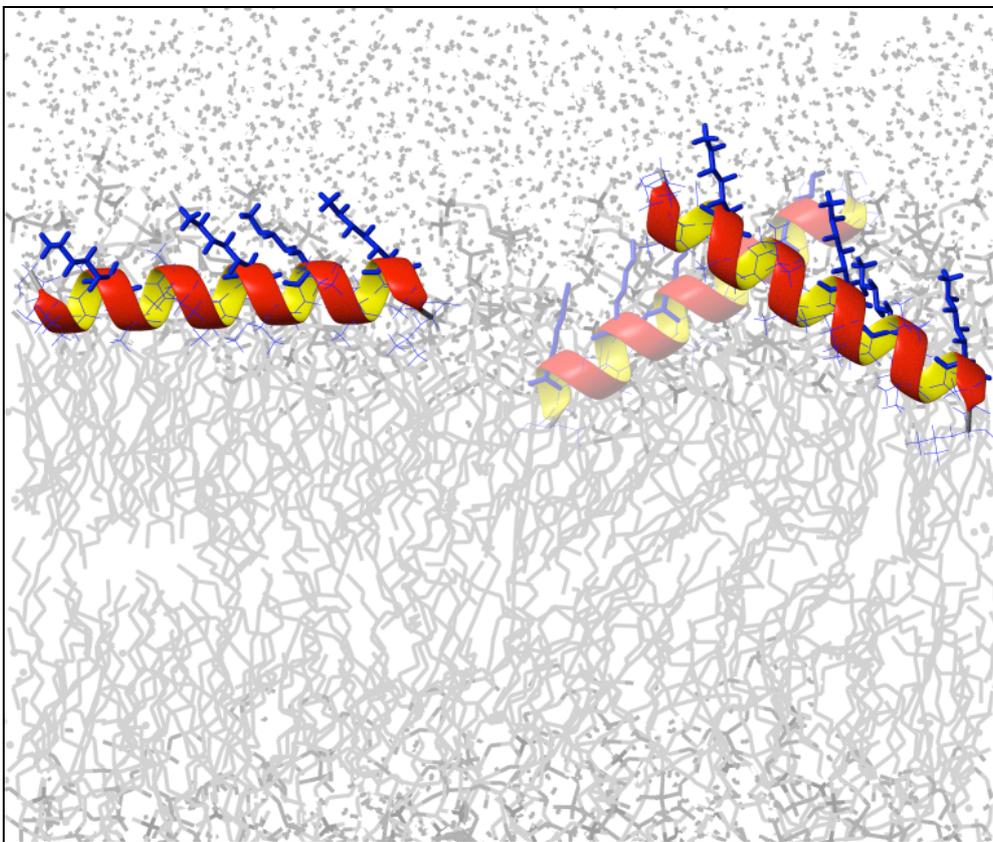


Diplomarbeit

**^{19}F -Festkörper-NMR-Untersuchungen zur
Orientierung und Dynamik des antimikrobiellen
Peptids PGLa in Lipidmembranen**



vorgelegt von Carsten Sachse

Jena, den 23.10.2003



seit 1558

Institut für Biochemie und Biophysik

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Inhalt

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | <i>Antimikrobielle Wirkstoffe als Forschungsgegenstand</i> | 1 |
| 1.1 | Antimikrobielle Peptide in der Natur | 1 |
| 1.1.1 | Biodiversität von Peptiden | 2 |
| 1.1.2 | Wirkmechanismus und Resistenzentwicklung | 3 |
| 1.1.3 | Expression und Regulation | 6 |
| 1.2 | Studium der Wirkungsweise antimikrobieller Peptide mit Hilfe von Modellmembranen und Festkörper-NMR | 7 |
| 1.2.1 | Struktur von Biomembranen | 7 |
| 1.2.1.1 | Eigenschaften von Modellmembranen | 9 |
| 1.2.1.2 | Lipid-Polymorphismus | 11 |
| 1.2.2 | Strukturbiologie in Membranen | 12 |
| 1.2.2.1 | Strukturmerkmale von Membranproteinen | 13 |
| 1.2.2.2 | Grundlagen der Festkörper-NMR | 14 |
| 1.2.2.3 | Anwendung der Fluor-NMR | 16 |
| 1.3 | PGLa – ein antimikrobielles membranaktives Peptid des Krallenfroschs | 18 |
| 1.3.1 | Strukturmodelle der Funktionsweise antimikrobieller Peptide | 19 |
| 1.3.2 | PGLa – ein Literaturüberblick | 21 |
| 1.3.3 | Untersuchung des Wirkmechanismus durch Festkörper-NMR – der experimentelle Ansatz | 26 |
| 1.4 | Zielstellung | 28 |
| 2 | <i>Synthese, Reinigung und Identifikation der ¹⁹F-markierten PGLa-Derivate</i> | 29 |
| 2.1 | Grundlagen der Festphasensynthese von Peptiden | 29 |
| 2.2 | Material und Methoden | 33 |
| 2.2.1 | Peptid-Synthese | 33 |
| 2.2.2 | Reinigung der Derivate durch RP-HPLC | 35 |
| 2.2.3 | Bestimmung der D- und L-Epimere | 35 |
| 2.2.4 | Identifikation der Peptide durch Massenspektrometrie | 35 |
| 2.3 | Ergebnisse und Diskussion | 36 |
| 2.3.1 | Peptid-Synthese | 36 |
| 2.3.2 | Reinigung der Derivate durch RP-HPLC | 37 |
| 2.3.3 | Bestimmung der D- und L-Epimere | 38 |
| 2.3.4 | Identifikation der Peptide durch Massenspektrometrie | 39 |
| 3 | <i>Struktur und Aktivität der PGLa-Derivate</i> | 41 |
| 3.1 | Anwendung der CD-Spektroskopie und antimikrobieller Wachstumsassays | 41 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2 | Material und Methoden | 42 |
| 3.2.1 | CD-Spektroskopie | 42 |
| 3.2.2 | Antimikrobielle Wachstumsassays | 42 |
| 3.3 | Ergebnisse und Diskussion | 43 |
| 3.3.1 | CD-Spektren mit hoher Übereinstimmung zum nativem Peptid | 43 |
| 3.3.2 | Antimikrobielle Wachstumsassays mit vergleichbarer biologischer Aktivität gegenüber dem Wildtyp | 45 |
| 4 | Charakterisierung der Orientierung des PGLa-Moleküls durch Festkörper-NMR | 49 |
| 4.1 | Grundlagen und Anwendung der „Orientational Constraints“-Strategie | 49 |
| 4.1.1 | Die Dipolkopplung und die Orientierung der markierten Seitenkette | 49 |
| 4.1.2 | Die Seitenketten an einem Sekundärstrukturgerüst als Ausgangspunkt für Orientierungsberechnungen | 51 |
| 4.1.3 | Normierung der Helixposition und Beschreibung ihrer Orientierung | 52 |
| 4.1.4 | Bestimmung der Orientierung der Helix | 53 |
| 4.2 | Material und Methoden | 55 |
| 4.2.1 | Herstellung von orientierten Proben | 55 |
| 4.2.2 | NMR-Experimente | 55 |
| 4.2.3 | Modellbau von α -Helices und Positionsnormierung | 57 |
| 4.2.4 | Berechnung der Peptidorientierung | 57 |
| 4.3 | Ergebnisse | 59 |
| 4.3.1 | Phosphor-Spektren: mögliche Umstrukturierung der Membran unter Peptideinfluss | 59 |
| 4.3.2 | Konzentrationsabhängige Helixlage von PGLa in der Membran | 61 |
| 4.3.3 | Berechnete Orientierung von PGLa bei niedriger Peptidkonzentration: der S-Zustand | 64 |
| 4.3.4 | Berechnete Orientierung von PGLa bei hoher Peptidkonzentration: der T-Zustand | 65 |
| 4.3.5 | Temperaturabhängigkeit der Umorientierung | 68 |
| 4.3.6 | Temperaturmessungen zur Dynamik des Peptids | 69 |
| 4.3.7 | Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Orientierung des Peptids | 75 |
| 4.3.7.1 | Umorientierungsverhalten unabhängig von Lipidkettenlänge | 75 |
| 4.3.7.2 | Keine Veränderung der Umorientierung bei negativer Lipidladung | 76 |
| 4.3.7.3 | Eine leichtere Umorientierung durch negative Krümmung in der Membran | 77 |
| 4.3.7.4 | Kein T-Zustand in bakteriellen Lipidmembranen | 78 |
| 4.3.8 | D-Aminosäuren als Markierung in der Festkörper-NMR | 78 |
| 4.4 | Diskussion | 81 |
| 4.4.1 | Orientierung und Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptids PGLa | 81 |
| 4.4.2 | Ein hypothetisches antiparalleles PGLa-Dimer im T-Zustand | 84 |
| 4.4.3 | Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Orientierung von PGLa | 87 |
| 4.5 | Ausblick | 90 |

Zusammenfassung

Das antimikrobielle Peptid PGLa (21 Aminosäuren) aus der Haut des Krallenfroschs *Xenopus laevis* ist für die Permeabilisierung von Bakterienmembranen verantwortlich. Als Ansatz zur Aufklärung seines Wirkmechanismus wurde die Orientierung der α -helikalen Peptidstruktur relativ zur Membran und ihre Dynamik mit Hilfe der sensitiven ^{19}F -Festkörper-NMR in orientierten Proben untersucht. Dazu wurden hydrophobe Aminosäuren an den Positionen 8, 9, 10, 13 und 14 entlang der amphipathischen Helix durch die nicht-proteinogene Reporteraminosäure 4- CF_3 -Phenylglycin mittels Peptid-Festphasensynthese ersetzt. Die fünf verschiedenen PGLa-Analoga (einschließlich ihrer jeweiligen D- und L-Epimere) wurden durch RP-HPLC gereinigt und mit Hilfe von ESI- bzw. MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. CD-Spektroskopie und antimikrobielle Wachstumsassays bestätigten sowohl den geringen strukturellen Einfluss der CF_3 -Phenylglycin-Substitutionen als auch die vergleichbare biologische Wirksamkeit der Analoga zum Wildtyp-PGLa, mit Ausnahme der Substitution an Position Ala8. Die Dipolaufspaltung (inkl. Vorzeichen) der L- CF_3 -Phenylglycin-Derivate wurde mit Hilfe von ^{19}F -NMR-Einpuls-Sequenzen bestimmt. Eine ^2D -Analyse der gesammelten Winkeleinschränkungen ergab die Orientierung der idealisierten PGLa α -Helix in Bezug auf orientierte DMPC-Membranen. Interessanterweise wurden zwei unterschiedliche Zustände je nach Membranumgebung und experimentellen Bedingungen gefunden: 1. im S-Zustand (S = surface) bei niedriger Peptidkonzentration legt sich die PGLa-Helix parallel auf die Membranoberfläche, und die Lysin-Seitenketten sind vom hydrophoben Membraninneren weg gerichtet; 2. im T-Zustand (T = tilt) bei hoher Peptidkonzentration (Lipid-Peptid-Verhältnisse von 50:1 bis 20:1) neigt sich die Helix um 30° gegen die Membranebene und dreht sich 25° um ihre Achse. Ein derartiger T-Zustand wird in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Bei extrem hohen Peptidkonzentrationen ($\text{L/P} \leq 20:1$) ließ sich keine bevorzugte Orientierung mehr feststellen. Die Einführung von kürzeren oder längeren Acylketten (DLPC bzw. DPPC) oder negativ geladenen Kopfgruppen (DMPG) bewirkte keine grundlegende Veränderung der Lipid-Peptid-Wechselwirkungen in Bezug auf die Peptidorientierungen. In Lipidproben mit ungesättigten Fettsäuren (DOPC, *E. coli*-Lipidextrakte) war hingegen selbst bei hohen Peptidkonzentrationen keine T-Orientierung induzierbar. Die biologische Bedeutung des neuen T-Zustands könnte einer Vorstufe von toroidalen Poren bzw. einem Bestandteil solcher Porenstrukturen zugeschrieben werden. Eine plausible Erklärung für die 30° -Orientierung liefert ein Dimerisierungsmodell zweier gegeneinander verkippter antiparalleler PGLa-Helices auf der Membranoberfläche.

Abstract

PGLa, a 21-residue member of the magainin family of antibiotic peptides isolated from frog skin of *Xenopus laevis*, is known to be responsible for permeabilizing bacterial membranes. In order to elucidate its mechanism of action, the orientation of the α -helical peptide structure with respect to the membrane and its dynamics were investigated by sensitive ^{19}F -solid-state NMR measurements in oriented samples. Hydrophobic amino acids were substituted by the non-proteinogenic reporter amino acid 4- CF_3 -phenylglycine at positions 8, 9, 10, 13 and 14 along the amphipathic helix using solid-phase peptide synthesis. The five resulting PGLa derivatives (including their respective D- and L-epimers) were purified by RP-HPLC and identified by ESI and MALDI mass spectrometry. CD spectroscopy confirmed the insignificant structural interference of the CF_3 -phenylglycine substitutions, and antimicrobial growth assays resulted in biological activity comparable to wild-type PGLa, with the exception of the substitution in position Ala8. Dipolar splittings (including signs) of L- CF_3 -phenylglycine PGLa derivatives were determined by ^{19}F -NMR one-pulse sequences. A 2 analysis of orientational constraints yielded the orientational state of the idealized PGLa helix with respect to the membrane surface of DMPC. Interestingly, this was found to differ depending on the experimental conditions and membrane composition: 1. in the S-state (S = surface) at low peptide concentration the PGLa helix assumes a flat orientation on the membrane surface with the lysine side chains directed away from the hydrophobic membrane interior; 2. in the T-state (T = tilt) at high peptide concentration (lipid-to-peptide ratio from 50:1 to 20:1) the helix tilt changes by 30° relative to the membrane plane accompanied by a 25° rotation around its axis. The present thesis describes such T-state for the first time. At very high peptide concentration ($L/P \leq 20:1$) no preferred orientation was detectable any more. The introduction of shorter and longer acyl chains (DLPC, DPPC) or negative head group charge (DMPG) did not cause any changes in the peptide-lipid interactions. In lipid samples containing unsaturated fatty acids (DOPC, *E. coli* lipid extracts), however, a T-orientation was not inducible even at high peptide concentration. The biological implications of this novel T-state may be ascribed to a preliminary state of a toroidal pore or to a structural component of such pore complex. A plausible explanation for the 30° -orientation may be provided by a dimeric model of two tilted PGLa helices aligned antiparallel and located on the membrane surface.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--|
| CD | Circular Dichroism |
| CF ₃ -Phg | 4-Trifluoromethyl-phenyl-glycin |
| DLPC | Dilauroyl-phosphatidylcholin |
| DMPC | Dimyristoyl-phosphatidylcholin |
| DMPE | Dimyristoyl-phosphatidylethanolamin |
| DMPG | Dimyristoyl-phosphatidylglycerin |
| DOPC | Dioleoyl-phosphatidylcholin |
| DPPC | Dipalmitoyl-phosphatidylcholin |
| DPPG | Dipalmitoyl-phosphatidylglycerin |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry |
| ESI-MS | Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie |
| F-Phg | 4-Fluoro-phenyl-glycin |
| GID | Grazing Incidence Diffraction |
| L/P | Lipid/Peptid |
| MALDI-TOF | Matrix-assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight |
| MIC | Minimal Inhibitory Concentration |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| PGLa | Peptidyl-Glycylleucine-Carboxyamid |
| POPC | Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholin |
| POPG | Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol |
| RP-HPLC | Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography |

1 Antimikrobielle Wirkstoffe als Forschungsgegenstand

Der medizinische Einsatz von Antibiotika hat in beträchtlichem Maße dazu beigetragen, dass sich in der Zeit von 1944 bis 1972 die durchschnittliche Lebenserwartung in den Industriestaaten um ca. acht Jahre erhöhte. Trotz dieses großen Erfolges häufen sich Berichte, nach denen ein Großteil der klassischen Antibiotika wie Penicillin durch das Auftreten von resistenten Stämmen unwirksam wird. Obgleich semisynthetische Weiterentwicklungen der zweiten Generation die Breitenwirksamkeit teilweise erhöhen konnten, traten auch bei diesen Verbindungen bald Resistenzen auf. Aus diesem Grunde wird der Entwicklung von neuen Antibiotika große Aufmerksamkeit zuteil, insbesondere solchen Verbindungen, die sich in ihren Wirkmechanismen von den herkömmlichen Antibiotika unterscheiden.

Zu einer solchen Gruppe von Verbindungen werden kationische antimikrobielle Peptide gerechnet, die als Teil inhärenter Abwehrmechanismen für das Pflanzen- und Tierreich in nahezu allen multizellulären Organismen weit verbreitet sind. Obwohl die Details ihrer Wirkungsweise nur teilweise geklärt sind, gilt die Anziehung und die Migration der kationischen Peptide bis zur Zellmembran als unumstritten. Dort entfalten sie ihre vollständige Wirkung und stören die Zellmembranstruktur derartig, dass essentielle Prozesse, wie die Energieerzeugung durch den Protonengradienten über der Membran nicht mehr aufrecht erhalten werden können. Das Zellinnere strömt dann in das äußere Medium aus und führt letztendlich den Tod des Bakteriums durch Lyse herbei [1].

Der genauen Kenntnis des Wirkungsmechanismus auf strukturellem Niveau kommt bei der Entwicklung solcher Antibiotika eine entscheidende Rolle zu. Denn mit dem Verständnis der Struktur und Funktion können die Modifizierung und sogar *de novo* Entwicklung derartiger Verbindungen Erfolg versprechend sein. Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem antimikrobiellen Peptid PGLa und der Zellmembran mit dem Schwerpunkt auf dessen molekularer Orientierung und Dynamik an Hand von Festkörper-NMR-Messungen (Kernmagnetische Resonanzspektroskopie).

1.1 Antimikrobielle Peptide in der Natur

Zur Entwicklung eines weit reichenden Verständnisses der Funktionsweise von antimikrobiellen Peptiden ist neben der Kenntnis der Orientierung und Dynamik auf strukturellem Niveau auch ein umfangreiches Bild über die natürliche Umgebung dieser pharmazeutisch interessanten Substanzen erforderlich.

1.1.1 Biodiversität von Peptiden

Die weite Verbreitung antimikrobieller Peptide im Pflanzen- und Tierreich räumt ihnen eine fundamentale Bedeutung in der evolutionären Entwicklung von multizellulären Organismen ein. Im Verlaufe der Evolution hat sich bei jedem komplexeren Organismus ein spezifisches und effizientes Repertoire an jenen Peptiden herausgebildet, welches gegen ein breites Spektrum von Mikroben wirksam und gleichzeitig für die individuelle Umgebung des Wirtsorganismus charakteristisch ist. Über 500 verschiedene Peptide dieser Art sind in der Online-Datenbank der Universität von Triest eingetragen [2], wovon eine Auswahl der am besten charakterisierten in Tabelle 1 zusammengestellt ist [3].

Tabelle 1: Überblick über antimikrobielle Peptide von Pflanzen und Tieren mit ihrer Primärstruktur, ihrem Wirtsorganismus und dem Sekretionsgewebe. (Übernommen von Zasloff [3].)

| Table 1 Overview of antimicrobial peptides from plants and animals | | Origin | Tissue* |
|--|---|----------------|----------|
| Representative peptides | | | |
| α-helical | | | |
| Cecropin A | KWKLFKKIEKVGQNIIRDGIIKAGPAVAWVGQATQIAKa | Silk moth | E, BC, H |
| Magainin 2 | GIGKFLHSAKFKGKAFVGEIMNS | Frog | E |
| Pexiganan | GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKKa | Synthetic | |
| Dermaseptin 1 | ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ | Frog | E |
| LL-37 | LLGDFFRKSKKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES | Human | E, BC |
| Buforin II | TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK | Vertebrate | E |
| One disulphide bond | | | |
| Bactenecin 1 | RLCRIVVIRVCR | Cow | BC |
| Thanatin | GSKKPVPIIYCNRRGTGKCQRM | Insect | BC |
| Brevinin 1T | VNPILGVLPKVCLITKKC | Rana frogs | E |
| Ranalexin | FLGGLIKVPAMICAVTKKC | Rana frogs | E |
| Ranateurin 1 | SMLSVLKKNLGVGLGFVACKINKQC | Rana frogs | E |
| Esculentin 1 | GIFSKLGRKIKKNLLSGLKNVGEVGMDDVVRTGIDIAGCKIKGEC | Rana frogs | E |
| Two disulphide bonds | | | |
| Tachyplesin | RWC ₁ FRVC ₂ YRGIC ₂ YRKC ₁ Ra | Horseshoe crab | BC |
| Androctonin | RSVC ₁ RQIKC ₂ RRRGGC ₂ YKCC ₁ TNRPY | Scorpion | H |
| Protegrin 1 | RGGRLC ₁ YC ₂ RRRRC ₂ VC ₁ VGRa | Pig | BC |
| Three disulphide bonds | | | |
| α-defensin (h-HP3) | DC ₁ YC ₂ RIPAC ₃ AGERRYGTC ₂ YQGRLLWAFCC ₁ | Human | BC, E |
| β-defensin (TAP) | NPVSC ₁ VRNKIGC ₂ VPIRC ₃ PGSMKIQIGTC ₂ VGRAVKC ₁ C ₃ RKK | Cow | E, BC |
| θ-defensin | GFC ₁ RC ₂ LC ₃ RRGVC ₃ RC ₂ IC ₁ TR | Monkey | BC |
| Defensin (sapecinA) | ATC ₁ DLLSGTGINHSAC ₂ AAHC ₃ LLRGNRRGGYC ₂ NGKAVC ₃ VC ₁ RN | Insect | E, BC, H |
| Thionin (crabmin) | TTC ₁ C ₂ PSIVARSNFNVC ₃ RIPGTPEAIC ₃ ATYTGCC ₂ IIIPGATC ₁ PGDYAN | Plant | E |
| Four disulphide bonds | | | |
| Defensin | QKLC ₁ QRPSTGWSGVC ₂ GNNNAC ₃ KNQC ₄ IRLEKARHGSC ₂ NYVFAHC ₃ C ₄ YFPC ₁ | Radish | Seeds, E |
| Drosomycin | DC ₁ LSGRYKGPC ₂ AWDNETC ₃ RRVC ₄ KEEGRSSGHC ₂ SPSLKC ₃ WC ₄ EGC ₁ | Drosophila | H |
| Hepcidin | DTHFPIC ₁ IFC ₂ C ₃ GC ₄ C ₁ HRSKC ₂ GMC ₃ C ₄ KT | Human | Liver |
| Linear, not α-helical | | | |
| Bac 5 | RFRPPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPPIRPPPIRPPPLGRPFPa | Cow | BC |
| PR-39 | RRRPPPPYLPRPPPPPPPPRLPPRIIPGGFPPRPPRFPa | Pig | BC |
| Indolicidin | ILPWKWPWWPWRRa | Cow | BC |
| Apidaecin | GNRRPVYIPQPPPHPI | Honeybee | H |
| Pyrrhocoricin | VDKGSYLRPPTPPRPIYNRN | Insect | H |
| Histatin 5 | DSHAKRH-HGYKRFHEKH-HSHRGY | Human | Saliva |

Cysteines paired in disulphide linkages are noted by common numerical subscripts. C-terminal amides are noted by a. In θ-defensin, the first and last residues are joined in a peptide bond.
 *BC, blood cell; H, haemolymph; E, epithelial tissue.

Eine übliche Einteilung antimikrobieller Peptide wird anhand ihrer Sekundärstrukturen vorgenommen (siehe Abbildung 1A): 1. niedermolekulare lineare Peptide mit α -helikaler Struktur z.B. PGLa, Magainin, 2. Disulfid-verknüpfte β -Faltblatt-Peptide z.B. Defensine, Tachyplesine und 3. eine große Familie linearer Peptide gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl bestimmter Aminosäuren z.B. das Tryptophan-reiche Indolicidin und das Prolin-

reiche PR39. All diese Klassen unterliegen einem Paradigma in der Ausbildung von amphipathischen Strukturen, in denen kationische Bereiche neben hydrophoben vorliegen.

Für die Biosynthese der Peptide kommen zwei prinzipielle Wege in Frage. Zum einen werden diese Peptide an nicht-ribosomalen Multienzymkomplexen hergestellt. Solche Verbindungen sind häufig aus nicht-proteinogenen Aminosäuren oder D-Aminosäuren aufgebaut, was sie resistenter gegenüber einem Protease-Abbau macht [4]. Zum anderen findet die ribosomale Synthese über größere Vorstufen von Proteinen statt, die im Verlauf der Prozessierung für eine korrekte intrazelluläre Dirigierung der Peptide über Signalsequenzen sorgen und später abgespalten werden. Des Weiteren werden die Carboxy-terminalen Enden der Proteine häufig posttranslational in Amid-Enden umgewandelt. Aufgrund solcher individueller und komplexer Synthesewege und ihrer intrinsischen Aktivität scheint eine gezielte Gewinnung antimikrobieller Peptide für NMR-Untersuchungen aus dem natürlichen Organismus problematisch, so dass wir die Peptide inklusive der nötigen Markierungen durch chemische Peptid-Festphasensynthese herstellen.

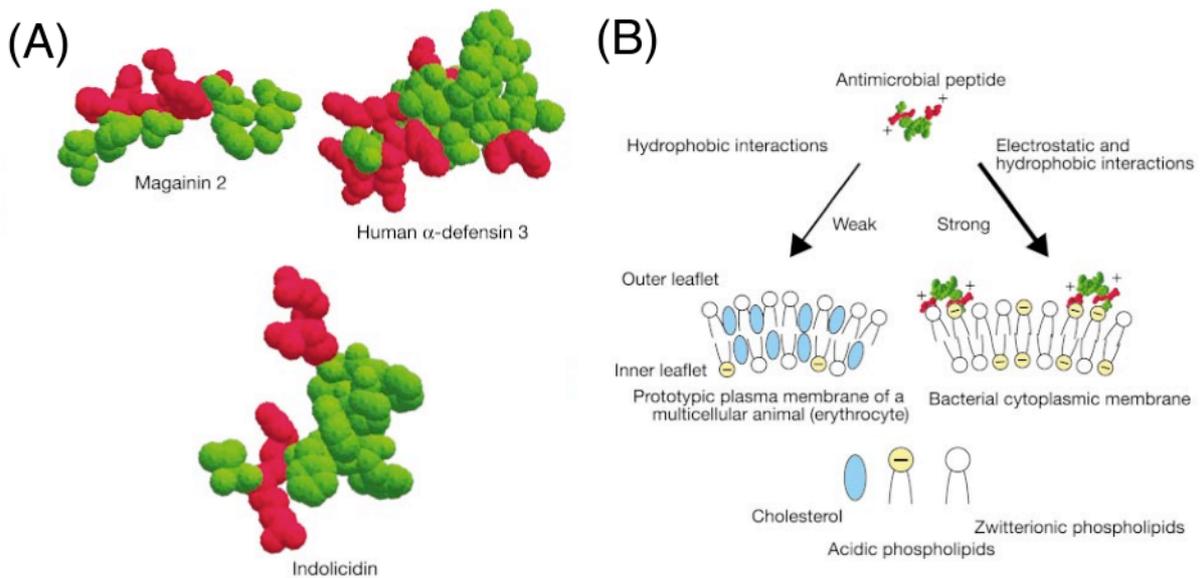


Abbildung 1: (A) Darstellung der 3D-Strukturen antimikrobieller Peptide eingeteilt nach den drei Hauptklassen. Magainin 2 als α -helikales, humanes α -Defensin 3 als Disulfid-verbrücktes β -Faltblatt und Indolicidin als Tryptophan-reiches Peptid als Kalottenmodelle. (B) Der Wirkort von antimikrobiellen Peptiden und die Grundlage ihrer Spezifität im Vergleich zu multizellulären Organismen. (Übernommen von Zasloff [3].)

1.1.2 Wirkmechanismus und Resistenzentwicklung

Auf welche Art und Weise sind die Peptide für den Tod der Mikroben verantwortlich? Im weiteren Sinne werden für diese Fragestellung viele Modelle in der Literatur diskutiert: die

fatale Depolarisation der Membran, die strukturelle Stabilisierung von Löchern in der Membran und die Störung der essentiellen Asymmetrie von Ober- und Unterseite der Membran. Ebenfalls genannt werden in diesem Zusammenhang die Initiierung tödlicher zellulärer Prozesse wie Hydrolaseaktivität mit der Folge von Zellwandabbau oder auch die Hemmung wichtiger intrazellulärer Proteine nach Membranpassage. Obwohl die NMR-Untersuchungen dieser Arbeit lediglich auf die Wechselwirkung des Peptids mit der Membran zielen, sollten weitere (zumindest unterstützende) Prozesse in der Wirkungsweise antimikrobieller Peptide stets in Betracht gezogen werden.

Die Entdeckung, dass D-Analoga der Peptide die gleiche Wirksamkeit entfalten, wies darauf hin, dass ihr Wirkort keine stereospezifische Interaktion etwa mit einem Rezeptor-Protein erfordert, sondern vor allem auf die Zellmembran der Bakterien zielt [5]. Des Weiteren konnten die von den Peptiden hervorgerufenen morphologischen Veränderungen der Bakterien mittels Elektronenmikroskopie abgebildet werden. Antimikrobielle Peptide sind bereits in mikromolaren Konzentrationen wirksam und entfalten ihre Wirkung bereits unterhalb der MIC (Minimal Inhibitory Concentration), wie in Abbildung 2 dargestellt.

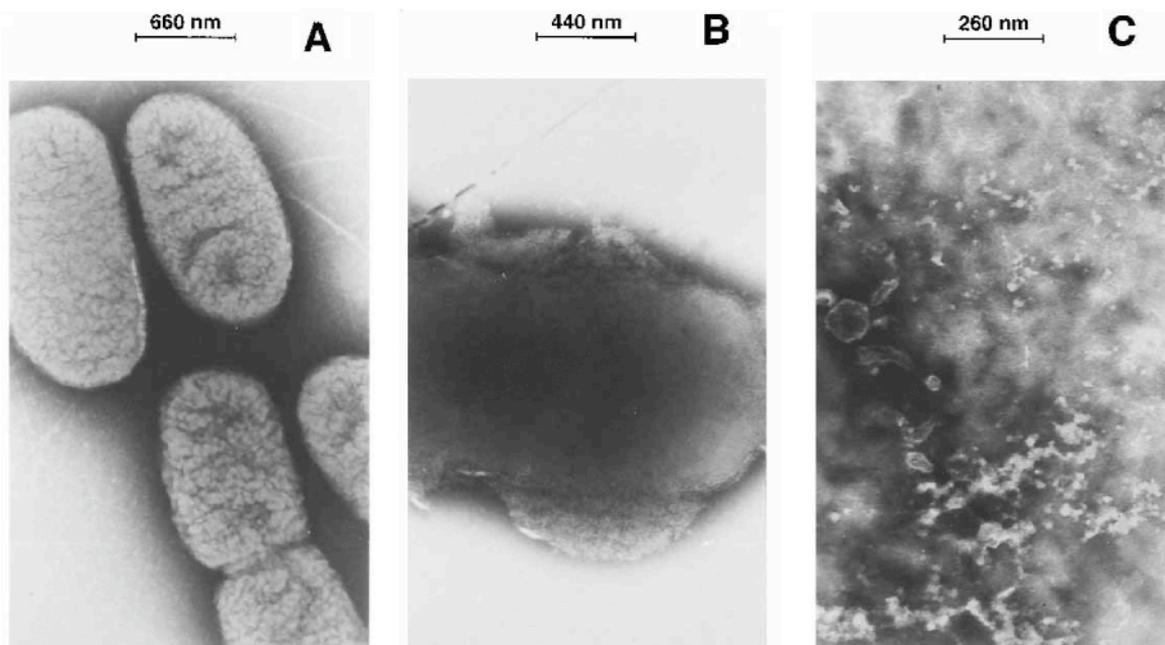


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* behandelt mit antimikrobiellen Peptiden (A) Kontrolle (B) Behandlung der Bakterien mit Peptiden unterhalb MIC. (C) Behandlung der Bakterien mit Peptiden bei MIC-Werten. (Übernommen von Oren [6].)

Nach diesen fundamentalen Erkenntnissen blieb die Frage offen, wie diese Peptide zwischen Wirts- und Mikroorganismus unterscheiden. Eine befriedigende Antwort darauf lieferte das SMH-Modell von Shai-Matsuzaki-Huang (Abbildung 1b) [7]. Der wesentliche Unterschied in

der Membranarchitektur zwischen Mikroben und multizellulären Organismen liegt in der Besetzung der Außenseite der Membran mit negativ geladenen Lipiden, während die Außenseite von Tier- und Pflanzenmembranen prinzipiell durch Lipide ohne Nettoladung charakterisiert ist, obwohl die Innenseite der Zellmembran ebenfalls negative Lipide aufweist. Ein weiterer Faktor, der für die Stabilisierung der Membran bei komplexeren Organismen sorgt, ist die Gegenwart des amphipathischen Moleküls Cholesterol. Die Aktivität der potenten Peptide wird verringert, indem Cholesterol das Eindringen des Peptids in die Membran verhindert und Proteasen im wässrigen Milieu des Gewebes ihre Substrate effektiver zersetzen können.

Gram-positive Bakterien sind relativ anfällig gegenüber antimikrobiellen Peptiden, weil ihre Zellwand nur mit einem Peptidoglycan-Geflecht geschützt ist, das durch Magnesium und Calcium-Ionen mit den negativ geladenen Phosphorzuckern stabilisiert wird. Daher sind kationische antimikrobielle Peptide in der Lage, die Metallionen aus ihren Bindungen zu verdrängen und auf diese Weise einen Eintritt von weiteren Peptiden zu fördern. Gram-negative Bakterien hingegen, die zusätzlich zur Plasmamembran eine äußere Membran aus einer Lipopolysaccharidschicht besitzen, stellen eine größere Barriere für das Eindringen antimikrobieller Peptide dar. Dabei können sie die äußere Membran über große Membranproteine, so genannte Porine, passieren und in den periplasmatischen Raum eindringen, von wo aus die cytoplasmatische Membran als eigentlicher Wirkort nur noch durch eine verhältnismäßig dünne Peptidoglycanwand geschützt ist [8]. Der schematische Aufbau der Zellwand von Gram-positiven und -negativen Bakterien ist in Abbildung 3 dargestellt. Leider ist eine strukturelle NMR-Untersuchung des antimikrobiellen Peptids direkt an der Bakterienmembran (noch) nicht möglich, so dass in dieser Arbeit Experimente mit verschiedenen Modellmembranen beschrieben werden, die lediglich bestimmte Aspekte bakterieller Zellmembranen gezielt berücksichtigen können.

Im Hinblick auf die Nutzung der antimikrobiellen Peptide für medizinische Zwecke ist der Erwerb von Resistenzen für Mikroorganismen gegenüber diesen Peptiden wesentlich komplizierter im Vergleich zu herkömmlichen Antibiotika. Während zum Beispiel beim Penicillin der Hauptgrund für die Resistenzentwicklung die Inaktivierung durch β -Lactamase ist, muss bei antimikrobiellen Peptiden eine Vielzahl von Mechanismen in Gang gesetzt werden, um deren Wirkungsweise zu umgehen. Die Peptide besitzen keine diskreten Sequenzen, die für ihre Aktivität verantwortlich sind, so dass z.B. Hydrolasen des periplasmatischen Raumes in der Epitoperkennung nur sehr unpräzise arbeiten. Sie können

somit kaum eine selektive Verteidigung gegen die kationischen Peptide in Gegenwart von zelleigenen Proteinen vornehmen. Eine weitere mögliche Variante stellt die Veränderung in der Zusammensetzung der Lipide der Plasmamembran dar, so dass die Biosynthese für saure Phospholipide unterdrückt wird und keine Bindungsstellen für die Peptide zur Verfügung stehen. Obwohl der Angriff mit Hilfe eines Peptid-Cocktails die Resistenzentwicklung auf Seiten des Mikroorganismus erschwert, sind die Zielzellen in der Lage Schutzmechanismen zu entwickeln. Solche Abwehrmechanismen auf strukturellem Niveau durch NMR-Untersuchungen in Modellmembranen nachzuvollziehen, könnte neuartige Einsichten in die Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden liefern.

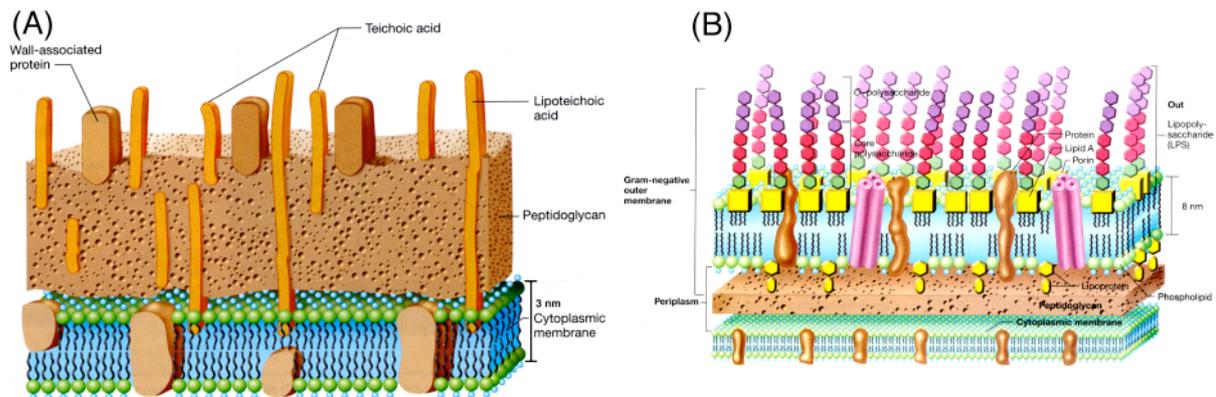


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der bakteriellen Zellwand von (A) Gram-positiven Bakterien (*Bacillus subtilis*) und (B) Gram-negativen Bakterien (*Escherichia coli*). Die cytoplasmatische Membran von Gram-positiven Bakterien ist mit einem Peptidoglycan-Geflecht bedeckt. Die Ausmaße der Zellwand von Gram-negativen Bakterien sind insgesamt größer, weil sie durch eine zusätzliche äußere Membran gekennzeichnet ist. Die äußere Membran wird durch Lipopolysaccharide abgedeckt und ist durch die Gegenwart von großen Porinproteinen für niedermolekulare Verbindungen dennoch diffusibel. (Übernommen nach Brock [8].)

1.1.3 Expression und Regulation

Die Abwehr von Mikroben gehört seit Beginn der mikrobiellen Entwicklung zu einem essentiellen Vorgang biologischer Organismen. Aus diesem Grund sind die Gene, die für die Expression verantwortlich sind, konserviert. Gene für antimikrobielle Peptide wurden bei *Drosophila* sequenziert und kloniert, so dass eine Identifikation von exprimierenden Geweben möglich wurde. Darunter zählen Blut-, Epithelial- und Fettkörperzellen, einem Organ, das der Leber von Vertebraten ähnelt. Die Genexpression des antifungalen Peptids Drosomycin wird durch einen NF κ B-homologen Transkriptionsfaktor eingeleitet, der durch den Toll-Pathways aktiviert wird. Wie erwartet zeigten *Drosophila*-Deletionsmutanten von beteiligten Proteinen eine deutlich höhere Anfälligkeit gegenüber Pilz-Infektionen. Für die Expression des

antimikrobiellen Peptides Diptericin sorgt der IMD-Pathway. Diese Signalwege sind demzufolge spezifische Antworten des Wirtsorganismus auf verschiedene physiologische Bedrohungen.

Auch für Vertebraten konnten die Signalwege identifiziert werden, die für eine Hochregulation von antimikrobiellen Peptiden sorgen. Menschen besitzen mindestens 10 verschiedene TLRs (Toll-like Receptors), die vor allem auf den Oberflächen von Makrophagen, Neutrophilen und Epithelialzellen zu finden sind. Sie bilden damit einen essentiellen Teil der angeborenen Immunität, indem sie auf Stimuli wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycan und bakterielle Flagellen reagieren und antimikrobielle Peptide entweder auf trockenen keratinisierten Oberflächen oder in einen mukosen Biofilm aus der Zelle abgeben. Des Weiteren dienen die entlassenen Peptide als Warnsystem für die adaptive Immunantwort, denn sie ziehen direkt T-Zellen und dendritische Zellen des Blutes an.

Diese Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf Mikroben sind evolutionär betrachtet sehr alte Mechanismen, die offenbar schon vor einer Milliarde Jahren vor der Aufspaltung der Organismen in Tiere und Pflanzen verbreitet waren, und unterstreichen ihre wichtige Stellung bei der Abwehr mikrobieller Pathogene [9].

1.2 Studium der Wirkungsweise antimikrobieller Peptide mit Hilfe von Modellmembranen und Festkörper-NMR

Aufgrund der Komplexität von natürlichen Membranen und ihrer schwierigen Handhabung sollen in dieser Arbeit Modellmembranen verwendet werden, um das Verständnis der Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit Biomembranen zu erhöhen.

1.2.1 Struktur von Biomembranen

Biomembranen bilden einen essentiellen Bestandteil lebender Zellen. Sie dienen als Begrenzung und zur Aufrechterhaltung der Unterschiede zwischen intra- und extrazellulärem Milieu. Ihr chemischer Hauptbestandteil sind Phospholipide, wie in Abbildung 4 dargestellt, also Moleküle, die sich durch eine hydrophile Kopfregion mit einer Phosphatgruppe und eine hydrophobe Schwanzregion mit einer Kohlenstoffkette auszeichnen und demzufolge amphipatischen Charakter besitzen. Auf dieser Grundlage setzen sich diese Moleküle mit ihrer möglichen Vielfalt zu einer Membran zusammen, da sie durch den hydrophoben Effekt begünstigt eine stabile Abgrenzung zur wässrigen Phase ausbilden.

Das Rückgrat des Lipidmoleküls wird durch ein Glycerolgerüst bereitgestellt, an dem Fettsäuren verestert und die Kopfgruppen über eine Phosphodiesterbindung angebracht sind.

Fettsäuren bilden den Ursprung der hydrophoben Region in Membranen und variieren dabei in einer Länge von 12-24 Kohlenstoffatomen und können vollständig gesättigt oder teilweise ungesättigt sein. Die Kopfgruppen zeichnen sich vor allem durch ihre unterschiedliche Ladung und Größe im Vergleich zum Schwanz aus. Eine weitere wichtige Gruppe von Membranlipiden sind die Sphingolipide und Cholesterol, die vor allem in eukaryotischen Membranen anzutreffen sind.

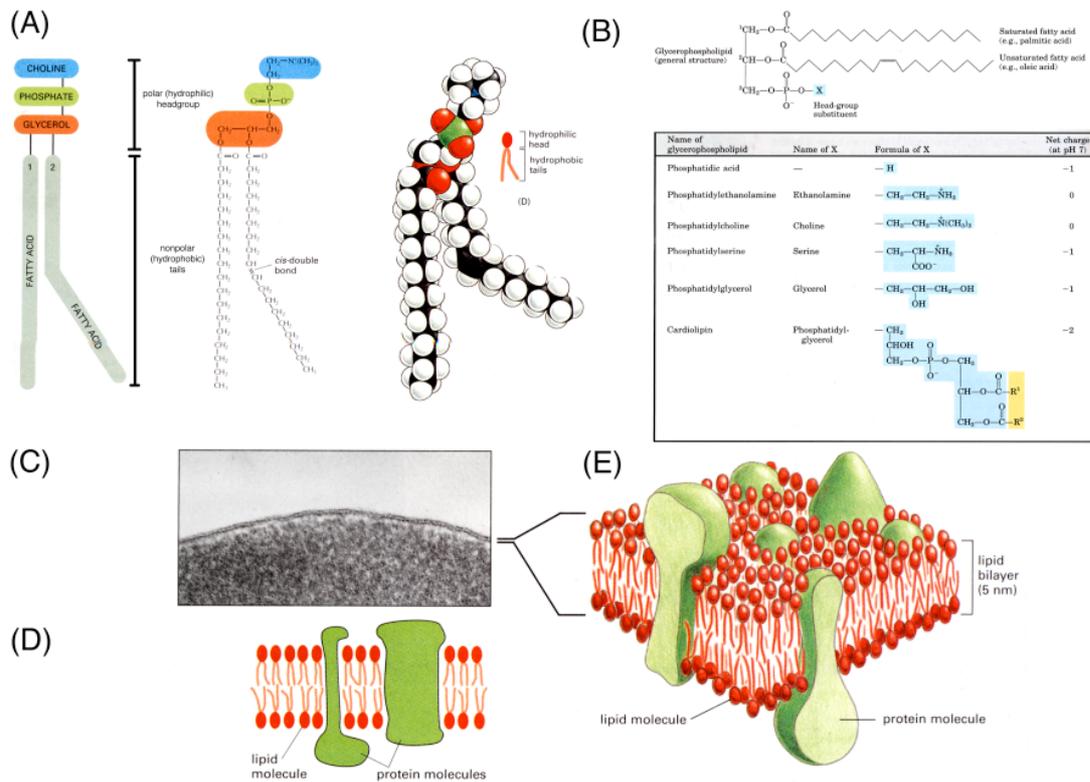


Abbildung 4: Darstellung der Struktur von Phospholipiden. (A) Schematischer Aufbau von Phospholipiden, die sich in eine hydrophile Kopfregion mit einer Phosphatgruppe und eine hydrophobe Schwanzregion mit einer Kohlenstoffkette aufteilen. (B) Tabelle mit wichtigen Kopfgruppen von Phospholipiden in der Biologie. (C) Elektronmikroskopische Aufnahme einer Plasmamembran von Erythrocyten. (D) Schematische 2D-Darstellung einer Biomembran mit einem hohen Anteil an assoziierten Proteinen. (E) 3D-Abbildung des Fluid-Mosaic-Modells nach Singer-Nicholson, welches die Biomembran als fluides Medium beschreibt, in dem Membranproteine lateral frei beweglich sind. ((A), (C), (D) und (E) übernommen von Alberts [9]. (B) Übernommen von Lehninger [10].)

Die genaue Zusammensetzung einer Biomembran ist charakteristisch auf der Ebene von Organismen, bei multizellulären Organismen auf der Ebene von Geweben, Zellen und sogar subzellulär verschieden. Diese jeweilige Mischung der individuellen Lipide macht den Charakter und die Funktionen von Biomembranen aus. Die Lipid-Doppelschicht stellt ein fluides Medium dar, in dem Membranproteine frei diffusibel eingebettet sind. Dieses Fluid-

1.2 STUDIUM DER WIRKUNGSWEISE ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE MIT HILFE VON MODELLMEMBRANEN UND FESTKÖRPER-NMR

Mosaic-Modell wurde in 70er Jahren von Singer-Nicholson entwickelt. Der Anteil von Membranproteinen ist Organismen-spezifisch und beträgt 30 – 75 %, wie der Übersicht von Tabelle 2 zu entnehmen ist. Ein Modellsystem für Biomembranen, welches vergleichsweise nah am natürlichen System liegt, ist der polare Lipid-Extrakt von *E. coli* Bakterien. Mit Hilfe dieser Lipidmischung konnten im Verlaufe der Diplomarbeit orientierte Proben für NMR-Untersuchungen hergestellt werden.

Tabelle 2: Übersicht über die Zusammensetzung von Zellmembranen in der Natur. (A) Aufteilung der Hauptkomponenten für beispielhafte Membranen von der menschlichen Nervenzelle bis zur E. coli-Membran. (B) Zusammensetzung der Phospholipid-Anteile in der E. coli-Membran. (C) Auflistung der Fettsäure-Komponenten von E. coli-Membranen. ((A) und (C) übernommen aus Lehninger [10].)

(A)

| Major Components of Plasma Membranes in Various Organisms | | | | | |
|---|--------------------------|--------------|--------|--------------|---------------------------------|
| | Components (% by weight) | | | | |
| | Protein | Phospholipid | Sterol | Sterol type | Other lipids |
| Human myelin sheath | 30 | 30 | 19 | Cholesterol | Galactolipids, plasmalogens |
| Mouse liver | 45 | 27 | 25 | Cholesterol | — |
| Maize leaf | 47 | 26 | 7 | Sitosterol | Galactolipids |
| Yeast | 52 | 7 | 4 | Ergosterol | Triacylglycerols, steryl esters |
| <i>Paramecium</i> (ciliated protist) | 56 | 40 | 4 | Stigmasterol | — |
| <i>E. coli</i> | 75 | 25 | 0 | — | — |

(B)

| Phospholipid Components of <i>E. coli</i> Polar Lipid Extract | |
|--|-------------|
| Phospholipids | % by weight |
| Phosphatidylethanolamine (PE) | 58 |
| Phosphatidylglycerol (PG) | 15 |
| Cardiolipin (CL) | 10 |
| Other | 17 |

Source: Data from Avanti Lipids® catalogue

(C)

| Fatty Acid | Percentage of total fatty acids* | | | |
|--|----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 10 °C | 20 °C | 30 °C | 40 °C |
| Myristic acid (14:0) | 4 | 4 | 4 | 8 |
| Palmitic acid (16:0) | 18 | 25 | 29 | 48 |
| Palmitoleic acid (16:1) | 26 | 24 | 23 | 9 |
| Oleic acid (18:1) | 38 | 34 | 30 | 12 |
| Hydroxymyristic acid | 13 | 10 | 10 | 8 |
| Ratio of unsaturated to saturated [†] | 2.9 | 2.0 | 1.6 | 0.38 |

Source: Data from Marr, A.G. & Ingraham, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260.

1.2.1.1 Eigenschaften von Modellmembranen

Die Zusammensetzung der Lipide bestimmt die Eigenschaften der Membran, die sehr stark durch ihre Fluidität und Dynamik gekennzeichnet ist. Chemisch reine Phospholipide unterliegen bei Steigerung der Temperatur einem Phasenübergang. Das Lipid DMPC, welches als Modelllipid durch seine unproblematische Handhabung weite Verbreitung in den Labors gefunden hat, ist unterhalb von 24 °C im so genannten Gelzustand in seiner lateralen Beweglichkeit stark eingeschränkt. Da die Lipide hoch geordnet und dicht gepackt sind, stellen die langsame Rotation der Lipide um die eigene Achse und vereinzelt *trans-gauche* Isomerisierungen die einzigen Bewegungen dar. Bei Temperaturerhöhung nimmt die

kinetische Energie der Acylketten zu, die van-der-Waals-Kontakte zwischen den Ketten nehmen ab, und die Lipid-Doppelschicht geht bei 24 °C sprungartig in den flüssig-kristallinen Zustand über. Im Zuge von kooperativen Prozessen und einer erhöhten Dynamik nimmt die Ordnung der Lipidpackung ab und die Acylketten unterliegen einer schnellen all-*trans* nach *gauche* Umwandlung ihrer Kettenkonfiguration. Demzufolge sinkt der Abstand zwischen gegenüberliegenden Phosphatgruppen auf der Ober- und Unterseite, und die Dicke der Membran nimmt ab. Die Übergangstemperatur einer chemisch reinen Lipidmembran vom Gel- in den flüssig-kristallinen Zustand ist für jeden Kopfgruppentyp und Acylkette spezifisch, da sie für die Packung der Lipide einen spezifischen Beitrag an van-der-Waals-Wechselwirkungen überwinden muss, wie Abbildung 5 zu entnehmen ist.

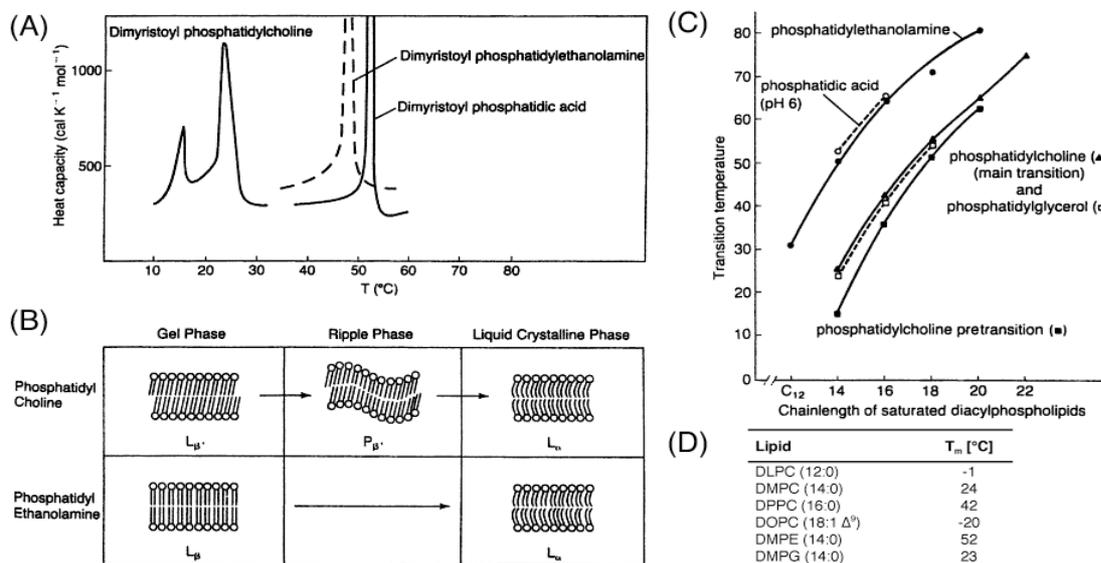


Abbildung 5: Darstellung zum Phasenübergang von Lipiden. (A) DSC – Differential Scanning Calorimetry misst den Übergang von der Gel- zur flüssig-kristallinen Phase der Lipid-Doppelschicht. (B) Schematische Darstellung von PC und PE-Übergängen, vom dicht gepackten Gel- in ein fluides lateral bewegliches System des flüssig-kristallinen Zustands. (C) Diagramm der Phasenübergangstemperaturen in Abhängigkeit von Kettenlänge und Kopfgruppe der Lipide. (D) Tabelle der Phasenübergangstemperaturen der in der Diplomarbeit eingesetzten Lipide. ((A), (B) und (C) übernommen von Gennis [11].)

Für Phosphatidylcholin (PC) ist die intermediäre Struktur einer Ripple Phase unterhalb des Haupt-Phasenübergangs bekannt, bei der die Kopfgruppen eine wellenförmige Oberfläche durch Unterschiede in den Kontaktflächen einnehmen. Sehr hohe Übergangstemperaturen besitzen Phosphatidylethanolamin (PE)-Lipide, deren hohe Phasenübergangstemperatur durch stabilisierende Wasserstoffbrücken zu Stande kommt. Biologische Membranen zeichnen sich durch einen fluiden Zustand aus und zeigen keinen derart scharfen Übergang zwischen den beiden Phasen, da für heterogene Lipidmischungen, wie sie in natürlichen Systemen

vorliegen, kein solch kooperativer Prozess eines sprungartigen Phasenübergangs zum Tragen kommt [11]. Um diesen flüssig-kristallinen Zustand zu simulieren, sollten alle biologisch relevanten Orientierungen oberhalb der Phasenübergangstemperatur untersucht werden.

1.2.1.2 Lipid-Polymorphismus

Neben der bis jetzt ausschließlich besprochenen Anordnung von Lipiden als eine Lipid-Doppelschicht gehören weitere regelmäßige Strukturen zum Repertoire des Auftretens jener Moleküle. Obwohl die direkte biologische Bedeutung dieser Phasen als Struktur der Zellmembran noch nachzuweisen ist, sind sie für die Charakterisierung von Modellmembranen unabdingbar. Möglicherweise spielen sie eine Rolle in Übergangszuständen biologischer Prozesse, wie z.B. auch bei der Membranzerstörung durch antimikrobielle Peptide, bei dem die Lipid-Doppelschicht-Anordnung der Membran deformiert werden muss. Die Argumentation läuft auf die geometrische Form des Phospholipidmoleküls und deren Packungsverhalten hinaus, wie sie in Abbildung 6A illustriert ist, wobei z.B. PE mit seiner kleinen Kopfgruppe die Form eines Kegels nachempfunden. Per Definition entsteht dadurch eine negative Krümmung an der Membran, da die kleinen Kopfgruppen im Vergleich zu ihren Schwänzen dichter aneinander gepackt werden können. Dies gilt als rationale Begründung, warum die Gegenwart von PE Vorgänge wie die Ausbildung von Lipid-Poren hemmt und Membranfusionen fördert. Als ein möglicher Mechanismus für die Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden werden Peptid-stabilisierende Lipid-Poren (toroidale Pore) diskutiert.

Die geometrische Form des Lipidmoleküls bestimmt die Ausbildung der entsprechenden Lipidphase, deren Namensbezeichnung sich auf die Symmetrie der Anordnungen bezieht. So können chemisch reine PE-Lipide invertierte hexagonale Phasen ausbilden. Analog dazu gleichen PC-Lipide einem Zylinder, so dass sie die Lipid-Doppelschicht, die so genannte lamellare Phase, stabilisieren. Lysophospholipide bilden Mizellen aus, die aus Lipiden mit großen Kopfgruppen hervorgehen, also eine positive Krümmung der Membran hervorrufen. Solche Krümmungen können hexagonale Phasen begünstigen, bei denen der Querschnitt einer Mizelle entlang eines Schlauches verlängert ist, wie die Abbildung 6B verdeutlicht. Des Weiteren gehen zylindrische Lipide unter bestimmten Bedingungen eine weitere Phase ein: die kubische, wie sie in Abbildung 6C illustriert ist. Sie ist durch einen wiederkehrenden Block von Lipid-Doppelschichten gekennzeichnet, der Raum für Wasserkanäle bildet. Wenngleich die Regelmäßigkeit und Vielfalt dieser Strukturen für die Zelle als Membranstruktur ungeeignet scheint, kann die Kenntnis solcher Anordnungen

interessante Hinweise auf die Ausbildung bestimmter funktionaler Lipidstrukturen in der Zelle liefern.

