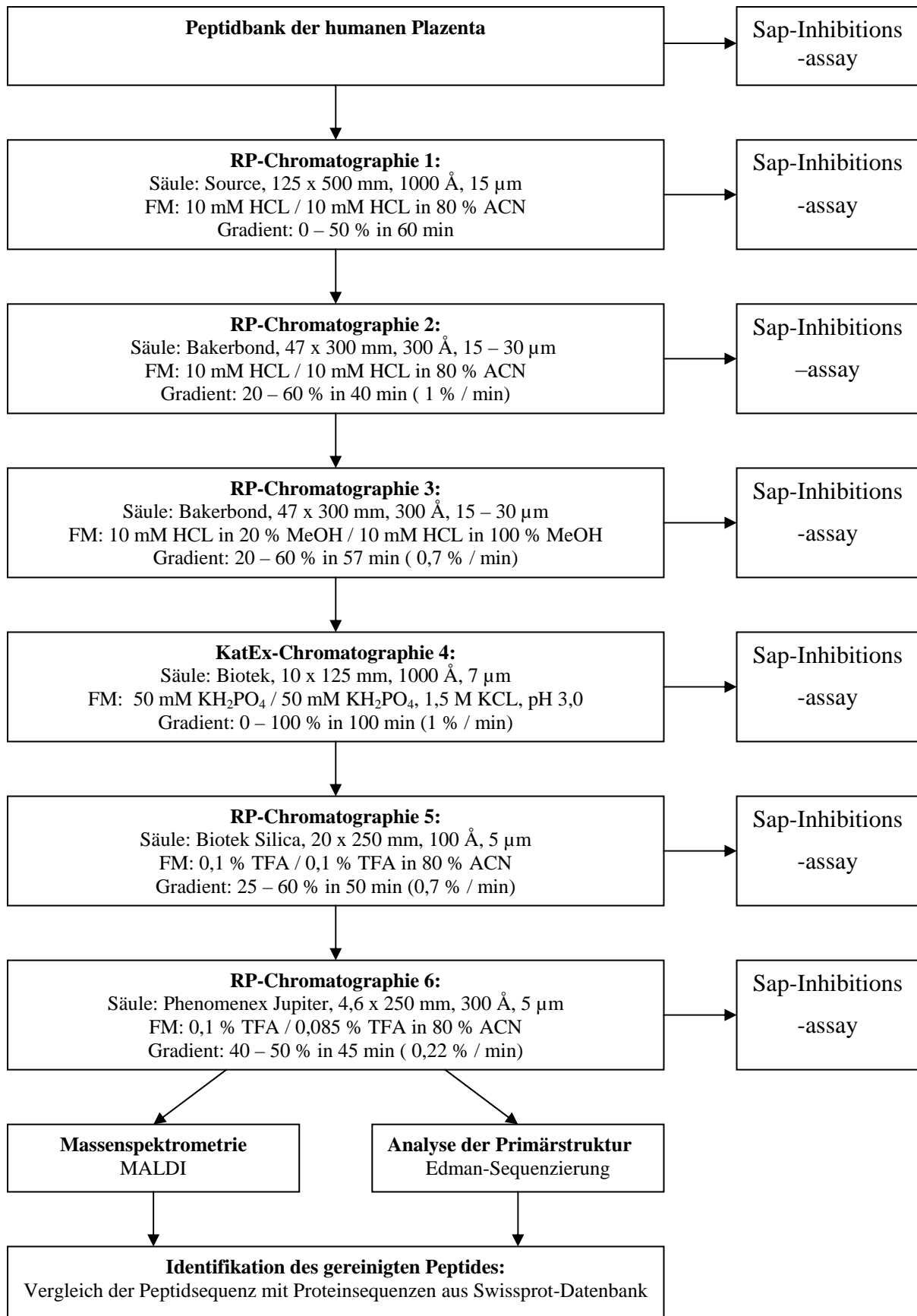


Abbildung 12: Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reinigungsverfahrens

Für Isolierungsschritt 1 wurden die beiden aktiven Fraktionen 21 und 22 des pH-Pool 4 chromatographisch getrennt und auf ihre inhibitorische Aktivität geprüft. Die Reversed-Phase-Chromatographie stellte den ersten Schritt zur Reinigung dar. Durch einen linearen Anstieg von Puffer B (10mM HCL in 80 % ACN) im Elutionsmittel in 60 min konnte eine erste Fraktionierung der an die stationäre Phase (Source, 125 x 500 mm, 1000 Å, 15µm, RPC 15) bindenden Substanzen erreicht werden. Für den Sap-Inhibitionsassay wurde eine Gewebeäquivalentmenge von 1,76 g eingesetzt. Die Fraktionen 23-44 bewirkten eine Sap-Inhibition, wobei die Fraktionen 31 und 32 die Aktivität der Sap zu 100 % inhibierten (Abb. 13a, Anhang: Tab. 9).

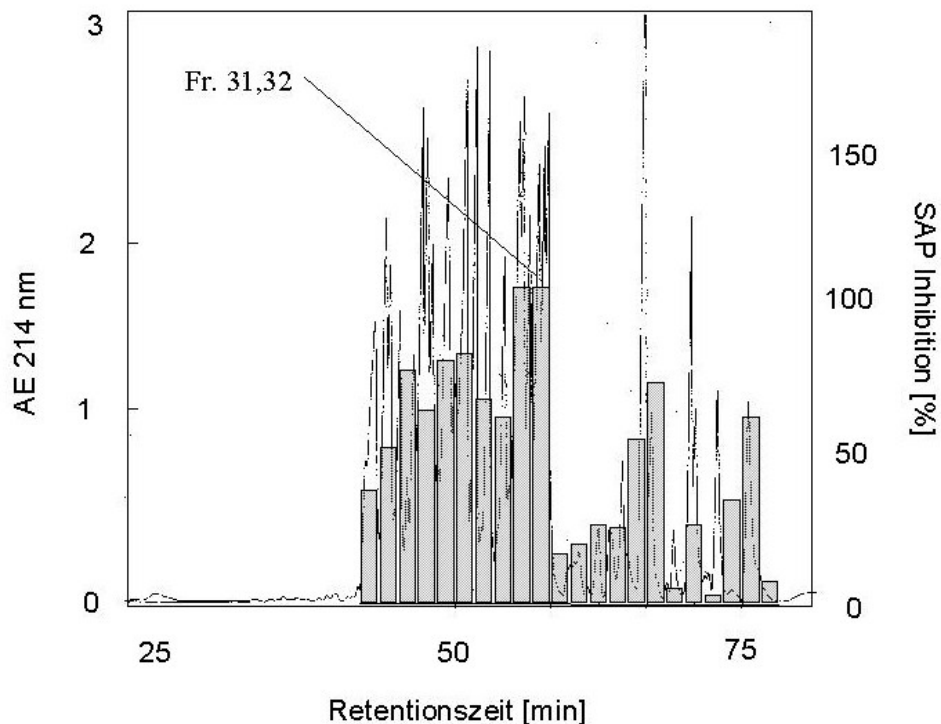


Abb. 13a: Reinigung des Sap-Inhibitorischen Peptides hHEM β (111 – 146) aus der Plazenta-Peptidbank. Die Balken zeigen die relative Inhibition der Fraktionen an. Die Fraktionen mit Beschriftung wurden für die weitere Isolierung genutzt. RP-Chromatographie der Fraktionen 21 und 22 der Plazenta-Peptidbank. In acht Fraktionen sind Substanzen enthalten, welche die sekretorische Aspartat-Proteinase von *Candida albicans* hemmen.
Säule: Source, RP C15, 125 x 500 mm, 1000 Å, 15 µm, Fließmittel: A: 10 mM HCL, B: 10 mM HCL in 80 % ACN, Gradient: 0 – 50 % B in 60 min. UV-Detektion: 214 nm Äquivalentmenge 1,7 g.

Die beiden im Assay aktivsten Fraktionen 31 und 32 wurden zur weiteren Reinigung vereinigt und rechromatographiert. Im zweiten Isolierungsschritt wurde die stationäre Phase ausgetauscht (Bakerbond C18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15 – 30 µm) und das Puffersystem beibehalten. Die Peptide wurden durch einen Gradienten von 20-60 % Puffer B im Elutionsmittel in 40 min eluiert. Bei einer eingesetzten Testmenge von 1,76 g Plazentaäquivalent zeigte Fraktion 27 die höchste Inhibition (Abb. 13b, Anhang: Tab. 10).

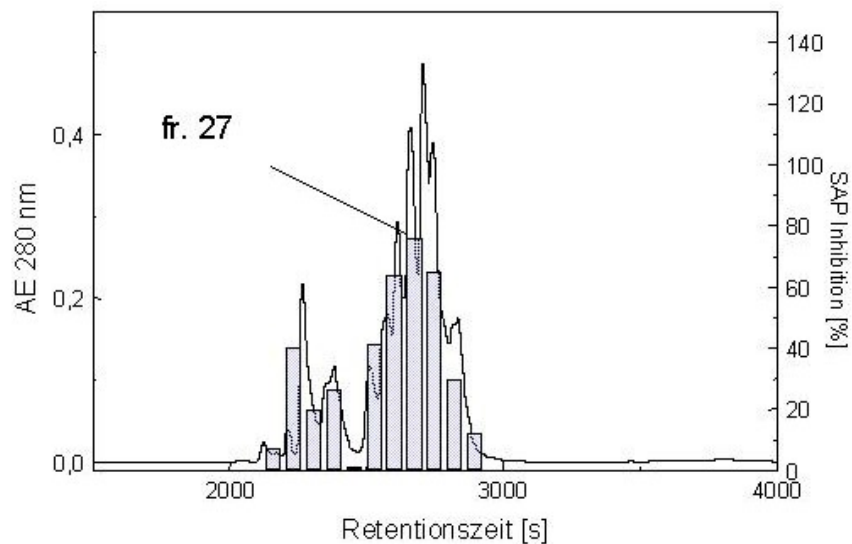


Abb. 13b: Rechromatographie der beiden aktivsten Fraktionen 31 und 32. Die wirksamsten Substanzen wurden in Fraktion 27 detektiert.

Säule: Bakerbond RP C18, 47 x 300 mm, 300 Å, 15 – 30 µm, Fließmittel: A: 10 mM HCL B: 10 mM HCL in 80 % ACN, Fluß: 40 ml/min, Gradient: 20 – 60 % B in 40 min (1 % B/min), UV-Detektion: 280 nm. Äquivalentmenge 1,7 g.

Im dritten Isolierungsschritt, bei dem die stationäre Phase beibehalten wurde, und das Puffersystem gegen MeOH-Puffer (Puffer A: 10 mM HCL in 20 % MeOH / Puffer B: 10 mM HCL in 100 % MeOH) ausgetauscht wurde, eluierte man Peptide durch einen Gradienten von 20 – 60 % Puffer B in 57 min. Die im Sap-Inbitionstest eingesetzte Gewebeäquivalentmenge betrug 3,5 g. Als Fraktion mit der höchsten Aktivität konnte Fraktion 23 detektiert werden (Abb. 13c, Anhang: Tab. 11).

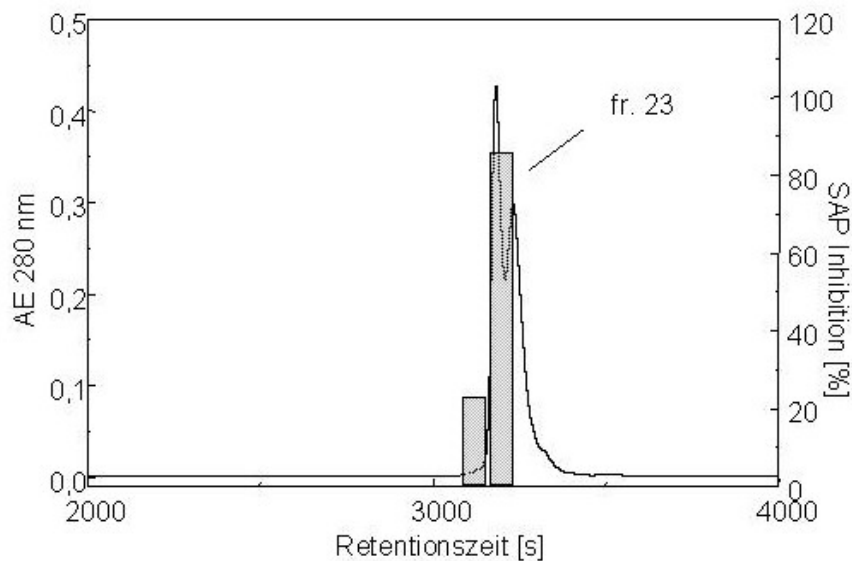


Abb. 13c: Rechromatographie der aktiven Fraktionen. Es konnten 2 benachbarte Fraktionen detektiert werden, die eine Hemmung der Sap zeigten.

Säule: Bakerbond RP C18, 47 x 300 mm, 300 Å , 15 – 30 µm, Fließmittel: A: 10 mM HCL in 20 % MeOH, B: 10 mM HCL in 100 % MeOH, Fluß: 40 ml/min, Gradient: 20 – 60 % B in 57 min (0,7 % B/min), UV-Detektion 280 nm, Äquivalentmenge 3,4 g.

Da antimikrobielle Peptide in den meisten Fällen basische Aminosäuren enthalten (Hancock et Lehrer, 1998), ist es durch die Kationenaustausch-Chromatographie möglich, polykationische Peptide anzureichern und zu trennen. Bei diesem 4. Reinigungsschritt wurden die Peptide mit einer hochkonzentrierten Kaliumchlorid-Lösung (1,5 M KCL in 50 mM KH₂PO₄, pH 3,0) von der stationären Phase (Biotek, PrepPak, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm) eluiert. Aufgrund des verwendeten Elutionsmittels (1,5 M KCL) enthielten die dabei entstandenen Fraktionen Salz in Konzentrationen bis zu 1 M. Bei dieser Konzentration werden viele der antimikrobiellen Peptide inaktiviert (Tossi, 2000), so dass die Fraktionen

entsalzt werden mussten, bevor sie im Sap-Inhibitionsassay untersucht werden konnten. Bei diesem Assay wurde eine Plazenta-äquivalentmenge von 11 g eingesetzt. Die KatEx-Chromatographie führte zu einer starken Verteilung der inhibitorischen Aktivität auf 15 Fraktionen. Aktivste Fraktion war Fraktion 37 (Abb. 13d, Anhang: Tab. 12).

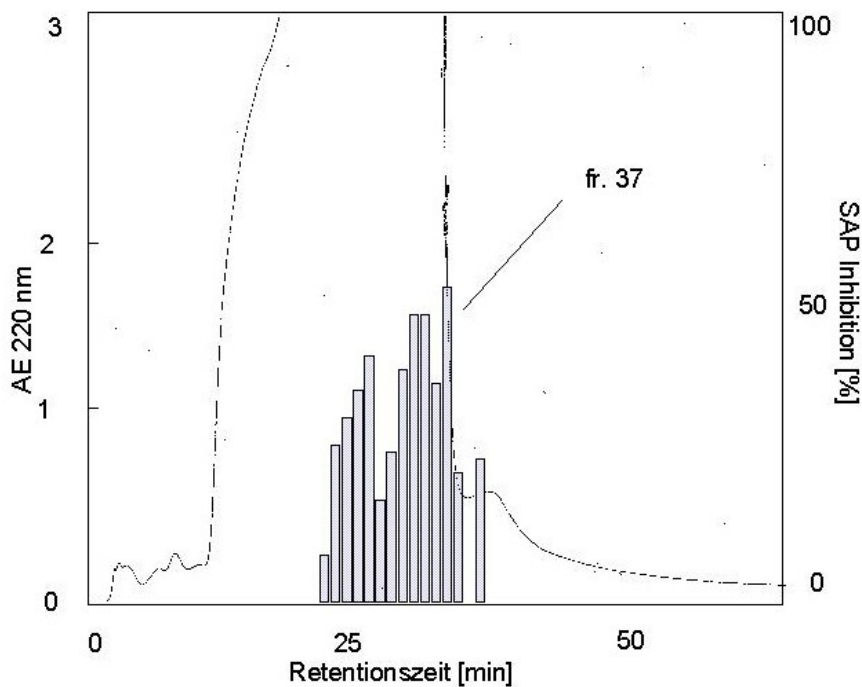


Abb. 13d: Kationenaustausch-Chromatographie der aktiven Fraktionen. Dieser Schritt führte zu einer Streuung der Sap-inhibitorischen Aktivität.

Säule: Biotek Pepkat, 10 x 125 mm, 1000 Å, 7 µm, Fließmittel: A: 50 mM KH₂PO₄, pH 3,0 B: 50 mM KH₂PO₄, 1,5 M KCL, Fluß: 2,5 ml/min, Gradient: 0 - 100 % B in 100 min (1 % B/min), UV-Detektion 220 nm, Äquivalentmenge 11 g.

Im folgenden Isolierungsschritt wurde Fraktion 37 verwendet und wieder eine RP-Chromatographie angewandt. Die Peptide wurden mit einem Gradienten von 25-60 % Puffer B (0,1 % TFA in 80% ACN) in 50 min von der stationären Phase (Biotek Silica RPC 4, 20 x 250 mm, 100 Å, 5 µm) eluiert. Eine inhibitorische Aktivität konnte in 14 Fraktionen detektiert werden. Die zur Aktivitätsbestimmung eingesetzte Äquivalentmenge betrug 60 g (Abb. 13e, Anhang: Tab. 13). Die molekulare Masse der in der aktivsten Fraktion 41 enthaltenen Substanz wurde mit einer MALDI-Messung detektiert. Die Masse betrug 3902,3 Da (Abb. 13f).

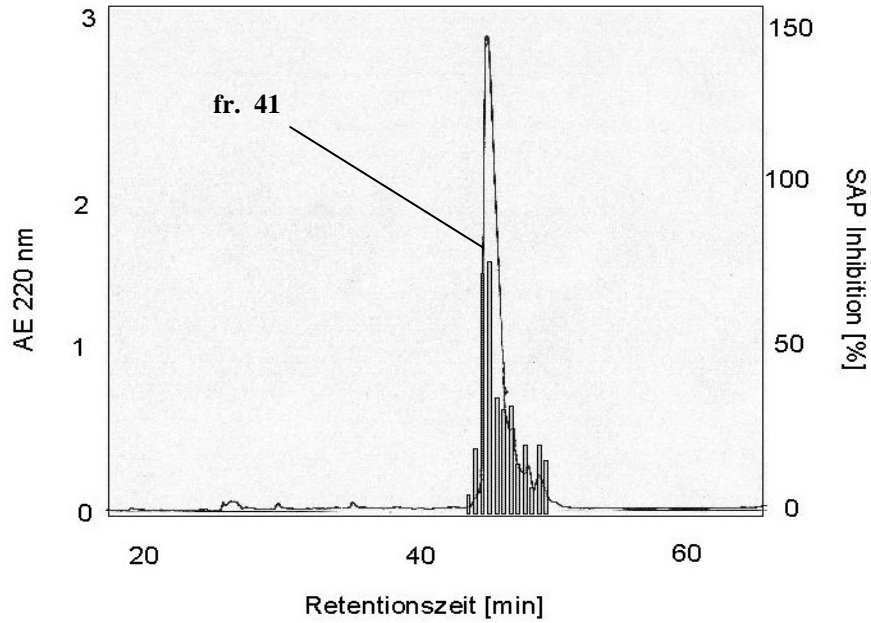


Abb. 13e: Rechromatographie der aktiven Fraktionen. Ein Sap-hemmendes Peptid konnte effektiv von nicht inhibierenden Peptiden getrennt werden.

Säule: Biotek Silica RP C4, 20 x 250 mm, 100 Å, 5 µm, Fließmittel: A: 0,1 % TFA, B: 0,1 % TFA in 80 % ACN, Fluß: 7 ml/min, Gradient: 25 – 60 % B in 50 min (0,7 % B/min), UV-Detektion 220 nm, Äquivalentmenge 60 g.

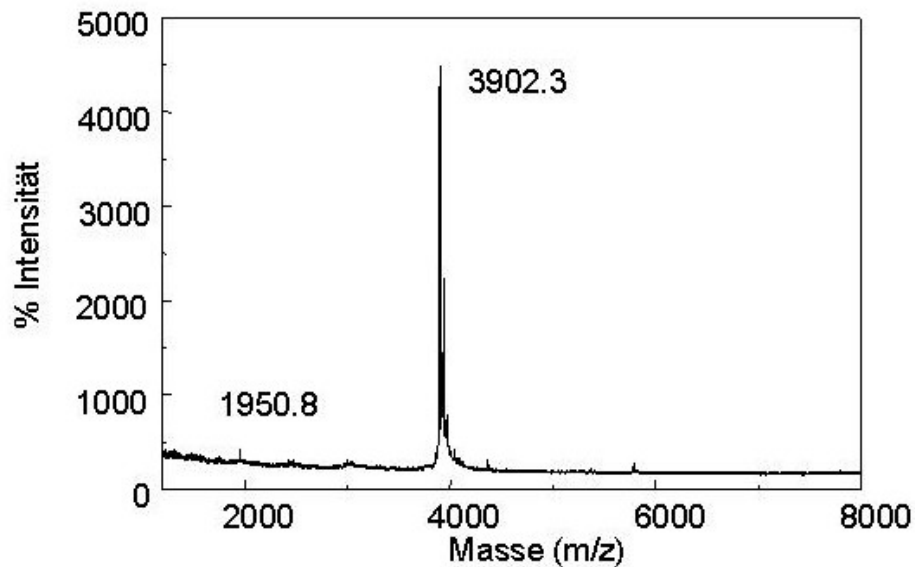


Abb. 13f: MALDI-Massenspektrum des Sap-hemmenden Peptids.
Die Masse des gereinigten Peptids beträgt 3902,3 Da.

Als letzter Reinigungsschritt zur Reinigung der Fraktion 41 wurde nochmals eine RP-Chromatographie eingesetzt. Mit Hilfe von ACN als Elutionsmittel und einer Phenomex Jupiter Säule (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm), konnten die aktiven Peptide weiter von biologisch inaktiven Peptiden getrennt werden. Um eine bessere Trennleistung zu erhalten, wurde ein flacher Gradient (0,22 % Puffer B/min; Puffer B: 0,085 % TFA in 80 % ACN) gewählt. Für den Sap-Inhibitionstest wurde eine Plazenta-Äquivalentmenge von 250 g eingesetzt. Es konnten hier 2 sehr aktive Fraktionen (Fr.: 21/31) detektiert werden (Abb. 13g).

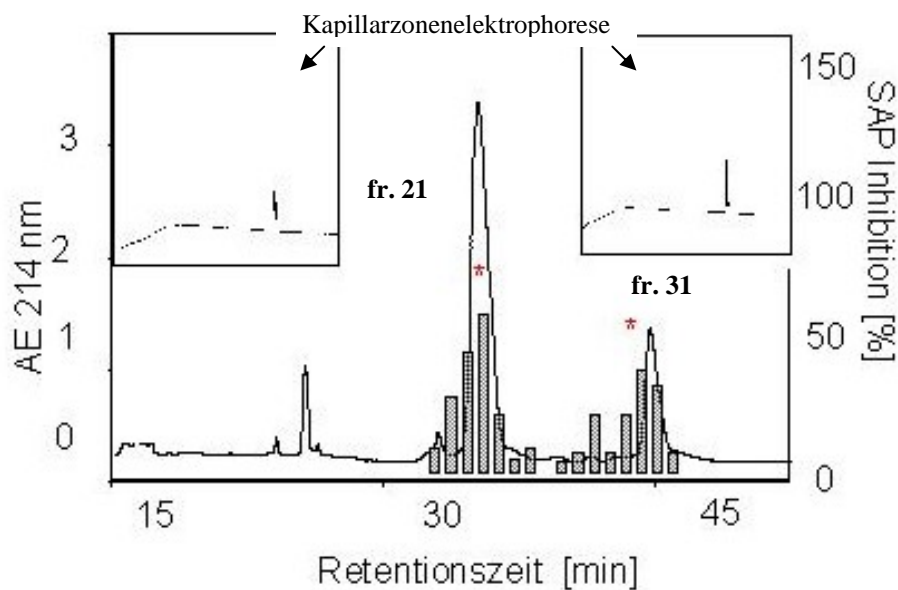


Abb. 13g: Rechromatographie der aktiven Fraktionen. Dieser Schritt führte zur Reindarstellung des Peptids hHem β (111 – 146) und seines Dimers.

Säule: Phenomex Jupiter RP C18, 4,6 x 250 mm 300 Å, 5 µm, Fließmittel: A: 0,1 % TFA, B: 0,085 % TFA in 80 % ACN, Fluß: 0,75 ml/min, Gradient: 40 – 50 % B in 45 min (0,22 % B/min), UV-Detektion 214 nm, Äquivalentmenge 250 g.

Die Reinheit der beiden aktivsten Fraktionen 21 und 31 wurde durch eine Kapillarzonenelektrophorese dargestellt. Die Reinheit der Peptide ist > 95 %.

Der Reinheitsgrad der Fraktionen 21 und 31 wurde durch Kapillarzonenelektrophorese überprüft (Kapitel 2.3.2.) Nach Anwendung des dargestellten Trennverfahrens war in den beiden Elektropherogrammen je 1 Substanz mit einer Reinheit von mindestens 95 % detektierbar (Abb. 13g, Anhang: Tab. 14). Die molekularen Massen der durch Kapillarzon-

elektrophorese überprüften Substanzen wurden durch MALDI-Messungen bestimmt. Die Masse von 3901,9 Da entspricht der Masse des Peptides humanes Hämoglobin β (Aminosäuren 111-146)(hHem β (111-146)) (Abb. 13h), die Masse von 7803,9 Da möglicherweise der Masse zweier zusammengelagerter Moleküle von hHem β (111-146).

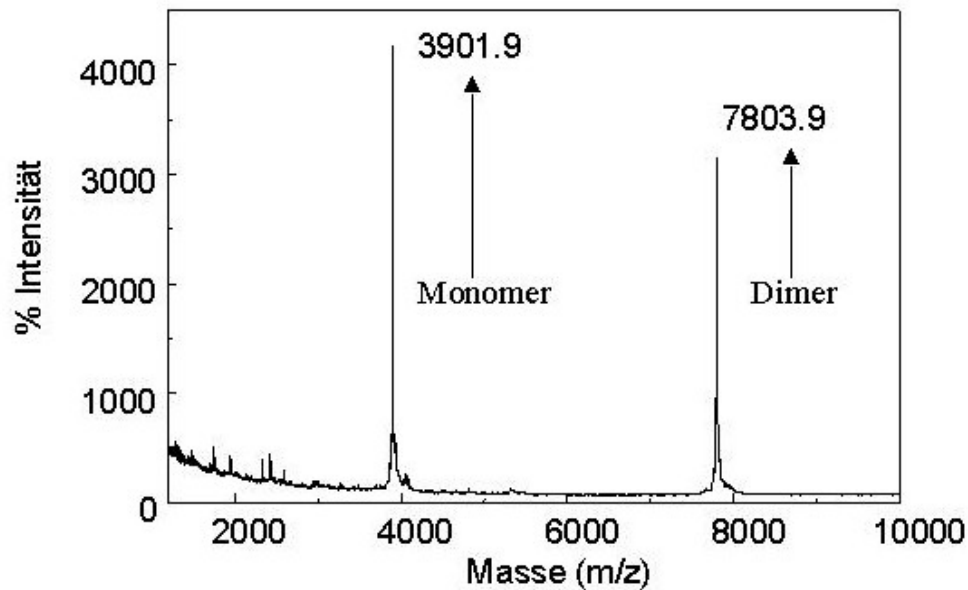


Abb. 13h: MALDI-Massenspektrum von hHem β (111 – 146) und seinem Dimer. Die Masse von hHem β (111 – 146) entspricht 3901,9 Da. Die detektierte Masse von 7803,9 Da entspricht der Masse von 2 zusammengelagerten Molekülen hHem β (111 – 146).

Die Aufklärung der Primärstruktur des gereinigten Peptides erfolgte durch N-terminale Sequenzierung mit Hilfe des Edman – Abbaus (Kapitel 2.3.3.). Die erhaltene Peptidsequenz wurde mit Eintragungen aus der Swissprot- bzw. EMBL-Datenbank mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen. Das erhaltene Proteinfragment wurde unter Berücksichtigung seines Molekulargewichts über die bei den Sequenzvergleichen wahrscheinlichste Möglichkeit als hHem β (111-146) identifiziert.

3.2.3 Charakterisierung von humanem Hämoglobin β (111-146)

Das Protein hHEM β (111-146) wurde chemisch synthetisiert bei IPF PharmaCeuticals. Zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde synthetisches Material verwendet.(Abb. 14, Anhang Tab. 15) Die Konzentrations-Wirkungskurve erreicht ein Maximum (vollständige Sap-Hemmung) bei ca. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die ED₅₀ liegt bei ca. 95 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

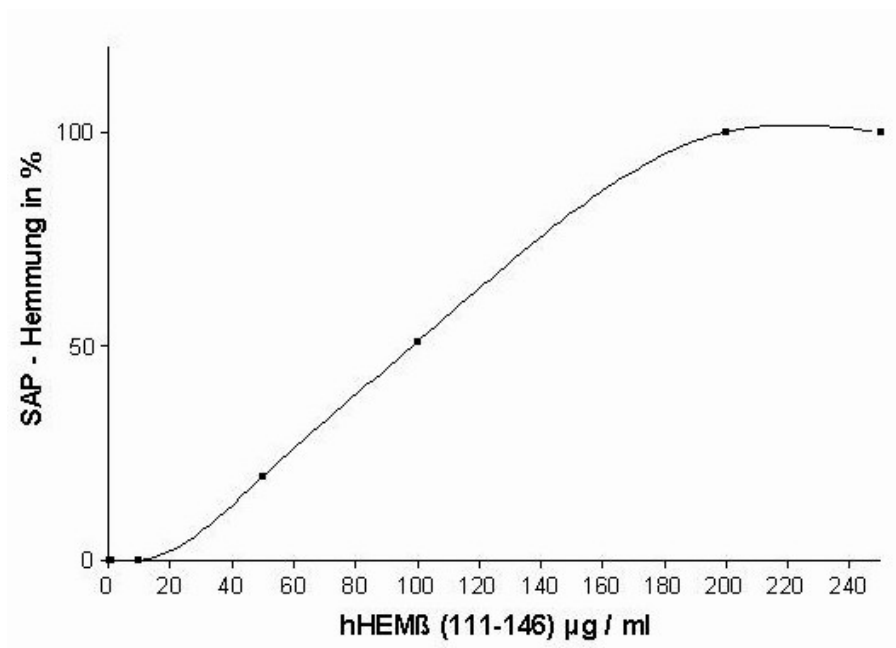


Abbildung 14: Prozentuale Sap - Hemmung durch hHEM β (111-146). Konzentrations-Wirkungsverhalten. Jeder Punkt representiert den arithmetischen Mittelwert aus 10 Versuchen. Die ED₅₀ liegt bei ca. 95 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.3 Wirkung bekannter Peptide auf *Candida albicans*

Die verwendeten Peptide wurden vom Institut für Peptidforschung in Hannover zur Verfügung gestellt. Der Test auf antifungale Aktivität erfolgte entsprechend Kapitel 2.4.6. Abbildung 15 zeigt die getesteten AP.

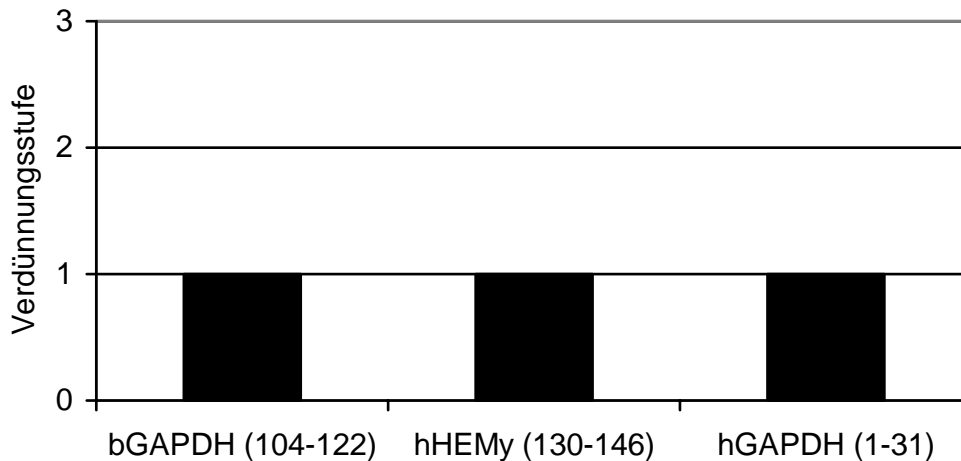


Abbildung 15: Testung antimikrobieller Peptide auf antifungale Aktivität im Mikrodilutionstest. Initial wurde eine Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ des zu untersuchenden Peptides, verwendet. In den jeweiligen Verdünnungsstufen wurde, ausgehend von der Anfangskonzentration, 1 : 2 verdünnt.