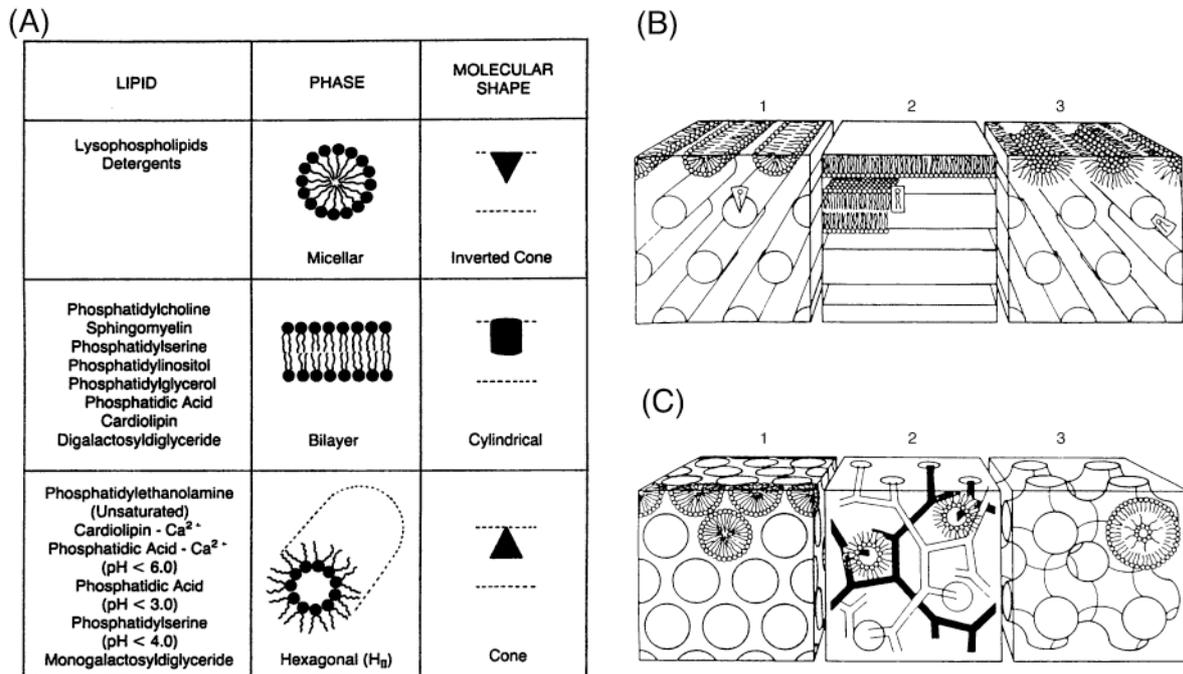


Abbildung 6: Der Lipid-Polymorphismus: (A) Einteilung der verschiedenen Lipidkopfgruppen nach bevorzugten Lipid-Phasen: 1. Mizellare hexagonale, 2. Lamellare Doppelschicht und 3. Invertierte hexagonale Phase. (B) 3D-Ansicht dieser Phasen in einem Würfel. (C) Weitere 3D-Darstellungen von Möglichkeiten der Ausbildung einer kubischen Phase: 1. Sphärische 2. Stäbchen-förmige 3. Lamellare Aggregate. ((A) Übernommen von Gennis [11].)

1.2.2 Strukturbiologie in Membranen

Die Strukturbiologie untersucht den Aufbau von Biomolekülen auf atomarem Niveau und hat einen großen Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise von Proteinen geleistet. Sie dient als Grundlage für viele Interpretationen aus dem gesamten Forschungsbereich der molekularen Biologie. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind über 17000 Proteinstrukturen in der PDB-Datenbank abgelegt worden [12]. Von den 17000 Strukturen sind nur ein Bruchteil (ca. 0,5 %) Strukturen von Membranproteinen, obwohl diese schätzungsweise ein Drittel des Genoms ausmachen. Hauptursache dafür ist die schlechte Kristallisierbarkeit von Membranproteinen, da sie durch ihre hydrophoben Oberflächen zur Aggregation in wässrigen Lösungen neigen. 1975 wurde die Struktur des Bakteriorhodopsin auf 7 Å Genauigkeit elektronenmikroskopisch charakterisiert [13]. 1984 konnte die erste Membranstruktur des Photoreaktionszentrum auf atomarem Niveau gelöst werden [14]. Diesen Erfolgen gingen eine Vielzahl von missglückten Versuchen voraus, so dass sie eher die Ausnahme für die Auflösung von Membranstrukturen bleiben werden. Aus diesem Grunde müssen neue

Methoden entwickelt werden, die das strukturelle Verständnis von Membranproteinen erhöhen. Eine Möglichkeit dafür stellt die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) im Festkörper dar, die im Gegensatz zur herkömmlichen biomolekularen NMR keine löslichen Proteine benötigt. Einen Durchbruch erzielte 1993 die Arbeitsgruppe um T. Cross, die als erste die gesamte Struktur des antimikrobiellen Peptids Gramicidin A auf der Grundlage von 144 gesammelten Orientierungseinschränkungen (engl. „Orientational Constraints“) in einer makroskopisch orientierten Lipidumgebung bestimmten [15]. Für größere Membranproteine scheint eine solche Strategie nicht mehr geeignet, da die Vielzahl der Einschränkungen unüberschaubar wird. Mit dem steigendem Erkenntnisgrad in der Strukturbiologie können Modelle jedoch sinnvoll mit diesem Ansatz kombiniert werden, so dass sie Aussagen liefern, die vorher schlicht unzugänglich waren.

1.2.2.1 Strukturmerkmale von Membranproteinen

Ein prinzipieller Vorteil der Anwendung der „Orientational Constraints“-Strategie für Membranproteine resultiert aus der relativ geringen Anzahl von Faltungsmotiven, da die Umgebung der Membran aufgrund der polaren Natur der Aminosäuren nur eine begrenzte Anzahl an Strukturen zulässt. Diese Tatsache soll auch in der Auswertung der gemessenen Strukturparameter eine wichtige Rolle spielen.

Zur besseren Anschaulichkeit sind die Faltungsmotive der Membran in Abbildung 7 illustriert. Ein sehr häufiges Motiv ist die Transmembranhelix, die im Membraninnern vor allem durch hydrophobe Aminosäuren gebildet wird, was eine Vorhersage über ein Hydrophathie-Diagramm relativ einfach ermöglicht. Der Hydrophathie-Plot zeigt die relative Hydrophobizität der Aminosäurereste entlang der Peptidkette. Damit sind im Diagramm solche Bereiche deutlich erkennbar, die für einen Membranbereich in Frage kommen [16]. An den sauren Lipidkopfgruppen sind häufig basische Aminosäuren anzutreffen. In der Grenzregion zwischen hydrophobem Membraninnern und Phospholipidköpfen treten aufgrund ihrer Dipoleigenschaften gehäuft aromatische Aminosäuren auf. Interessanterweise sind die Aminosäuren Prolin und Glycin im Vergleich zu α -Helices in löslichen Proteinen überrepräsentiert, was auf die essentielle Funktion dieser Aminosäuren als Helixbrecher oder intra- bzw. intermolekulare Kontaktbildner hinweist. Solche Helices können auch Cluster bilden oder die Membran als Kanal mit hydrophilen Aminosäuren zum Kanalinneren weisend durchspannen, um die Passage von Wasser und darin gelösten Verbindungen zu erlauben. Solche Strukturen wurden für die antimikrobiellen Peptide Gramicidin A und Alamethicin vorgeschlagen, wobei diese ihren hohen Ordnungsgrad durch Oligomerisierung erreichen.

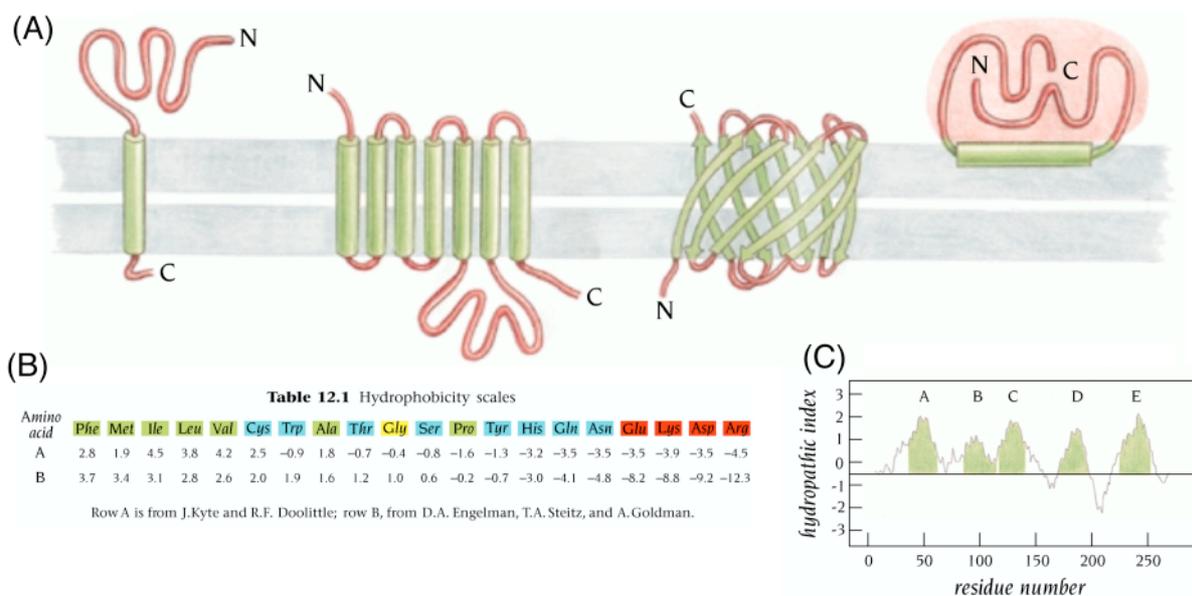


Abbildung 7: (A) Darstellung von möglichen Faltungsmotiven in einer Membrumgebung: Transmembran-Helices isoliert bzw. im Cluster, β -Barrel-Porine, periphere Proteinbindung. (B) Hydrophobizitätsindex nach Kyte/Doolittle und Engelmann/Steitz/Goldmann. (C) Hydropathie-Diagramm für Membranproteine. (Übernommen von Branden und Tooze [16].)

Ein weiteres Faltungsmotiv für Membranproteine sind die aus β -Faltblatt-Konformationen bestehenden Porine, die einen wichtigen Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien ausmachen. Sie sind aus einem β -Barrel-Motiv aufgebaut, dessen β -Stränge aneinander gelegt einen Kanal auskleiden. Hydrophobe und hydrophile Aminosäuren alternieren in der β -Struktur und verleihen dem Protein einen amphipathischen Charakter. Des Weiteren können Membranproteine auch peripher an der Membranoberfläche durch hydrophobe Seitenketten oder über Lipidanker assoziiert sein. Dieser Gruppe von Membran-assoziierten Proteinen ähneln antimikrobielle Peptide in ihrem Ausgangszustand, wenn sie sich an die Membran annähern. Ein solcher Zustand wurde für PGLa bereits im Vorfeld dieser Arbeiten durch NMR-Untersuchungen beschrieben [51].

1.2.2.2 Grundlagen der Festkörper-NMR

Konventionelle NMR-Methoden in Lösung werden seit den 80er Jahren für die Bestimmung der 3D-Struktur von Biomolekülen angewandt. Grundprinzip ist die intrinsische Eigenschaft bestimmter Atomkerne, ein magnetisches Moment und damit einen Kernspin zu besitzen. In Gegenwart eines starken externen Magnetfeldes können durch die Einstrahlung von Radiofrequenzpulsen Quantenzustände dieses Kernspins ineinander überführt werden. Dabei ist die Frequenz für die NMR-aktiven Kerne charakteristisch und wird als Larmor-Frequenz

1.2 STUDIUM DER WIRKUNGSWEISE ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE MIT HILFE VON MODELLMEMBRANEN UND FESTKÖRPER-NMR

bezeichnet. In einem starken Magnetfeld übt die elektronische Umgebung der Kerne der benachbarten chemischen Gruppen einen spürbaren Einfluss auf das lokale Magnetfeld am Kernspin aus, so dass sie entschirmt oder abgeschirmt werden, was eine leichte Abweichung der Resonanzfrequenz hervorruft. Diese Veränderung wird als chemische Verschiebung in ppm angegeben und ist für bestimmte chemische Gruppen spezifisch. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 8 dargestellt.

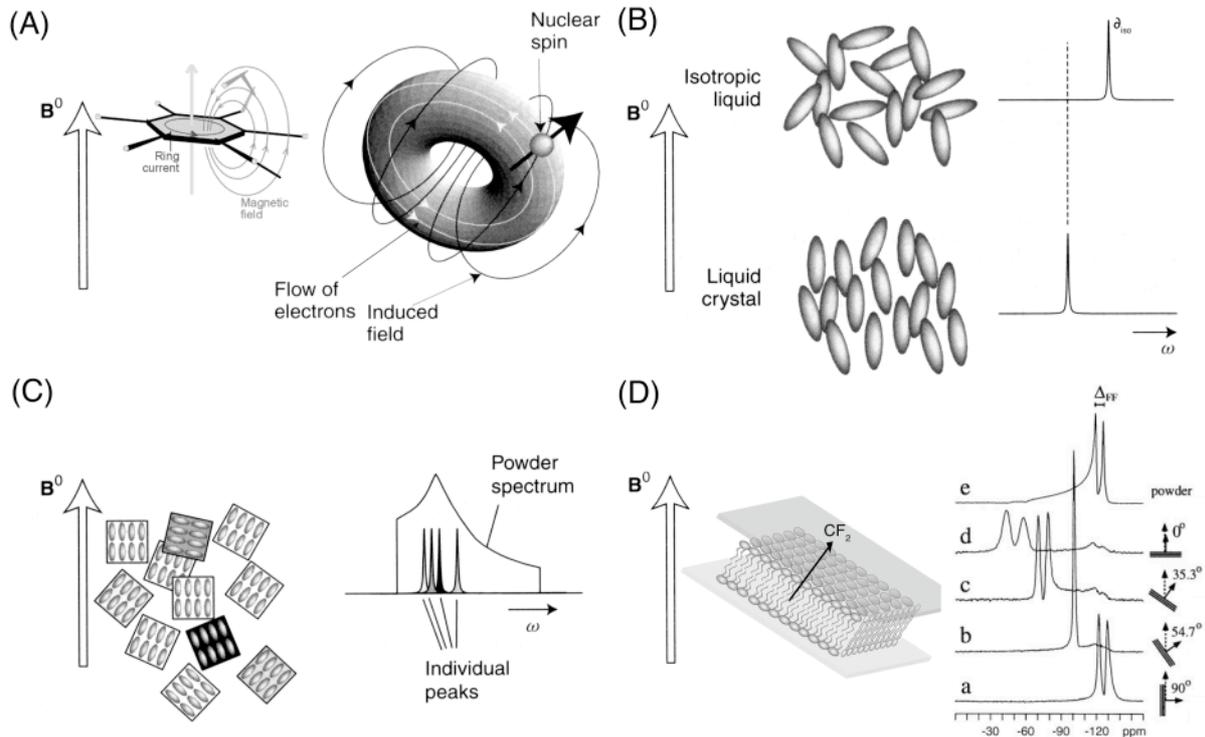


Abbildung 8: Schaubilder zu den Prinzipien der NMR. (A) Darstellung des Prinzips der chemischen Verschiebung. Eine Elektronenwolke, deren Elektronen um einen Kernspin kreisen, induziert dadurch ein zusätzliches Magnetfeld, welches das externe Magnetfeld je nach Lage stärkt oder schwächt. (B) Gegenüberstellung: Kernspins in einer isotropen Flüssigkeit mit frei beweglichen Molekülen bzw. im Flüssigkristall mit eingeschränkter Beweglichkeit. Die Resonanzfrequenzen zeigen zum einen eine ausgemittelte chemische Verschiebung am isotropen Wert und zum anderen einen Orientierungs-abhängigen Wert der chemischen Verschiebung. (C) Die Summe aller möglichen Orientierungen in einem Festkörper bildet ein Pulverspektrum. (D) In einer flüssig-kristallinen orientierten Lipid-Doppelschicht werden die Dipolkopplungen nicht wie in Lösung aufgehoben. Die Dipolwechselwirkung wird als Aufspaltung der Signale sichtbar und korrespondiert direkt mit der Orientierung der Spingruppe zum äußeren Magnetfeld. Die Veränderung der Aufspaltung für eine statische CF₂-Gruppe kann durch die Drehung der makroskopisch-orientierten Probe zum Magnetfeld herbeigeführt werden. (Übernommen von Levitt [17] und Grage [18].)

Bei der klassischen NMR in Lösung diffundieren und rotieren die Moleküle im Rahmen der NMR-Zeitskala sehr schnell, so dass die einzelnen lokalen Unterschiede ihrer momentanen Orientierungen ausgemittelt werden und im Spektrum isotrope Peaks erscheinen. Ein

Flüssigkristall, wie beispielsweise eine Lipidmembran, ist in einer Bewegungsrichtung eingeschränkt: in diesem Fall der Translationsbewegung von Molekülen. Im Festkörper findet weder Translations- noch Rotationsbewegung statt, so dass die lokalen Unterschiede im Aufbau der Moleküle in der NMR zum Tragen kommen und für sehr breite anisotrope Peaks mit charakteristischen Linienformen in den Spektren sorgen.

Es gibt zwei prinzipielle Beiträge, die für eine hohe Linienbreite der Spektren sorgen. Zum einen werden die Magnetfeldbeiträge von anderen Kernen nicht mehr aufgehoben, und zum anderen ist die bevorzugte Position einer chemischen Gruppe dafür verantwortlich, dass das externe Magnetfeld lokal gestärkt oder geschwächt (, d.h. entschirmt oder abgeschirmt wird). Diese Tatsache spiegelt sich dann im Spektrum wider, indem eine bevorzugte Orientierung der chemischen Gruppe direkt von der chemischen Verschiebungsanisotropie (CSA-Position des Peaks in ppm) oder der dipolaren Kopplung (DD-Signalaufspaltung) abhängt, wie in Abbildung 8C und D schematisch dargestellt [19]. Beide NMR-Wechselwirkungen ermöglichen eine rechnerische Bestimmung des Winkels θ der Orientierung in Bezug auf das Magnetfeld nach folgender Gleichung: CSA, DD $3 \cos^2 \theta - 1$. Diese Winkelbestimmung dient als Grundlage der „Orientational Constraints“-Strategie, mit deren Hilfe in dieser Arbeit die Orientierung des PGLa-Moleküls relativ zur Membran ausgerichtet werden soll.

1.2.2.3 Anwendung der Fluor-NMR

Um viele verschiedene Parameter in einer Versuchsanordnung von antimikrobiellen Peptiden und der Membran messen zu können, erweisen sich die sonst biologisch eingesetzten ^{15}N - oder ^{13}C -Kerne aufgrund langer Messzeiten als unpraktikabel. Wasserstoff und Fluor hingegen besitzen die höchsten magnetischen Momente von allen Isotopen des Periodensystems neben dem radioaktiven Tritium, wodurch sie die höchste Sensitivität und die stärksten Dipolkopplungen erlangen. Deswegen scheint es nicht überraschend, dass ^1H der meist gebrauchte Kern in der Lösungs-NMR ist. Für Festkörper-NMR wird die hohe Sensitivität und natürliche Häufigkeit der Protonen zum Nachteil, da die starken Dipolwechselwirkungen unspezifisch zu einer sehr starken Linienverbreiterung führen. Für den ^{19}F -Kern hingegen gibt es in biologisch relevanten Proben keinen natürlichen Hintergrund. Durch Protonen-Entkopplung können die Fluor-Signale von den dipolaren Störungen durch die ^1H -Spins befreit werden. Mit einer natürlichen Häufigkeit des ^{19}F -Isotops von 100 % und einer 83 %igen Empfindlichkeit im Vergleich zu ^1H ist der Kern sehr gut für

1.2 STUDIUM DER WIRKUNGSWEISE ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE MIT HILFE VON MODELLMEMBRANEN UND FESTKÖRPER-NMR

die NMR-Analyse geeignet (siehe Tabelle 3). Die sonst in der Strukturbiologie eingesetzten Kerne wie ^{13}C und ^{15}N sind um zwei bzw. drei Größenordnungen weniger sensitiv, so dass für ein adäquates Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich längere Messzeiten in Kauf genommen werden müssen.

Die Einführung einer ^{19}F -markierten Aminosäure in ein Peptid stellt aufgrund der Fortschritte in der Fluor-Synthesechemie kein prinzipielles Problem mehr dar. Wenn man zu Grunde legt, dass der Einfluss der Markierung nur zu einer lokal begrenzten Veränderung der Konformation des Proteins führt, so dass die allgemeine Raumstruktur unbeeinflusst bleibt, kann die ^{19}F -NMR sehr aussagekräftige Informationen über Strukturparameter liefern. Des Weiteren stellt der ^{19}F -Kern nicht unbedingt einen Fremdkörper in Biomolekülen dar, weil die C-F Bindung eine sehr ähnliche Geometrie aufweist, wie C-H oder C-OH Bindungen. Durch seine hohe Polarität ist das Fluor ein potentieller Wasserstoffbrücken-Akzeptor, aber die gleichzeitig erhöhte Hydrophobizität macht es für Markierungen in Membranumgebungen geeignet.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Eigenschaften von Nuclei mit Spin 1/2 und Relevanz in der Strukturbiologie. (Modifiziert nach Gerig [20].)

| NMR-Kern | Gyromagnetisches Verhältnis (in $\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1} \times 10^{-7}$) | NMR-Frequenz (in MHz 11,75 T) | Natürliche Häufigkeit (in %) | Relative Empfindlichkeit (bei konstanter Anzahl von Kernen) | Bereich der chemischen Verschiebung (in ppm) |
|-----------------|--|---|--|---|--|
| ^3H | 28,535 | 533 | 0 | 1,2 | 13 |
| ^1H | 26,7519 | 500 | 99,98 | 1,0 | 13 |
| ^{19}F | 25,181 | 470,4 | 100 | 0,83 | 400 |
| ^{31}P | 10,841 | 200,2 | 100 | 0,066 | 530 |
| ^{13}C | 6,7283 | 125,7 | 1,108 | 0,0159 | 250 |
| ^{15}N | -2,712 | 50,7 | 0,37 | 0,00134 | 1700 |

Unsere Arbeitsgruppe um Prof. Anne Ulrich konnte mit mehreren Publikationen (zusammengefasst in Abbildung 9) zeigen, dass sich Fluor für die Aufklärung bestimmter Strukturparameter in orientierten Peptid-Lipid-Systemen sehr gut eignet. So wurden ^{19}F -markierte Aminosäuren für das Studium der Wechselwirkung von Gramicidinen einer anderen Gruppe von antimikrobiellen Peptiden mit Biomembranen eingesetzt. Salgado verfolgte die Strategie der Einführung der 4-Fluor-Phenylglycin-Aminosäure mit einer starren Verbindung zum Peptidrückgrat. Damit bestimmte er die interatomaren Abstände zweier Seitenketten zur Verifizierung der bekannten Struktur und davon ausgehend die Orientierung im Vergleich zur Membrannormalen [21]. Er arbeitete dabei mit dem markierten Peptid in orientierten Membranen, die sich zwischen Glasplättchen aufeinander gestapelt unter

adäquaten Hydratationsbedingungen entlang der Glasoberfläche anordnen. Damit bestimmte er die bevorzugte Lage des Peptids in Bezug auf die Membran und konnte mit einer erhöhten Sensitivität messen, da das ^{19}F -NMR-Signal auf ein schmales Signal verdichtet wird. Analog verwendete Grage die Aminosäure 5-Fluor-Tryptophan zur Bestimmung der Orientierung dieser Seitenkette [22]. Er zeigte weiterführend, dass in Membranen die Orientierung einer markierten Gruppe nicht nur mit Hilfe der CSA, sondern auch mit Hilfe der Dipolkopplung einer Trifluoromethylgruppe bestimmt werden kann [23]. Nach der Etablierung dieser Methoden in unserer Arbeitsgruppe erschien es sinnvoll, die Messung von Winkeleinschränkungen auf der Basis von Dipolkopplungen einer Trifluoromethylgruppe auf das antimikrobielle Peptid PGLa anzuwenden, um umfangreiche Untersuchungen zur Aufklärung seines Wirkmechanismus durchzuführen.

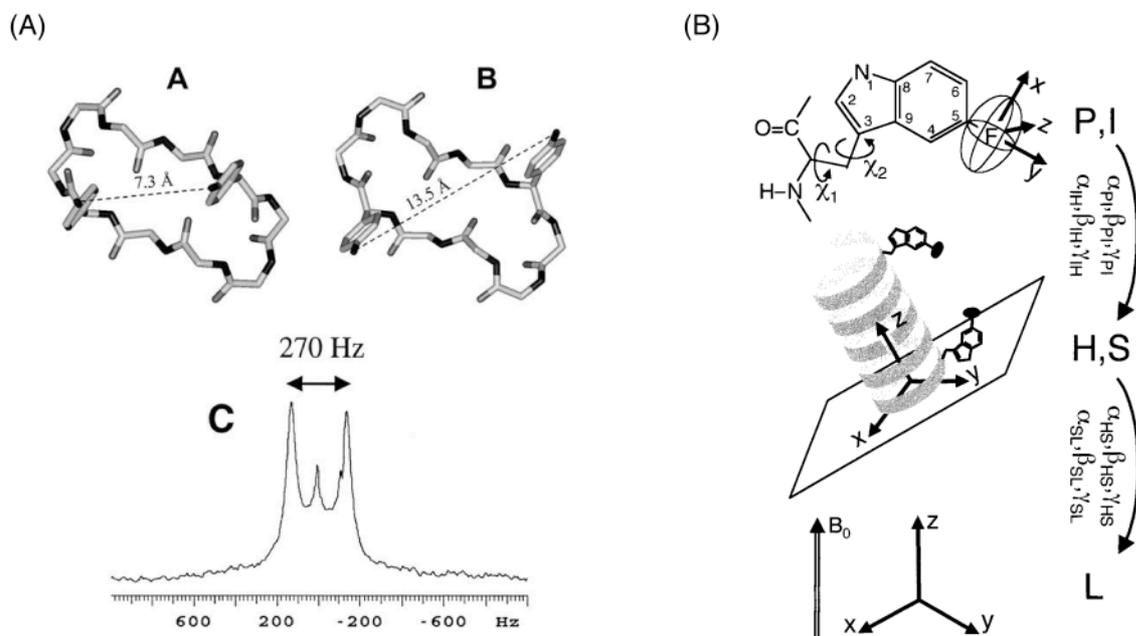


Abbildung 9: (A) Salgado verwendete zur Bestimmung der interatomaren Abstände von zwei Seitenketten in Gramicidin S die Markierung 4-Fluor-Phenylglycin. (B) Grage setzte für die Orientierungsbestimmung der Gramicidin A-Helix die nicht-proteinogene Aminosäure 5-Fluor-Tryptophan ein. ((A) Übernommen von Salgado [21] und (B) von Grage [23].)

1.3 PGLa – ein antimikrobielles membranaktives Peptid des Krallenfroschs

Bei chirurgischen Eingriffen zur routinemäßigen Entnahme von Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* trat eine überraschend niedrige Entzündungsrate der Wunden auch bei unsterilen Arbeiten auf, so dass eine potentiell desinfizierende Wirkung der Haut postuliert

wurde. Aus den Extrakten der Froschhaut konnten antimikrobiell wirksame Peptide isoliert werden, die unter dem Namen Magainine zusammengefasst wurden. Der Name besitzt hebräische Wurzeln und bedeutet Schild. Er steht für den Schutz vor antibakterieller Infektion [24]. Des Weiteren konnten diese Peptide in Magenextrakten der Frösche identifiziert werden [25]. Hauptbestandteil der Extrakte sind Peptidyl-Glycylleucin-Carboxyamid (PGLa) mit 21 Aminosäuren, Magainine mit 23 Aminosäuren und Xenopsin Precursor Protein mit 25 Aminosäuren [26]. Ihre Primär- und Sekundärstruktur ist in Abbildung 10A und B zusammengefasst. Das wichtigste Merkmal dieser und anderer antimikrobieller Peptide ist der amphiphile Charakter der Moleküle im jeweils funktionell gefalteten Zustand.

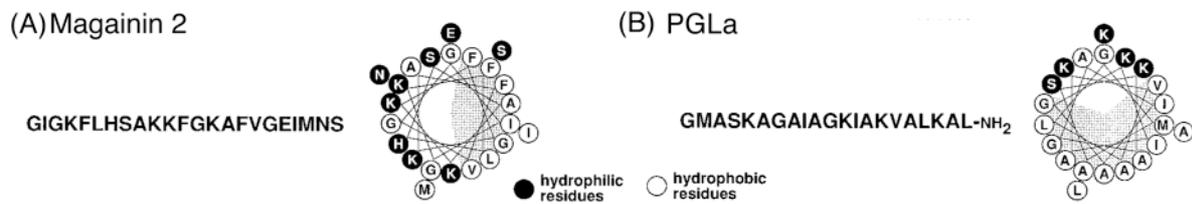


Abbildung 10: (A) Magainin 2 ist ein verwandtes Peptid von (B) PGLa. Beide antimikrobiell wirksame Substanzen wurden aus der Haut von Fröschen isoliert. Sie besitzen keine Sequenzhomologie, PGLa bildet aber ebenso eine amphiphile α -Helix mit einer größeren hydrophoben Oberfläche aus. Übernommen von Matsuzaki [33].

1.3.1 Strukturmodelle der Funktionsweise antimikrobieller Peptide

Die Erklärung des exakten Wirkmechanismus auf strukturellem Niveau ist für ein rationales Medikamentendesign von herausragender Bedeutung. Im Verlaufe der 90er Jahre wurden drei verschiedene Modelle der prinzipiellen Funktionsweise der amphiphilen kationischen Peptide herausgearbeitet, die in der gegenwärtigen Literatur stets als Diskussionsgrundlage dienen: 1. das Carpet-Modell, 2. das Barrel-Stack-Modell und 3. die toroidale Pore oder Wurmloch-Modell (siehe Abbildung 11). Das Carpet-Modell sieht keine geordnete Assoziation der Peptide mit sich selbst oder den Lipiden vor, sondern stellt den Vorgang der Membranpermeabilisation als einen unspezifischen Destabilisierungsprozess dar. Das Barrel-Stack-Modell und die toroidale Pore tragen dem Konzept einer strukturell geordneten Pore Rechnung. Nach der Aufklärung der ersten Membranproteinstrukturen und der Struktur des ersten antimikrobiellen Peptids Gramicidin A galt eine Ionenkanalbildung nach deren Vorbild als sehr plausibel.

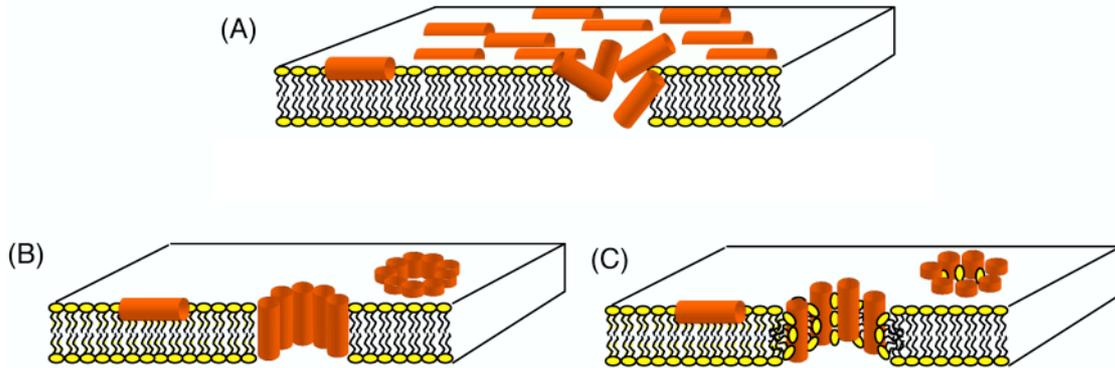


Abbildung 11: Schematische Darstellung der drei diskutierten Strukturmodelle für die Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden. (A) Das Carpet-Modell basiert auf der peripheren Bindung der amphipathischen Peptide, die bei hoher Konzentration zu einer spontanen Leckschlagung der Membran führt. (B) Beim Barrel-Stave-Mechanismus bilden die Transmembran-Helices eine Pore. (C) Das Modell der toroidalen Pore sieht eine Assoziation der kationischen Peptide mit anionischen Lipidkopfguppen vor, die dadurch in eine positive Krümmung gezwungen werden. (Übernommen von Ulrich.)

Mit der elektrostatischen Anziehung der kationischen Peptide an die Phospholipid-Kopfgruppen der bakteriellen Membran richten sich die amphiphilen Peptide an der Membranoberfläche aus. Sie befinden sich im S-Zustand (S = surface bound, engl. Oberflächen gebunden), der Prozess der Ausbildung einer geordneten Sekundärstruktur beginnt. Diese wird durch eine Rotation des Peptids um die Helixachse und das Eindringen der hydrophoben Oberfläche des Peptids in den inneren Bereich der Lipid-Doppelschicht begleitet, so dass die positiven Ladungen mit den Phospholipid-Kopfgruppen teilweise neutralisiert werden. Bis zu diesem Schritt lassen sich alle Befunde mit den drei genannten Modellen vereinbaren. Für das Carpet-Modell wird eine gewisse Akkumulation von Peptiden auf der Membranoberfläche postuliert, die aber als Folge der Abstoßung durch ihre eigene hohe Ladung nicht assoziieren können. Die Permeabilisation vollzieht sich in einer Detergenz-ähnlichen Wirkungsweise, so dass die amphipathischen Bereiche für eine Destabilisierung der Lipid-Doppelschicht sorgen [27]. Diese Funktionsweise benötigt keine Insertion senkrecht zur Membranebene, da Membranzerstörung schon vor der Umorientierung detektiert wird. Die Ausbildung einer strukturell geordneten Pore des Barrel-Stave- bzw. toroidalen Modells wird im Verlaufe des Konzentrationsanstiegs vom Peptid durch einen kooperativen Vorgang der Peptid-Peptid- oder Peptid-Lipid-Assoziation auf der Membranoberfläche eingeleitet. Dies ist der entscheidende Schritt im Wirkprozess, denn nur so lässt sich der Aufenthalt von teilweise polaren Peptiden in einer Umgebung mit niedriger Dielektrizitätskonstante erklären [28]. Die Selbstassoziation des Peptids ermöglicht

anschließend das Eintauchen in den hydrophoben Kern der Membran, so dass die Peptide die Membran durchspannen und in einer I-Orientierung (I = inseriert) vorliegen. Für den detaillierten Aufbau der Pore in Bezug auf die Lipide gibt es im folgenden zwei Möglichkeiten. Zum einen können sie wie Helix-Bündel von Bakteriorhodopsin in direktem Kontakt mit den Acylketten der Phospholipide stehen, was als das Barrel-Stage-Modell diskutiert wird. Dabei sind die apolaren Seitenketten ins Innere der Membran und die polaren Bestandteile ins Innere der Pore gerichtet. Zum anderen sind die Peptide beim toroidalen Porenmodell in der Lage, die Phospholipide in eine positive Krümmung zu zwingen, so dass der Kontakt der polaren Seitenkette mit den Lipidkopfgruppen erhalten bleibt und die Lipidkopfgruppen als integrierter Bestandteil die Pore stabilisieren.

Für bestimmte Peptide sind distinkte Modelle zugewiesen und akzeptiert, wie z.B. die Barrel-Stage-Struktur des cytotoxischen Alamethicin. Trotzdem werden für die Mehrheit der Peptide die experimentellen Ergebnisse in dem Spannungsfeld der drei Modelle diskutiert. Es zeichnet sich ab, dass keines der Modelle als Dogma Gültigkeit besitzt. Jedes Peptid gibt individuelle Voraussetzungen vor, aus denen die verschiedenen Modelle resultieren. Experimentelle Befunde bestimmter Peptide legen auch eine synergistische Wirkung bzw. eine Umlagerung von dem einen in einen anderen Zustand nahe.

Ein messbarer Vorgang, der mit der Ausbildung der beschriebenen Strukturen einhergeht, ist die Umorientierung der Peptide vom S- in den I-Zustand. Bei der Aufklärung solcher Wirkmechanismen erweisen sich Orientierungsmessungen mit Festkörper-NMR als Methode der Wahl, da sich die Lage einzelner molekularer Segmente exakt zur makroskopisch-ausgerichteten Lipid-Doppelschicht bestimmen lässt. Dadurch gewonnene Einsichten in die Peptid-Membran-Wechselwirkung dienen als Ausgangspunkt für das rationale Verständnis von Bindung und Selbstassoziation, also der Funktionsweise antimikrobieller Peptide. Diese Erkenntnisse ermöglichen vielleicht eine Optimierung oder Mimetisierung solcher Verbindungen, die dann gezielt und zuverlässig zum therapeutischen Einsatz als antimikrobielle Wirkstoffe kommen können.

1.3.2 PGLa – ein Literaturüberblick

Ein Literaturüberblick ist als Ausgangspunkt zur Untersuchung der Orientierung des antimikrobiellen Peptids PGLa in Modellmembranen hilfreich, da er mögliche Hinweise für den experimentellen Ansatz und die spätere Diskussion liefern kann. Die ersten Publikationen nach der Isolation der Magainine untersuchten mit Hilfe von antimikrobiellen, hämolytischen und Antimalaria-Assays die D-Spiegelbilder der Peptide, die im Vergleich zu den L-Peptiden

eine identische biologische Aktivität aufwiesen. Dieser Befund wies auf die Plasmamembran als Wirkort im Gegensatz zu einer chiralen Rezeptor-Interaktion hin [5, 29].

Anhand von CD-, Raman- und FT-IR Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass PGLa und Magainin 2 in wässriger Lösung in einem unstrukturierten Random Coil vorliegen und in Umgebung mit niedriger Dielektrizitätskonstante eine α -Helix Struktur ausbilden, die amphipathischen Charakter besitzt, wie in Abbildung 10B illustriert ist [30]. Obgleich sie keine Sequenzhomologie besitzen, weisen beide die typische Trennung von polaren und apolaren Bereichen auf. PGLa besitzt mit +5 eine etwas höhere Nettoladung als Magainin 2 (+3 bis +4) und einen bedeutend niedrigeren Winkel, der durch polare Reste eingeschlossen wird. Ein Vergleich der Primär- und Sekundärstrukturen ist der Abbildung 10 zu entnehmen. Des Weiteren wurde mit Hilfe von CF(6-Carboxyfluorescein)-Fluoreszenz-Messungen und hämolytischen Tests eine synergistische Wirkungsweise der beiden Peptide nachgewiesen - ein Indiz dafür, dass antimikrobielle Peptide zusammen wirksam sind und ihre einzeln erhaltenen Ergebnisse stets in diesem Kontext diskutiert werden sollten [31, 32].

Weiterführende Mutationsstudien zeigten eine exakte molekulare Erkennung der beiden Peptide mit 1:1 Stöchiometrie detektiert durch Dye-Release-Messungen und Crosslinking [33, 34]. Diese Experimente legen einen analogen Wirkmechanismus für die Funktionsweise der individuellen Peptide nahe. Eine NMR-Struktur von Magainin 2 in Vesikeln wurde publiziert, deren Autoren mit Hilfe von NOEs eine antiparallele Homodimer-Struktur errechnet haben (siehe Abbildung 12A) [35]. Aufgrund der großen Anzahl von Publikationen für das antimikrobielle Peptid Magainin 2 und seiner Ähnlichkeit in der Wirkungsweise zu PGLa erscheint es sinnvoll, auf die gewonnenen Erkenntnisse der Magainin 2 Untersuchungen zurückzugreifen, um Hinweise auf den Wirkmechanismus von PGLa zu erhalten. Magainin 2 wird stets als Paradigma für den Mechanismus der toroidalen Pore diskutiert. Eine der ersten Arbeiten, die diese Hypothese stützten, waren Voltage-Clamp-Messungen zur Leitfähigkeit, die einen Kationen-selektiven Kanal mit positiver Krümmung postulierten. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde ein Modell mit atomarer Auflösung vorgeschlagen, das einen Kanal mit $\sim 12 \text{ \AA}$ Durchmesser aus antiparallelen Homodimeren beschreibt. Zwischen den polaren Lysinseitenketten der Dimeren befinden sich zwei Reihen von Lipidkopfgruppen und sind für ein negatives Feldpotential verantwortlich, das Kationen bevorzugt passieren lässt. Das Modell wird in Abbildung 12B vorgestellt [36].

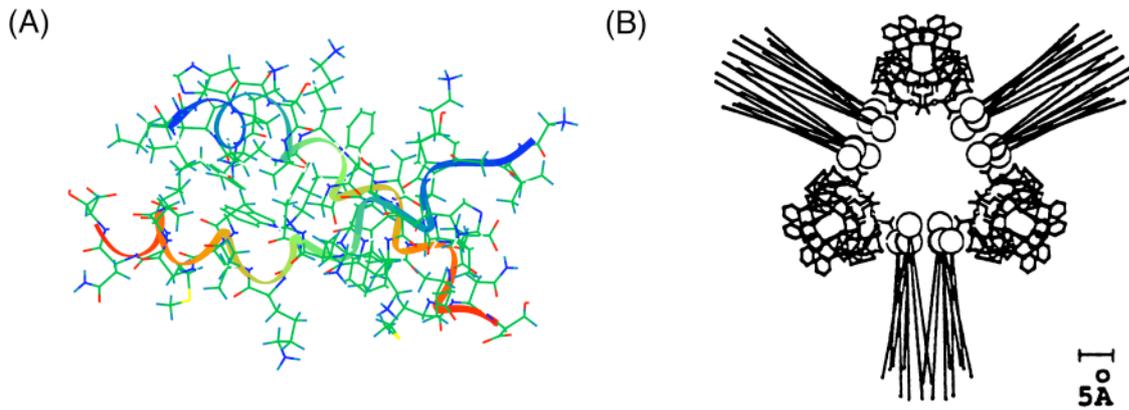


Abbildung 12: (A) NMR-Struktur Magainin 2 als antiparalleles Homodimer. (B) Ausgehend von Voltage-Clamp Messungen postuliertes Magainin 2 Dimer im I-(inserierten) Zustand als Bestandteil einer toroidalen Pore. Darstellung des Modells in der Draufsicht entlang der Membrannormalen. ((A) Übernommen von Wakamatsu [35], (B) von Cruciani [36].)

Weitere Hinweise zur Funktionsweise lieferten CD-Messungen mit orientierten Proben, die eine Umorientierung des Peptids vom S-Zustand parallel zur Membranoberfläche in eine senkrechte I-Orientierung bei Lipid:Peptid(L/P)-Verhältnissen von 30:1 nachweisen konnten [37]. Tryptophan-Fluoreszenz-Experimente belegten eine S-Orientierung und gaben Auskunft über die Kinetik der Porenbildung, so dass zunächst eine Dimerisierung und nachfolgende Tetramerisierung bzw. Pentamerisierung postuliert wurde [38]. Aus solchen Kinetik-Studien erwuchs die Erkenntnis, dass man von einer transienten Pore mit einer Stabilitätsdauer von ca. 40 μ s ausgehen sollte [39]. Neutronenstreuexperimente belegen eine Pore bei 10:1 L/P-Verhältnis, die aus 4-7 Monomeren gebildet und mit einem Durchmesser von 25 Å angegeben wird, so dass Calcein eine solche Pore passieren, während Trypsin sie nicht durchqueren kann [40]. Gerade wurden sehr ausführliche ^{31}P -Messungen zu einem Magainin 2 Analog publiziert, die anhand des toroidalen Porenmodells von Matsuzaki die chemische Verschiebung des Phosphors in orientierten Proben simulieren und mit experimentellen Ergebnissen auf sehr geringe Abweichungen stoßen [41]. Grazing Incidence Diffraction (GID) ist eine Methode, mit der die Umordnung der Acylketten für Magainin 2 beobachtet wurde [42].

Weitere Hinweise, die für die Ausbildung einer toroidalen Pore sprechen, sind die Erhöhung der Lipid-Flip-Flop Geschwindigkeit, die durch ein Kontinuum von Ober- und Unterseite der Membran hervorgerufen wird [43]. Systematische Untersuchungen zur Variation der Lipidkopfgruppe gaben Aufschluss über das Krümmungsverhalten der Membran. Lipide, die eine negative Krümmung bevorzugen, hemmten die Porenbildung, was die Ausbildung einer toroidalen Pore stützt [44]. Die meisten Ergebnisse wurden mit negativ

geladenen Phospholipiden erhalten, so dass der hohe Anteil von Phosphatidylglycerol (PG) in Bakterienmembranen dadurch gut repräsentiert ist. Die Analyse der Bindungsisothermen legt nahe, dass die fördernde Wirkung vor allem durch die elektrostatische Anziehung zur gesteigerten Akkumulation des Peptids an der Grenzfläche führt und nicht durch spezifische Bindung zu Stande kommt [45]. Interessanterweise ließ sich bei vielen Messungen, die mit Lipiden ungesättigter Fettsäureketten durchgeführt wurden, keine Umorientierung bzw. Ausbildung einer Pore detektieren, obwohl Leakage-Assays die Membranpermeabilisation belegen [46, 47]. Die Einführung von Cholesterol erweist sich in allen Fällen als Permeabilisierungshemmend, da die Membran auf diese Weise dichter gepackt wird und die Peptide schlechter zwischen die Kopfgruppen eintauchen können.

Über das Peptid PGLa ist nicht so umfangreich publiziert worden, dennoch liegen einige Informationen vor, die uns bei unseren Experimenten weiterhelfen können. Prinzipiell erweist sich PGLa zwar als antimikrobiell stärker aktiv als Magainin 2, es ist aber gleichzeitig hämolytisch aktiv. Diese gesteigerte Aktivität und geringere Spezifität wird seinem höheren mittleren Hydrophobizitätswert von +0,042 zugeschrieben [48, 49]. Strukturelle Untersuchungen am Peptid sind durch Raman-Spektroskopie und CD-Spektroskopie verfügbar [31, 50]. Danach liegen ca. 60 % des Moleküls in α -helikaler Struktur in Membrenumgebung vor, wobei Helixwahrscheinlichkeitsberechnungen den Amino-Terminus mit seinem Anteil an Glycinen als Helixbrecher dem unstrukturierten Anteil zuordnen. Multidimensionale NMR in Lösung von PGLa an DPC-Micellen ordneten die Seitenketten 6-21 einer α -Helix zu und zeigten, dass die Seitenketten 10-17 sehr stark strukturiert und möglicherweise fest als Bindungspartner mit den Lipidkopfgruppen assoziiert sind [51]. ^{15}N -Festkörper-NMR-Untersuchungen konnten einen S-Zustand der Helix auf der Membranoberfläche bei einem hohen L/P-Verhältnis bestimmen. In einem solchen Fall wird die Orientierung der N-H-Bindung entlang der Helix in makroskopisch orientierten Membranen bestimmt, wie in Abbildung 13 dargestellt, eine sehr ähnliche Strategie, wie wir sie bei unseren Experimenten mit ^{19}F -NMR verfolgen.

Untersuchungen mit Differential Scanning Calorimetry (DSC) konnten für PGLa eine teilweise Erhöhung der Phasenübergangstemperatur von DPPG nachweisen. Die Schlussfolgerungen dieser Experimente zielen auf eine Phasenseparation von Peptid-reichen und Peptid-freien Domänen, die möglicherweise für eine kritische Akkumulation der Peptide auf der Membran sorgen [50]. Bei Untersuchungen zur Struktur der Phospholipide mit Hilfe von Röntgendiffraktion konnte eine teilweise Umorientierung der Acylketten bzw. mit GID

ein Verlust an Acylkettenordnung durch die Wirkung des Peptids festgestellt werden, die in beiden Fällen nur einem S-Zustand entspricht [52]. Des Weiteren diskutieren beide Studien eine bevorzugte Bindung an geladene DMPG-Lipide. Die Einführung von PS- bzw. PE-Kopfgruppen wirkt sich analog wie bei Magainin 2 hemmend auf eine Porenbildung aus [44, 49]. Bei der Vielzahl an unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen, Konzentrationen und Temperaturen sind die gewonnenen Erkenntnisse untereinander nur bedingt vergleichbar, da bereits geringe Änderungen dieser Größen einen starken Einfluss auf die Wechselwirkung der Peptide mit der Lipid-Doppelschicht ausüben.

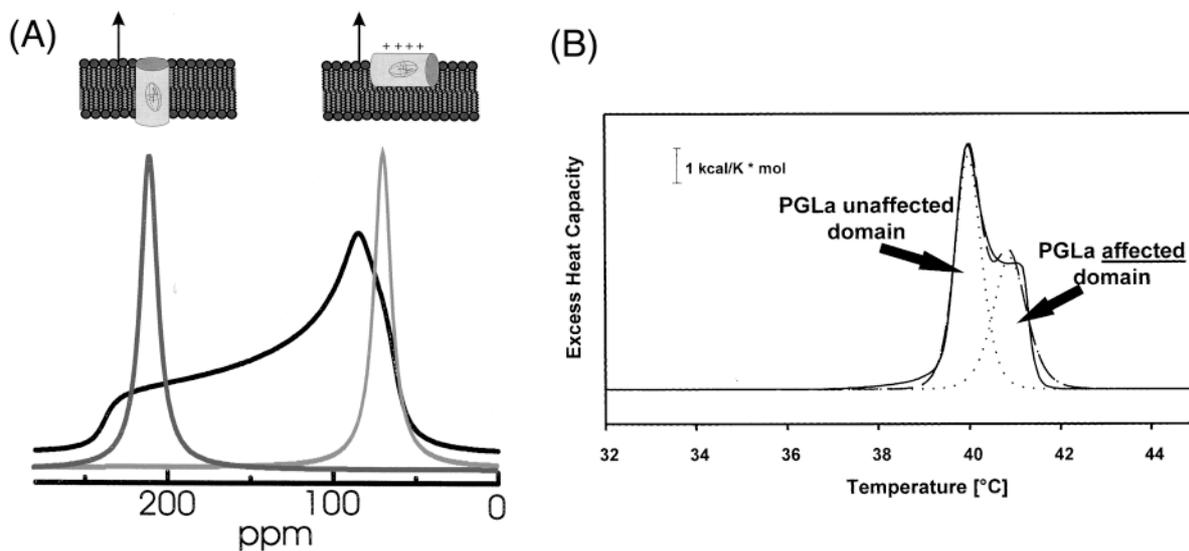


Abbildung 13: Untersuchungen zum antimikrobiellen Peptid PGLa. (A) Schematische Darstellung eines ^{15}N -Spektrum von orientierten Proben. Im Hintergrund das Pulverspektrum grenzt den möglichen Bereich aller Orientierungen ein. Die beiden scharfen Signale korrespondieren direkt mit den zwei Grenzorientierungen. Die Orientierung von PGLa wurde dabei als parallel zur Membranoberfläche detektiert. (B) Differential Scanning Calorimetry (DSC)-Messungen bei L/P von 50:1 in DPPG-Liposomen weisen auf eine Phasenseparation von Peptid-reichen und Peptid-armen Anteilen hin. ((A) Modifiziert nach Bechinger [27].) ((B) Übernommen von Lohner [53].)

Die Bindungsstudien führten zu folgendem Wirkungsmechanismus von PGLa in POPC/POPG Membranen: 1. Transfer des Peptids aus der Lösung auf die Membranoberfläche getrieben durch elektrostatische Wechselwirkungen, 2. Eindringen der hydrophoben Seitenketten in das Membraninnere unter Umwandlung eines unstrukturierten Random Coils in eine amphiphile Helix, 3. Umlagerung von S- in den I-Zustand als Bestandteil einer möglichen Pore. Dennoch konnten keine anderen Spezies als S-orientierte

Monomere detektiert werden. Lediglich mit Hilfe von Bindungsisothermen wurde eine transiente Pore bei Unterschreiten des L/P-Verhältnis von 57:1 postuliert [47].

1.3.3 Untersuchung des Wirkmechanismus durch Festkörper-NMR – der experimentelle Ansatz

Mit Hilfe der vorausgehenden Publikationen lassen sich nun Experimente entwerfen, die tiefere Erkenntnisse zur Funktionsweise von PGLa liefern. Die NMR-Experimente von Bechinger in orientierten Membranen eigneten sich nicht, um eine Umorientierung bei niedrigeren L/P-Verhältnis zu untersuchen. Die Verwendung des wenig sensitiven ^{15}N -Spins erlaubte lediglich eine grobe Orientierungsbestimmung der ^{15}N -H-Bindung der Helix bei hohem L/P-Verhältnis. Weiterhin konnten nur Informationen über den Kippwinkel zur Membran, nicht aber über den Rotationswinkel der Helix um die eigene Helixachse erhalten werden. Eine wesentlich genauere Bestimmung der Orientierung des Kippwinkels zur Membranebene und zusätzlich des azimuthalen Rotationswinkels ist mit Seitenketten-Markierungen möglich. Mit Hilfe von ^{19}F -Kernen können in sehr geringer Messzeit gut auswertbare Spektren erhalten werden. Liegen diese Sonden in einer starren Verbindung zum Peptidrückgrat vor, kann daraus direkt die Helixlage berechnet werden.

Das Peptid PGLa ist in unserem Labor bereits seit drei Jahren Studienobjekt mit einer 4-Fluor-Phenylglycin-Aminosäure-Markierung (F-Phg). Zunächst wurden vor allem chemische Verschiebungsdaten mit der Orientierung in Bezug auf orientierte Lipid-Doppelschichten gesammelt. Bei niedrigeren L/P-Verhältnissen konnte eine Umorientierung postuliert werden, die sich aber nicht in Form einer molekularen Positionierung der Helix in Bezug auf die Membranebene auswerten ließ, da die unregelmäßige Bewegung der Seitenkette keine einfache Interpretation über die Lage des Peptidrückgrats zulässt [54].

Aus diesen Überlegungen heraus erschien eine Modifikation der Markierung sinnvoll, die die Problematik der Seitenkettendynamik durch Einführung einer CF_3 -Gruppe umgeht. Im 4-Trifluoromethyl-phenyl-glycin (CF_3 -Phg) führen die Fluor-Atome eine gleichförmige Rotation um die Einfachbindung aus. Diese nicht-proteinogene Aminosäure ist in Abbildung 14A dargestellt. Des Weiteren liefert die CF_3 -Gruppe Orientierungseinschränkungen zusätzlich zur chemischen Verschiebung in Form der Dipolkopplung, die im Festkörper nicht ausgemittelt wird. In orientierten Lipid-Doppelschichten lässt sich die Orientierung der Seitenkette direkt zum Magnetfeld und folglich direkt zu der auf den Glasplättchen angeordneten Membran positionieren, wie in Abbildung 14D illustriert.

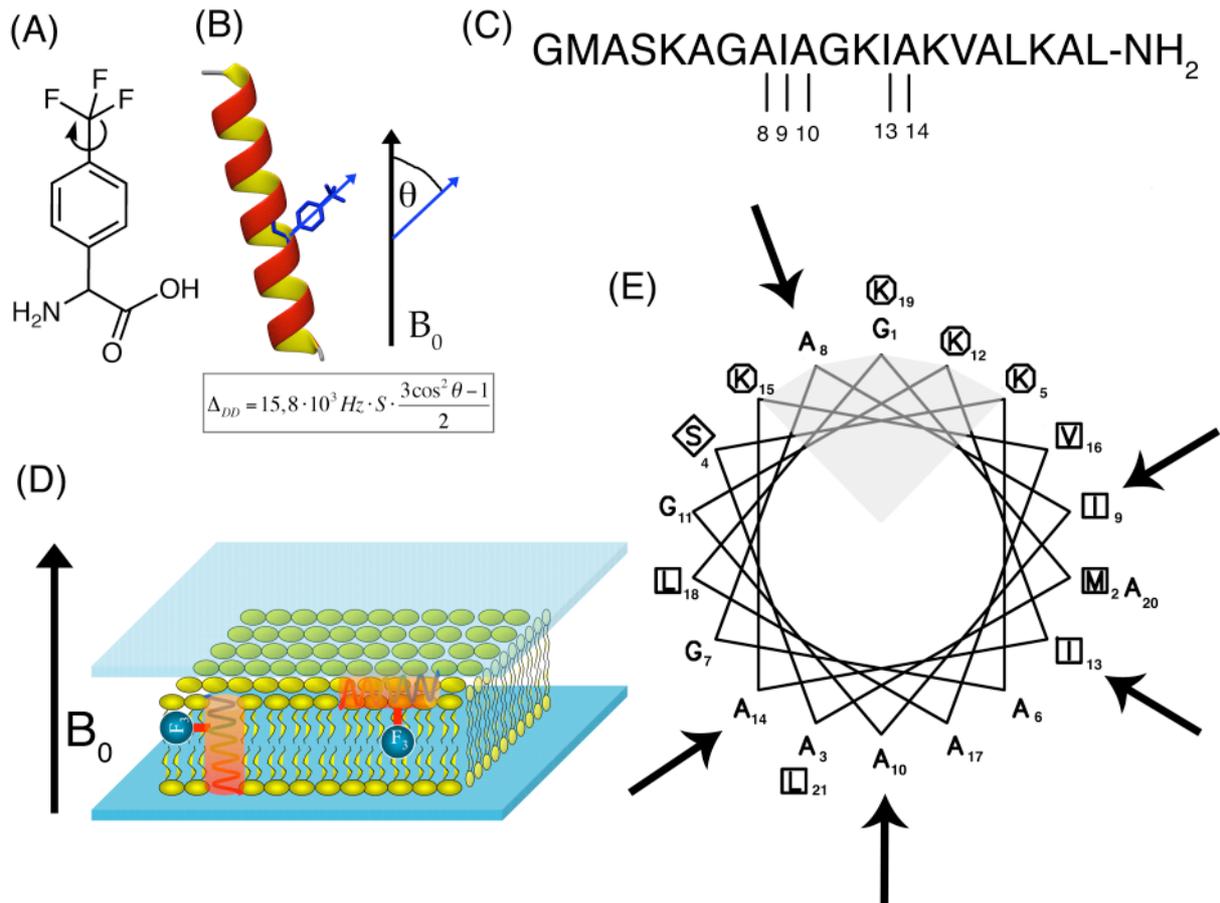


Abbildung 14: Darstellung (A) der eingesetzten Fluor-Aminosäure zur Markierung für die Festkörper-NMR. (B) Schematische Darstellung einer idealen α -Helix mit der Markierung über eine starre Verbindung zum Peptidrückgrat. (C) und (E) zeigen die Positionen der substituierten Aminosäuren, die repräsentativ über das Helixrad (PEPWHEEL [55]) verteilt liegen. (D) Prinzip der Bestimmung von Winkelschränkungen mit Hilfe von orientierten Proben.