Die drei auf ihre antifungale Aktivität getesteten Peptide bGAPDH (104-122), hHEM γ (130-146) und hGAPDH (1-31) zeigten eine minimale Hemmkonzentration gegen *Candida albicans* von 125 $\mu\text{g/ml}$. bGAPDH (104-122) ist ein Fragment der bovinen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Arndt et al., 2001), hHEM γ ein Fragment der v.a. im fetalen Blut vorkommenden γ -Kette des humanen Hämoglobins (Liepke et al., 2003), und hGAPDH (1-31) ein Fragment der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase.

3.3.1 Sap-Hemmung durch humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (1-31) (hGAPDH (1-31))

Im folgenden wurde geprüft, ob die bereits bekannten antimikrobiellen Peptide in der Lage sind, die Sap von *Candida albicans* zu hemmen. Dazu wurde der in Kapitel 2.4.8. beschriebene Test angewandt. Der Assay wurde 10 mal durchgeführt, als Kontrolle diente Pepstatin A. Jedes Peptid wurde in einer maximalen Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

Getestet wurden die Peptide bGAPDH (104-122), hHEM γ (130-146), Lysozym, HNP-2 (Humanes Neutrophiles Peptid 2) und hGAPDH (1-31). Das einzige Peptid mit Sap-inhibitorischer Aktivität war hGAPDH (1-31). (Abb. 16, Tab. 18) Es inhibierte die Sap von *Candida albicans* zu 96 %. 0 % entspricht der Aktivität nach einer Stunde ohne Hemmstoff.

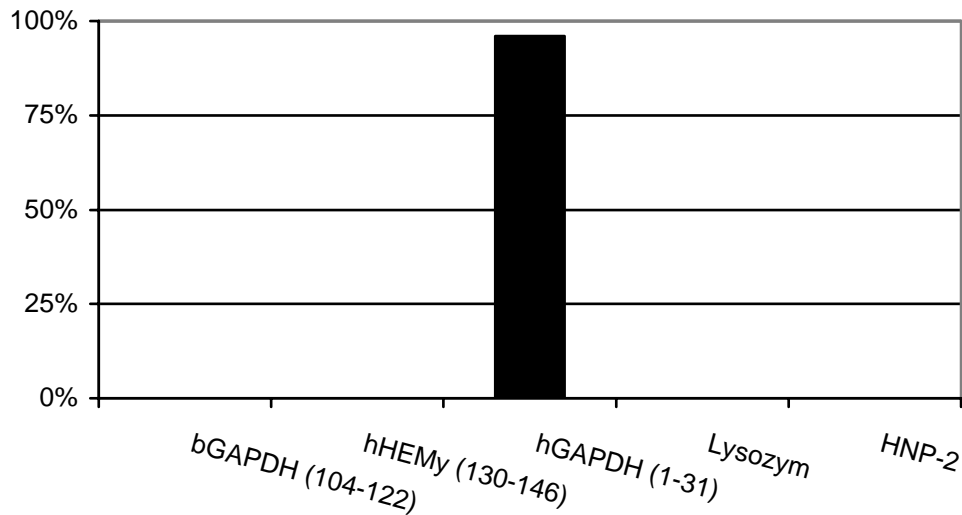


Abb. 16: Relative Sap-Inhibition durch antimikrobielle Peptide. Eingesetzte Konzentration 150 $\mu\text{g/ml}$.

hGAPDH (1-31) zeigte sowohl antimikrobielle Aktivität im Sinne einer Wachstumshemmung von *Candida albicans* als auch die Fähigkeit, die sekretorische Aspartat-Protease dieser Hefe zu hemmen. Die folgende Abbildung zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von hGAPDH (1-31) (Abb. 17, Anhang: Tab. 19).

Die ED_{50} von hGAPDH (1-31) liegt bei ca. 25 $\mu\text{g/ml}$. Bei 200 $\mu\text{g/ml}$ ist die Sap zu 96 % inhibiert und zeigt somit kaum proteolytische Aktivität. Jeder Punkt der Kurve representiert den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 10 Testergebnissen.

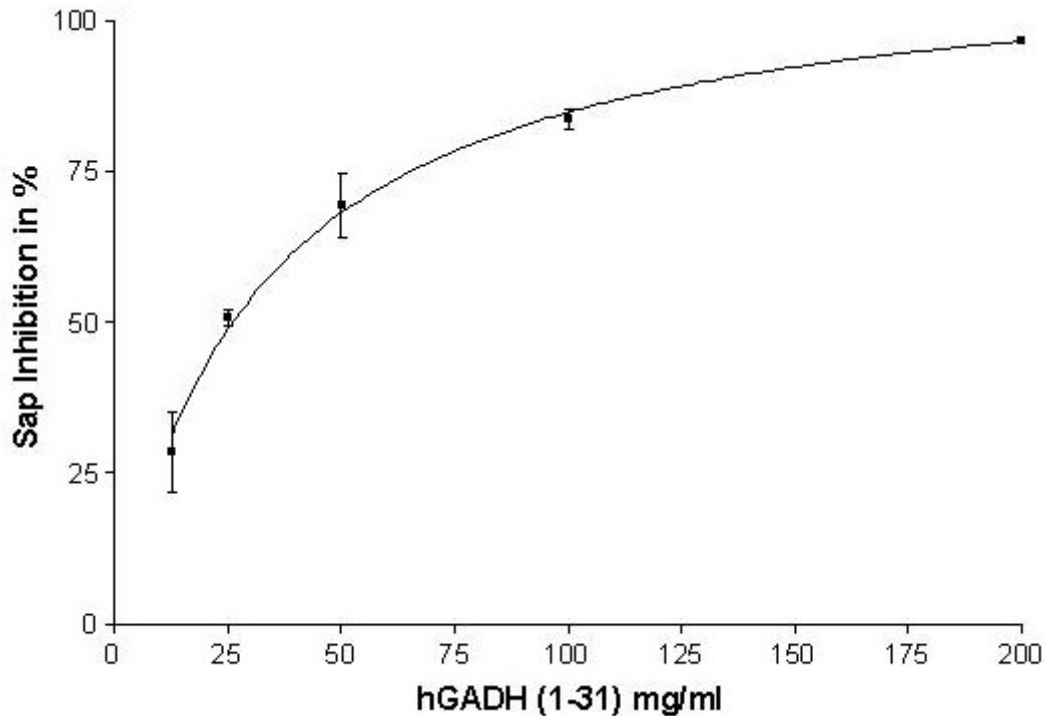


Abb. 17: Prozentuale Sap-Hemmung durch hGAPDH (1-31). Jeder Punkt representiert den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 10 Testergebnissen.

3.3.2 Ultrastrukturelle Veränderungen von *C. albicans* durch hGAPDH (1-31)

Um einen direkten strukturellen Schaden an *Candida albicans* Zellen nach Behandlung mit hGAPDH (1-31) nachzuweisen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden etwa 5×10^6 *Candida* Zellen / ml mit 125 μ g hGAPDH (1-31) / ml für 24 h inkubiert.

Während die Hefezellen des Kontrollansatzes nach 24h Inkubation im Schüttelinkubator in einem physiologischen Zustand waren (Abb. 18a), zeigten sich bei Zusatz antimikrobiellen Peptids manifeste ultrastrukturelle Schäden. Diese Schäden bestanden in der Ausbildung großer, zentraler multilokaler Vakuolen im Zytoplasma der Hefezellen (Abb. 18b).

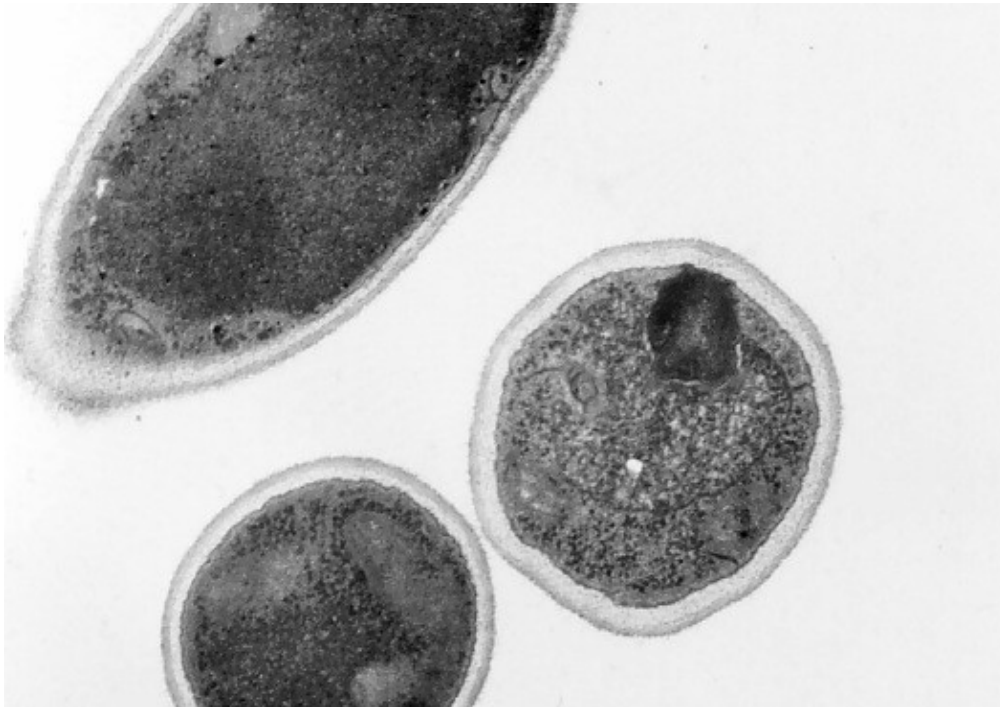


Abb. 18a: Elektronenmikroskopie von *Candida albicans* Zellen ohne antimikrobielles Peptid. Kultiviert in TSB Medium für 24h. Physiologische Morphologie. Vergrößerung 7200x.



Abb. 18b: Elektronenmikroskopie von *C. albicans*, behandelt mit 125 $\mu\text{g/ml}$ hGAPDH (1-31). Zentrale Vakuole (Pfeil). Vergrößerung 1700x.

Der dargestellte Schaden ist hinweisend auf eine fungizide Wirkung des antimykotischen Peptids hGAPDH (1-31), nicht jedoch auf einen möglichen Wirkmechanismus dieses Peptides. So blieb unter anderem die Integrität der Zellwand erhalten. Schäden an dieser wären ein Indiz zum Beispiel für die Bildung von Membrankanälen gewesen.

3.3.3 *In vitro* Untersuchungen am Modell der oralen Kandidose

Um pharmakologische wie infektiologische Sachverhalte *in vitro* zu untersuchen, hat sich das verwendete orale Hautmodell als sehr geeignet erwiesen (Schaller et al., 2002). Es stellt eine bedeutende Alternative zu Tierversuchen dar. Die auf einer Polykarbonschicht sich befindlichen oralen Hautzellen zeigen eine weitestgehend übereinstimmende Morphologie und Stoffwechselaktivität mit der menschlichen oralen Schleimhaut (Monteiro-Riviere et al., 1997; Rosdy et al., 1990/93).

Zur Demonstration der antimikrobiellen Aktivität des Peptids hGAPDH (1-31) am oralen Schleimhautmodell wurde die Abhängigkeit des Schädigungsgrades des *ex-vivo*-Kandidose-Modells vom Zusatz des Peptides hGAPDH (1-31) untersucht. Dazu wurde die orale Schleimhaut mit 2×10^6 *Candida* Zellen in 50 μ l infiziert und für 18 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Der Testansatz enthielt nur 50 μ l TSB und zusätzlich hGAPDH (1-31) in einer Konzentration von 125 μ g/ml. Im folgenden wurden die Modelle lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 19 a,b).

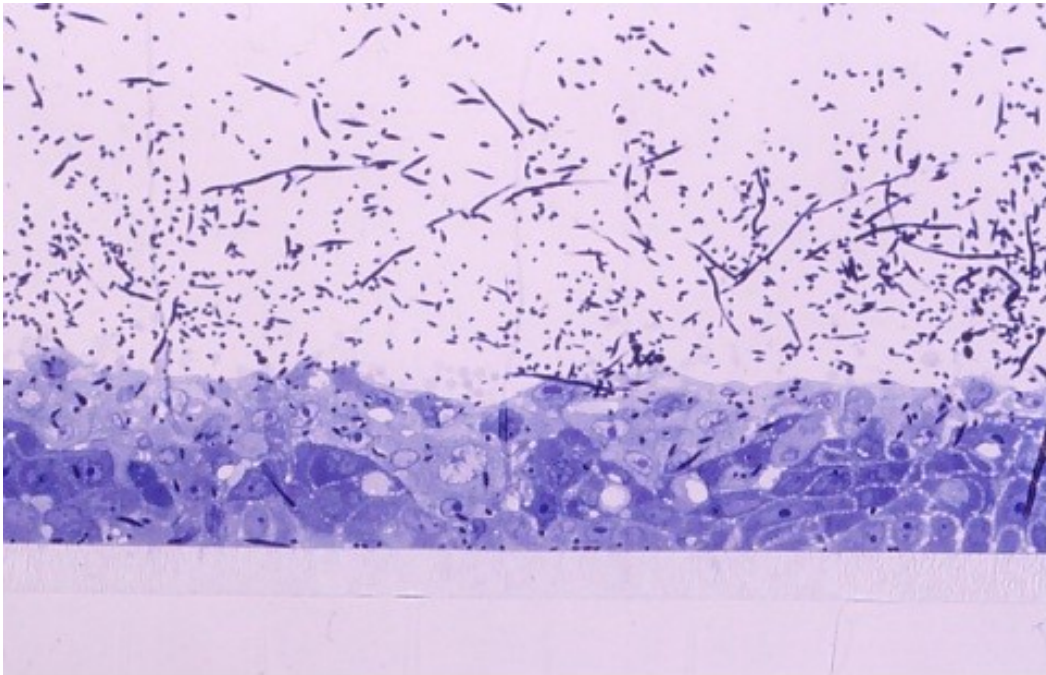


Abb. 19a: Lichtmikroskopie am Modell der oralen Kandidose, ohne hGAPDH (1-31), 18 h nach Infektion mit *Candida albicans* SC 5314. Hohe Zellzahl, multiple Vakuolen, Ödem, Invasion aller Strata. Vergrößerung 400x.

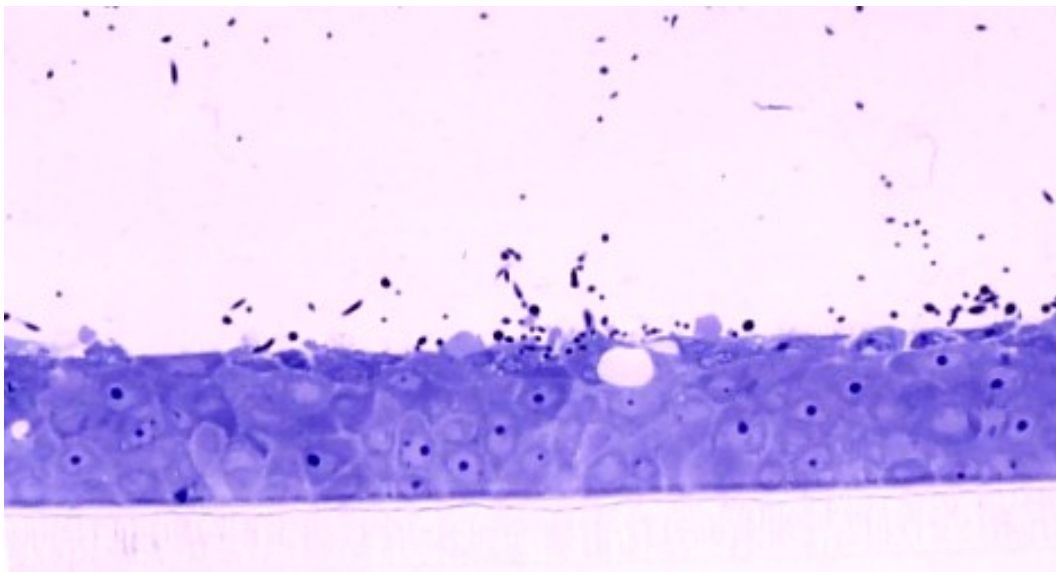


Abb 19b: Lichtmikroskopie am Modell der oralen Kandidose, mit 125 µg/ml hGAPDH (1-31), 18h nach Infektion. Niedrigere Hefezellzahl, sehr geringes Ödem, Schleimhaut als weitgehend intakte Barriere. Vergrößerung 400x.

Die histologischen Veränderungen der oralen Schleimhaut wurden auf der Basis von 50 Schnitten, aus 5 verschiedenen Stellen der infizierten Haut, evaluiert. Die histologische Untersuchung wurde 18 h post infectionem durchgeführt. Es zeigten sich deutliche

Schädigungen der Schleimhaut, mit Ödem und Vakuolisierung der Keratinozyten, und einem vergrößerten interzellulären Raum, im Sinne einer Spongiose. Die Hefepilze waren in der Lage, alle Strata der rekonstituierten oralen Schleimhaut zu invadieren. Zudem wurde eine hohe Zellzahl von *Candida albicans* beobachtet, die zu starker Hautschädigung führte.

Im Gegensatz dazu steht die Untersuchung des Kandidose-Modells, welches mit hGAPDH (1-31) behandelt wurde. Es konnten bedeutend weniger morphologische Veränderungen beobachtet werden. Als einzige pathologische Veränderung zeigte sich ein mildes Ödem in den oberen Zellschichten. Weder eine Spongiose noch eine Invasion der Keratinozyten durch Hefezellen konnte nachgewiesen werden. Außerdem war die Zellzahl von *Candida albicans* deutlich erniedrigt.

4. Diskussion

Candida albicans ist einer der am häufigsten isolierten Erreger. Bei diesem opportunistischen Erreger kann man viele verschiedene klinische Erscheinungsbilder beobachten. Vor allem bei der steigenden Anzahl immunsupprimierter Patienten kann *C. albicans* bis zu einer lebensbedrohlichen tiefen Organmykose führen (Fridkin et Jarvis, 1996). Bei *C. albicans* haben verschiedene Virulenzfaktoren, vor allem aber die Saps eine entscheidende pathogenetische Bedeutung (Naglik et al., 2003).

Das Wachstum von Pilzen kann durch antimikrobielle Peptide gehemmt werden. Die Suche nach diesen Peptiden erfolgte in den meisten Fällen mittels HPLC aus verschiedenen Materialien von Mensch, Tier und Pflanzen. Die antimikrobielle Wirksamkeit von Plazentaextrakten ist hinreichend bekannt. So wurden in den letzten Jahren in der Plazenta unter anderem das humane α -Defensin HD-5 (Svinarich et al., 1997), aber auch das humane β -Defensin HBD-1 nachgewiesen (Valore et al., 1998).

Ziel der vorgelegten Dissertation war es, unbekannte antimikrobielle Peptide mit wachstumshemmenden und den Hauptpathogenitätsfaktor von *Candida albicans* (Sap) beeinflussenden Eigenschaften, zu finden und zu reinigen und ihre Primärstruktur zu klären. Desweiteren wurden bereits bekannte antimikrobiell wirksame Peptide auf ihre Sap-inhibitorische Aktivität untersucht.

Die Plazenta (lat. placenta : Kuchen) ist eines der bemerkenswertesten Organe des Menschen. Die Plazenta übernimmt während der Schwangerschaft in Zusammenarbeit mit den entsprechenden mütterlichen Organen alle Aufgaben der noch nicht funktionstüchtigen Organe des Embryos. So ist sie z.B. beteiligt am Gasaustausch, an der Exkretion, an den Synthese-, Speicherungs-, Entgiftungs- und Abbauleistungen der Leber, an der Hormonsekretion fast aller endokrinen Drüsen (z.B. Inhibin, Östriol, hCG, Progesteron, DHAS, Somatostatin, LDL) und in der Frühschwangerschaft an der Blutbildung und am Wärmeaustausch. Zudem übt sie einige Immunfunktionen lymphatischer Organe aus. Sowohl Plazenta als auch Fetus sind für die Mutter Allotransplanate, deren Abstoßung innerhalb weniger Wochen erwartet werden sollte. Um dies zu verhindern, leistet die Plazenta einen entscheidenden immunmodulatorischen Beitrag. Desweiteren wird diskutiert, dass in der

Plazenta selbst Antikörper gebildet werden sollen (Kaufmann, 1994; Hunziker et Wegmann, 1987; Pschyrembel, 1994).

Aufgrund ihrer grundlegenden Bedeutung für das fetale Immunsystem und da die Plazenta meist noch frei von iatrogenen Stoffen ist, sollte untersucht werden, ob neben den bereits bekannten Peptiden weitere antimikrobielle Peptide in der Plazenta gebildet werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden antimikrobielle Peptide im Mikrodilutionsassay und im Sap-Aktivitätsassay auf ihre antimykotische Wirksamkeit untersucht, welche bei IPF PharmaCeuticals GmbH Hannover identifiziert und charakterisiert worden waren.

4.1 Das antimikrobielle Peptid humanes Hämoglobin β (111-146)

Bei dem gereinigten Peptid mit Sap-inhibitorischer Aktivität handelt es sich um ein Fragment (die Aminosäuren 111-146) des humanen Hämoglobin β . Das Peptid konnte in 6 Chromatographieschritten rein dargestellt werden. Das Proteinfragment besteht aus 36 Aminosäuren (Abb. 20) und weist ein Molekulargewicht von 3902 Da auf. Sowohl die Sequenz als auch die mit MALDI-Massenspektrometrie analysierte Masse des gereinigten Peptides stimmte mit der rechnerisch ermittelten des Proteinfragments hHEM β (111-146) überein. Hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung ist der sehr hohe Anteil an Histidin (11 mol %) auffällig. Das Protein weist einen isoelektrischen Punkt von 9,5 auf und zählt somit zu den basischen bzw. kationischen Peptiden. hHEM β (111-146) stellt das C-terminale Ende der β -Kette des Hämoglobinmoleküls dar. In diesem Bereich weist das Hämoglobinmolekül eine α -Helixstruktur auf (Protein Data Bank).

hHEM β (111-146) MW: 3902 Da

¹¹¹VCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH¹⁴⁶

Abb. 20: Aminosäuresequenz von humanem HEM β (111-146)

Aufgrund der weiteren mit MALDI detektierten Molekularmasse von 7803,9 Da wäre es denkbar, dass sich zwei Moleküle des hHem β (111-146) zusammenlagern und eine Doppelhelix-Struktur ausbilden. Die Zusammenlagerung mit der anschließenden Ausbildung einer Doppelhelix würde auch in Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus kationischer Peptidantibiotika stehen (Gräfe, 1992). hHem β (111-146) könnte, aufgrund einer Doppelhelix-Struktur, ähnlich wie andere Peptidantibiotika z. B. Magainine und Defensine

(Falla et al., 1996; Hancock et al., 1995) Kanäle in der mikrobiellen Zytoplasmamembran bilden. Gramicidine, die zu den Pentadecapeptiden zählen, durchdringen die Zytoplasmamembran und inhibieren das Wachstum von Keimen durch die Bildung von dimeren Poren. Dazu bilden zwei Moleküle eine Helixstruktur aus, die durch innere Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxyl- und den Aminogruppen sowie durch Lipidverbindungen mit den nach außen weisenden aliphatischen Resten der Antibiotika stabilisiert werden. Durch die im Innenraum der Helix befindlichen polaren Gruppen wird ein passiver Transport der Ionen durch die Membran ermöglicht (Gräfe, 1992). Dies führt zum Ausgleich des Spannungspotentials an der Membran und in der Folge zum Zusammenbruch des Energiehaushaltes der Bakterienzelle. Die ATP-Synthese kommt infolge des fehlenden Membranpotentials zum Erliegen und der Tod der Bakterienzelle ist vorprogrammiert (Saberwal et Nagaraj, 1994).

Die antimikrobielle *in vitro* Aktivität humanen Hämoglobins ist bekannt seit den Untersuchungen durch Hobson und Hirsch von 1957 (Hobson et Hirsch, 1958). Den Autoren zufolge war diese Aktivität nur unter definierten Laborbedingungen möglich und *in vivo* sehr unwahrscheinlich. Die Bedeutung von Hämoglobin als Ausgangspunkt für biologisch aktive Peptide wurde erst in den 90er Jahren bekannt (Ivanov et al., 1997). Erstmals 1999 wurde die antimikrobielle Wirkung eines Hämoglobinfragments durch Fogaca et al. nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Fogaca isolierte ein Fragment der Alpha-Kette des bovinen Hämoglobinmoleküls aus der Hämolympheflüssigkeit und dem Darminhalt der Rinderzecke *Boophilus microplus*. Sie vermuteten, dass blutsaugende Insekten das Hämoglobin ihrer Wirte nicht nur als Aminosäurequelle nutzen, sondern gleichzeitig zu ihrem eigenen Schutz vor Mikroorganismen verwenden (Fogaca et al., 1999).

Desweiteren wurde das synthetisierte Peptid auf seine minimale Hemmkonzentration hin untersucht. Die antimikrobielle Aktivität (MHK) von hHEM β (111-146) wurde bei IPF PharmaCeuticals mittels eines Mikrodilutionstests zur MHK Bestimmung ermittelt. (Anhang: Tab.16) Eine antimikrobielle Aktivität gegen *Candida albicans* konnte nicht nachgewiesen werden.

Bakterienstamm	MHK (µg/ml)
<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 12956	300
<i>Escherichia coli</i> DSM 1103	200
<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 681	150
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	200
<i>Streptococcus pneumoniae</i> DSM 11865	> 300
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1128	> 300
<i>Candida albicans</i> SC 5314	---

Tab. 16: Minimale Hemmkonzentration von hHEMβ (111-146) gegen verschiedenen Bakterien und *Candida albicans*. (Liepke et al., 2003)

hHEMβ (111-146) zeigt ein breites Wirkungsspektrum im Gram-negativen wie im Gram-positiven Bereich. Die MHK Werte von hHEMβ (111-146) (MHK 150-300 µg/ml) sind, verglichen mit den aktivsten antimikrobiellen Peptiden mit MHK Werten < 50 µg/ml, relativ hoch. Jedoch ist die Menge von hHEMβ (111-146) in humanem Plazentagewebe etwa bei 500 mg/l Plazentablut und somit in ausreichender wirksamer Konzentration vorhanden. Das gleiche Peptid hHEMβ (111-146) wurde von Liepke et al. aufgrund der antimikrobiellen Aktivität gegen *Escherichia coli* isoliert (Liepke et al., 2003).

Bis heute sind die Aminosäuresequenzen von mehr als 150 endogenen Hämoglobinfragmenten bekannt. Einige dieser Hämoglobinfragmente weisen auch eine antimikrobielle Wirkung auf. Dass Hämoglobin eine beim Menschen natürlich vorkommende Quelle antimikrobieller Peptide ist, wurde 2002 erstmals von Liepke et al. nachgewiesen. (Liepke et al., 2003). Die biologische Aktivität von Hämoglobinfragmenten weist ein breites Spektrum an regulatorischen Funktionen auf. Diese Fragmente greifen wahrscheinlich nicht nur regulierend sondern auch komplementierend in das konventionelle Hormon- und Neuromodulations-System ein (Ivanov et al., 1997).

Das reichliche Vorkommen von Hämoglobinfragmenten in verschiedenen Körpergeweben wirft die Frage nach ihrer Bildung auf. So könnte das Globin-Gen nicht nur in den roten Blutkörperchen exprimiert werden, sondern die jeweiligen Peptide könnten auch direkt innerhalb der Zellen der entsprechenden Gewebe gebildet werden. Jedoch scheint die große Menge des Hämoglobins, welches in den Erythrozyten lokalisiert ist, die wahrscheinlichste

Vorstufe für die isolierten Peptide zu sein. Dies wurde durch die Ergebnisse der Isolierung von hHEM β (111-146) aus Erythrozytenlysat von Liepke et al. bestätigt (Liepke et al., 2003).

Die chromatographische Analyse, welche von Ivanov et al. durchgeführt wurde, zeigt, dass bereits in den Erythrozyten unter nativen Bedingungen eine intensive proteolytische Degradation des Hämoglobins stattfindet. Er publizierte neben den Sequenzen der isolierten Peptide auch deren relative Konzentration in den Erythrozyten. Die Gesamtmenge der Peptide beläuft sich auf ca. 0,5 % des Hämoglobingehaltes in den roten Blutkörperchen. Aufgrund der Ergebnisse aus Versuchen mit Erythrozyten-Lysat und dem Überstand einer Erythrozytenprimärkultur schlussfolgerten Ivanov et al., dass die Freisetzung von Peptiden aus den roten Blutkörperchen durch einen proteolytischen Abbau der anfänglich in den Erythrozyten gebildeten langen Peptidsequenzen begleitet wird. Dies, so vermutet er, könnte durch membranassoziierte Proteasen erfolgen.

Aus dem humanen Kleinhirn wurde neben einer Reihe anderer Hämoglobinfragmente auch ein dem hHem β (111-146) sehr ähnliches Peptid isoliert. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren 111 bis 130 der Beta-Kette des Hämoglobins. Es wurde festgestellt, dass dieses Fragment als Marker für die Alzheimer Krankheit fungiert (Sleemmon et Flood, 1992). Die mögliche antibakterielle Wirkung dieses entsprechenden Peptids wurde allerdings nicht untersucht.

4.2 Das antimikrobielle Peptid humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (1-31)

Das Peptid hGAPDH (1-31) ist ein Fragment der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Es handelt sich um die ersten 31 N-terminalen Aminosäuren des Enzyms (Abb. 21).

hGAPDH (1-31), MG: 3188 Da

¹GKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVA³¹

Abb. 21: Aminosäuresequenz des Peptides GAPDH (1-31)

Das Peptid wurde von Liepke *et al.* IPF PharmaCeuticals aus humanem Plazentagewebe gereinigt, anschließend chemisch synthetisiert, und auf antimikrobielle Aktivität (MHK) bei verschiedenen Bakterien getestet (Tab. 17).

Bakterienstamm	MHK (µg/ml)
<i>Staphylococcus carnosum</i> TM 300	12,5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	31,25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	7,8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	100
<i>Escherichia coli</i> BL 21	7,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	62,5

Tab 17: *In vitro* MHK Testung verschiedener Bakterien mit hGAPDH (1-31). Der Mikroorganismus *E. coli* BL 21 wurde von J. Alves (Medizinische Hochschule Hannover (MHH)) zur Verfügung gestellt, *Pseudomonas aeruginosa* PAO von I. Steinmetz (MHH), und *Staph. carnosum* TM 300 von F. Goetz (Ludwig-Maximilian-Universität, München). Die ATCC-Stämme wurden erworben bei der „Deutschen Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen“ (DSZM, Braunschweig).

hGAPDH (1-31) besitzt ein weites Wirkungsspektrum sowohl gegen Gram-negative und Gram-positive Keime als auch gegen Hefen. Mit MHK Werten $< 10 \mu\text{g/ml}$ gehört es zu den wirksamsten antimikrobiellen Peptiden. Zudem war hGAPDH (1-31) das einzige Peptid, welches sowohl antimikrobielle Aktivität im Sinne einer Wachstumshemmung von *C. albicans* zeigte, als auch die Fähigkeit, die Sap dieser Hefe zu hemmen. Die Wirksamkeit dieses Peptids konnte weiterhin mittels ultrastruktureller Untersuchungen und eines *in-vitro* Schleimhaut-Kandidose-Modells bestätigt werden.

GAPDH ist ein 37 kDa großes Enzym. Es katalysiert die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat durch Reduktion von NAD^+ zu NADH, das innerhalb der Glykolyse zur Energiegewinnung im Stoffwechselkreislauf benötigt wird. Allerdings konnten in den letzten Jahren dem Enzym auch weitere Funktionen zugeschrieben werden, wie Phosphotransferase-Aktivität, eine Rolle bei der Membranfusion, beim Zell-RNA-Transport, der DNA-Replikation, und dem DNA-Reparatur-Mechanismus (Habenicht, 1997). Es konnte ein Zusammenhang zwischen GAPDH und verschiedenen Krankheiten wie altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, Prostata – Krebs und viraler Pathogenese hergestellt werden. Bei neurodegenerativen Erkrankungen kommt es zu Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen GAPDH und β -Amyloid-Precursorprotein, Huntington-Protein, Antropin und Ataxin und ihrem Rezeptor. Dies führt zu einer Verminderung der glykolytischen Aktivität des Proteins, welche Strukturveränderungen und Läsionen des Gehirns verursachen. Bei metastasierenden Zellen in der Prostata konnte eine erhöhte Expression von GAPDH im Cytoplasma festgestellt werden (Sirover, 1999). Weiterhin

konnte gezeigt werden, daß die steigende Expression von GAPDH in neuronalen wie auch nicht-neuronalen Zellen in Zusammenhang mit induzierter Apoptose dieser Zellen steht (Berry et Boulton, 2000). Der Mechanismus ist allerdings noch unklar. Es ist bekannt, daß auch Bakterien bei oben genannten Zellen Apoptose induzieren können (Ali et al., 2003). Die ansteigende Expression von GAPDH und die anschließend durch Proteolyse entstehenden Proteinfragmente könnten als Schutz der Zellen bei einem Bakterienbefall dienen.