Im Verlauf der Diplomarbeit wurden fünf Positionen einzeln durch CF₃-Phg entlang der Helix substituiert. Bei der Auswahl der Seitenketten wurden die hydrophoben Aminosäuren in Betracht gezogen, da das CF₃-Phg apolarer Natur ist, vergleichbar einem Phenylalanin. Für eine einfache Auswertung müssten die Substitutionen in einem regulären α -Helix-Element liegen. Das erscheint sinnvoll für Bereiche, die sich in geringem Abstand entlang der Peptidsequenz liegen. Eine solche Region konnte mit den Resten 8 bis 14 durch die Publikationen von Latal und Bechinger identifiziert werden [50, 51]. Des Weiteren sollten die ausgewählten Reste möglichst gut über das Helixrad verteilt sein, um mit Hilfe weniger Markierungen ein möglichst vollständiges Bild über die räumliche Lage zu gewinnen. Diesen Kriterien konnte durch die Einführung der Fluor-Aminosäure an den Positionen 8, 9, 10, 13 und 14 entsprochen werden, wie in Abbildung 14 illustriert.

1.4 Zielstellung

Nachdem in unserem Labor bereits erste ^{19}F -NMR-Messungen an PGLa mit Hilfe von 4F-Phg-Markierungen durchgeführt wurden, konnte aufgrund der ungewissen Beweglichkeit des CSA-Tensors dieser ^{19}F -Sonde keine genaue Molekülorientierung bezüglich der Membran berechnet werden. Daher sollten nun in der vorliegenden Arbeit die postulierten Umorientierungen des Peptids molekular beschrieben werden. Hierbei wurde die neue Aminosäure CF_3 -Phg eingesetzt, mit deren Hilfe sich durch Dipolkopplungen exakte Winkeleinschränkungen sammeln lassen. Für eine räumliche Orientierungsbestimmung der PGLa-Helix in Bezug auf die Membran müssen mindestens drei verschiedene Positionen im Peptid substituiert und mittels ^{19}F -NMR vermessen werden. Daraus ergibt sich dann der Kippwinkel θ der Helix relativ zur Membran, der Rotationswinkel ϕ um die Helixachse und der molekulare Ordnungsparameter S_{mol} im idealen Helixmodell. Die dafür benötigten PGLa-Analoga sollten mittels Peptid-Festphasensynthese hergestellt, per RP-HPLC aufgereinigt und durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Für eine biologisch relevante Interpretation der Ergebnisse sind dabei auch die Einflüsse der ^{19}F -Reporteraminosäure auf die native PGLa-Struktur und Funktion zu prüfen. Mittels CD-Spektroskopie sollte ein quantitativer Vergleich der Sekundärstrukturen erfolgen, und antimikrobielle Wachstumsassays sollten dazu Aussagen über die biologische Wirksamkeit der markierten Peptide liefern. Dazu wurden Agar-Diffusions-Untersuchungen durchgeführt und die minimal-inhibitorisch wirksame Konzentration (MIC) bestimmt. Auf der Grundlage einer derart gut charakterisierten ^{19}F -Markierungsstrategie sollten dann umfangreiche Erkenntnisse in einer Vielzahl von verschiedenen Lipid-Umgebungsbedingungen im Hinblick auf die Orientierung und Dynamik des antimikrobiellen Peptids PGLa gewonnen werden. Davon ausgehend lassen sich viele Aspekte (Konzentration, Temperatur, Lipidzusammensetzung) gezielt berücksichtigen, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung zwischen antimikrobiellen Peptiden und natürlichen Bakterienmembranen spielen.

2 Synthese, Reinigung und Identifikation der ¹⁹F-markierten PGLa-Derivate

Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten, Peptide oder Proteine für wissenschaftliche Untersuchungen zu gewinnen: (1) Aufreinigung aus dem Gewebe - eine Aufgabe, die sich in unserem Falle als unpraktisch erweist, da diese Peptide nur in verschwindend geringen Konzentrationen auftreten. (2) Expression von rekombinanten Proteinen oder Peptiden in Bakterien - dieser Weg erscheint ebenfalls ungeeignet für unsere Anwendung, da das antimikrobielle Peptid PGLa die Bakterien sofort an ihrem Wachstum hindert. (3) Die chemische Synthese stellt offensichtlich die direkteste und einfachste Möglichkeit dar, das 21 Aminosäuren große Peptid PGLa für NMR-Untersuchungen zu erhalten und gleichzeitig mit den gewünschten Markierungen zu versehen.

2.1 Grundlagen der Festphasensynthese von Peptiden

Die klassische organische Synthesechemie stand nach der Aufklärung der chemischen Natur von Proteinen aufgrund deren Komplexität und Vielfalt in funktionellen Gruppen vor einer schwierigen Aufgabe, da stets ein großer Anteil der Ausbeute als Nebenprodukte verloren ging. Ein Durchbruch auf diesem Forschungsgebiet gelang 1962, als R. Bruce Merrifield das Ende eines Peptids an einer feste Phase verankerte und damit alle löslichen Reagenzien und Nebenprodukte vom unlöslichen Harz sauber abtrennen konnte. Das Peptid entsteht durch schrittweise Kupplung der Aminosäuren vom Carboxy- zum Amino-Terminus durch einen sich wiederholenden Reaktionszyklus, bei dem Schutzgruppen unerwünschte Nebenreaktionen verhindern. Ein schematischer Ablauf der Synthese, welche den sukzessiven Aufbau von Peptidketten aus ihren Grundbausteinen ermöglicht, ist in Abbildung 15 dargestellt.

Einen essentiellen Bestandteil der Peptidsynthese bilden die Schutzgruppen, die das unerwünschte Eingreifen von zusätzlichen funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel die stark nukleophile Aminogruppe der Aminosäuren, in die Bildung der Peptidbindung verhindern. Sie müssen sich zum einen als stabil erweisen, um Nebenreaktionen zu blockieren, aber gleichzeitig unter solchen Bedingungen abspaltbar sein, dass sie das gebildete Peptid nicht zerstören. Prinzipiell haben sich zwei Strategien etabliert, die den erwähnten Anforderungen gerecht werden: (1) Boc-Chemie und (2) Fmoc-Chemie, als Abkürzung für Tertiärbutoxycarbonyl bzw. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, die als Aminoschutzgruppen

Anwendung finden. Abbildung 15 stellt die Fmoc-Strategie mit chemischen Strukturformeln graphisch dar.

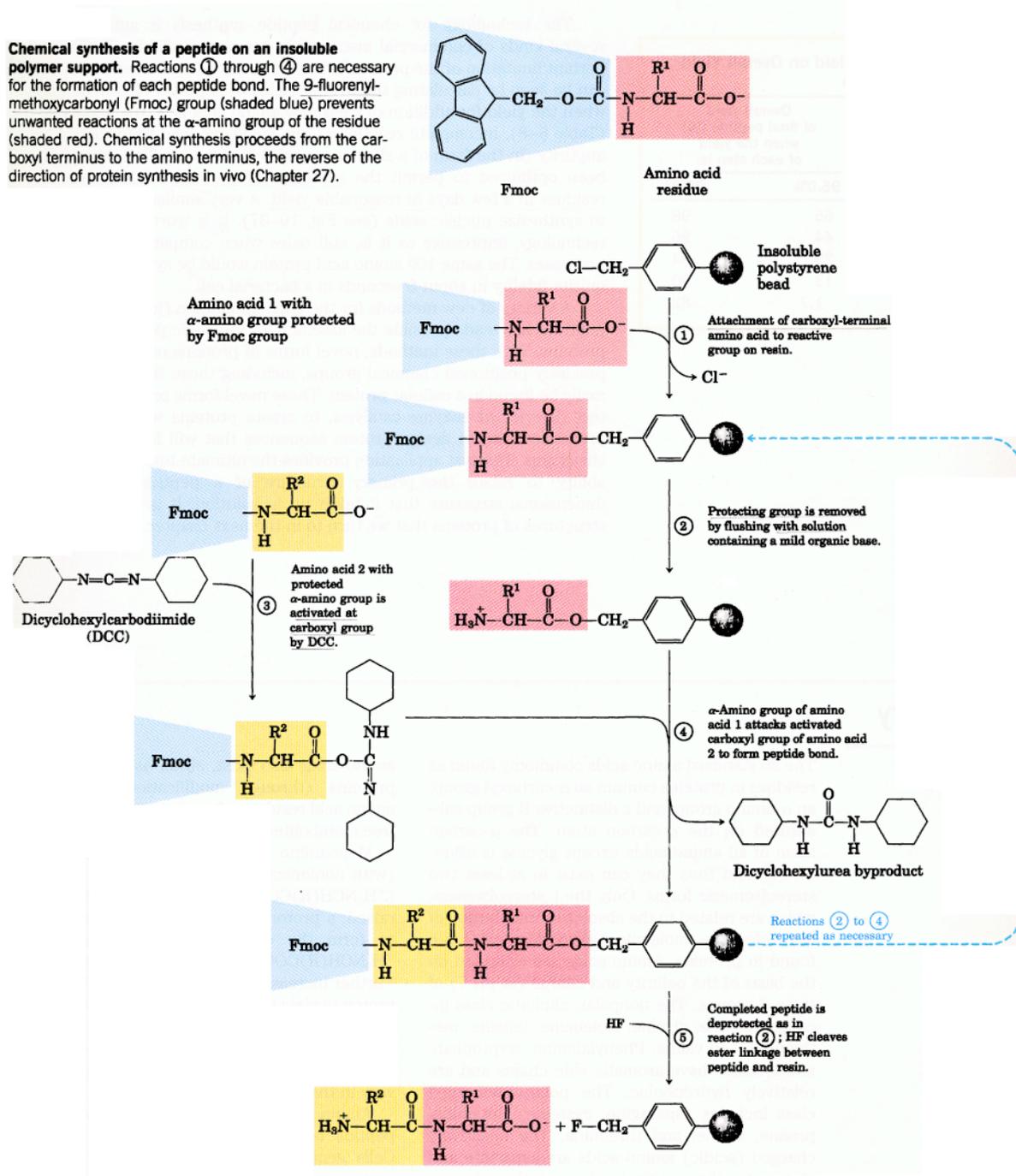


Abbildung 15: Schematischer Ablauf der Festphasensynthese von Peptiden nach der Fmoc-Strategie. Für genaue Beschreibung siehe Erklärungen auf Abbildung. (Übernommen von Lehninger [10].)

Das aufzubauende Peptid befindet sich mit einem freien Amino-Terminus an einem festen Polymerkügelchen, und eine Fmoc-geschützte Aminosäure in Lösung stellt sicher, dass nur der freie Amino-Terminus am Träger einen nukleophilen Angriff auf den Carboxy-Terminus

der gelösten Fmoc-Aminosäure ausübt. Beim Einbau von trifunktionellen Aminosäuren kommen weitere Schutzgruppen zum Einsatz, die von der Synthesestrategie abhängig sind. Oft werden die NH_2 - oder OH -Gruppen der Seitenketten als Ester oder Ether nach Boc-Chemie mit Benzyl-Resten oder nach Fmoc-Chemie mit Tertiärbutyl-Resten geschützt.

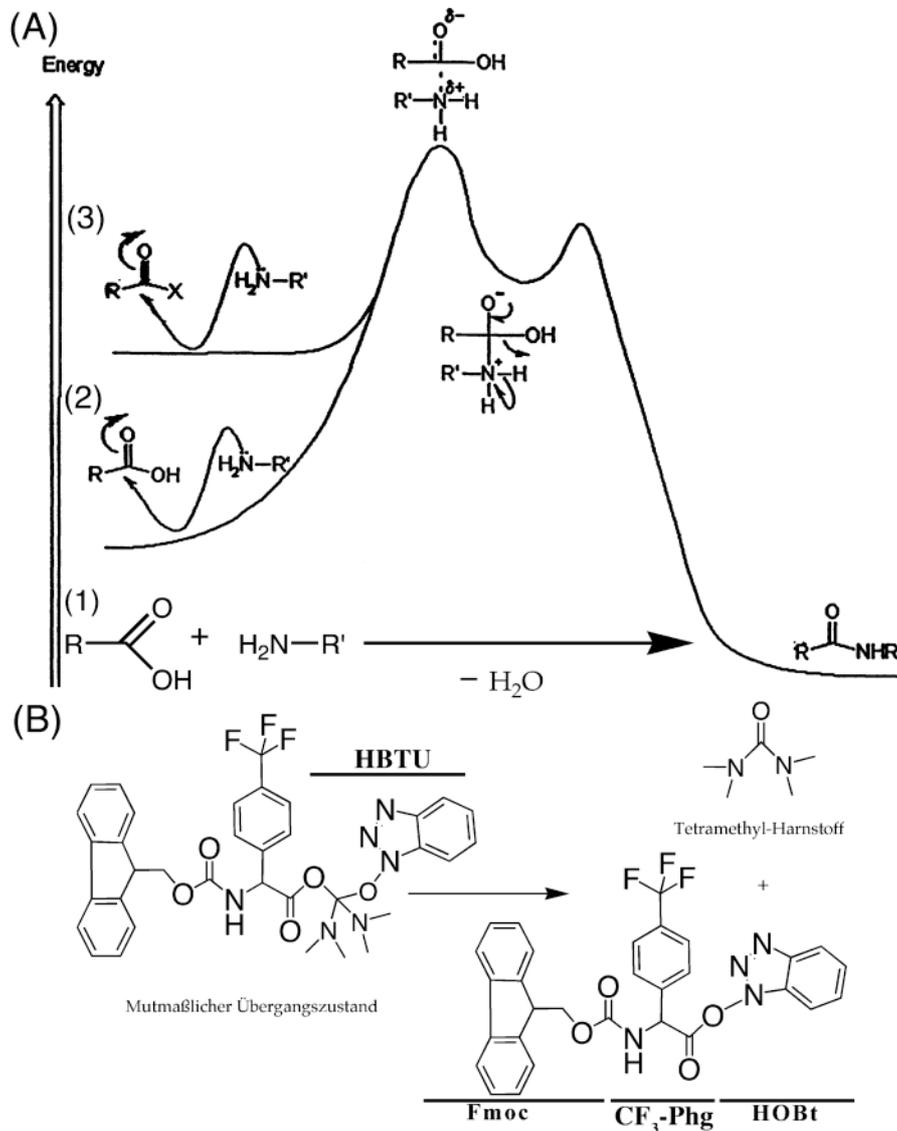


Abbildung 16: Schaubild zur Fmoc-Synthesechemie (A) (1) Die Knüpfung der Peptidbindung unter Wasserabspaltung ist die Hauptreaktion während der Peptidsynthese. (2) Der nukleophile Angriff der Aminogruppe auf die reaktionsträge Carboxygruppe benötigt eine hohe Aktivierungsenergie. (3) Deutlich weniger Energie ist für die Kupplung von aktivierten Carboxygruppen COO-X z.B. HOBt nötig. (B) HBTU sorgt für die Bildung eines mutmaßlichen Zwischenproduktes und zerfällt im Verlaufe der Aktivierung zu einem aktiven Carbonsäure-Ester: Fmoc-Aminosäure-HOBt unter Freisetzung von Tetramethyl-Harnstoff.

Obwohl die zu reagierenden Gruppen nun frei verfügbar sind, erweist sich der nukleophile Angriff der Aminogruppe des aufgebauten Peptids auf den Carboxy-Kohlenstoff der Fmoc-Aminosäure unter Knüpfung der Peptidbindung als sehr ineffektiv und bedarf zudem einer

hohen Aktivierungsenergie, so dass die reaktionsträge Carboxygruppe zusätzlich mit Kupplungsreagenzien aktiviert werden muss. Der thermodynamische Aspekt der Peptidbindungsknüpfung wird in Abbildung 16A veranschaulicht. Die klassische Methode ist die DCC-Aktivierung unter Bildung von symmetrischen Anhydriden, wie in Abbildung 15 dargestellt. Obwohl DCC sehr schnell zu einer erfolgreichen Bindungsknüpfung führt, ist es auch für eine Vielzahl von Nebenprodukten verantwortlich. Aus diesem Grund verwenden heute viele Syntheselabore eine HBTU/HOBt-Mischung, die zwar für langsamere Kupplungen sorgt, aber Nebenprodukte reduziert. Zuerst wird die Aminosäure zu einem ersten Aktivester voraktiviert, der dann effektiv von HOBt unter Bildung eines zweiten Aktivesters angegriffen wird, wie in Abbildung 16B mit chemischen Formeln unterlegt ist. Am Ende der Synthese kann das aufgebaute Peptid vom Polymer durch TFA abgespalten werden. Als Zusammenfassung dazu und der gesamten Fmoc-Synthesechemie dient die Abbildung 17.

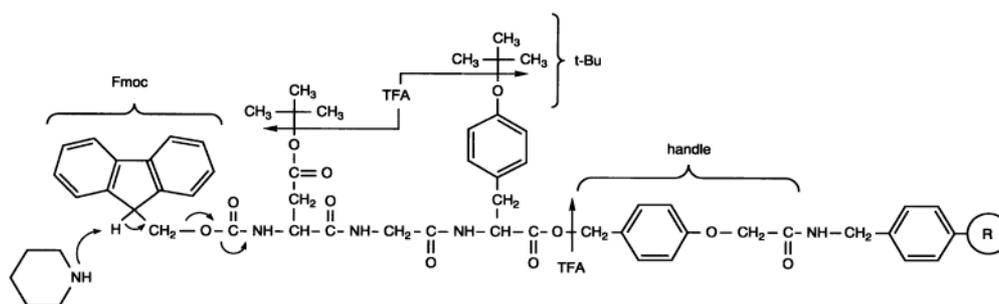


Abbildung 17: Eine Zusammenfassung zur Fmoc-Synthesechemie weist auf die verschiedenen Möglichkeiten der Blockade und Abspaltung der funktionellen Gruppen in Aminosäuren hin: Fmoc schützt den Amino-Terminus und kann unter milden basischen Bedingungen durch Piperidin-Zugabe abgespalten werden. Zum Abschluss der Synthese spaltet TFA die schützenden Tertiär-Butylgruppen von den Seitenketten und das aufgebaute Peptid vom unlöslichen Harz ab. (Entnommen aus NovaBiochem Katalog [56].)

Für den Einbau der nicht-proteinogenen Aminosäure 4-Trifluormethyl-phenylglycin (CF_3 -Phg) in Peptide müssen die Standard-Peptidsyntheseprotokolle aufgrund des stark Elektronenziehenden Charakters des para-fluorierten Aromaten und seiner Nähe zur entstehenden Peptidbindung optimiert werden, da die Kupplung der fluorogenen Aminosäuren sonst ineffektiv verläuft. Des Weiteren spielt bei diesem Vorgang die Epimerisierung der Peptidbindung eine Rolle, da besonders unter basischen Reaktionsbedingungen das Proton am α -Kohlenstoff der ^{19}F -Aminosäure sehr azid ist. Da die CF_3 -Phg-markierten Peptide im Verlauf der Synthese ohnehin epimerisieren, kann die ^{19}F -Aminosäure zur Synthese auch als racemisches Gemisch von D- und L-Enantiomeren eingesetzt werden. Da der Einbau von

Fluor-Markierungen in Peptide ein Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist, konnte Dr. Parvesh Wadwahani bereits im Vorfeld meiner Arbeiten folgende Strategie etablieren: Die Peptidsynthese wird zum Zeitpunkt der problematischen Peptidbindungsknüpfung unterbrochen und manuell durchgeführt, so dass der kritische Punkt der Synthese genau überwacht und den eventuellen Gegebenheiten angepasst werden kann. Dabei wird mit einem Minimum an kostbarer Fluor-Aminosäure ein Optimum an Ausbeute erreicht.

Nach der erfolgreichen Synthese der Peptide muss eine Reinigung stattfinden, um Nebenprodukte und verbliebene Reagenzien ab- und insbesondere auch die beiden Epimere voneinander zu trennen. Eine weit verbreitete Methode für Peptide ist die RP-HPLC, die sich die unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit einer hydrophoben Oberfläche zu Nutze macht. Mit diesem Trennverfahren lassen sich auch hydrophobe Peptide sauber aufreinigen. Für unsere Zwecke muss zumindest der letzte HPLC-Trennungsschritt in TFA-freiem Lösungsmittel vorgenommen werden, da sonst zusätzliche Signale die Auswertung der ^{19}F -NMR-Spektren erschweren.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können die Syntheseprodukte schnell und zuverlässig auf ihre exakte Masse überprüft werden. Messungen wurden sowohl mit ESI- als auch MALDI-TOF Massenspektrometern durchgeführt. Der Unterschied beider Apparaturen liegt im Ionisationsverfahren der Moleküle. Während beim ESI eine Elektronadel ionisierte Gasmoleküle aus einer sauren verdünnten Lösung erzeugt, desorbiert bei MALDI-TOF ein Laserpuls das Molekül aus einer festen Matrix.

2.2 Material und Methoden

Eine genaue Laboranleitung der einzelnen Arbeitsschritte und der benötigten Reagenzien ist im Anhang beigefügt.

2.2.1 Peptid-Synthese

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden vier verschiedene PGLa-Derivate mit Modifikationen der nicht-proteinogenen Aminosäure CF_3 -Phg an den Seitenketten 8, 9, 13 und 14 synthetisiert (Peptidderivat CF_3 -Phg-Position 10 Synthese Frau Scheiding 02.04.2001). Die Synthese der PGLa-Derivate erfolgte an einem Peptid-Synthesizer 433a (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) mit Fmoc-geschützten Aminosäuren. Mit Hilfe der Software SynthAssist (Applied Biosystems) lässt sich die Sequenz und Synthesechemie festlegen und der Verlauf der Synthese überwachen. Insgesamt wurden vier Synthesen im 250 μmolar Maßstab mit den Aktivatoren HBTU/HOBt und zwei Synthesen mit HCTU in Gegenwart von

DIEA als Base im 100 μ molaren Maßstab während der Diplomarbeit ausgeführt. Die Deprotektion wurde mit 20 % Piperidin in DMF durchgeführt. Aufgrund der nötigen Unterbrechung für die manuelle Kupplung der ¹⁹F-markierten Aminosäure wurden insgesamt 12 Synthese-Läufe gestartet, die über Nacht und jeweils mit doppelter Kupplung ausgeführt wurden, bis sich nach der zweiten Reaktion mit dem Kaiser-Test keine freien Aminogruppen mehr nachweisen ließen [57]. Eine weitere direkte Überwachungsmöglichkeit im Verlauf der Synthese stellen Leitfähigkeitsmessungen dar, die als ein Maß für die Vollständigkeit der Entschützung interpretiert werden können. Der Hauptanteil der Leitfähigkeit wird von abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen und ihren Carbamatsalzen geliefert. Mit fortschreitender Zeit der Deprotektion sinkt das Niveau der Leitfähigkeit demzufolge. Ein solches Leitfähigkeitsprofil ist in Abbildung 18 zu sehen. Mit Hilfe der Software wird auf diese Art und Weise die Länge der Deprotektion automatisch angepasst (siehe Ala14). Die unterschiedliche Dauer der Deprotektion ist erforderlich, weil es vor allem bei höherer Kettenlänge zur Bildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen kommen kann, welche eine verminderte Zugänglichkeit für die chemischen Reagenzien zur Folge hat.

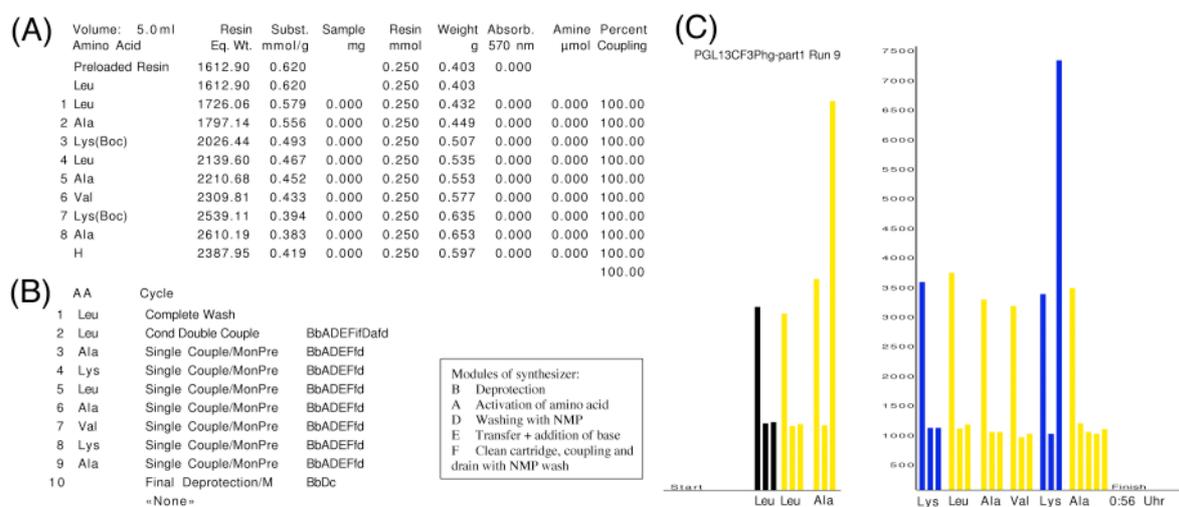


Abbildung 18: Ausgabe der SynthAssist Software für den ersten C-terminalen Abschnitt PGL13 (Leu21-Ala14). (A) Nach Angabe von Sequenz und Synthesemaßstab erfolgt die Berechnung der Einwaagen. (B) Zuordnung der Zyklen, mit dem die Ventile des Syntheseparates geöffnet und geschlossen werden, damit die richtigen Reagenzien und Lösungsmitteln in die Reaktionskammer gelangen. (C) Das Leitfähigkeitsprofil überwacht den Status der Deprotektion. Hauptbeitrag liefert die Fmoc-Schutzgruppe mit ihrem Carbamatsalz.

Als Spaltungscocktails fanden MY-Reagent K (81,5 % TFA, 5 % Thioanisol, 5 % Phenol, 5 % H₂O, 2,5 % EDT, 1% TIS) und MY-TIS (93 % TFA, 2 % H₂O und 5 % TIS) für zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur Anwendung. Das Harz wurde durch Filtration

abgetrennt und das Filtrat unter Stickstoffstrom eingengt. Das Syntheseprodukt wurde in kaltem Diethylether gefällt und in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (50:50) aufgenommen und lyophilisiert.

2.2.2 Reinigung der Derivate durch RP-HPLC

Das Rohpeptid wurde auf C18-Säulen (Vydac, Hesperia, USA) mit Hilfe von RP-HPLC (Jasco, Tokyo, Japan): 1. PU-987 (Intelligent Prep. Pump), 2. MD-1510 (Multwavelength-Detector) von den Nebenprodukten getrennt. Auf der 4,5 x 250 mm Säule mit einer Flussrate von 1,5 ml/min charakterisiert wurde zunächst analytisch. Auf der 25 x 250 mm bzw. 10 x 250 mm Säule mit Flussraten von 25 bzw. 6 ml/min wurde das Reaktionsprodukt in ein oder zwei Reinigungsschritten in großem Maßstab TFA-frei in Gegenwart von 5 mM HCl gereinigt. Wasser-Acetonitril-Gradienten wurden individuell für die CF₃-Phg-Derivate mit Substitutionen an Position 8, 9, 10, 13 und 14 zwischen 30 und 40 °C optimiert (siehe Tabelle 5).

2.2.3 Bestimmung der D- und L-Epimere

Die Identifikation der Epimere gelang durch Derivatisierung mit Marfeys Reagenz auf der 4,5 mm Säule [58]. Dazu wurden die gereinigten Peptide mit HCl hydrolysiert (0,1 mg in 0,5 ml 6 M HCl, 16 h bei 105 °C). Die Aminosäuren wurden mit Marfeys Reagenz derivatisiert (Entfernung des HCl durch Lyophilisation, Zugabe von 25 µl 0,5 M NaHCO₃ und 50 µl von 1%igem Marfeys Reagenz in Aceton mit anschließender Inkubation bei 40 °C für 90 min, dann Zugabe 14 µl 1 M HCl). Die Mischung der derivatisierten Aminosäuren wurde aufgetrennt durch RP-HPLC (4,5 x 250 mm C18 Säule, bei 40 °C, linearer Acetonitril-Wasser-Gradient, 0,1 % TFA von 10 auf 43 % Acetonitril in 12 min, Flussrate 1,5 ml/min, Detektion bei 415 nm). Peaks wurden durch den Vergleich der Retentionszeiten eines reinen derivatisierten racemischen Gemisches von CF₃-Phg identifiziert (Das L- CF₃-Phg-Enantiomer weist eine niedrigere Retentionszeit auf).

2.2.4 Identifikation der Peptide durch Massenspektrometrie

Nach jedem abgeschlossenen Synthese-Lauf wurden Massenspektren zur Identifikation des Syntheseproduktes herangezogen. Die Massenspektren erfolgten ebenso nach der ersten analytischen HPLC zur Identifikation der Peaks und gegebenenfalls nach der Reinigung zur Bestätigung der gereinigten Peptide. Standardmäßig wurde ESI-MS-Analyse vom Hans-Knöll-Institut durch Frau Perner durchgeführt, und bei unklaren Befunden konnte MALDI-

MS zweifelsfreie Ergebnisse zur Masse liefern. ESI-MS Proben wurden in 80:20 MeOH/Wasser gelöst und auf einem Fison VG Quattro Triple Quadrupole Massenspektrometer (Fison Instruments, Beverly, USA) gemessen. Die MALDI-MS Matrix bestand aus α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, und das Spektrometer war vom Typ Bruker Reflex 2 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland).

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Peptid-Synthese

Bei den ersten beiden Synthesen PGL8 und PGL13 im November 2002 wurden sehr hohe Ausbeuten erzielt, die der Tabelle 4 zu entnehmen sind. Ende Januar wurden zwei neue Synthesen für die Seitenketten 9 und 14 angesetzt. Diese konnten aufgrund von technischen Problemen mit dem Synthesepapparat nicht erfolgreich zu Ende geführt werden.

Möglicherweise verursachte ein Überschuss an Aktivatoren eine Blockade des Amino-Terminus für weitere nukleophile Angriffe. Indiz dafür liefern indirekt die Massenspektren, die zeigen, dass keine erfolgreiche Kupplung mehr möglich war.

Ungefähr drei Wochen später erfolgte ein neuer Versuch, der eine relativ geringe Ausbeute an Rohpeptid hervorbrachte. Die Synthese des PGL9 wurde bereits nach einfacher Kupplung fortgesetzt, was die niedrige Ausbeute erklärt, während PGL14 anschließend einer erneuten Kupplung unterzogen wurde. Nach der Abspaltung vom Polymer stand bei der Verdampfung von TFA leider nur technischer Stickstoff mit einem niedrigeren Reinheitsgrad zur Verfügung. Tabelle 4 fasst die Änderungen im Laufe der Synthesen zusammen und listet mögliche Ursachen für die uneffektiven Synthesen von PGL9 und PGL14 auf. Trotz dieser Schwierigkeiten wurden ausreichende Mengen aller Peptide PGL8, PGL9, PGL13 und PGL14 für NMR-Untersuchungen produziert.

Tabelle 4: Übersicht der durchgeführten Synthesen und wichtigsten Abweichungen in der Durchführung

| Derivat | Synthese-Datum | Maßstab (in μ mol) | Aktivatoren | Manuelle Kupplung (Anzahl) | Spaltungs- Cocktail | Ausbeute Rohpeptid (in mg) |
|---------|----------------|---------------------------|-------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| PGL13 | 11.11.02 | 250 | HBTU/HOBt | 2x | MY-Reagent K | 500 von 500 |
| PGL8 | 13.11.02 | 250 | HBTU/HOBt | 2x | MY-Reagent K | 500 von 500 |
| PGL9 | 31.01.03 | 250 | HBTU/HOBt | 2x | - | abgebrochen |
| PGL14 | 02.02.03 | 250 | HBTU/HOBt | 2x | - | abgebrochen |
| PGL9 | 20.02.03 | 100 | HCTU | 1x | MY-TIS/techn. N ₂ | 70 von 200 |
| PGL14 | 21.02.03 | 100 | HCTU | 2x | MY-TIS/techn. N ₂ | 130 von 200 |

2.3.2 Reinigung der Derivate durch RP-HPLC

Die Chromatogramme der analytischen HPLC in Abbildung 19 zeigen, dass die an unterschiedlichen Positionen substituierten CF_3 -Phg-PGLa-Derivate auch unterschiedliche Retentionszeiten besitzen. Zudem erweisen sich die L-Epimere stets als hydrophober als die D-Epimere, da ihre hydrophobe Oberfläche wirksamer exponiert ist [59].

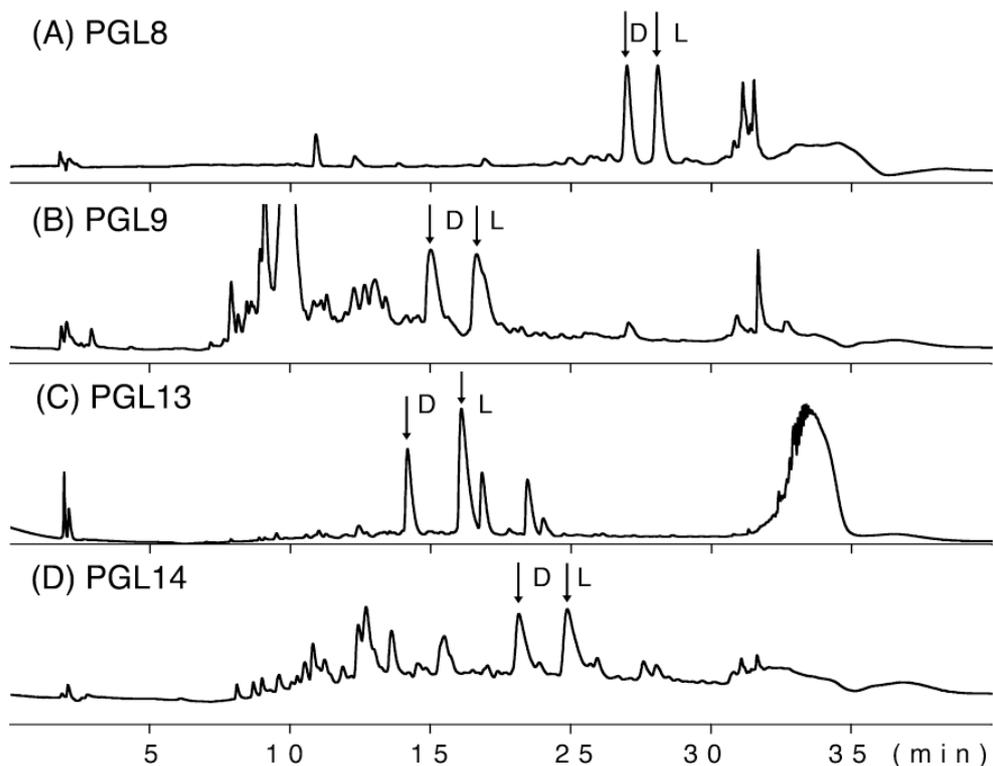


Abbildung 19: Chromatogramme für die vier synthetisierten CF_3 -Phg-PGLa-Derivate. (A) PGL8 (B) PGL9 (C) PGL13 (D) PGL14. Auffällig sind die unterschiedlichen Retentionszeiten der Peptide bei gleichem Gradienten. Das D-Epimer zeigt stets weniger starke Wechselwirkung mit der hydrophoben Säule.

PGL8 zeichnet sich durch eine auffallend hohe Hydrophobizität aus, da die Substitution direkt in der hydrophilen Oberfläche der Helix liegt (siehe Abbildung 14) und damit möglicherweise die Eigenschaften der Helix modifiziert. Zur Aufreinigung mussten die Gradienten demzufolge individuell angepasst werden. Die entsprechenden Gradienten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Für die Peptide PGL8, 9 und 14 wurde eine vollständige Reinigung in je einem einzigen HPLC-Lauf TFA-frei erzielt, wohingegen für die Produkte der PGL13-Synthese zwei Läufe (1x mit TFA, 1 x ohne) notwendig waren.

Tabelle 5: Zusammenfassung der verwendeten Gradienten für die Reinigung der CF₃-Phg-PGLa-Derivate. MeCN (Acetonitril), TFA (Trifluoressigsäure)

| Derivat | Säule (in mm) | analytisch: 4,5 | präparativ: 10 | TFA-frei: 10 |
|---------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | Lösung A: 10% MeCN B: 100% MeCN | A + B inkl. 0,5 % TFA | A + B inkl. 0,5 % TFA | A inkl. 5mM HCl + B |
| PGL8 | Gradient | 15,5 – 32 % B | | 16 – 29 % B |
| | Temperatur (in °C) | 30 | - | 30 |
| | Peaks (in min) | D:22,0 L:23,1 | | D:11,6-13,1 L:13,1-15,2 |
| PGL9 | Gradient | 15,5 – 32 % B | | 5 – 40 % B |
| | Temperatur (in °C) | 30 | - | 39 |
| | Peaks (in min) | D:15,0 L:16,6 | | D:11,0-11,5 L:11,6-12,2 |
| PGL10 | Gradient | 10 – 70 % B | 20 – 37 % B | 18 – 39 % B |
| | Temperatur (in °C) | 35 | 30 | 30 |
| | Peaks (in min) | D: 13,7 L:17,2 | D:10,6-11,4 L:13,6-14,4 | D:11,2 L:13,0 |
| PGL13 | Gradient | 15,5 – 32 % B | 22 – 30 % B | 22 – 30 % B |
| | Temperatur (in °C) | 30 | 30 | 38 |
| | Peaks (in min) | D:19,8 L: 22,4 | D:11,4-12,6 L:14,2-16,4 | D:9,5-10,3 L:9,7-10,5 |
| PGL14 | Gradient | 15,5 – 32 % B | | 5 – 40 % B |
| | Temperatur (in °C) | 30 | - | 39 |
| | Peaks (in min) | D:18,1 L:19,9 | | D: 12,0-12,7 L: 12,7-13,4 |
| PGLwt | Gradient | | 11 – 33 % B | |
| | Temperatur (in °C) | - | 30 | - |
| | Peaks (in min) | | L:14,3 | |

2.3.3 Bestimmung der D- und L-Epimere

Obleich nach der Derivatisierung mit Marfeys Reagenz beide CF₃-Phg-Enantiomere in den Chromatogrammen aufgrund einer partiellen Razemisierung während der Peptidhydrolyse detektierbar sind, lässt sich die Stereoisomerie der CF₃-Phg-Aminosäure zweifelsfrei anhand der Intensitäten bei 415 nm bestimmen. Dies ermöglicht eine genaue Zuordnung der D- bzw. L-CF₃Phg-PGLa-Epimere. Drei exemplarische Chromatogramme sind in Abbildung 20 dargestellt. Als Vergleich wurde die razemische Mischung der Aminosäure parallel derivatisiert, so dass für die isolierten Peptide die Zuordnung direkt möglich war. Marfeys Reagenz reagiert mit D- und L-Aminosäuren. Nach der Derivatisierung stabilisieren intramolekulare Wasserstoffbrücken stereospezifisch proteinogene L-Aminosäurederivate, die aufgrund einer kompakteren Struktur kürzere Retentionszeiten auf der HPLC-Säule besitzen [58]. Diese stabilisierenden Wechselwirkungen wirken offenbar in ähnlicher Weise für D/L-

CF_3 -Phg-Enantiomere, da Referenzsubstanzen von L-F-Phg (4-Fluor-phenyl-glycin) und D-F-Phg die gleiche Reihenfolge im Retentionsverhalten aufwiesen.

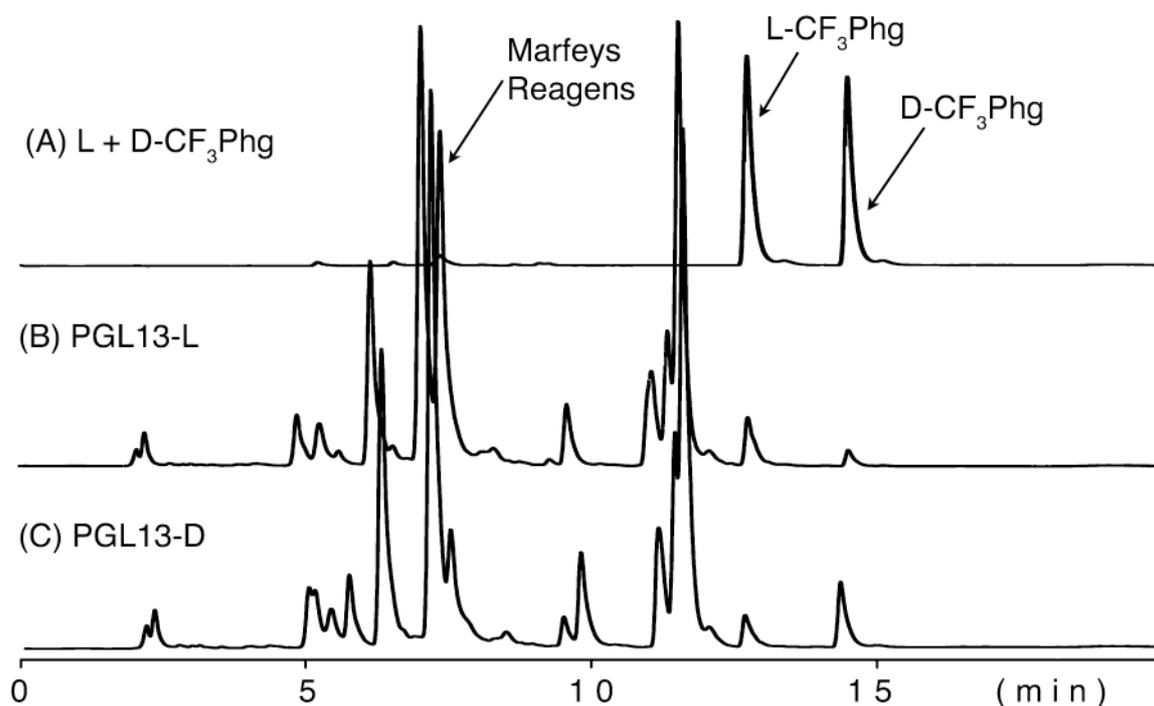


Abbildung 20: Chromatogramme der Reaktionsgemische zur Bestimmung der Stereoisomerie der eingebauten racemischen ^{19}F -markierten Aminosäure nach Marfey. Im Anschluss an die Derivatisierung der hydrolysierten Peptide besitzt das L-Enantiomer von CF_3 -Phg die kürzere Retentionszeit wegen intramolekularer Wasserstoffbrückenbildung. Dadurch ist eine zweifelsfreie Bestimmung der Chiralität der CF_3 -Phg-PGLa-Derivate möglich, trotz der teilweisen Racemisierung während der Peptidhydrolyse.

2.3.4 Identifikation der Peptide durch Massenspektrometrie

In den meisten Fällen genügte die routinemäßige Massenbestimmung durch ESI-MS. Teilweise traten jedoch im erwarteten Massenbereich keine Signale auf, da das Peptid wahrscheinlich nicht ausreichend ionisiert werden konnte. Für ESI-MS müssen die Proben in einem hohen Anteil von MeOH gelöst sein, worin PGLa allerdings schlecht löslich ist. Das MALDI-TOF Gerät lieferte in allen Fällen zweifelsfreie Ergebnisse. Das Peptid wird hier in eine feste Zimtsäure-Matrix eingebettet ist, wodurch offensichtlich eine zuverlässigere Ionisation gewährleistet wurde. Bei der Auswertung der MS-Spektren von Abbildung 21 sind zwei Dinge zu beachten: Zum einen können mehrere verschiedene Kationen (z.B. H^+ , K^+ , Na^+) am Molekül angelagert sein, und zum anderen werden mehrfach geladene Moleküle detektiert. Die Massen der Zwischenprodukte und endgültigen CF_3 -Phg-PGLa-Derivate konnten damit zuverlässig bestimmt werden und sind in Tabelle 6 aufgelistet.

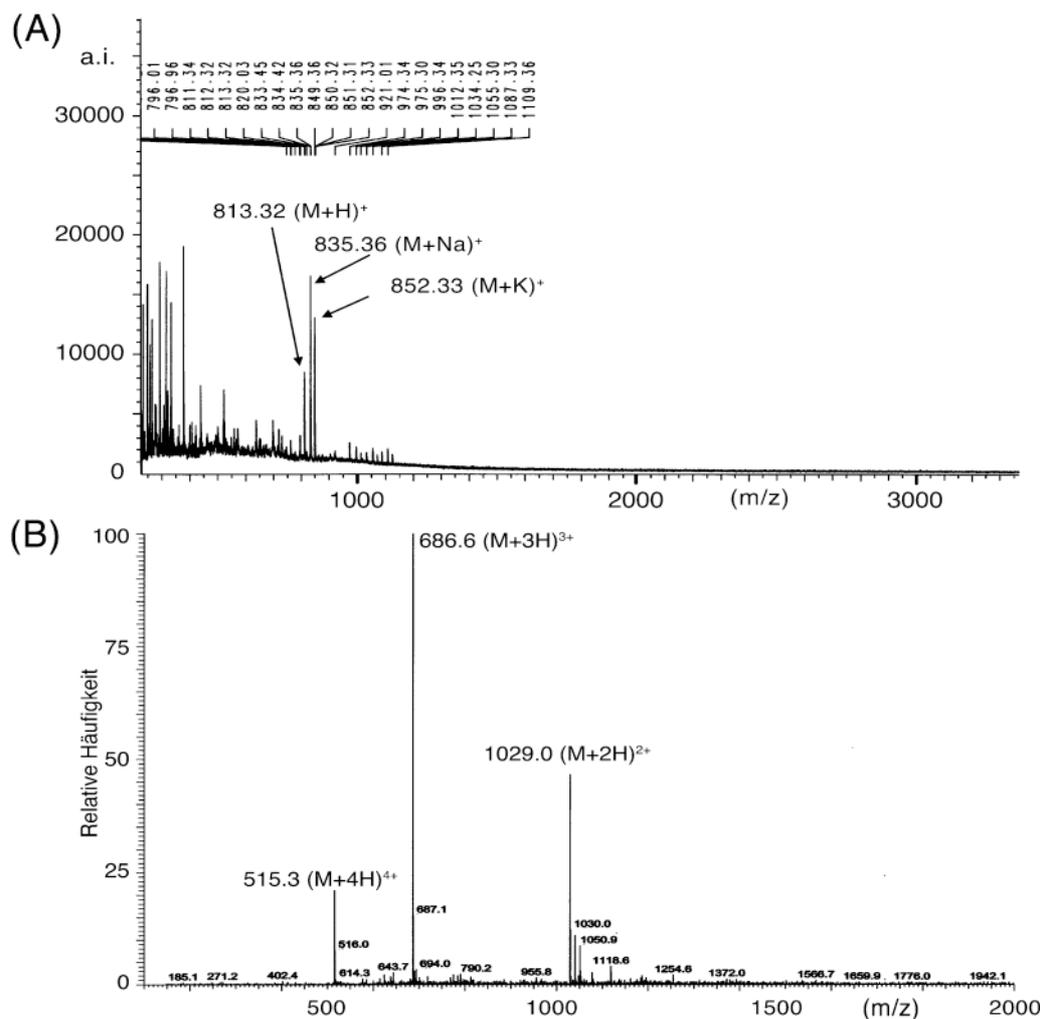


Abbildung 21: Massenspektrogramme von PGL13. (A) MALDI Kontrolle des Zwischenproduktes Fmoc-PGL13-Teil 1 ($M=812$ Da). Die Massenzahlen ergeben sich aus den zusätzlich angelagerten Kationen. Ein hoher Anteil des Signals ist unspezifisch und besteht aus der Matrix. (B) PGL13-L ($M=2055$ Da) nach der TFA-freien Reinigung zur Kontrolle der Masse vor der Probenvorbereitung für die weiteren Experimente. Die Massenzahlen ergeben sich aus der unterschiedlichen Ladungszahl zuzüglich angelagerter Protonen.

Tabelle 6: Auflistung der einzelnen CF_3 -Phg-PGLa-Derivate mit dazugehöriger Sequenz und relevante Massen im Verlaufe der Peptidsynthese (Die Sequenz ist im Einbuchstabencode ausgedrückt, X bezeichnet die Fluor-markierte Aminosäure 4-Trifluoromethyl-phenylglycin)

| Derivat | X-123456789012345678901-X | Teil1 | Teil1+ Fmoc- CF_3 -Phg | Komplett |
|---------|--|--------|------------------------------------|----------|
| PGLwt | H-GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂ | | | 1968,5 |
| PGL8 | H-GMASKAGXIAGKIAKVALKAL-NH ₂ | 1294,7 | 1719,1 | 2097,2 |
| PGL9 | H-GMASKAGAXAGKIAKVALKAL-NH ₂ | 1181,5 | 1604,9 | 2055,1 |
| PGL10* | H-GMASKAGAIIXGKIAKVALKAL-NH ₂ | 1110,5 | 1533,8 | 2097,2 |
| PGL13 | H-GMASKAGAIAGKXAKVALKAL-NH ₂ | 812,1 | 1235,5 | 2055,1 |
| PGL14 | H-GMASKAGAIAGKIXKVALKAL-NH ₂ | 741,1 | 1164,4 | 2097,2 |

*Synthese vom 02.04. 2001 durch Frau Scheiding

3 Struktur und Aktivität der PGLa-Derivate

3.1 Anwendung der CD-Spektroskopie und antimikrobieller Wachstumsassays

Die Verwendung von Fluor-Markierungen eröffnet viele neue Möglichkeiten für NMR-Strukturuntersuchungen, indem biologisch relevante Proben ohne Hintergrund und mit hoher Sensitivität vermessen werden können. Allerdings muss auch beachtet werden, dass der Einfluss solcher Markierungen auf die native Struktur nicht vorhersagbar ist. Daher ist in jedem Falle durch geeignete Verifizierungsmethoden nachzuweisen, dass das markierte Peptid hinsichtlich seiner Sekundärstruktur und biologischen Wirksamkeit dem nativen Peptid (weitgehend) entspricht.

Eine sehr schnelle Methode, um Sekundärstrukturveränderungen nachzuvollziehen, stellt die CD-Spektroskopie dar. Sie beruht auf der Chiralität von Biomolekülen, so dass rechts- und linksdrehende Komponenten von zirkular-polarisiertem Licht unterschiedlich stark absorbiert werden. Dabei erzeugen bestimmte Sekundärstrukturen von Proteinen eine charakteristische Wellenlängenabhängigkeit der Extinktionskoeffizienten der angesprochenen Licht-Bestandteile. Mit Hilfe von Protein-Referenzspektren, deren dreidimensionale Struktur mit Röntgenkristallographie aufgelöst wurde, lassen sich mit Hilfe von Auswertungssoftware die CD-Spektren in ihre Sekundärstrukturbeiträge zerlegen, so dass diese direkt quantifiziert werden können.

Für biologische Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden dienen seit langer Zeit antimikrobielle Wachstumsassays [26]. Beim Agar-Diffusionstest plattiert man eine Bakterienkultur auf einem festen Nährmedium aus. Der zu untersuchende Wirkstoff wird in ausgestanzte Löcher dosiert, von denen er in den Agar diffundiert. Eine antimikrobielle Aktivität ist dann gegeben, wenn sich eine messbare Hemmhofzone um das betreffende Loch bildet. Je größer die Hemmhofzone, desto antimikrobiell aktiver ist die Substanz. Ein weiteres Maß für die Aktivität von antimikrobiell aktiven Substanzen ist die minimal-inhibitorische Konzentration (MIC), welche mit Hilfe des MIC-Assays bestimmt wird. Je niedriger die Konzentration, die gerade noch das Wachstum von Mikroben verhindert, desto potenter der Wirkstoff. Beide Methoden können dem Vergleich der biologischen Aktivität von antimikrobiellen Peptiden dienen und den Einfluss der fluorierten Seitenketten auf das native Peptid charakterisieren.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden auf einem Jasco-Spektropolarimeter J-720 (Jasco, Tokyo, Japan) von 183 bis 260 nm bei 35 °C aufgenommen. Die Auflösung betrug 0,5 nm, die Scangeschwindigkeit 20 nm/min, die Glättung 4 s, die Bandbreite 2 nm und die Messung wurde bei einer Sensitivität von 20 mdeg 5-fach akkumuliert. Die DMPC/DMPG (60%:40%)-Vesikel wurden durch Ultraschallbehandlung hergestellt. Der Puffer enthielt 1mM Phosphat pH7, und die Peptidkonzentration betrug 20 µg/ml. Das molare Verhältnis von Lipiden zu den Peptiden wurde mit 50:1 bzw. 200:1 eingestellt. Die Peptidkonzentration wurde vorher durch UV-Spektrometrie über die Aromatenabsorption von CF₃-Phg bei 263 nm bestimmt, wobei 1 mg Peptid von CF₃-Phg eine Absorption von 0,219 Absorptionseinheiten hervorruft. Das native Peptid PGLwt wurde bei einer Absorption bei 200 nm über die Peptidbindung abgeglichen. (Detaillierte Auflistung der Arbeitsschritte im Anhang)

3.2.2 Antimikrobielle Wachstumsassays

Die antimikrobiellen Wachstumsassays wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Möllmann am Hans-Knöll-Institut durchgeführt. Für den Agar-Diffusionstest wurden 100 µl Suspension des McFarland Standards 1 des Test-Organismus mit 32 ml steriler Trypticase Soy Broth (TSB) Agarose beimpft. Die Endkonzentration der Zellen betrug 10⁶ CFU (Colony Forming Units). 50 µl einer 100 µl/ml konzentrierten Peptidlösung wurden in 9 mm große Stanzlöcher im Agar eingefüllt. Der Durchmesser der Hemmzone um das Loch wurde nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37 °C gemessen [60].

Die minimale inhibitorisch wirkende Konzentration (MIC) wurde durch den Standard-Assay des NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) bestimmt [61]. Die Zellen wurden über Nacht bei 35 °C in Nährlösung angezüchtet und später mit TSB verdünnt. 50 µl der Peptidlösung wurden schrittweise um die Hälfte mit TSB verdünnt. 50 µl Bakterien wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit einer Endkonzentration von 5x10⁵ CFU/ml in einem Endvolumen von 100 µl beimpft. Die Platten wurden 24 h bei 37 °C inkubiert und die optische Dichte mit dem automatischen Lesesystem Nephaloscan Ascent 1.4 (Labsystems, Vantaa, Finnland) bestimmt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 CD-Spektren mit hoher Übereinstimmung zum nativem Peptid

Bei der Auswertung der CD-Spektren (siehe Abbildung 22) mit den exakten Sekundärstrukturberechnungen (siehe Tabelle 7) lassen sich zuverlässige Aussagen über den Einfluss der ^{19}F -markierten Aminosäure treffen. Der ermittelte Helixanteil von 66 % für das native Peptid weist eine gute Übereinstimmung mit anderen Publikationen auf [50, 27]. Der Helixanteil nimmt bei steigender Peptid-Konzentration im Lipid zu, was für eine stärker ausgeprägte α -Helix durch kooperative Effekte spricht. Entweder liegt das Peptid in einer Umgebung der Membran mit niedrigerer Dielektrizitätskonstante vor oder die höhere Ordnung der Struktur ist Ausdruck einer Oligomerisierung.

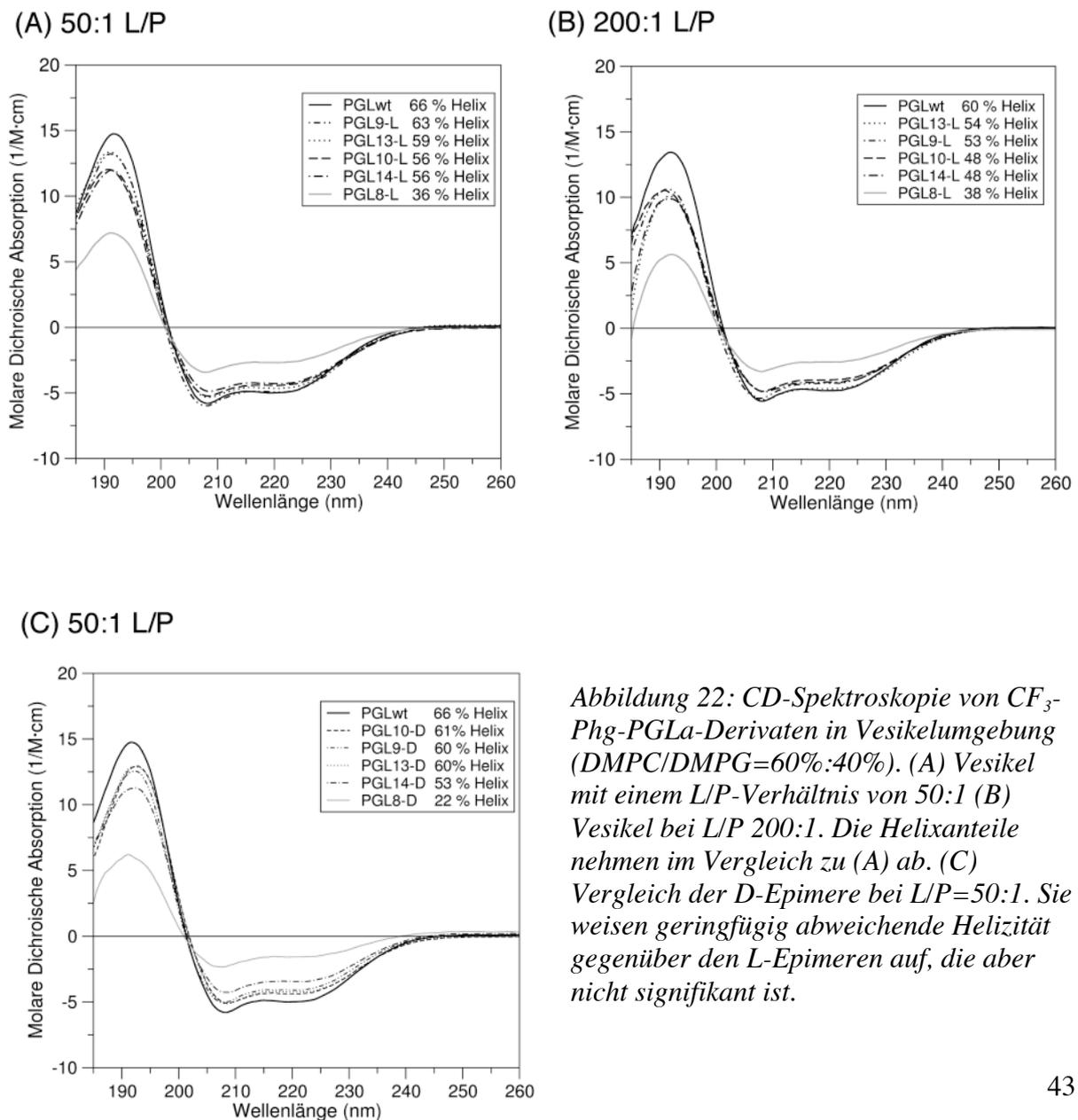


Abbildung 22: CD-Spektroskopie von CF_3 -Phg-PGLa-Derivaten in Vesikelumgebung (DMPC/DMPG=60%:40%). (A) Vesikel mit einem L/P-Verhältnis von 50:1 (B) Vesikel bei L/P 200:1. Die Helixanteile nehmen im Vergleich zu (A) ab. (C) Vergleich der D-Epimere bei L/P=50:1. Sie weisen geringfügig abweichende Helizität gegenüber den L-Epimeren auf, die aber nicht signifikant ist.

Beim Vergleich der derivatisierten Seitenketten fällt das PGL8-Derivat aus der Reihe, da es ungefähr die Hälfte an Helizität gegenüber dem nativen Wildtyp-Peptid einbüßt, so dass das Peptid PGL8 für eine NMR-Struktur-Messung ungeeignet zu sein scheint. Die anderen Markierungen unterliegen nur leichten Beeinträchtigungen mit einer Helixabnahme von 5-10 %. Dieses Ergebnis unterstreicht einen detektierbaren Einfluss der Markierungen, aber offenbar keinen fundamental störenden Effekt.

Tabelle 7: Zusammenstellung der quantitativen Auswertung der Sekundärstrukturberechnungen mit den drei unterschiedlichen Programmen (SELCON3, Continnl, CDSSTR), aus denen abschließend der Mittelwert gebildet wurde [62].

| Lipid-Peptid-Verhältnis (L/P) | Derivat | $\Delta\epsilon_{222\text{ nm}}$ [1/M·cm] | Helixanteil | | | |
|-------------------------------|---------|--|-------------|----------|--------|------------------|
| | | | SELCON3 | Continnl | CDSSTR | $\bar{\epsilon}$ |
| 50:1 | PGLwt | -4,945 | 0,633 | 0,662 | 0,670 | 0,655 |
| | PGL8-D | -1,559 | 0,222 | 0,218 | 0,210 | 0,217 |
| | PGL8-L | -2,659 | 0,330 | 0,365 | 0,375 | 0,357 |
| | PGL9-D | -4,082 | 0,551 | 0,645 | 0,615 | 0,604 |
| | PGL9-L | -4,930 | 0,590 | 0,647 | 0,651 | 0,629 |
| | PGL10-D | -3,943 | 0,566 | 0,634 | 0,620 | 0,607 |
| | PGL10-L | -4,379 | 0,531 | 0,597 | 0,557 | 0,562 |
| | PGL13-D | -4,351 | 0,565 | 0,616 | 0,625 | 0,602 |
| | PGL13-L | -4,612 | 0,581 | 0,595 | 0,585 | 0,587 |
| | PGL14-D | -3,454 | 0,493 | 0,572 | 0,534 | 0,533 |
| PGL14-L | -4,287 | 0,532 | 0,612 | 0,547 | 0,564 | |
| 200:1 | PGLwt | -4,741 | 0,573 | 0,606 | 0,609 | 0,596 |
| | PGL8-D | -1,568 | 0,192 | 0,183 | 0,203 | 0,193 |
| | PGL8-L | -2,572 | 0,319 | - | 0,442 | 0,381 |
| | PGL9-D | -3,773 | 0,481 | 0,533 | 0,568 | 0,527 |
| | PGL9-L | -4,195 | 0,504 | 0,509 | 0,589 | 0,534 |
| | PGL10-D | -3,807 | 0,492 | 0,451 | 0,578 | 0,507 |
| | PGL10-L | -3,899 | 0,480 | 0,467 | 0,505 | 0,484 |
| | PGL13-D | -3,439 | 0,452 | 0,463 | 0,520 | 0,478 |
| | PGL13-L | -4,601 | 0,474 | - | 0,608 | 0,541 |
| | PGL14-D | -3,508 | 0,476 | 0,484 | 0,538 | 0,499 |
| PGL14-L | -4,139 | 0,462 | 0,427 | 0,556 | 0,482 | |

Ein weitere Rolle für die Störung der Struktur der Substitution scheint die substituierte Position zu spielen. So weisen die CF₃-Phg-PGLa-Derivate PGL9 und PGL13 die geringste Beeinträchtigung auf, während PGL10 und PGL14 mit etwas geringerem Helixanteil detektiert wurden. Die Aminosäure an den Positionen 9 und 13 ist Isoleucin, eine β -verzweigte Aminosäure, die einen größeren Raum einnimmt als Alanin an den Positionen 10 und 14. Die Einführung der ¹⁹F-markierten Aminosäure CF₃-Phg stört aus diesem Grunde die Isoleucinpositionen weniger, da die sterische Spannung schon im nativen Peptid vorliegt. Die

D-Epimere der CF₃-Phg-PGLa-Derivate erweisen sich ebenso als hauptsächlich helikal, wobei variierende Helixanteile gegenüber den L-Epimeren nicht signifikant sind.

Eine Begrenzung der CD-Messungen liegt in der Interpretierbarkeit der Daten, da eine Unterscheidung zwischen dem absoluten Helixanteil entlang der Peptidsequenz und der Dynamik eines Gleichgewichts zwischen Helix und unstrukturiertem Random Coil nicht möglich ist [63]. So können zu diesen Aspekten keine Aussagen im Hinblick auf die Auswertung getroffen werden.

3.3.2 Antimikrobielle Wachstumsassays mit vergleichbarer biologischer Aktivität gegenüber dem Wildtyp

Alle Peptide bis auf die PGL8-Peptid-Derivate zeichnen sich durch eine antimikrobielle Potenz aus, die in der Größenordnung des nativen Peptids liegt, wie aus Abbildung 23 und Abbildung 24 erkennbar ist (Zusammenfassung der ermittelten Hemmhofzonen und MIC-Werte in Tabelle 8 und Tabelle 9). Die PGLa-Derivate mit der ¹⁹F-markierten Aminosäure sind zudem noch etwas aktiver, was der erhöhten Hydrophobizität zugeschrieben werden kann. Sie sorgt für eine bevorzugte Verteilung des Peptids zum Membraninnern und kann durch tieferes Eindringen in die Membran eine effektivere Membranpermeabilisation erreichen [64]. Obwohl die CD-Daten einen erkennbaren Einfluss der Substitution an verschiedenen Positionen suggerieren, scheint sie keinen Einfluss auf die Hemmaktivität für Mikroben auszuüben. Dies kommt möglicherweise daher, dass die Hydrophobizität der Derivate untereinander kaum differiert. Die D-Epimere weisen in den Wachstumstests eine etwas geringere Aktivität auf, was aber nicht durch die Helixanteile erklärt werden kann. Möglicherweise sind hier CD-Spektroskopie und antimikrobielle Wachstumsassays zu ungenau, um eine direkte Korrelation der Helizität mit der biologischen Aktivität [65] nachzuweisen. Die Hauptfehlerquelle für beide Methoden liegt in der exakten Konzentrationsbestimmung durch die UV-Spektroskopie.

Weiterhin konnten die Experimente zeigen, dass Gram-positive Bakterien anfälliger für die Wirkung dieser antimikrobiellen Peptide sind, da offenbar ihr Peptidoglycan-Geflecht vor der Plasmamembran leichter zu überwinden ist, als die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien (vgl. auch Abschnitt Wirkmechanismus und Resistenzentwicklung).

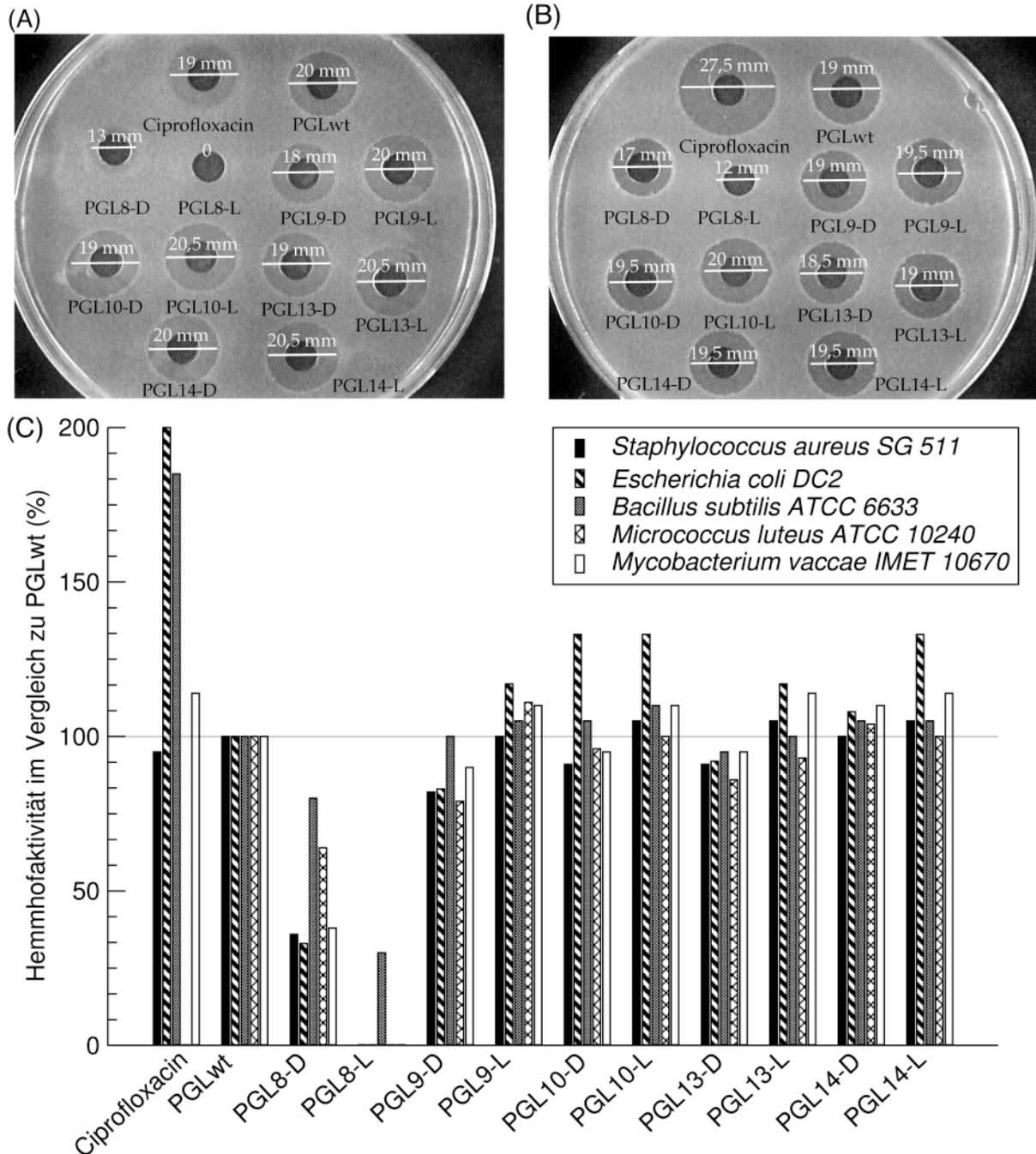


Abbildung 23: Agar-Diffusionstests der CF_3 -Phg-PGLa-Derivate und Ciprofloxacin als Kontrolle mit 12 Stämmen. (A) *Staphylococcus aureus* SG511 und (B) *Bacillus subtilis* ATCC6633 werden in ihrem Wachstum charakteristisch gehemmt. Auffallend ist die verminderte Aktivität der PGL8-Derivate. (C) Zusammenstellung der Hemmhofaktivität aus dem Agar-Diffusionstest im Vergleich zum nativen Peptid PGLwt. Die CF_3 -Phg-PGLa-Derivate erweisen sich sogar als leicht potentere antimikrobielle Substanzen im Vergleich zum nativen Peptid vermutlich durch ihre gesteigerte Hydrophobizität. D-Epimere weisen eine geringfügig niedrigere Aktivität auf als L-Epimere.

Tabelle 8: Mit Hilfe des Agar-Diffusionstests ermittelte antimikrobielle Wachstumshemmung der gereinigten CF₃-Phg-PGLa-Derivate (Hemmhofgröße in mm)

| Mikroorganismus□ | Hemmhofgröße (mm) | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| | Cipro- floxacin | PGLwt | PGL8-D | PGL8-L | PGL9-D | PGL9-L | PGL10-D | PGL10-L | PGL13-D | PGL13-L | PGL14-D | PGL14-L | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 13,0 | 3,5 | 0 | 0 | 2,5 | 4,5 | 5,0 | 5,5 | 3,0 | 4,0 | 3,5 | 4,5 | |
| <i>Escherichia coli</i> DC2 | 12,0 | 6,0 | 2,0 | 0 | 5,0 | 7,0 | 8,0 | 8,0 | 5,5 | 7,0 | 6,5 | 8,0 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | 7,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,0 | 2,0 | 4,0 | 0 | 2,5 | 3,0 | 3,0 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> K799/61 | 15,5 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4,0 | 8,0 | 0 | 3,0 | 5,5 | 5,5 | |
| <i>Burkholderia cepacia</i> DSM 7288 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 | 10,5 | 11,0 | 4,0 | 0 | 9,0 | 11,0 | 10,0 | 11,5 | 10,0 | 11,5 | 11,0 | 11,5 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 134/93 | 0 | 6,0 | 0 | 0 | 4,0 | 6,0 | 30,0 | 28,0 | 28,0 | 29,0 | 30,0 | 30,0 | |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 18,5 | 10,0 | 8,0 | 3 | 10,0 | 10,5 | 10,5 | 11,0 | 9,5 | 10,0 | 10,5 | 10,5 | |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 | 0 | 14,0 | 9,0 | 0 | 11,0 | 15,5 | 13,5 | 14,0 | 12,0 | 13,0 | 14,5 | 14,0 | |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 | 0 | 8,0 | 2,0 | 0 | 5,5 | 8,0 | 8,5 | 11,0 | 7,0 | 9,0 | 9,5 | 10,0 | |
| <i>Mycobacterium vaccae</i> IMET 10670 | 12,0 | 10,5 | 4,0 | 0 | 9,5 | 11,5 | 10,0 | 11,5 | 10,0 | 12,0 | 11,5 | 12,0 | |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Nach den ermittelten Ergebnissen weisen die CF₃-Phg-PGLa-Derivate der Seitenketten 9, 10, 13 und 14 eine akzeptable Übereinstimmung in Struktur und Aktivität mit dem nativen Peptid auf und können für die Sammlung von Winkeleinschränkungen eingesetzt werden. Im Vergleich der verschiedenen CF₃-Phg-PGLa-Derivate lassen sich Helizität und antimikrobielle Wirksamkeit direkt korrelieren. Die Derivate mit der Substitution an Position 8 weisen weder eine ausreichende Übereinstimmung im Helixanteil noch eine genügende biologische Aktivität auf. Sie sollten daher für die Sammlung von NMR-Winkeleinschränkungen mit Hilfe der Festkörper-NMR nur unter Vorbehalt in Betracht gezogen werden. Diese Vermutung ließ sich nach durchgeführten ¹⁹F-NMR-Messungen (sowohl für das L- als auch das D-Epimer) bestätigen, da keine Dipolaufspaltungen bestimmbar waren (Spektren nicht gezeigt).

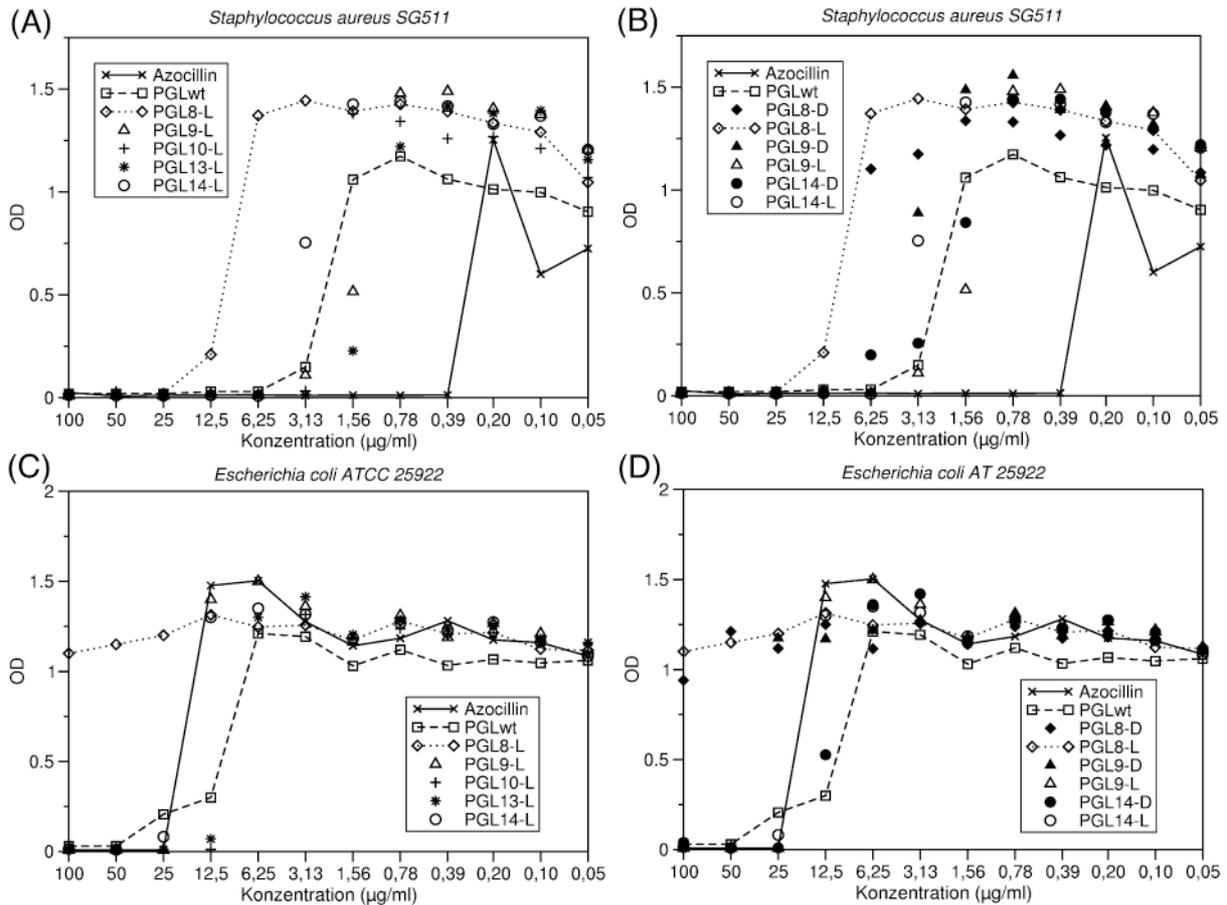


Abbildung 24: MIC-Assays der synthetisierten CF_3 -Phg-PGLa-Derivate und Azocillin als Kontrolle für Kulturen von *Staphylococcus aureus* SG511 und *Escherichia coli* ATCC25922. (A) und (C) Vergleich der L-Epimere nach substituierter Positionen. (B) und (D): Vergleich zwischen D- und L-Epimeren. Prinzipiell lassen sich drei Gruppen von Aktivitäten einteilen: 1. Kontrolle 2. PGL8 und 3. PGLwt, deren Wertepunkte jeweils zu einer Geraden verbunden sind. Das PGL8-Derivat weist für beide Stämme eine wesentlich niedrigere Aktivität auf. Die D-Epimere zeigen tendenziell eine etwas geringere Aktivität.

Tabelle 9: Zusammenfassung der ermittelten MIC-Werte in $\mu\text{g/ml}$

| Mikroorganismus | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Azocillin | PGLwt | PGL8-D | PGL8-L | PGL9-D | PGL9-L | PGL10-D | PGL10-L | PGL13-D | PGL13-L | PGL14-D | PGL14-L |
| Gram-neg.: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 25 | 25 | >100 | >100 | 50 | 25 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 25 | 25 |
| Gram-pos.: <i>Staphylococcus aureus</i> SG511 | 0,4 | 6,25 | 25 | 12,5 | 6,25 | 6,25 | 6,25 | 3,13 | 12,5 | 3,13 | 12,5 | 6,25 |

4 Charakterisierung der Orientierung des PGLa-Moleküls durch Festkörper-NMR

4.1 Grundlagen und Anwendung der „Orientational Constraints“-Strategie

4.1.1 Die Dipolkopplung und die Orientierung der markierten Seitenkette

Zur Bestimmung der räumlichen Orientierung einer α -Helix relativ zum externen Magnetfeld ist als Ausgangspunkt die räumliche Lage der einzelnen markierten CF_3 -Phg-Seitenketten in einer makroskopisch orientierten Membranprobe zu ermitteln. Diese einzelnen Winkeleinschränkungen zusammengefasst an einem starren Sekundärstrukturelement können die Gesamtorientierung der Helix beschreiben. Dieser Ansatz wird als „Orientational Constraints“-Strategie bezeichnet.

Die Kenntnis der Größe der Dipolkopplung Δ_{FF} aus der Festkörper-NMR ermöglicht die Bestimmung des Winkels θ , welcher die CF_3 -Rotationsachse (bzw. $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$) mit der Membrannormalen bei horizontaler Probenorientierung einschließt. Wenn für interatomare Fluor-Abstände in der CF_3 -Gruppe $r_{12} = 2,16 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ zu Grunde gelegt werden und zusätzlich der Ordnungsparameter S_{mol} berücksichtigt wird, gilt:

$$\Delta_{FF} = 15,8 \cdot 10^3 \text{ Hz} \cdot S_{\text{mol}} \cdot \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2}$$

Abbildung 25 stellt diesen Zusammenhang graphisch dar. Die Größe des molekularen Ordnungsparameters S_{mol} , der Werte von 0 bis 1 annehmen kann, repräsentiert die ausgemittelte Orientierung im Rahmen der NMR-Zeitskala. Je näher der Ordnungsparameter an 1 ist, desto weniger ausgemittelt und umso direkter interpretierbar ist die bestimmte Orientierung. Wenn sich also die Seitenkette mit dem ^{19}F -Kern schneller bewegt als ein FID (Free Induction Decay) aufnehmen kann, dann wird lediglich eine zeitlich gemittelte Orientierung im Spektrum abgebildet.

Für eine exakte Auswertung ist neben der Kenntnis des Betrages der Dipolaufspaltung auch das Vorzeichen von Bedeutung. Die dazugehörige Information der chemischen Verschiebung ermöglicht eine exakte Zuordnung des Vorzeichens der Dipolkopplungen. Eine

solche Bestimmung bedarf einiger Überlegungen, die anhand der Abbildung 25 nachvollziehbar werden. Neben der Dipolkopplung unterliegt die chemische Verschiebungsanisotropie einer analogen Abhängigkeit des Winkels von $(3\cos^2\theta - 1)$ zwischen der Seitenkette und dem externen Magnetfeld. Eine prinzipielle Einschränkung für das Vorzeichen der Dipolkopplung kann man für Beträge größer als 7,9 kHz treffen, da sie laut Abbildung 25 immer positiv sind. Aus diesem Grund erhalten alljene Dipolkopplungen ein positives Vorzeichen, die auf der gleichen Seite des Spektrums (von der isotropen Position aus gesehen) wie $\Delta_{FF} > 7,9$ kHz auftreten.

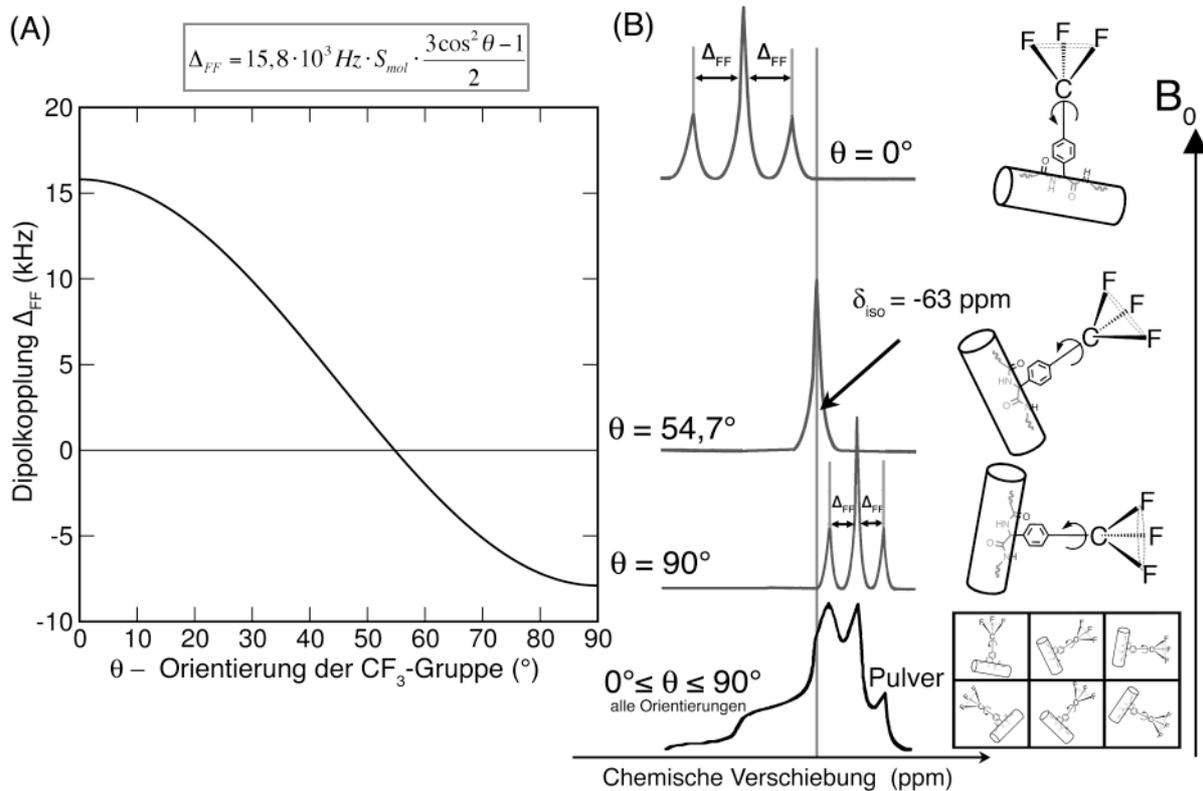


Abbildung 25: (A) Dipolkopplung als Funktion von θ (der Orientierung der CF_3 -Rotationsachse). Für eine eindeutige Bestimmung der Lage der Seitenkette ist die Kenntnis des Vorzeichens von Δ_{FF} entscheidend. Lediglich für Kopplungen größer als 7,9 kHz kann das Vorzeichen zweifelsfrei als positiv zugeordnet werden. (B) Vier idealisierte ^{19}F -NMR-Spektren für $\theta = 0^\circ; 54,7^\circ; 90^\circ$ und $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$ (Pulverspektrum). Mit Hilfe der chemischen Verschiebungsinformation können jedoch alle Dipolkopplungen inklusive Vorzeichen zugeordnet werden.

In einem Fall zeigte die PGL10-D Markierung Kopplungen bei 10,7 kHz, wie aus Abbildung 47 hervorgeht. Da diese Kopplung nach der Δ_{FF} -Gleichung ein positives Vorzeichen besitzen muss, tragen alle weiteren Kopplungen, deren chemische Verschiebung größer als $-63,8$ ppm sind, ein positives bzw. alle kleiner als $-63,8$ ppm ein negatives Vorzeichen.

Die isotrope chemische Verschiebung, die einem isotropen Signal durch Ausmittelung einer freien schnellen Bewegung um alle Achsen des Moleküls entspricht, lässt sich auch anhand des Drehens der Probe in der Festkörper-NMR bestimmen. Voraussetzung dafür sind die Ordnungsverhältnisse eines Flüssigkristalls, der für unsere orientierten Lipid-Doppelschichten eine Rotation des Peptids um die Membrannormalen zulässt. Eine anisotrope Probe, die sowohl horizontal als auch vertikal orientiert zum externen Magnetfeld vermessen wird, ruft jeweils ein Signal mit einem Abstand von $2/3$ bzw. $1/3$ zur isotropen Position hervor. Die vertikal vermessenen Proben rufen damit eine Halbierung der Dipolaufspaltung hervor, wie sie an Abbildung 33 nachvollzogen werden können.

4.1.2 Die Seitenketten an einem Sekundärstrukturgerüst als Ausgangspunkt für Orientierungsberechnungen

Um die Ausrichtung eines Peptids in Bezug auf eine Lipid-Doppelschicht durch die Sammlung von Winkeleinschränkungen zu berechnen, ist die Stellung der Bindungen zueinander entscheidend, die durch die Dipolkopplungen repräsentiert werden. So kann eine ideale α -Helix als Gerüst dienen, an dem die markierten Seitenketten starr angebracht sind. Deren gesammelte Winkel erlauben die Bestimmung der Gesamtorientierung des Peptids in Bezug auf das externe Magnetfeld bzw. die Membran. Dennoch besitzt eine α -Helix neben ihrem charakteristischen Wasserstoffbrückenmuster noch mehrere Freiheitsgrade in ihren dihedralen Winkeldefinitionen, die wiederum eine Vielzahl an Positionen für die Seitenketten zulassen, so dass die Auswertung dementsprechend komplizierter wird.

Für α -Helices gelten in der Literatur ϕ - und ψ -Werte von $+20^\circ$ bis -60° bzw. -30° bis -120° als erlaubter Bereich, dem eine Analyse von 500 Proteinkristallstrukturen zu Grunde lagen [66]. Für eine genauere Festlegung der ϕ - und ψ -Werte erscheint eine Untersuchung von Membranproteinstrukturen sinnvoll, da aufgrund der niedrigen Dielektrizitätskonstante der Lipidumgebung wesentlich weniger variable Sekundärstrukturen zulässig sind als in wässriger Lösung. Bei wasserlöslichen Proteinen können beispielsweise α -Helices und β -Faltblätter im Inneren und Äußeren des Proteins verteilt sein, so dass ihre Wechselwirkungen untereinander asymmetrisch auftreten und dementsprechend variabel sind. Da Sekundärstrukturen in Membranumgebung bestrebt sind, überflüssige Wechselwirkungen mit den Lipiden zu vermeiden, sind die Amid-Positionen im Peptidrückgrat häufig ideal in einer Sekundärstruktur angeordnet. Die Beeinflussung einer idealen Geometrie in Abwesenheit von Wasser findet zwischen den Sekundärstrukturelementen statt, so dass keine hydrophoben,

sondern schwache weitreichende elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen für Abweichungen von der idealen α -Helix sorgen. Diese Tendenz konnte bei der Analyse der ϕ - und ψ -Winkel von Bakteriorhodopsin und M2-Transmembran-Helix des Influenza A-Virus bestätigt werden. Für diese Beispiele zeichnet sich eine gesteigerte Uniformität der Helix-Geometrie in Membranumgebung mit $\phi = -60^\circ$ und $\psi = -45^\circ$ ab [67].

Darüber hinaus sind für Membranumgebung weitere helikale Modelle wie die 3_{10} und die π -Helix bekannt, die ein Wasserstoffbrückenmuster von 3_{10} bzw. $4,6_{16}$ aufweisen.

Abbildung 26 zeigt die erwähnten Helixmodelle aufgetragen in einem Ramachandran-Diagramm und die verschiedenen PGLa-Helices in der Aufsicht entlang ihrer Helixachse.

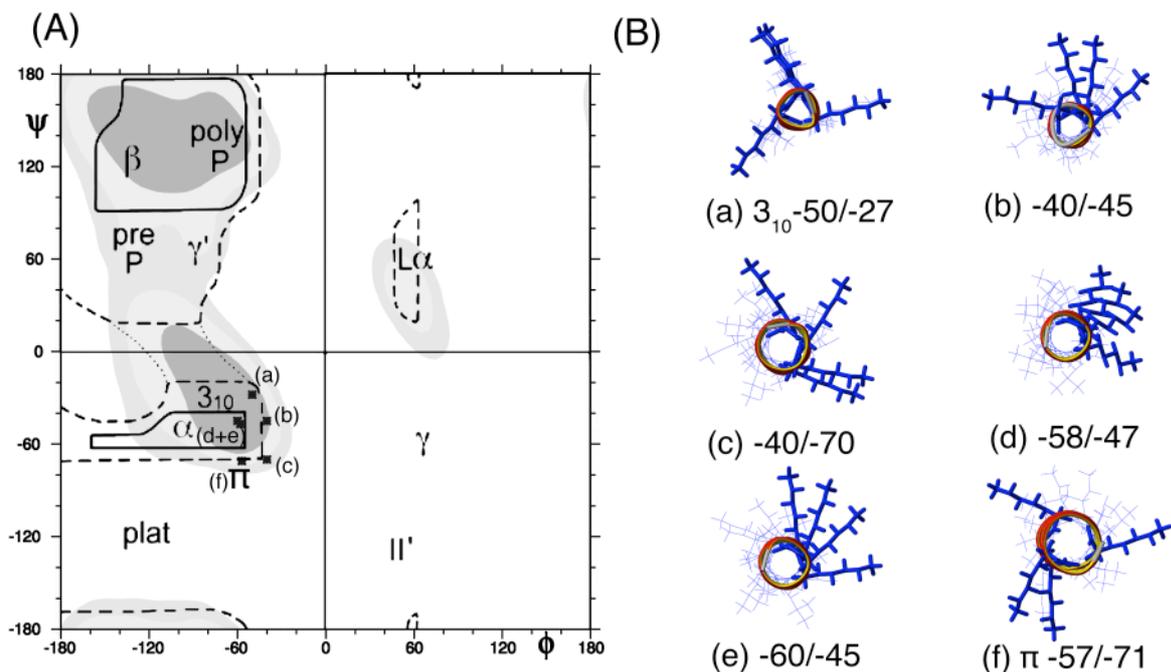


Abbildung 26: (A) Ramachandran-Diagramm mit ausgewählten Helixmodellen (a) bis (f) als Kreuze markiert. Überlagert sind das Häufigkeitsverteilte Auftreten der ϕ - und ψ -Winkel mit ihren zugehörigen Sekundärstrukturen. (B) Helixdarstellungen von PGLa entlang der Helixachse der sechs eingesetzten Helixmodelle mit dazugehörigen ϕ - und ψ -Werten. Die Lysin-Seitenketten sind hervorgehoben dargestellt.

4.1.3 Normierung der Helixposition und Beschreibung ihrer Orientierung

Anstatt zur Beschreibung der Orientierung einer α -Helix im Raum mit rechtwinkligen Koordinaten zu arbeiten, erweist es sich als sinnvoll, Winkel anzugeben, mit denen um ein molekulares Bezugssystem gedreht wird. Als Ausgangspunkt dient eine α -Helix in einer normierten Position in Bezug auf das externe Magnetfeld B_0 . Die Helixachse vom N- zum C-Terminus liegt dabei direkt auf dem B_0 -Feldvektor bzw. der z-Achse. Ein gewähltes α -Kohlenstoff-Atom wird von der y-Achse geschnitten. Diese normierte Lage des Peptids wird

als das molekulare Bezugssystem bezeichnet. Die α -Helix, vergleichbar mit einem Zylinder, kann um einen Winkel θ („Tilt“) in der yz -Ebene gekippt werden und um einen Winkel ϕ („Rotation“) um die Zylinderachse rotieren. Der dritte Winkel, mit dem ein Zylinder eindeutig im dreidimensionalen Raum beschrieben wird, dreht um die z -Achse. Er kann in unserem Fall frei gewählt werden, da die gewöhnliche Bewegung eines solchen Peptids eine Rotation um die Membrannormale ausführt, so dass der Winkel für die Berechnung außer Acht gelassen werden kann. Der Sachverhalt der Normierung und der Drehung mit Hilfe der azimutalen Winkel ist in Abbildung 27 illustriert.

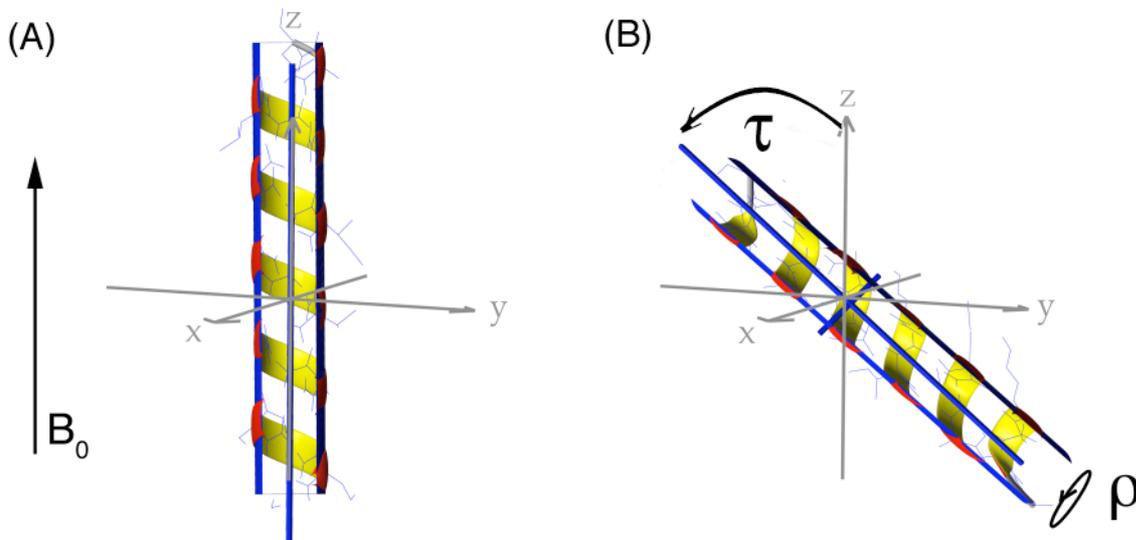


Abbildung 27: Darstellung der α -Helix (A) in normierter Lage mit ihrem dazugehörigen Koordinatensystem. Die z -Achse bildet die Helixachse vom Amino- zum Carboxy-Terminus. Auf der y -Achse sind die Koordinaten des C_{α} der Seitenkette 9 definiert. (B) in orientierter Lage zum externen Magnetfeld B_0 (oder zur Membrannormalen, die bei horizontaler Probenanordnung mit der z -Achse identisch ist) werden die Winkel $0^{\circ} \leq \theta \leq 90^{\circ}$ für den Kippwinkel oder Tilt in der xz -Ebene und $0^{\circ} \leq \phi \leq 360^{\circ}$ für die Rotation der Helix um ihre eigene Achse verwendet. Das molekulare Ansicht- und Analyse-Programm MOLMOL [68] bietet direkte Eingabemöglichkeiten, um die Drehungen auf die Helix anzuwenden.

4.1.4 Bestimmung der Orientierung der Helix

Bei der Bestimmung der Gesamtorientierung des Peptids genügen prinzipiell drei Winkeleinschränkungen von verschiedenen Seitenketten der Helix, um die beiden Winkel θ und den Ordnungsparameter S_{mol} zu bestimmen. Nachdem die Koordinaten der Dipolkopplungsachse eines normierten Moleküls und die gemessenen Dipolkopplungen vorliegen, werden alle möglichen θ -Winkel und der Ordnungsparameter S_{mol} bzw. die daraus folgenden Dipolkopplungen durchgerechnet und mit Hilfe einer χ^2 -Funktion mit den

experimentellen Werten verglichen. Minima der χ^2 -Funktion ergeben sich für diejenigen $\tau/\rho/S_{mol}$ -Kombinationen, bei denen die geringsten Abweichungen zwischen simulierten und experimentellen Kopplungen auftreten. Die prinzipielle Funktionsweise der Auswertung ist dem Fließschema in Abbildung 28 zu entnehmen.

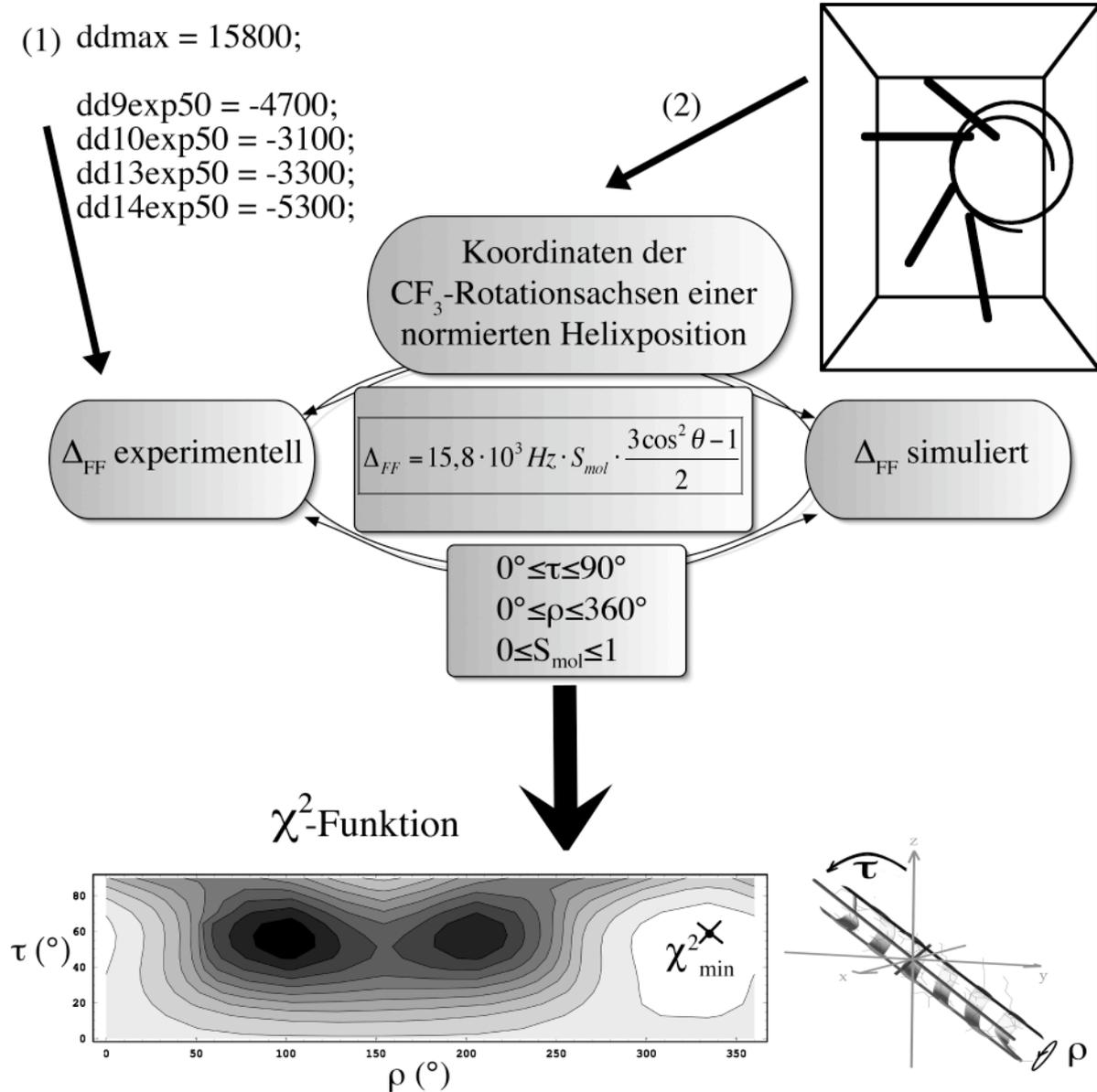


Abbildung 28: Fließschema für die Auswertung der einzelnen CF_3 -Dipolkopplungen von verschiedenen Seitenketten bis zur Bestimmung der Orientierung des gesamten Peptids. (1) Als Eingabe werden die einzelnen experimentell ermittelten Dipolkopplungen und (2) die dazugehörigen Koordinaten der Seitenketten aus einem normierten Molekül benötigt. Diese fließen in die Berechnung von Δ_{FF} ein. Das Kernstück der Berechnung ist die χ^2 -Funktion, die über einen simulierten τ - und ρ -Bereich experimentell ermittelte und theoretisch berechnete Dipolkopplungen miteinander vergleicht und für die wahrscheinlichste Lage des Peptids zum Magnetfeld die minimale Abweichung angibt.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Herstellung von orientierten Proben

Nach der Einwaage der Lipide (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) entsprechend dem vorgegebenen Lipid-Peptid-Verhältnis (L/P) wurden diese in 357 μl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst (maximal jedoch 20 mg): DMPC, DLPC und DPPC in MeOH; DMPG und DMPE in MeOH:CHCl₃ (70:30), *E. coli* polarer Lipidextrakt in CHCl₃. Die wässrige Peptid-Lösung (0,2 bis 1,5 mg in 153 μl) wurde mit Lipid-Lösung gemischt, wodurch sich eine Gesamt-Lösungsmittelzusammensetzung von 30 % H₂O und 70 % Lipidlösungsmittel ergab. Das L/P-Verhältnis wurde von 400:1 bis 20:1 variiert. Jeweils ein Ansatz wurde auf max. 17 Glasplättchen mit Maßen von 0,06 mm x 7,5 mm x 18 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) verteilt. Dabei wurden nicht mehr als 30 μl pro Plättchen verwendet. Probenansätze mit hohem L/P-Verhältnis wurden kurzzeitig auf 35 °C erwärmt, um die Fluidität zu erhöhen. Nach der Evaporation der flüchtigen Bestandteile unter der Sicherheitswerkbank folgten mindestens vier Stunden Trocknung bei angelegtem Vakuum. Danach wurden die Glasplättchen aufeinander gestapelt und mit einem leeren Glasplättchen bedeckt. Dieser Glasstapel wurde in 98%iger Feuchtigkeitsatmosphäre von K₂SO₄ bei 48 °C für 1-4 Tage hydratisiert (Erhöhung auf 55 °C für DMPE nötig, um Phasenübergangstemperatur von 52 °C zu überschreiten). Vor dem Austrocknen der Probe wurden die Glasstapel mit gedehntem Parafilm und zusätzlich mit Frischhaltefolie geschützt. (Detaillierte Laboranleitung im Anhang einzusehen)

4.2.2 NMR-Experimente

Festkörper-¹⁹F-NMR-Spektren wurden auf einem 500 MHz Varian Unity Inova Spektrometer (Varian, Palo Alto, USA) aufgenommen. Als Probenkopf kam ein Zweikanal-(¹H, ¹⁹F)-Doty-Flachspulenkopf (Doty Scientific, Columbia, USA) mit einer Probenöffnung von 2,5 mm x 9 mm zum Einsatz, bei dem die Probenorientierung mit einem Goniometer eingestellt werden konnte. Für die ¹⁹F-Pulse wurde ein externer 470 MHz-Hochleistungsverstärker (Creative Electronics, Los Angeles, USA) verwendet. Zur Referenzierung wurden NaF-Lösungen in 10 mM Phosphat-Puffer hergestellt und über die orientierte Probe gestapelt: -120,8 ppm = $\perp \uparrow B_0$ bzw. -120,1 ppm $\parallel \uparrow B_0$ zum Magnetfeld. Wenn die Referenzprobe nicht über die orientierte Probe in den Flachspulenkopf passte, wurden ¹H-Spektren zur Referenzierung herangezogen: beide großen ¹H-Signale auf 4,83 ppm und 1,21 ppm geeicht [69]. Für ³¹P-Messungen wurde

ein selbstgebauter $^1\text{H}/\text{X}$ statischer Probenkopf eingesetzt, um die Orientierung der Lipide zu überwachen.

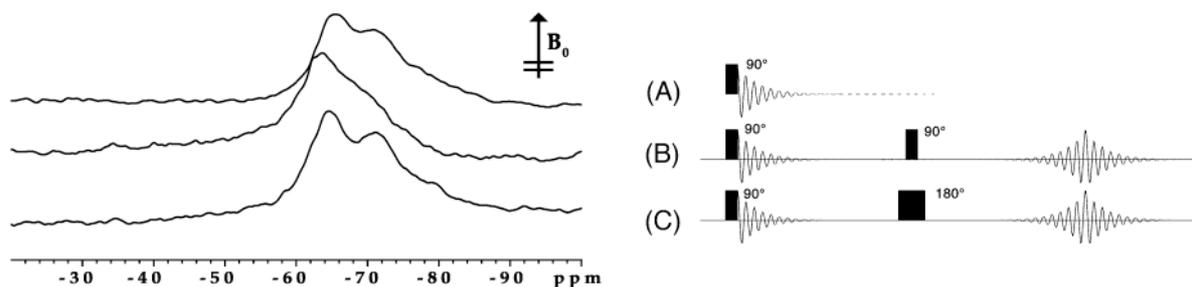


Abbildung 29: ^{19}F -NMR-Spektren des CF_3 -Phg-PGLa-Derivates PGL13-L 50:1 im L/P-Verhältnis mit schematischer Darstellung der jeweils angewandten Pulssequenzen. (A) Das 90° Einpuls-Experiment wurde mit einer Pulslänge von $2,6 \mu\text{s}$ ausgeführt und führt durch die ersten fehlenden Punkte des FIDs (Free Induction Decay) zu einer nicht-linearen Basislinie. Es nimmt aber sowohl chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) als auch Dipolkopplung (Δ_{FF}) zuverlässig auf. (B) Das 90° Echo-Experiment wurde mit einer Pulslänge von $2,9 \mu\text{s}$ optimiert. Theoretisch fokussiertes Δ_{FF} , führt aber zu einer Ungenauigkeit in der CSA. In diesem Fall ist keine korrekte Δ_{FF} -Bestimmung möglich, auch die CSA verschiebt sich. (C) Das 180° Echo-Experiment wurde ebenfalls mit einer Pulslänge von $2,9$ bzw. $5,4 \mu\text{s}$ programmiert. In der Theorie geben die Spektren eine korrekte CSA wider, sind aber nicht in der Lage Δ_{FF} zu fokussieren. In diesem Beispiel befinden sich offensichtlich beide Größen im Vergleich zum 90° Einpuls-Experiment in guter Übereinstimmung.

Soweit nicht anders spezifiziert, erfolgte die Aufnahme die Spektren bei 35°C . Zur Bestimmung der korrekten Dipolkopplungen wurden 90° Einpuls-, 90° Echo- und 180° Echo-Pulssequenzen miteinander verglichen. Die Spektren mit den schematischen Pulsfolgen sind der Abbildung 29 zu entnehmen. Leider konnte nur mit einer sehr niedrigen Entkopplung von ca. 10 kHz gearbeitet werden. Die zuverlässigsten und reproduzierbarsten Ergebnisse wurden mit Hilfe der 90° Einpuls-Sequenzen erzielt. Die fehlenden ersten Punkte des FIDs (Free Induction Decay) konnten durch eine Phasenkorrektur zweiter Ordnung kompensiert werden, so dass trotz einer nicht-linearen Basislinie die wichtige Information der chemischen Verschiebungsanisotropie und der Dipolkopplung aus den Spektren extrahierbar waren. Im Verlaufe der Optimierung wurden auch CPMG-Pulsfolgen angewandt, da sie eine genauere Bestimmung der Dipolkopplung für Trifluoromethylgruppen versprachen [23]. Im Prinzip erscheint dies möglich, wie einige erfolgreiche Bestimmungen auch für CF_3 -Phg-PGLa-Derivate nahe legen. Die Dauer der Optimierung und die längere Messzeit rechtfertigte jedoch einen aufwändigeren Einsatz nicht. (Eine detaillierte Anleitung ist im Anhang beigefügt.)

4.2.3 Modellbau von α -Helices und Positionsnormierung

Mit Hilfe der Software SYBYL (Tripos, St. Louis, USA) kann nach Eingabe der Primärstruktur von PGLa eine ideale α -Helix gebaut werden ($\phi = -58^\circ$ $\psi = -47^\circ$). Bei Bedarf können die dihedralen Winkel manuell eingestellt werden, so dass zusätzlich mit folgenden Winkelkombinationen gearbeitet wurde: $-40^\circ/-45^\circ$, $-40^\circ/-70^\circ$, $-60^\circ/-45^\circ$. Des Weiteren wurden noch 3_{10} - und π -Helixmodelle mit $-50^\circ/-28^\circ$ sowie $-57^\circ/-71^\circ$ eingesetzt. Für jede substituierte Seitenkette wurde jeweils ein Helixmodell erstellt, das anschließend im Tripos Kraftfeld ohne Einbeziehung von elektrostatischen Wechselwirkungen Energie-minimiert wurde. Eine graphische und numerische Darstellung der ϕ - und ψ -Winkel für die jeweiligen Helixmodelle ist der Abbildung 30 zu entnehmen.

Die erstellten PGLa-Helices wurden in ihrer Position normiert, so dass die Helixachse entlang der z-Achse und das C_{α} -Atom des Isoleucins 9 auf die y-Achse ausgerichtet wurde. Zu diesem Zweck hat Dr. Ralf W. Glaser das C⁺⁺-Programm Axis geschrieben, mit dessen Hilfe die nötigen Rotationen der Helix berechnet werden und schrittweise in MOLMOL nachvollzogen werden können. Diese Prozedur wurde für das native Peptid durchgeführt. Anschließend wurde mit MOLMOL eine Positionsanpassung der Modelle mit den substituierten CF₃-Phg-Seitenketten auf das Peptidrückgrat des Wildtyps vorgenommen. Die resultierenden pdb-Dateien erlauben die direkte Extraktion der Koordinaten der substituierten Seitenketten. (Eine genaue Beschreibung des Helixmodellbaus und des Source Codes der Programme sind im Anhang zu finden.)

4.2.4 Berechnung der Peptidorientierung

Die Peptidorientierung wird durch systematisches Kippen und Rotieren aller starren α -Helixmodelle und der Bestimmung der χ^2 -Funktion aus den vorhergesagten und experimentellen Werten ermittelt. Für diese Operationen wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Ulrich Duerr ein Mathematica-Notebook entwickelt, mit dem alle weiteren Rechenschritte in einem Programm durchgeführt werden können. Das entsprechende Prinzip wurde bereits im Fließschema unter Abbildung 28 dargestellt, wobei die experimentellen Dipolaufspaltungen und die Koordinaten der Dipolkopplungsachse als Eingabe erforderlich sind. Die ermittelten Winkel können direkt zur Visualisierung in MOLMOL [68] mit den entsprechenden Dreh-Befehlen an einem normierten Molekül durchgeführt werden.