Hessler *et al.* konnte die Bedeutung der GAPDH als kalzium-abhängiges Fusionsmolekül nachweisen, welches entscheidend an der Fusion von neutrophilen Granulozyten und der Plasmamembran beteiligt ist (Hessler et al., 1998). Neutrophile Granulozyten nehmen im Immunsystem entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung von Entzündungserkrankungen. 1982 konnte das Enzym in hohen Konzentrationen aus verschiedenen menschlichen Organen, wie Leber, Gehirn, Herz, Niere und Lunge, isoliert werden (Heinz et Freimüller, 1982). Keokitichai und Wrigglesworth zeigten, daß nach Lyse frisch entnommener Erythrozyten 73 % der GAPDH – Aktivität assoziiert mit der Membran – Fraktion gefunden wurde, während sich 27 % im Überstand befanden (Keokitichai et Wrigglesworth, 1980). Das zeigt, daß mehr als $\frac{1}{4}$ des Enzyms nach dem Absterben und Lyse der Zellen nicht mehr an die Membran gebunden ist, sondern dem Körper als freies Protein zur Verfügung steht. Dieses unterliegt der Proteolyse, bei welcher biologisch aktive Fragmente entstehen könnten, wie das hier isolierte Fragment (1-31).

Das Proteinfragment bGAPDH (104-122) besteht aus 19 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 1861 Da auf. Das Proteinfragment hat einen pI von 11,9 und zählt mit einem Anteil von 26 % an kationischen Aminosäuren zu den basischen Peptiden. In der Aminosäuresequenz sind keine Cysteinreste enthalten, das Peptid ist linear und unverbrückt. (Arndt et al., 2001)

Ein weiteres GAPDH-Fragment (1-25) konnte von Seiler *et al.* (1999) aus Schweinehirn isoliert werden, was für das Vorkommen von Protein-Fragmenten in Geweben spricht. Allerdings ist die biologische Funktion dieses Proteinfragments noch unklar.

5. Zusammenfassung

Eine der ersten Barrieren des Körpers gegen Bakterien, Pilze und Viren stellt die unspezifische angeborene Immunantwort dar. Zu den wichtigsten Vertretern der angeborenen Immunantwort zählt die Gruppe der antimikrobiellen Peptide. Diese Gruppe wird, gerade im Hinblick auf die Zunahme azolresistenter *Candida*-Stämme, immer wichtiger zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen. Weiterhin gewinnt der Hauptpathogenitätsfaktor von *Candida albicans*, die sekretorische Aspartatproteinase, an Bedeutung als therapeutischer Angriffspunkt.

Ziel dieser Dissertation war die Isolierung und Identifizierung von Peptiden aus humanem Plazentagewebe, die das Wachstum von Mikroorganismen, im speziellen von *Candida albicans*, hemmen. Desweiteren wurde ein Peptid aus humanem Plazentagewebe gereinigt, welches in der Lage ist, den Hauptpathogenitätsfaktor von *Candida albicans*, die sekretorische Aspartatproteinase zu inhibieren. Zu diesem Zweck wurde eine Peptidbank aus humanem Plazentagewebe hergestellt. Die Separation von biologisch aktiven und inaktiven Peptiden erfolgte durch Reversed-Phase und Kationenaustausch-Chromatographie, wobei die antimikrobielle Aktivität der gesammelten HPLC-Fractionen durch den Mikrodilutionstest und Sap-Inhibitionsassay überprüft wurde.

Mittels dieser Methoden war es erstmals möglich, ein Peptid zu detektieren, welches sowohl die sekretorische Aspartatproteinase von *Candida albicans* inhibiert, als auch antimikrobielle Wirksamkeit besitzt. Dieses Peptid wurde chromatographisch gereinigt und als Fragment der β -Kette des humanen Hämoglobins identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Peptid, bestehend aus den 36 C-terminalen Aminosäuren des oben genannten Hämoglobins.

Zudem wurden weitere bereits bekannte antimikrobielle Proteinfragmente mit Hilfe des Mikrodilutionstests und Sap-Inhibitionsassays auf antifungale Aktivität geprüft. Dabei wurde festgestellt, dass ein Fragment der humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, hGAPDH (1-31), sowohl das Wachstum von *Candida albicans* als auch die sekretorische

Aspartatprotease des Pilzes hemmt. Die antifungale Aktivität des Peptides konnte auf ultrastruktureller Ebene bestätigt werden. Darüber hinaus zeigt dieses Peptid eine protektive Wirkung bei der Entwicklung oraler Kandidosen. Dies konnte unter Zuhilfenahme eines *in-vitro*-Schleimhaut-Kandidose-Modells auf der Basis rekonstituierten humanen Epithels gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit identifizierten und verwendeten Proteinfragmente sind ein vermutlich wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und spielen eine wesentliche Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen. Aufgrund ihrer Eigenschaften könnten diese Peptide z.B. mittels lead structure Optimierung und molecular modeling in ihrer Wirksamkeit verbessert werden und sich zur Entwicklung neuer klinisch anwendbarer Peptidantibiotika eignen.

6. Anhang

6.1. Tabellen der Versuchsergebnisse des Sap-Inhibitionsassays

Die Werte sind Mittelwerte aus 10 Einzelergebnissen. t_0 ist die gemessene Fluoreszenz bei 490 nm sofort nach Zugabe des Renin-Substrats. t_{60} ist die Fluoreszenz nach 60 Minuten. Daneben ist die relative prozentuale Zunahme der Fluoreszenzwerte dargestellt. Diese Werte werden jeweils mit den Leerwerten (Lw), dem Fluoreszenzanstieg ohne Peptid, verglichen. „P“ steht für die jeweiligen pH-Pools der Plazenta Peptidbank und „F“ für die Fraktionen dieser Pools.

Tab. 7: Screening der Plazenta Peptidbank. Eingesetzte Äquivalentmenge 220 mg.

Peptide	t_0	t_{60}	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t_0	Lw- t_{60}
P1 F1-5	450,94	736,25	63,27	44,68	498,81	721,68
P1 F6-10	466,13	773,63	65,97	44,68	498,81	721,68
P1 F11-15	489,5	790,19	61,43	44,68	498,81	721,68
P1 F16-20	482,75	691,5	43,24	33,85	548,31	733,94
P1 F21-25	489,06	694,06	41,92	33,85	548,31	733,94
P1 F26-30	485,37	720,5	48,44	33,85	548,31	733,94
P1 F31-35	500,75	747,63	49,30	33,85	548,31	733,94
P1 F36-40	528,19	773,38	46,42	33,85	548,31	733,94
P1 F41-45	496,13	709,63	43,03	17,26	517,88	607,25
P1 F46-48	526,68	752,07	42,79	17,26	517,88	607,25
P2 F1-5	541,25	766,5	41,62	17,26	517,88	607,25
P2 F6-10	532,63	734,44	37,89	17,26	517,88	607,25
P2 F11-15	525,13	634,07	20,75	17,26	517,88	607,25
P2 F16-20	515,81	569,75	10,46	21,92	584,44	712,56
P2 F21-25	533,12	610,5	14,51	21,92	584,44	712,56
P2 F26-30	511	610,06	19,39	21,92	584,44	712,56
P2 F31-35	525,06	659,31	25,57	21,92	584,44	712,56
P2 F36-40	543,88	694,31	27,66	21,92	584,44	712,56
P2 F41-45	532,88	799,44	50,02	42,31	505,81	719,81
P2 F46-48	503,5	772,5	53,43	42,31	505,81	719,81
P3 F1-5	503,5	771,69	53,27	42,31	505,81	719,81
P3 F6-10	495,38	743,94	50,18	42,31	505,81	719,81
P3 F11-15	502	715,13	42,46	42,31	505,81	719,81
P3 F16-20	507,94	613,63	20,81	27,35	547,69	697,5
P3 F21-25	509,25	605,88	18,97	27,35	547,69	697,5
P3 F26-30	521,94	674,06	29,15	27,35	547,69	697,5
P3 F31-35	535,88	731,25	36,46	27,35	547,69	697,5

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
P3 F36-40	547,06	743,13	35,84	27,35	547,69	697,5
P3 F41-45	597	729,56	22,20	33,48	558	744,81
P3 F46-48	589,44	694,81	17,88	33,48	558	744,81
P4 F1-5	578,13	700	21,08	33,48	558	744,81
P4 F6-10	569,63	689	20,96	33,48	558	744,81
P4 F11-15	553,69	615,56	11,17	33,48	558	744,81
P4 F16-20	457,93	496,33	8,39	35,23	460	622,06
P4 F21-25	435,68	498,13	14,33	35,23	460	622,06
P4 F26-30	437,93	538,94	23,07	35,23	460	622,06
P4 F31-35	458,13	643,5	40,46	35,23	460	622,06
P4 F36-40	453,69	653,19	43,97	35,23	460	622,06
P4 F41-45	481,19	690,44	43,49	23,38	468	577,44
P4 F46-48	459,63	681,94	48,37	23,38	468	577,44
P0 F1-5	470,81	729,56	54,96	23,38	468	577,44
P0 F6-10	467,44	717,38	53,47	23,38	468	577,44
P0 F11-15	461,94	678,06	46,79	23,38	468	577,44
P0 F16-20	509,44	642,06	26,03	20,59	487,44	587,81
P0 F21-25	506,69	628,5	24,04	20,59	487,44	587,81
P0 F26-30	478,69	604,69	26,32	20,59	487,44	587,81
P0 F31-35	480,44	615,44	28,10	20,59	487,44	587,81
P0 F36-40	475,81	610,44	28,29	20,59	487,44	587,81
P0 F41-45	580,12	746,44	28,67	26,31	538,19	679,81
P0 F46-48	570,69	727,75	27,52	26,31	538,19	679,81

Tab. 8: Sap-Aktivitätsassay der Plazenta-Pool Einzelfractionen, Äquivalentmenge 220mg.

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
P2 F16	594,88	632,31	6,29	21,98	573,38	699,43
P2 F17	566,44	630,38	11,29	21,98	573,38	699,43
P2 F18	561,13	622,31	10,90	21,98	573,38	699,43
P2 F19	551,75	608,56	10,30	21,98	573,38	699,43
P2 F20	548,69	595,13	8,46	21,98	573,38	699,43
P2 F21	583,73	653,4	11,94	21,12	561,69	680,31
P2 F22	560,25	611,69	9,18	21,12	561,69	680,31
P2 F23	543,31	616,44	13,46	21,12	561,69	680,31
P2 F24	543,69	645,56	18,74	21,12	561,69	680,31
P2 F25	585	656,94	12,30	21,12	561,69	680,31
P4 F21	545,87	523,31	-4,13	20,94	550,75	666,06
P4 F22	537,75	532,75	-0,93	20,94	550,75	666,06
P4 F23	532,25	547,75	2,91	20,94	550,75	666,06
P4 F24	540,75	561,18	3,78	20,94	550,75	666,06
P4 F25	559,44	608,62	8,79	20,94	550,75	666,06
P4 F26	537,56	566,13	5,31	22,02	537	655,25
P4 F27	543,94	592	8,84	22,02	537	655,25
P4 F28	526,19	631,88	20,09	22,02	537	655,25

P4 F29	533,25	655,69	22,96	22,02	537	655,25
P4 F30	543,06	676,19	24,51	22,02	537	655,25

Tab. 9: Plazenta, Pool 4, Fr. 21, Nr. 1- 46, mit je 1,76 g Äquivalentmenge

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
1	552,5	682	23,44	22,19	529,56	647,06
2	547	674,71	23,35	22,19	529,56	647,06
3	534,38	671,63	25,68	22,19	529,56	647,06
4	519,75	675,62	29,99	22,19	529,56	647,06
5	535,12	676,14	26,35	22,19	529,56	647,06
6	517,63	661	27,70	22,19	529,56	647,06
7	545,38	683,71	25,36	22,19	529,56	647,06
8	539,63	686,63	27,24	22,19	529,56	647,06
9	532,75	677	27,08	22,19	529,56	647,06
10	566,5	683,43	20,64	22,19	529,56	647,06
11	512,5	593,88	15,88	17,26	505,71	593
12	512,13	613,63	19,82	17,26	505,71	593
13	503,38	595,62	18,32	17,26	505,71	593
14	489	589	20,45	17,26	505,71	593
15	501,88	612,13	21,97	17,26	505,71	593
16	498,25	619	24,23	17,26	505,71	593
17	496,13	612,38	23,43	17,26	505,71	593
18	521,75	625	19,79	17,26	505,71	593
19	525,63	612,63	16,55	17,26	505,71	593
20	504,5	592,5	17,44	17,26	505,71	593
21	493	642,63	30,35	25,90	495,94	624,38
22	486,38	604,5	24,29	25,90	495,94	624,38
23	476,75	549,25	15,21	25,90	495,94	624,38
24	477,62	532,88	11,57	25,90	495,94	624,38
25	480,38	508,13	5,78	25,90	495,94	624,38
26	460,71	501	8,75	25,90	495,94	624,38
27	482,88	509,25	5,46	25,90	495,94	624,38
28	507,75	530,57	4,49	25,90	495,94	624,38
29	502,5	542,5	7,96	25,90	495,94	624,38
30	497,5	543	9,15	25,90	495,94	624,38
31	522,25	514,88	-1,41	19,15	519,06	618,44
32	506,38	499,38	-1,38	19,15	519,06	618,44
33	510,5	590,38	15,65	19,15	519,06	618,44
34	504,25	579,5	14,92	19,15	519,06	618,44
35	519,88	585,88	12,70	19,15	519,06	618,44
36	495,29	555,5	12,16	19,15	519,06	618,44
37	503,63	555,88	10,37	19,15	519,06	618,44
38	528,75	555,88	5,13	19,15	519,06	618,44
39	515,43	609,43	18,24	19,15	519,06	618,44
40	520,63	589,63	13,25	19,15	519,06	618,44
41	561,75	686,25	22,16	22,88	562,25	690,88
42	573,75	654,5	14,07	22,88	562,25	690,88

43	550	595,13	8,21	22,88	562,25	690,88
44	559	678,25	21,33	22,88	562,25	690,88
45	562,25	707	25,74	22,88	562,25	690,88
46	544	682	25,37	22,88	562,25	690,88

Tab. 10: Plazenta, Pool 4, Fr. 21, Rechromatographie Fr. 31/32, Äquivalentmenge 1,76 g.

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
1	575	740	28,70	33,82	558,47	747,33
2	564,88	742,25	31,40	33,82	558,47	747,33
3	551	746,13	35,41	33,82	558,47	747,33
4	556,25	766,5	37,80	33,82	558,47	747,33
5	556,75	776	39,38	33,82	558,47	747,33
6	552,88	729,75	31,99	33,82	558,47	747,33
7	560,63	735,88	31,26	33,82	558,47	747,33
8	554,86	731	31,74	33,82	558,47	747,33
9	573	756	31,94	33,82	558,47	747,33
10	561,43	740	31,81	33,82	558,47	747,33
11	544,38	711,75	30,75	30,20	545,88	710,75
12	542	705,25	30,12	30,20	545,88	710,75
13	533,75	695,63	30,33	30,20	545,88	710,75
14	523,38	690,63	31,96	30,20	545,88	710,75
15	534	713,88	33,69	30,20	545,88	710,75
16	528,63	720,25	36,25	30,20	545,88	710,75
17	531,63	694,25	30,59	30,20	545,88	710,75
18	534,63	710,38	32,87	30,20	545,88	710,75
19	542	741,43	36,80	30,20	545,88	710,75
20	551,38	710,25	28,81	30,20	545,88	710,75
21	533,13	596,88	11,96	19,97	527,8	633,2
22	524,5	608,5	16,02	19,97	527,8	633,2
23	523,38	600,88	14,81	19,97	527,8	633,2
24	522,75	626,25	19,80	19,97	527,8	633,2
25	516,63	577,5	11,78	19,97	527,8	633,2
26	513,13	549,88	7,16	19,97	527,8	633,2
27	533,88	559,75	4,85	19,97	527,8	633,2
28	535	572,5	7,01	19,97	527,8	633,2
29	559,13	637,25	13,97	19,97	527,8	633,2
30	542,13	637,75	17,64	19,97	527,8	633,2
31	553,25	693,25	25,31	25,06	531,81	665,06
32	562,25	705	25,39	25,06	531,81	665,06
33	536,25	677,5	26,34	25,06	531,81	665,06
34	537	686,13	27,77	25,06	531,81	665,06
35	527,75	682,13	29,25	25,06	531,81	665,06
36	521,88	664,75	27,38	25,06	531,81	665,06
37	554,13	704,13	27,07	25,06	531,81	665,06
38	530,38	681,38	28,47	25,06	531,81	665,06

39	545,13	685,75	25,80	25,06	531,81	665,06
40	543,25	669,63	23,26	25,06	531,81	665,06
41	553,57	636,71	15,02	13,05	558	630,81
42	560	648,57	15,82	13,05	558	630,81