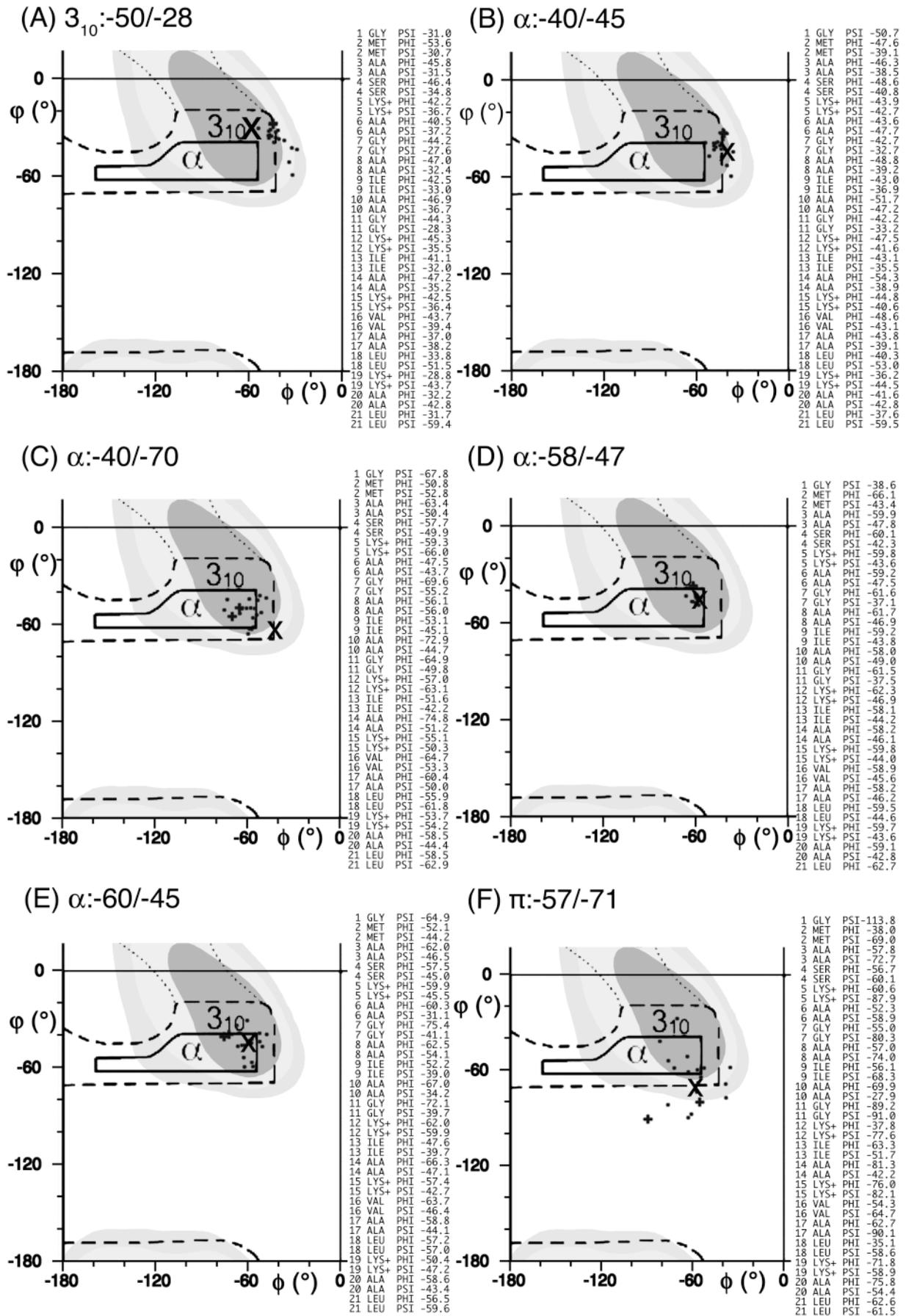


Abbildung 30: Ramachandran-Diagramme der erstellten und Energie-minimierten Helixmodelle von PGLa. (A)–(F) mit den ϕ/ψ -Werten. Ein x kennzeichnet die Ausgangswinkel vor der Energie-Minimierung. Die Namen der Modelle sind an diesen Ausgangswinkel angelehnt. Daneben sind die jeweiligen ϕ - und ψ -Winkel nach der Energie-Minimierung als Punkte numerisch hinzugefügt. Die geringste Streuung weist das ideale $-58/-47$ -Helixmodell in (D) auf. Die größte Streuung der ϕ - und ψ -Winkel tritt beim π -Helixmodell in (F) auf, wobei der C-terminale Teil ab Valin 16 in eine β -Helix übergeht.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Phosphor-Spektren: mögliche Umstrukturierung der Membran unter Peptideinfluss

Für die zuverlässige Bestimmung von Winkeleinschränkungen aus orientierten Proben ist die Kontrolle der makroskopischen und molekularen Orientierung der Membranproben essentiell. Dafür eignet sich ^{31}P -NMR, mit der sich der Grad der Orientierung der Phospholipide quantitativ bestimmen lässt. Neben dieser Kontrolle enthält ein ^{31}P -Spektrum aber auch molekulare Informationen zur Bewegung und Orientierung der Phosphatgruppe. Bei der Herstellung orientierter Proben mit steigender Peptidkonzentration wurde mit dem nicht markierten Peptid PGLwt gearbeitet, da man für ^{31}P -Spektren keine weitere Markierung benötigt. Der Vergleich der ^{31}P -Spektren der CF_3 -Phg-tragenden PGLa-Derivate kann als weiterer Beweis dienen, dass die molekularen Eigenschaften der markierten und unmarkierten Peptide ebenso wie deren Wechselwirkungen der Membran nahezu identisch sind. Die folgenden Beobachtungen wurden in gleicher Weise für alle markierten CF_3 -Phg-PGLa-Derivate gemacht (Spektren nicht gezeigt). Abbildung 31 stellt eine Konzentrationsserie des nativen PGLa in DMPC-Membranen dar, bei denen ein Orientierungsgrad von ca. 80% bestimmt werden konnte. Das Diagramm in Abbildung 32 zeigt, dass im Verlaufe des Anstiegs der Peptidkonzentration eine konstante Verschiebung des Hauptsignals ab L/P=80:1 von 29 ppm auf 24,5 ppm und bei L/P=20:1 das Auftreten eines breiteren Anteils bei 5 ppm zu beobachten war. Die stetige Verschiebung des Peaks deutet auf eine höhere Beweglichkeit oder eine leichte Neigungsänderung der Phosphatgruppen hin, die offenbar durch das Peptid induziert wird. Das Auftreten eines zweiten Anteils geht mit einer möglichen Verbreiterung des orientierten Peaks von 28 bis ca. 15 ppm einher. Dieser Befund könnte durch Peptid-induzierte Veränderung der Phosphatorientierung hervorgerufen werden.

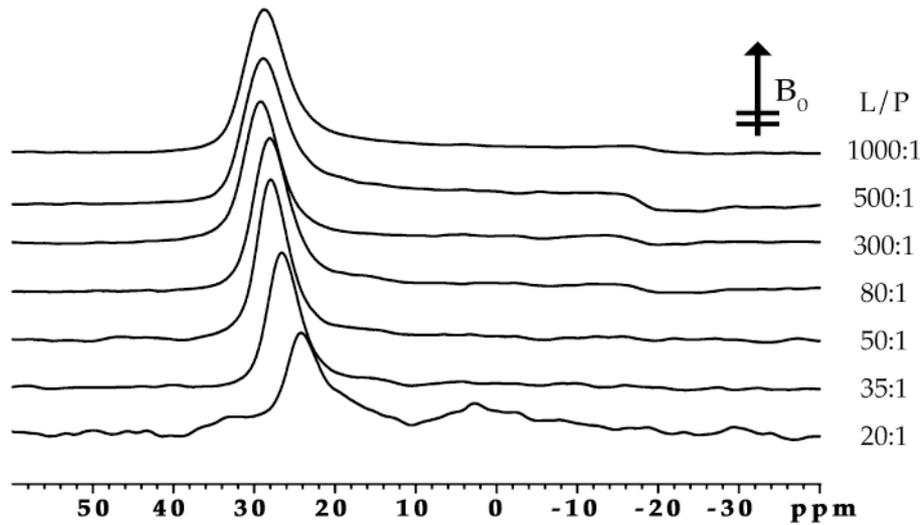


Abbildung 31: ^{31}P -Echo-Spektren von orientierten Proben bei 35 °C. Konzentrationsserie PGL-Wildtyp (PGLwt) mit steigender Peptidkonzentration $1000:1 \leq L/P \leq 20:1$ im Lipid DMPC. Proben sind zu ca. 80% orientiert. Lediglich $L/P=20:1$ zeigt einen zusätzlichen schlecht orientierten Anteil bei 5 ppm. Mit steigender Peptidkonzentration ist eine konstante Verschiebung des ^{31}P -Peaks ab $L/P=80:1$ von 29 auf 24,5 ppm sichtbar.

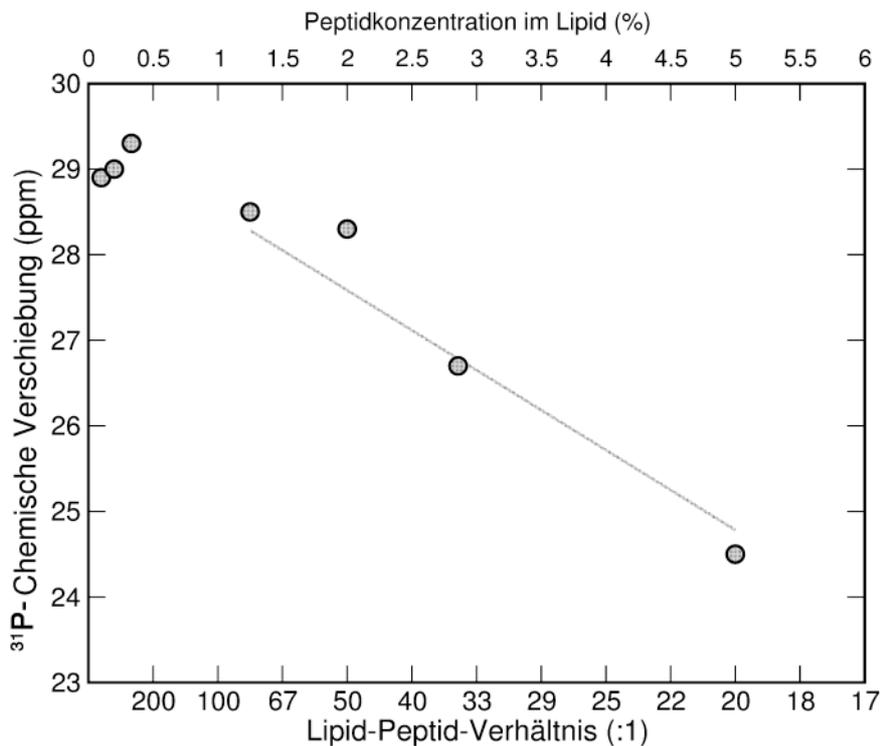


Abbildung 32: Auftragung der Chemischen Verschiebung des Hauptsignals der ^{31}P -NMR-Spektren in Abhängigkeit vom Lipid-Peptid-Verhältnis. Mit steigender Peptid-Konzentration bei $1000:1 \leq L/P \leq 300:1$ bleibt die Chemische Verschiebung konstant. Ab $L/P=80:1$ nimmt die ^{31}P -Verschiebung konstant ab.

4.3.2 Konzentrationsabhängige Helixlage von PGLa in der Membran

Nach der Herstellung von orientierten Proben mit DMPC-Membranen lieferten ^{19}F -Einpuls-Messungen von vier verschiedenen Derivaten mit den markierten Seitenketten 9, 10, 13 und 14 inklusive D- und L-Epimer auswertbare Dipolkopplungen. Aus den Spektren des Peptidderivats PGL8 (sowohl des L- als auch des D-Epimers) ließen sich keine auswertbaren Kopplungen ermitteln, man registrierte lediglich ein Signal in der Nähe der isotropen Position (Spektren nicht gezeigt). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus CD-Spektroskopie (vgl. 3.3.1) und antimikrobiellen Wachstumsassays (vgl. 3.3.2). Die Einführung der ^{19}F -Aminosäure an der Position 8 übt offensichtlich einen spürbaren störenden Einfluss auf die Sekundärstruktur aus. Das NMR-Signal, welches an der isotropen Position zu finden ist, spiegelt damit wahrscheinlich ein schlecht gefaltetes Peptid mit einem Drittel Helixanteil wider.

Für die CF_3 -Phg-PGLa-Derivate mit den markierten Seitenketten 9, 10, 13 und 14 ist die Form der breiten und asymmetrischen Dipolaufspaltungen auffällig, die von einer idealen Linienform deutlich abweicht (ideales Intensitätsverhältnis eines Triplets wäre 1:2:1 siehe Abbildung 25). Dies ist exemplarisch für das Derivat PGL13-L in Abbildung 33 dargestellt. Als mögliche Ursachen lassen sich Relaxations-Effekte diskutieren, die in ähnlicher Weise wie TROSY-Pulssequenzen für die Strukturaufklärung biologischer Makromoleküle ausgenutzt werden. Diese Möglichkeit ließe sich durch Experimente in anderen Magnetfeldern untersuchen. Trotz der anomalen Spektren konnten der Betrag und das Vorzeichen der Aufspaltungen zuverlässig ermittelt werden.

Zum Studium des Wirkmechanismus wurden Proben mit steigender Peptidkonzentration hergestellt. Alle ^{19}F -NMR-Spektren der gemessenen Konzentrationen der vier CF_3 -Phg-PGLa-Derivate in DMPC-Membranen sind in Abbildung 34 zusammengefasst. Je nach Lage der Seitenkette lässt sich im Konzentrationsbereich von L/P=200:1 bis 50:1 eine deutliche Änderung der Dipolaufspaltung messen, die Ausdruck einer Umorientierung des Peptids in Bezug zur Membranebene ist. Des Weiteren zeigen die Messungen bei vertikaler Probenorientierung zum Magnetfeld, dass eine schnelle Rotation des Peptids um die Membrannormale sowohl vor als auch nach der Umorientierung stattfindet. Sehr niedrige L/P-Verhältnisse von 20:1 der Derivate PGL10-L und PGL13-L zeigen keine wohl definierten Linienformen und Kopplungen mehr, da die Signale sehr stark verbreitert sind. Demzufolge liegen in diesen Konzentrationen keine bevorzugten Orientierungen mehr vor.

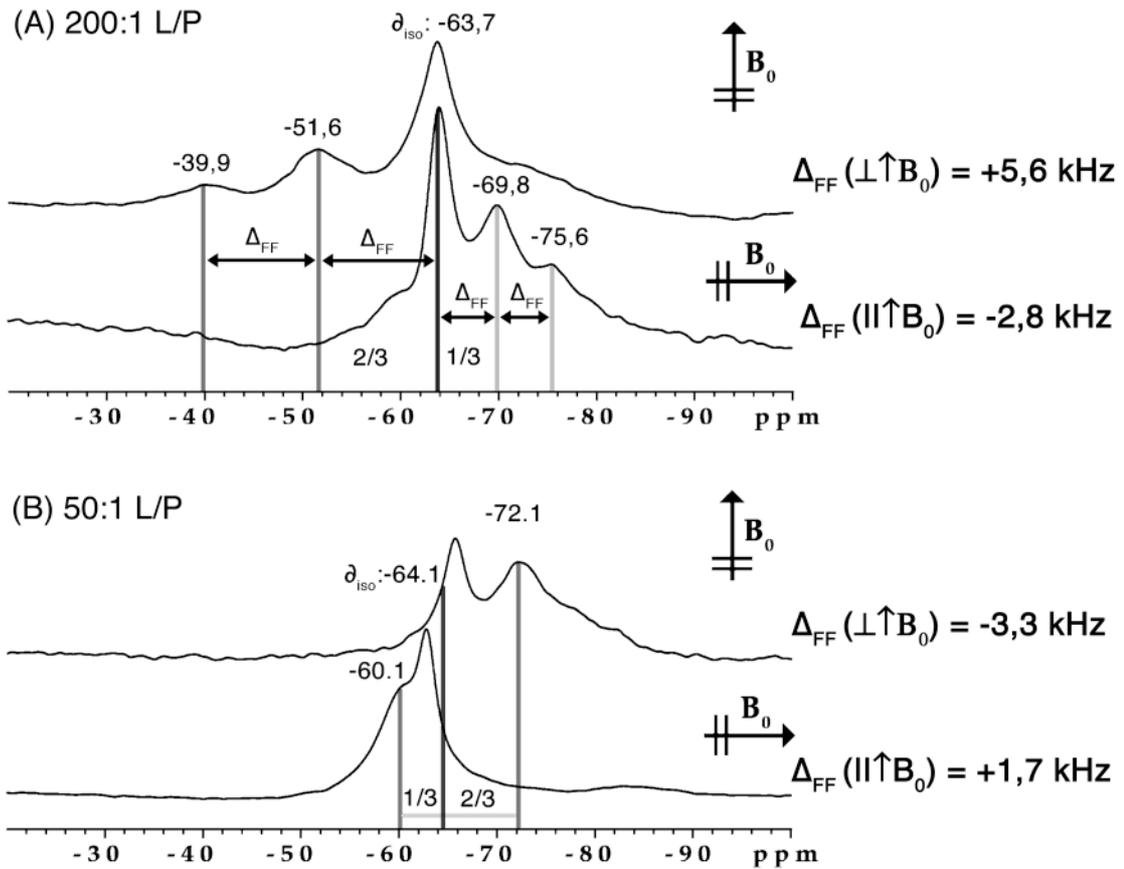


Abbildung 33: ^{19}F -Einpuls-Spektren für das PGL13-L Derivat bei horizontaler und vertikaler Probenorientierung zeigen (A) eine bestimmte Peptid-Orientierung bei $L/P=200:1$ und (B) eine Umorientierung bei hoher Peptidkonzentration von $L/P=50:1$ in DMPC-Membranen. Die Lage des isotropen Peaks lässt sich mit Hilfe horizontal und vertikal orientiert vermessenen Proben zum Magnetfeld berechnen. Eine anisotrope Probe ruft jeweils einen Peak mit einem Abstand von $2/3$ bzw. $1/3$ zur isotropen Position hervor. (vgl. Abschnitt 4.1.1 Die Dipolkopplung und die Orientierung der markierten Seitenkette)

Weiterhin ist interessant, ob in den Konzentrationsbereichen zwischen den beiden gemessenen Orientierungen andere diskrete oder kontinuierliche Zwischenzustände detektiert werden können. Für solche L/P -Verhältnisse zwischen $200:1$ und $50:1$ liegen ^{19}F -NMR-Spektren zweier CF_3 -Phg-PGLa-Derivate vor. $100:1$ Konzentrationen weisen bei PGL10-L eine geringfügig größere Dipolkopplung auf. Für PGL13-L scheint das Signal bei Konzentrationen zwischen den beiden Orientierungen an Intensität zu verlieren. Das Signal „verschmiert“ und verteilt sich auf die Breite der chemischen Verschiebung. Analog zeigt sich ein teilweises Verschwinden der Signalintensität für Übergangstemperaturen (vgl. Abschnitt 4.3.5 Temperaturabhängigkeit der Umorientierung). Die Messungen dieser beiden Derivate bei den Konzentrationen zwischen den Orientierungszuständen sind durch einfache Orientierungsveränderungen nicht zu erklären und beziehen offensichtlich dynamische und

Relaxationseffekte mit ein. Eine Zusammenfassung der ermittelten Dipolkopplungen in Abhängigkeit des L/P-Verhältnisses ist in Abbildung 35 als Diagramm dargestellt.

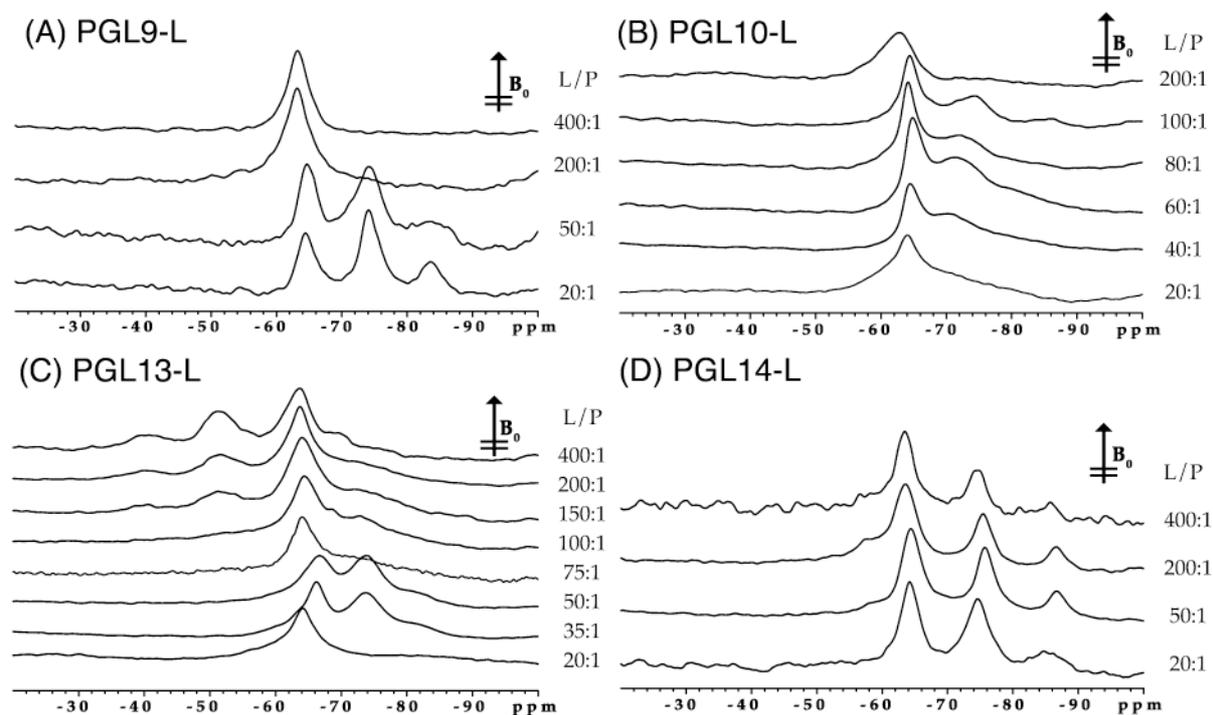


Abbildung 34: ^{19}F -Einpuls-Spektren für vier CF_3 -Phg-PGLa-Derivate in DMPC-Membranen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (L/P=400:1 bis 20:1): (A) PGL9-L (B) PGL10-L (C) PGL13-L (D) PGL14-L. Die Dipolkopplung ist in nahezu allen Fällen gut bestimmbar, auch wenn die asymmetrische Verteilung des Triplets teilweise die Detektion des dritten Peaks unmöglich macht. Die Proben bei hohem L/P-Verhältnis (≥ 150) zeigen eine unterschiedliche Peptidorientierung als bei niedrigen L/P (≤ 100). Die Seitenkette CF_3 -Phg in Position 14 spiegelt diese Umorientierung nicht wider, vermutlich da sie entlang einer invarianten Achse liegt (wie durch die späteren Strukturrechnungen bestätigt werden kann). Bei L/P=20:1 sind für die Derivate PGL10-L und PGL13-L keine bevorzugten Orientierungen bestimmbar, da die Signale sehr breit sind.

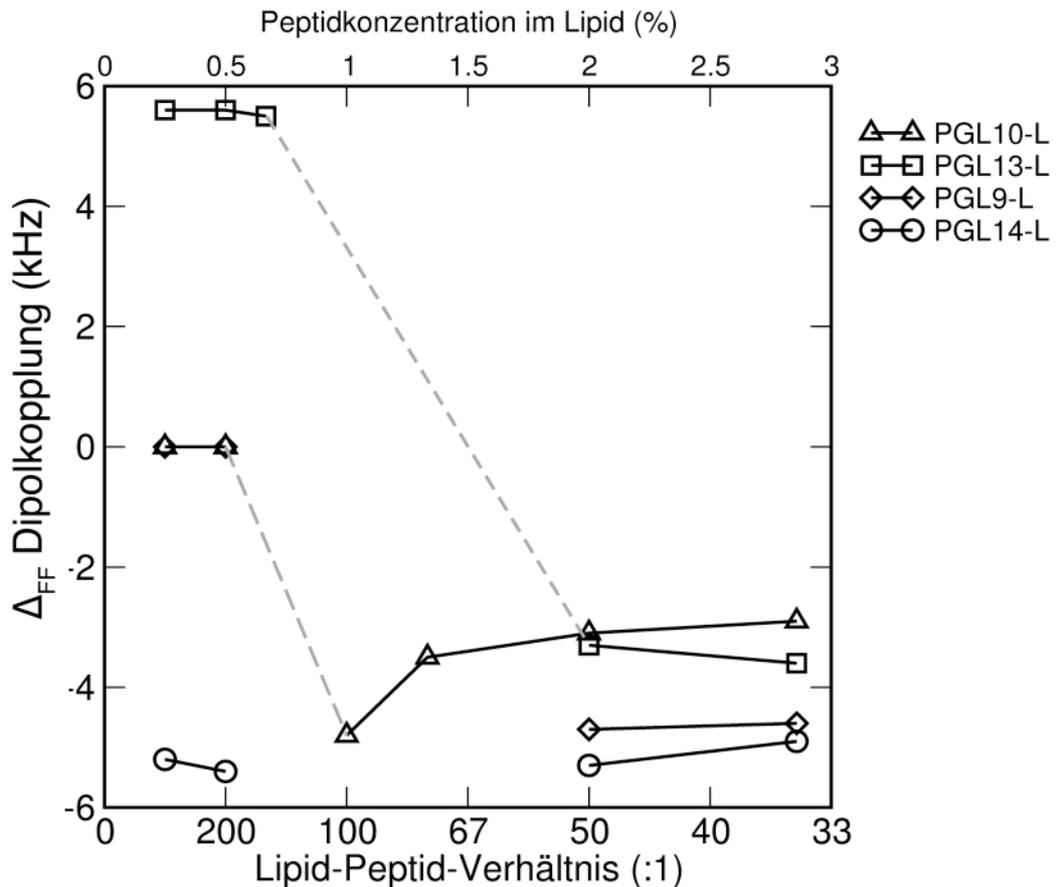


Abbildung 35: Darstellung der ermittelten Dipolkopplungen der L- CF_3 -Phg-PGLa-Derivate in Abhängigkeit vom L/P-Verhältnis in DMPC-Membranen. Mit hoher Sicherheit lassen sich zwei bevorzugte Orientierungen bestimmen (siehe auch Tabelle 10). Konzentrationsbereiche, die zwischen diesen L/P-Verhältnissen liegen, zeigen offenbar keine eindeutig zuordenbare Orientierung, da hier möglicherweise dynamische Prozesse die NMR-Signale ausmitteln. Die grauen gestrichelten Linien markieren den vermessenen Bereich, der keiner eindeutigen Orientierung zugeordnet werden kann, da er offenbar Gleichgewichtsumwandlungen unterliegt.

4.3.3 Berechnete Orientierung von PGLa bei niedriger

Peptidkonzentration: der S-Zustand

Die ermittelten Dipolkopplungen der L-Epimere PGL9, 10, 13 und 14 ergaben eine befriedigende χ^2 -Anpassung $\chi^2 \leq 1$ für die Orientierungsberechnung niedriger Peptidkonzentrationen, die in Tabelle 10 zusammengefasst sind. Aus den Dipolkopplungen der L/P-Verhältnisse von 400:1 bis 200:1 wurde für die α -Helixmodelle ein Kippwinkel zur Membrannormalen von $\alpha \approx 90^\circ$ und ein Rotationswinkel um die Helixachse von $\alpha \approx 350^\circ$ berechnet. Bei der genaueren Analyse erreichen zwei Helixmodelle die beste χ^2 -Anpassung: die π -Helix und das $-60^\circ/-45^\circ$ - α -Helixmodell, wie aus den χ^2 -Werten zu erkennen ist. Als

plausibelste Lösung erscheint hier die α -Helix, da das π -Helixmodell die Amphipathie, welche als Grundvoraussetzung für die Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide anerkannt ist, fast vollständig aufgibt (vgl. Abschnitt 1.1 Biodiversität von Peptiden). Das Peptid liegt unter solchen Umständen mit seiner Helixachse senkrecht zur Membrannormalen ($\theta=90^\circ$) und parallel zur Membranoberfläche. Diese Orientierung entspricht dem in der Literatur beschriebenen S-Zustand [51].

4.3.4 Berechnete Orientierung von PGLa bei hoher Peptidkonzentration: der T-Zustand

Die Beobachtung, dass in den ^{19}F -Spektren zwei distinkte Orientierungen sichtbar waren, ließ sich durch die Berechnung der Gesamtorientierung der PGLa-Helix bestätigen. L/P-Verhältnisse von 50:1 und 35:1 zeigen die beste Anpassung für α -Helixmodelle bei einem $\theta\approx 60^\circ$ und einem $\phi\approx 325^\circ$. Der Ordnungsparameter S_{mol} beträgt für die meisten α -Helixmodelle bei beiden Orientierungen ungefähr 0,6. Die umorientierte Spezies wird am besten durch eine $-40^\circ/-70^\circ$ Helix, aber auch noch befriedigend mit einem $-58^\circ/-47^\circ$ Helixmodell angepasst. Die Helix würde dann eine Lage von ca. 60° gekippt in Bezug auf die Membrannormale einnehmen. Im Gegensatz zum S-Zustand neigt sich die Helix 30° zur Membranoberfläche. Eine solche Orientierung wird in der vorliegenden Arbeit erstmals als ein neuartiger T-Zustand (T = tilt engl. gekippt) beschrieben. Der Rotationswinkel ϕ um die Helixachse variiert zwischen den beiden Zuständen um einen Betrag von etwa 25° , was auf mögliche subtile Veränderungen in der Struktur hinweist. Plausibel scheinen sowohl der S- als auch der T-Zustand, da die Lysinseitenketten vom Membraninnern weg zu den Phospholipid-Kopfgruppen hinweisen, wie in Abbildung 36C und D illustriert. Bei der Interpretation dieses neuartigen T-Zustands sollte auch in Betracht gezogen werden, dass eine solche Lösung als eine zeitlich gemittelte Orientierung eines sehr schnellen Gleichgewichts zwischen S- ($\theta=90^\circ$) und I-Zustand ($\theta=0^\circ$) zu Stande kommen kann. Für die niedrigen L/P-Verhältnisse zeigt sich ein weiteres Helixmodell in guter Übereinstimmung zwischen simulierten und bestimmten Dipolkopplungen. Die 3_{10} -Helix erfüllt die Eigenschaften einer Transmembran-Helix und steht senkrecht zur Membranoberfläche. Aber auch in diesem Fall scheint eine solche Lösung für die neue Orientierung unwahrscheinlich, da hier genauso die Amphipathie nicht erhalten bliebe. Ein sehr ähnlicher Ordnungsparameter von 0,6 bei beiden α -Helix-Orientierungen spricht offenbar dafür, dass die Beweglichkeit des gesamten Peptids in beiden Zuständen sehr ähnlich ist.

Tabelle 10: Ergebnisse der Orientierungsberechnungen für α (Kippwinkel zur Membrannormalen), β (Rotationswinkel um die Helixachse) und S_{mol} (Ordnungsparameter) bei niedrigen und hohen Peptidkonzentrationen von L/P=400:1, 200:1, 50:1 und 35:1 mit sechs verschiedenen PGLa-Helixmodellen (siehe Abbildung 26). In der ersten Spalte sind die verwendeten Dipolkopplungen aufgelistet. (Ideale α -Helix mit $\beta=-58^\circ$ und $\alpha=-47^\circ$ fett hervorgehoben)

| L/P-Verhältnis und Δ_{FF} (in kHz) | Helixmodell: α/β (in $^\circ$) | β^2 | α (in $^\circ$) | β (in $^\circ$) | S_{mol} |
|---|--|---------------|----------------------------|---------------------------|--------------|
| 400:1 | 3_{10} : -50/-28 | 11,8577 | 45,4 | 160,1 | 1,000 |
| | α : -40/-45 | 5,2224 | 32,0 | 163,0 | 0,700 |
| PGL9-L: 0 | α : -40/-70 | 7,1315 | 87,6 | 352,3 | 1,000 |
| PGL10-L: 0 | α : -58/-47 | 0,7467 | 92,6 | 350,7 | 0,600 |
| PGL13-L: +5,6 | α : -60/-45 | 0,5875 | 94,7 | 350,8 | 0,643 |
| PGL14-L: -5,2 | β : -57/-71 | 0,4963 | 100,0 | 285,5 | 0,837 |
| 200:1 | 3_{10} : -50/-28 | 11,9616 | 44,7 | 160,0 | 1,000 |
| | α : -40/-45 | 47,7434 | 77,0 | 296,2 | 0,437 |
| PGL9-L: 0 | α : -40/-70 | 7,6654 | 87,5 | 352,4 | 1,000 |
| PGL10-L: 0 | α : -58/-47 | 1,0646 | 92,3 | 350,6 | 0,614 |
| PGL13-L: +5,6 | α : -60/-45 | 0,8616 | 94,4 | 350,8 | 0,657 |
| PGL14-L: -5,4 | β : -57/-71 | 0,4684 | 79,1 | 104,7 | 0,868 |
| 50:1 | 3_{10} : -50/-28 | 0,1479 | 4,0 | 127,5 | 1,115 |
| | α : -40/-45 | 0,0538 | 53,2 | 300,3 | 1,048 |
| PGL9-L: -4,7 | α : -40/-70 | 0,0518 | 67,9 | 342,3 | 0,889 |
| PGL10-L: -3,1 | α : -58/-47 | 0,2165 | 58,0 | 327,4 | 0,637 |
| PGL13-L: -3,3 | α : -60/-45 | 0,4555 | 62,9 | 328,5 | 0,639 |
| PGL14-L: -5,3 | β : -57/-71 | 2,9997 | 26,2 | 17,1 | 0,637 |
| 35:1 | 3_{10} : -50/-28 | 0,6396 | 3,4 | 121,5 | 1,072 |
| | α : -40/-45 | 0,0774 | 52,7 | 300,6 | 1,006 |
| PGL9-L: -4,6 | α : -40/-70 | 0,0004 | 66,3 | 340,7 | 0,807 |
| PGL10-L: -2,9 | α : -58/-47 | 0,0050 | 57,2 | 323,9 | 0,616 |
| PGL13-L: -3,6 | α : -60/-45 | 0,1894 | 62,4 | 324,2 | 0,625 |
| PGL14-L: -4,9 | β : -57/-71 | 2,0062 | 27,2 | 25,5 | 0,599 |

Die verschiedenen α -Helixmodelle, die in die Orientierungsberechnung eingeflossen sind, erzielen eine ähnliche Helixlage in Bezug auf die Membrannormalen (Genauigkeit von $\pm 10^\circ$). Ob mit einer genaueren Anpassung $\beta^2=0,01$ statt 0,2 auch gleich zwingend eine exaktere Helixstruktur gefunden wurde, bleibt fraglich, da die Unterschiede in den vorhergesagten Dipolkopplungen sehr gering ausfallen. Es ist die Modellstruktur, die in die Orientierungsberechnungen Eingang findet, welche den größten Einfluss auf die berechneten Winkel α und β ausübt. Für die verschiedenen α -Helixmodelle liegen die α/β -Winkel nach einer Energieminimierung teilweise stark um die Ausgangswinkel gestreut, wie der Abbildung 30 zu entnehmen ist. Die geringfügigen Unterschiede in der Sekundärstruktur nach einer Energieminimierung sind sehr viel komplexer und schwieriger zu interpretieren. Hier

wird deutlich, dass diese Strategie ohne Präzisierung durch weitere experimentelle Einschränkungen für die Sekundärstrukturbestimmung auf einem derart exakten Niveau ungeeignet ist.

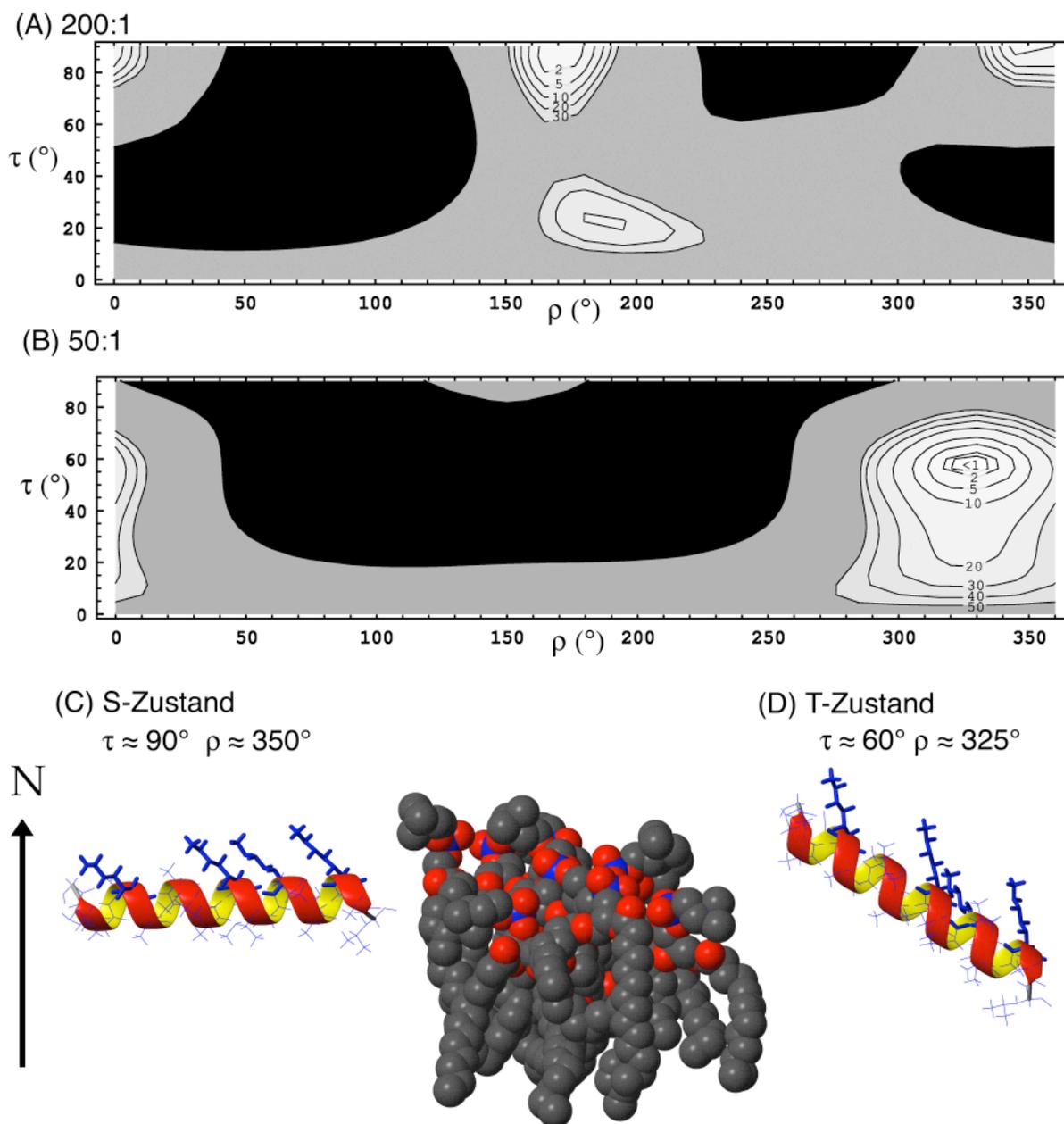


Abbildung 36: Orientierungsberechnung der α -Helix PGLa für zwei verschiedene L/P-Verhältnisse (A) 200:1 und (B) 50:1. Die beiden Kontur-Diagramme stellen χ^2 -Funktionen einer idealen α -Helix dar, die systematisch jeweils durch einen χ^2 und χ^2 -Raum gedreht und gekippt wurde. Die niedrigsten Abweichungen zwischen den gemessenen und simulierten Dipolkopplungen ergeben befriedigende Minima $\chi^2 \leq 1$ (weiße Konturen repräsentieren wahrscheinliche Orientierungen). (C) S-Zustand (S = surface engl. Oberfläche): parallel zur Membranoberfläche und (D) T-Zustand (T = tilt engl. gekippt): 30° geneigt zur Membranoberfläche. Aus Symmetrie- und Plausibilitätsüberlegungen können die Lysinseitenketten (dick dargestellt) vom Membraninnern wegzeigend positioniert werden. Als Größenvergleich ist die Oberseite einer DMPC-Membran im Kalottenmodell dargestellt.

Des Weiteren gibt eine solche minimale Anpassung nur Auskunft über die helikalen Bereiche in direkter Umgebung zu den Markierungen und bringt keine Angaben zu dem stark helikalen C-terminalen Bereich hervor. Aus diesem Grund scheint für eine weitere strukturelle Diskussionen die Annahme einer idealen α -Helix mit den ϕ/ψ -Werten von $-58^\circ/-47^\circ$ sinnvoll.

4.3.5 Temperaturabhängigkeit der Umorientierung

Die Abbildung 35 zeigt, dass in einem Bereich zwischen L/P=200:1 und 50:1 die Helixorientierungen nicht eindeutig zuzuordnen sind. Zum einen zeigen die beiden CF_3 -Phg-PGLa-Derivate PGL10-L und PGL13-L verschiedene Orientierungszustände, und zum anderen weisen Temperaturmessungen für diesen Konzentrationsbereich auf ein dynamisches Gleichgewicht beider Orientierungen hin. Für PGL13-L sind die Veränderungen in der Orientierung für L/P<150:1 wahrnehmbar, wobei bei 100:1 keine bevorzugte Orientierung der Seitenkette mehr detektierbar war. Die betreffenden Spektren für L/P=100:1 sind in Abbildung 37 zu sehen.

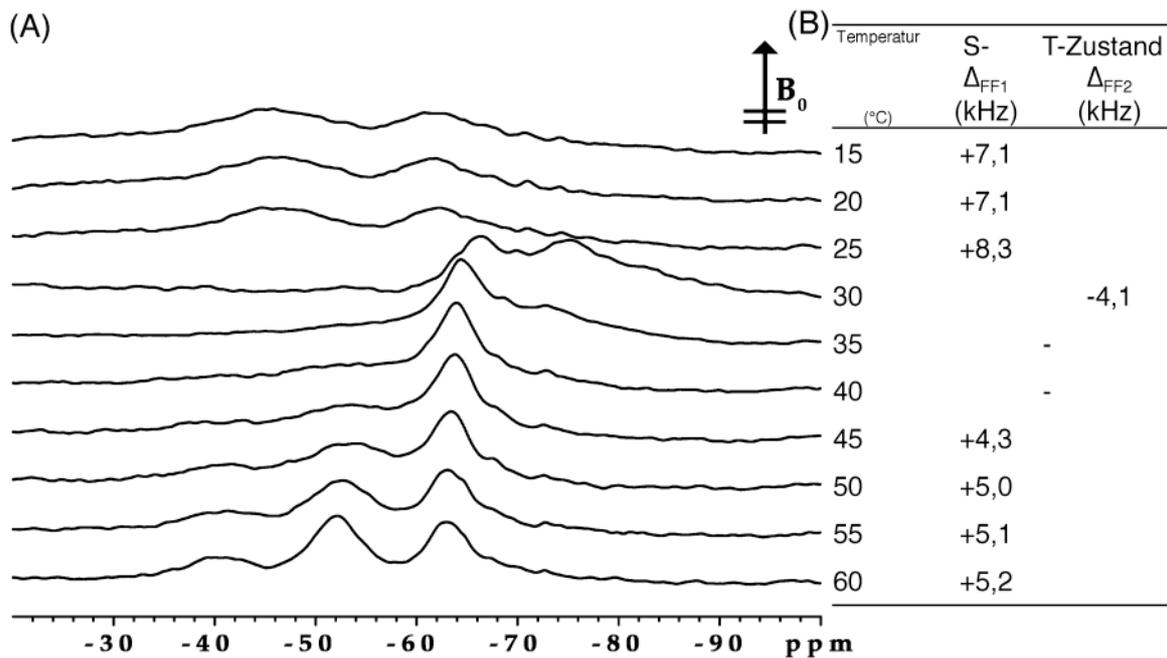


Abbildung 37: ^{19}F -Einpuls-Spektren des Derivats PGL13-L zeigen einen Temperatur-induzierten Umorientierungsprozess für ein L/P-Verhältnis von 100:1. (A) Unterhalb des Phasenübergangs (15-20°C) liegt das Peptid offenbar im S-Zustand ($\phi=90^\circ$) vor, da die großen positiven Kopplungen weniger stark ausgemittelt werden. Mit der Steigerung an Beweglichkeit kurz nach Phasenübergang orientiert sich das Peptid in den T-Zustand ($\phi=60^\circ$). Eine weitere Temperatursteigerung oberhalb des Phasenübergangs sorgt für eine Aufgabe des T- zu Gunsten des S-Zustands. (B) Tabelle der ermittelten Dipolkopplungen mit Zuordnungen zur Helixlage.

Unterhalb des Phasenübergangs ($T_{\text{DMPC}}=24^{\circ}\text{C}$) weisen große positive Dipolkopplungen auf den S-Zustand der Helix hin, die offenbar durch eine Verminderung an Beweglichkeit weniger stark ausgemittelt werden. Mit dem Gewinn an lateraler Beweglichkeit der Lipid-Doppelschicht nimmt die Helix bei etwa 30°C die 60° -Position zur Membrannormalen des T-Zustands ein. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung geht die Helix wieder in den S-Zustand über. Zur Umwandlung zwischen den beiden Zuständen oberhalb des Phasenübergangs lassen sich ganz ähnliche Beobachtungen machen, wie bei der Konzentrations-induzierten Umorientierung: Das Signal verliert an Gesamtintensität, „verschmiert“ und erscheint allmählich wieder auf der anderen Seite.

Diese Befunde sprechen für ein sehr schnelles Gleichgewicht zwischen beiden Orientierungszuständen in den Zwischenkonzentrationen. Möglicherweise kommen hier auch die geringfügig unterschiedlichen Eigenschaften der markierten Peptide zum Tragen. Kleine Abweichungen zum Beispiel in der Hydrophobizität könnten in eine geringere Tendenz der Helix zur Umorientierung resultieren.

4.3.6 Temperaturmessungen zur Dynamik des Peptids

Temperaturmessungen können quantitative Aussagen über die Dynamik des Peptids in der Membran liefern. Für DMPC-Membranen mit 50:1 L/P-Verhältnis wurden Temperaturserien von $15\text{-}35^{\circ}\text{C}$ gemessen, deren Spektren in Abbildung 38 angeordnet sind. Anschließend wurden die ermittelten Werte auch einer Orientierungsberechnung unterzogen.

Bei der Auswertung der Dipolaufspaltungen in einem Temperaturbereich von $15, 25$ und 35°C für ein L/P-Verhältnis von 50:1, also dem T-Zustand, zeigen rechnerisch die verschiedenen Helixmodelle leicht unterschiedliche optimale Anpassungen, so dass für weiterführende Betrachtungen wiederum die ideale $-58^{\circ}/47^{\circ}$ Helix gewählt wurde. Tabelle 11 fasst die berechneten Kippwinkel θ und Rotationswinkel ϕ mit $\langle P^2 \rangle$ -Funktion und Ordnungsparameter S_{mol} für die verschiedenen Helixmodelle zusammen. Die ideale θ -Helix bei 15°C erfüllt im Vergleich zu 35°C sehr ähnliche θ -Werte im Bereich 60° und einen ϕ -Winkel bei 310° (Genauigkeit $\pm 10^{\circ}$). Unterhalb des Phasenübergangs liegt der Ordnungsparameter mit $S_{\text{mol}} \approx 1$ erwartungsgemäß sehr hoch. Wenn also die laterale Beweglichkeit im Lipid-Gitter eingeschränkt ist, werden auch die NMR-Signale der Helix weniger stark ausgemittelt. Oberhalb des Phasenübergangs für 25 und 35°C wird die Anpassung über die $\langle P^2 \rangle$ -Funktion für ideale θ -Helices wesentlich besser und der Ordnungsparameter nimmt ab, was offenbar Ausdruck einer gesteigerten Mobilität der Helix ist.

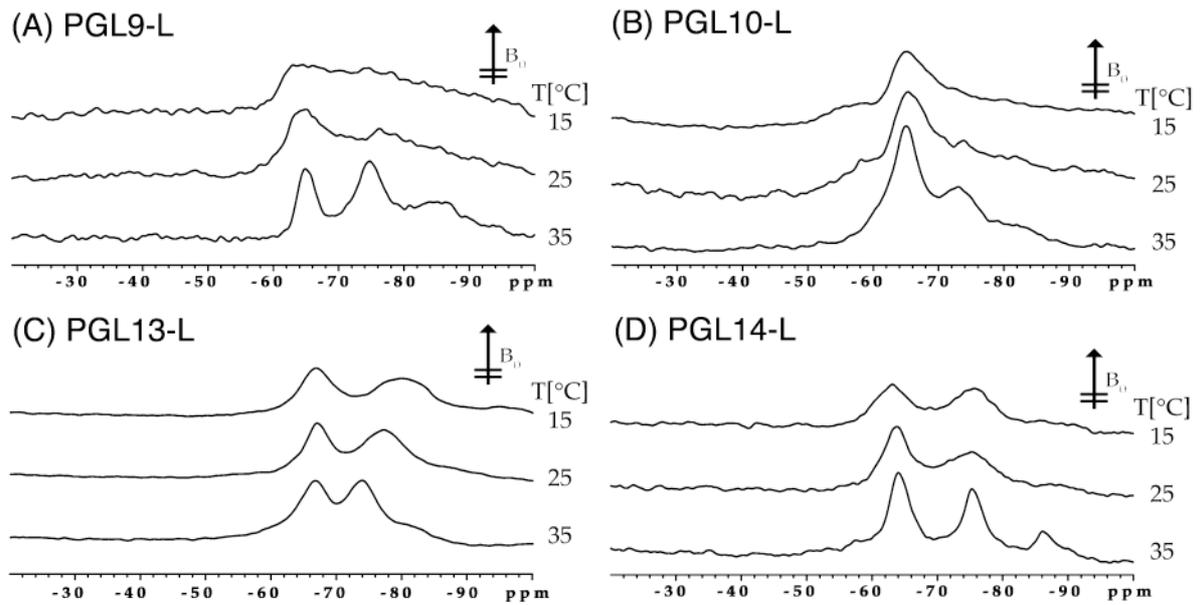


Abbildung 38: ^{19}F -Einpuls-Spektren der CF_3 -Phg-PGLa-Derivate (A) PGL9-L (B) PGL10-L (C) PGL13-L (D) PGL14-L bei einem L/P-Verhältnis von 50:1 in DMPC-Membranen. Die Aufnahme von Temperaturserien unterhalb und oberhalb des Phasenübergangs ($T_m=24^\circ\text{C}$) zeigt keine prinzipielle Änderung des T-Zustands ($\square=60^\circ$). Mit steigender Temperatur nimmt der Ordnungsparameter im Betrag ab und die Dipolaufspaltungen werden geringer.

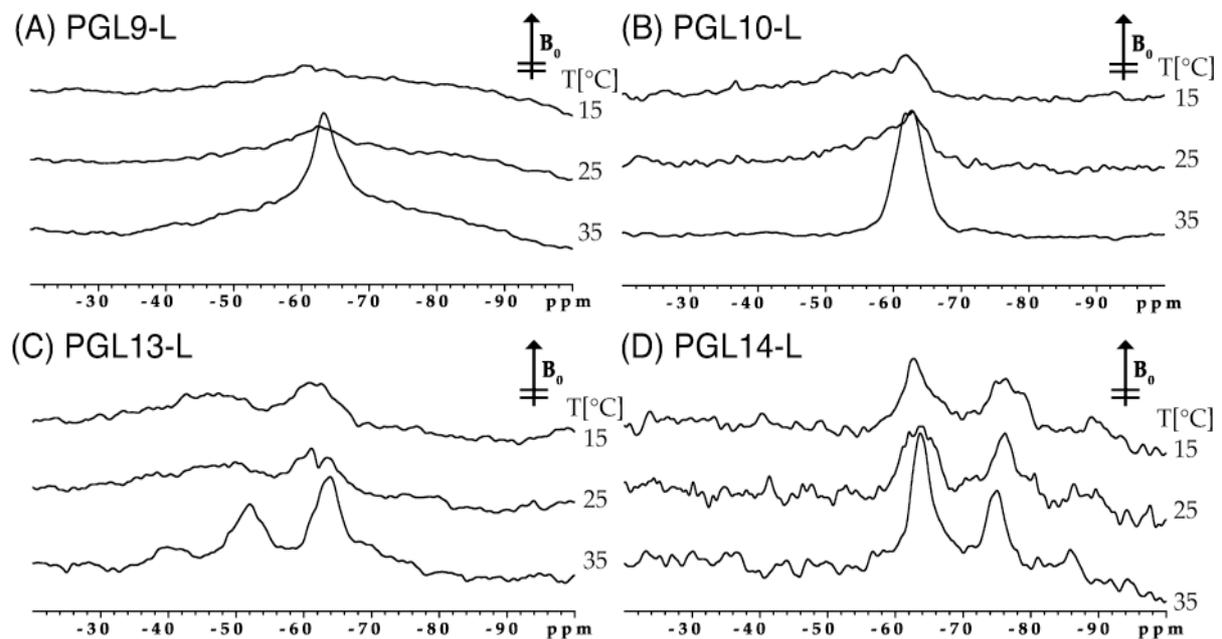


Abbildung 39: ^{19}F -Einpuls-Spektren der CF_3 -Phg-PGLa-Derivate (A) PGL9-L (B) PGL10-L (C) PGL13-L (D) PGL14-L bei einem L/P-Verhältnis von 400:1 in DMPC-Membranen. Die Aufnahme von Temperaturserien unterhalb und oberhalb des Phasenübergangs ($T_m=24^\circ\text{C}$) zeigt keine prinzipielle Änderung des S-Zustands ($\square=90^\circ$). Der Ordnungsparameter verhält sich analog zu den Proben im T-Zustand (siehe Abbildung 38 oben).

Das Temperatur-abhängige Verhalten der PGLa-CF₃-Phg-Derivate im S-Zustand bei einem L/P-Verhältnis von 400:1 ist der Abbildung 39 zu entnehmen. Der Trend ist ähnlich, wie bei Proben im T-Zustand: unterhalb des Phasenübergangs finden keine prinzipiellen Umorientierungen statt, jedoch ist die Beweglichkeit des Peptids stark eingeschränkt. Dies äußert sich an einem hohem Ordnungsparameter und größeren Dipolaufspaltungen.

Tabelle 11: Ergebnisse der Orientierungsberechnungen für α (Kippwinkel zur Membrannormalen), β (Rotationswinkel um die Helixachse) und S_{mol} (Ordnungsparameter) bei einer Peptidkonzentrationen von L/P=50:1 und jeweils drei Temperaturen $T=15, 25, 35^\circ\text{C}$ mit sechs verschiedenen PGLa-Helixmodellen (siehe Abbildung 26). In der ersten Spalte sind die verwendeten Dipolkopplungen aufgelistet. (Ideale α -Helix mit $\alpha=-58^\circ$ und $\alpha=-47^\circ$ fett hervorgehoben)

| Temperatur und Δ_{FF} (in kHz) | Helixmodell: α/β (in $^\circ$) | α^2 | α (in $^\circ$) | β (in $^\circ$) | S_{mol} |
|---------------------------------------|--|---------------|-------------------------|------------------------|--------------|
| 15 $^\circ\text{C}$ | 3_{10} : -50/-28 | 31,3663 | 1,1 | 358,7 | 1,000 |
| | \square : -40/-45 | 41,3724 | 4,5 | 308,9 | 1,000 |
| PGL9-L: -6,7 | \square : -40/-70 | 0,9066 | 60,0 | 330,0 | 0,941 |
| PGL10-L: -3,5 | \square : -58/-47 | 2,6102 | 59,4 | 311,6 | 0,978 |
| PGL13-L: -7,0 | \square : -60/-45 | 0,0085 | 64,6 | 311,9 | 1,023 |
| PGL14-L: -5,9 | \square : -57/-71 | 0,0009 | 35,9 | 58,4 | 0,901 |
| 25 $^\circ\text{C}$ | 3_{10} : -50/-28 | 0,3913 | 3,5 | 112,7 | 1,191 |
| | \square : -40/-45 | 0,0208 | 52,9 | 301,4 | 1,118 |
| PGL9-L: -5,3 | \square : -40/-70 | 0,1744 | 66,4 | 340,7 | 0,897 |
| PGL10-L: -3,3 | \square : -58/-47 | 0,0174 | 57,5 | 326,3 | 0,681 |
| PGL13-L: -3,8 | \square : -60/-45 | 0,0339 | 62,9 | 325,8 | 0,694 |
| PGL14-L: -5,3 | \square : -57/-71 | 2,1475 | 24,5 | 21,3 | 0,706 |
| 35 $^\circ\text{C}$ | 3_{10} : -50/-28 | 0,1479 | 4,0 | 127,5 | 1,115 |
| | \square : -40/-45 | 0,0538 | 53,2 | 300,3 | 1,048 |
| PGL9-L: -4,7 | \square : -40/-70 | 0,0518 | 67,9 | 342,3 | 0,889 |
| PGL10-L: -3,1 | \square : -58/-47 | 0,2165 | 58,0 | 327,4 | 0,637 |
| PGL13-L: -3,3 | \square : -60/-45 | 0,4555 | 62,9 | 328,5 | 0,639 |
| PGL14-L: -5,3 | \square : -57/-71 | 2,9997 | 26,2 | 17,1 | 0,637 |

Neben DMPC kommt DOPC als Modellmembran häufig zum Einsatz. Dieses PC-Lipid mit ungesättigten Acylketten ermöglicht die komplette Aufnahme von Temperaturserien im Bereich von -10° bis $+50^\circ\text{C}$. Die ^{19}F -Einpuls-Spektren der DOPC-Proben in Abbildung 40 zeigen, dass bei einer Konzentration von 50:1 die Dipolkopplungen noch dem S-Zustand entsprechen, so dass das Peptid in diesen Lipid-Doppelschichten noch nicht umgekippt ist. Proben mit noch höheren Peptidkonzentrationen bis 20:1 zeigen ebenfalls keine Umorientierung, wie der Abbildung 41 zu entnehmen ist. DOPC-Dipolkopplungen (siehe Tabelle 12) wurden ebenso einer ausführlichen Auswertung im Hinblick auf eine α^2 -

Anpassung unterzogen, deren Ergebnisse in Tabelle 13 zusammengefasst sind. Je niedriger die Temperatur, desto schlechter wird die χ^2 -Anpassung bei den α -Helixmodellen. Mit steigender Temperatur wird der Ordnungsparameter erwartungsgemäß kleiner, was eine Folge der erhöhten Beweglichkeit ist.

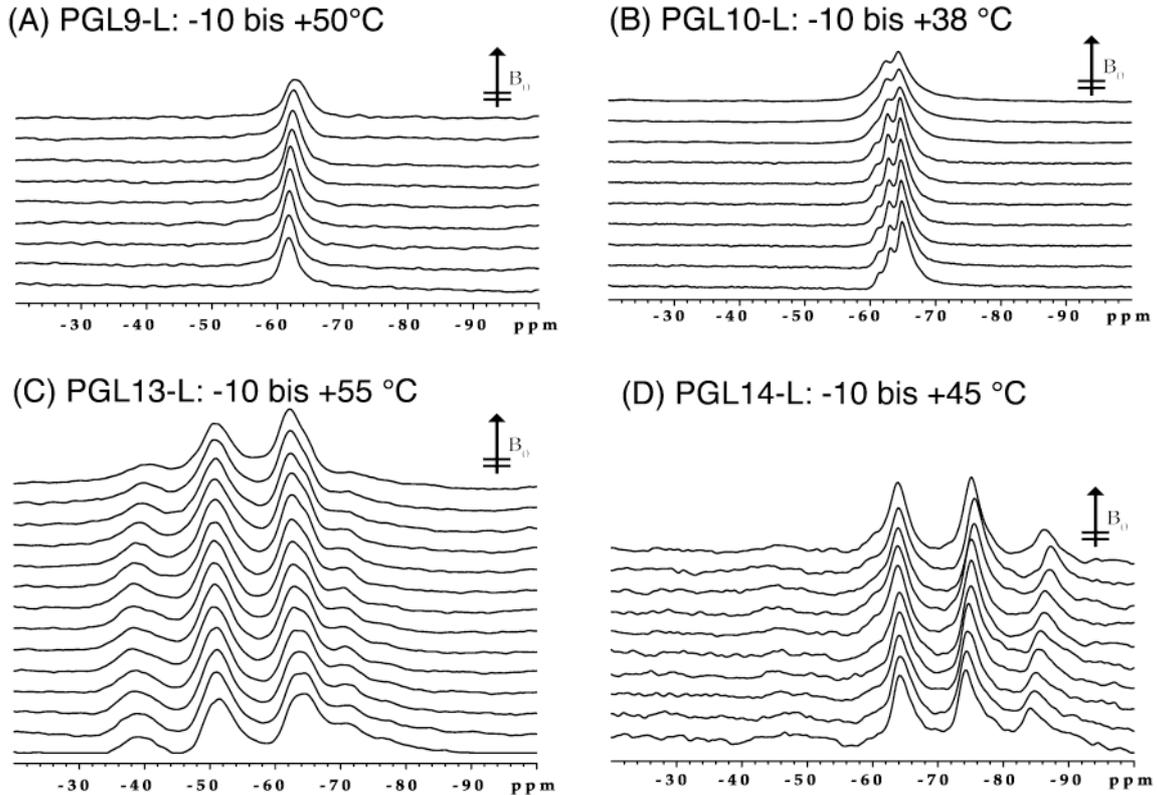


Abbildung 40: ^{19}F -Einpulse-Spektren der CF_3 -Phg-PGLa-Derivate (A) PGL9-L (B) PGL10-L (C) PGL13-L (D) PGL14-L für L/P-Verhältnisse von 50:1 in DOPC-Membranen für einem Temperaturbereich von -10 bis $+50$ °C. Alle Derivate weisen den S-Zustand ($\beta = 90^\circ$) auf. Die Phasenübergangstemperatur liegt unterhalb des gemessenen Bereichs, so dass fast ausschließlich eine graduelle aber stetige Erniedrigung der Dipolkopplung zu messen ist, die nur durch die temperaturabhängige Mobilität der Seitenkette verursacht wird. (C) PGL13-L zeigt ein zusätzliches Signal, das möglicherweise durch den unorientierten Peptidanteil hervorgerufen wird.

Tabelle 12: Ermittelte Dipolkopplungen für L/P=50:1 in DOPC bei vier verschiedenen Temperaturen $T = -10, 15, 35, 50$ °C finden Eingang in die Orientierungsrechnungen.

| Temperatur (in °C) | Δ_{FF} PGL9-L (kHz) | Δ_{FF} PGL10-L (kHz) | Δ_{FF} PGL13-L (kHz) | Δ_{FF} PGL140-L (kHz) |
|-----------------------|---|--|--|---|
| -10 | 0 | +1,0 | +5,0 | -5,6 |
| 15 | 0 | +0,9 | +5,7 | -5,3 |
| 35 | 0 | +0,8 | +5,8 | -5,0 |
| 50 | 0 | +0,7 | +5,8 | -4,6 |

Tabelle 13: Ergebnisse der Orientierungsberechnungen für θ (Kippwinkel zur Membrannormalen), α (Rotationswinkel um die Helixachse) und S_{mol} (Ordnungsparameter) bei $L/P=50:1$ in DOPC und vier verschiedenen Temperaturen $T=-10, 15, 35, 50$ °C mit sechs verschiedenen PGLa-Helixmodellen (siehe Abbildung 26). (Ideale θ -Helix mit $\theta=-58^\circ$ und $\theta=-47^\circ$ fett hervorgehoben)

| Helixmodell: θ/α (in °) | Temperatur (in °C) | θ^2 | α (in °) | θ (in °) | S_{mol} |
|---|-----------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------|
| 3_{10} : -50/-28 | -10 | 4,2415 | 43,8 | 159,4 | 1,000 |
| | 15 | 7,5158 | 45,3 | 158,9 | 1,000 |
| | 35 | 8,3266 | 46,3 | 159,0 | 1,000 |
| | 50 | 8,6236 | 47,6 | 159,3 | 1,000 |
| θ : -40/-45 | -10 | 0,7597 | 29,4 | 160,7 | 0,741 |
| | 15 | 2,1652 | 33,2 | 160,9 | 0,696 |
| | 35 | 2,8226 | 35,3 | 161,1 | 0,655 |
| | 50 | 3,3536 | 38,2 | 161,5 | 0,602 |
| θ : -40/-70 | -10 | 7,9004 | 87,8 | 351,2 | 1,000 |
| | 15 | 8,8615 | 88,8 | 351,6 | 1,000 |
| | 35 | 8,0515 | 89,0 | 351,5 | 1,000 |
| | 50 | 6,8806 | 89,3 | 351,3 | 1,000 |
| θ : -58/-47 | -10 | 3,7811 | 86,3 | 167,6 | 0,587 |
| | 15 | 1,5051 | 84,9 | 168,3 | 0,597 |
| | 35 | 0,7677 | 84,4 | 168,7 | 0,582 |
| | 50 | 0,2534 | 83,9 | 169,0 | 0,556 |
| θ : -60/-45 | -10 | 3,8997 | 84,7 | 168,2 | 0,642 |
| | 15 | 1,5785 | 83,5 | 168,7 | 0,655 |
| | 35 | 0,8125 | 83,1 | 168,9 | 0,639 |
| | 50 | 0,2773 | 82,5 | 169,1 | 0,611 |
| θ : -57/-71 | -10 | 0,0754 | 76,8 | 104,6 | 0,930 |
| | 15 | 0,0000 | 80,2 | 107,5 | 0,893 |
| | 35 | 0,0061 | 82,1 | 109,2 | 0,844 |
| | 50 | 0,0060 | 85,0 | 111,6 | 0,779 |

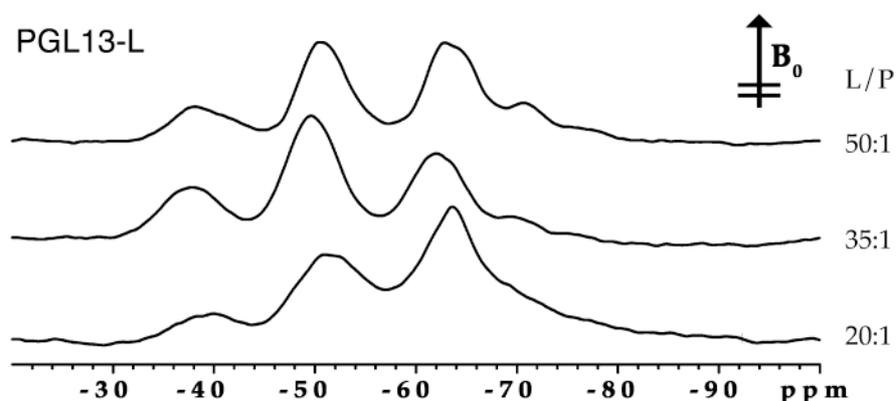


Abbildung 41: ^{19}F -Einpuls-Spektren des CF_3 -Phg-Derivats PGL13-L in DOPC-Membranen. Konzentrationsreihe von einem L/P-Verhältnis von 50:1 bis 20:1 zeigt keine Umorientierung, so dass lediglich der S-Zustand ($\theta=90^\circ$) aufgezeichnet wird.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Peptiddynamik sind in Abbildung 42 dargestellt. Die Temperatursteigerung führt zu einem sprunghaften Übergang des Ordnungsparameters S_{mol} von 1 auf 0,6 im Zuge des Phasenübergangs für DMPC und einem graduellen Abfall in DOPC. Der Ordnungsparameter von 0,6 lässt eine vergleichsweise hohe Beweglichkeit des Peptids in der flüssig-kristallinen Membran zu. Die dynamischen Verhältnisse in DMPC- und DOPC-Membranen sind aufgrund des gleichen Ordnungsparameters als sehr ähnlich einzuschätzen. Außerdem zeigen sie, dass das $-58^\circ/-47^\circ$ \square -Helixmodell in einer Orientierungsberechnung plausible Ergebnisse liefert, da andere Helixmodelle sehr viel höhere Ordnungsparameter erzielen und damit sehr unterschiedliche dynamische Verhältnisse zu Grunde gelegt werden müssten. Zur Veranschaulichung eines Ordnungsparameters von 0,6 kann man ein isotropes Bewegungsmodell heranziehen. Für ein Peptidmodell, welches sich isotrop in einer Kreisbahn bewegt, entspricht ein Ordnungsparameter von 0,6 einer Bewegungsfreiheit von 31° um die Membrannormale. Allerdings spiegelt eine solche isotrope Kreisbahn bei weitem nicht die reale Bewegung eines Peptids in Membranumgebung wider, es ist lediglich das einfachste Modell. Denn die Bewegung ist in bestimmten Raumrichtungen stark eingeschränkt, was aber gleichzeitig impliziert, dass unter diesen Umständen sogar noch größere Fluktuationen in den Winkeln erlaubt sein müssten.

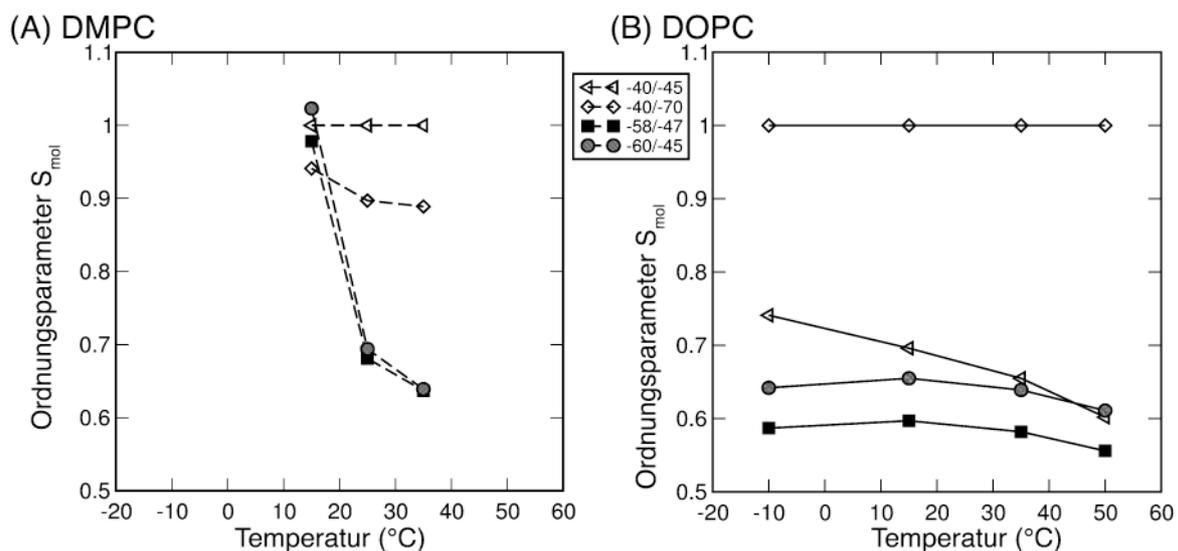


Abbildung 42: Diagramme zur Abhängigkeit des Ordnungsparameters bei steigender Temperatur in (A) DMPC bei 50:1 im T-Zustand ($\square=60^\circ$) für die verschiedenen PGLa \square -Helixmodelle. Aufgrund des Phasenüberganges in DMPC weist der Ordnungsparameter einen Sprung von nahe 1 bis 0,6 auf. Die steigende Temperatur sorgt für höhere Mobilität des Peptids. (B) DOPC-Membranen bei 50:1 Lipid:Peptidverhältnis im S-Zustand ($\square=90^\circ$). In DOPC führt die Temperatursteigerung zu einer graduellen Abnahme des Ordnungsparameters. Der Ordnungsparameter bei 35 $^\circ\text{C}$ ist für die idealen Helixmodelle von $-58^\circ/-47^\circ$ und $-60^\circ/-45^\circ$ (\square -Werte) in DOPC und DMPC vergleichbar groß.

4.3.7 Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Orientierung des Peptids

4.3.7.1 Umorientierungsverhalten unabhängig von Lipidkettenlänge

Zur genaueren Analyse der biologisch aktiven Orientierung des Peptids wurden Proben mit variablen Lipidkettenlängen von 12, 14 und 16 Kohlenstoffatomen angefertigt, um weitere Details über die Wechselwirkung des Peptids mit der Membran aufzuklären. Auf den ersten Blick zeigte sich ein sehr ähnliches Bild wie bei DMPC-Proben, wobei offenbar die Dynamik unter den Lipiden leicht variiert, wie aus den Spektren in Abbildung 43 zu entnehmen ist.

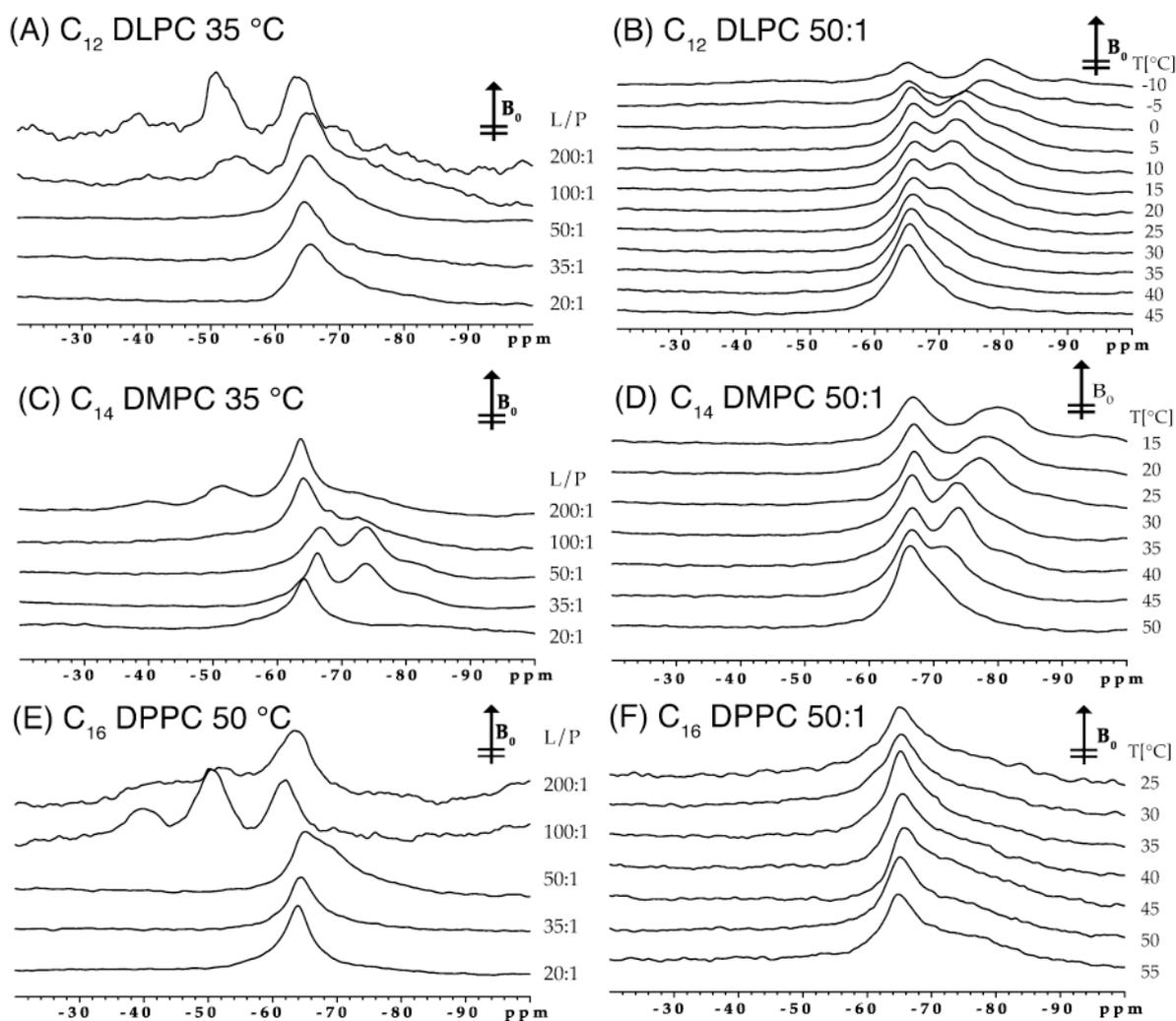


Abbildung 43: ^{19}F -Einpulse-Spektren des CF_3 -Phg-Derivats PGL13-L für DLPC, DMPC und DPPC, mit C_{12} -, C_{14} - bzw. C_{16} -Kohlenstoffketten. Auf der linken Seite sind Konzentrationsserien untereinander und auf der rechten Seiten Temperaturserien angeordnet. Prinzipiell verhält sich das Peptid in Lipiden mit verschiedenen Kettenlängen sehr ähnlich. Geringfügige Abweichungen sind möglicherweise Ursache der unterschiedlichen Dynamik der Lipide.

Die prinzipiellen Konzentrationsbereiche für den S- und den T-Zustand ähneln sich, wobei die Zwischenkonzentrationen von 100:1 leicht unterschiedliches Verhalten aufweisen. Wie bereits von den DMPC-Proben bekannt, sind dort die S- und T-Orientierung durch Temperaturveränderung ineinander überführbar (vgl. Abbildung 37). DPPC wurde bei 50 °C vermessen, da dieses Lipid erst zu diesem Zeitpunkt spürbar oberhalb des Phasenübergangs gelangt. Alles in allem weisen die Befunde auf sehr ähnliche Wechselwirkungen des Peptids mit unterschiedlich dicken Membranen hin, wobei geringfügige Unterschiede offenbar dynamischen Ursprungs sind.

4.3.7.2 Keine Veränderung der Umorientierung bei negativer Lipidladung

Nach den Erkenntnissen über das Verhalten des antimikrobiellen Peptids PGLa in DMPC-Membranen stellt sich die Frage nach der biologischen Anwendbarkeit der gewonnenen Einsichten. Es gibt einige bekannte Parameter, die für bakterielle Membranen charakteristisch sind (vgl. 1.2.1 Struktur von Biomembranen), wie z.B. die negative Ladung der Lipidkopfgruppe.

Aus diesem Grunde wurden orientierte Proben mit systematisch steigendem DMPG-Anteil hergestellt. Die Spektren sind in Abbildung 44 dargestellt. Sie zeigen, dass die Ladung der Lipid-Kopfgruppe offenbar keinen wesentlichen Einfluss auf die Wechselwirkungen des Peptids mit der Membran ausübt, da die Konzentrationsbereiche der Umorientierung die gleichen sind, wie bei reinen DMPC-Membranen. Allerdings sind Unterschiede in der Feinstruktur des Triplets zu entdecken, so dass bei hohen Peptid-Konzentrationen in der Membran mit steigendem DMPG-Anteil die Dipolaufspaltung abnimmt.

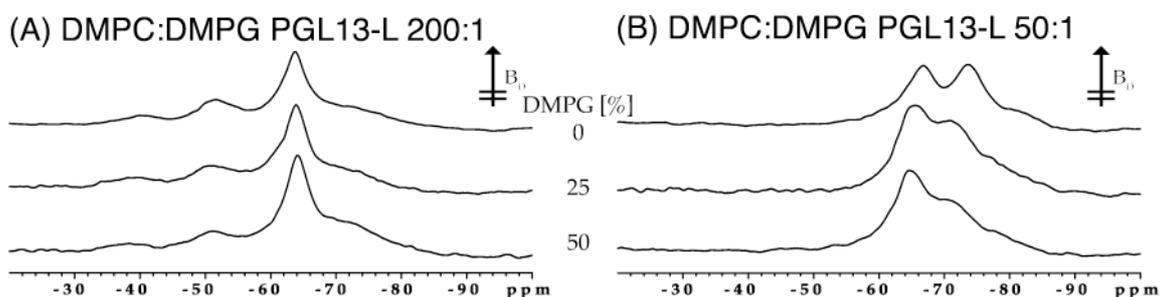


Abbildung 44: ^{19}F -Einpulse-Spektren des Derivats PGL13-L in DMPC-Membranen mit steigendem Gehalt an negativ geladenem DMPG (A) bei L/P-Verhältnis 200:1 und (B) L/P=50:1. Prinzipiell weist die PGLa-Helix bei beiden Konzentrationen den gleichen S- ($\square=90^\circ$) und T-Zustand ($\square=60^\circ$) wie in reinen DMPC-Membranen auf.

Auch hier sorgt die Einführung eines anderen Lipids für geringfügig andere Wechselwirkungsverhältnisse in der Membran, so dass die Dynamik des Peptids wieder variiert und ein direkter Vergleich in Bezug auf die α bzw. β -Winkel nicht sehr aussagekräftig wäre.

4.3.7.3 Eine leichtere Umorientierung durch negative Krümmung in der Membran

Bakterielle Membranen zeichnen sich neben ihrer negativen Ladung durch einen hohen Anteil an Lipiden PE-Lipiden mit negativer Krümmung aus (vgl. 1.2.1 Struktur von Biomembranen). Um diese Verhältnisse direkt zu simulieren und deren Einfluss auf die PGLa-Orientierung zu untersuchen, wurden orientierte Proben mit DMPG:DMPE (50:50) angefertigt. Die ^{19}F -NMR-Spektren (siehe Abbildung 45) spiegeln ein anderes Verhalten von PGLa als in reinen DMPC-Membranen wider.

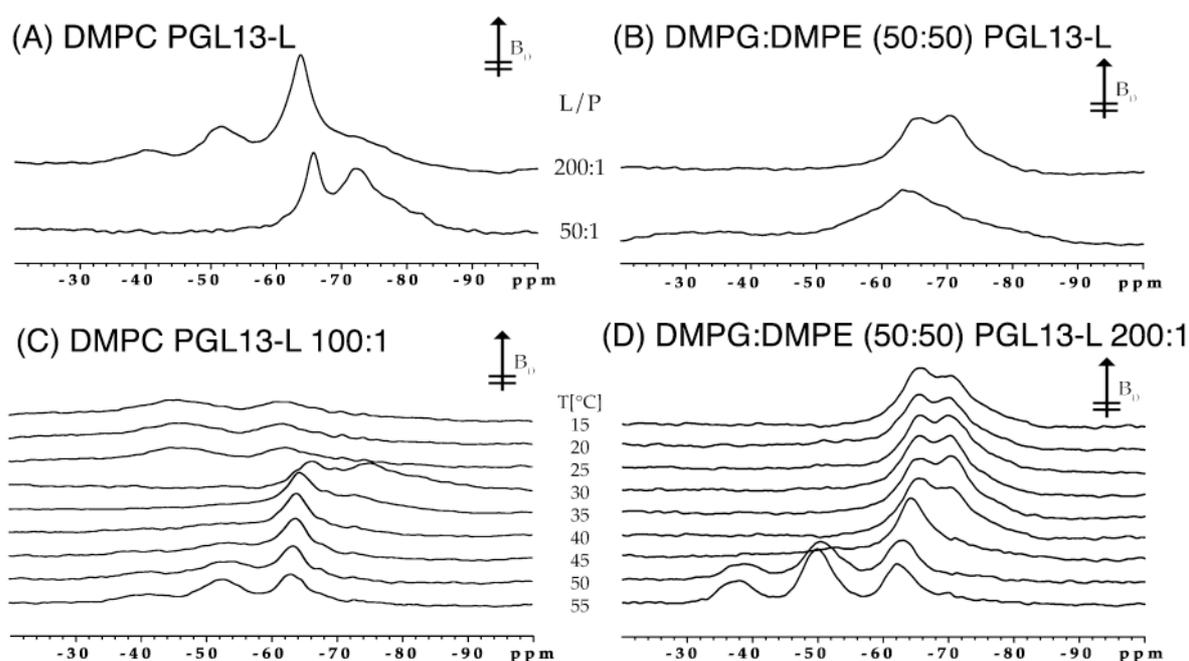


Abbildung 45: ^{19}F -Einpuls-Spektren des Derivats PGL13-L mit zusätzlichen DMPE-Lipiden. (A) Konzentrationsserie 200:1 und 50:1 L/P-Verhältnis in DMPC als Vergleich zu (B) DMPG:DMPE (50:50). (C) Temperaturserie für 100:1 DMPC als Vergleich zu (D) 200:1 DMPG:DMPE (50:50). Der T-Zustand ($\beta=60^\circ$) wird schon bei 200:1 L/P-Verhältnis erreicht, und bei 50:1 liegt keine bevorzugte Orientierung mehr vor. Die 100:1 DMPC-Probe verhält sich ähnlich wie die DMPG:DMPE-Probe bei 200:1 L/P-Verhältnis.

So zeigt sich schon bei Peptid-Konzentrationen von 200:1 eine eindeutige Umorientierung in den T-Zustand. Bei Konzentrationen von 50:1 hat das Peptid offenbar seine bevorzugte

Orientierung aufgegeben und liegt ungeordnet vor. Beim Vergleich der Temperaturserien in Abbildung 45C und D fällt auf, dass sich die 100:1 L/P-Verhältnis in reinem DMPC und 200:1 DMPG:DMPE (50:50) sehr ähnlich verhalten, denn beide wechseln ihre Orientierung vom T- in den S-Zustand bei ca. 40 °C oberhalb des Phasenübergangs. Unterhalb des Phasenübergangs allerdings unterliegt die DMPG/DMPE-Probe keiner Umorientierung, wie sie bei reinem DMPC beobachtet werden konnte.

4.3.7.4 Kein T-Zustand in bakteriellen Lipidmembranen

Für eine weitere Versuchsreihe wurden orientierte Proben aus polaren Lipid-Extrakten von *E. coli* hergestellt (Zusammensetzung vgl. Abschnitt 1.2.1 Struktur von Biomembranen). ^{19}F -Einpuls-Spektren dieser Proben sind in Abbildung 46 zusammengefasst. Sie zeigen keine offensichtliche Umorientierung, auch nicht bei niedrigem L/P-Verhältnis von 20:1. Auffällig ist aber, dass hier das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wesentlich schlechter wird.

Möglicherweise findet eine Umorientierung unter anderen experimentellen Bedingungen statt, als sie hier untersucht wurde.

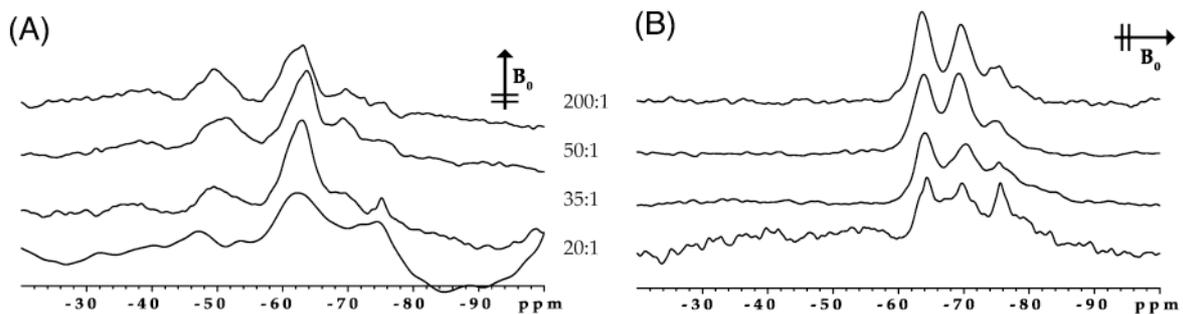


Abbildung 46: ^{19}F -Einpuls-Spektren des CF_3 -Phg-PGLa-Derivats PGL13-L von orientierten polaren *E. coli* Lipid-Extrakten bei 35 °C mit steigender Peptidkonzentration. (A) Horizontale Probenorientierung: Eine eindeutige Umorientierung ist nicht detektierbar, das Peptid verbleibt auch bei hohen Konzentrationen im S-Zustand ($\beta = 90^\circ$). Die Spektren sind durch ein sehr schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis geprägt, was sich auch durch lange Messzeiten nicht wesentlich verbessern ließ. (B) Eine Auswertung der vertikal vermessenen Proben ermöglicht die Zuordnung des unorientierten Anteil der Probe, der bei 20:1 verhältnismäßig hoch ist.

4.3.8 D-Aminosäuren als Markierung in der Festkörper-NMR

Parallel zu der Markierungsstrategie von L- CF_3 -Phg-Seitenketten an vier verschiedenen Positionen wurden die dazugehörigen D-Epimere auf ihre Tauglichkeit für die Sammlung von Winkeleinschränkungen untersucht. Prinzipiell ergibt sich dabei folgendes Bild: Die verschiedenen Derivate zeigen in den Spektren ebenso eine Umorientierung für niedrige bzw.

hohe Peptidkonzentrationen, wie aus Abbildung 47 hervorgeht. Dennoch stimmen die simulierten Dipolaufspaltungen bei der Anwendung der ermittelten θ und ϕ -Winkel lediglich bedingt mit denen der L-Epimere überein. Auffällig ist, dass für das PGLa-Derivat PGL10-D sehr hohe Kopplungen von 12,1 bzw. 10,7 kHz aufgezeichnet wurden, die bei Zugrundelegen eines Ordnungsparameters von 0,6 (wie für die L-Epimere ermittelt) gar nicht möglich wären. Diese Tatsache weist darauf hin, dass sich die D-Epimere anders verhalten als ihre strukturell ähnlichen *all*-L-Stereoisomere.

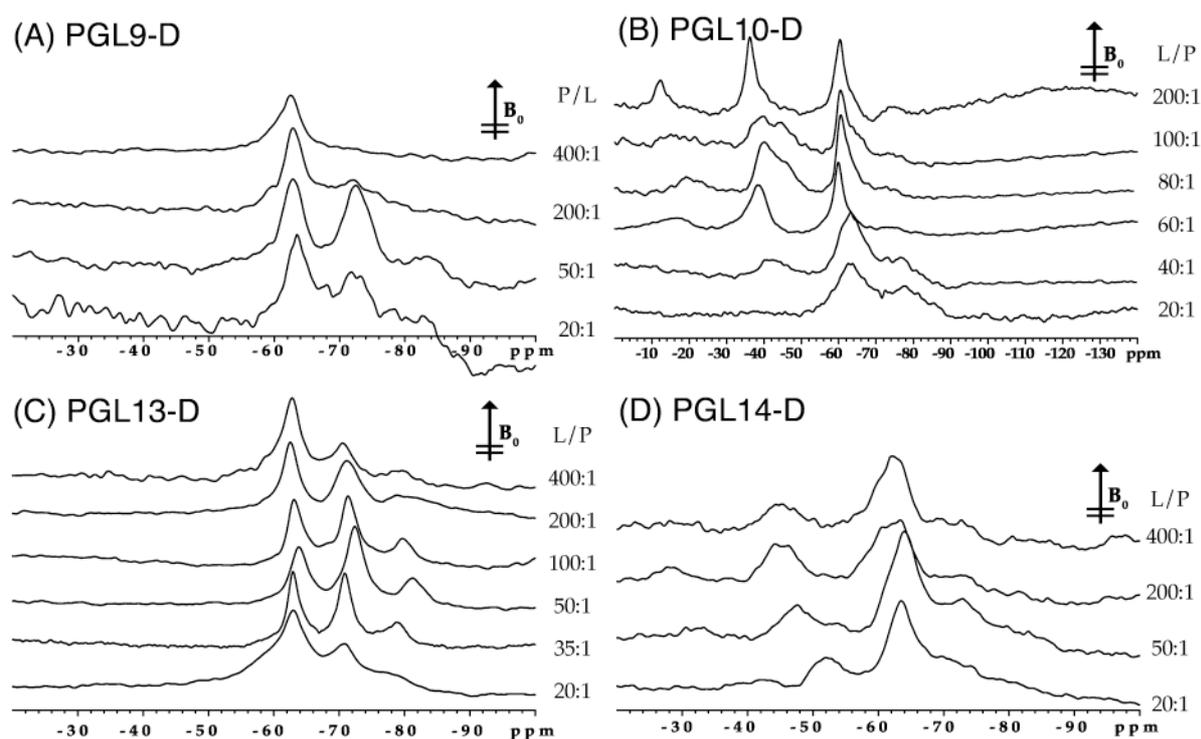


Abbildung 47: ^{19}F -Einpuls-Spektren für die D-Epimere der vier CF_3 -Phg-PGLa-Derivate (A) PGL9-L (B) PGL10-L (C) PGL13-L (D) PGL14-L. In allen Spektren sind Umorientierungen erkennbar, die aber wesentlich weniger eindeutig ausfallen als bei den L-Epimeren.

Nach der Orientierungsberechnung mit Hilfe der Dipolaufspaltungen der L-Epimere können deren Ergebnisse dennoch zum besseren Verständnis der D-Epimere beitragen. So ist es möglich, die Gesamtorientierungen in θ (Kippwinkel), ϕ (Rotationswinkel) und S_{mol} (Ordnungsparameter) aus den L-Dipolkopplungen zur Simulation der D-Kopplungen einzusetzen. Der Vergleich der simulierten und experimentell ermittelten Dipolkopplungen zeigt, dass nur die Seitenketten 13 und 14 ausreichend gute Übereinstimmung besitzen (siehe Tabelle 14). Bei den Seitenketten 9 und 10 weichen die Werte hingegen deutlich voneinander ab. Ein Grund dafür ist möglicherweise die bekannte Instabilität der α -Helix hin zum Amino-

Terminus, die durch die Glycin-Reste als Helixbrecher hervorgerufen wird. Demnach würden die D-Markierungen der Seitenketten 9 und 10 die Barriere zur Öffnung der Helix schneller überwinden als die vergleichbaren Seitenketten der L-Diastereomeren.

Tabelle 14: Zusammenstellung der ermittelten Dipolkopplungen und der daraus folgenden Orientierungsberechnung für die D-Epimere unter der (wahrscheinlich fälschlichen) Annahme eines idealen α -Helixmodells ($\alpha = -58^\circ / \alpha = -47^\circ$) in θ (Kippwinkel zur Membrannormalen), ϕ (Rotationswinkel um die Helixachse) und S_{mol} (Ordnungsparameter) bei niedrigen und hohen Peptidkonzentrationen von L/P=200:1, 50:1. Die rechte Spalte enthält die simulierten Dipolaufspaltungen gemäß eines vorausgesetzten S- ($\alpha = 90^\circ$) und T-Zustands ($\alpha = 60^\circ$).

| L/P-Verhältnis und Δ_{FF} (in kHz) | α^2 | θ (in $^\circ$) | ϕ (in $^\circ$) | S_{mol} | Δ_{FFsim} (in kHz) |
|---|------------|-------------------------|-----------------------|-----------|----------------------------|
| 200:1 PGL9-D 0 | 50,8827 | 43,8 | 44,1 | 1,0 | für 1,7 |
| PGL10-D 12,1 | | | | | $\alpha = 350,6^\circ$ 2,6 |
| PGL13-D -3,5 | | | | | $\alpha = 92,3^\circ$ -3,8 |
| PGL14-D 8,2 | | | | | $S_{mol} = 0,614$ 6,1 |
| 50:1 PGL9-D -4,7 | 0,4311 | 379,4 | 75,4 | 0,7 | für -1,8 |
| PGL10-D 10,7 | | | | | $\alpha = 327,3^\circ$ 0,3 |
| PGL13-D -4,1 | | | | | $\alpha = 58,0^\circ$ -3,8 |
| PGL14-D 7,6 | | | | | $S_{mol} = 0,637$ 7,7 |

Im Hinblick auf die simulierten Dipolaufspaltungen erscheint eine erneute Analyse der Spektren sinnvoll, da für mehrere Fälle, die Dipolaufspaltungen nicht eindeutig bestimmbar waren. Bei Betrachtung des CF_3 -Phg-PGLa-Derivats PGL13-D und PGL14-D stimmen die Tendenzen durchaus mit den bestimmten Dipolkopplungen überein, auch wenn die Heterogenität von mehreren Orientierungen hier mehrere Signale verursacht. Bei den anderen markierten Seitenketten befinden sich die vorgeschlagenen Helixmodelle fast überhaupt nicht in Einklang mit den gemessenen Daten. Offenbar weicht mit der Veränderung der Struktur ebenso das Verhalten gegenüber der Membran ab, so dass die biologische Effektivität möglicherweise beeinträchtigt wird, obwohl die Ergebnisse des antimikrobiellen Wachstumassays dafür keine Hinweise lieferten (vgl. 3.3.2).

Die CD-Daten und die Ergebnisse des antimikrobiellen Wachstumsassays hatten nahe gelegt, die D-Epimere möglicherweise in die Auswertung einzubeziehen. Wie die Analyse jedoch zeigt, lassen sich die ermittelten Dipolkopplungen nicht logisch zusammenfassen. Vielleicht wird der Gesamt-Helixanteil nur geringfügig verändert, aber Unterbrechungen oder Helix-Knicke würden zu einem unvorhersehbaren Verhalten der Seitenketten untereinander führen, so dass eine gemeinsame Auswertung wenig sinnvoll erscheint.

4.4 Diskussion

4.4.1 Orientierung und Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptids PGLa

Die Beschreibung einer konzentrationsabhängigen Umorientierung des antimikrobiellen Peptids PGLa in Modell-Lipiden konnte in dieser Arbeit erstmals mit umfangreichen Daten aus der ^{19}F -Festkörper-NMR umgesetzt werden. Dabei wurde ein um 30° zur Membranoberfläche geneigter T-Zustand aus Winkeleinschränkungen bestimmt, der wahrscheinlich ein wichtiger Bestandteil der antimikrobiellen Funktionsweise darstellt.

Erste Hinweise auf eine Veränderung der Lipidstruktur ergaben unsere ^{31}P -Messungen. Die konstante Verschiebung des orientierten Hauptsignals bei einem L/P-Verhältnis $\leq 80:1$ ist offenbar auf eine Erhöhung der Beweglichkeit der Phospholipide zurückzuführen. Sie wird bei höheren Konzentrationen des Peptids hervorgerufen und korreliert direkt mit dem Auftreten des T-Zustands. Eine Publikation von Hallock spricht von einer synchronisierten Bewegung des Peptids mit den Phospholipiden, die unter anderem als Ursache für das schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei ^{15}N -NMR-Messungen angesehen wird [70]. Eine solche Interpretationsmöglichkeit wird zusätzlich durch den unerwartet niedrigen Ordnungsparameter als Resultat der Orientierungsberechnungen des Peptids gestützt. Der niedrige Ordnungsparameter ist Indiz für eine hohe Ausmittlung des ^{19}F -NMR-Signals, also einer starken Beweglichkeit des Peptids. Eine weitere Erklärung könnte eine mögliche Winkeländerung der Phosphatgruppe liefern. Die Anlagerung des Peptids an die Phospholipid-Kopfgruppen ruft eine Lücke im Membraninnern hervor, die durch geneigte Acylketten aufgefüllt wird. Im Zuge einer solchen leichten Schiefelage der Lipide wird die Membrandicke reduziert, wie es für Magainin 2 gezeigt werden konnte [71]. Dieser Sachverhalt ist schematisch in Abbildung 48 illustriert.

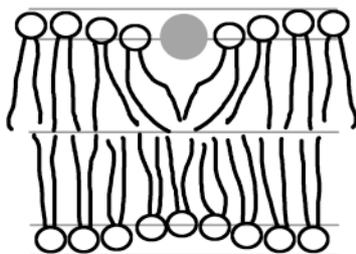


Abbildung 48: Schematische Darstellung zur Verringerung der Membrandicke. Die Anlagerung der Peptide (graue Helix) an die Phospholipid-Kopfgruppen lassen Platz für die Acylketten, so dass die Membran lokal dünner wird. (Modifiziert nach Ludtke [71])

Das Auftreten von breiteren ^{31}P -Komponenten von 28 bis 15 ppm bei molarem L/P-Verhältnis $\leq 20:1$ kann die Folge einer stärkeren Umorientierung oder eines Ordnungsverlusts der

Phosphatgruppe sein. Ähnliche Spektren wurden von Hallock et al. 2003 veröffentlicht, der die Gegenwart eines Magainin 2-Analogs für die Bildung einer toroidalen Pore verantwortlich machte [41]. Er konnte die chemische Verschiebung des Lipid-Modells der toroidalen Pore simulieren und eine gute Übereinstimmung mit experimentellen Daten zeigen.

Mit Hilfe der ermittelten Dipolkopplungen der vier verschiedenen CF_3 -Phg-PGLa-Derivate mit der CF_3 -Phg-Aminosäure an den Positionen 9, 10, 13 und 14 konnte die räumliche Lage der PGLa-Helix mit ihrem Kippwinkel θ und Rotationswinkel ϕ um die Helixachse und dem Ordnungsparameter S_{mol} bestimmt werden. Für niedrige L/P-Verhältnisse von 400:1 bis 200:1 wurde ein θ -Winkel von 90° der Helix zur Membrannormalen errechnet. Dieser S-Zustand mit $\phi=350^\circ$ auf der Membranoberfläche erscheint plausibel, da auf diese Weise die Lysinseitenketten vom Membraninnern wegzeigen. Sie ragen somit in die wässrige Phase bzw. kontaktieren die sauren Phospholipid-Kopfgruppen und vermeiden den thermodynamisch ungünstigen Aufenthalt der geladenen Reste in der Lipid-Phase. In dieser Arbeit konnte erstmalig bei Steigerung der Peptid-Konzentration ein 30° zur Membranebene gekippter Zustand (T-Zustand) detektiert werden, bei dem sich die Helix leicht um die Helixachse mit etwa 25° dreht. Bei der Interpretation dieses neuartigen T-Zustands sollte auch in Betracht gezogen werden, dass eine derartige Lösung als eine zeitlich gemittelte Orientierung eines sehr schnellen Gleichgewichts zwischen S- und I-Zustand zu Stande kommen kann. Im Verlauf dieses Prozesses waren weder Zwischenorientierungen sichtbar noch eine Verteilung von zwei Populationen detektierbar, so dass man von einer Alles-oder-Nichts-Umwandlung sprechen kann, die typisch für kooperative Prozesse ist. Dass dennoch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Orientierungen vorliegt, zeigen die Umorientierungsprozesse, die durch eine Temperatursteigerung oberhalb des Phasenübergangs induziert werden konnten.

Inwiefern können unsere ermittelten Orientierungen insbesondere der erstmals beschriebene T-Zustand mit den erläuterten strukturellen Modellen der Wirkungsweise antimikrobieller Peptide verstanden werden (vgl. 1.3.1)? Für hohe L/P-Verhältnisse erscheint das Carpet-Modell durchaus plausibel. Das Peptid legt sich peripher auf die Membranoberfläche und kann vielleicht durch seine hohe Dynamik unspezifische Schäden in Detergenz-ähnlicher Wirkung an der Membran hervorrufen. Der neuartige T-Zustand bei niedrigeren L/P-Verhältnissen hingegen liefert keine anschaulichen Erklärungen für dieses Modell mehr, da die gekippte Helixposition nicht offensichtlich stabil wäre. Das klassische Modell der Barrel-Stave-Pore hingegen ließe sich kaum mit dem T-Zustand vereinbaren, da

man eine Transmembran-Orientierung des I-Zustands senkrecht zur Membranebene erwarten sollte. Theoretisch könnte solch eine flach geneigte Helix Bestandteil eines hoch symmetrisch angeordneten makromolekularen Komplexes sein, wobei aber die detektierte Rotation um die Membrannormale kaum möglich wäre. Außerdem erweist sich ein Aufenthalt von vier positiven Ladungen in naher Umgebung des hydrophoben Membraninnern als sehr ungünstig [72]. Diese Überlegungen lassen ein Barrel-Staff-Modell jedenfalls als unwahrscheinlich erscheinen. Das Modell der toroidalen Pore kann zwar den Aufenthalt der positiven Ladung in der Nähe von negativ geladenen gekrümmten Phospholipiden gut erklären, gilt aber nicht unbedingt in zwitterionischem DMPC. Dennoch wird in der Literatur durchaus diskutiert, dass die Gegenwart des geneigten Peptids die Oberflächenspannung der Membran auf eine Weise verändert, dass auch zwitterionische Lipide in eine positive Krümmung gedrängt werden können [73]. So würde der T-Zustand etwa eine Oberseite der Lipid-Doppelschicht besetzen und müsste wahrscheinlich in einer symmetrischen Pore auch auf der Unterseite mit einem solchen T-Zustand stabilisiert werden. Dennoch wird das Modell der toroidalen Pore in der Literatur nur mit Orientierungen parallel zur Membrannormalen diskutiert [74]. Entweder ist entgegen dieser Annahmen eine flach geneigte Helix Bestandteil der Pore (Abbildung 49A), oder sie ist lediglich eine Vorstufe (Abbildung 49B) der Membranschädigung. Des Weiteren kann der errechnete T-Zustand als zeitlich gemittelte Orientierung zwischen S- und I-Zustand bereits indirektes Indiz einer toroidalen Pore sein. Der beobachtete T-Zustand als Bestandteil der toroidalen (evtl. transienten) Pore wurde durch Bindungsstudien an PGLa postuliert, die von einer aktiven Peptidspezies mit einer Porenbildung ab L/P=57:1 ausgehen [47]. Der T-Zustand als Vorstufe würde durch eine Publikation am verwandten Magainin 2 gestützt werden, da dort Porenstrukturen mit dem Peptid senkrecht zur Membranoberfläche erst im Bereich der L/P-Verhältnisse von 30:1 bis 10:1 detektiert wurden [37, 40]. Diese verschiedenen Modelle sind in der Abbildung 49 illustriert. Über den Zustand bei derartig niedrigen L/P-Verhältnissen $\leq 20:1$ lassen sich anhand der durchgeführten Messungen nur Vermutungen äußern, da eine bevorzugte Orientierung des Peptids nicht mehr detektierbar war. Neben einer statischen Pore mit einer Vielzahl von Orientierungen können aber auch weitere Lipidphasen (vgl. 1.2.1.2 Lipid-Polymorphismus) beteiligt sein. Daher lassen sich hexagonale Phasen als Ursachen für die Phosphorspektren diskutieren. Auf eine solche Art und Weise werden sowohl die Peptid-Spektren als auch eine Membranschädigung plausibel. Beim Abwägen des Für und Wider sollte die übergreifende Möglichkeit von synergistischen Wirkungen derartiger struktureller Modelle nicht außer Acht gelassen werden. Denn nur so

erscheint es plausibel, dass Membranschädigungen für eine Reihe solcher antimikrobieller Peptide bereits bei hohen L/P-Verhältnissen gemessen werden [27].

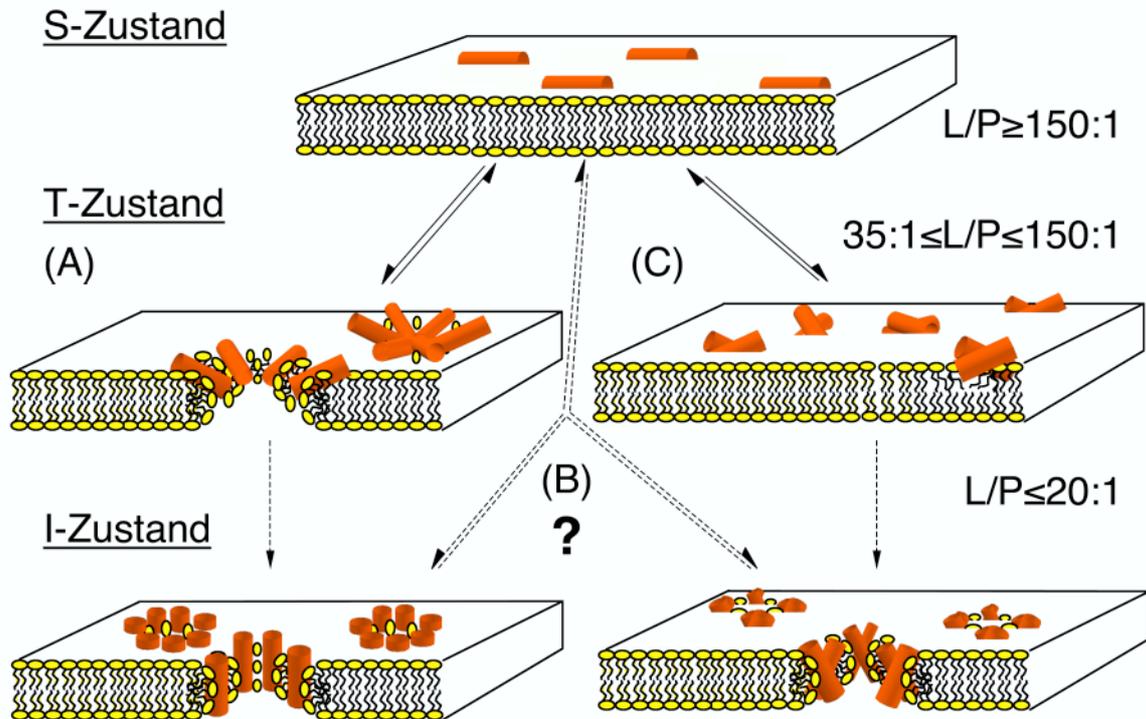


Abbildung 49: Illustration der diskutierten Modelle für den neuartigen postulierten T-Zustand ($\square=60^\circ$). S-Zustand: bei niedrigen L/P-Verhältnissen legt sich das Peptid flach mit 90° zur Membrannormalen auf die Membranoberfläche. T-Zustand: mit Steigerung der Peptidkonzentration neigt sich die Helix um 30° zur Membranebene. Entweder handelt es sich um (A) den eine Vorstufe zur klassischen toroidalen Pore, (B) um die zeitlich gemittelte Orientierung zwischen S-Zustand und einer transienten Pore im I-Zustand oder (C) um eine dimere Vorstufe einer Pore bestehend aus aufrechten Dimeren. Der dimerisierte T-Zustand könnte auch als intrinsischer Schutzmechanismus von eukaryotischen Zellmembranen vor eigener Membranpermeabilisation dienen.

4.4.2 Ein hypothetisches antiparalleles PGLa-Dimer im T-Zustand

Seit längerem werden Dimerisierungs- und Oligomerisierungsprozesse als Wirkungsweisen von antimikrobiellen Peptiden diskutiert und untersucht (vgl. 1.3.2 PGLa – ein Literaturüberblick) [Schaefer, persönliche Kommunikation]. Interessanterweise wird die Umorientierung in den T-Zustand von einer Steigerung des Helixanteils begleitet, wie durch die CD-Messungen gezeigt werden konnte. Ob dies tatsächlich Ausdruck eines gesteigerten \square -Helixanteils oder einer dynamisch geringeren Auffaltung ist, bleibt Spekulation. Dennoch können die CD-Beobachtungen durch subtile Konformationsänderungen als Folge einer abweichenden Umgebung des Peptids erklärt werden. Die hier im Rahmen der Orientierungsberechnung ermittelten \square^2 -Anpassungen für verschiedene Helixstrukturen sind

in ihrer Aussagekraft zu vage, um eine solche Hypothese auf exaktem atomarem Niveau zu stützen. Bei detaillierter Analyse des T-Zustands der Helix fällt die Rotation um die Helixachse um 20° auf. Diese führt zu einer leichten Verdrehung der Lysinseitenketten, die damit etwas asymmetrisch in einer sonst symmetrischen Membrenumgebung verteilt sind. Falls diese Abweichung von 20° nicht Folge der Rechenungenauigkeit ist, sollte eine spezifische Erkennung durch asymmetrische Moleküle vorliegen. Für die Richtigkeit des ermittelten Rotationswinkels spricht, dass die Lysinseitenkettenposition durch die anderen Helixmodelle bestätigt werden.

In unserem Modellsystem kommt folglich eine Selbstassoziation in Frage, die mit einer leichten Erhöhung des Helixanteils einherginge. Auf dem einfachsten Niveau könnte das einer antiparallelen Dimerisierung entsprechen, wie es für Magainin 2 durch NMR-Untersuchungen in Lösung errechnet wurde. Ein paralleles Dimer in der Membranebene hingegen würde zwei verschiedene Orientierungen in den NMR-Spektren hervorrufen. Als thermodynamische Triebkraft kann die Minimierung der unvorteilhaft hydrophoben Oberfläche zu den Lipidkopfgruppen verstanden werden. Eine solches Dimer würde durch die Helixdipole stabilisiert und könnte den ermittelten T-Zustand erklären. Ein Winkel von 30° zur Membranebene mag im ersten Moment etwas ungewöhnlich für Peptide in Membrenumgebung erscheinen, da sonst immer vom S- (periphere Lage auf der Membranoberfläche) und I-Zustand (Transmembranorientierung) mit leichten Abweichungen die Rede ist (siehe 1.2.2.1). Für Faltungsmotive aus β -Strukturen ist allerdings bekannt, dass diese nie direkt parallel zueinander assoziieren, sondern mit der Helixachse gegeneinander verkippen und verdrillen [16]. Diese Tatsache verdeutlicht auch, dass wir realistischerweise keine starren gegeneinander verkippten Zylinder annehmen sollten. In Wirklichkeit sind die Helices flexibel miteinander assoziiert, und die berechneten Orientierungen repräsentieren lediglich den markierten Bereich der vier Aminosäuren. Ein solches Dimer ist für Magainin 2 beschrieben und könnte stabil mit seinen Helices 30° geneigt zur Membranoberfläche stehen [35]. Die fortführende Rotation des Peptids in der Membranebene bei niedrigen L/P-Verhältnissen konnte durch die vertikal vermessenen Proben gezeigt werden. Dieser Befund spricht dafür, dass es sich im Zuge einer Oligomerisierung nicht um ein sehr großes molekulares Aggregat handeln kann, da es in seiner Beweglichkeit zu stark eingeschränkt wäre. Als potentielle Kontaktbildner in einem derartigen Dimer kommen die Glycinreste in Position 7 und 11 in Frage, die durch ihr kleines Volumen in der Peptidkette genügend Raum

für komplementäre Oberflächen der Alanine oder Leucine bilden würden. Ein einfaches Modell dieser Art ist in Abbildung 50 illustriert.

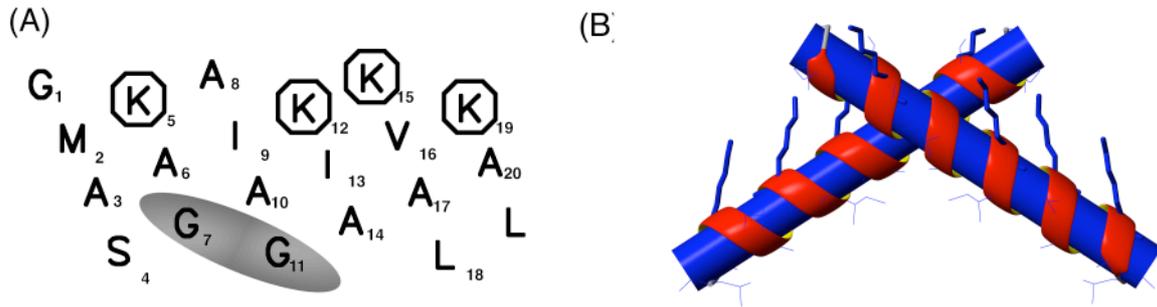


Abbildung 50: (A) 2D-Seitenansicht (PEPNET-Plot [55]) einer idealen PGLa-Helix. Hervorgehoben sind die Glycine in Position 7 und 11 als potentielle Kontaktbildner und die funktionell wichtigen Lysine in Position 5, 12, 15, 19 mit Achtecken umrahmt. (B) Symmetrisches Dimer-Modell zweier idealer PGLa-Helices ($\alpha\alpha = -58^\circ/-47^\circ$) mit mutmaßlichen Kontaktstellen an den Glycinen.

Weitere Festkörper-Messungen, die sowohl mit Magainin 2 [75] als auch mit PGLa [51] in orientierten Proben durchgeführt wurden, konnten bisher nur S-Zustände peripher auf der Membranoberfläche detektieren. Sie stehen aber nicht in unmittelbarem Widerspruch zum ermittelten T-Zustand. Da sie nur mit weniger sensitiven ^{15}N -Markierung bestimmt worden sind (ohne auf Konzentrationsabhängigkeiten zu achten), können dabei durchaus Abweichungen von $\pm 35^\circ$ auftreten, ohne dass sie bemerkt worden wären.