Tab.11: Plazenta, Pool 4, Fr. 21, 3. Aufreinigungsstufe, Äquivalentmenge 3,5 g

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
1	547,38	641,63	17,22	18,07	516,31	609,63
2	517,88	631,13	21,87	18,07	516,31	609,63
3	520,13	627,75	20,69	18,07	516,31	609,63
4	503,25	608,13	20,84	18,07	516,31	609,63
5	500,75	608,38	21,49	18,07	516,31	609,63
6	498,13	611,75	22,81	18,07	516,31	609,63
7	520,5	617,25	18,59	18,07	516,31	609,63
8	522,13	617	18,17	18,07	516,31	609,63
9	521,25	622,63	19,45	18,07	516,31	609,63
10	515,25	616,38	19,63	18,07	516,31	609,63
11	564,88	671,38	18,85	18,89	560,63	666,56
12	583,88	698,63	19,65	18,89	560,63	666,56
13	563,38	681,13	20,90	18,89	560,63	666,56
14	556	673,38	21,11	18,89	560,63	666,56
15	573,5	694,25	21,05	18,89	560,63	666,56
16	562,88	687,63	22,16	18,89	560,63	666,56
17	560,25	675,25	20,53	18,89	560,63	666,56
18	549	684,25	24,64	18,89	560,63	666,56
19	575,25	709	23,25	18,89	560,63	666,56
20	569	701,63	23,31	18,89	560,63	666,56
21	586,25	754,25	28,66	27,43	550,56	701,56
22	569	689,17	21,12	27,43	550,56	701,56
23	548	569,5	3,92	27,43	550,56	701,56
24	574,63	735,5	28,00	27,43	550,56	701,56
25	566,88	743	31,07	27,43	550,56	701,56
26	555,75	707,63	27,33	27,43	550,56	701,56
27	571,13	749,63	31,25	27,43	550,56	701,56
28	559,63	716,13	27,96	27,43	550,56	701,56
29	552,86	709,71	28,37	27,43	550,56	701,56
30	575	707,88	23,11	27,43	550,56	701,56
31	546,38	643,63	17,80	20,52	533,69	643,19
32	541,5	649,13	19,88	20,52	533,69	643,19
33	528,13	653,38	23,72	20,52	533,69	643,19
34	516,88	642,38	24,28	20,52	533,69	643,19
35	521,38	632,75	21,36	20,52	533,69	643,19
36	513	640,5	24,85	20,52	533,69	643,19
37	524	632,13	20,64	20,52	533,69	643,19
38	541,5	659,25	21,75	20,52	533,69	643,19
39	547,63	668,25	22,03	20,52	533,69	643,19
40	547,38	668,63	22,15	20,52	533,69	643,19

41	460,5	621,63	34,99	31,19	468,13	614,13
42	480,75	665,25	38,38	31,19	468,13	614,13

Tab. 12: Plazenta, SAP23, Äquivalentmenge 11g.

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
1	519,63	706,25	35,91	34,46	516	693,81
2	525,75	710,5	35,14	34,46	516	693,81
3	500,25	699,13	39,76	34,46	516	693,81
4	502,5	700,38	39,38	34,46	516	693,81
5	498	690,63	38,68	34,46	516	693,81
6	487,87	670,5	37,43	34,46	516	693,81
7	513,13	695,38	35,52	34,46	516	693,81
8	525,38	706,75	34,52	34,46	516	693,81
9	491,25	678,25	38,07	34,46	516	693,81
10	518,38	690,5	33,20	34,46	516	693,81
11	556,86	732	31,45	24,00	546,73	677,94
12	545,5	692,88	27,02	24,00	546,73	677,94
13	525,63	689,13	31,11	24,00	546,73	677,94
14	530,38	690	30,10	24,00	546,73	677,94
15	527,75	685,5	29,89	24,00	546,73	677,94
16	511,75	655,88	28,16	24,00	546,73	677,94
17	515,75	658,75	27,73	24,00	546,73	677,94
18	545,13	701,88	28,75	24,00	546,73	677,94
19	536,88	687,5	28,05	24,00	546,73	677,94
20	556,25	690,5	24,13	24,00	546,73	677,94
21	511,38	654,57	28,00	26,69	528,5	669,56
22	531,13	646,13	21,65	26,69	528,5	669,56
23	507,88	648	27,59	26,69	528,5	669,56
24	519,25	676,13	30,21	26,69	528,5	669,56
25	520,88	668,38	28,32	26,69	528,5	669,56
26	499,25	621,63	24,51	26,69	528,5	669,56
27	555,75	668,63	20,31	26,69	528,5	669,56
28	521,25	621,13	19,16	26,69	528,5	669,56
29	525,5	620,75	18,13	26,69	528,5	669,56
30	524,63	616,5	17,51	26,69	528,5	669,56
31	512,25	692,75	35,24	40,29	536,75	753
32	510,88	669,13	30,98	40,29	536,75	753
33	525,75	665	26,49	40,29	536,75	753
34	514,88	634,25	23,18	40,29	536,75	753
35	504,5	623,13	23,51	40,29	536,75	753
36	506,38	646,5	27,67	40,29	536,75	753
37	508,75	618,25	21,52	40,29	536,75	753
38	509,88	676,5	32,68	40,29	536,75	753
39	512,88	730,5	42,43	40,29	536,75	753
40	522,88	688	31,58	40,29	536,75	753
41	508	622,13	22,47	21,88	496,31	604,88
42	537,25	736,75	37,13	21,88	496,31	604,88

43	487,25	664,5	36,38	21,88	496,31	604,88
44	484,25	635,5	31,23	21,88	496,31	604,88
45	478,5	608,25	27,12	21,88	496,31	604,88
46	481	608,38	26,48	21,88	496,31	604,88
47	480,75	600,57	24,92	21,88	496,31	604,88
48	497,75	632,25	27,02	21,88	496,31	604,88
49	488,63	627,25	28,37	21,88	496,31	604,88
50	500,88	626,25	25,03	21,88	496,31	604,88
51	502,38	675,75	34,51	28,65	507,44	652,81
52	495,75	684,88	38,15	28,65	507,44	652,81
53	499,75	695,75	39,22	28,65	507,44	652,81
54	482,13	665,38	38,01	28,65	507,44	652,81
55	483,38	668,5	38,30	28,65	507,44	652,81
56	480,13	663	38,09	28,65	507,44	652,81
57	482,25	682,38	41,50	28,65	507,44	652,81
58	490	687,5	40,31	28,65	507,44	652,81
59	495	715,63	44,57	28,65	507,44	652,81
60	496,38	684,88	37,97	28,65	507,44	652,81
61	484,38	590,25	21,86	18,17	513,44	606,75
62	502,25	601,5	19,76	18,17	513,44	606,75
63	498,63	619,38	24,22	18,17	513,44	606,75
64	499,25	607,25	21,63	18,17	513,44	606,75
65	489	610,5	24,85	18,17	513,44	606,75
66	489,5	611,63	24,95	18,17	513,44	606,75
67	483,75	598,75	23,77	18,17	513,44	606,75
68	489,5	599,5	22,47	18,17	513,44	606,75
69	503,75	620	23,08	18,17	513,44	606,75
70	523,63	629,75	20,27	18,17	513,44	606,75
71	522,88	720,88	37,87	34,46	508,25	683,38
72	512,5	706,5	37,85	34,46	508,25	683,38
73	507,88	693,63	36,57	34,46	508,25	683,38
74	495,13	695,88	40,54	34,46	508,25	683,38
75	501,13	704,13	40,51	34,46	508,25	683,38
76	507,88	678,5	33,59	34,46	508,25	683,38
77	502,63	694,25	38,12	34,46	508,25	683,38
78	511,88	701,75	37,09	34,46	508,25	683,38
79	519,25	705	35,77	34,46	508,25	683,38
80	520,88	710,63	36,43	34,46	508,25	683,38
81	512,63	714,5	39,38	28,04	506,38	648,38
82	501,88	667	32,90	28,04	506,38	648,38
83	493,25	669,57	35,75	28,04	506,38	648,38
84	470,25	637,25	35,51	28,04	506,38	648,38

Tab. 13: Plazenta, Rechromatographie Fr. 37, SAP23, Äquivalentmenge 60g

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
1	449,13	649,5	44,61	48,99	467,06	695,88
2	444,63	645,75	45,23	48,99	467,06	695,88
3	446	629,63	41,17	48,99	467,06	695,88
4	439,63	655,75	49,16	48,99	467,06	695,88
5	441	628,5	42,52	48,99	467,06	695,88
6	441,75	644,75	45,95	48,99	467,06	695,88
7	465	657,88	41,48	48,99	467,06	695,88
8	450	624	38,67	48,99	467,06	695,88
9	441,75	620	40,35	48,99	467,06	695,88
10	471,25	674,38	43,10	48,99	467,06	695,88
11	490,5	678,43	38,31	29,02	483,44	623,75
12	499,88	658	31,63	29,02	483,44	623,75
13	486,38	657,75	35,23	29,02	483,44	623,75
14	515,75	755,25	46,44	29,02	483,44	623,75
15	477,75	675,25	41,34	29,02	483,44	623,75
16	477,25	674,13	41,25	29,02	483,44	623,75
17	498,13	698	40,12	29,02	483,44	623,75
18	483	655,75	35,77	29,02	483,44	623,75
19	479,63	676	40,94	29,02	483,44	623,75
20	498,63	679,88	36,35	29,02	483,44	623,75
21	437,13	656,5	50,18	49,46	464	693,5
22	437,5	662,29	51,38	49,46	464	693,5
23	433,25	666,25	53,78	49,46	464	693,5
24	433,5	660,13	52,28	49,46	464	693,5
25	445,13	670,38	50,60	49,46	464	693,5
26	477,63	698,38	46,22	49,46	464	693,5
27	496	707,13	42,57	49,46	464	693,5
28	449,25	686,63	52,84	49,46	464	693,5
29	463,13	677,5	46,29	49,46	464	693,5
30	449,5	631,86	40,57	49,46	464	693,5
31	479,38	609,13	27,07	36,86	438,88	600,63
32	485,13	640,75	32,08	36,86	438,88	600,63

33	476	639,13	34,27	36,86	438,88	600,63
34	462,38	642	38,85	36,86	438,88	600,63
35	465	638,13	37,23	36,86	438,88	600,63
36	483	632,75	31,00	36,86	438,88	600,63
37	474,75	661,38	39,31	36,86	438,88	600,63
38	470,63	668,25	41,99	36,86	438,88	600,63
39	480,38	648,75	35,05	36,86	438,88	600,63
40	481,13	628,86	30,70	36,86	438,88	600,63
41	476,71	560,38	17,55	45,01	472,07	684,56
42	476,43	552,5	15,97	45,01	472,07	684,56
43	476,14	627,63	31,82	45,01	472,07	684,56
44	487	646,63	32,78	45,01	472,07	684,56
45	465,71	617,5	32,59	45,01	472,07	684,56
46	475	659,88	38,92	45,01	472,07	684,56
47	492,14	673,63	36,88	45,01	472,07	684,56
48	500,29	709,13	41,74	45,01	472,07	684,56
49	508,71	696,13	36,84	45,01	472,07	684,56
50	500,29	694,88	38,90	45,01	472,07	684,56
51	472,13	650,63	37,81	34,74	463,31	624,25
52	475,13	666	40,17	34,74	463,31	624,25
53	454,25	638,25	40,51	34,74	463,31	624,25
54	466,38	635,75	36,32	34,74	463,31	624,25
55	461,5	643,5	39,44	34,74	463,31	624,25

Tab. 14: Plazenta, SAP41F, Äquivalentmenge 250 mg

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
1	584	692,75	18,62	19,34	548,38	654,44
2	595,63	693,75	16,47	19,34	548,38	654,44
3	585,63	707,38	20,79	19,34	548,38	654,44
4	560,63	671,38	19,75	19,34	548,38	654,44
5	585	684,5	17,01	19,34	548,38	654,44
6	565,13	662,25	17,19	19,34	548,38	654,44
7	569,75	677,25	18,87	19,34	548,38	654,44
8	576,38	672,13	16,61	19,34	548,38	654,44
9	577,25	671,88	16,39	19,34	548,38	654,44
10	570	675,29	18,47	19,34	548,38	654,44
11	540	677,75	25,51	25,71	510,25	641,44
12	564,5	689,38	22,12	25,71	510,25	641,44

13	553,5	685,63	23,87	25,71	510,25	641,44
14	547,38	658	20,21	25,71	510,25	641,44
15	550,25	688,63	25,15	25,71	510,25	641,44
16	564,5	704,25	24,76	25,71	510,25	641,44
17	575,38	717,75	24,74	25,71	510,25	641,44
18	569,88	693,25	21,65	25,71	510,25	641,44
19	574,88	661,63	15,09	25,71	510,25	641,44
20	550,88	601,88	9,26	25,71	510,25	641,44
21	516,88	532,5	3,02	22,04	494	602,88
22	546,38	627,88	14,92	22,04	494	602,88
23	533,75	640,25	19,95	22,04	494	602,88
24	550,38	654,13	18,85	22,04	494	602,88
25	541,88	661,63	22,10	22,04	494	602,88
26	578,88	697,75	20,53	22,04	494	602,88
27	570	681,25	19,52	22,04	494	602,88
28	580	666,63	14,94	22,04	494	602,88
29	582,25	694,25	19,24	22,04	494	602,88
30	574,25	661	15,11	22,04	494	602,88
31	516	595,88	15,48	34,51	497,63	669,38
32	503,63	597,13	18,57	34,51	497,63	669,38
33	518,75	674,38	30,00	34,51	497,63	669,38
34	526,88	736,75	39,83	34,51	497,63	669,38
35	514,5	709,38	37,88	34,51	497,63	669,38
36	532,75	729,75	36,98	34,51	497,63	669,38
37	525	716,75	36,52	34,51	497,63	669,38
38	531,38	708,25	33,29	34,51	497,63	669,38
39	537,75	737,75	37,19	34,51	497,63	669,38
40	535,17	722	34,91	34,51	497,63	669,38
41	478,71	737	53,96	44,34	451,06	651,06
42	475,88	706,63	48,49	44,34	451,06	651,06
43	474,13	690,13	45,56	44,34	451,06	651,06
44	487,88	694,75	42,40	44,34	451,06	651,06
45	467,63	715,15	52,93	44,34	451,06	651,06

Tab. 15: hHEM β (111-146) Sap-Inhibitionsassay

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
0,1 μ g/ml	511,5	693,88	35,66	38,67	465,13	645
1 μ g/ml	490,69	684,13	39,42	38,67	465,13	645
10 μ g/ml	462,5	643,5	39,14	38,67	465,13	645
50 μ g/ml	490,5	642,63	31,02	38,67	465,13	645
100 μ g/ml	470,38	559,38	18,92	38,67	465,13	645
200 μ g/ml	511,44	506,25	-1,01	12,15	476,38	534

Tab. 18: Synthetisierte Peptide, 150 µg/ml

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
HNP - 2	572,31	743,88	29,98	26,31	538,19	679,81
Lysozym	576,88	704	22,04	26,31	538,19	679,81
HGAP	534,88	546	2,08	26,31	538,19	679,81
BHA	518,06	728,73	40,67	19,03	533	634,44
B22A	502,19	704	40,19	19,03	533	634,44
B21A	522,31	670,06	28,29	19,03	533	634,44
B20A	530,75	656	23,60	19,03	533	634,44

Tab. 19: hGAPDH (1-31) Sap-Inhibitionsassay

Peptide	t ₀	t ₆₀	Zunahme in %	Lw-Zunahme in %	Lw- t ₀	Lw- t ₆₀
200 mg/ml	441,2	450,7	2,15	37,93	436,3	601,8
100 mg/ml	438,8	466,5	6,31	37,93	436,3	601,8
50 mg/ml	432,2	486,7	12,61	37,93	436,3	601,8
25 mg/ml	429,2	507,2	18,17	37,93	436,3	601,8
12,5 mg/ml	451,1	577,8	28,09	37,93	436,3	601,8

7. Abkürzungsverzeichnis

Å	= Angström-Einheit
Abb	= Abbildung
ACN	= Acetonitril
AP	= Antimikrobielles Peptid
bzw.	= beziehungsweise
CHC	= α -Cyano-4-hydroxycimtsäure
cm	= Zentimeter
CO ₂	= Kohlendioxid
d	= Tag
Da	= Dalton
DHAS	= Dehydroepiandrosteronsulfat
DMSO	= Dimethylsulfoxid
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
FM	= Fließmittel
g	= ¹⁾ Gramm = ²⁾ Gravitationskonstante mit 9,81 m/s ²
h	= Stunde
Hac	= Essigsäure
hCG	= humanes Choriongonadotropin
HCL	= Salzsäure
hGAPDH	= humane Glyceryl-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
hHEM β	= Beta Kette des humanen Hämoglobins
HNP	= Humanes neutrophiles Peptid
HPLC	= High Performance Liquid Chromatography
KatEx	= Kationenaustausch-Chromatographie
KCl	= Kaliumchlorid
kDa	= Kilodalton
KH ₂ PO ₄	= Kaliumdihydrogenphosphat
kV	= Kilovolt
l	= Liter
λ	= Wellenlänge
LDL	= Low Density Lipoprotein