Der T-Zustand bei höheren Peptidkonzentrationen dient möglicherweise als Voraussetzung für die Schädigung der Membran, vielleicht indem die Dimere für eine starke Verringerung der Membrandicke (Abbildung 48) sorgen. Bei noch niedrigeren L/P-Verhältnissen im Bereich von 20:1 liegt ein Überschuss an Peptid vor, dass sich möglicherweise eine toroidale Pore ausbildet, was durch die gemessenen Phosphor-Spektren gestützt wird. Obgleich diese Arbeit dazu keine weiteren Befunde liefern konnte, erscheint folgendes Modell möglich: Senkrecht zur Membranoberfläche stehende Dimere bilden den Kern eines makromolekularen Komplexes als toroidale Pore. Dabei sind die positiven Lysinseitenketten optimal zu zwei Seiten des Dimers positioniert und assoziieren an negativ geladene Lipidkopfgruppen (, die hier kaum untersucht wurden). Solche ^{19}F -NMR-Spektren wären sehr komplex und schwierig in Bezug auf Orientierungen auszuwerten. Mit diesen Interpretationen erscheint das Modell, wie es von Cruciani et al. bereits 1992 für Magainin 2 vorgeschlagen wurde, nicht unrealistisch (siehe Abschnitt 1.3.2 PGLa – ein Literaturüberblick, siehe Abbildung 12).

4.4.3 Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Orientierung von PGLa

Alle bisherigen Resultate konnten an Hand von orientierten Proben mit DMPC-Modellmembranen gewonnen werden. Der Einfluss der Lipidkettenlänge von C_{12} - C_{16} für DLPC, DMPC bzw. DPPC kann Details über die molekulare Wechselwirkung des Peptids mit der Membran in Bezug auf den hydrophoben Mismatch liefern. Von genauerem Interesse sollten nun die stabilen Konzentrationsbereiche des T-Zustands der Helix sein, denn die Kettenlänge des Lipids dürfte keinen spürbaren Einfluss auf den S-Zustand von PGLa auf der Membranoberfläche haben. Im Falle des T-Zustands als Bestandteil einer toroidalen Pore sollte die Variation der Kettenlänge im Lipidmolekül einen Einfluss auf die Orientierung des Peptids ausüben. Wenn wir ein hypothetisches Modell zu Grunde legen, bei dem die geneigte Helix die Oberseite der Membran durchspannt und mit einer spiegelbildlich orientierten Helix auf der Unterseite der Membran Kontakt aufnimmt, dann sollte eine steigende Lipidkettenlänge bei konstantem τ -Winkel eine Erniedrigung des τ -Winkels der Helix hervorrufen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 51 graphisch dargestellt.

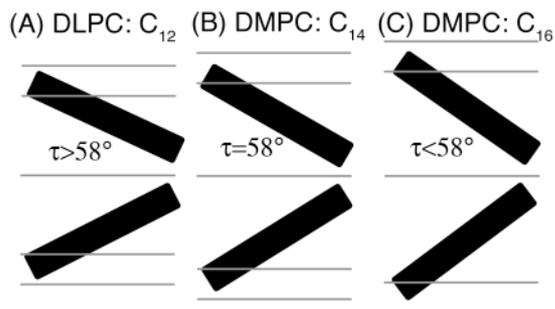


Abbildung 51: Modell zur Variation der Kettenlänge und dem Einfluss des Peptids im T-Zustand ($\tau=60^\circ$) als Bestandteil einer Pore. Im Falle einer Membraninsertion sollte das Peptid bei Variation der Kettenlänge (A) C_{12} (B) C_{14} (C) C_{16} aufgrund des hydrophoben Mismatches den Kippwinkel τ verändern. Dieses Modell kann anhand der ^{19}F -Messungen ausgeschlossen werden.

Die Dipolkopplung müsste nach einer derartigen Simulation bei gleichem Ordnungsparameter für das Derivat PGL13-L geringer als $-3,3$ kHz ausfallen. Ein solches einfaches Modell kann nach unseren Daten ausgeschlossen werden, da sowohl DLPC und DPPC größere Kopplungen aufwiesen. DLPC nimmt aufgrund seiner kürzeren Kettenlänge weniger an van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Ketten teil, so dass die Membranbewegung stärker als für DMPC bei gleicher Temperatur ausgeprägt ist. Demzufolge sind die Dipolaufspaltungen stärker ausgemittelt und kleiner im Betrag. Es ist allerdings zu bedenken, dass die Dynamik der unterschiedlichen Lipide schwer vergleichbar ist, so dass aus den Spektren einer einzelnen Seitenkette keine zwingenden Schlussfolgerungen zur Lageabhängigkeit der Helix in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Lipids gezogen werden können.

Die negativ geladenen Kopfgruppen der bakteriellen Lipide werden als eine Hauptursache für die selektive Wirkung von antimikrobiellen Peptiden diskutiert (vgl. 1.1.2 Wirkmechanismus und Resistenzentwicklung). Bei unseren Versuchen schien die Einführung von negativem DMPG in DMPC-Membranen keinen offensichtlichen Einfluss auf den T-Zustand der Helix auszuüben. Der steigende DMPG-Anteil führt zu etwas mehr ausgemittelten Dipolkopplungen, die wahrscheinlich dynamische Ursachen haben. Daraus lässt sich schließen, dass die Hauptfunktion der negativen Ladung in der Anziehung des kationischen Peptids aus der wässrigen Phase an die Membranoberfläche besteht, auch wenn die Wechselwirkungen mit den Lysininen als Hauptstabilisatoren einer toroidalen Pore postuliert werden [Schaefer, persönliche Kommunikation]. Während dies im natürlichen Milieu zum Tragen kommt, kann die Ladung in den hier untersuchten orientierten Proben eine solche Wirkung nicht entfalten, da das Peptid zwischen den gestapelten Lipid-Doppelschichten ohnehin eingefangen ist.

Seit langer Zeit wird PGLa parallel zu Magainin 2 als Paradigma einer toroidalen Pore diskutiert (vgl. 1.3.2 PGLa – ein Literaturüberblick). Demzufolge erschien es sinnvoll, Lipide mit negativer Krümmung einzuführen, die möglicherweise gegen den Aufbau einer solchen Pore wirksam sind. Die Ergebnisse mit 50% DMPE widersprachen zunächst scheinbar dieser Annahme, denn der T-Zustand der Helix konnte bereits bei L/P-Verhältnissen von 200:1 detektiert werden (vgl. 4.3.7.3). Diese Daten führten zu der Annahme, dass ein Zusatz des Lipids DMPE in DMPG den Vorgang der Umorientierung der Helix fördert. Das Lipid DMPE trägt aufgrund seiner geometrischen Form zu einer negativen Krümmung der Lipid-Doppelschicht bei und leitet damit die Bildung von invertierten Mizellen oder einer invertierten hexagonalen Phase ein. Diese Interpretation spricht gegen das Modell einer toroidalen Pore, (obgleich für eine solch strukturierte Pore bekannt ist, dass diese in der Ebene parallel zur Membranebene negativ gekrümmte Lipid benötigt [44]). Des Weiteren erscheint es plausibel, dass im Zuge einer Ausbildung zur toroidalen Pore kleine Kopfgruppen besser zwischen die Peptide passen und großflächigere Acylkettenbereiche die entstandene Lücke, die durch das partielle Eindringen der Peptide hervorgerufen wird, effektiver auffüllen. Eine weitere mögliche Erklärung der Beobachtungen könnte die Ausbildung von Peptid-assoziierten Lipiddomänen sein, wie sie für PGLa in der Literatur bereits beschrieben wurde [53]. Besonders für binäre Lipidmischungen aus DMPG/DMPE sind diese Erscheinungen von Relevanz, da das Lipid DMPE bevorzugt separate Phasen bildet. Es kann durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung die Oberfläche der Membran versiegeln und das

Eindringen des Peptids erschweren. Das positive PGLa wird ausschließlich an die negativ geladenen Kopfgruppen geleitet. Die effektive Konzentration des Peptids auf der DMPG-Oberfläche entspricht dabei dem Doppelten der manuell zugegebenen, also für die Probe DMPG/DMPE (50:50) mit L/P=200:1 entspräche dies effektiv 100:1 im binären Gemisch. In einem solchen experimentellen Ansatz ist der Einfluss der Lipidkrümmung nicht mehr zuverlässig interpretierbar. Dennoch bleibt die Frage, inwiefern diese Eigenschaften der Lipide nicht auch biologische Bedeutung besitzen, denn für ein antimikrobielles Peptid wäre die Assoziation an Peptide negativer Krümmung sehr kontraproduktiv, wenn es für die Ausbildung einer toroidalen Pore „konzipiert“ ist.

Obwohl binäre Lipidmischungen bestimmte Aspekte einer bakteriellen Membran simulieren können, ist die reale Bakterienmembran noch wesentlich heterogener beschaffen (vgl. 1.2.1.1 Eigenschaften von Modellmembranen). Für orientierte Proben aus polaren Lipidextrakten von *E. coli* konnte auch bei niedrigen L/P-Verhältnissen bis 20:1 keine Umorientierung in den T-Zustand der Helix nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerspricht dem toroidalen Porenmodell und hinterfragt auch den T-Zustand im Hinblick auf ihre biologische Bedeutung. Eventuell sind noch wesentlich niedrigere L/P-Verhältnisse nötig, um eine Neigung der Helix herbeizuführen. Genauso kann die Umorientierung Bestandteil eines Schutzmechanismus für eukaryotische Membranen sein, der mit dem T-Zustand eine Schädigung der Membran verhindert, indem die toroidale Porenbildung vermieden wird. Eine solche Hypothese kann durch diese Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden. Die bisherigen Arbeiten, die zur Gruppe der Magainine veröffentlicht wurden, legen jedoch eine solche Vermutung nicht unbedingt nahe, da Membranpermeabilisation an nahezu allen Lipidsystemen sichtbar ist.

Interessanterweise wurde für orientierte Proben aus DOPC-Membranen mit ungesättigten Acylketten ebenfalls keine Umorientierung gefunden. Möglicherweise besteht zwischen beiden Beobachtungen ein kausaler Zusammenhang, denn *E. coli*-Membranen besitzen je nach Wachstumsbedingungen einen bis zu 50%igen Anteil von ungesättigten Acylketten. In der Literatur wurden interessanterweise keine Umorientierungen in Lipiden mit Oleylketten beschrieben. Trotzdem konnte die Fähigkeit des PGLa zur Membranpermeabilisierung zweifelsfrei beschrieben werden [49]. Die dynamischen Verhältnisse einer Lipidmembran aus gesättigten und ungesättigten Fettsäureketten variieren beträchtlich, so dass möglicherweise der T-Zustand als Zwischenzustand zur toroidalen Pore mit sehr geringer Lebensdauer nicht detektierbar ist. Oder aber es sind einfach noch

niedrigere L/P-Verhältnisse nötig, um den T-Zustand bzw. die toroidale Pore zu erreichen. Eine solche Argumentation könnte in dem Sinne verstanden werden, dass ungesättigte Fettsäureketten wesentlich widerwilliger eine toroidale Pore mit positiver Krümmung eingehen als gesättigte Lipide. Möglicherweise unterliegt diesem Befund ebenfalls eine biologische Bedeutung für den Angriff der Peptide auf die mikrobielle Zellmembranen. Demzufolge wären Peptid-assoziierte Lipidphasen eine Voraussetzung für die effektive Wirksamkeit der Peptide. Effektiv für das Peptid wäre dann nur die Assoziation an solche Lipide, bei denen eine Porenausbildung auch Erfolg versprechend ist.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine 30° geneigte Lage des α -helikalen Peptids PGLa zur Membranebene bei hohen Peptidkonzentrationen beschrieben werden. Demzufolge wird erstmalig ein T-Zustand vorgeschlagen, der als Vorstufe oder als Bestandteil einer toroidalen Pore zur Membranschädigung des Peptids beiträgt. Des Weiteren konnten viele interessante Aspekte im Hinblick auf die Lipidzusammensetzung im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht werden. Eine genauere Interpretation wäre sicherlich durch Vermessung von weiteren markierten Positionen unter Berücksichtigung der Vielfalt an Lipidzusammensetzungen möglich. Ein weiterer interessanter Aspekt, der noch nicht berücksichtigt wurde, ist die Gegenwart von Cholesterol in orientierten Membranen. Solche Membranpräparationen können Aufschluss über das unterschiedliche Verhalten des Peptids gegenüber prokaryotischen und eukaryotischen Membranen geben.

Obwohl mit der vorliegenden Arbeit mittels CD-Spektroskopie und antimikrobiellen Wachstumsassays aufschlussreiche Daten zum Einfluss der markierten CF₃-Phg-Seitenketten geliefert wurden, konnte der exakte strukturelle Einfluss der nicht-proteinogenen Aminosäuren auf die native Peptidstruktur nicht im Detail erfasst werden. Aus diesem Grunde erscheint eine Überprüfung der errechneten Helixlage anhand von deuterierten Seitenketten als eine sinnvolle komplementäre Strategie, die durch einen vernachlässigbar geringen Einfluss auf die native Struktur gekennzeichnet ist. Der T-Zustand der Helix ließ in einem plausiblen Kontext der Dimerisierung interpretieren, wobei ein direkter Beweis aber noch nicht angetreten werden konnte. Diesen könnten intermolekulare Abstandsmessungen liefern. Möglicherweise lassen sich dann auch auswertbare Ergebnisse für die sehr niedrigen L/P-Verhältnisse von unter 20:1 erzielen, unter denen sich die in der Literatur postulierte toroidale Pore letztlich ausbilden könnte. Diese Arbeiten sollten mehr Befunde liefern, um die Wechselwirkungen von antimikrobiellen Peptiden mit der Membran genauer zu

charakterisieren und könnten letztlich einen Beitrag zum besseren Design von pharmazeutisch relevanten Verbindungen nach dem Vorbild der Natur liefern.

1. Breithaupt H: **The new antibiotics**. *Nature Biotechnology* 1999, **17**:1165-1169.
2. <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>
3. Zasloff M: **Antimicrobial peptides of multicellular organisms**. *Nature* 2002, **415**:389-395.
4. Hancock RE, Chapple DS: **Peptide antibiotics**. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:1317-1323.
5. Wade D, Boman A, Wahlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB: **All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:4761-4765.
6. Oren Z, Shai Y: **A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus***. *European Journal of Biochemistry* 1996, **237**:303-310.
7. Matsuzaki K: **Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self- defense? Magainins and tachyplesins as archetypes**. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1999, **1462**:1-10.
8. Madigan M, Martinko J, Parker J: **Brock - Biology of Microorganisms**. 9th Edition, *Prentice Hall, Inc.* 2000, New Jersey.
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular Biology of the Cell**, 4th Edition, *Garland Science* 2002, New York.
10. Nelson D, Cox M: **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3rd Edition, *Worth Publishers* 2000, New York.
11. Gennis R: **Biomembranes: Molecular Structure and Function**, *Springer-Verlag* 1989, New York.
12. Campbell ID: **The march of structural biology**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002, **3**:377-381.
13. Henderson R, Unwin PNT: **3-Dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron- Microscopy**. *Nature* 1975, **257**:28-32.

14. Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H: **Structure of the Protein Subunits in the Photosynthetic Reaction Center of Rhodospseudomonas-Viridis at 3a Resolution.** *Nature* 1985, **318**:618-624.
15. Ketchum RR, Hu W, Cross TA: **High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR.** *Science* 1993, **261**:1457-1460.
16. Branden C, Tooze J: **Introduction to Protein Structure.** 2nd Edition, *Garland Science* 1999, New York.
17. Levitt M: **Spin Dynamics – Basics of Nuclear Magnetic Resonance.** *Wiley-VCH Verlag GmbH* 2001, Weinheim.
18. Grage SL, Ulrich AS: **Structural parameters from ¹⁹F homonuclear dipolar couplings, obtained by multipulse solid-state NMR on static and oriented systems.** *J Magn Reson* 1999, **138**:98-106.
19. Atkins P: **Physical Chemistry.** 6th Edition, *Oxford University Press* 1998, Oxford.
20. Gerig J: **Biophysics online Fluorine NMR.** 2001
21. Salgado J, Grage SL, Kondejewski LH, Hodges RS, McElhaney RN, Ulrich AS: **Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial beta-sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state ¹⁹F-NMR.** *J Biomol NMR* 2001, **21**:191-208.
22. Grage SL, Wang J, Cross TA, Ulrich AS: **Solid-State (¹⁹F)-NMR Analysis of (¹⁹F)-Labeled Tryptophan in Gramicidin A in Oriented Membranes.** *Biophys J* 2002, **83**:3336-3350.
23. Grage SL, Ulrich AS: **Orientation-dependent (¹⁹F) dipolar couplings within a trifluoromethyl group are revealed by static multipulse NMR in the solid state.** *J Magn Reson* 2000, **146**:81-88.
24. Zasloff M: **Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from Xenopus Skin - Isolation, Characterization of 2 Active Forms, and Partial Cdna Sequence of a Precursor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**:5449-5453.
25. Moore KS, Bevins CL, Brasseur MM, Tomassini N, Turner K, Eck H, Zasloff M: **Antimicrobial peptides in the stomach of Xenopus laevis.** *J Biol Chem* 1991, **266**:19851-19857.

-
26. Giovannini MG, Poulter L, Gibson BW, Williams DH: **Biosynthesis and Degradation of Peptides Derived from Xenopus- Laevis Prohormones.** *Biochemical Journal* 1987, **243**:113-120.
27. Bechinger B: **The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1462**:157-183.
28. Shai Y: **Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1999, **1462**:55-70.
29. Bessalle R, Kapitkovsky A, Gorea A, Shalit I, Fridkin M: **All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance.** *FEBS Lett* 1990, **274**:151-155.
30. Williams RW, Starman R, Taylor KM, Gable K, Beeler T, Zasloff M, Covell D: **Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa.** *Biochemistry* 1990, **29**:4490-4496.
31. Jackson M, Mantsch HH, Spencer JH: **Conformation of magainin-2 and related peptides in aqueous solution and membrane environments probed by Fourier transform infrared spectroscopy.** *Biochemistry* 1992, **31**:7289-7293.
32. Vaz Gomes A, de Waal A, Berden JA, Westerhoff HV: **Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes.** *Biochemistry* 1993, **32**:5365-5372.
33. Matsuzaki K, Mitani Y, Akada KY, Murase O, Yoneyama S, Zasloff M, Miyajima K: **Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa.** *Biochemistry* 1998, **37**:15144-15153.
34. Hara T, Mitani Y, Tanaka K, Uematsu N, Takakura A, Tachi T, Kodama H, Kondo M, Mori H, Otaka A, et al.: **Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study.** *Biochemistry* 2001, **40**:12395-12399.
35. Wakamatsu K, Takeda A, Tachi T, Matsuzaki K: **Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles.** *Biopolymers* 2002, **64**:314-327.
36. 1. Cruciani RA, Barker JL, Durell SR, Raghunathan G, Guy HR, Zasloff M, Stanley EF: **Magainin-2, a Natural Antibiotic from Frog-Skin, Forms Ion Channels in Lipid Bilayer-**

Membranes. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* 1992, **226**:287-296.

37. Ludtke SJ, He K, Wu Y, Huang HW: **Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1190**:181-184.

38. Matsuzaki K, Murase O, Tokuda H, Funakoshi S, Fujii N, Miyajima K: **Orientational and Aggregational States of Magainin-2 in Phospholipid-Bilayers.** *Biochemistry* 1994, **33**:3342-3349.

39. Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K: **Translocation of a Channel-Forming Antimicrobial Peptide, Magainin-2, across Lipid Bilayers by Forming a Pore.** *Biochemistry* 1995, **34**:6521-6526.

40. Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW: **Membrane pores induced by magainin.** *Biochemistry* 1996, **35**:13723-13728.

41. Hallock K, Lee D, Ramamoorthy A: **MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain.** *Biophys J* 84 2003, 3052-60.

42. Munster C, Spaar A, Bechinger B, Salditt T: **Magainin 2 in phospholipid bilayers: peptide orientation and lipid chain ordering studied by X-ray diffraction.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1562**:37-44.

43. Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K: **An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation.** *Biochemistry* 1996, **35**:11361-11368.

44. Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, Epan RM: **Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2.** *Biochemistry* 1998, **37**:11856-11863.

45. Wieprecht T, Beyermann M, Seelig J: **Binding of antibacterial magainin peptides to electrically neutral membranes: thermodynamics and structure.** *Biochemistry* 1999, **38**:10377-10387.

46. Matsuzaki K, Murase O, Tokuda H, Funakoshi S, Fujii N, Miyajima K: **Orientational and Aggregational States of Magainin-2 in Phospholipid-Bilayers.** *Biochemistry* 1994, **33**:3342-3349.

-
47. Wieprecht T, Apostolov O, Beyermann M, Seelig J: **Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects.** *Biochemistry* 2000, **39**:442-452.
48. Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV: **A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides.** *FEBS Lett* 1999, **449**:105-110.
49. Blazyk J, Wiegand R, Klein J, Hammer J, Epand RM, Epand RF, Maloy WL, Kari UP: **A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids.** *J Biol Chem* 2001, **276**:27899-27906.
50. Latal A, Degovics G, Epand RF, Epand RM, Lohner K: **Structural aspects of the interaction of peptidyl-glycylleucine-carboxamide, a highly potent antimicrobial peptide from frog skin, with lipids.** *Eur J Biochem* 1997, **248**:938-946.
51. Bechinger B, Zasloff M, Opella SJ: **Structure and dynamics of the antibiotic peptide PGLa in membranes by solution and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy.** *Biophys J* 1998, **74**:981-987.
52. Konovalov O, Myagkov I, Struth B, Lohner K: **Lipid discrimination in phospholipid monolayers by the antimicrobial frog skin peptide PGLa. A synchrotron X-ray grazing incidence and reflectivity study.** *Eur Biophys J* 2002, **31**:428-437.
53. Lohner K, Prenner EJ: **Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1999, **1462**:141-156.
54. Afonin S, Glaser RW, Berditchevskaja M, Wadhvani P, Gührs K-H, Möllmann U, Perner A, Ulrich AS: **4-Fluoro-phenylglycine as a label for ¹⁹F-NMR structure analysis of membrane associated peptides.** in Druck *ChemBioChem*.
55. Rice P, Longden I, Bleasby A: **EMBOSS: The European molecular biology open software suite.** *Trends in Genetics* 2000, **16**:276-277.
56. **Catalog and Peptide Synthesis Handbook.** *NovaBiochem Catalog* 1999.
57. Kaiser E, Colescot.RI, Bossing.Cd, Cook PI: **Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in Solid-Phase Synthesis of Peptides.** *Analytical Biochemistry* 1970, **34**:595-&.

58. Marfey P, Ottesen M: **Determination of D-Amino Acids .1. Hydrolysis of Dnp-L-Amino Acid Methyl-Esters with Carboxypeptidase-Y.** *Carlsberg Research Communications* 1984, **49**:585-590.
59. Chen Y, Mant CT, Hodges RS: **Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic alpha-helix.** *Journal of Peptide Research* 2002, **59**:18-33.
60. **Deutsches Arzneibuch.** 9th Edition, *Deutscher Apotheker Verlag* 1990, Stuttgart, pp. 47-48, 424-430.
61. National Committee for Clinical Laboratory Standards: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 4th Edition (Ed. Villanova) *NCCLS*, 1997, Approved standard document M7-A4.
62. Sreerama N, Woody RW: **Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set.** *Analytical Biochemistry* 2000, **287**:252-260.
63. Wieprecht T, Dathe M, Schumann M, Krause E, Beyermann M, Bienert M: **Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement.** *Biochemistry* 1996, **35**:10844-10853.
64. Wieprecht T, Dathe M, Beyermann M, Krause E, Maloy WL, MacDonald DL, Bienert M: **Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes.** *Biochemistry* 1997, **36**:6124-6132.
65. Chen HC, Brown JH, Morell JL, Huang CM: **Synthetic Magainin Analogs with Improved Antimicrobial Activity.** *Febs Letters* 1988, **236**:462-466.
66. Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC: **Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation.** *Proteins* 2003, **50**:437-450.
67. Kim S, Cross TA: **Uniformity, ideality, and hydrogen bonds in transmembrane alpha-helices.** *Biophys J* 2002, **83**:2084-2095.
68. Koradi R, Billeter M, Wuthrich K: **MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures.** *Journal of Molecular Graphics* 1996, **14**:51-&.

69. Glaser RW, Ulrich AS: **Susceptibility corrections in solid-state NMR experiments with oriented membrane samples. Part I: applications.** *Journal of Magnetic Resonance* 2003, **164**:104-114.
70. Hallock K, Lee D, Omnaas J, Mosberg H, Ramamoorthy A: **Membrane composition determines pardaxin's mechanism of bilayer disruption.** *Biophys J* 83 2002, 1004-13.
71. Ludtke S, He K, Huang H: **Membrane thinning caused by magainin 2.** *Biochemistry* 1995, **34**:16764-16769.
72. Bechinger B: **Solid-state NMR investigations of interaction contributions that determine the alignment of helical polypeptides in biological membranes.** *FEBS Lett* 2001, **504**:161-165.
73. Zuckermann MJ, Heimburg T: **Insertion and pore formation driven by adsorption of proteins onto lipid bilayer membrane-water interfaces.** *Biophys J* 2001, **81**:2458-2472.
74. Matsuzaki K: **Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1376**:391-400.
75. Bechinger B, Zasloff M, Opella SJ: **Structure and Orientation of the Antibiotic Peptide Magainin in Membranes by Solid-State Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy.** *Protein Science* 1993, **2**:2077-2084.

Anhang

Inhalt

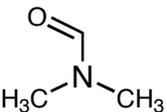
| | | |
|------------|--|-------------|
| 2 | <i>Synthese, Reinigung und Identifikation der ¹⁹F-markierten PGLa-Derivate</i> | II |
| 2.1 | Peptidsynthese | II |
| 2.1.1 | Benötigte Reagenzien | II |
| 2.1.2 | Starten des Syntheseapparates | V |
| 2.1.3 | Manuelle Kupplung der fluorogenen Aminosäure | VI |
| 2.1.4 | Abspaltung vom Harz | VI |
| 2.2 | Peptidaufreinigung mit RP-HPLC | VII |
| 2.2.1 | Vorbereitung | VII |
| 2.2.2 | Probenauftragung | VIII |
| 2.2.3 | Herunterfahren der HPLC | IX |
| 2.2.4 | Unterschiede analytische, präparative HPLC, TFA-frei Reinigung | IX |
| 2.3 | Enantiomerenbestimmung nach MARFEY | X |
| 2.4 | Peptididentifikation durch Massenspektrometrie | XI |
| 2.4.1 | Vorbereitung des Targets | XI |
| 2.4.2 | Messung am MALDI | XI |
| 3 | <i>Struktur und Aktivität der PGLa-Derivate</i> | XII |
| 3.1 | CD-Spektroskopie | XII |
| 3.1.1 | UV-Spektrometer | XII |
| 3.1.2 | Herstellung von Vesikeln | XII |
| 3.1.3 | Messung am CD-Spektrometer | XII |
| 3.1.4 | Auswertung der CD-Daten | XIII |
| 4 | <i>Charakterisierung der Orientierung des PGLa-Moleküls durch Festkörper-NMR</i> | XIV |
| 4.1 | Herstellung einer Festkörper-NMR-Probe | XIV |
| 4.2 | Herstellung einer NaF-Referenz-Probe | XVI |
| 4.3 | NMR-Spektrometer | XVII |
| 4.3.1 | Vorbereitung einer ¹⁹ F-Messung | XVII |
| 4.3.2 | Vorbereitung einer ¹ H-Messung | XVIII |
| 4.3.3 | Vorbereitung einer ³¹ P-Messung | XVIII |
| 4.3.4 | Wichtigste Befehle in VNMR | XIX |
| 4.3.5 | Referenzierung | XX |
| 4.3.6 | Tunen des Fluor-Verstärkers (Big Blue) | XXI |
| 4.3.7 | Neubooten des Spektrometers | XXI |
| 4.4 | Prozessierung der Spektren | XXI |
| 4.5 | Auswertung der Daten | XXII |
| 4.5.1 | Bauen eines idealen α -Helix Modells von PGLa | XXII |
| 4.5.2 | Das C ⁺⁺ -Programm Axis von Glaser | XXII |
| 4.5.3 | Anpassen der Helixposition auf normierten Wildtyp | XXIV |
| 4.5.4 | Das C ⁺⁺ -Programm Tilt von Glaser | XXIV |
| 4.5.5 | Mathematica-Notebook zur Orientierungsberechnung | XXV |

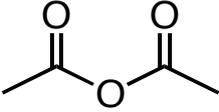
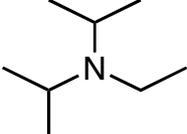
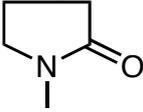
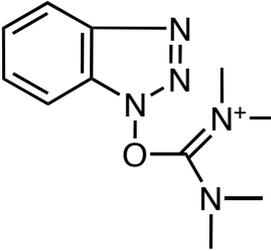
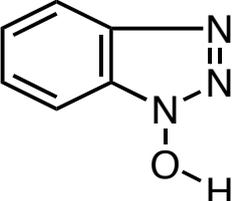
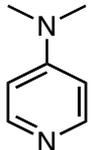
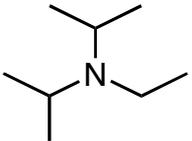
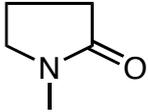
2 Synthese, Reinigung und Identifikation der ¹⁹F-markierten PGLa-Derivate

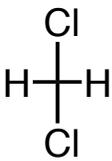
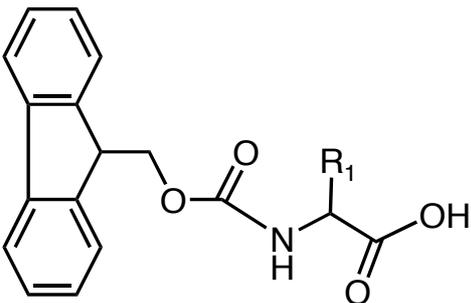
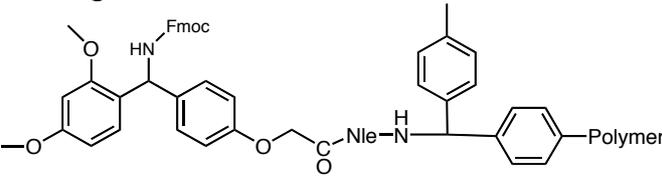
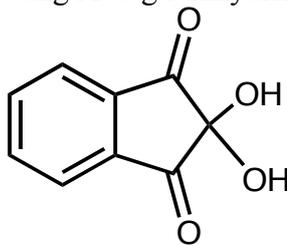
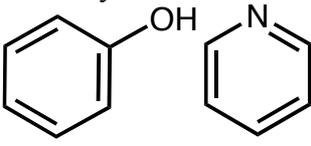
2.1 Peptidsynthese

2.1.1 Benötigte Reagenzien

| Fmoc-Aminosäuren | MW (Da) | Einwaage 250 µmol Umsatz mit 10x Überschuss (mg) |
|------------------|------------|---|
| A, Ala | 311,3 | 311,3 |
| R, Arg (Pbf) | 648,8 | 648,8 |
| N, Asn (Trt) | 596,7 | 596,7 |
| D, Asp (OtBu) | 411,5 | 411,5 |
| C, Cys (Trt) | 585,7 | 585,7 |
| E, Glu (OtBu) | 425,5 | 425,5 |
| Q, Gln (Trt) | 610,7 | 610,7 |
| G, Gly | 297,3 | 297,3 |
| H, His (Trt) | 619,7 | 619,7 |
| I, Ile | 353,4 | 353,4 |
| L, Leu | 353,4 | 353,4 |
| K, Lys (Boc) | 468,5 | 468,5 |
| M, Met | 371,5 | 371,5 |
| F, Phe | 387,4 | 387,4 |
| P, Pro | 337,4 | 337,4 |
| S, Ser (tBu) | 383,4 | 383,4 |
| T, Thr (tBu) | 397,5 | 397,5 |
| W, Trp | 426,5 | 426,5 |
| W, Trp (Boc) | 526,6 | 526,6 |
| Y, Tyr | 459,6 | 459,6 |
| V, Val | 339,4 | 339,4 |
| CF3-Phg | 441,4 | 441,4 |

| Reagenz (mit chemischen Formeln) | Bemerkung |
|---|--|
| DMF  <i>N,N</i> -Dimethyl-formamide | Lösungsmittel, unbedingt wasserfreie Qualität und Entgasung durch <ol style="list-style-type: none"> 1. Destillation 2. N₂-Strom 3. Hinzufügen von Molekularsieben |
| Piperidin  | 20% (v/v) Piperidin in DMF-Lösung für Deprotektion (Aufbewahrung in dunkler Flasche) |

| | |
|--|---|
| <p>Capping Solution: Acetanhydrid, DIEA in NMP</p>  <p>Acetanhydrid</p>  <p>Ethyl-diisopropyl-amine</p>  <p>1-Methyl-pyrrolidin-2-one</p> | <p>0,5 M Acetanhydrid, 0,125 M DIEA, 0,015 HOBt in NMP besetzt die freien NH₂-Gruppen des Harzes und verhindert die Synthese von Peptiden ohne korrekte C-terminale Aminosäure</p> |
| <p>(1) 0,5 M HBTU/0,45 M HOBt oder</p>   <p>HBTU: 2(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate</p>  <p>HOBt: 1-Hydroxy-Benzotriazol</p> <p>(2) 0,45 M HCTU 6-Cl HBTU</p> | <p>1. Aktivator in DMF-Lösung unbedingt frisch ansetzen (MW=379,3) pro Aminosäure-Cartridge 1 mmol (a) 0,5 M HBTU Lösung von 100 ml m=18,85 g dient Voraktivierung MW=153,1 (b) 0,45 M HOBt Lösung von 100 ml m=6,767 g 2. HCTU: 0,45 M in 100 ml m =18,61 g (MW=413,69)</p> |
| <p>DMAP</p>  <p>Dimethyl-pyridin-4-yl-amine</p> | <p>Katalysatorlösung 0,1 M in DMF</p> |
| <p>2M DIEA in 50 ml NMP</p>   <p>Ethyl-diisopropyl-amine 1-Methyl-pyrrolidin-2-one</p> | <p>Base: MW=129,24; d=0,75 Base im Kupplungsgemisch</p> |

| | |
|---|---|
| <p>MeOH</p> <p style="text-align: center;">$\text{H}_3\text{C}-\text{OH}$</p> | <p>Waschlösung</p> |
| <p>DCM</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">Dichloro-methane</p> | <p>Waschlösung</p> |
| <p>Fmoc-Aminosäure-Behälter mit Strichcode</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p>Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäure</p> | <p>Einwaage 1mmol</p> |
| <p>Harz (Rinkamide MBHA-Resin) mit Glaskügelchen</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p>Fmoc-Rinkamide</p> | <p>ermöglicht direkte Synthese von Carboxamid-Peptiden am C-Terminus, weiterentwickelter Rinkamide-Resin mit ausgezeichneten Quelleigenschaften Gewicht der Einwaage abhängig vom Umsatz-Maßstab: (a) 100 µmol → 161,2 mg oder (b) 403 für 250 µmol</p> |
| <p>Kaiser Testkit</p> <p>(1) Lösung A: 5 g Ninhydrin in 100 ml EtOH</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p>2,2-Dihydroxy-indan-1,3-dione</p> <p>(2) Lösung B: 80 g verflüssigtes Phenol in 20 ml EtOH + 2 ml 0,001 M wässrige KCN-Lösung auf 98 ml Pyridin</p> <p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">Phenol Pyridine</p> | <p>Qualitativer Schnelltest auf Gegenwart von freien Amino-Gruppen durch dunkelblaue Farbe aber: bestimmte entschützte Aminosäuren zeigen keine positive Reaktion z.B. Serin, Asparagin, Asparaginsäure und Prolin als sekundäre Aminosäure</p> |

| | |
|---|---|
| Spaltungs-Cocktail (4ml für 128 mg Harz) (1) MY-Reagent K 81,5 % TFA (Trifluoressigsäure) 5 % Thioanisol 5 % Phenol (Einwaage als Feststoff und anschließendes Schmelzen bei 110°C) 5 % H ₂ O 2,5 % EDT 1% TIS: 1 ml (2) MY TIS 93 % TFA 5% TIS 2 % H ₂ O | Auswahl der exakten nach jeweiligen AA im Peptid (Schema nach: Novabiochem® Katalog 1999 S. S53, Fig.47) EDT, TIS und Thioanisol dienen als "Scavenger" zum Abfangen von aus den Schutzgruppen hervorgegangenen kationischen Spezies, die sonst als Ziel der nukleophilen Gruppen von W, M, Y, C dienen |
| Ether , eiskalt | zum Fällen des Peptids, da meiste Peptide unlöslich |

2.1.2 Starten des Syntheseapparates

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Einwaage der Aminosäuren in vorgesehene Behälter und Einführung in Syntheseapparat |
| 2 | Herstellung der Lösungen (s.o.) |
| 3 | Vorbereitung des Reaktionsgefäßes (a) Einwaage des Harzes und zusätzlich Glaskügelchen (b) Lösung in NMP unter tropfenweiser Zugabe und weiter DCM zum Quellen des Harzes (c) Verschließen des Gefäßes mit Filter |
| 4 | Einsetzen des Reaktionsgefäßes in Syntheseapparat |
| 5 | Überprüfen des Abfall- und Lösungsmittelniveaus der Flaschen (1) Piperidin (2) Capping Solution (3) HBTU/HOBt (4) MeOH (5) 2M DIEA (6) DCM (7) NMP |
| 6 | Anschalten des N₂-Stroms: N ₂ -Flasche und Ventile am Syntheseapparat |
| 7 | Anschalten des angeschlossenen Computers Starte Software SynthAssistent |
| 8 | Einfügen des Teströhrchens mit ml-Skalierung zur Ausführung des Flusstestes Starte Flusstest durch Öffnen ABI Chemistry flow test file und folgende schrittweise Überprüfung der Lösungsmittel auf Arbeitsblatt |
| 9 | Send data to synthesizer |
| 10 | Eingabe der Sequenz und Speichern als Sequenzdatei |
| 11 | Konfigurieren (=Setup) eines Laufes mit dazugehörigen Waschprozeduren |
| 12 | Send data to synthesizer |
| 13 | Menü am Synthese-Display (a) Main Menu/ <u>Barcode yes</u> zur Erkennung des Strichcodes am Behälter (b) Main Menu/ <u>Cycle monitor Resinmth</u> : no, <u>Add/Hold hme</u> : no →continue |

| | |
|--|--|
| | (c) Start, wenn Dateiname des Laufes korrekt |
|--|--|

2.1.3 Manuelle Kupplung der fluorogenen Aminosäure

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Waschen und Quellen des Harzes mit entgastem DMF für 20' |
| 2 | Entschützung mit 3 ml 22% Piperidin in DMF unter N ₂ -Strom für 30' |
| 3 | Waschen mit entgastem DMF (~10ml) |
| 4 | <p>Kupplung mit DMF-gelöstem 2 eq.mol von (300 µmol)</p> <p>(a) 1:1,2 eq.mol Aminosäure (CF₃Phg m=137,2 mg)</p> <p>(b) 1: 1,2 eq.mol HOBT (m=40,5 mg) + 1: 2 eq.mol HBTU (m=113,8 mg) oder nur 1,14 eq.mol HCTU MW=413,69 g/mol</p> <p>(c) 2:2-4 eq.mol DIEA (m=77,6 mg →d=0,75 V=103,4 µl) oder (Collidin) als Base</p> <p>Zugabe von entgaster DMF Lösung (3 ml) →Schließen des Reaktionsgefäßes nach dem Auslaufen der alten Waschlösung (Verfolgen durch Färbung möglich)</p> <p>Prozess der Bindungsknüpfung 3-5h abhängig von Aminosäuresequenz</p> <p>- zur Wiederverwertung der Fluor-Aminosäure Aufsammeln des DMF Durchlaufs</p> |
| 5 | <p>Kaiser Test nach Test Kit zur Detektion freier NH₂-Gruppen</p> <p>3xWaschen mit DMF und Zentrifugation</p> <p>(a) 5 Tropfen Lösung A</p> <p>(b) 5 Tropfen Lösung B</p> <p>(c) wenig Aliquot vom Harz</p> <p>Vortex und Zentrifugation →4-6' Inkubation bei 110°C</p> <p>→ Blaue Färbung deutet auf Reaktion mit freien NH₂-Gruppen hin</p> |
| 6 | Nach befriedigender Färbung Waschen mit DMF |
| 7 | Rücktransfer des Harzes in Reaktionsgefäß für die Synthese von Teil 2 mit DCM |

2.1.4 Abspaltung vom Harz

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Trocknen des Harzes im Vakuum für mehrere Stunden |
| 2 | Frische Herstellung des Spaltungs-Cocktails |
| 3 | Spaltreaktion bei RT und Dauer ist Sequenz-abhängig z.B. 5 h bei gelegentlichem Rühren |
| 4 | <p>Abtrennung der Spalllösung vom Harz durch Filtration (Trichter oder Pipettenspitze mit gefüllter Glaswolle)</p> <p>Waschen 3x 0,5 ml TFA</p> |
| 5 | Verdampfen des TFA unter dem Abzug! mit N ₂ Strom und Reduktion des Volumens auf wenige ml (Rest verbleibt als ölarartige viskose Flüssigkeit) |
| 6 | Präzipitation des Peptides durch Hinzufügen von eiskaltem Ether (für vollständiges Fällen über Nacht bei -20°C) |
| 7 | Waschen und Zentrifugation des weißen Präzipitats 2x mit Ether und Überstand evtl. nochmals fällen |
| 8 | Trocknen des Präzipitats im N ₂ -Strom oder Vakuum |

2.2 Peptidaufreinigung mit RP-HPLC

2.2.1 Vorbereitung

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | <p>(a) Reinigung inkl. TFA <u>A</u> 10 % Acetonitril (MeCN); 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in wässriger Lösung <u>B</u> 100 % Acetonitril; 0,1 % TFA <u>Trunc</u> MeOH</p> <p>(b) TFA-frei Reinigung: <u>A</u> 10 % MeCN, 5 mM HCl <u>B</u> 100 % MeCN</p> <p style="text-align: right;">H₂O 890 ml MeCN 100 ml 10 % TFA 10 ml H₂O 895 ml MeCN 100 ml 1N HCl 5 ml</p> |
| 2 | Entgasung Lösung A und B mit Wasserstrahlpumpe im Ultraschallbad Anschließen der Flaschen an HPLC-Schläuche (kurzes Aufdrehen des Argonhahnes → Sprudeln in Flasche A) |
| 3 | Leeren der Abfalls: 1. Flasche am Ausgang, 2. Röhrchen hinter der Ladeschleife |
| 4 | Anschalten der HPLC mit braunem Mehrfachstecker |
| 5 | Booten des Computer auf Win98 (Verlassen von Linux durch Exit → Strg+Alt+Del Login: hplc Passwd: hplc |
| 6 | Temperieren der Säule im Wasserbad bei gewünschter Temperatur |
| 7 | Starten der BORWIN-Software Login: casa Passwd: Erscheinen des Status-Fensters der Pumpen (2 werden erkannt, die erste wird kontrolliert): BORWIN_PDA Status-Balken ist rot für "waiting" |
| 8 | Spülen der Pumpe A Säule in MeOH: Wechseln des geöffneten Trunc-Schlauches in MeOH-Flasche, Umlegen des Schalters für Pumpe A → Trunc Öffnen des Ventils von Pumpe A Anschalten der Pumpe A manuell durch Knöpfe: <u>Pump</u> → <u>Edit</u> Flowrate mindestens 10ml/min für ca. 2' Stoppen der Pumpe durch <u>Pump</u> und Schließen des Ventils Pumpe A |
| 9 | Starten des Programms zur Umstellung der Säule von MeOH auf Lösung B 100 % MeCN/0,1 % TFA Run → Start → Method: C0_100 für 5' (Angabe der Konzentration gelten für Lösung B) manuelles Starten der Pumpe mit Schalter nötig Stop der Pumpe durch Control → Stop Pump |
| 10 | Spülen der Pumpe A mit Lösung A Umlegen des Schalters Trunc → Bottle A Öffnen des Ventils von Pumpe A Anschalten der Pumpe A manuell durch Knöpfe: <u>Pump</u> → <u>Edit</u> Flowrate mindestens 10ml/min für ca. 2' Stoppen der Pumpe durch <u>Pump</u> und Schließen des Ventils Pumpe A |
| 11 | Starten des Programms zur Umstellung der Säule von Lösung B 100 % MeCN/0,1 % TFA auf Lösung A 10 % MeCN/0,1 % TFA Run → Start → Method: C100_0 für 5' (Angabe der Konzentrationen gelten für Lösung B) |

| | |
|----|--|
| | manuelles Starten der Pumpe mit Schalter nötig |
| 12 | Entlüftung der Pumpe Stop der Pumpen, Öffnen der Ventile Herrausaugen der Luft mit Spritze von Abfallschlauch und A/B durch Unterdruck Schließen der Ventile |
| 13 | Temperaturüberprüfung |

2.2.2 Probenauftragung

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Lösen der Probe in Lösung A Zentrifugation und Einschätzung der Lösung nach Klarheit →sonst µFilter |
| 2 | Starten des Programms zur Gradientenelution der Säule von Lösung A 10 % MeCN/0,1 % TFA auf Lösung B 100 % MeCN/0,1 % TFA Run →Start →Methode, Dateiname, Zeit RUN kurze Zeit laufen lassen, bis korrekter Druck aufgebaut ist |
| 3 | Spülen der Ladeschleife mit >20 µl analytisch bzw. >1 ml Lösung A präparativ |
| 4 | Auftragen der Probe auf Ladeschleife mit mehr als 1 ml Lösung A Schalter der Ladeschleife auf Load: Injektion von 100-500 µl Probe Umlegen des Schalters auf Inject (Pumpe beginnt) Zur Reproduzierbarkeit Schalter nach gleicher Zeit zurücklegen |
| 5 | Sammeln der Probe: Aufwecken des Probensammlers aus Standby Modus Einstellung auf 0,1 min/tube Programmierung der Probensammlung bei <u>Control Method</u> FRAC=ON 9.0 STWEI=ON 9.05 STWEI=OFF 16.0 STOP=ON 16.05 STOP=OFF 18.0 FRAC=OFF |
| 6 | Zurücklegen des Schalters nach 1' zur höheren Reproduzierbarkeit |

2.2.3 Herunterfahren der HPLC

Vorgehensweise umgekehrt wie Vorbereitung zur Aufbewahrung der Säule in MeOH

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Starten des Programms zur Umstellung der Säule von Lösung A 10 % MeCN/0,1 % TFA auf Lösung B 100 % MeCN/0,1 % TFA Run → Start → Method: C0_100 für 5' (Angabe der Konzentrationen gelten für Lösung B) manuelles Starten der Pumpe mit Schalter nötig |
| 2 | Spülen der Pumpe A mit MeOH Umlegen des Schalters Bottle A → Trunc Öffnen des Ventils von Pumpe A Anschalten der Pumpe A manuell durch Knöpfe: <u>Pump</u> → <u>Edit</u> Flowrate mindestens 10ml/min für ca. 2' Stoppen der Pumpe durch <u>Pump</u> und Schließen des Ventils Pumpe A |
| 3 | Starten des Programms zur Umstellung der Säule von Lösung B 100 % MeCN/0,1 % TFA auf MeOH Run → Start → Method: C100_0 für 5' (Angabe der Konzentrationen gelten für Lösung B) manuelles Starten der Pumpe mit Schalter nötig |
| 4 | Beenden BORWIN-Software Herunterfahren Win98 |
| 5 | Ausschalten der Mehrfachstecker: 1.Computer 2. HPLC |

2.2.4 Unterschiede analytische, präparative HPLC, TFA-frei Reinigung

| | Analytisch | Semipräparativ | Präparativ |
|--|-------------------|---------------------------------|----------------------|
| Schläuche | dünn (blau) | dünn (blau) | dick |
| Säule [mm] C18 Vydac Partikelgröße 5 µm | 2: 4.5x250mm/dünn | 4:10x250mm/mittel | 10:22x250mm/dick |
| Messzelle | 1x | 10x weniger sensitiv oder 1x | 10x weniger sensitiv |
| Flussraten [ml/min] | 1.5/niedrig | 6/mittel | 25/hoch |
| Methode | c_... | p_... | e_... |
| Druck [kg/cm ²] | 120 | 120 | 120 |

2.3 Enantiomerenbestimmung nach MARFEY

| Reagenz | Bemerkung |
|--|---|
| 6 M HCl | Säure-katalysierte Hydrolyse von Peptiden |
| 0,5 M NaHCO ₃ | Puffer |
| Marfeys Reagenz 1-Fluoro-2,4-dinitro- 5-L-alaninamid | Reaktion mit D- bzw. L-AA ergeben 2 Produkte: DL und LL. LL hat durch intramolekulare H-Brücken-Wechselwirkung kürzere Retentionszeiten auf einer RP-HPLC |
| 1 M HCl | Stop der Reaktion |

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Einwaage trockenes Peptid m=0,1 mg |
| 2 | Aufnahme in 0,5 ml 6 M HCl Inkubation über Nacht (16-24h) bei 105°C |
| 3 | Einfrieren (-80 °C) Lyophilisation in Vakuumzentrifuge |
| 4 | + 25 µl 0,5 M NaCO ₃ + 50 µl 1% Marfeys Reagenz (m-mg/v-µl) → 0,5 mg in 50 µl Aceton Inkubation 90' bei 40°C |
| 5 | + 14 µl 1M HCl |
| 6 | Vorbereitung der Probe für RP-HPLC + 0,5 ml Lösung A = 89,9 % H ₂ O 10 % Acetonitril 0,1 % TFA |
| 7 | RP-HPLC bei 40°C Injektion von 20 µl Probe Methode: Marfey_rwg7.MTH/ Marfey_rwg8.MTH/ Marfey_rwg9.MTH Detektion von Marfey-derivatisierten Aminosäuren bei 415 nm |

2.4 Peptididentifikation durch Massenspektrometrie

2.4.1 Vorbereitung des Targets

| Reagenz | Bemerkung |
|--|--|
| EtOH oder i-PrOH | Säuberung des Targets |
| Ameisensäure | Säuberung des Targets |
| CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) | Matrix für Proteine und Peptide mit MW<10Kda |
| MeCN | |
| H ₂ O | |

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Säuberung des Targets mit EtOH or i-PrOH und Ameisensäure (80:20) für 5' im Ultraschallbad |
| 2 | Waschen mit bidest. H ₂ O |
| 3 | Anheften des Magnets mit Schraube |
| 4 | Trocknen des Wassers in Zwischenraum zwischen Magnet und Target (Test auf Geräusch beim Schütteln) |
| 5 | Herstellung der Matrix: (a) m=10 mg CHCA + 470 μ l H ₂ O (b) 30 μ l 10 % TFA (c) 500 μ l MeCN Vortex mindestens 1 min mit anschließender Zentrifugation bis Matrix vollständig aufgelöst |
| 6 | Pipettieren von 0,5 μl Basis auf Matrix auf Target |
| 7 | Mischen von 5 μl Proben-Aliquot mit Matrix |
| 8 | Hinzufügen von 1 μl auf Target |
| 9 | Verdunsten der Probe |

2.4.2 Messung am MALDI

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Einführen des Targets durch Öffnen des Hebels bis Probe „in“-Stellung und Anlegen des Vakuums |
| 2 | Make directory für Messungen /export/home/data/Gast/Glaser |
| 3 | Schießen auf Target mit Massenergebnissen |
| 4 | Abspeichern der Daten |

3 Struktur und Aktivität der PGLa-Derivate

3.1 CD-Spektroskopie

3.1.1 UV-Spektrometer

| Materialien | Bemerkung |
|---------------------------|---|
| 2 Küvetten | 1. für lösliche Probe 2. leer bzw. H ₂ O für Basislinie |
| Spektrometer +Computer | Aufnahme des Absorptionsspektrums |

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Einschalten des Spektrometers und Computers |
| 2 | Automatische Erkennung des Spektrometers bzw. Initialisierung über Lambda-Icon |
| 3 | Einlegen der Küvetten |
| 4 | Definition der Methode: (a) RWG_P mit Bereich von 340-220 nm (b) Scan Speed: 60 nm/min, Smooth 2 nm (c) Sample: <u>Result filename</u> Festlegen der Output-Datei |
| 5 | Autozero/Eichung des Gerätes mit zwei H ₂ O-Küvetten |
| 6 | Aufnahme des Spektrums mit Probe und Ausdrucken... dient vor allem als Eichung für spätere CD-Auswertung |

3.1.2 Herstellung von Vesikeln

| Material | Bemerkung |
|-------------------|---|
| Peptid | lyophilisiert |
| Lipid | z.B. DMPC: MW=677,94 |
| Lösungsmittel | MeOH/H ₂ O/CH ₃ Cl |
| Puffer | Phosphatpuffer 1 mM pH=7 mit geringster UV-Absorption |
| Ultraschall-Gerät | zur Erzeugung von Vesikeln |

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Einwaage Lipid DMPG/DMPC-Mischung |
| 2 | Eindampfen der CHCl ₃ /MeOH (33%+66%) Lösung im Glasröhrchen |
| 3 | Aufnahme im Phosphatpuffer |
| 4 | Erwärmung des Gemischs über Phasenübergang im Wasserbad (optional vom Lipid abhängig, da während des US →Erwärmung) |
| 5 | Ultraschall Spitze einführen und Ultraschall anwenden, so dass Lösung selbst nicht zu heiß bzw. rausspritzt (Duty-Cycle Dauer der Pulse 20-30 sec) bis Lösung klar und noch doppelte Zeitdauer |
| 6 | Vesikel sind mehrere Tage im Kühlschrank haltbar |

3.1.3 Messung am CD-Spektrometer

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Öffnen der N ₂ -Spülung mind. 15 min vor Beginn des Zündens der Xe-Lampe |
| 2 | Einschalten der Messtemperatur z.B. 35 °C |

| | |
|----|---|
| 3 | Öffnen des Wasserhahns für Wasserkühlung |
| 4 | Umlegen der Xe-Lampenschaltung (linker Kippschalter) mit anschließender Zündung (muss möglicherweise wiederholt werden) |
| 5 | Einschalten des Spektrometers (rechter Kippschalter) |
| 6 | Einschalten des Computers inkl. Monitor |
| 7 | Starten von Windows 3.11 |
| 8 | Starten des Jasco-CD-Hardware-Managers - Open spectrometer: start-up routine running... |
| 9 | Action: Measurement |
| 10 | Standard Analysis: Parameters: für Publikation: Step resolution: 0.5 nm Scan speed: 20 nm/min Accumulation: 5 Response: 4 sec Band width: 2.0 nm Sensitivity: 20 mdeg schnelle Messung: Accumulation 2x mit response 8 sec |
| 11 | Start der Messung mit Measurement/Execute |

3.1.4 Auswertung der CD-Daten

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Speichern der gemessenen Daten als ASCII-Text-Datei |
| 2 | Umschalten auf US-Zahlensystem mit . Dezimalstellen |
| 3 | Kopieren der Rohdaten in Tabelle (nur erste Spalte in mdeg, zweite gibt lediglich Spannung des Sekundärelektrodenelementes an) |
| 4 | Abziehen der Leerwerte Küvette ohne Peptid (inkl. Vesikel und Puffer) |
| 5 | Umrechnen der Werte in molare dichroische Absorption |
| 6 | Eichen der Werte gegeneinander mit Hilfe der UV-Werte |
| 7 | Speichern einer Textdatei mit Tab-getrennten Spalten für jeweilige Probe 260 0.003 259 0.006 258 0.015 etc. |
| 8 | Starten der Auswertesoftware (a) CDDATA bereitet die Daten in einer INPUT Datei für die anschließende Auswertung vor: Erzeugen einer Input-Datei, Angabe des Formats, Start und Ende der Wellenlänge, keine weitere Umrechnung in nötig, Auswahl der vorgeschlagenen Referenzproteine (b) SELCON3.EXE (c) Continnl.exe (d) CDSSTR.EXE |

4 Charakterisierung der Orientierung des PGLa-Moleküls durch Festkörper-NMR

4.1 Herstellung einer Festkörper-NMR-Probe

| Material | Bemerkung |
|--|---|
| Peptid | lyophilisiert |
| Lipid | z.B. DMPC: MW=677,94 |
| Lösungsmittel | MeOH/H ₂ O/CH ₃ Cl |
| Puffer optional | z.B. Tris/MES 250 mM, HEPES 300 mM physiologisch relevant: 100-200mM Endkonzentration in hydratisierter Probe <ul style="list-style-type: none"> - Aufkonzentration im Vakuum beachten! Eingabe des Puffers, 1:1 Gewicht Lipid zu H₂O bleiben gebunden → Aufkonzentration des Puffers - z.B. 7 mg Lipid → 7 mg H₂O → 7 µl H₂O, anfängliche Zugabe von 100 µl Puffer d.h. Aufkonzentration von 14:1 d.h. Aufnahme des Peptids in 100 µl 10 mM Puffer, resultiert in 140 mM Puffer! |
| halbe 50-ml-Röhrchen | optimale Trocknung der Glasplättchen |
| Glasplättchen | max. Stapel von 18 pro Probe (Deckgläschen 18 x 7,5 mm) |
| Pinzette | Handhabung der Glasplättchen |
| Petri-Schale | Transport und Trocknung der Glasplättchen |
| Parafilm/Frischhaltefolie | Einwickeln der Probe zur Aufrechterhaltung der Hydratisierung |
| Exsikkator | Aufbewahrung der Proben in Vakuum bzw. Feuchtigkeitsatmosphäre |
| K ₂ SO ₄ -Lösung | zur Erzeugung einer 98%igen Luftfeuchtigkeit für die Hydratisierung der Probe |

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Reinigung der Glasplättchen in 2 Bädern EtOH oder Isopropanol unter Sicherheitswerkbank (optional) |
| 2 | Trocknen der Glasplättchen im Exsikkator unter Vakuum (3-4 h) |
| 3 | Einwaage Lipid und Peptid unter Beachtung des Molaritätsverhältnisses |
| 4 | Lösen bekannter Peptidmenge in LM z.B. 70/30=MeOH/H ₂ O siehe „NMR-Probenberechnung.xls“ |
| 5 | Auftragen von 20-30 µl Lösung auf Glasplättchen pro Probe unter Sicherheitswerkbank (max. 17+1) 0,3-3mg Lipid/Plättchen Trocknen der Proben bis Lösungsmittel vollkommen verdunstet |
| 6 | Trocknen der Proben im Exsikkator unter Vakuum (3-4h) |
| 7 | Optionale Zugabe 1 µl Puffer pro Glasplättchen |
| 8 | Stapelung der von n-Glasplättchen mit Probe und n+1 als Deckel |
| 9 | Hydratisierung der Lipide in 98%iger Feuchtigkeitsatmosphäre bei 50°C von K ₂ SO ₄ -übersättigter Lösung in einem Exsikkator für mind. 2 d nicht mehr als 4 d |

| | |
|----|--|
| 10 | Einwickeln des Stapels (optimal mit Handschuhen) Dehnen des Parafilms auf Petrischale, Herausschneiden des Stückes und 4faches Umwickeln und 3fach mit Frischhaltefolie Achtung unbedingt TFA-frei arbeiten (frische Eppis und Folie!) |
| 11 | Nach Hydratisieren und Einpacken und Einfrieren bei -20 °C mit anschließendem Messen ohne Probleme möglich |

4.2 Herstellung einer NaF-Referenz-Probe

| Material | Bemerkung |
|-----------------------------------|---|
| Heizplatte | Erhitzen des Klebers bis ca. 75 °C notwendig |
| 2-Komponenten Kleber: Epoxid-Harz | UHU [®] „plus endfest 300“ und „plus sofortfest“ |
| Glasschneider, Pinzette | Handhabung |
| Bunsen-Brenner | |
| Glasstab (5 mm Durchmesser) | Zur Herstellung von sehr dünnen Glasstäbchen mit Durchmesser 1 mm über der Bunsen-Flamme |
| Referenz-Lösung | 1 M NaF, 0,05% NaN ₃ , 10 mM Phosphat-Puffer NaN ₃ als bakterizider Zusatz |

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Reinigung der Glasplättchen in 2 Bädern EtOH oder i-PrOH unter Sicherheitswerkbank (optional) |
| 2 | Trocknen der Glasplättchen im Exsikkator unter Vakuum (3-4 h) |
| 3 | Ziehen von ca. 1mm dünnen Glasstäbchen aus 5 mm Stäben über Bunsen-Brenner |
| 4 | Schneiden von dünnen Glasstäbchen auf solche Länge, dass sie als Barriere entlang der Enden der Glasplättchen dienen |
| 5 | Vorbereitung des 2-Komponenten-Klebers (50:50) |
| 6 | Auftragen des Klebers auf vorbereitete Glasstäbchen |
| 7 | Kurzes Schwenken der Stäbchen auf Alu-Folie auf Heizplatte, sorgt für eine gleichmäßige Verteilung |
| 8 | Aufbau der Glasstäbchen-Barrieren Bedecken der ersten mit zweiten Deck-Glasplättchen (möglichst dicht verschließen, damit Container die Referenz-Lösung aufnehmen kann) |
| 9 | Trocknen des Klebers ca. 1d |
| 10 | Befüllen des getrockneten Containers von offener Stelle (max 50 µl) Achtung Luftblasen |
| 11 | Schließen der Taschen mit sofortfestem Kleber und eingeschmierten Glasstäbchen |
| 12 | Trocken und Festigung ca. 1 Woche |
| 13 | Letzte Anwendung von Kleber zur Festigung, evtl. erneutes Befüllen und Schließen der Container |
| 14 | Markierung des Flüssigkeitsniveaus zur Überwachung der Austrocknung |

4.3 NMR-Spektrometer

4.3.1 Vorbereitung einer ^{19}F -Messung

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Lade altes Experiment oder kopiere altes in neues |
| 2 | <code>amptype='bbl'</code> Umschalten auf Fluor-Verstärker <code>config</code> <code>masvt='n'</code> (Soerensen Verstärker aus) |
| 3 | Deaktiviere Temperaturkontrolle mit <code>temp='n' su</code> |
| 4 | Ausschalten VARIAN-Verstärker |
| 5 | Entfernen der Kabel von Probenkopf und Schrauben, Herausgleiten des Probenkopfes |
| 6 | Wechseln von Probe oder Probenkopf und anschließendes Einsetzen des Probenkopfes unter korrektem Anschließen der Kabel <ul style="list-style-type: none"> · Anschließen des Fluor-Kabels vom Tune-Interface über Filter · Anschließen des Entkopplungs-1H-Kabels vom Filter · Anschließen der Temperatursteuerung · Anschließen der Temperaturvorheizung über Umluft und Luftspülung |
| 7 | Reset der Hardware: <code>sethw('vt','reset')</code> |
| 8 | Einstellen der gewünschten Temperatur: <code>temp=T su</code> <ul style="list-style-type: none"> · bei Temperaturserie höchstens 5 °C Schritte programmieren · Temperatur beim Tunen in der Mitte des zu messenden Temperaturbereiches |
| 9 | Tuning und Matching des eingebauten Probenkopfes ^{19}F Tune <ul style="list-style-type: none"> · Entfernen des ^{19}F-Pulsekabels während des Tunens! · Umstecken der Stecker von BigBlue in Ausgangsposition: Entfernen J297 von BigBlue, stecke J298 → J297, J298 bleibt lose · ^{19}F: Verbindung zum Filter lösen und an Input Tune Interface verbinden → in J5321, außerdem Tune OUTPUT J5302 → TUNE UT J5323 · Lösen der 1H-Verbindung zur Quelle (pulst während des Tuning) · <code>qtune</code>: Anpassen der Kurve auf Minimum mit Hilfe der Tuning und Matching-Schrauben am Probenkopf → EXIT button verlässt qtune-Program · Verbindungen wiederherstellen 1H-Entkopplungs-Tune <ul style="list-style-type: none"> · 1H: Verbindung zum Filter lösen und an Input Tune Interface verbinden → in J5321, außerdem Tune OUTPUT J5302 → TUNE UT J5323 · <code>qtune</code>: Anpassen der Kurve auf Minimum mit Hilfe der Tuning und Matching-Schrauben am Probenkopf → EXIT button verlässt qtune-Program · Verbindungen wiederherstellen →Stecker vom BigBlue auf ^{19}F Pulse - ^{19}F Pulse INPUT |
| 10 | Anschalten VARIAN-Verstärker HI-Band auf HI-Power LO-Band auf LO-Power |

| | |
|----|--|
| 11 | Einstellen der Parameter und Starte Experiment mit go |
|----|--|

4.3.2 Vorbereitung einer ¹H-Messung

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Lade altes Experiment oder kopiere altes in neues |
| 2 | <u>amptype='aal'</u> Umschalten auf VARIAN-Verstärker <u>config</u> <u>masvt='n'</u> (Soerensen Verstärker aus) |
| 3 | Deaktiviere Tempaturkontrolle mit <u>temp='n'</u> su |
| 4 | Ausschalten VARIAN-Verstärker |
| 5 | Entfernen der Kabel von Probenkopf und Schrauben, Herausgleiten des Probenkopfes |
| 6 | Wechseln von Probe oder Probenkopf und anschließendes Einsetzen des Probenkopfes unter korrektem Anschließen der Kabel <ul style="list-style-type: none"> · Anschließen des 1H-Kabels vom Filter · Anschließen der Temperatursteuerung · Anschließen der Temperaturvorheizung über Umluft und Luftspülung |
| 7 | Reset der Hardware: <u>sethw('vt','reset')</u> |
| 8 | Einstellen der gewünschten Temperatur: <u>temp=T</u> su <ul style="list-style-type: none"> · bei Temperaturserie höchstens 5 °C Schritte programmieren · Temperatur beim Tunen in der Mitte des zu messenden Temperaturbereiches |
| 9 | Tuning und Matching des eingebauten Probenkopfes 1H-Tune <ul style="list-style-type: none"> · 1H: Verbindung zum Filter lösen und an Input Tune Interface verbinden → in J5321, außerdem Tune OUTPUT J5302 →TUNE UT J5323 · <u>qtune</u>: Anpassen der Kurve auf Minimum mit Hilfe der Tuning und Matching-Schrauben am Probenkopf →EXIT button verlässt qtune-Program · Verbindungen wiederherstellen |
| 10 | Eintreffender 1H-Pulse über Verlängerung in INPUT Interface |
| 11 | Anschalten VARIAN-Verstärker HI-Band auf HI-Power LO-Band auf LO-Power |
| 12 | Einstellen der Parameter und Starte Experiment mit go |

4.3.3 Vorbereitung einer ³¹P-Messung

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Lade altes Experiment oder kopiere altes in neues |
| 2 | <u>amptype='aal'</u> Umschalten auf VARIAN-Verstärker <u>config</u> <u>masvt='n'</u> (Soerensen Verstärker aus) |
| 3 | Deaktiviere Tempaturkontrolle mit <u>temp='n'</u> su |
| 4 | Ausschalten VARIAN-Verstärker |
| 5 | Entfernen der Kabel von Probenkopf und Schrauben, Herausgleiten des Probenkopfes |

| | |
|----|---|
| 6 | Wechseln von Probe oder 31P-Probenkopf! und anschließendes Einsetzen des Probenkopfes unter korrektem Anschließen der Kabel <ul style="list-style-type: none"> · Anschließen des Entkopplungs-1H-Kabels vom Filter · 31P Input geht über Kanal 2 exit J5311 LR208 low pass filter · Anschließen der Temperatursteuerung |
| 7 | Reset der Hardware: <code>sethw('vt','reset')</code> |
| 8 | Einstellen der gewünschten Temperatur: <code>temp=T su</code> <ul style="list-style-type: none"> · bei Temperaturserie höchstens 5 °C Schritte programmieren · Temperatur beim Tunen in der Mitte des zu messenden Temperaturbereiches |
| 9 | Tuning und Matching des eingebauten Probenkopfes 31P-Tune <ul style="list-style-type: none"> · 31P: Verbindung zum Filter lösen und an Input Tune Interface verbinden → exit J5311 zum Tune Interface · <code>qtune</code>: Anpassen der Kurve auf Minimum mit Hilfe der Tuning und Matching-Schrauben am Probenkopf →EXIT button verlässt qtune-Program 1H-Tune <ul style="list-style-type: none"> · 1H: Verbindung zum Filter lösen und an Input Tune Interface verbinden → in J5321, außerdem Tune OUTPUT J5302 →TUNE UT J5323 · <code>qtune</code>: Anpassen der Kurve auf Minimum mit Hilfe der Tuning und Matching-Schrauben am Probenkopf →EXIT button verlässt qtune-Program · Verbindungen wiederherstellen |
| 10 | Anschalten VARIAN-Verstärker 2x Hi Power |
| 11 | Einstellen der Parameter und Starte Experiment mit <code>go</code> |

4.3.4 Wichtigste Befehle in VNMR

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Befehle zur Navigation zwischen den einzelnen Experimenten <code>cexp</code> create experiment <code>jexp</code> join experiment <code>cd('')</code> change directory <code>rt('filename')</code> retrieve experiment <code>svf('filename')</code> save file <code>dq</code> display experiment data <code>da</code> display array |
| 2 | Wichtigste Parameter für Experimente <code>temp</code> temperature <code>nt</code> number of transients <code>tpwr</code> transmitter power <code>dm='yyy'</code> decoupling on <code>dpwr</code> decoupling power <code>dps</code> display pulse sequence <code>pw</code> pulse width <code>seqfil='filename'</code> load pulse sequence <code>rts('shimfile')</code> retrieve shims <code>load='y'</code> übernimmt alle wichtigen Parameter (Pulssequenz, Shims) aus geladenem Experiment |

| | |
|---|--|
| 3 | <p>Prozessierung der Daten</p> <p>- commands:</p> <p><u>df</u> display fid <u>dfsh</u> display fids stacked horizontally <u>ft</u> Fourier Transform <u>wft</u> Weight Fourier Transform <u>ds</u> display spectrum <u>dscale</u> display scale (useful macros w3...) <u>f</u> displays full width of data plot <u>full</u> displays chosen data on full width of screen <u>dc</u> drift correction <u>res</u> moves cursor to maximum peak <u>dpf</u> display peak frequencies - variables: require certain values <u>sp</u> spectral width <u>wp</u> width of plot <u>cr</u> cursor position <u>lsfid</u> legt die Anzahl der Datenpunkte fest, die am Anfang in Fourier Transform eingehen <u>rp</u> phase correction 1st order <u>lp</u> phase correction 2nd order</p> |
| 4 | <p>Datenanalyse und Ausdrucken der Spektren</p> <p>Addition von FIDs <u>clradd</u> clears add memory which is always stored in exp5 <u>add(1)</u> adds certain fid <u>adm(2,4)</u> administer macro (starting block, number of blocks)</p> <p>Messen von relativen Integralen unter dem Spektrum <u>cz</u> clear memory from lines, <u>ds</u> <u>z</u> determines the beginning of the area to be measured interactively <u>z</u> etc. <u>dpirn</u> yields the ratio of determined areas</p> <p>Messen von numerischen Integralen</p> <ul style="list-style-type: none"> · Herausschneiden des interessanten Bereiches · <u>is=100</u> Normierung des Integralwertes · <u>integ</u> gibt Wert aus <p><u>vs</u> vertical shift <u>vp</u> vertical position - printing commands <u>pl</u> plot spectrum <u>ppf</u> print peak frequencies <u>p scale</u> prints scale <u>pap</u> print all parameters <u>page</u> sends page to printer <u>page('file.ps')</u> to Postscript file <u>page('clear')</u> clears printer memory</p> |

4.3.5 Referenzierung

4.3.5.1 NaF für Proben mit weniger als 12 Glasplättchen

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Laden eines Referenzspektrums und Aufnahme des Spektrum <u>svf('')</u> |
| 2 | weight Fourier transform <u>wft</u> |
| 3 | Phasierung interaktiv |
| 4 | res bewegt Cursor auf Max. Peak z.B. -116.35 |
| 5 | Festlegen des Referenz-Peaks für 0°: -120.8ppm: <u>rl(-120.8p)</u>; 90°: <u>rl(-120.1p)</u> |
| 6 | <u>f full sp? tof?</u> Aufschreiben des sp-Wertes |
| 7 | Gehe zu Peptidspektrum <u>jexp(x)</u> |
| 8 | <u>sp? tof?</u> Lege sp fest auf sp-Wert des Referenzspektrums <u>cr=0 rl(difference value)</u> Achtung tof <u>sp=-298365 + tof + shift*470.325</u> |

4.3.5.2 1H für Proben mit mehr als 12 Glasplättchen

| Step | Procedure |
|------|--|
| 1 | Aufnahme 1H Spektrum |
| 2 | Phasierung und Bestimmung der beiden Peaks (<u>dc res</u>): $(6.04 - I-II)/2 = \text{shift}$ |
| 3 | 19F-Ausgangsspektrum muss um Shift verschoben werden in ppm $\text{cr}=0$ $\text{rl}(\text{difference value})$ oder folgender Gleichung gehorchen Achtung $\text{tof} = -298365 + \text{tof} + \text{shift} * 470.325$ Verschiebung um Differenz siehe NaF-Referenzierung |

4.3.5.3 Pulslängenbestimmung

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Laden eines Referenzexperiments |
| 2 | Array von Pulslängen: $\text{pw}=2.4, 2.6, 2.8, 5.2, 5.5, 5.8, 10.2, 10.5, 10.8, 11.2$ veranschlagter 90° Wert zur korrekten Phasenbestimmung veranschlagter 180° Wert für Nulldurchgang weiterer 360° value zur Bestimmung einer Pulsflanke (nachdem Puls Signal gesendet wird, verstricht endliche Zeit bis Puls aktiv wird) |
| 3 | <u>dps, nt=2</u> |
| 4 | Bestimmung der Zeit des Nulldurchgangs entspricht $\text{pw}/2$ (Achtung Flanke, Vergleiche mit 90° und 360° Werten) |

4.3.6 Tunen des Fluor-Verstärkers (Big Blue)

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Verbinden des 19F-Pulskabels in koaxialen Attenuator |
| 2 | Laden des Referenzexperiments $\text{cd}('/\text{homefids}/\text{RWG}/\text{REF_ss}')$ → Biglue_setup → go |
| 3 | Einstellung für (a) $\text{tpwr}=56 \rightarrow 600$ W mit Drehknöpfen auf Leistung tunen (b) $\text{tpwr}=54 \rightarrow 350$ W |

4.3.7 Neubooten des Spektrometers

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Hardware-Reboot mit Hilfe der Reset-Taste Warten bis Lampe auf grün OK |
| 2 | Terminal-Software: <u>su acqproc</u> kills running processes |
| 3 | <u>su acqproc</u> restart für Software-Neustart |

4.4 Prozessierung der Spektren

Alle Daten wurden mit VNMR-Software bei folgenden Parametern prozessiert

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | $\text{lsfid}=3$ $\text{lp}=-2280$ Phasenkorrektur 2.Ordnung |
| 2 | $\text{lb}=500$ wft – Weight Fourier Transform |
| 3 | $\text{sp}=-100\text{p}$ $\text{wp}=80\text{p}$ dscale |

4.5 Auswertung der Daten

4.5.1 Bauen eines idealen α -Helix Modells von PGLa

Mit Hilfe der Software von Sybyl kann einfach eine α -Helix gebaut werden.

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|---|
| 1 | Menu: Biopolymer → Build → Protein - im nächsten Dialog Festlegen der Sequenz und Typ der Sekundär-Struktur |
| 2 | Modifizieren der Struktur (a) Menu: Biopolymer → Add Hydrogens (All) zeigt alle Wasserstoff-Atome an (b) Anzeigen der zu veränderten Seitenkette Menu: Biopolymer Atom Information Dialog: Atom Expression Monomers anstatt von Atoms, Substructures zeigen Aminosäure Reste, Auswählen des Restes und Anzeigen der Position (c) Menu: Build/Edit → Sketch molecule, Dialog: remove_atom and group zum Hinzufügen einer bestimmten funktionellen Gruppe (phenyl+t-butyl) Beachte Chiralität! - Modifizieren des Carboxy-Terminus zum Carboxamid |
| 3 | Minimieren der Struktur Menu: Compute → Minimize (ohne Elektrostatische WW) Amber94 ForceField |

4.5.2 Das C++-Programm Axis von Glaser

Das Programm Axis berechnet die nötigen Rotationen, um die α -Helix am externen Magnetfeld auszurichten. Dieses gilt als Ausgangspunkt für die Eingabe der Tensorkoordinaten.

Source Code:

```
// axis.cc
// Ralf W. Glaser,
char *release="25.4.03";
// calculate necessary rotations to adjust molecule to normalized orientation
// two steps:
// 1) helix axis along z-axis
// 2) CA on +y axis
// you need a modified molmol that prints cylinder coordinates

#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <string.h>

#define MAXLN 256
#define MAX 40

char line[MAXLN];

void along_z(void) {
    float x1,x2,y1,y2,z1,z2,dx,dy,dz;
    int read;
    printf("MOLMOL> SelectAtom '@CA'\n");
    printf("MOLMOL> AddCylinder least_square\n");
    printf("paste helix axis coordinates\n");
    fgets(line,MAXLN-1,stdin);
    if((read=sscanf(line,"%f%f%f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2)) < 1)
        read=sscanf(line,"%*s*s%f%f%f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2);
    if(read<6) {
        printf("invalid input, %d numbers readable\n",read);
        return;
    }
    dx=x2-x1; dy=y2-y1; dz=z2-z1;
    float dxy=sqrt(dx*dx+dy*dy);
    float alfa=atan2(dy,dx);
    float beta=atan2(dxy,dz);
```

```

printf("RotateZ %.2f\n", -alfa*180/M_PI);
printf("RotateY %.2f\n", -beta*180/M_PI);
}

void CA_y(void) {
float x1,x2,y1,y2,z1,z2,dx,dy,dz;
float xc,yc,zc;
int read;
printf("MOLMOL> SelectAtom '@CA'\n");
printf("MOLMOL> AddCylinder least_square\n");
printf("paste helix axis coordinates\n");
fgets(line,MAXLN-1,stdin);
if((read=sscanf(line,"%f%f%f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2)) < 1)
    read=sscanf(line,"%s*s%f%f*f*s%f%f%f",&x1,&y1,&z1,&x2,&y2,&z2);
if(read<6) printf("invalid input, %d numbers readable\n",read);
dx=x2-x1; dy=y2-y1; dz=z2-z1;
float dxy=sqrt(dx*dx+dy*dy);
float alfa=atan2(dy,dx);
float beta=atan2(dxy,dz);
if(beta>0.005) {
    printf("put the helix axis along z first!\n");
    printf("MOLMOL> RotateZ %.2f\n", -alfa*180/M_PI);
    printf("MOLMOL> RotateY %.2f\n", -beta*180/M_PI);
    return;
}

printf("> grep CA test_z.pdb | grep ' 9 '\n");
printf("paste CA coordinates (no leading shit)\n");
fgets(line,MAXLN-1,stdin);
if((read=sscanf(line,"%f%f%f",&xc,&yc,&zc)) < 3) {
    printf("invalid input, %d numbers readable\n",read);
    return;
}
dx=xc-(x2+x1)/2; dy=yc-(y2+y1)/2;
float gamma=atan2(dx,dy);
printf("MOLMOL> SelectAtom'#1:1-18@C,CA,N'\n");
printf("MOLMOL> Center\n");
printf("MOLMOL> RotateZ %.2f\n", gamma*180/M_PI);
printf("MOLMOL> MoveZ %.2f\n", -zc);
}

int main(int argc, char *argv[]) {
printf("axis.cc %s:\n calculate necessary rotations to adjust molecule to normalized orientation\n",release);
printf(">>>>>> read molecule into molmol\n");
printf("MOLMOL> RotateInit\n");
printf("\n1) helix axis along z\n");
along_z();

printf("MOLMOL> WritePdb test_z.pdb\n");
printf("MOLMOL> InitAll\n");
printf("MOLMOL> ReadPdb test_z.pdb\n");
printf("\n2) selected CA along +y\n");
CA_y();

printf("MOLMOL> WritePdb normal.pdb\n");
}

```

Axis arbeitet eng mit einer modifizierten MOLMOL-Version zusammen, welche die Koordinaten der Helixachse direkt in der Befehlszeile ausgibt. Schritt für Schritt erscheinen die Anweisungen im Terminal. Teil 1) des Programms sorgt für die korrekte Positionierung der Helixachse mit der internen z-Achse. Teil 2) berechnet den Winkel, um den die Helix um die Helixachse gedreht werden muss, damit das α -Kohlenstoff-Atom der Seitenkette 9 auf der y-Achse liegt. Die Koordinaten werden aus dem Brookhaven Datenbank Format pdb extrahiert und später wieder gespeichert.

Eingabemaske in der Befehlszeile unter Unix:

```

[Notenbuch:05_analysis/PGLwt/mol] casa% axis
axis.cc 25.4.03:
calculate necessary rotations to adjust
molecule to normalized orientation
>>>>>> read molecule into molmol
MOLMOL> RotateInit
1) helix axis along z
MOLMOL> SelectAtom '@CA'
MOLMOL> AddCylinder least_square
paste helix axis coordinates
7.582 12.800 -1.750 -> -8.249 -11.857 1.549
RotateZ 122.70
2) selected CA along +y
MOLMOL> SelectAtom '@CA'
MOLMOL> AddCylinder least_square
paste helix axis coordinates
0.074 -0.539 -14.971 -> 0.072 -0.540 14.516
> grep CA test_z.pdb | grep ' 9 '
paste CA coordinates (no leading shit)
-0.252 1.864 -3.242
MOLMOL> SelectAtom'#1:1-18@C,CA,N'
MOLMOL> Center
MOLMOL> RotateZ -7.70
MOLMOL> MoveZ 3.24

```

```

RotateY -83.58                                MOLMOL> WritePdb normal.pdb
MOLMOL> WritePdb test_z.pdb
MOLMOL> InitAll
MOLMOL> ReadPdb test_z.pdb

```

4.5.3 Anpassen der Helixposition auf normierten Wildtyp

| Schritt | Tätigkeit |
|---------|--|
| 1 | Lese normalisiertes PGLwt-Molekül ein: <u>ReadPdb /Users/casa/diplom/material_methods/05_analysis/PGLwt/mol/PGLwt-3-10_min_normal.pdb</u> Lese zu normailierendes PGL13-L Molekül ein: <u>ReadPdb /Users/casa/diplom/material_methods/05_analysis/PGL13/mol/PGL13-L-3-10_min_normal.pdb</u> |
| 2 | Wähle beide Moleküle aus: <u>SelectMol 'num = 1..2'</u> Wähle Rückgratome aus: <u>SelectAtom 'bb'</u> |
| 3 | Anpassen der Position auf das erste Molekül: <u>Fit to first 'selected'</u> |

4.5.4 Das C++-Programm Tilt von Glaser

Ermöglicht die direkte Extraktion einer Dipolkopplung aus einer manuell gedrehten Helix, die in eine pdb-Datei ausgeschrieben wurde.

Source Code:

```

// tilt.cc
// Ralf W. Glaser,
char *release="16.4.03";
// calculate tilt of atomic distance with respect to z-axis
// calculate dipolar coupling

#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <string.h>

#define MAXLN 256
#define MAX 40

float coupling=17.38;
char *res1="PHEN";
char *atom1="C<1";
char *res2="TBUT"; //residue names
char *atom2="C1"; //atom names

float dipole_coupling(float alfa) {
    return coupling*(3*cos(alfa)*cos(alfa) - 1)/2;
}

void extract(FILE *E) {
    char line[MAXLN];
    char res[MAX], atom[MAX];
    int an, an1, an2;
    float x, y, z;
    int has1=0, has2=0;
    float x1,x2,y1,y2,z1,z2;
    while(!feof(E)) {
        fgets(line,MAXLN-1,E);
        if(strncmp(line,"ATOM",4)) continue;
        int r=sscanf(line+4, "%d%s%d%f%f", atom, res, &an, &x, &y, &z);
        if(r<6) { fprintf(stderr,"ignored: %s\n", line); continue; }
        if(!strcmp(res,res1)&&!strcmp(atom,atom1)) {
            if(has1) fprintf(stderr,"no partner: %s %s %d\n", res1, atom1, an1);
            has1=1;
            x1=x; y1=y; z1=z; an1=an;
        }
        if(!strcmp(res,res2)&&!strcmp(atom,atom2)) {
            if(has2) fprintf(stderr,"no partner: %s %s %d\n", res2, atom2, an2);
            has2=1;
        }
    }
}

```

```
x2=x; y2=y; z2=z; an2=an;
}
if(!(has1&&has2)) continue;
printf("%6s %6s %2d --> %6s %6s %2d\n",res1,atom1,an1, res2,atom2,an2);
has1=0; has2=0;
// calc angle
float alfa;
float dz=z2-z1;
float dx=sqrt((x2-x1)*(x2-x1)+(y2-y1)*(y2-y1));
alfa=atan2(dx,dz);
float dc=dipole_coupling(alfa);
printf("Angle: %5.1f Coupling %5.1f kHz\n", 180/M_PI*alfa, dc);
}
}

int main(int argc, char *argv[]) {
printf("tilt.cc %s: searching for %s %s --> %s %s axis, maximum dipolar splitting %.1f\n\n",release,
res1,atom1,res2,atom2,coupling);
FILE *F;
if(argc<2) F=stdin;
else F=fopen(argv[1],"r");
extract(F);
}
}
```

Eingabemaske in der Befehlszeile unter Unix:

```
[Notenbuch:05_analysis/PGL10/mol] casa% tilt PGL10-D_min_normal.pdb
tilt.cc 16.4.03: searching for PHEN C<6 --> TBUT C1 axis, maximum dipolar splitting 14.0

    PHEN    C<6 23 -->    TBUT    C1 24
Angle: 65.1 Coupling -3.3 kHz
```

4.5.5 Mathematica-Notebook zur Orientierungsberechnung

Notebook: PGLa-58-47-helix.nb

Alle blau-unterlegten Texte sind für die Eingabe wichtig und müssen modifiziert werden.

- (1) Koordinaten der Dipolachsen
- (2) Experimentell ermittelte Dipolkopplungen

PGLa-coordinates from pdb

■ preparation

```
In[237]:= Clear["Global`*"];

Print["loading mathematical routines"];
<< "~/diplom/material_methods/06_evaluation/lib/euler-new.m";
Print["loading visualization routines"];
<< "~/diplom/material_methods/06_evaluation/lib/visual.m";

ez = {0, 0, 1};

Print["angle between two vectors"];
angle[a_, b_] := Module[{norm, vec1 = a, vec2 = b},
  norm = Sqrt[vec1[[1]]^2 + vec1[[2]]^2 + vec1[[3]]^2];
  vec1 /= norm;
  norm = Sqrt[vec2[[1]]^2 + vec2[[2]]^2 + vec2[[3]]^2];
  vec2 /= norm;
  Return[ArcCos[vec1.vec2]];
];

Print["dipolar splitting, orientation dependence"];
dd[theta_, d0_] := d0 (3 Cos[theta]^2 - 1) / 2;

loading mathematical routines

EulerMatrix[a_, b_, g_]

    active Euler rotation matrix as given by Melinda Duer (2002):

    EulerMatrix[α, β, γ] :=

$$\begin{pmatrix} \cos[\alpha] \cos[\beta] \cos[\gamma] - \sin[\alpha] \sin[\gamma] & -\cos[\gamma] \sin[\alpha] - \cos[\alpha] \cos[\beta] \sin[\gamma] & \cos[\alpha] \sin[\beta] \\ \cos[\beta] \cos[\gamma] \sin[\alpha] + \cos[\alpha] \sin[\gamma] & \cos[\alpha] \cos[\gamma] - \cos[\beta] \sin[\alpha] \sin[\gamma] & \sin[\alpha] \sin[\beta] \\ -\cos[\gamma] \sin[\beta] & \sin[\beta] \sin[\gamma] & \cos[\beta] \end{pmatrix}$$

EulerRotate[Matrix_, a_, b_, g_]

    returns transform of matrix M according to M' = R.M.Rt

AveDia[diamatrix_, S_]

    returns diagonal matrix diamatrix, scaled by order parameter S

loading visualization routines

dreibein[matrix_, rho_, tau_, alpha_, origin_, label_]

coordsys[origin_, text_]

alphacoord[t_]

angle between two vectors

dipolar splitting, orientation dependence
```

■ produce & visualize model

Need one vector r for each dipolar coupling, calculated from molecular coordinates in MOL system

Model: build with Sybyl with $\phi=-57^\circ$ and $\psi=-47^\circ$ later minimized without electrostatics

```

In[247]:= CaL9 = {-0.274, 1.805, -3.264};
          CaL10 = {-2.517, -0.890, -1.852};
          CaL13 = {-1.729, 1.344, 2.607};
          CaL14 = {-1.769, -2.163, 4.084};

          CbL9 = {-4.016, 5.242, -6.188};
          CbL10 = {-5.030, -5.181, -4.958};
          CbL13 = {-6.787, 1.579, -0.350};
          CbL14 = {-0.876, -7.080, 1.016};

          CaD9 = {-0.412, 1.868, -3.257};
          CaD10 = {-2.578, -1.010, -1.921};
          CaD13 = {-1.795, 1.415, 2.590};
          CaD14 = {-1.801, -2.184, 4.070};

          Cbd9 = {2.827, 5.899, -0.534};
          Cbd10 = {-7.301, 1.487, 0.494};
          Cbd13 = {-1.171, 6.781, 4.890};
          Cbd14 = {-6.955, -2.779, 6.792};

          r9L = CbL9 - CaL9;
          r10L = CbL10 - CaL10;
          r13L = CbL13 - CaL13;
          r14L = CbL14 - CaL14;

          r9D = Cbd9 - CaD9;
          r10D = Cbd10 - CaD10;
          r13D = Cbd13 - CaD13;
          r14D = Cbd14 - CaD14;

          stereomer = "D+L";
          Switch[stereomer, "L", {r9 = r9L; r10 = r10L; r13 = r13L; r14 = r14L;},
            "D", {r9 = r9D; r10 = r10D; r13 = r13D; r14 = r14D;}, "D+L", {r9 = r9L; r10 = r10L;
              r13 = r13L; r14 = r14L, r15 = r9D, r16 = r10D; r17 = r13D, r18 = r14D}
            ];

          (*alpha-helix dimensions as given by L. Stryer*)
          radius = 2.5;
          ganghoehe = 5.4; (*height=pitch of helix*)
          deltah = ganghoehe / 3.6;
          (*angle between two residues, positive angle gives right-handed helix*)
          deltaphi = 100 Pi / 180;
          (** backbone spiral **)
          spiral =
            ParametricPlot3D[alphacoord[t], {t, -Pi / 2, 3 Pi}, DisplayFunction Identity];

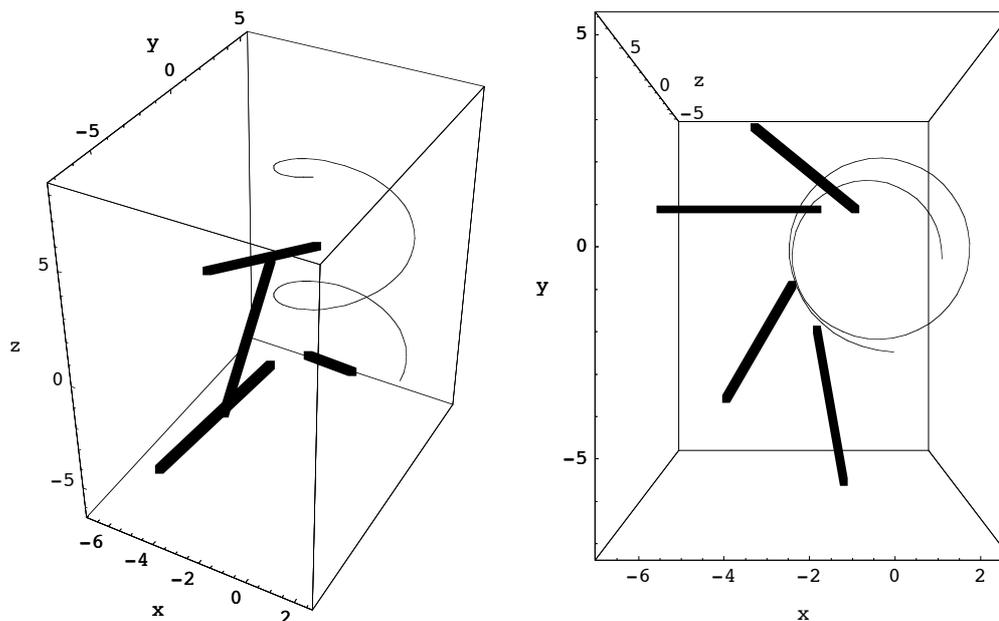
          line9 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0], Line[{CaL9, CaL9 + r9}]}];
          line10 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0], Line[{CaL10, CaL10 + r10}]}];
          line13 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0], Line[{CaL13, CaL13 + r13}]}];
          line14 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0], Line[{CaL14, CaL14 + r14}]}];

          model = {line9, line10, line13, line14, spiral};

          pic1 = Show[model, Axes True, AxesLabel {x, y, z}, DisplayFunction -> Identity];
          pic2 = Show[model, ViewPoint {0, 0, 2},
            Axes True, AxesLabel {x, y, z}, DisplayFunction -> Identity];
          forexport = Show[GraphicsArray[{pic1, pic2}], ImageSize -> 500];

ParametricPlot3D::ppcom :
Function alphacoord[t] cannot be compiled; plotting will proceed with the uncompiled function.

```



Cave: In this (older) *Mathematica* version, the command for exporting graphics looks different than before:

```
In[286]:= Display["~/diplom/material_methods/06_evaluation/exports/PGLmodel.pdf",
  ForeExport, "PDF"];
```

■ chi square function

use Ralf's value for static dipolar coupling in rotating CF₃-group: 15.8kHz

```
In[287]:= dmax = 15800;
```

```
dd9exp50 = -4700;
dd10exp50 = -3100;
dd13exp50 = -3300;
dd14exp50 = -5300;
dd15exp50 = -2200;
dd16exp50 = 0;
dd17exp50 = -3800;
dd18exp50 = 7600;
```

```
dd9exp200 = 0;
dd10exp200 = 0;
dd13exp200 = 5600;
dd14exp200 = -5400;
dd15exp200 = -4700;
dd16exp200 = 3100;
dd17exp200 = -3500;
dd18exp200 = 6600;
```

```
error = 800;
```

```
concentration = "200:1";
```

```
Switch[concentration, "200:1", {dd9exp = dd9exp200;
  dd10exp = dd10exp200; dd13exp = dd13exp200; dd14exp = dd14exp200;
  dd15exp = dd15exp200; dd16exp = dd16exp200; dd17exp = dd17exp200;
```

```

dd18exp = dd18exp200;}, "50:1", {dd9exp = dd9exp50; dd10exp = dd10exp50;
dd13exp = dd13exp50; dd14exp = dd14exp50;
dd15exp = dd15exp50; dd16exp = dd16exp50;
dd17exp = dd17exp50; dd18exp = dd18exp50;}}];

chisq[rho_, tau_, S_] := Module[{},
(
R = EulerMatrix[0, tau, rho];

r9LAB = R.r9;
r10LAB = R.r10;
r13LAB = R.r13;
r14LAB = R.r14;
r15LAB = R.r15;
r16LAB = R.r16;
r17LAB = R.r17;
r18LAB = R.r18;

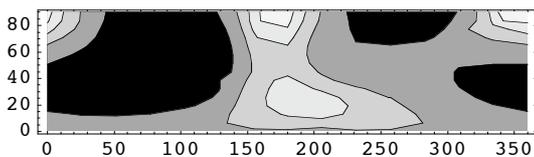
dd9sim = dd[angle[r9LAB, ez], S * ddmax];
dd10sim = dd[angle[r10LAB, ez], S * ddmax];
dd13sim = dd[angle[r13LAB, ez], S * ddmax];
dd14sim = dd[angle[r14LAB, ez], S * ddmax];
dd15sim = dd[angle[r15LAB, ez], S * ddmax];
dd16sim = dd[angle[r16LAB, ez], S * ddmax];
dd17sim = dd[angle[r17LAB, ez], S * ddmax];
dd18sim = dd[angle[r18LAB, ez], S * ddmax];

Return[N[((dd9exp - dd9sim) ^ 2 + (dd10exp - dd10sim) ^ 2 +
(dd13exp - dd13sim) ^ 2 + (dd14exp - dd14sim) ^ 2) / (error ^ 2), 64]];
)];

Print["chi square function at order parameter S=0.6--meant as illustration"];
pic3 = ContourPlot[-chisq[rho Pi / 180, tau Pi / 180, 0.6], {rho, 0, 360},
{tau, 0, 90}, Contours {-1, -2, -5, -20, -10, -50, -100, -200, -1000},
AspectRatio -> 0.25, ContourShading -> True];

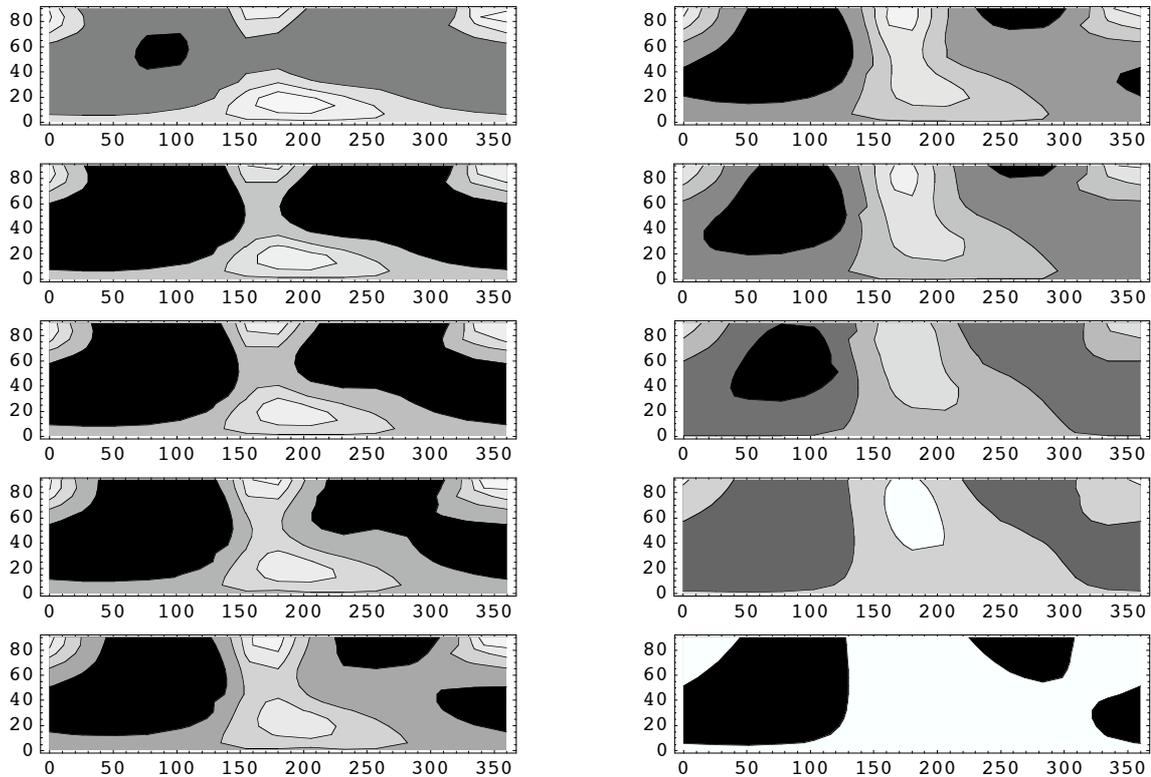
chi square function at order parameter S=0.6--meant as illustration

```



■ generate pictures over whole Smol-range ('grid search')

```
In[310]:= allpic = Table[1, {10}];
S = 1.0;
For[i = 1, i 10, i++,
(
  allpic[[i]] = ContourPlot[-chisq[rho Pi / 180, tau Pi / 180, S], {rho, 0, 360},
    {tau, 0, 90}, Contours {0, -1, -2, -5, -10, -20, -50, -100, -200, -1000},
    AspectRatio -> 0.25, DisplayFunction Identity];
  S -= 0.1;
)];
array = Partition[allpic, 5];
Show[GraphicsArray[Transpose[array]], ImageSize -> 600];
```



Please note that these two very inconspicuous lines are the most important ones: In this special case, the minimum of the chi square function can be found by direct search in the complete, three-dimensional parameter space.

```
In[315]:= Clear[S];
FindMinimum[chisq[rho Pi / 180, tau Pi / 180, S],
  {rho, 170, 10}, {tau, 20, 10}, {S, .6, .7}]
FindMinimum[chisq[rho Pi / 180, tau Pi / 180, S],
  {rho, 300, 10}, {tau, 80, 10}, {S, .6, .7}]

Out[316]= {6.10549, {rho 178.659, tau 8.82503, S 2.887}}

Out[317]= {1.0646, {rho 350.608, tau 92.3098, S 0.613607}}
```

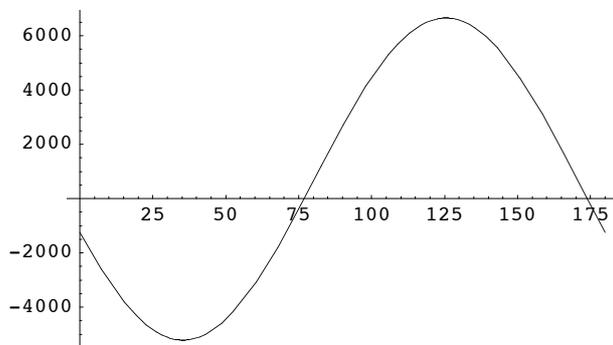
■ qualitatively: How does resonance change with tau?

```
In[318]:= dd13tilt[rho_, tau_, S_] := Module[{},
  (
    R = EulerMatrix[0, tau, rho];

    r13LAB = R.r13;
    dd13sim = dd[angle[r13LAB, ez], S * ddmax];
    Return[dd13sim];
  )];

rho = 328;
S = 0.66;

Plot[dd13tilt[rho Pi / 180, tau Pi / 180, S], {tau, 0, 180}];
```



```
In[322]:= Print[rho, S, dd13exp];
          Solve[dd13tilt[rho Pi / 180, tau Pi / 180, S] == dd13exp, tau]

3280.665600

Solve::ifun : Inverse functions are being used by Solve, so some solutions may not be found.

Out[323]= {{tau -71.9758}, {tau -37.276}, {tau 108.024}, {tau 142.724}}

In[324]:= dd13tilt[327.665 Pi / 180, 58.637 Pi / 180, 0.656]

Out[324]= -3368.38
```

■ control and presentation of result

here I would like to have a picture of the positioned helix in the laboratory frame
 point-illated helix from B18-threepod-LAB.nb
 also: predicted vs. experimental splitting values at minimum

```
In[325]:= tau0 = 92;
          rho0 = 350;
          S = 0.61;
          T = EulerMatrix[0, tau0 Pi / 180, rho0 Pi / 180];

          (*calculated predicted resonances*)
          r9LAB = T.r9;
          r10LAB = T.r10;
          r13LAB = T.r13;
```

```

r14LAB = T.r14;
r15LAB = T.r15;
r16LAB = T.r16;
r17LAB = T.r17;
r18LAB = T.r18;

dd9sim = dd[angle[r9LAB, ez], S * ddmax];
dd10sim = dd[angle[r10LAB, ez], S * ddmax];
dd13sim = dd[angle[r13LAB, ez], S * ddmax];
dd14sim = dd[angle[r14LAB, ez], S * ddmax];
dd15sim = dd[angle[r15LAB, ez], S * ddmax];
dd16sim = dd[angle[r16LAB, ez], S * ddmax];
dd17sim = dd[angle[r17LAB, ez], S * ddmax];
dd18sim = dd[angle[r18LAB, ez], S * ddmax];

angle9sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd9sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle10sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd10sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle13sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd13sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle14sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd14sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle15sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd15sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle16sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd16sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle17sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd17sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle18sim = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd18sim / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;

angle9exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd9exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle10exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd10exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle13exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd13exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle14exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd14exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle15exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd15exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle16exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd16exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle17exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd17exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;
angle18exp = ArcCos[Sqrt[1/3 * ((2 * dd18exp / (ddmax * S)) + 1)]] * 180 / Pi;

Print[ddsim, "\t\t", dd9sim, "\t", dd10sim, "\t", dd13sim, "\t",
      dd14sim, "\t", dd15sim, "\t", dd16sim, "\t", dd17sim, "\t", dd18sim];
Print[ddexp, "\t\t", dd9exp, "\t\t", dd10exp, "\t\t", dd13exp, "\t", dd14exp,
      "\t\t", dd15exp, "\t\t", dd16exp, "\t\t", dd17exp, "\t\t", dd18exp];
Print[anglesim, "\t", angle9sim, "\t", angle10sim, "\t", ,
      angle13sim, "\t", angle14sim, "\t", angle15sim, "\t",
      angle16sim, "\t", angle17sim, "\t", angle18sim,];
Print[angleexp, "\t", angle9exp, "\t", angle10exp, "\t",
      angle13exp, "\t", angle14exp, "\t", angle15exp, "\t",
      angle16exp, "\t", angle17exp, "\t", angle18exp];
Print["chi2=", chisq[rho0 Pi / 180, tau0 Pi / 180, S]];

(*transform connecting vectors into LAB*)
line9 =
  Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0], Line[{T.CaL9, T.(CaL9 + r9)}}]];
line10 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0],
  Line[{T.CaL10, T.(CaL10 + r10)}}]];
line13 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0],
  Line[{T.CaL13, T.(CaL13 + r13)}}]];
line14 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[0, 0, 0],
  Line[{T.CaL14, T.(CaL14 + r14)}}]];
line15 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[1, 0, 1],
  Line[{T.CaL9, T.(CaD9 + r15)}}]];
line16 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[1, 1, 0],
  Line[{T.CaL10, T.(CaD10 + r16)}}]];
line17 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[1, 1, 0],

```

```

Line[{T.CaL13, T.(CaD13 + r17)}]};
line18 = Graphics3D[{Thickness[.02], RGBColor[1, 1, 0],
Line[{T.CaL14, T.(CaD14 + r18)}]}}];
labels = {line9, line10, line13, line14, line15, line16, line17, line18};

(*produce a spiral made from points*)
delta = Pi / 50;
spiral = Table[alphacoord[t], {t, -9 Pi / 2, 9 Pi / 2, delta}];
npoints = Length[spiral];
(*Print["npoints = ", npoints];*)

(*and transform into LAB*)
For[i = 1, i npoints, i++,
  spiral[[i]] = T.spiral[[i]];
];
grspirals = Table[Graphics3D[Point[spiral[[i]]]], {i, 1, npoints}];

pic3 = Show[labels, grspirals, ViewPoint {0, 2, 0}, DisplayFunction Identity];
pic4 = Show[labels, grspirals, ViewPoint {2, 2, 0}, DisplayFunction Identity];
Show[GraphicsArray[{pic3, pic4}], ImageSize 500];

ddsim      -542.119    -165.51    5864.05
           -4816.21   1894.09   2357.56   -3710.73   6053.21

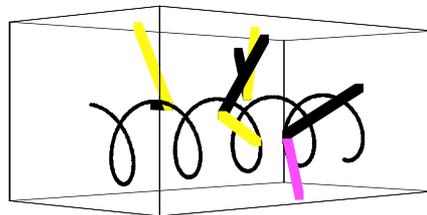
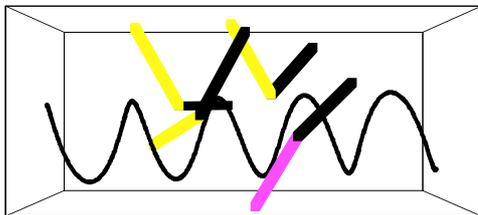
ddexp       0         0         5600     -5400     -4700     3100     -3500     6600

anglesim    57.05     55.4344   Null30.7256
           89.2038    47.0444   45.2059    73.9262   29.865Null

angleexp    180 ArcCos[1/√3]   180 ArcCos[1/√3]
           π                π
           31.9041   90. - 11.4105   84.7946   42.2592   72.419   27.2846

chi2=1.14347

```



In[383]:=

Out[383]=

■ chi square plot, Ralf's style (projection instead of section)

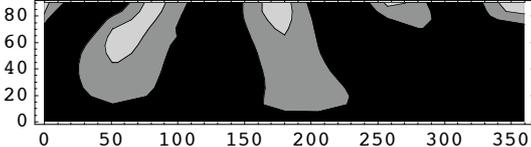
Unluckily, in this section I don't manage to get rid of the precision problem--so we'll have to live with the error messages. Anyway, I find that the new representation looks good enough for any thesis.

```
In[384]:= Clear[S];

newrep[rho0_, tau0_, S0_] := Module[{string, x, x0 = S0, x1 = S0 + 0.1},
(
  string =
  FindMinimum[SetPrecision[chisq[rho0 Pi / 180, tau0 Pi / 180, x], 32], {x, x0}];

  Sbest = x /. string[[2]];
  (*S value giving best chi2 for fixed (rho,tau)*)
  If[Sbest < 1.0,
  Return[{string[[1]], Sbest}];,
  Return[{chisq[rho0 Pi / 180, tau0 Pi / 180, 1.0], 1.0}];
];
)];

pic4 = ContourPlot[-newrep[rho, tau, 0.6][[1]], {rho, 0, 360}, {tau, 0, 90},
  Contours {0, -1, -2, -5, -10, -20, -50, -100, -200, -1000}, AspectRatio -> 0.25
];
```



```
In[385]:= FindMinimum[newrep[rho, tau, 0.7][[1]], {rho, 300, 310}, {tau, 50, 60}]

Out[385]= {9.14511, {328 267.942, tau 85.1242}}
```

■ trouble-shooting section

```
In[386]:= FindMinimum[SetPrecision[chisq[20 Pi / 180, 20 Pi / 180, x], 2], {x, .7}]

Out[386]= {61.1178, {x -0.437795}}
```

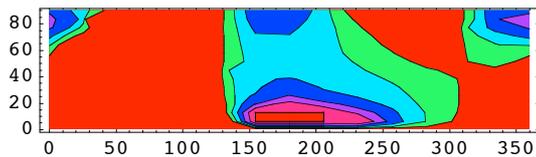
```
In[387]:= SetPrecision[chisq[20 Pi / 180, 20 Pi / 180, .7], 2]

Out[387]= 2.9 102
```

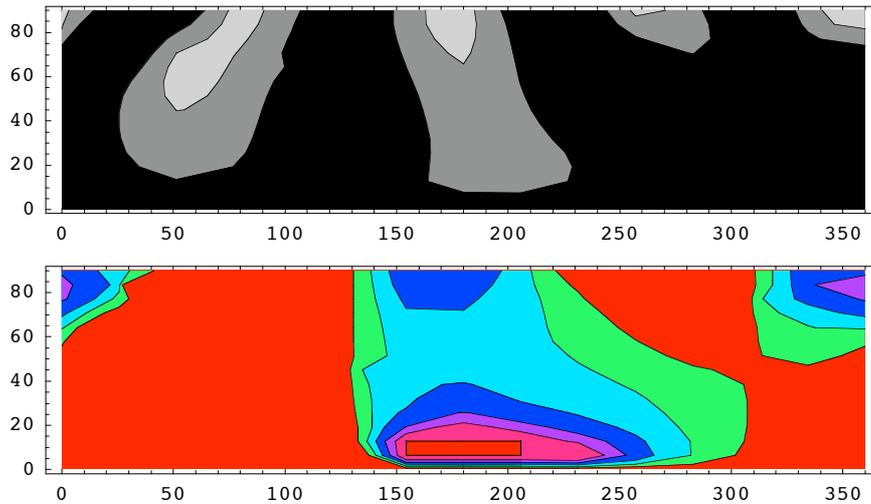
```
In[388]:= newrep[53, 136, 0.7]

Out[388]= {71.0697, 0.21719}
```

```
In[389]:= (*plot optimal Smol values*)
pic5 = ContourPlot[newrep[rho, tau, 0.7][[2]],
  {rho, 0, 360}, {tau, 0, 90}, Contours -> {0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1},
  ColorFunction -> Hue, AspectRatio -> 0.25];
```



```
In[390]:= Show[GraphicsArray[{{pic4}, {pic5}}]];
```



```
In[391]:= Hue[0.6]
```

```
Out[391]= Hue[0.6]
```

■ internals of Mathematica

```
In[392]:= Print[$Context, "\n", $ContextPath, "\n", Context[Display], "\n", Contexts[]];
```

```
Global`
{Global`, System`}
System`
{Algebra`Algebraics`Private`, BoxForm`, BrowserCategoryLoad`, Chase`, Compile`,
Conversion`, Debug`, Developer`, DSolve`, Experimental`, Factor`, FE`, Format`,
FrontEnd`, Global`, HypergeometricLogDump`, Integrate`, Integrate`Elliptic`,
Internal`, Internal`ProcessEquations`, Limit`, LinearAlgebra`Private`, MLFS`,
NPDsolve`, Optimization`LinearProgramming`, OscNInt`, OutputFormsDump`, Series`,
Simplify`, Solve`, SymbolicProduct`, SymbolicSum`, System`, System`CompileDump`,
System`ComplexExpand`, System`Convert`CommonDump`, System`Convert`MathMLDump`,
System`Convert`NotebookMLDump`, System`Convert`SVGDump`, System`Convert`XMLDump`,
System`CrossDump`, System`Dump`, System`Dump`ArgumentCount`, System`FactorDump`,
System`FEDump`, System`IntegerPartitionsDump`, System`InverseFunctionDump`, System`Private`,
XML`, XML`MathML`, XML`MathML`Symbols`, XML`NotebookML`, XML`Parser`, XML`SVG`}
```

```
In[393]:= Context[newrep]
```

```
Out[393]= Global`
```

```
In[394]:= Print[$MinPrecision, " ", $MaxPrecision, " ", $WorkingPrecision];
```

```
0. 1. 106 $WorkingPrecision
```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die am Zustandekommen meiner Diplomarbeit auf unterschiedlichste Art und Weise mitgewirkt haben.

Zu allererst danke ich meiner betreuenden Professorin Anne Ulrich für die Organisation und Durchführung einer höchst interessanten Diplomarbeit. Mit ihrem Optimismus und ihrer Offenheit war sie stets Quelle neuer Ideen und sorgte für ein sehr motivierendes Arbeitsklima. Ausdrücklich möchte ich mich bei Dr. Ralf W. Glaser für seine intensive persönliche Betreuung bei allen Arbeiten bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Beteiligten aus unserem Labor: Dr. Parvesh Wadwahani für die kompetente Betreuung während der Peptidsynthese, Ulrich Dürr für die unkomplizierte Zusammenarbeit zur Orientierungsberechnung und natürlich Dr. Sergii Afonin für Diskussionen aller Art. Dr. Marina Berditchevskaia, Frau Scheiding und Frau Reichardt standen mir im Labor mit ihren Erfahrungen und steter Hilfsbereitschaft immer zur Seite.

Dr. Gührs vom IMB (Institut für Molekulare Biotechnologie) und Frau Perner vom HKI (Hans-Knöll-Institut) verdienen dankende Erwähnung für ihre Massenbestimmungen. Des Weiteren wurden die antimikrobiellen Wachstumassays durch die tatkräftige Unterstützung von Frau Heinemann aus der AG Dr. Möllmann HKI durchgeführt.

Für die Ablenkung und sonstige Hilfe während der gesamten Arbeit danke ich meinen Freunden Oli und Yvonne. Ein ganz herzlicher Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern, die mich immer unterstützt und gefördert haben. Zum Schluss bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Verlobten, die viele Nächte allein ausgeharrt und mich in jeder Situation ermutigte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Jena, 23.10.2003

Carsten Sachse