M	= Molar
MALDI-TOF	= Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
max	= Maximal
MeOH	= Methanol
MG	= Molekulargewicht
mg	= Milligramm
µg	= Mikrogramm
MHK	= Minimale Hemmkonzentration
min	= Minuten
ml	= Milliliter
µA	= Mikroampere
µl	= Mikroliter
mm	= Millimeter
µm	= Mikrometer
mRNA	= messenger Ribonukleinsäure
mS	= Millisiemens
NaAc	= Natriumacetat
NaCl	= Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	= Natriumdihydrogenphosphat
nl	= Nanoliter
nm	= Nanometer
RPC	=Reversed-Phase-Chromatographie
rpm	= revolution per minute
s	= Sekunden
Sap	= Sekretorische Aspartatproteasen (Isoenzyme)
Tab	= Tabelle
TFA	= Trifluoressigsäure
TSB	= Tryptic Soy Broth
U	= Unit
u.a.	= unter anderem
UV	= Ultraviolett
VE	= vorentsalzt
z.B.	= zum Beispiel

8. Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1:** Struktur der Peptide: A: HBD1; B: HBD2; C: HBD3
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung möglicher Virulenzfaktoren von *Candida albicans* (nach Morschhäuser et al., 1997)
- Abbildung 3:** Dendrogramm der *SAP* Gen-Familie (nach Hube et al., 1996).
- Abbildung 4:** Expression der *SAP*-Gen-Familie (*SAP1-8*) von *C. albicans*. *SAP1* und *SAP3* werden vor allem während des phänotypischen switchings reguliert. *SAP2* ist das dominante Gen der Hefeform in allen Medien mit Protein als einziger Stickstoffquelle. Die Gene *SAP4-6* werden ausschließlich während des Übergangs von der Hefe- zur Myzelform exprimiert. *SAP8* ist temperatur-reguliert und wird überwiegend bei 25 °C transkribiert. Transkripte von *SAP7* wurden mit Hilfe der Northern-Blot-Technik bisher nicht nachgewiesen. (Hube, 1994) Die konstitutive Expression der beiden mutmaßlichen regulatorischen Protease-Gene *SAP9* und *SAP10* (Felk, 1999) ist nicht dargestellt.
- Abbildung 5:** Spektrum, das den Überlappungsbereich der Absorption von DABCYL mit der Fluoreszenz des EDANS zeigt.
- Abbildung 6:** Eichkurve von Reninsubstrat (R-2931)
- Abbildung 7:** Herstellung der Placenta-Peptidbank. (A) Zur Kationenaustausch-Chromatographie von 11 kg humaner Placenta wurden Puffer mit ansteigendem pH-Wert eingesetzt (8,3 l Säule, Vantage, TSK SP 650 M). Die pH-Pools wurden durch RP-HPLC fraktioniert. (B) - (F) zeigen die RP-Chromatogramme (RP C15 Source, 125 x 200 mm, 15 µm, Pharmacia, Freiburg) der einzelnen pH-Pools. 42 Fraktionen wurden pro pH-Pool gesammelt und lyophilisiert. Diese Fraktionen bilden die Placenta-Peptidbank.

- Abbildung 8:** Initiales Screening der Plazenta Peptidbank auf antimykotische Substanzen. 220 mg Gewebeäquivalent der 48 gepoolten Fraktionen der einzelnen pH-Pools wurden im Mikrodilutionstest auf antimikrobielle Aktivität untersucht. „P“ ist der pH-Pool, „F“ sind die Fraktionen. In Verdünnungsstufe 2 wurden 110 mg Gewebeäquivalent und in Verdünnungsstufe 3, 55 mg Gewebeäquivalent eingesetzt.
- Abbildung 9:** Antimykotische Aktivität von ausgewählten Peptidbank-Fraktionen nach Hydrolyse durch die Protease Subtilisin.
- Abbildung 10:** Reinigung antimikrobieller Peptide aus der Plazenta-Peptidbank. Die Balken zeigen zeigen die antimikrobielle Aktivität der Fraktionen. Die Fraktionen mit höchster Aktivität wurden jeweils für die weitere Aufreinigung genutzt.
- Abbildung 11:** Screening des pH-Pool 4 der Plazenta-Peptidbank. Die Balken zeigen die relative Sap Inhibition. Plazentaäquivalentmenge 220 mg.
- Abbildung 12:** Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reinigungsverfahrens für Sap-Inhibitorische Peptide.
- Abbildung 13:** Reinigung des Sap-Inhibitorischen Peptides hHEM β (111 – 146) aus der Plazenta-Peptidbank. Die Balken zeigen die relative Inhibition der Fraktionen an. Die Fraktionen mit Beschriftung wurden für die weitere Isolierung genutzt.
- Abbildung 14:** Prozentuale Sap - Hemmung durch hHEM β (111-146). Konzentrations-Wirkungsverhalten. Jeder Punkt representiert den arithmetischen Mittelwert aus 10 Versuchen. Die ED₅₀ liegt bei ca. 95 μ g/ml.
- Abbildung 15:** Testung antimikrobieller Peptide auf antifungale Aktivität im Mikrodilutionstest. Initial wurde eine Konzentration von 125 μ g/ml des zu untersuchenden Peptides, verwendet. In den jeweiligen

Verdünnungsstufen wurde, ausgehend von der Anfangskonzentration, 1 : 2 verdünnt.

Abbildung 16: Relative Sap-Inhibition durch antimikrobielle Peptide. Eingesetzte Konzentration 150 µg/ml.

Abbildung 17: Prozentuale Sap-Hemmung durch hGAPDH (1-31). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung aus 10 Testergebnissen.

Abbildung 18: **A:** Elektronenmikroskopie von *Candida albicans* Zellen ohne antimikrobielles Peptid. Kultiviert in TSB Medium für 24h. Physiologische Morphologie. Vergrößerung 7200x.
B: Elektronenmikroskopie von *C. albicans*, behandelt mit 125 µg/ml hGAPDH (1-31). Zentrale Vakuole (Pfeil). Vergrößerung 1700x.

Abbildung 19: **A:** Lichtmikroskopie am Modell der oralen Kandidose, ohne hGAPDH (1-31), 18 h nach Infektion mit *Candida albicans* SC 5314. Hohe Zellzahl, multiple Vakuolen, Ödem, Invasion aller Strata. Vergrößerung 400x.
B: Lichtmikroskopie am Modell der oralen Kandidose, mit 125 µg/ml hGAPDH (1-31), 18h nach Infektion. Niedrigere Hefezellzahl, sehr geringes Ödem, Schleimhaut als weitgehend intakte Barriere. Vergrößerung 400x.

Abbildung 22: Aminosäuresequenz von humanem HEMβ (111-146).

Abbildung 23: Aminosäuresequenz des Peptides GAPDH (1-31).

9. Verzeichnis der Tabellen

- Tabelle 1:** Strukturelle Gruppen kationischer, antimikrobieller Peptide.
- Tabelle 2:** Zusammensetzung der Puffer, die für die Kationenaustausch-Chromatographie bei der Herstellung der Placenta-Peptidbank verwendet wurden.
- Tabelle 3:** RP-Chromatographiesäulen, die für die Isolierung antimikrobieller Peptide verwendet wurden.
- Tabelle 4:** Elutionspuffer, die für die Reinigung von antimikrobiellen Peptiden verwendet wurden.
- Tabelle 5:** KatEx-Chromatographiesäulen, die für die Isolierung der Antimikrobiellen Peptide verwendet wurden.
- Tabelle 6:** Elutionspuffer, die für die Isolierung der antimikrobiellen Peptide verwendet wurden.
- Tabelle 7:** Screening der Plazenta Peptidbank. Eingesetzte Äquivalentmenge 220 mg.
- Tabelle 8** Sap-Aktivitätsassay der Plazenta-Pool Einzelfractionen, Äquivalentmenge 220mg.
- Tabelle 9:** Sap-Test Plazenta, Pool 4, Fr. 21, Nr. 1- 46, mit je 1,76 g Äquivalentmenge
- Tabelle 10:** Sap-Test Plazenta, Pool 4, Fr. 21, Rechromatographie Fr. 31/32, Äquivalentmenge 1,76 g.
- Tabelle 11:** Sap-Test Plazenta, Pool 4, Fr. 21, 3. Aufreinigungsstufe, Äquivalentmenge 3,5 g.
- Tabelle 12:** Sap-Test Plazenta, SAP23, Äquivalentmenge 11g.

- Tabelle 13:** Sap-Test Plazenta, Rechromatographie Fr. 37, SAP23, Äquivalentmenge 60g.
- Tabelle 14:** Sap-Test Plazenta, SAP41F, Äquivalentmenge 250 mg.
- Tabelle 15:** hHEM β (111-146) Sap-Inhibitionsassay.
- Tabelle 16:** Minimale Hemmkonzentration von hHEM β (111-146) bei verschiedenen Bakterien und *Candida albicans* (Liepke, 2003).
- Tabelle 17:** *In vitro* MHK Testung verschiedener Bakterien mit hGAPDH (1-31). Der Mikroorganismus *E. coli* BL 21 wurde von J. Alves (Medizinische Hochschule Hannover (MHH)) zur Verfügung gestellt, *Pseudomonas aeruginosa* PAO von I. Steinmetz (MHH), und *Staph. carnosum* TM 300 von F. Goetz (Ludwig-Maximilian-Universität, München). Die ATCC-Stämme wurden erworben bei der „Deutschen Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen“ (DSZM, Braunschweig).
- Tabelle 18:** Synthetisierte Peptide, 150 μ g/ml. Sap-Inhibitionsassay.
- Tabelle 19:** hGAPDH (1-31) Sap-Inhibitionsassay.

10. Literaturverzeichnis

- Ali F**, Lee ME, Ianelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Read RC, Dockrell DH (2003) *Streptococcus pneumoniae*-associated human macrophage apoptosis after bacterial internalization via complement and Fc γ receptors correlates with intracellular bacterial load. *J Infect Dis* 188: 1119-1131
- Anderson ML**, Odds FC (1985) Adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelia: significance of morphological form and effect of ketoconazole. *Mycoses* 28: 531-540
- Andreu D**, Rivas L (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433
- Arai T**, Mikami Y, Yokoyami K (1977) Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils. *Sabouraudia* 15: 171-177
- Arndt S** (2001) Isolierung und Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden aus Kalbsthymus. *Chem. Diss. Hannover, Deutschland*
- Banerjee A**, Datta G, Datta A (1991). Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*.137: 2455-2461
- Barrett KB**, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenesis of yeasts. *J Gen Microbiol* 131: 1217-1221
- Beck-Sague CM**, Jarvis WR (1993) The National Nosocomial Infections Surveillance System: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980 – 1990. *J Infect Dis* 167: 1247-1251
- Bellamy W**, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M (1993) Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol* 182: 97-105
- Berry MD**, Boulton AA (2000) Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase and apoptosis. *J Neurosci Res* 60: 150-154
- Biragyn A**, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW (2001) Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 167: 6644-6653
- Bodey GP** (1966) Fungal infections complicating acute leukemia. *J Chron Dis* 19: 667-687

- Boman** HG (1995) Peptide antibiotics and their role in the innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 61-92
- Borg** M, Rüchel R (1988) Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 56: 626-631
- Borg-von Zepelin** M, Eucker J, Rüchel R (1997) Beteiligung sekretorischer Candida-Proteinasen an der Adhärenz von *Candida tropicalis* Blastokonidien im Zellkultur-Modell. *Mycoses* 40: 64-72
- Borg-von Zepelin** M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* 28: 543-554
- Bross** J, Talbott GH, Maislin G, Hurwitz S, Strom BL (1989) Risk factors for nosocomial candidemia: a case-control study. *Am J Med* 87: 614-620
- Bush** K, Macielag M (2000) New approaches in the treatment of bacterial infections. *Curr Opin Chem Biol* 4: 433-9.
- Capobianco** JO, Lerner CG, Goldman RC (1992) Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of *Candida albicans* aspartic proteinase. *Anal Biochem* 204: 96-102
- Calderone** RA, Braun P (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55: 1-20
- Casey** LC (2000) Immunologic response to infection and its role in septic shock. *Crit Care Clin* 16: 193-213
- Cassone** A, De Bernardis F, Mondello F, Cedia T, Agatensi L (1987) Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 156: 777-783
- Chen** J, Falla TJ, Liu H, Hurst MA, Fujii CA, Mosca DA, Embree JR, Loury DJ, Radel PA, Cheng Chang C, Gu L, Fiddes JC (2000) Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers* 55 (1): 88-98
- Cociancich** S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem* 268: 19239-19245
- Collins** FM (1979) Mucosal defenses against *Salmonella* infection in the mouse. *J Infect Dis* 139: 503-10

- Conejo García 1** JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Küver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG (2001) Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 15: 1819-1821
- Conejo García 2** JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez FJ, Forssmann U, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R Forssmann WG, Bals R (2001) Identification of a novel, multifunctional β -defensin (hBD-3) with specific antimicrobial activity, interaction with oocyte membrane, and inducing macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 306: 257-264
- Cutler** JE (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45:187-218
- Dalton** AJ (1955) A chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anat Rec* 121: 281
- Davies** DR (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann Rev Biophys Chem* 19: 189-215
- De Bernadis** F, Boccanera M, Adriani D, Spreghini E, Santoni G, Cassone A (1997) Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* 65: 3399-3405
- De Lucca** AJ, Walsh TJ (1999) Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 13: 1-11
- Deslauriers** N, Cote L, Montplaisir S, de Rependigny L (1997) Oral carriage of *Candida albicans* in murine AIDS. *Infect Immun* 65: 661-667
- Diamond** G, Bevins CL (1998) beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol* 88: 221-225
- Deutsche** Norm (1999) Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 84: Spezielle Anforderungen an die Testung von Pilzen gegen Antimykotika. *Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin* DIN 58940-84
- Evron** R, Drewe JA (1984) Demonstration of the polysaccharides in the cell wall of *Candida albicans* blastospores, using silver methenamine straining and a sequence of extraction procedures. *Mycopathologia* 84: 141-150
- Falla** T, Karunaratne DN, Hancock RE (1996) Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem* 271: 19298-19303
- Fehlbaum** P, Rao M, Zasloff M, Anderson GM (2000) An essential amino acid induces epithelial beta-defensin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1273-1278

- Felk A**, Schäfer W, Hube B (1999) Cloning, characterisation and expression of *SAP 10*, a new putative GPI-anchored member of the secreted aspartyl proteinase gene family of *Candida albicans*. Unpublished
- Fogaca AC**, da Silva PI, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S (1999) Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 274: 25330-25334
- Fridkin SK**, Jarvis WR (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9: 499-511
- Frohm M**, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, Gudmundsson GH (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272: 15258-15263
- Fujii G**, Selsted ME, Eisenberg D (1993) Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci* 2: 1301-1312
- Gallo RL**, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M (1994) Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11035-11039.
- Ganz T**, Lehrer RI (1994) Defensins. *Curr Opin Immunol* 6: 584-589
- Garred P** (2000) Innate immunity creates hope for new strategies in treatment of infections. *Immunol Today* 21: 531
- Ghannoum MA**, Janini G, Khamis L, Radwan SS (1986) Dimorphism-associated variations in the lipid composition of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 132: 2367-2375
- Gillum AM**, Tsay EYH, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179-182
- Gopal P**, Sullivan PA, Sheperd MG (1984) Isolation and structure of glucan from regenerating spheroblast of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 130: 1217-1225
- Gräfe M** (1992) Biochemie der Antibiotika. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, New York
- Habenicht A** (1997) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. *Biol Chem* 378: 1413-9.
- Hancock RE** (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* 349: 418-422
- Hancock RE**, Chapple DS (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 249: 1317-1323

- Hancock** RE, Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends Microbiol* 8: 402-410
- Hancock** RE, Nair P (2000) Cationic antimicrobial peptide antibiotics. *Curr Opin Anti-infective Investig Drugs* 2: 140-144
- Hancock** RE, Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16: 82-88
- Hancock** RE, Falla T, Brown MM (1995) Cationic bacterial peptides. *Adv Microbiol Physiol* 37: 135-175
- Hänsch** GM (1986) Einführung in die Immunbiologie. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
- Heinz** F, Freimüller B (1982) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human tissues. *Methods Enzymol* 89 Pt D: 301-5
- Hessler** RJ, Blackwood RA, Brock TG, Francis JW, Harsh DM, Smolen JE (1998) Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a Ca²⁺-dependent fusogen in human neutrophil cytosol. *J Leukoc Biol* 63: 331-6
- Hobson** D, Hirsch JG (1958) *J Exp Med* 107: 167
- Hoegl** L, Ollert M, Korting HC (1996) The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. *J Mol Med* 74: 135-142
- Hoegl** L, Korting HC, Klebe G (1999) Inhibitors of aspartic proteases in human diseases: molecular modeling comes of age. *Pharmazie* 54: 319-329
- Hostetter** MK (1998) Linkage of adhesion, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *J Lab Clin Med* 132: 258-263
- Hube** B, Turver CJ, Odds FC, Eiffert H, Boulnois GJ, Köchel H, Rüchel R (1991) Sequence of the *Candida albicans* gene encoding the secretory aspartat proteinase. *J Med Vet Mycol* 29: 129-131
- Hube** B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14: 87-99
- Hube** B (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 7: 55-69
- Hube** B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schäfer W, Brown AJP, Gow NAR (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 65: 3529-3538
- Hube** B (1998) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15: 68-71

- Hube B**, Rüchel R, Monod M, Sanglard D, Odds FC (1998) Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. In: James MNG (ed) Aspartic proteinases: retroviral and cellular enzymes. *Plenum Press*, New York, pp 339-334
- Hunziker RD**, Wegmann TG (1987) Placental immunoregulation. *Crit Rev Imm* 6/3: 245-285
- Huttner KM**, Bevins CL (1999) Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 45: 785-794
- Islam D**, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 7: 180-185
- Ivanov VT**, Karelin AA, Philippova MM, Nazimiv IV, Pletnev VZ (1997) Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. *Inc Biopoly* 43: 171-188
- Jarvis WR** (1995) Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 20: 1526-1530
- Jung EG** (1998) Dermatologie. *Hippokrates Verlag, Stuttgart*: 106-121
- Kagan BL**, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 210-214
- Karabinis A**, Hill C, Leclercq B, Tancrede C, Baume D, Andreumont A (1988) Risk factors for candidemia in cancer patients: a case control study. *J Clin Microbiol* 26: 429-432
- Karnovsky MJ** (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for the use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137-138
- Kaufmann P** (1994) Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. *Urban & Schwarzenberg* 164-173
- Keokitichai S**, Wrigglesworth JM (1980) Association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the membrane of the intact human erythrocyte. *Biochem J* 187: 837-41
- Kim HS**, Yoon H, Minn I, Park CB, Lee WT, Zasloff M, Kim SC (2000) Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. *J Immunol* 165: 3268-3274
- Kimura LH**, Pearsall NN (1978) Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelia. *Infect Immun* 21: 64-68
- Komshian SV**, Uwaydah A, Sobel JD, Crane LR (1989) Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis* 11: 379-390

- Korting** GW (1982) Dermatomykosen. In: Praxis der Dermatologie. *Georg Thieme, Stuttgart*: 155-171
- Kulkarni** RK, Hollingsworth PJ, Volz PA (1980) Variation in the cell surface features of *Candida albicans* with respect to carbon sources. *Sabouraudia* 18: 255-260
- Latham** PW (1999) Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol* 17: 755-757
- Lehrer** RI, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Cur Opin Immunol* 11: 23-27
- Lehrer** RI, Barton A, Daher K, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME (1989) Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 84: 553-561
- Liepke** C, Zucht HD, Forssmann WG, Standker L (2001) Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *J Chromatogr B* 752: 369-377
- Liepke** C, Baxmann S, Heine C, Breithaupt N, Ludger Ständker, Forssmann WG (2003) Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B* 791: 345-356
- Lohner** K, Latal A, Lehrer RI, Ganz T (1997) Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 36: 1525-1531
- Luft** JH (1961) Epoxy resins. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414
- MacDonald** F, Odds FC (1980) Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J Med Microbiol* 13: 423-435
- Mansfeld** HW, Schulz S, Grütz G, von Baehr R, Ansorge S (1993) Detection of inhibition of HIV-1 protease activity by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *J Immun Meth* 161: 151-155
- Matayoshi** ED, Wang GT, Krafft GA, Erickson J (1990) Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* 247: 954-958
- McCourtie** J, Douglas LJ (1981) Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun* 32: 1234-1241
- Molecular Probes Inc.** (1999) Renin substrate 1 (R-2931), Leiden, Niederlande
- Monod** M, Togni G, Hube B, Sanglard D (1994) Multiplicity of genes encoding secreted aspartat proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13: 357-368
- Monod** M, Hube B, Heß D, Sanglard D (1998) Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144: 2731-2737

- Monteiro-Riviere** NA, Inman AO, Snider TH, Blank JA, Hobson DW (1997) Comparison of an *in vitro* skin model to normal human skin for dermatological research. *Microscop Res Tech* 37: 172-179
- Morschhäuser** J, Köhler G, Hacker J (1996) Gibt es Pathogenitätsfaktoren bei Pilzen? *Mycoses* 39: 51-54
- Morschhäuser** J, Blum-Oehler G, Hacker J (1997) Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies. *Med Welt* 48: 352-357
- Morschhäuser** J (2002) The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1587: 240-248
- Müller** F-MC, Lyman CA, Walsh TJ (1999) Antimicrobial peptides as potential new antifungals. *Mycoses* 42, (Suppl. 2): 77-82
- Naglik** JR, Challacombe SJ, Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-428
- Negi** M, Tsuboi R, Matsui T, Ogawa H (1984) Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. *J Invest Dermatol* 83: 32-36
- Nolting** S, Fegeler K (1993) Medizinische Mykologie. *Springer, Heidelberg*: 61-101
- Odds** FC, Evans EGV (1975) Routine use of modified Sabouraud's dextrose broth in the germ tube test for *Candida albicans*. *Med Lab Technol* 32: 23-26
- Odds** FC (1988) *Candida* and Candidosis. *Baillière Tindall*, London, 2nd edition
- Odds** FC (1994) *Candida* species and virulence. *ASM News* 60: 313-318
- Oethinger** M (1997) Mikrobiologie und Immunologie. *Gustav Fischer, Stuttgart*: 97-107
- Ollert** M, Wende C, Görlich M, McMullan-Vogel CG, Borg-von Zepelin M, Vogel CW, Korting HC (1995) Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 33: 2543-2549
- Ollert** M, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W (1993) Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 61: 4560-4568
- Ouellete** AJ, Selsted ME (1996) Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J* 10: 1280-1289
- Peschel** A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Gotz F (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274: 8405-8410

- Peschel A** (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiol* 10 (4): 179-186
- Picker LJ, Butcher EC** (1992) Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10: 561-91
- Preusser HJ** (1982) *Trichophyllum rubrum, Candida albicans*: Biologie, Cytologie, Wirkung von Imidazolderivaten. *Gustav Fischer, Stuttgart*: 1-11, 37-63
- Pschyrembel W** (1994). Klinisches Wörterbuch. *de Gruyter* 257. Auflage
- Qadripur SA** (1996) Pilze und Pilzerkrankungen. *Georg Thieme, Stuttgart*: 10-12, 36-51
- Quayle AJ, Porter E, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip K-P, Mok SC** (1998) Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152: 1247-1258
- Rao AG** (1995) Antimicrobial peptides. *Mol Plant Microbe Interact* 8: 6-13
- Ray TL, Digre KB, Payne CD** (1984) Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: Correlation with cutaneous pathogenicity. *J Invest Dermatol* 83: 37-41
- Ray TL, Payne CD** (1990) Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 58: 508-514
- Remold H, Fasold H, Staib F** (1968) Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochem Biophys Acta* 167: 399-406
- Richardson MD, Smith H** (1981) Production of germ tubes by virulent and attenuated strains of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 144: 565-569
- Rieth H** (1975) Systematik und Morphologie der pathogenen Pilze. In: Hartung J, Lubach D (ED) Mykosen. *Georg Thieme, Stuttgart*: 5-29
- Rosdy M, Clauss L** (1990) Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 95: 409-441
- Rosdy M, Pisani A, Ortonne JP** (1993) Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Dermatol* 129: 227-234
- Ross IK, De Bernardis F, Emerson GW, Cassone A, Sullivan PA** (1990) The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 136:687-694

- Rotrosen** D, Edwards JE, Gibson TR, Moore JC, Cohen AH, Green J (1985) Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: mechanism of attachment and endothelial cell penetration. *J Infect Dis* 152: 1264-1274
- Rüchel** R (1981) Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 659: 99-113
- Rüchel** R (1983) On the role of proteinases of *Candida albicans* in the pathogenesis of acronecrosis. *Zbl Bakt Hyg Orig* 255: 524-536
- Rüchel** R, Böning B (1983) Detection of *Candida* proteinase by enzyme immunoessays and interaction of the enzyme with alpha-2-macroglobulin. *J Immunol Meth* 61: 107-116
- Rüchel** R, Ritter B, Schaffrinski M (1990) Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. *Zbl Bakt* 273: 391-403
- Ruhnke** M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M (1994) Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 32: 2092-2098
- Saberwal** G, Nagaraj R (1994) Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membrans: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane perturbing abilities. *Biochim Biophys Acta* 1197: 109-131
- Sanglard** D, Ischer F, Monod M, Bille J (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2300-2305
- Sanglard** D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates in AIDS patients involve multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2378-2386
- Sanglard** D, Hube B, Monnod M, Odds FC, Gow NAR (1997) A triple deletion in *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* secretory aspartyl proteinase genes of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* 65: 3539-3546
- Sanglard** D, Ischer F, Monod M, Bille J (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143: 405-416
- Sato** T, Nagai K, Shibazaki M, Abe K (1994) Novel aspartyl proteinase inhibitors, YF-0200R-A and B. *J Antibiot* 47: 566-570

- Sato T**, Shibazaki M, Yamagouhi H, Abe K (1994) Novel *Candida albicans* aspartyl proteinase inhibitor. II. A new pepstatin-ahpatinin group inhibitor, YF-044P-D. *J Antibiot* 47: 588-590
- Scannon PJ** (1999) Recombinant 21 kDa N-Terminal fragment of human bacteridal/permeability-increasing protein (rBPI21): progress in clinic. *J Endotoxin Res* 5: 209-212
- Schaller M**, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC (2002) Infection of oral human epithelia with *Candida* species induces cytokine expression pattern correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* 118: 652-657
- Schaller M**, Schäfer W, Korting HC, Hube B (1998) Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 29: 605-615
- Schaller M**, Korting HC, Schäfer W, Bastert J, Chen WC, Hube B (1999) Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 34: 169-180
- Schibli DJ**, Hunter HN, Aseyer V, Starner TD, Wienzek JM, Mc Cray PB jun, Tuck BS, Vogl HJ (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 277: 8279-8289
- Schönborn C**, Grimmecke HD, Wand H (1984) Inhibition of extracellular proteinases from yeasts by Pepstatin A and leupeptin in vitro. *Mykosen* 28: 117-126
- Schröder JM** (1999) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 56: 32-46
- Schröder JM**, Harder J (1999) Human-beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 645-651
- Schulz-Knappe P**, Schrader M, Standker L, Richter R, Hess R, Jurgens M, Forssmann WG (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J Chrom A* 776: 125-132
- Seiler P**, Ständker L, Mark S, Hahn W, Forssmann WG und Meyer M (1999) Application of a peptid bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J Chrom A* 852: 273-283
- Senet JM** (1997) Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 14: 6-13
- Sentandreu R**, Martinez JP, Elorza MV, Mormeneo S (1991) Relationships between dimorphism, cell wall structure and surface activities in *Candida albicans*. In Prasad R (ed.): *Candida albicans: Cellular and molecular biology*. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg 72-88.

- Shepherd** MG (1991) Morphogenesis in *Candida albicans*. In: Prasad R (ed) *Candida albicans: Cellular and molecular biology*. Springer, Heidelberg Berlin New York, pp 5 -19
- Sirover** MA (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-84
- Skalicky** JJ, Selsted ME, Pardi A (1994) Structure and dynamics of the neutrophil defensins NP-2, NP-5, and HNP-1: NMR studies of amide hydrogen exchange kinetics. *Proteins* 20: 52-67
- Slemmon** JR, Flood DG (1992) Profiling of endogenous brain peptides and small proteins: methodology, computer-assisted analysis, and application to aging and lesion models. *Neurobiol Aging* 13: 649-660
- Staib** F (1965) Serum-proteins as nitrogen source for yeast like fungi. *Sabouraudia* 4: 187-193
- Staib** F (1969) Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* 37: 345-348
- Stewart** TS, Ballou CE (1968) A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis. *Biochemistry* 7: 1855-1863
- Summers** DF, Grollmann AP, Hasenclever HF (1964) Polysaccharide antigens of *Candida albicans* cell wall. *J Immunol* 92: 491-499
- Svinarich** DM, Gomez R, Romero R (1997) Detection of human defensins in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 38: 252-255
- Tang** YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouelette AJ, Selsted ME (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286: 489-502
- Tossi** A, Sandri L, Giangaspero A (2000) Amphipatic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 4-30
- Tsuchia** T, Fukazawa Y, Kawakitas S (1961) Serological classification of the genus *Candida*. In: Studies on candidiasis in Japan. In: Winner HI, Hurley R. (ed) *Research committee of candidiasis*. University of Tokio Press, pp 34-46
- Valore** EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T (1998) Human β defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101: 1633-1642
- Vanden Bossche** HV, Warnock D, Dupont B, et al. (1994) Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol* 32 (Suppl. 1): 189-202.
- Wang** GT, Chung CC, Holzman TF, Krafft GA (1992). A continuous fluorescence assay of renin activity. *Analyt Biochem* 210: 351-359

- Watts** HJ, Cheah FSH, Hube B, Sanglard D, Gow NAR (1998) Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* 159: 129-135
- Weinberg** A, Krisanaprakornkit S, Dale BA (1998) Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 399-414
- Wimley** WC, Selsted ME, White SH (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* 3: 1362-1373
- Winner** HI, Hurley R (1964) *Candida albicans*. J & A Churchill, London, pp 1-13, 24-43, 76-95, 176-181
- Yang** D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001) Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* 69: 691-697
- Yang** D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* 58: 978-989
- Zhao** C, Wang I, Lehrer RI (1996) Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396: 319-322
- Zotter** C, Hausteiner UF, Schönborn C, Grimmecke HD, Wand H (1990) Effect of Pepstatin A on the *Candida albicans* infection in mice. *Dermatol Monatsschr* 176: 189-198
- Zucht** HD, Raida M, Adermann K, Mägert HJ, Forssmann WG (1995) Human beta-defensin-1: Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett* 372: 185-188.

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu promovieren.

Für die Möglichkeit, diese Arbeit zusammen mit dem Institut für Peptidforschung in Hannover anfertigen zu können, gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. W.G. Forssmann.

Herrn Prof. Dr. H.C. Korting möchte ich für die Überlassung des Themas, die konstruktive Unterstützung und die eingehenden Diskussionen bei allen auftretenden Fragen in besonderem Maße danken.

Herrn PD Dr. M. Schaller danke ich für die intensive Betreuung, die fachliche Zusammenarbeit und die nette und freundliche Unterstützung.

Für die kompetente Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit und die Durchführung der Experimente im IPF Hannover möchte ich vor allem Frau Dr. Cornelia Liepke, Frau Dr. Susann Arndt und Herrn Dr. Michael Walden danken, die mir bei allen Problemen zur Seite standen.

Frau A. Kerschnitzki (MTA) und Frau K. Fanderl (MTA) möchte ich für die stets freundliche Unterstützung sowie für ihre aufmunternden Gespräche danken.

Mein Dank gilt weiterhin Frau E. Januschke (MTA) und Frau J. Laude (MTA) für die engagierte Betreuung bei lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Dem Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ des DFG und dem Sprecher Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danke ich für die Gewährung des Stipendiums und vielen wertvollen Anregungen.

12. Lebenslauf

Geburtsdatum:	20.01.1976	
Geburtsort:	Mühldorf am Inn	
Eltern:	Josef Schneider, Deutsche Bahn Ang. Juliane Schneider, Pflegehelferin	
Schulbesuch:	1982-85	Grundschule Ampfing, Oberbayern
	1985-86	Vorschule der Regensburger Domspatzen, Pielenhofen
	1986-93	Musikgymnasium der Regensburger Domspatzen hum. und neuspr. Gymnasium mit Kernfach Musik
	1993-94	Sandy Creek High School, Georgia, USA
	1994-96	Musikgym. Rgbg. Domspatzen
Schulabschluß:	1996	Abitur in Englisch, Musik, Mathematik, und Geschichte Durchschnittsnote: 1,4
Wehrdienst:	1996-97	Grundausbildung zum Sanitätssoldaten Fagottist und Spielmann im Heeresmusikkorps 4, Regensburg
Studium:	1997-2003	Medizinstudium an der LMU München Gesamtnote: 1,66
März 2000- März 2002		Stipendiat im Graduiertenkolleg der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG), "Infektion und Immunität". Sprecher des Kollegs: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann