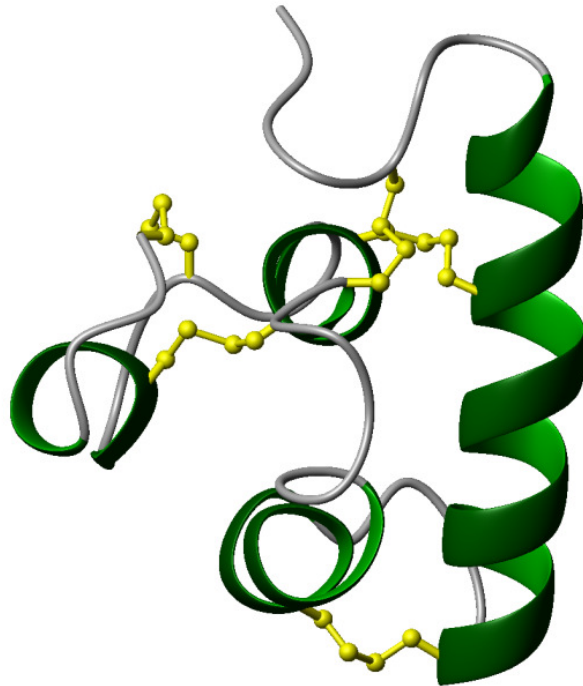


Struktur und Funktion eines porenbildenden Proteins aus *Acanthamoeba culbertsoni*



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Matthias Michalek

Kiel

2009

**Struktur und Funktion eines porenbildenden
Proteins aus *Acanthamoeba culbertsoni***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Matthias Michalek

Kiel

2009

Referent: Prof. Dr. Matthias Leippe

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

*„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche
erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.“*

[Johann Wolfgang von Goethe]

Für Siegfried, Herta und Frieda

Zusammenfassung

Die freilebende, ubiquitär vorkommende Amöbenart, *Acanthamoeba culbertsoni*, nutzt in ihrer natürlichen Umgebung Bakterien als Nahrungsquelle. Als fakultatives Pathogen kann die Amöbe bei immunsupprimierten Individuen die granulomatöse amöboide Enzephalitis sowie bei Immunkompetenten die Amöbenkeratitis im Zusammenhang mit dem Gebrauch von weichen Kontaktlinsen verursachen. Beide Krankheiten zeichnen sich durch nekrotische Gewebszerstörungen aus. Als ein mögliches Effektormolekül wurde aus *A. culbertsoni*-Extrakten ein porenbildendes, antimikrobielles Peptid namens Culbicin isoliert.

In dieser Arbeit wurde die Tertiärstruktur von Culbicin mittels mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopie aufgeklärt und ergab ein vier- α -Helixprotein, dessen Faltungstopologie bisher unbekannt war. Dazu musste zunächst ein Protokoll für die rekombinante Herstellung von Culbicin in Bakterien und die Anreicherung des Proteins mit dem für die NMR-spektroskopischen Analysen wichtigen Stickstoffisotop, ^{15}N , nebst Reinigungsprotokoll etabliert werden.

Untersuchungen an Modellmembranen zeigten, dass Culbicin an anionischen Membranen pH-Wert-abhängig oligomerisiert. Der Mechanismus der zuvor beschriebenen pH-Wert-abhängigen antimikrobiellen Aktivität konnte mithilfe der Tertiärstruktur des Culbicin Monomers als auch des Dimers aufgeklärt werden. Die Protonierung von drei Histidinen an der C-terminalen α -Helix führte bei sauren pH-Werten zur Bildung eines positiven Ladungspols. Dieser ist für die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Membran und Protein entscheidend. Bei basischen pH-Werten erfolgten die Deprotonierung und die Dimerisierung von Culbicin. Ein daraus resultierender negativer Ladungspol in der Interaktionsfläche der Dimere führte zur Abstoßung zwischen Membran und Protein.

Die Analyse der Tertiärstruktur von Culbicin erlaubte es, Porenmodelle zu generieren. Die heptameren und oktameren Poren stehen im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen *barrel-stave*-Modell, welches für die Permeabilisierung von Membranen durch Culbicin spricht.

Untersuchungen zur Cytotoxizität von Culbicin an humanen Neuroblastomazellen konnte die Bedeutung des Proteins als Virulenzfaktor bei Gewebsschädigungen, die durch die Amöbe hervorgerufen werden, nahelegen. Culbicin stellt somit nicht nur das erste Mitglied einer neuen Superfamilie von Proteinen dar, sondern begründet auch eine neue Familie von cytolytischen, porenbildenden Proteinen parasitischer Amöben.

Summary

The free-living and ubiquitous occurring amoeba, *Acanthamoeba culbertsoni*, use bacteria as a food source in their natural environment. As facultative pathogens they can cause the granulomatous amoeboid encephalitis in immunocompromised individuals as well as the amoebic keratitis in immunocompetent individuals linked to the use of soft contact lenses. Both diseases are characterized by large necrotic tissue damage. As a possible effector molecule a pore-forming and antimicrobial peptide, named culbicin, was isolated from *A. culbertsoni* extracts.

In this work the solution of culbicin's tertiary protein structure by use of multidimensional, heteronuclear NMR-spectroscopy revealed a four- α -helix protein with a yet unknown fold.

Initially a protocol for the recombinant production of culbicin was established as well as the labeling of the protein with the nitrogen isotope, ^{15}N , which is essential for NMR-spectroscopy. Also, a protocol for purification was elaborated.

Experiments with model membranes showed the pH-dependent oligomerization of culbicin in presence of anionic charged membranes. The formerly described pH-dependent antimicrobial activity against bacteria could be explained by the monomeric and dimeric protein structure. The protonation of three histidines at the C-terminal α -helix resulted in a positively charged pole under acidic conditions. This pole is crucial for the electrostatic interaction between molecule and the membrane. Under basic conditions culbicin was deprotonated and consequently dimerized. This leads to a negatively charged pole at the dimer interface and a repulsion between molecule and the membrane.

Models of culbicin pores were generated by analysis of its protein structure. Heptameric and octameric pores are in good agreement with the pores of the barrel-stave mechanism, which was described in literature and which is also in good agreement with the mechanism of permeabilization of membranes by culbicin.

Culbicin showed cytotoxic effects against human neuroblastoma cells which highlights the importance of this protein as a virulence factor for the establishment of the diseases caused by the amoeba.

Culbicin is therefore not only the first member of a new superfamily of proteins but also the first member of a new family of cytolytic, pore-forming proteins of parasitic amoeba.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
<i>1 Einleitung</i>	1
1.1 <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> und potentielle Virulenzfaktoren	1
1.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)	3
1.3 Diversität und Eigenschaften der AMPs	3
1.4 Mechanismen der antimikrobiellen Wirkung von AMPs	6
1.5 Grundlagen der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR)	10
1.5.1 Theorie der NMR-Spektroskopie	10
1.5.2 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie.....	12
1.6 Zielsetzung	14
<i>2 Material und Methoden</i>	15
2.1 Klonierung der cDNA von Culbicin	15
2.2 Transformation	15
2.3 Expression von rekombinantem Culbicin	16
2.3.1 Expression in M9-Minimalmedium	17
2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	18
2.5 Färbemethoden	18
2.5.1 Coomassie-Färbung	18
2.5.2 Silberfärbung	19
2.6 Reinigung und Isolierung von rCulbicin	19
2.7 Renaturierung des Fusionsproteins mittels Dialyse	20
2.8 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)	20

2.9	Pufferaustausch	21
2.10	Konzentrationsbestimmung von Fusionsprotein und rCulbicin.....	21
2.11	Proteolytische Spaltung.....	22
2.12	Kationenaustauschchromatographie	22
2.13	Hydrophobizitätschromatographie.....	23
2.14	Gefriertrocknung.....	23
2.15	Charakterisierung des isolierten rCulbicins	23
2.15.1	Massenspektrometrie	23
2.15.2	Gradienten RP-HPLC	24
2.15.3	Circulardichroismus-Spektropolarimetrie	25
2.16	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR).....	25
2.16.1	Probenvorbereitung	25
2.16.2	NMR-Experimente	26
2.16.3	Identifikation des Spinsystems und sequenzspezifische Zuordnung.....	28
2.16.4	Zuordnung strukturspezifischer Signale.....	28
2.16.5	Strukturberechnungen.....	28
2.16.6	Disulfidverbindungen	29
2.17	Modifikation von rCulbicin mit DEPC	30
2.18	Präparation von Liposomen	30
2.19	Untersuchung der Oligomerisierungszustände.....	31
2.19.1	Größenausschlusschromatographie	31
2.19.2	Quervernetzungsexperiment.....	32
2.20	Cytotoxizitätsexperiment	32
3	<i>Ergebnisse</i>.....	34
3.1	Rekombinante Expression, Reinigung und Renaturierung.....	34
3.2	Untersuchung auf einheitliche Disulfidverknüpfungen	36
3.3	Einfluss der chemischen Modifikation von Histidinresten mit DEPC	36
3.4	Sekundärstrukturanalyse von Culbicin	37
3.5	Aufklärung der Tertiärstruktur des Culbicins.....	38
3.5.1	Die sequenzspezifische Zuordnung.....	38
3.5.2	Die TOCSY-Experimente.....	39

3.5.3	Die NOESY-Experimente	41
3.5.4	Die Sekundärstrukturelemente	46
3.5.5	Die Tertiärstruktur	47
3.5.6	Die Disulfidbindungen	48
3.6	Die Tertiärstruktur von Culbicin.....	50
3.6.1	Strukturhomologien zur Struktur des Culbicins	53
3.7	Untersuchungen zur Oligomerisierung des Culbicins	54
3.7.1	pH-Wert-abhängige Dimerisierung von Culbicin	54
3.7.2	2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten	55
3.7.3	Die Struktur des inaktiven Culbicin-Dimers bei pH 8,0	57
3.7.4	Elektrostatistisches Oberflächenpotential des Dimers bei pH 8,0	61
3.7.5	Vergleich der Monomere bei den pH-Werten 5,4 und 8,0	62
3.7.6	Quervernetzung von Culbicin an Liposomen	63
3.8	Darstellungen von Porenmodellen des Culbicins	65
3.9	Cytotoxizität des Culbicins gegenüber Neuroblastomazellen	69
4	<i>Diskussion</i>.....	70
4.1	Modell des Wirkmechanismus von Culbicin	71
4.2	Culbicin als <i>pars pro toto</i> für das Arsenal von <i>A. culbertsoni</i>	80
	Abkürzungsverzeichnis	81
	Literaturverzeichnis	83
	Lebenslauf.....	95
	Publikationen, Poster und Kongressvorträge.....	96
	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 *Acanthamoeba culbertsoni* und potentielle Virulenzfaktoren

Acanthamoeba spp. ist eine ubiquitär vorkommende, frei lebende Amöbenart, die in Süßwasser und im Boden beheimatet ist, wo sie sich von Bakterien ernährt. Morphologisch sind die Trophozoiten von anderen Amöbenarten durch die auffälligen Ausstülpungen der Plasmamembran, den sogenannten Acanthopodien, zu unterscheiden. Bereits 1958 beschrieben Culbertson *et al.* *Acanthamoeba*-Spezies, die Zellkulturen kontaminierten, woraus sie schlussfolgerten, dass freilebende Amöben fakultative Pathogene auch für den Menschen darstellen [1]. In Versuchen mit Affen und Mäusen, die kontaminierten Zellkultursuspensionen ausgesetzt wurden, entwickelten die Tiere eine ausgeprägte und letale Meningoenzephalitis [2].

Von der ersten amöboiden Meningoenzephalitis beim Menschen wurde 1965 in Port-Augusta, Südaustralien, berichtet [3]. Darauf folgten 1968 weitere Fallbeschreibungen aus Florida (USA) und aus der Tschechoslowakei [4, 5].

Bis heute sind 200 Fälle der sogenannten granulomatösen amöboiden Enzephalitis (GAE) beschrieben worden, die durch *Acanthamoeba* spp. verursacht wurden [6]. Die GAE ist eine chronische, progressive Erkrankung des zentralen Nervensystems. Der schleichende Verlauf und die geringe Symptomatik lassen erst spät ein Krankheitsbild erkennen. Da keine ausreichende Therapie vorhanden ist, führt die GAE fast stets zu nekrotischen Läsionen des Gehirns, vor allem des Temporallappens, und schließlich zum Tod des Erkrankten. Nicht zuletzt deswegen erfolgten die bisherigen Diagnosen fast immer erst *post mortem*. Durch Bestrahlung, Alkoholismus, Schwangerschaft, Knochenmarktransplantation oder AIDS sind immungeschwächte Individuen für die GAE prädisponiert [6].

Wesentlich häufiger werden Fälle der Amöbenkeratitis (AK) beschrieben. Diese progressive und sehr schmerzhafteste Infektion der Cornea tritt auch bei immunkompetenten Individuen auf. Die AK wurde 1974 das erste Mal in England [7] und 1975 in den USA beschrieben [8]. Die Fälle häufen sich wegen mangelnder Hygiene im Gebrauch von weichen Kontaktlinsen [9].

Neben einer Behandlung mit dem Medikament Miconazol bei Früherkennung bleibt meist nur die chirurgische Exzision des infizierten Auges. In den USA erkrankt eines von 250.000 Individuen, während in England zwischen 1975 und 2002 erst 400 Fälle beschrieben wurden [10].

Die GAE und AK werden wegen der geringen Epidemiologie vom Robert-Koch-Institut als „seltene und importierte parasitäre Erkrankung“ klassifiziert [11]. Beide Krankheiten zeichnen sich durch stark inflammatorische und nekrotische Gewebsveränderungen aus. Einer der Verursacher ist in beiden Fällen *Acanthamoeba culbertsoni*. Als Effektormoleküle für die Pathogenität der *Acanthamoeba* wurden Serin- und Cysteinproteasen postuliert, da beide Proteasen vor allem in pathogenen *Acanthamoeba*-Gattungen in größeren Mengen vorhanden waren [12, 13]. Weiterhin wurden Zellextrakte, Zellkulturüberstände und lysierte Amöben auf Enzymaktivität untersucht. Dabei wurde auch die Bedeutung von Elastasen als Virulenzfaktor der Amöbenstämme beschrieben [14].

Durch elektronenmikroskopische Analysen konnte die Cytotoxizität der Amöben gegenüber Säugetierzellen näher untersucht werden. *Acanthamoeben* offenbarten dabei neben der Phagozytose von Zellen auch einen kontakt-abhängigen Weg, bei dem über ein *Digipodium*, das von der Amöbe in die Zielzelle gebohrt wird, die Lyse eukaryotischer Zellen induziert wird [18]. Es wurde aber auch gezeigt, dass die Amöbe über kontakt-unabhängige Wege eukaryotische Zellen durch Induktion der Apoptose [15, 16] und durch nekrotische Schädigung [17] beeinträchtigt.

Zu den bereits bekannten Virulenzfaktoren in vielen anderen Amöbenarten gehören beispielsweise Effektormoleküle von *Entamoeba histolytica* (Amoebapore-A, -B und -C), *Entamoeba dispar* (Dispapore-A, -B und -C), *Entamoeba invadens* (Invapore-A, -B und -X) und *Naegleria fowleri* (Naegleriapore-A und -B), welche zur Superfamilie der *Saposin-like Proteins* (SAPLIPs) zählen. Diese zeichnen sich durch ein α -helikales Strukturmotiv aus fünf α -Helices aus, das als *folded-leaf* bezeichnet wird [19]. Bei fast allen Mitgliedern ist die Ausbildung von sechs intramolekularen Disulfidbindungen konserviert. *Per definitionem* ist die Interaktion mit Lipiden die funktionelle Basis dieser Superfamilie. Für Amoebapore-A konnte gezeigt werden, dass Amöben über porenbildende Peptide verfügen, die sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen lysieren können. Daher war es naheliegend, dass auch *Acanthamoeba culbertsoni* über porenbildende, antimikrobielle und cytolytische Peptide verfügen könnte. Eines dieser Peptide wurde aus Amöbenextrakten isoliert und Culbicin genannt [20, 21].

1.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Antimikrobielle Proteine werden wegen ihrer Länge von *circa* 15 bis 100 Aminosäureresten als Peptide bezeichnet. Alle zeigen eine diversifizierte antimikrobielle Wirkung gegenüber Prokaryoten, Viren, Pilzen und seit neuesten Erkenntnissen auch gegenüber Tumoren [22]. Daher wird in sie bei der Bekämpfung multiresistenter Bakterienstämme, wie beispielsweise methicillin-resistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA), höchste Hoffnung gesetzt.

Antimikrobielle Peptide sind ubiquitär vorhanden und von Prokaryoten bis zum Menschen isoliert worden. In allen Organismen dienen sie als unspezifische Effektormoleküle der angeborenen Immunität. Ihr Angriffsort ist die Zellmembran. Es konnte gezeigt werden, dass sich die natürlichen L-Peptide in ihrer antimikrobiellen Aktivität nicht von den D-Enantiomeren unterscheiden. Daher wird ein Rezeptor-unabhängiger Wirkmechanismus an der Membran angenommen [23].

Als die zwei ersten AMPs wurden 1940 Gramicidin-D und -S aus [24] *Bacillus brevis* isoliert. Die Gramicidine bauen sich als selektive Ionophor-Dimere in die Membran von Gram-positiven Bakterien und Gram-negativen Neisserien ein [25]. Infolgedessen wurden Gramicidine als cyclische Peptidantibiotika bei Augen- und Racheninfektionen eingesetzt [26].

Die humanen Defensine wurden 1985 von Lehrer *et al.* erstmalig beschrieben [27]. Seitdem erhielt die Suche nach weiteren antimikrobiellen Effektormolekülen einen Aufschwung. Die Suche weitete sich auch auf antivirale, antimykotische und antitumoröse Moleküle aus. Mittlerweile sind in der APD-Datenbank (engl.: *antimicrobial peptide databank*) 1504 Moleküle vieler unterschiedlicher Organismen aufgeführt (Stand: September 2009) [28]. Davon wirken 1154 antibakteriell, 86 antiviral, 438 antimykotisch und 94 gegen Tumoren.

1.3 Diversität und Eigenschaften der AMPs

Antimikrobielle Peptide sind amphipathische und überwiegend polykationische Peptide. Nur wenige anionische Peptide, wie das synthetisch hergestellte AP1 [29] oder das humane Dermicidin [30], wurden bisher näher charakterisiert. Im Folgenden wird daher nur auf die polykationischen AMPs eingegangen.

Die AMPs diversifizieren sich durch ihren Anteil an ausgebildeten Sekundärstrukturen erheblich. Sie wurden daher strukturell in folgende Gruppen eingeteilt (Abbildung 1).

- 1) Lineare, hauptsächlich α -helikale Peptide, ohne Cysteine, wie die Cecropine, Magainine und Melittin,
- 2) lineare Peptide mit einem großen Gehalt an einer Aminosäure, ohne Cysteine, zum Beispiel PR39 und Indolicidin,
- 3) antibakterielle Peptide, mit einer intramolekularen Disulfidverbindung, in die beispielsweise die Brevinine und die Lactoferricine klassifiziert werden,
- 4) hauptsächlich β -Faltblätter ausbildende Peptide mit mehreren intramolekularen Disulfidbindungen, wie Defensine und Protegrine,
- 5) antibakterielle Peptide, die von größeren Vorläuferproteinen stammen und andere bekannte Funktionen haben, wie beispielsweise das humane Cathelicidin/LL-37 und Dermaseptin [31].

Einige antimikrobielle Peptide, wie die der Superfamilie der SAPLIPs, können nicht in diese Gruppen klassifiziert werden. Bei ihnen handelt es sich um ausschließlich α -helikale Proteine (Gruppe 1), die meist alle (bis auf den PAS-Faktor, Bacteriocin AS-48 und Granulysin) über sechs konservierte Cysteine verfügen (Gruppe 4), die an der Bildung von drei intramolekularen Disulfidbindungen beteiligt sind. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht von antimikrobiellen Peptiden aus den genannten Gruppen. Ebenfalls abgebildet sind Amoebapore-A und der PAS-Faktor als Vertreter der AMPs, die nicht zugeordnet werden können.

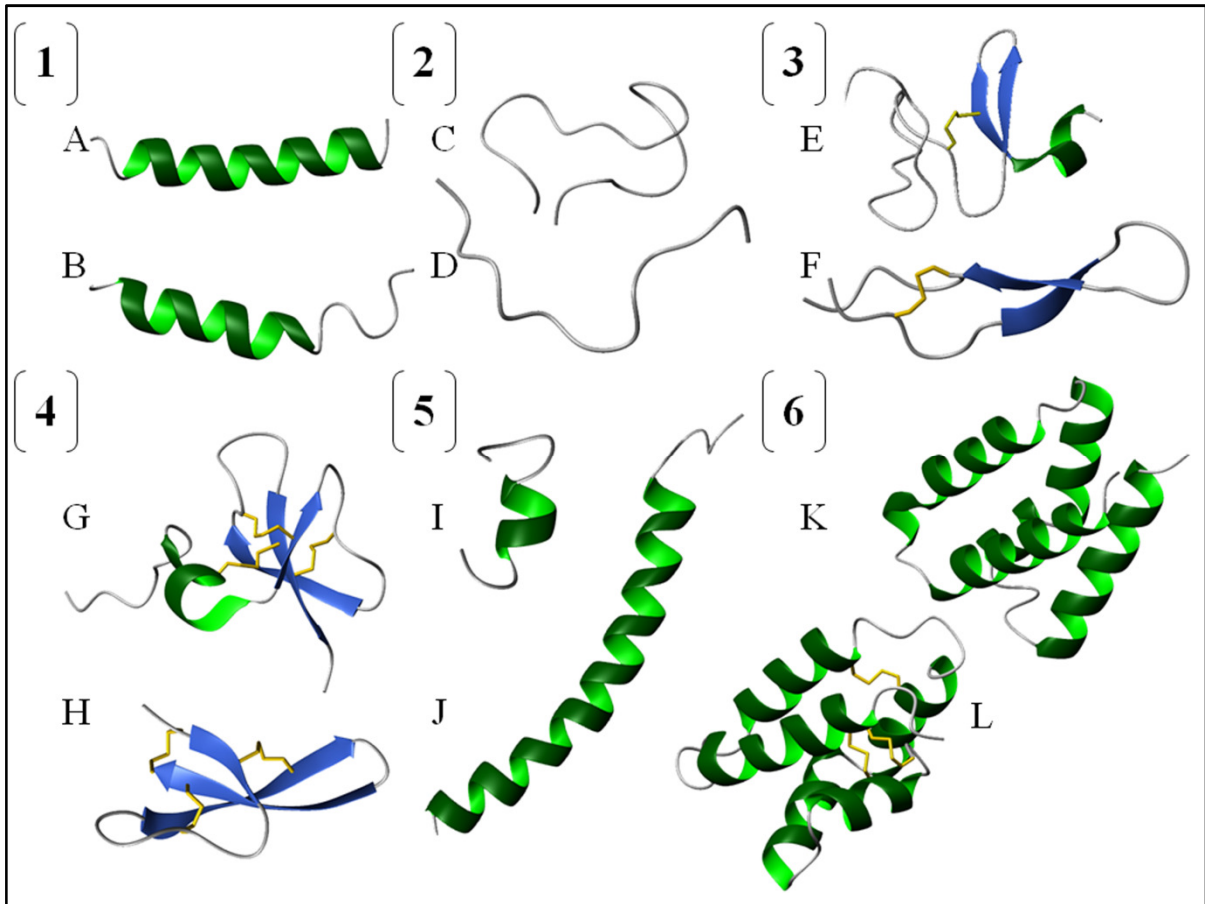


Abbildung 1: Übersicht über die Diversität der antimikrobiellen Peptide [31]. Die Strukturen von jeweils zwei Mitgliedern jeder Gruppe sind als Bandmodell abgebildet: Aus Gruppe 1 sind A) Magainin-2 (aus *Xenopus laevis*, pdb-Code 2MAG) und B) Piscidin-1 (aus *Morone chrysops* und *Morone saxatilis*, pdb-Code 2jos), aus Gruppe 2 C) das glycinreiche Microcin J25 (aus *Escherichia coli*, pdb-Code 1GR4) und D) tryptophanreiches, bovines Indolicidin (pdb-Code 1G89), aus Gruppe 3 E) Scarabaecin (aus *Orytes rhinoceros*, pdb-Code 1IYC) und F) bovines Lactoferrin-B (pdb-Code 1LFC), aus Gruppe 4 G) humanes β -Defensin-3 (pdb-Code 1KJ6) und H) humanes α -Defensin-1 (pdb-Code 3gny) sowie aus Gruppe 5 I) das Fragment Dermaseptin (aus *Phyllomedusa bicolor*, pdb-Code 2dd6) und J) das humane LL37-Fragment (pdb-Code 2k6O) dargestellt. Unter 6 sind K) der PAS-Faktor (aus *Vibrio vulnificus*, pdb-Code 2b8i) und L) Amoebapore-A (aus *Entamoeba histolytica*, pdb-Code 1OF9) als nicht in die genannten Gruppen klassifizierbare AMPs abgebildet. Disulfidverbindungen sind gelb illustriert.

Aus der Abbildung 1 werden die strukturellen Unterschiede innerhalb einer Gruppe ersichtlich. Daher wurde vorgeschlagen, die Gruppen der antimikrobiellen Peptide ausschließlich nach der Ausbildung der Tertiärstruktur einzuteilen [32]. Demnach galt die Klassifizierung für amphiphile Peptide mit

- 1) zwei bis vier β -Strängen (z.B. humanes α -Defensin, Abbildung 1 H),
- 2) amphipathischen α -Helices (z.B. Magainin-2, Abbildung 1 A),
- 3) Schleifenstrukturen (z.B. Scarabaecin, Abbildung 1 E),
- 4) gestreckten Strukturen (z.B. Microcin J25, Abbildung 1 D),

5) gemischten Strukturen aus α -Helices, β -Strängen und Schleifen (z.B. humanes β -Defensin, Abbildung 1 G) [32]. Diese Einteilung ermöglicht die Gruppierung der AMPs der SAPLIPs in die α -helikalen, amphiphilen Peptide.

Die bedeutendste Eigenschaft der AMPs ist ihr amphiphiler Charakter. Es ist weitgehend anerkannt, dass der initiale Kontakt zwischen AMP-Molekül und Phospholipiden, Lipoteichonsäuren sowie Lipopolysacchariden über die kationischen Seitenketten von Lysin und Arginin vermittelt wird [33]. Für die Defensine wurde nachgewiesen, dass die Ionenstärke diesen Prozess der initialen, elektrostatischen Wechselwirkung stört und so eine verminderte antimikrobielle Wirkung verursacht [34]. Dennoch sind AMPs bekannt, die bei hoher Salzkonzentration unveränderte antimikrobielle Wirkung vorweisen [35]. Mit Hilfe von mutierten Magainin-2-Molekülen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an positiven Ladungen des Moleküls in direkter Beziehung zur antimikrobiellen Aktivität stand [36].

Die hydrophoben Bereiche der AMPs ermöglichen es den Molekülen wie Detergenzien zu wirken und in die hydrophoben Acylkettenbereiche der Membran zu inserieren. Auch in diesem Fall wurde an Magainin-2-Analogen die Bedeutung der Hydrophobizität für die antimikrobielle Aktivität dargelegt. Bis zu einer kritischen Hydrophobizität wurde eine verstärkte Wirkung gegen Bakterien nachgewiesen, darüber hinaus aber eine verminderte Wirkung [37, 38].

Diese Arbeiten zeigen, dass der Grad an kationischen und hydrophoben Aminosäureseitenketten über die antimikrobielle Aktivität der amphiphilen Moleküle entscheidet.

1.4 Mechanismen der antimikrobiellen Wirkung von AMPs

Die äußere Zellwand Gram-positiver und -negativer Bakterien stellt für antimikrobielle Peptide die erste Barriere dar. Bei Gram-positiven Bakterien besteht die äußerste Hülle aus einer mehrschichtigen, *circa* 15-80 nm dicken Peptidoglyanschicht, in die Teichonsäuren eingelagert sind. An Peptidoglycan kovalent gekoppelte Teichonsäuren, Lipoteichonsäuren, ragen in den periplasmatischen Spalt hinein, welcher zwischen Mureinsacculus und cytoplasmatischer Membran liegt [39].

Gram-negative Bakterien dagegen verfügen über eine *circa* 2 nm dünne Peptidoglyanschicht, die in ein periplasmatisches Gel eingelagert ist.

Zur extrazellulären Umgebung wird die Zellwand durch eine Lipopolysaccharidschicht abgegrenzt, die ein Charakteristikum vieler Gram-negativer Bakterien darstellt [39].

Lipoteichonsäuren bestehen hauptsächlich aus Polyglycerolphosphatketten und liegen demnach stark anionisch geladen vor. Ebenso sind die Lipopolysaccharidmoleküle wegen ihrer Phosphatgruppen negativ geladen. Elektrostatische Kräfte wirken über eine große Distanz und induzieren den ersten Kontakt zwischen Membranmolekülen und polykationischen, antimikrobiellen Peptiden.

Für einige polykationische AMPs wurde gezeigt, dass sie mit ihren positiv geladenen Aminosäureseitenketten an die negativ geladenen Gruppen der Zellmembranbestandteile binden. Dabei werden bivalente Kationen von der äußeren Zellmembran verdrängt und diese wird destabilisiert. Hancock [40] beschrieb diesen Prozess als *self-promoted uptake*. Dieses Modell erklärt, wie AMPs in den periplasmatischen Raum gelangen können.

Über der cytoplasmatischen Membran von prokaryotischen Pathogenen in der logarithmischen Wachstumsphase liegt ein Membranpotential zwischen -130 mV und -150 mV an. Dieses ist im Vergleich zu Säugetierzellen (-90 mV bis -110 mV) wesentlich größer und begünstigt zusätzlich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen anionischen Kopfgruppen der Phospholipide der Plasmamembran und den polykationischen AMPs [33].

Die Plasmamembran von Prokaryoten ist reich an anionischem Phosphatidylglycerin (und dem Diphosphatidylglycerin, Cardiolipin) [41]. Nach initialer Anlagerung der AMPs an die Kopfgruppen der Phospholipide interagieren hydrophobe Bereiche der amphipathischen AMP-Moleküle mit den Lipiden der Membran und es kommt zur parallelen Anlagerung. Durch den Platzbedarf einiger eingelagerter AMPs werden die Phosphatidylmoleküle der Plasmamembran leicht auseinandergeschoben. Dieser sogenannte *thinning effect* konnte in vielen unterschiedlichen Modellmembranen belegt werden [42, 43]. Zusätzlich wird die Membran durch die AMP-Anlagerung gekrümmt. Durch die daraus resultierende mechanische Spannung wird eine Permeabilisierung begünstigt [44].

Das Eintauchen der hydrophoben Bereiche von amphipathischen AMPs wird ab einer kritischen Konzentration erreicht. Sie wird in dem Verhältnis von Peptid zu Lipid (P/L-Ratio) angegeben. Dabei sind die Beschaffenheit des AMP-Moleküls und die sterische Kopfgruppengröße der Phospholipide entscheidend [45, 46]. Vergleiche von künstlichen Membranen aus Phosphatidylglycerin- (PG) mit Phosphatidylethanolaminlipiden (PE) offenbarten beispielsweise, dass einige AMPs bei Anlagerung an PE-Membranen, deren Kopfgruppe kleiner als die von PG ist, einen deutlich geringeren *thinning effect* zeigen und somit eine höhere P/L-Ratio benötigen, als im Fall der PG-Membranen [43].

Die P/L-Ratio verschiedener AMPs unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung und definiert somit ein Charakteristikum der AMPs und der zu permeabilisierenden Membran. Einige AMPs zeigen dabei einen sigmoidalen Verlauf der Membranbindung in Abhängigkeit von der Konzentration. Dieser kooperative Effekt verläuft nach dem Alles-oder-nichts Prinzip [47, 48].

Huang [43] schlug anhand von Experimenten mit Magainin, Melittin und Alamethicin ein *two-state model* für die initiale Anlagerung dieser Peptide an Membranen vor: Vor Erreichen der kritischen Konzentration charakterisiert der *S-state* (von *solid*, da Liposomenvesikel dabei präzipitieren können) die parallele Anlagerung der AMPs an die Membran. Wird die P/L-Ratio überschritten, inserieren die AMP-Moleküle vertikal oder in einem bestimmten Winkel in die Membran in den sogenannten *I-state* (von *intermedium*). Tatsächlich handelt es sich bei diesem Übergang um einen kooperativen Prozess. Dazwischen liegen nach Huang [43] keine Zwischenzustände. Die Moleküle erzeugen beim Anlagern an die Membran (*S-state*) eine Dehnung, die ansteigt, je mehr Moleküle binden. Bei genügend hoher Dehnungsenergie, abhängig von der Anzahl der Moleküle und der Beschaffenheit der Membran, führt die Bildung des *I-state* zu einem energetisch niedrigeren Zustand, in dem die Moleküle oligomere Poren oder Aggregate innerhalb der Membran bilden. Zusätzlich unterstützt die Entropie der zur wässrigen Umgebung exponierten hydrophoben Bereiche der amphipathischen Moleküle eine Einlagerung in die hydrophobe Umgebung der Membran.

Bis zu diesem Prozess stimmen die Mehrheit der in der Literatur gezeigten Modelle der initialen Bindung und der Membraninserierung überein. Für die Mechanismen der AMPs bei Membraninserierung werden vier Modelle vorgeschlagen:

Das Aggregatmodell unterscheidet sich von anderen dadurch, dass die AMP-Moleküle nicht vertikal, sondern in beliebiger Richtung in die Membran inserieren [49]. Dabei wird die Membran an der Eintrittsstelle entweder durch Mizellenbildung zerrissen, oder die Cytoplasmamembran wird passiert und die AMPs gelangen in den cytoplasmatischen Raum der Bakterienzelle. Dort interagieren die polykationischen Moleküle mit negativ geladenen Molekülen und inhibieren so zum Beispiel Enzyme der Zellwandsynthese, verhindern die Replikation sowie Transkription und Translation. Zusätzlich wird in einigen Fällen die Proteinfaltung gestört [32, 33]. Im Wirkmechanismus unterscheiden sich AMPs hierbei nicht von gängigen Antibiotika. Man geht daher davon aus, dass für viele AMPs neben der Membranpermeabilisierung ebenso intrazelluläre Wirkmechanismen vorliegen.

Das *barrel-stave*-Modell [50] beschreibt die Oligomerisierung der AMP-Monomere, die sich wie die Dauben (*stave*) eines Fasses (*barrel*) zu Poren definierter Größe zusammenfinden. So bildet zum Beispiel Alamethicin eine oktamere Pore mit einem Innendurchmesser von 1,8 nm [51]. Für Amoebapore-A [52] ebenso wie für S100A7-Psoriasin [53] wurden hexamere Modelle vorgeschlagen. In diesen Poren sind die hydrophoben Bereiche der Monomere zur Lipidschicht gerichtet, wohingegen das Innere mit den hydrophilen Bereichen der AMP-Monomere ausgekleidet ist.

Der Wirkmechanismus nach dem *toroidal-pore*- (auch *worm-hole model* genannt) Modell [54] umfasst eine größere Gruppe von AMPs. Hierbei werden Poren abhängig von der Molekülkonzentration gebildet und variieren in Durchmesser und Beständigkeit. Zusammen mit den Lipiden der Membran zeigen hydrophobe Bereiche der AMP-Monomere in das Innere der Pore hinein. Die Packung der Phospholipide wird dadurch ausgedünnt. Für Magainin und Mellitin wurden diese Poren charakterisiert. Der Durchmesser variiert von 3,0 bis 5,0 nm (Innendurchmesser [51]). Die Poren wirken nach innen leicht abgeflacht, weshalb sie „toroidal“ genannt wurden.

Als viertes beschreibt das *carpet-like* Modell einen Detergenz-ähnlichen Wirkmechanismus [46]. Die Monomere inserieren ab einer kritischen Konzentration in die Membran und umschließen hydrophobe Bereiche. Infolgedessen werden Mizellen gebildet, die die Membran permeabilisieren und eine transiente Pore unregelmäßiger Größe hinterlassen. Die induzierte Krümmung der Membran führt schließlich zu einer vollständigen Zerstörung der Membranintegrität.

Die Permeabilisierung und Störung der Membranintegrität führt neben dem Ausströmen von Kofaktoren und Enzymen vor allem zum *Influx* und *Efflux* von Ionen, wodurch das Membranpotential nicht aufrecht gehalten werden kann. Demzufolge kommt die Synthese von Metaboliten, wie zum Beispiel ATP, zum Erliegen und die Zelle stirbt.

1.5 Grundlagen der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*) ist neben der Röntgenkristallographie die einzige Methode zur Aufklärung der atomaren Struktur von Nucleinsäuren und Proteinen [55]. Die Entdeckung von Kernresonanz-Signalen gelang Bloch und Purcell 1946 unabhängig voneinander [56, 57]. 1952 erhielten sie dafür den Nobelpreis für Physik. Kurz darauf wurden die Aufspaltung der Signale durch die skalare Kopplung und die chemische Verschiebung in eindimensionalen Spektren entdeckt. Durch Verfeinerung der Methode beispielsweise durch Einführung der gepulsten Fourier-Transformation durch Ernst [58] (Nobelpreis für Chemie, 1991) und der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie durch Wüthrich [59] (Nobelpreis für Chemie, 2002), wurde sie zu einer der Hauptanwendungen in der Strukturanalyse von Proteinen bis 100 kDa [60]. Daneben bietet die NMR-Spektroskopie zahlreiche Möglichkeiten die Interaktionen von Biomolekülen, Reaktions- und Faltungskinetiken sowie intramolekulare dynamische Prozesse zu analysieren. Jüngst wurden sogar Proteinstrukturen innerhalb von prokaryotischen [61] sowie eukaryotischen Zellen [62] aufgeklärt. Diese Methoden erlauben die Analyse von Proteinstrukturen in zellulärer Umgebung.

1.5.1 Theorie der NMR-Spektroskopie

Der Kernspin (I) einiger Kerne verursacht durch seinen Eigendrehimpuls (P) ein magnetisches Moment (μ). Der Drehimpuls und magnetisches Moment sind vektorielle Größen und zueinander proportional:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{P}$$

Das gyromagnetische Verhältnis (γ) ist für verschiedene Elemente charakteristisch und beschreibt die Empfindlichkeit eines Kerns im NMR-Experiment. Je größer das gyromagnetische Verhältnis ist, desto größer die Empfindlichkeit des Kerns.

In einem homogenen Magnetfeld (B_0) spalten sich die Energieniveaus der Kernspins eines Moleküls in verschiedene Zustände auf. Die Drehimpulse der Kerne orientieren sich entlang der Feldrichtung, P_z . Für Protonen und Kerne, wie die Isotope ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P mit einem Kernspin von $I = 1/2$, ergeben sich zwei Orientierungsmöglichkeiten, $m = +1/2$ und $m = -1/2$.

Die Kerne präzedieren dabei um die z-Achse (Feldrichtung) in einem Doppelpräzessionskegel mit der Lamorfrequenz ν_L . Diese ist zu dem angelegten Magnetfeld proportional:

$$\nu_L = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0$$

Aus den Kern-Zeeman-Niveaus ergeben sich die Energiezustände für Kernspins von $I = 1/2$. Dabei steht $m = +1/2$ für eine parallele, energetisch günstigere Orientierung der magnetischen Momente des Spins (α -Spin oder auch *spin-up*), $m = -1/2$ für eine antiparallele, energetisch ungünstigere Orientierung (β -Spin oder auch *spin-down*). Normalerweise liegen mehr Orientierungen im α -Zustand als im β -Zustand vor. Die Boltzmann-Verteilung beschreibt die Verteilung der Kerne in beiden Orientierungen. Für den Energieunterschied zwischen diesen beiden benachbarten Energieniveaus (mit $\hbar = h/2\pi$, $h =$ Plancksches Wirkungsquantum) gilt:

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

Da die Besetzung des α -Zustands größer ist als die des β -Zustands, summiert sich die z-Komponente aller magnetischen Kernmomente zu einer Gesamtmagnetisierung, M_0 . Im thermodynamischen Gleichgewicht existiert nur eine Gesamtmagnetisierung in Feldrichtung (z-Magnetisierung, M_z), da die transversalen x- und y-Komponenten sich zu Null addieren. Sie weisen keine Vorzugsrichtung auf. In einer Empfängerspule wird die zeitliche Entwicklung der Gesamtmagnetisierung gemessen. Durch Einstrahlen eines Radiofrequenzpulses (RF-Puls) wird ein zusätzliches Magnetfeld B_1 , das senkrecht zu B_0 steht, erzeugt. Entspricht die Frequenz des RF-Pulses der Lamorfrequenz, führt dies zur transversalen Magnetisierung der Kernspins, in der die Energieniveaus gleich besetzt sind ($M_z = 0$). Die Gesamtmagnetisierung rotiert in diesem Fall in y-Richtung. Nach dieser Anregung kehrt das System wieder in das thermodynamische Gleichgewicht zurück. Dieser als Relaxation beschriebene Prozess wird durch die longitudinale (T_1) und transversale (T_2) Relaxationszeit der Magnetisierung definiert [63]. Die transversale M_x -, M_y -Magnetisierung strebt dem Grenzwert 0, die longitudinale M_z -Magnetisierung strebt M_0 entgegen. Die longitudinale Relaxationszeit beschreibt die verschiedenen zeitabhängigen Wechselwirkungen zwischen dem Spin und seiner Umgebung und wird Spin-Gitter-Relaxationszeit genannt. Die transversale Relaxationszeit beruht auf der Wechselwirkung der Spins untereinander und wird als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet.

Die Relaxationszeiten sind durch die Brownsche Molekularbewegung und damit auch durch die molekulare Masse des Moleküls in Lösung charakterisiert, was durch die Korrelationszeit τ_c ausgedrückt wird. Die Korrelationszeit entspricht der Zeit zwischen zwei Umorientierungen des Moleküls, für die gilt: $T_2^{-1} \propto \tau_c$. Daher induzieren die Kernspins nur kurz eine Spannung an der Empfängerspule, und das empfangene Signal nimmt zeitlich ab. Infolgedessen werden die registrierten Daten als freier Induktionszerfall, FID (*free induction decay*), bezeichnet. Nach einer Fourier-Transformation werden diese in die Frequenzdomäne eines eindimensionalen NMR-Spektrums überführt.

Die Larmorfrequenzen der Kerne unterscheiden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Umgebungen, die grundlegend für die Dispersion der NMR-Signale im Spektrum sind. Die Ursache ist die Abschirmung eines Kerns durch die eigene Elektronenwolke und die seiner Nachbargruppen, die dem äußeren Magnetfeld entgegenwirken und so eine effektive Magnetfeldstärke (B_{eff}) am Kern bewirken. Daher haben induktive und mesomere Effekte einen großen Einfluss auf die chemische Verschiebung eines Kerns. In der Nähe eines aromatischen Systems erfährt ein Kern aufgrund des sogenannten Ringstromeffekts, der auf die delokalisierten π -Elektronen basiert, eine Hochfeldverschiebung. Der Wert der chemischen Verschiebung (δ) wird in ppm (*parts per million*) angegeben und auf eine Standardfrequenz wie zum Beispiel das interne Wassersignal referenziert. Nach Konvention wird δ auf der Abszisse eines NMR-Spektrums von rechts nach links aufgetragen. Daher steht eine Hochfeldverschiebung für eine chemische Verschiebung zu einem niedrigeren ppm-Wert.

Die chemischen Verschiebungen vieler Kerne können im eindimensionalen NMR-Spektrum überlappen. Durch die Einführung mehrerer spektraler Dimensionen können die Signalmuster entzerrt werden.

1.5.2 Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Ein 1D-NMR-Experiment besteht aus den beiden Phasen „Präparation“, in der das Spinsystem durch Einstrahlen eines RF-Pulses in einen definierten Zustand gebracht wird, und der „Detektion“ zur Registrierung des FID. Im 1D-Spektrum überlappen die Signale der verschiedenen Kerne. Daher werden an das 1D-Experiment eine zusätzliche Evolutionszeit t_1 und eine Mischsequenz, die aus Pulsen und Wartezeiten besteht, für ein 2D-Experiment angefügt.

In der Präparation können die Spins in einer festen t_1 -Zeit präzedieren, und gleichzeitig wird die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des ersten Kerns markiert. In der Mischsequenz wird der Zustand der Magnetisierung am Ende der t_1 -Zeit (indirekte Evolutionszeit) abgefragt. Zusätzlich findet ein Transfer von Magnetisierung statt. Dabei werden die skalare Kopplung oder die dipolare Wechselwirkung zum Transfer genutzt. Bei der skalaren Kopplung findet der Transfer durch die Bindungselektronen zwischen kovalent gebundenen Atomkernen statt. Dabei sind die koppelnden Kerne maximal über drei Bindungen miteinander verbunden. Die dipolare Wechselwirkung beruht auf dem Nuclear-Overhauser-Effekt (NOE), der durch den Raum wirkt und dessen Stärke proportional zu $1/r^6$ (r = Abstand der beteiligten Kerne) ist. Aus diesem Grund wird ein Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen nur beobachtet, wenn sie einen Abstand kleiner als 5 Å besitzen.

Am Ende des 2D-Experiments wird die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kerns markiert und die Daten akquiriert (t_2 -Zeit, direkte Evolutionszeit). Nach Fourier-Transformation in der t_2 -Richtung erhält man ein 1D-Spektrum zu gegebener Zeit t_1 . Werden nun inkrementierte Experimente in t_1 mit der gleichen zeitlichen Differenz aufgenommen, so führt das zu einer Abfolge von Momentaufnahmen der 1D-Spektren, die zeitlich in t_2 zu t_1 entwickelt sind. Durch Fouriertransformation zusätzlich in t_1 -Richtung gelangt man so zum 2D-Spektrum, dessen Intensitäten als Höhenliniendiagramm dargestellt werden. Bei homonuklearen 2D-Spektren liegt die Information des 1D-Spektrums auf der Diagonale des Spektrums. Symmetrisch zu dieser Diagonale liegen die Kreuzsignale der Kerne, die miteinander koppeln. Die wichtigsten 2D-NMR-Spektren sind das TOCSY- (*Total Correlation Spectroscopy*) und das NOESY- (*Nuclear-Overhauser-Effect Spectroscopy*) Experiment.

Beim TOCSY-Experiment wird die Magnetisierung über skalare Kopplung auf das ganze Spinsystem einer Aminosäure verteilt. Dies führt zu charakteristischen Signalmustern aller Aminosäuren, die die Grundlage der Identifizierung der Aminosäuren darstellen.

Im NOESY-Experiment beobachtet man zwischen allen Protonen ein Signal, deren Abstand kleiner als 5 Å ist. Das trifft sowohl auf die Kerne des Spinsystems der Aminosäuren als auch auf die Kerne benachbarter Aminosäuren und durch räumlich nahe beieinander liegende Kerne zu. Daher liegt im NOESY-Spektrum die wichtigste Information für die Strukturaufklärung von Proteinen vor.

Das Anfügen einer weiteren indirekten Evolutionszeit und Mischsequenz, statt der Datenakquisition des 2D-Experiments, führt zu 3D-NMR-Experimenten.

Beispielsweise kann dieses letzte Experiment aus einem 2D-HSQC- (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) Experiment bestehen. Hierbei werden die Magnetisierungstransfers aus den homonuklearen 2D-Experimenten auf Protonen, die an ^{15}N -Atome gebunden sind, transferiert. Als Folge werden die Signale in den 3D- ^1H - ^{15}N -NOESY-HSQC- und 3D- ^1H - ^{15}N -TOCSY-HSQC-Spektren noch weiter entzerrt. Durch Ausschnitte aus dem 2D-NOESY/TOCSY-Spektrum bei gegebener ^{15}N -Frequenz können die Spinsysteme und ihre Kreuzsignale mit den Kernen anderer Spinsysteme dadurch ermittelt werden.

1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Tertiärstruktur des porenbildenden, antimikrobiellen und cytolytischen Proteins, Culbicin, aus *Acanthamoeba culbertsoni* mittels der mehrdimensionalen, heteronuklearen NMR-Spektroskopie. Dazu sollte ein Protokoll etabliert werden, das die Markierung des Proteins mit dem ^{15}N -Isotop sowie die Herstellung der für die NMR-Spektroskopie nötigen Mengen durch rekombinante Expression in *E. coli*-Bakterien ermöglichte. Ausgehend von der Tertiärstruktur des Culbicin sollten die funktionellen Grundlagen des antimikrobiellen Wirkmechanismus untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Interaktion des Culbicins mit Modellmembranen und seine Wirkung auf humane Neuroblastomazellen untersucht werden, um die Bedeutung des Culbicins als Virulenzfaktor zu analysieren.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Fluka Chemie GmbH, Buchs; Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze; Campro Scientific GmbH, Berlin und Roche Diagnostics GmbH, IN, USA.

2.1 Klonierung der cDNA von Culbicin

Die Ligation der cDNA (*complementary DNA*) des Culbicins wurde über die NcoI- und XhoI-Schnittstelle in den Expressionsvektor pET-32a (Novagen, Merck, Darmstadt [64]) von Dr. Inken Lorenzen (Biochemisches Institut der CAU zu Kiel) durchgeführt. Aufgrund der Klonierungsstrategie wurde das rekombinante Culbicin als Fusionsprotein exprimiert. Dieses enthielt N-terminal einen Rest bestehend aus Thioredoxin und Hexahistidin mit C-terminal angrenzender Thrombinschnittstelle, S-Rest und einer Enterokinaseschnittstelle (Abbildung 2). Der Expressionsvektor wird weiterhin als pET-32a-FprCulb bezeichnet. Culbicin wird zusätzlich mit einem Alanin- und einem Methioninrest am N-Terminus prozessiert und daher als rCulbicin bezeichnet.

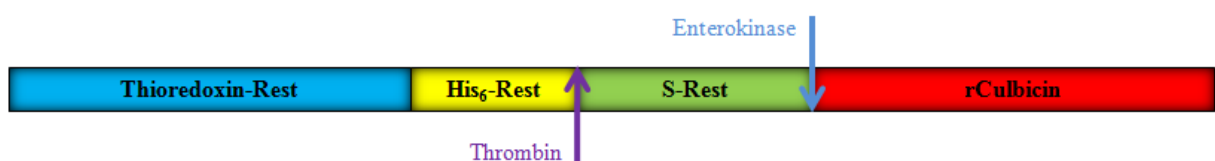


Abbildung 2: Schematisierte Darstellung des Fusionsproteins. Die nicht maßstabsgetreuen Rechtecke geben Anteile am Fusionsprotein wieder. Pfeile kennzeichnen die Schnittstellen von Thrombin und Enterokinase.

2.2 Transformation

Der Expressionsvektor wurde mittels Hitzeschock in den Expressionsstamm *Escherichia coli* C43 (DE3) transformiert. Dazu wurden 50 μ l der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, mit 200 ng Plasmid-DNA versetzt und nachfolgend fünf Minuten auf Eis inkubiert.

Es erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C (Eppendorf Thermomixer Comfort 1,5 ml, Hamburg) und darauffolgend eine schnelle Abkühlung auf Eis für fünf Minuten. Dann wurden der Suspension 500 µl LB-Medium (Luria Bertani-Kapseln [65], MP-Biomedicals, LLC, Illkirch, Frankreich) zugefügt und anschließend bei 37 °C und 850 upm für eine Stunde inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 µl auf eine 1,5 %ige (w/v) Agar-LB-Platte, die 50 µg/ml Ampicillin (Natriumsalz, ≥ 99%, für die Molekularbiologie) enthielt, überführt und über Nacht bei 37 °C im Inkubator (WTC Binder) gehalten.

2.3 Expression von rekombinantem Culbicin

Die Herstellung von rekombinantem Culbicin in LB-Medium wurde nach der bewährten Methode aus der Diplomarbeit des Verfassers dieser Arbeit durchgeführt [66]: Von der Agarplatte des Transformationsansatzes wurde eine einzelne Kolonie selektiert und in 3 ml LB-Medium, welches mit 150 µg Ampicillin versehen war, überführt. Diese Vorkultur wurde 16 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert, um sie anschließend in 300 ml LB-Medium mit 1,5 mg Ampicillin zu überführen und ebenfalls bei 37 °C und 200 upm zu inkubieren. Das Wachstum der Bakterien wurde über die Bestimmung der Extinktion bei 600 nm (engl.: *optical density*, OD₆₀₀) im UV-Spektrophotometer (U-2001, Hitachi Instruments, Japan) kontrolliert. Bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,9 wurde die Kultur mit 1 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG, ≥ 99 %, für die Biochemie) versehen und solange inkubiert, bis die OD₆₀₀ aufgrund der Lyse der Bakterienzellen abnahm. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 10826 g für 30 min (Varifuge 3.0R, Heraeus, Osterode) bei 4 °C sedimentiert.

Für größere Expressionsansätze wurden 300 ml der oben genannten Bakterienkultur über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend in 5 L LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Die Fermentation (Infors, Bottmingen, Schweiz) wurde als *fed-batch* Ansatz durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 5 %ige (v/v) Ammoniaklösung und 1 M Phosphorsäurelösung auf pH 7,0 reguliert. Das Gerät hält selbständig neben dem pH-Wert auch die Temperatur von 37 °C, die Umwälzung bei 650 upm und den Sauerstoffpartialdruck von 40 % konstant. Neben der OD₆₀₀ wurde der Verbrauch an 1,5 M Glucoselösung über Glucosenachweisindikatoren (One Touch Ultra, Life Scan, CA, USA) alle 30 min überprüft. Bei einem OD₆₀₀-Wert von 9 wurde die Expression durch Zugabe von 4,75 g IPTG induziert und weitere 90 min inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien bei 10826 g für 30 min bei 4 °C sedimentiert.

2.3.1 Expression in M9-Minimalmedium

Zur spezifischen Markierung des rCulbicins mit dem ^{15}N -Isotop, wurde die Expression in M9-Minimalmedium vorgenommen (Tabelle 1, [67]). Dazu wurde von einer 1,5 %ige (w/v) Agar-LB-Platte eine einzelne Kolonie in 3 ml LB-Medium, angereichert mit 150 μg Ampicillin, überführt und anschließend für 16 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Diese Kultur wurde in 150 ml markiertes Minimalmedium (Tabelle 1) transferiert und für 20 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Von dieser Kultur wurden 10 ml in 1 L ^{15}N -haltiges Minimalmedium gegeben und anschließend solange bei 37 °C und 200 upm inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,8 detektiert wurde. Dann erfolgten die Induktion mit 1 mM IPTG und eine weitere Inkubation für acht Stunden. Aufgrund der langen Inkubationszeiten der Expressionskulturen wurde für die Antibiotika-Selektion das stabilere Ampicillin-Derivat, Carbenicillin (Dinatriumsalz, $\geq 90\%$, für die Biochemie), verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation bei 10826 g und bei 4 °C für 30 min.

Tabelle 1: Zusammensetzung des M9-Minimalmediums.

Substanz	Konzentration
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	42 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	34 mM
Glucose (Anhydrat)*	10 mM
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Anhydrat)*	15 mM
MgSO_4 (Anhydrat)*	2 mM
Carbenicillin*	100 $\mu\text{g/ml}$

Alle mit * markierten Substanzen wurden nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Für größere Expressionen in Minimalmedium wurde wie in 2.3 beschrieben mehrmals eine 5 L *fed-batch* Fermentation durchgeführt. Dazu wurde eine Bakteriensuspension in 300 ml ^{15}N -haltigem Minimalmedium für 16 h bei 37 °C und 200 upm inkubiert und anschließend in 5 L ^{15}N -haltiges Minimalmedium und in einen Fermenter überführt. Zur Regulation des pH-Wertes wurden 1 M Phosphorsäurelösung und 1 M NatronlaugeLösung verwendet. Bei einer OD_{600} von 0,8 wurde mit 4,75 g IPTG induziert und darauf folgend 8 h inkubiert. Schließlich erfolgte die oben beschriebene Sedimentation der Bakterien.

2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Lämmli [68] mit dem Mini-Protean[®] 3 Elektrophorese-System von der Firma BioRad (CA, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Proteinproben in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit doppelt konzentrierten, reduzierenden Lämmli-Puffer (2 ml Glycerin ($\geq 99,9\%$, Molecular Biology Grade, Calbiochem), 4 ml 10 % (w/v) SDS, 1 ml 2-Mercaptoethanol, 0,002 mg Bromphenolblau, 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 1,5 ml ddH₂O) gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen und bei 200 V in 350 ml Laufpuffer (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, pH 8,3, 1000 ml ddH₂O) elektrophoretisch getrennt (Tabelle 2). Zum Molekulargewichtvergleich wurde der Proteinstandard #SM0431 (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Zum Visualisieren der Proteinbanden wurden die Gele entweder mit Coomassie- (siehe 2.5.1) oder mit Silbernitratlösung gefärbt (siehe 2.5.2).

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.

	Sammelgel (7,5%)	Trenngel (15%)	Trenngel (18%)
Acrylamid : Bisacrylamid (37,5 : 1)	1,25 ml	6 ml	7,2 ml
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8	1,25 ml	-	-
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	-	3 ml	3ml
ddH ₂ O	2,45 ml	2,75 ml	1,55 ml
10% (w/v) SDS	50 μ l	120 μ l	120 μ l
10% (w/v) APS	50 μ l	120 μ l	120 μ l
TEMED	5 μ l	6 μ l	6 μ l

2.5 Färbemethoden

2.5.1 Coomassie-Färbung

Die Polyacrylamidgele wurden im Anschluss an die Gelelektrophorese eine Stunde in 25 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau G250 bei Raumtemperatur gefärbt.

Nachfolgend wurden die Gele in 10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure überführt und bei Raumtemperatur geschwenkt, bis die gewünschte Entfärbung eintrat. Die Nachweisgrenze für Proteine lag bei dieser Färbung bei 200 bis 400 ng pro 0,5 cm Bandengröße [69].

2.5.2 Silberfärbung

Geringe Mengen an Proteinen in einem Polyacrylamidgel wurden durch die Silberfärbung nach folgender Methode bei Raumtemperatur gefärbt:

Die Polyacrylamidgele wurden mindestens eine halbe Stunde, maximal 20 Stunden in 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser abgespült und in 100 ml frisch angesetzter Reduktionslösung (6,8 g Natriumacetat-Trihydrat, 0,314 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat, 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd) 30 min inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Schritte, in denen die Gele zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 10 min in Wasser geschwenkt wurden. Darauf folgte die Silberfärbung der Gele für 30 min in einer Lösung mit 0,1 g Silbernitrat und 54 µl 37 % (v/v) Formaldehyd. Nach zweimaligem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Entwicklung der Proteinbanden in 100 ml Entwicklerlösung (2,5 g Natriumcarbonat, 27 µl 37 % (v/v) Formaldehyd, pH 11,5). Diese Reaktion wurde bei gewünschter Färbung durch Zugabe von 100 ml Stopplösung (1,68 g EDTA, pH 8,0) beendet.

Durch die Silberfärbung werden Proteine in einer Konzentration von 5 bis 30 ng pro 0,5 cm Proteinbande gefärbt [70].

2.6 Reinigung und Isolierung von rCulbicin

Die Bakterienzellsedimente (siehe 2.3) wurden in PBS, versehen mit 0,2 % (v/v) Tween-20, pH 7,4 resuspendiert und im Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD2200, ausgestattet mit einer SH213 G Sonotrode und bestückt mit einem TT13-Titankopf) bei 40 % Leistung 600 ms für eine Minute auf Eis beschallt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (Sorvall Zentrifuge, RC-5B RSC, USA) bei 47850 g und 4 °C für 40 min. Diese Schritte wurden insgesamt zweimal mit und zweimal ohne Tween-20 im PBS-Puffer durchgeführt. Schließlich wurden die gewaschenen und sedimentierten Einschlusskörper in 6 M Guanidin-Hydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen und über Nacht auf dem Rolltisch bei Raumtemperatur

inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 47850 g und 20 °C für 1 h sedimentiert. Der Überstand wurde der Dialyse zugeführt.

2.7 Renaturierung des Fusionsproteins mittels Dialyse

Zur Renaturierung des in chaotroper Umgebung befindlichen Fusionsproteins, wurde durch Dialyse das denaturierende Agens in Gegenwart eines Redoxsystems schonend entfernt. Dazu wurde der Überstand aus 2.6 in eine Slide-A-Lyzer Dialysekassette (Pierce, IL, USA) mit einem molekularem Ausschluss (engl. *molecular-weight cut off*: MWCO) von 3500 Da überführt. Bei größeren Volumina wurde ein Dialyseschlauch (ZelluTrans) mit einem MWCO von 4000 - 6000 Da eingesetzt. Die Dialyse fand zunächst gegen das 200-fache Volumen des Probevolumens an 1 M Guanidin-Hydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 statt. Diesem Puffer wurden 0,2 mM oxidiertes und 2 mM reduziertes Glutathion (jeweils $\geq 98\%$, für die Biochemie) zugefügt. Nach Inkubation für 20 h bei 4 °C wurde der Dialysepuffer gegen das 200-fache Volumen des Probenvolumens an 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 ersetzt und erneut für 20 h bei 4 °C inkubiert.

Abschließend wurde die Probe bei 47850 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert, um die Präzipitate von der Lösung zu separieren. Für die Präzipitate wurde der Vorgang der Renaturierung mittels Dialyse nach Disaggregation in 6 M Guanidin-Hydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 ein weiteres Mal wiederholt. Die Proben mit renaturiertem rCulbicin-Fusionsprotein wurden der Affinitätschromatographie zugeführt.

2.8 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Das Fusionsprotein enthielt einen Hexahistidin-Rest, der eine Trennung von den übrigen löslichen Bestandteilen nach der Renaturierung ermöglichte. Dazu wurden pro Liter der Expressionsansätze 0,5 ml Nickel-NTA-(Nitrilotriessigsäure)-Agarose (Qiagen, Hilden) mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 equilibriert und der Lösung mit renaturiertem rCulbicin-Fusionsprotein zugefügt. Die Suspension wurde 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rolltisch inkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch Filtration an einer geleerten NAP-10-Säule (Amersham biosciences, Uppsala, Schweden) von der Agarose getrennt.

Daraufhin wurde die Nickel-NTA-Agarose dreimal mit je 50 ml 50 mM Tris-HCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0 gespült. Abschließend wurden erst 4 ml 50 mM Tris-HCl, 750 mM Imidazol, pH 8,0, dann erneut 3 ml desselben Puffers hinzugefügt und jeweils für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rolltisch inkubiert.

Die Überstände dieser Suspensionen wurden ebenfalls durch Filtration von der Agarose getrennt. Die beiden Elutionen wurden dem Pufferaustausch zugeführt.

2.9 Pufferaustausch

Zur Überführung von Proteinlösungen in einen anderen Puffer wurden NAP-Säulen nach Angaben des Herstellers verwendet (Amersham biosciences, Uppsala, Schweden). Bei größeren Volumina wurden Dialysekassetten mit einem MWCO von 3500 Da eingesetzt. Die Dialyse fand gegen das 200-fache Volumen des Probevolumens für 20 h bei Raumtemperatur statt. Die Elutionen nach IMAC wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 überführt und die Konzentration an Fusionsprotein in dieser Lösung ermittelt, um die Menge an Enterokinase für die proteolytische Spaltung zu bestimmen.

2.10 Konzentrationsbestimmung von Fusionsprotein und rCulbicin

Zur Bestimmung der Konzentration des Fusionsproteins wurde die Absorption der Proteinlösung in einem Bereich von 320 bis 240 nm mithilfe eines UV-Spektrophotometers bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für verdünnte Lösungen, dass über den spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} eines Proteins, welcher unter Verwendung der Software ProteinCalculator [71] errechnet wurde, die Extinktion E_{280} einer Proteinlösung mit dessen Konzentration c_{Fp} korreliert.

$$c_{Fp} = \frac{E_{280}}{d \cdot \epsilon_{280}}$$

Der spezifische, molare Extinktionskoeffizient für das Fusionsprotein betrug $0,6360 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, bei einer verwendeten Schichtdicke d von 1 cm [72].

Da das prozessierte rCulbicin nicht über die für die Absorption bei 280 nm benötigten Tryptophane und Tyrosine verfügte, wurde die Konzentration über den Bicinchinoninsäure-Test (BCATM-Protein Assay Kit, Pierce, IL, USA) aus der Erstellung einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*: BSA) bestimmt [73].

2.11 Proteolytische Spaltung

Die Lösung mit Fusionsprotein wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml verdünnt. Um das Fusionsprotein proteolytisch zu spalten und prozessiertes, rekombinantes Culbicin zu erhalten, wurden pro 0,3 mg Fusionsprotein 0,1 U Enterokinase (EKMaxTM, Invitrogen, UK) zugefügt und 20 h bei 37 °C und leichtem Schwenken inkubiert. Die Proteolyseprodukte wurden anschließend in 50 mM Natriumacetat, pH 4,4 überführt und der Kationenaustauschchromatographie zugeführt.

2.12 Kationenaustauschchromatographie

Die Lösung nach der proteolytischen Spaltung mit Enterokinase wurde zur Abtrennung des rCulbicins von den übrigen Bestandteilen des Fusionsproteins auf eine in 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 4,4 equilibrierte Source-30S (Amersham biosciences, Uppsala, Schweden) Kationenaustauschsäule bei einer Flussrate von 1 ml/min gegeben. Dazu wurde der Aekta-Explorer (Amersham biosciences, Uppsala, Schweden) als übergeordnete Kontrolleinheit genutzt. Die Absorption wurde bei 280 nm, 260 nm und 214 nm nachgewiesen. Im Anschluss an eine 80-minütige Spülung der Säule nach Probenauftragung, erfolgte eine graduelle Elution mittels eines Natriumchloridgradienten von 0 bis 1 M (ausgedrückt in 0 bis 100 % Ionenstärke). Die Elutionen wurden in 3 ml fraktioniert und mittels SDS-PAGE auf Gehalt an rCulbicin überprüft. Im Anschluss wurden die Fraktionen mit rCulbicin vereint und der Hydrophobizitätschromatographie zugeführt.

2.13 Hydrophobizitätschromatographie

Der pH-Wert der Lösungen mit rCulbicin wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TFA auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Eine SepPak[®] (Vac 6cc, 500 mg, Waters, MA, USA) tC₁₈-Säule wurde zunächst mit 10 ml 84 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA und anschließend mit 10 ml 0,1 % (v/v) TFA gespült und equilibriert. Auf die Säule wurde anschließend das gesamte Volumen der rCulbicin-Lösung zwei Mal nacheinander aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 10 ml 0,1 % (v/v) TFA gespült.

Abschließend erfolgte die Elution des rCulbicins mit 5 ml 84 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA. Das Eluat wurde bei -80 °C eingefroren.

2.14 Gefriertrocknung

Die Lyophilisation der gefrorenen rCulbicin-Proben erfolgte in einer Alpha 2-4 LSC Lyophylle (Christ, Osterode), ausgestattet mit einer Chemie-Hybrid Pumpe RC6 (Vacuubrand, Wertheim), bei 0,035 mbar und bei einer Kondensatortemperatur von -85 °C. Das Lyophilisat wurde im Anschluss in Puffer aufgenommen und eine Stunde vor jedem Versuch bei Raumtemperatur inkubiert.

2.15 Charakterisierung des isolierten rCulbicins

2.15.1 Massenspektrometrie

Die theoretischen Molekulargewichte der Proteinproben wurden zunächst über den ProteinCalculator berechnet. Für rCulbicin errechnete sich ein mittleres Isotopengewicht von 5993,2 Da, für das Fusionsprotein von 23035,4 Da. Für das ¹⁵N-angereicherte rCulbicin ergab sich ein mittleres theoretisches Molekulargewicht von 6064,6 Da.

Zu untersuchende Proben wurden mittels ZipTip-C₁₈ Säulen (Waters, MA, USA) für die Massenspektrometrie vorbereitet, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Elution erfolgte jedoch in 5 µl 85 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA.

Für die MALDI- (*matrix-assisted laser-desorption ionization*) TOF- (*time of flight*) Massenspektrometrie wurden die Proteine zunächst mit einer Matrix von α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure gemischt. Dazu wurden durch Dr. Christoph Gelhaus (Zoologisches Institut, Prof. Dr. M. Leippe, CAU zu Kiel) 0,5 μ l der vorbereiteten Probe sowie 0,5 μ l α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure auf eine Trägerplatte (MTP 384 *target plate ground steel T F*, Bruker, Rheinstetten) aufgetragen.

In einem 4700 Proteomics Analyser-Massenspektrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) wurden die Probenkristalle im Hochvakuum mit einem UV-Laser-Puls bestrahlt, und dadurch ionisiert. Die Ionen passierten einen Spalt in eine feldfreie Vakuum-Flugröhre, den Flugzeitanalysator (TOF, *time of flight*).

Die Ionen besaßen aufgrund unterschiedlicher Ladung/Masse-Verhältnissen verschiedene Geschwindigkeiten, legten die Länge des TOF als Strecke zurück und erreichten daher den Detektor zu verschiedenen Zeiten. Diese Flugzeiten wurden gemessen.

2.15.2 Gradienten RP-HPLC

Der pH-Wert der Fraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie, die ^{15}N -angereichertes rCulbicin enthielten, wurde mit 0,1 % (v/v) TFA auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und der Gradienten-RP-HPLC (engl.: *reversed phase-high performance liquid chromatography*, 880-PU, Jasco, Japan) bei einer Flussrate von 3,5 ml/min zugeführt. Eine VP250/10 Nucleosil 300-7 C_{18} -Säule (Macherey-Nagel, Düren), ausgestattet mit einer VP50/10 Nucleosil 300-7 C_{18} -Vorsäule (Macherey-Nagel, Düren), wurde 5 min mit 62,45 % (v/v) Acetonitril (MeCN)/Wasser, 0,1 % (v/v) TFA equilibriert. Nun erfolgte durch graduelle Zugabe von 0,2 % (v/v) MeCN/Wasser, 0,1 % (v/v) TFA pro Minute eine schrittweise Erhöhung des Gehaltes an Acetonitril in der mobilen Phase. Nach 50-minütiger Trennung des Probengemisches wurde die Säule gereinigt, um noch bindende Bestandteile des Probengemisches zu entfernen. Dazu wurde die Säule innerhalb von drei Minuten auf eine Laufmittelzusammensetzung von 95 % (v/v) MeCN/ H_2O , 0,1 % (v/v) TFA gebracht und unter diesen Bedingungen fünf Minuten gespült. Abschließend erfolgte eine Änderung der Laufmittelzusammensetzung zu 2 % (v/v) MeCN/ H_2O , 0,1 % (v/v) TFA innerhalb von drei Minuten mit einer Spülung von 5 Minuten. Die Detektion der eluierten Bestandteile erfolgte bei 214 nm (875-UV, Jasco, Japan).

2.15.3 Circular dichroismus-Spektropolarimetrie

Zur Untersuchung der Konformation des rCulbicins wurde die Absorption linkszirkular und rechtszirkular polarisierter Lichtanteile an chiralen Zentren des Peptidrückgrats abhängig von der Art und Struktur des Peptids ausgenutzt. Dazu wurde die in einer Küvette unterschiedlicher Schichtdicke (je nach Konzentration der rCulbicinprobe) befindliche Probe in den zirkular polarisierten Lichtstrahl eines CD-Spektropolarimeters (Jasco, Japan) gebracht. Das resultierende Licht nach Probendurchgang war elliptisch polarisiert, was in der sogenannten *mean-residue-weight* Elliptizität ausgedrückt wurde:

$$[\theta]_{\text{MRW}, \lambda} = \frac{\theta_{\lambda} \cdot \text{MW}}{100 \cdot d \cdot c \cdot N_{\text{A}}}$$

Der Term MW/N_{A} wird auch als *Mean-Residue Weight* (MRW) bezeichnet und führt zu einer Normalisierung des CD-Spektrums. Da Proteine sich vor allem in der Anzahl der für den Circular dichroismus relevanten Peptidbindungen unterscheiden, mussten alle CD-Spektren für den Vergleich mit anderen Proteinen normalisiert werden. Bei N Aminosäuren lagen $N - 1$ Peptidbindungen vor. Daneben beschreibt MW die Masse des Proteins (g/mol), d die Schichtdicke der Küvette (cm), c die Konzentration der Proteinprobe (g/cm³) und θ_{λ} die Elliptizität bei der jeweiligen Wellenlänge im CD-Spektrum (mgrad).

Die Spektren wurden, falls nicht anders erwähnt, in einem Bereich von 196 bis 250 nm bei Raumtemperatur und einer spektralen Bandbreite von 2 nm aufgenommen. Das CD-Spektropolarimeter wurde nach der Methode von Chen und Yang kalibriert [74]. Die gemessene Elliptizität des Puffers, in dem sich die rCulbicinprobe befand, wurde von dem Spektrum des Proteins subtrahiert.

2.16 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

2.16.1 Probenvorbereitung

Für die NMR-spektroskopischen Aufnahmen wurde das lyophilisierte, ¹⁵N-angereicherte rCulbicin in unterschiedlichen Pufferbedingungen gelöst und in ein Shigemi-Röhrchen

(Shigemi Co., LTD, Tokyo, Japan) überführt. Tabelle 3 fasst die Bedingungen und Konzentrationen der Proben für die NMR-spektroskopischen Experimente zusammen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der rCulbicinproben zur Durchführung der NMR-spektroskopischen Experimente.

pH-Wert	Konzentration	Pufferbedingungen
pH 5,4	1,0 mM	50 mM Natriumphosphat, 7 % (v/v) D ₂ O, 0,001 % (w/v) Natriumazid
pH 8,0	0,7 mM	50 mM deuterierter Tris/HCl-Puffer, 7 % (v/v) D ₂ O, 0,001 % (w/v) Natriumazid
pH 8,0*	0,7 mM	25 mM deuterierter Tris/DCl-Puffer, 100 % D ₂ O
pH 3,5	0,2 mM	50 mM deuterierter Natriumacetatpuffer, 7 % (v/v) D ₂ O, 0,001 % (w/v) Natriumazid
pH 5,4*	0,2 mM	50 mM Natriumphosphat, 7 % (v/v) D ₂ O, 0,001 % (w/v) Natriumazid

Der mit einem Stern markierte pH-Wert von 8,0 weist auf 100 % D₂O hin. Bei dem markierten pH-Wert von 5,4 liegt eine rCulbicinprobe vor, die mit DEPC (siehe 2.17) modifiziert wurde. Das Volumen aller Proben betrug 300 µl.

Alle Pufferlösungen wurden vor der Rekonstitution des Lyophilisats durch einen Minisart-Celluloseacetat-Filter (Sartorius AG, Göttingen, mit 0,20 µm Porengröße) steril filtriert.

2.16.2 NMR-Experimente

Zur Aufklärung der dreidimensionalen Raumstruktur des rCulbicins wurden mit der ¹⁵N-angereicherten rCulbicinprobe zweidimensionale homonukleare NOESY- (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) und TOCSY- (*Total Correlation Spectroscopy*) Experimente, zweidimensionale ¹H-¹⁵N-HSQC- (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) sowie dreidimensionale ¹⁵N-editierte NOESY-HSQC- und ¹⁵N-editierte TOCSY-HSQC- Experimente bei unterschiedlichen Mischzeiten durchgeführt. Die Experimente wurden bei einem pH-Wert von 5,4 auf einem Bruker Avance 750 MHz, ausgestattet mit einer 5 mm TXI ¹H/²H-¹³C/¹⁵N *triple-gradient probe*, von Dr. Rainer Wechselberger (Utrecht Universität, Arbeitsgruppe Prof. R. Boelens) bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen. Alle anderen Experimente wurden von Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie, CAU zu Kiel) auf einem Bruker Avance 600 MHz, ausgestattet mit einer aktiv abgeschirmten Z-*gradient triple resonance cryoprobe*, aufgenommen. Die einzelnen NMR-Experimente, sowie deren Mischzeiten und komplexe Datenpunkte sind in der folgenden Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: NMR-Experimente.

Experimente	Mischzeiten (ms)	Spektrale Breite (Hz)			Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)		
		F ₁	F ₂	F ₃	t ₁	t ₂	t ₃
pH 5,4							
2D-NOESY [75, 76]	60, 120, 200, 300	7880	7880	-	1956(¹ H)	1956(¹ H)	-
2D-TOCSY [77]	20, 40, 80	7880	7880	-	1956(¹ H)	1956(¹ H)	-
2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC [78, 79, 80]	-	2540	1977	-	512(¹ H)	1024(¹⁵ N)	-
3D- ¹⁵ N-NOESY- HSQC [81, 82, 83]	200	8251	1977	2332	256(¹ H)	128(¹⁵ N)	470(¹ H)
3D- ¹⁵ N-TOCSY- HSQC [81, 82, 83]	80	8251	1977	2332	256(¹ H)	128(¹⁵ N)	470(¹ H)
pH 8,0							
3D- ¹⁵ N-NOESY- HSQC [81, 82, 83]	150	7199	1581	7199	1024(¹ H)	64(¹⁵ N)	129(¹ H)
3D- ¹⁵ N-TOCSY- HSQC [81, 82, 83]	60	7199	1581	7199	1024(¹ H)	32(¹⁵ N)	256(¹ H)
2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC [78, 79, 80]	-	8418	1581	-	1024(¹ H)	256(¹⁵ N)	-
pH 8,0*							
2D-NOESY [75, 76]	100, 150, 250	7211	6001	-	4096(¹ H)	513(¹ H)	-
2D-TOCSY [77]	60	7211	7211	-	4096(¹ H)	348(¹ H)	-
2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC [78, 79, 80]	-	8418	1581	-	1024(¹ H)	256(¹⁵ N)	-
pH 3,5							
2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC [78, 79, 80]	-	8418	1581	-	1024(¹ H)	256(¹⁵ N)	-
pH 5,4*							
2D- ¹ H- ¹⁵ N-HSQC [78, 79, 80]	-	8418	1581	-	1024(¹ H)	256(¹⁵ N)	-

*Der mit einem Stern markierte pH-Wert von 8,0 weist auf 100 % D₂O hin. Bei dem markierten pH-Wert von 5,4 liegt eine rCulbicineprobe vor, die mit DEPC (siehe 2.17) modifiziert wurde.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen wurden auf das interne Wassersignal referenziert. Die Stickstoff(¹⁵N)-Verschiebungen wurden indirekt zum internen Wassersignal über das gyromagnetische Verhältnis bestimmt [84]. Alle Spektren wurden mit Hilfe des Programmes NMRPipe [85] prozessiert. Die Analyse der Spektren erfolgte mit den Programmen Sparky [86] und NMRView [87].

2.16.3 Identifikation des Spinsystems und sequenzspezifische Zuordnung

Die Zuordnung der intraresidualen Resonanzsignale jedes Spinsystems des rCulbicins erfolgte durch die Analyse der zweidimensionalen homonuklearen TOCSY- und der dreidimensionalen ^{15}N -editierten TOCSY-HSQC-Spektren. Als Übersicht und als Basis für die sequenzspezifische Zuordnung nach Identifikation der Aminosäuren wurden die Informationen in das 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum überführt. Die sequenzspezifische Zuordnung wurde anhand der dreidimensionalen ^{15}N -editierten NOESY-Spektren durchgeführt.

2.16.4 Zuordnung strukturspezifischer Signale

Die aufgrund der räumlichen Struktur hervorgerufenen Signale (*cross peaks*) wurden in den zweidimensionalen homonuklearen NOESY- sowie in den dreidimensionalen ^{15}N -editierten NOESY-Spektren analysiert. Maßgeblich für die Interpretation der sogenannten *long-range* Kontakte der aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren des rCulbicins waren die zweidimensionalen homonuklearen NOESY-Spektren.

2.16.5 Strukturberechnungen

Die Strukturberechnungen wurden unter Verwendung des Programms CYANA (*Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications*) durchgeführt [88]. Dazu wurden die Abstandsbegrenzungen der Protonen bei pH 5,4 und bei pH 8,0, die aus den zweidimensionalen homonuklearen NOESY- und dreidimensionalen ^{15}N -editierten NOESY-HSQC-Spektren stammten, nach ihrer relativen Intensität in stark, mittel und schwach klassifiziert, was als Begrenzungen von 1,8 – 2,8 Å, 2,8 – 3,4 Å und 3,4 – 5,0 Å definiert wurde. Die Intensitäten der Methylgruppen wurden halbiert. Die zehn Cysteine wurden als fünf Cystine in die Berechnung integriert. Aus ihnen ergaben sich weitere 30 Abstandsbeschränkungen interatomarer Abstände von $2,0 \leq d(\text{S}_{\gamma_i}, \text{S}_{\gamma_j}) \leq 2,1$ Å; $3,0 \leq d(\text{S}_{\gamma_i}, \text{C}_{\beta_j}) \leq 3,1$ Å; $3,0 \leq d(\text{C}_{\beta_i}, \text{S}_{\gamma_j}) \leq 3,1$ Å.

Die oberen und unteren Abstandsbeschränkungen bei pH 5,4 sowie bei pH 8,0 wurden in die Strukturberechnung implementiert und 400 Strukturen berechnet. Für jede Struktur wurde ein Wert der sogenannten Zielfunktion (engl.: *target function*) angegeben.

Diese gibt einen Hinweis über die potentielle Energie V eines Systems. Die vollständige Funktion [89, 90] ist beschrieben als:

$$V = \sum_{c=u,l,v} w_c \sum_{(\alpha,\beta) \in I_c} (d_{\alpha\beta} - b_{\alpha\beta})^2 + w_a \sum_{i \in I_a} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta_i}{\Gamma_i} \right)^2 \right] \Delta_i^2$$

Der letzte Summenterm bezieht sich auf Abstandbeschränkungen, welche durch Torsionswinkel vorgegeben werden können. Da diese in die Berechnung nicht integriert wurden, war nur der erste Term für diese Berechnungen relevant: Die oberen und unteren aktuellen experimentellen Beschränkungen, $b_{\alpha\beta}$, mit dem Abstand $d_{\alpha\beta}$, zweier Atome α und β wurden berücksichtigt. I_u , I_l und I_v beschreiben eine Sammlung von Atompaares (α , β) mit oberen (I_u), unteren (I_l) oder van der Waals (I_v) Distanzbindungen (sowie I_a für die Torsionswinkel). Die Faktoren w_u , w_l und w_v (sowie w_a für die Torsionswinkel) waren Wichtungsfaktoren für die jeweiligen Beschränkungen. Die Formel ließ sich für die hier durchgeführten Berechnungen vereinfachen, mit K_{NOE} als zusammenfassenden Faktor:

$$V = \sum_{(\alpha,\beta)\text{Paare}} K_{\text{NOE}} (d_{\alpha\beta} - b_{\alpha\beta})^2$$

Die 20 besten Strukturen, orientiert an den niedrigsten Werten der Zielfunktionen, wurden ausgewählt und ein Ensemble generiert, welches die Abstandsbeschränkungen mit den geringsten Abweichungen wiedergab. Mit Hilfe des Programms WHATIF [91] wurde eine mittlere Struktur errechnet, die mit dem Programm GROMOS [92] im Anschluss energieminiert wurde.

Die graphischen Darstellungen erfolgten mit den Programmen MOLMOL [93] und GRASP [94].

2.16.6 Disulfidverbindungen

Die Verbindungen der zehn Cysteine des rCulbicins wurden experimentell anhand der Strukturberechnungen aufgeklärt. Dazu wurden in den ersten Berechnungen keine Cysteine vorgegeben. Aufgrund der Verteilung der Cysteine in der Tertiärstruktur des Culbicins wurden weitere Strukturberechnungen durchgeführt, bei denen alle Möglichkeiten der Verknüpfung implementiert wurden.

Anhand der Anzahl der Strukturverletzungen, der berechneten mittleren Abweichung (r.m.s.d. = *root mean square deviation*) und der Verteilung der Torsionswinkel im Ramachandran-Diagramm wurden die energetisch günstigsten Disulfidverbindungen für die Struktur des rCulbicins bestimmt. Das entscheidende Kriterium für die Auswahl der richtigen Verknüpfung wurde im Vergleich zur Strukturberechnung ohne Implementierung einer Disulfidbindung gewählt. Alle drei genannten qualitativen Werte mussten sich durch die Vorgabe der Disulfidbindungen verbessern.

2.17 Modifikation von rCulbicin mit DEPC

Es wurden jeweils 350 µg gefriergetrocknetes, ¹⁵N-angereichertes sowie unmarkiertes rCulbicin in 500 µl Natriumphosphatpuffer, pH 6,0 rekonstituiert und mit der 200-fachen molaren Menge (entspricht 11,7 µMol) an Diethylpyrocarbonat (DEPC, ≥ 97 %, für die Biochemie) für 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Lösung durch eine NAP-10 Säule nach Angaben des Herstellers (Amersham biosciences, Uppsala, Schweden) in einen 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,4 überführt. Die Modifikation wurde mittels der Massenspektrometrie verifiziert. Die modifizierte, unmarkierte rCulbicinprobe wurde der Gelfiltration, die modifizierte, ¹⁵N-angereicherte Probe der NMR-Spektroskopie zugeführt.

2.18 Präparation von Liposomen

Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurden als große, unilamellare Vesikel (LUVs, *large unilamellar vesicles*) nach Pick [95] hergestellt indem 2,5 mg Phosphatidylcholin (aus Hühnerei, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) sowie Phosphatidylglycerin (aus Hühnerei, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) in 1,5 ml Chloroform gelöst wurden. Diese Lösungen wurden im Rotationsverdampfer (Rotavapor R-114, Büchi Labortechnik AG, Schweiz) im schwachen Vakuum bei 40 °C eingengt, so dass sich ein dünner Lipidfilm an der Glaskolbenwand bildete. In den Glaskolben wurden 270 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,4 zugegeben, der Lipidfilm mittels einer sterilen Einmalimpföse resuspendiert und anschließend die Suspension eine Minute geschüttelt.

Die so vorbereitete Probe wurde vier Mal abwechselnd in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren und sofort danach bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Zwischen den Zyklen wurden die Proben 30 s geschüttelt. Im Anschluss an die FAT-Methode (engl.: *freeze and thaw*) wurden der Suspension 280 µl des gleichen Puffers zugefügt. Diese Suspension wurde so lange auf Eis bei 40 % Leistung und 600 ms Intervallen beschallt, bis die Trübung verschwand.

Die so hergestellten Liposomen wurden nun mittels einer NAP-5-Säule gereinigt. Dazu wurden 0,5 ml der Liposomensuspension auf die equilibrierte Säule aufgetragen und zunächst mit 0,3 ml des Puffers eluiert. Dieses Eluat wurde verworfen. Eine nun folgende Elution durch Zugabe von 0,35 ml Puffer wurde aufgefangen und anschließend für 20 h bei Raumtemperatur gegen das 200-fache Volumen des gleichen Puffers dialysiert. Diese Suspension wurde in unterschiedlichen Verdünnungen für die weiteren Versuche verwendet.

2.19 Untersuchung der Oligomerisierungszustände

2.19.1 Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung der Oligomerisierungszustände des rCulbicins in Abhängigkeit des pH-Wertes wurde das Protein in 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 3,5 oder 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,4 oder in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 überführt. Diese Lösungen wurden dann auf eine im jeweiligen Puffer equilibrierte *Hiload Superdex Peptide 75 16/60* (Amersham biosciences, Uppsala, Schweden) aufgetragen und bei einer Flussrate von 1 ml/min, bei 4 °C eluiert (Aekta-Explorer, Amersham biosciences, Uppsala, Schweden). Das Elutionsprofil wurde bei 214 nm spektroskopisch aufgezeichnet. Als Größenstandards für die jeweiligen pH-Werte dienten die Proteine Ovalbumin (49 kDa, pI 4,6), Carboanhydrase (29 kDa, pI 7,0), Ribonuclease A (13,7 kDa, pI 9,6) und Aprotinin (6,5 kDa, pI 10,5) (GE Healthcare, München). Carboanhydrase bei einem pH-Wert von 3,5 und Aprotinin bei einem pH-Wert von 8,0 konnten nicht als Standard dienen, da sie unter diesen Bedingungen präzipitierten. Von den erhaltenen Kalibriergeraden und der daraus resultierenden Geradengleichung wurde das hydrodynamische Molekulargewicht des rCulbicins beim jeweiligen pH-Wert errechnet.

2.19.2 Quervernetzungsexperiment

Für die Quervernetzungsexperimente wurden 30 µg des rCulbicins in Gegenwart von PG- (L- α -Phosphatidyl-DL-glycerin) und PC- (L- α -Phosphatidyl-DL-cholin) Liposomen bei unterschiedlichen Verhältnissen von Lipidsuspension zu Protein (v/w) in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,4, für 1 h bei 25 °C und 400 upm inkubiert [96]. Die Suspension wurde im Anschluss für 1 h bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge (Optima LE 80K Ultracentrifuge, ausgestattet mit einem 70.Ti Rotor, Beckman Instruments Inc., USA) bei 4 °C zentrifugiert. Der lösliche Teil wurde abgenommen und das Sediment zweimal mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,4 gewaschen, bevor es in demselben Puffer resuspendiert wurde. Nun erfolgte die Zugabe des Quervernetzers EDAC (1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid, Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA) in einem 100-fachen molaren Überschuss und eine anschließende Inkubation bei 25 °C. Diese wurde zu bestimmten Zeitpunkten durch Zugabe von 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 gestoppt, oder bei unterschiedlichen Lipidkonzentrationen für 2 h inkubiert und schließlich gestoppt. Als Kontrollen dienten rCulbicinproben ohne Zugabe von EDAC oder Liposomensuspension. Die Proben wurden elektrophoretisch getrennt (siehe 2.4) und die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe 2.5.2). Ebenso wurde der Versuch in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 in Gegenwart von PG-Liposomen durchgeführt. Als Quervernetzer diente DSS (Disuccinimidyl-Suberat, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) in einem 100-fachen molaren Überschuss.

2.20 Cytotoxizitätsexperiment

Zur Messung der Cytotoxizität von rCulbicin gegenüber SH-SY5Y humanen Neuroblastomazellen (DSMZ Nummer: ACC 209) [97] wurde maßgeblich die Methode von Herbst *et al.* verwendet [98]. SH-SY5Y-Zellen wurden adhärent in DMEM-Medium (PAA, Pasching, Österreich), welches mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 *units/ml* Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versehen war, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden nach 5 min Inkubation mit 0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA abgelöst und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden sie in einer 96-*well*-Platte zu je 2 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung ausgesät.

Nach 16 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen zweimal mit Puffer gespült und folgend mit 80 µl der Proteinlösungen versehen. Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor 20 µl 10 % *Celltiter-blue*-Reagenz (Promega, Madison WI, USA) zugegeben und weiter inkubiert wurde. Als Kontrolle diente Melittin (Sigma-Aldrich). Für die maximale Lyse (100 % Wert) der SH-SY5Y-Zellen wurde 1 % (v/v) Triton X-100-Lösung im jeweiligen Puffer verwendet oder Puffer ohne Zusatz von Triton (0 % Wert) verwendet. Lebende Zellen reduzieren den Farbstoff *Celltiter-blue*, was zu einer nachweisbaren Intensitätszunahme der Fluoreszenz (experimenteller Wert) bei einer Anregungswellenlänge von 538 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm führte. Demnach errechnete sich die cytotoxische Aktivität nach:

$$\text{Cytotoxizität (\%)} = 100 \cdot \left(\frac{0 \text{ \% Wert} - \text{experimenteller Wert}}{0 \text{ \% Wert} - 100 \text{ \% Wert}} \right)$$

Als experimentelle Puffer dienten 20 mM MES-Puffer, pH 5,5, denen 150 mM NaCl oder 100 mM NaCl und 100 mM Glucose, oder 50 mM NaCl und 200 mM Glucose oder 300 mM Glucose zugesetzt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Expression, Reinigung und Renaturierung

Die Expression des ^{15}N -angereicherten rCulbicins wurde in M9-Minimalmedium durchgeführt. Zum Vergleich sind in Abbildung 3 die Expressionen in *E. coli* C43 (DE3) in LB-Medium und M9-Minimalmedium gegenübergestellt. Die Mengen der aufgetragenen Bakterienlysate waren in allen Fällen equivalent. Während in LB-Medium eine Stunde nach Induktion keine weitere Intensitätszunahme in Höhe des Fusionsproteins zu beobachten war, erfolgte die Expression in Minimalmedium auch acht Stunden nach Induktion nur marginal. Infolgedessen war keine Proteinbande in Höhe des Fusionsproteins nachzuweisen. Dennoch konnte aus den Expressionsansätzen ^{15}N -angereichertes Fusionsprotein gewonnen werden (Abbildung 3, Spur A und B).

Das in Einschlusskörpern aggregierte, ^{15}N -angereicherte Fusionsprotein wurde mit Hilfe des chaotropen Guanidin-Hydrochlorids solubilisiert und anschließend mittels Dialyse renaturiert. Nach Renaturierung konnte das Fusionsprotein mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie von den meisten anderen Bestandteilen getrennt werden (Abbildung 3, Spur B).

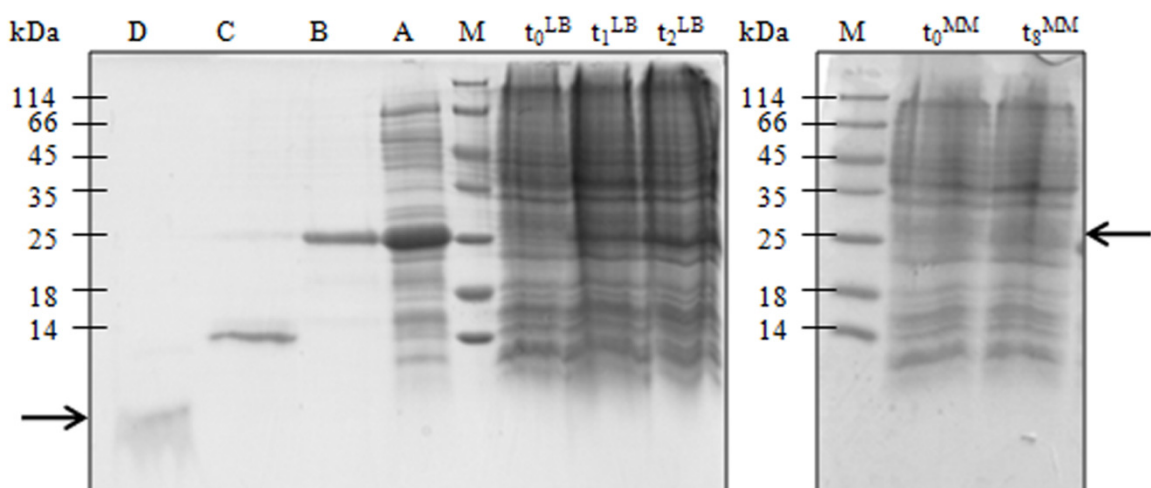


Abbildung 3: Rekombinante Expression und Reinigung von rCulbicin. Dargestellt sind Aliquots aus den Expressionsansätzen in LB-Medium vor Induktion mit IPTG (t_0^{LB}) sowie 1 h und 2 h nach Induktion (t_1^{LB} und t_2^{LB}) sowie in Minimalmedium vor Induktion (t_0^{MM}) und 8 h nach Induktion (t_8^{MM}). Das Fusionsprotein ist im Vergleich zum Molekulargewichtsmarker (M) bei einer Höhe von 25 kDa zu erwarten (Pfeil oben). Weiterhin sind die löslichen Bestandteile nach Renaturierung mittels Dialyse (A), nach IMAC (B), nach proteolytischer Spaltung mittels Enterokinase (C, siehe Abbildung 4 A, II) und die Fraktion mit ^{15}N -angereichertem rCulbicin nach Kationenaustauschchromatographie (Pfeil unten, D, siehe Abbildung 4 A, I) dargestellt.

Das ^{15}N -angereicherte rCulbicin wurde nun vom Rest des Fusionsproteins durch die Endopeptidase Enterokinase proteolytisch abgespalten und der Kationenaustauschchromatographie zugeführt. Die Analysen der Fraktionen I und II aus Abbildung 4 A sind in Abbildung 3, Spur C und D dargestellt. Die Kationenaustauschmatrix wurde 80 min equilibriert und die Proteolyseprodukte anschließend gebunden und gewaschen. Danach erfolgte die Elution des ^{15}N -angereicherten rCulbicins nach 125 Minuten (Abbildung 4 A, I).

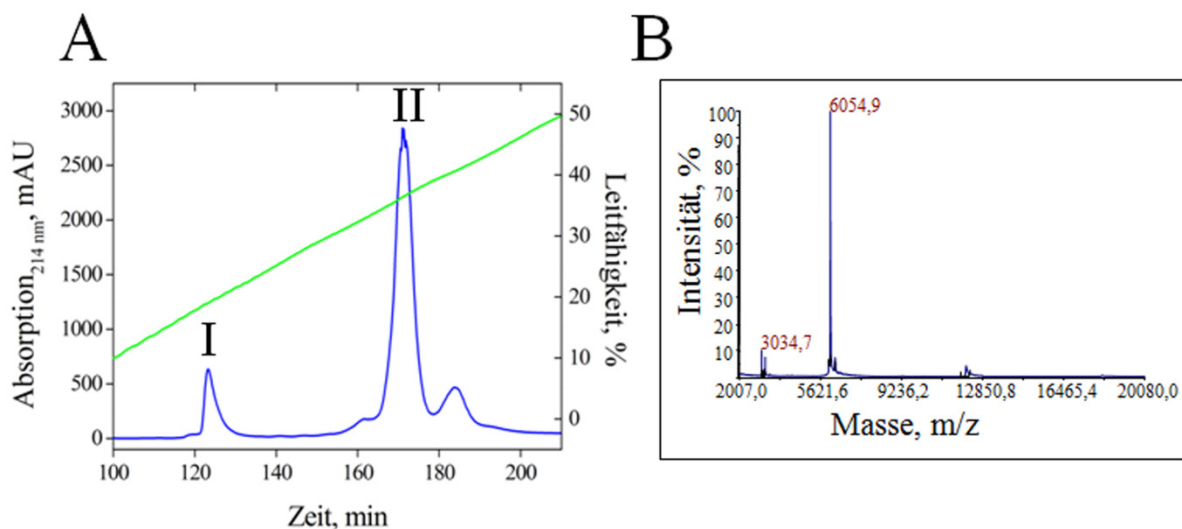


Abbildung 4: Kationenaustauschchromatogramm nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins und Massenspektrum von ^{15}N -angereichertem rCulbicin. A) Nach 80-minütiger Equilibrierung und Bindung der Proteolyseprodukte bei einem pH-Wert von 4,4 eluierte das ^{15}N -angereicherte rCulbicin nach 125 min bei einer Leitfähigkeit von 20% (I, siehe Abbildung 3, Spur D). B) Massenspektrum des gereinigten ^{15}N -angereicherten rCulbicins.

Die Masse des ^{15}N -angereicherten rCulbicins wurde im Massenspektrometer bestimmt. Das mittlere theoretische Molekulargewicht des ^{15}N -angereicherten rCulbicins ergab 6064,6 Da. Das experimentell ermittelte mittlere Isotopengewicht des einfach geladenen Moleküls betrug 6054,9 (± 2) m/z und offenbarte unter Berücksichtigung der Ladung eine Differenz von *circa* 10 Da zwischen theoretischer und experimentell ermittelter mittlerer Masse (Abbildung 4 B). Damit wird nahegelegt, dass alle Sulfhydrylgruppen der zehn Cysteine an der Ausbildung von Disulfidbindungen zu fünf Cystinen beteiligt waren.

3.2 Untersuchung auf einheitliche Disulfidverknüpfungen

Die Fraktionen, die nach der Kationenaustauschchromatographie das ^{15}N -angereicherte rCulbicin enthielten, wurden der RP-HPLC zugeführt, um zu untersuchen, ob sich während der Reinigungs- und Renaturierungsprozedur unterschiedliche Disulfidisomere gebildet hatten. Mehrere Isoformen eines Proteins wären an unterschiedlichen Retentionszeiten auf der RP-HPLC zu erkennen. Die Probe mit ^{15}N -angereichertem rCulbicin eluierte nach 25 min bei einer Laufmittelzusammensetzung von 67,45 % (v/v) MeCN/ H_2O , 0,1% TFA als homogenes Absorptionsmaximum. Das Chromatogramm lieferte keinen Hinweis auf mögliche Disulfidisomere innerhalb des ^{15}N -angereicherten rCulbicins (Abbildung 5).

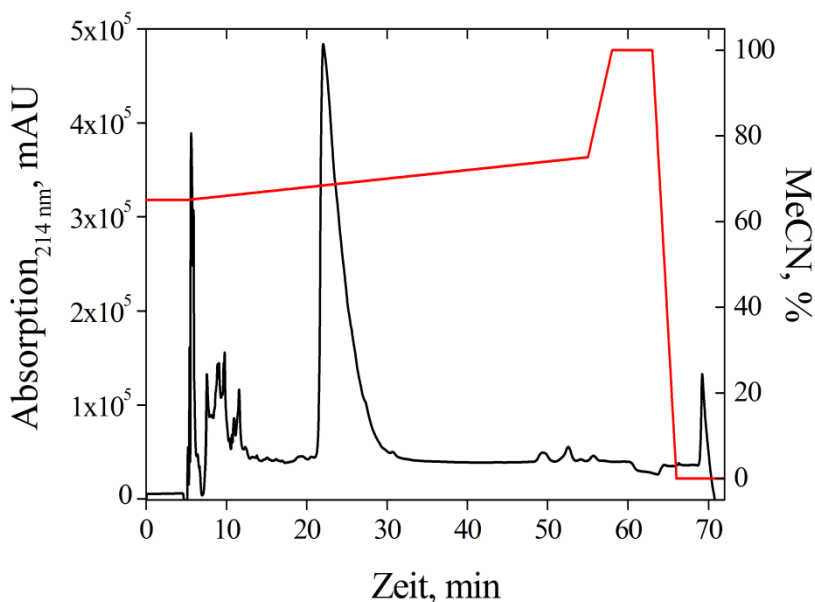


Abbildung 5: Darstellung des RP-HPLC-Laufes von ^{15}N -rCulbicin. Nach 5-minütiger Equilibrierung eluierte das ^{15}N -angereicherte rCulbicin nach weiteren 20 min als homogenes Absorptionsmaximum. Da die Absorption bei 214 nm angezeigt wurde, kann die Elution der Salze zwischen den Minuten 6 und 15 beobachtet werden.

3.3 Einfluss der chemischen Modifikation von Histidinresten mit DEPC

Das rCulbicin wurde zur Modifikation der Histidine mit Diethylpyrocarbonat bei einem pH-Wert von 6,0 inkubiert. Bei dieser Reaktion wurde das Stickstoffatom (HN^1) des Imidazolrings der Histidine mit einer Carboethoxy-Gruppe (73 Da) kovalent verbunden. Dadurch kann der Imidazolring an diesem Stickstoffatom nicht mehr protoniert werden.

Nach der Reaktion wurde die Modifikation mittels Massenspektrometrie verifiziert. Abbildung 6 zeigt das Massenspektrum des mit DEPC modifizierten, unmarkierten rCulbicins. Das mittlere Molekulargewicht von $6054,2 (\pm 2)$ m/z zeigt das monosubstituierte, $6126,4 (\pm 2)$ m/z das disubstituierte und $6199,2 (\pm 2)$ m/z das trisubstituierte Molekül. Nach der Reaktion liegt rCulbicin vor allem mono- und disubstituiert vor. An welchen Histidinen diese Modifikation vorlag, blieb bisher ungeklärt.

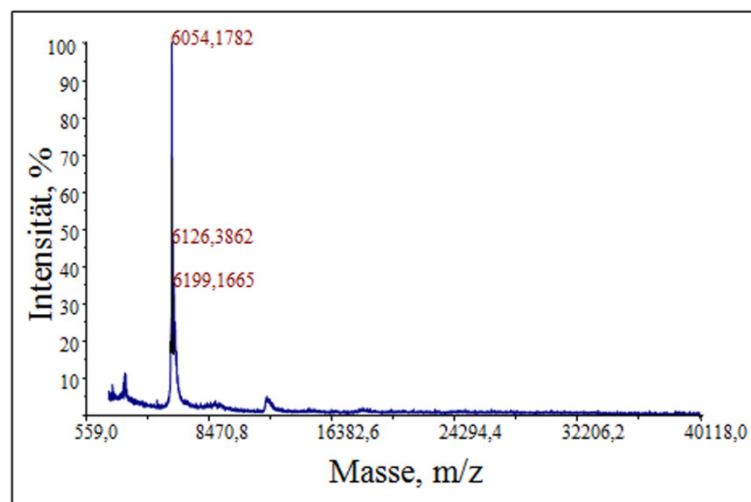


Abbildung 6: Massenspektrum des mit DEPC modifizierten, unmarkierten rCulbicins.

3.4 Sekundärstrukturanalyse von Culbicin

Die Analyse der Sekundärstruktur des rCulbicins fand bei unterschiedlichen pH-Werten im CD-Spektropolarimeter statt. Die CD-Spektren zeigten einen Verlauf, der typisch für hauptsächlich α -helikale Proteine ist. In Abbildung 7 sind die CD-Spektren des rCulbicins bei den pH-Werten 3,5 sowie 5,4 und 8,0 und des Weiteren das CD-Spektrum des mit DEPC modifizierten rCulbicins bei einem pH-Wert von 5,4 dargestellt.

Es ließen sich nur marginale Unterschiede in den Spektren bei unterschiedlichen pH-Werten feststellen. Das rCulbicin zeigte bei allen pH-Werten die gleiche α -helikale Konformation. Auch die Modifikation mit DEPC zeigte keinen Einfluss auf die Konformation des Proteins.

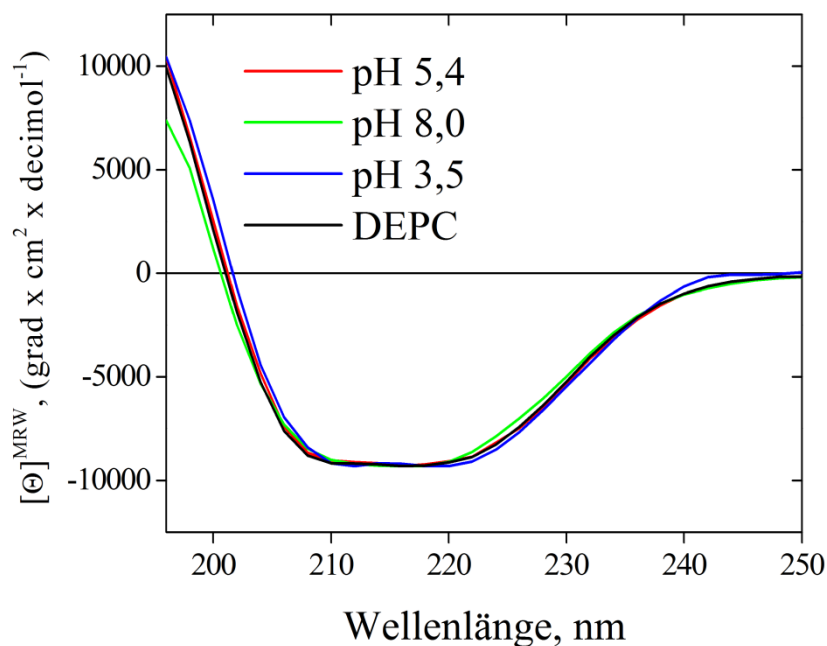


Abbildung 7: CD-Spektren von rCulbicinproben. Das rCulbicin wurde im CD-Spektropolarimeter bei den pH-Werten 3,5 (blau), 5,4 (rot) und 8,0 (grün) von 196 – 250 nm gemessen. Ebenso wurde die Konformation des mit DEPC modifizierten rCulbicins bei einem pH-Wert von 5,4 analysiert (schwarz).

3.5 Aufklärung der Tertiärstruktur des Culbicins

Zu Beginn wurden die NMR-Spektren des monomeren rCulbicins bei einem pH-Wert von 5,4 ausgewertet. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die folgenden Beschreibungen auf die Experimente bei pH 5,4.

3.5.1 Die sequenzspezifische Zuordnung

Für die sequenzspezifische Zuordnung wurden zunächst die Resonanzsignale aus den aufgenommenen NMR-Spektren den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet. Dazu wurden die TOCSY-Experimente ausgewertet (siehe 3.5.2). Schließlich dienten die NOESY-Spektren als wichtigstes Werkzeug bei der Zuordnung und der Aufklärung der Tertiärstruktur des rCulbicins (siehe 3.5.3).

3.5.2 Die TOCSY-Experimente

Intraresiduale Protonensignale wurden über die homonuklearen, zweidimensionalen TOCSY-Spektren bei verschiedenen Mischzeiten und über die dreidimensionalen, ^{15}N -editierten TOCSY-HSQC-Spektren ausgewertet. Wegen der skalaren Kopplung eines Spinsystems sind im TOCSY-Experiment bei gegebener Resonanzfrequenz nahezu alle Protonen einer Aminosäure zu identifizieren. In Abbildung 8 ist ein homonukleares 2D-TOCSY-Spektrum bei einer Mischzeit von 80 ms gezeigt. Entlang der vertikalen Resonanzlinie können die Spinsysteme den Frequenzen der Kreuzsignale zugeordnet werden.

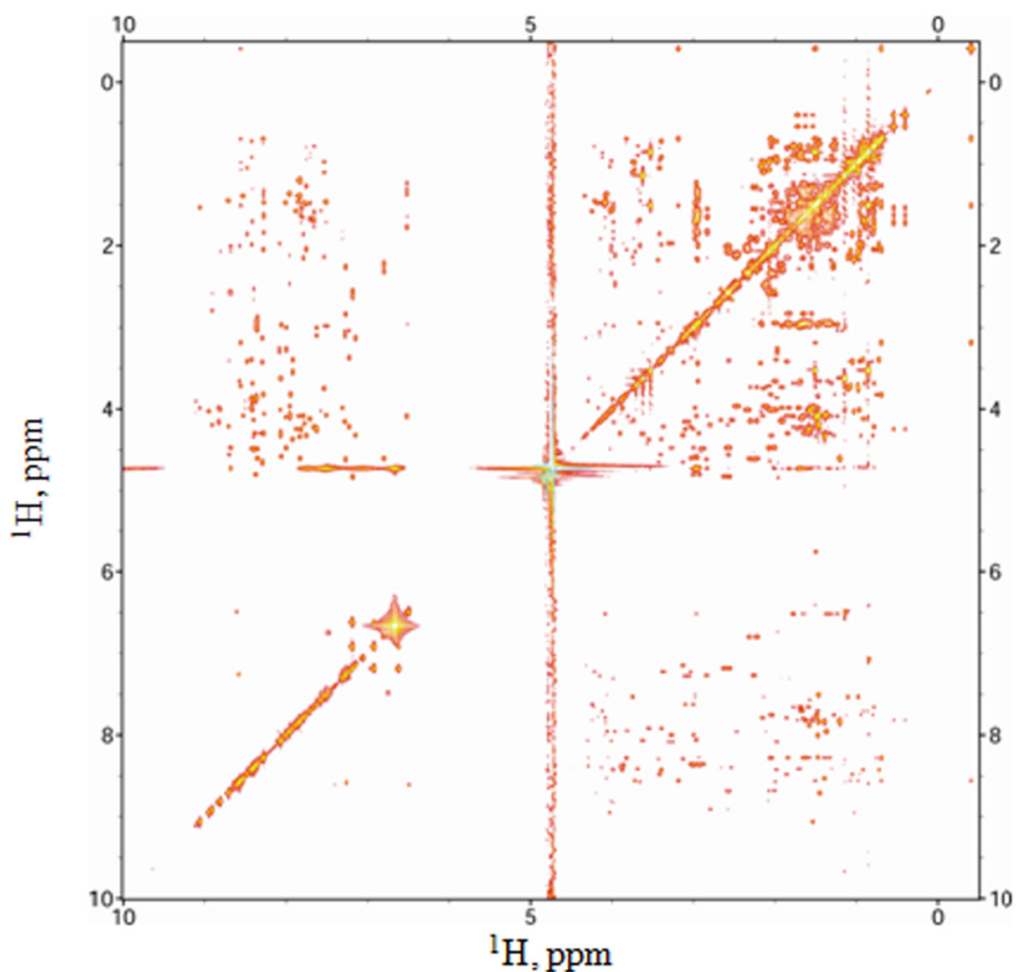


Abbildung 8: 2D- ^1H - ^1H -TOCSY-Spektrum von rCulbicin.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen vieler Aminosäuren sind charakteristisch, aber nur für die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Lysin, Isoleucin und Threonin eindeutig zuzuordnen [59].

Beispielsweise bilden die Verschiebungen der α - und β -Protonen sowie der γ -Protonen der beiden Methylreste der Seitenkette des Valins 32 ein charakteristisches Signalmuster, das für die Kreuzsignale auf der Frequenz der Amidprotonen die Beziehung $H^{\alpha(i)}-H^N(i)$, $H^{\beta(i)}-H^N(i)$, $H^{\gamma(i)}-H^N(i)$ wiedergibt (Abbildung 9).

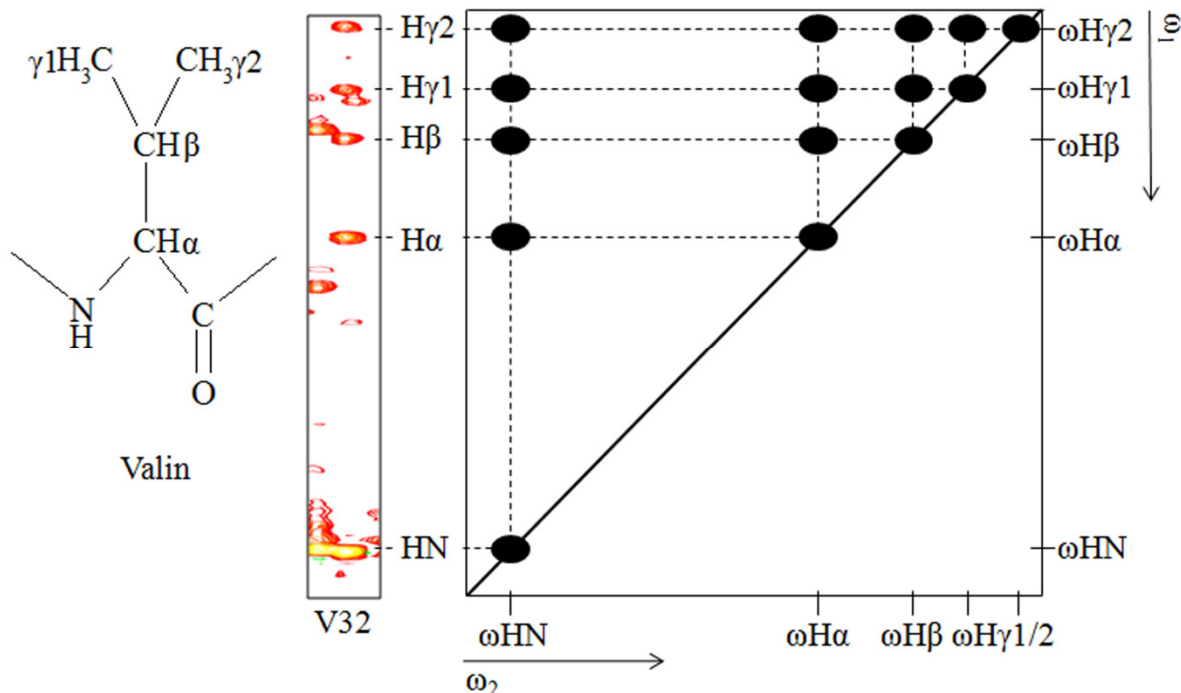


Abbildung 9: Charakteristisches Kreuzsignalmuster der Aminosäure Valin im homonuklearen 2-D-TOCSY-Spektrum. Zur besseren Übersicht sind rechts die unterhalb der Diagonalen liegenden intraresidualen Kreuzsignale nicht dargestellt. Links ist die Strukturformel des Valins abgebildet. Die farbige Darstellung veranschaulicht ein Beispiel, Valin 32, aus dem 3-D-TOCSY-HSQC-Spektrum (bei 120,4 ppm ^{15}N -Frequenz), auf dessen 1HN -Frequenz (8,572 ppm) die Signale des Spinsystems liegen.

Für alle anderen Aminosäuren bedarf es weiterer Information (siehe 3.5.3).

Mit Hilfe der bekannten Primärstruktur des rCulbicins wurden viele Signale den Protonenfrequenzen der meisten Aminosäuren zugeordnet. Aufgrund der häufig überlappenden Signale innerhalb der zweidimensionalen TOCSY-Spektren konnten manche Signale nicht eindeutig einem Spinsystem zugeordnet werden. Daher wurde das dreidimensionale ^{15}N -editierte TOCSY-HSQC hinzugezogen. Signale, die im zweidimensionalen Spektrum auf einer Resonanzfrequenz liegen, aber zu zwei unterschiedlichen Spinsystemen gehören, werden durch das angefügte 2D- 1H - ^{15}N -HSQC-Experiment getrennt. Als Beispiel werden hier die Aminosäuren Valin 7 und Valin 32 gezeigt, die auf derselben Amidprotonenfrequenz von 8,572 ppm liegen (Abbildung 10).

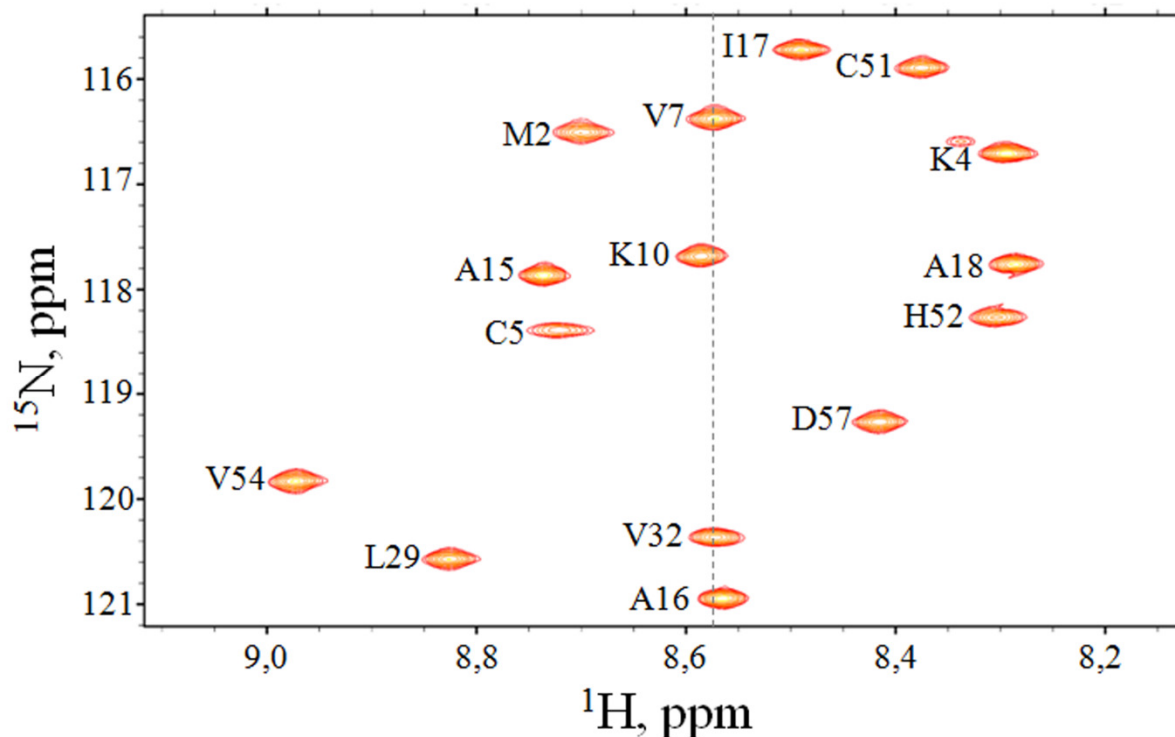


Abbildung 10: Ausschnitt aus dem 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des rCulbicins. Die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen der Aminosäuren Valin 7 und Valin 32 liegen auf der gleichen vertikalen Resonanzlinie (graue Linie). Daher überlappen die Signale dieser beiden Aminosäuren in den zweidimensionalen homonuklearen TOCSY- und NOESY-Spektren. Die Zuordnung der sequentiellen Kontakte erfolgte im 3D- ^{15}N -editierten NOESY-HSQC (siehe 3.5.3).

Durch die Kombination eines HSQC-Experiments mit einem zweidimensionalen TOCSY-Experiment sind in jedem Spinsystem nun, neben einer ^1H -Frequenz von 8,572 ppm, auch die ^{15}N -Frequenzen für Valin 7 von 116,4 ppm und für Valin 32 von 120,4 ppm zugeordnet (Abbildung 10). Auf diese Weise konnten die oben genannten und auch alle übrigen Aminosäuren identifiziert werden.

3.5.3 Die NOESY-Experimente

Die NOESY-Experimente wurden als Grundlage für die sequenzspezifische Zuordnung verwendet. Aufgrund der dipolaren Kopplung des Nuclear-Overhauser-Effekts koppeln alle Protonen mit einem Abstand von weniger als 5 Å miteinander. Daher liegen im NOESY-Spektrum sowohl intraresiduale (siehe 3.5.2) als auch interresiduale Kreuzsignale vor. Infolgedessen erscheinen in dem in Abbildung 11 gezeigten homonuklearen 2D-NOESY-Spektrum bei einer Mischzeit von 200 ms weitaus mehr Signale als im homonuklearen 2D-TOCSY-Spektrum (Abbildung 8).

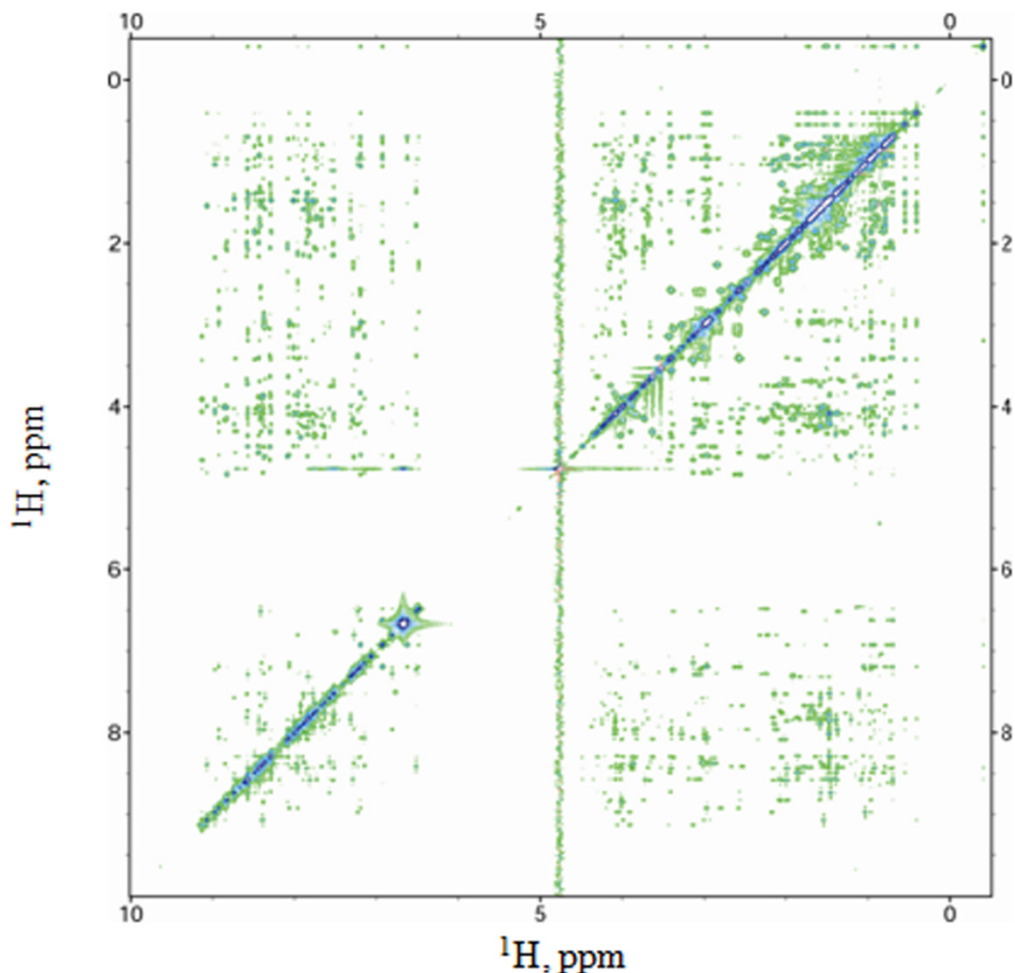


Abbildung 11: 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von rCulbicin.

Interresiduale Kopplungen finden wegen der Wechselwirkungen der Protonen bedingt durch die Raumstruktur statt. Sie sind als Kreuzsignale an den Stellen im Spektrum zu erkennen, an denen zwei Kerne miteinander koppeln, die einen Abstand von weniger als 5 \AA vorweisen. Das geschieht zum einen durch die Faltung des Proteins, zum anderen auch innerhalb der direkten Nachbarschaft zwischen Aminosäure i und Aminosäure $i+1$, da der Abstand des Amidprotons ($i+1$) immer kleiner als 5 \AA zu den $\text{H}^{\text{N}}(i)$ -, $\text{H}^{\alpha}(i)$ -, $\text{H}^{\beta}(i)$ - und $\text{H}^{\gamma}(i)$ -Protonen der benachbarten Aminosäure ist (sequentielle Kontakte). Daher befinden sich auf der vertikalen Frequenzachse neben den intraresidualen Signalen der Aminosäure ($i+1$) auch die interresidualen Kreuzsignale mit dem Nachbarn (i). Durch Überlagerung von TOCSY- und NOESY-Spektren ist es möglich, die intraresidualen Signale von den interresidualen Kontakten zu unterscheiden.

Die Zuordnung der sequentiellen Kontakte fand ausschließlich im dreidimensionalen ^{15}N -editierten NOESY-HSQC statt. Dazu wurden die Kreuzsignale im Amidprotonenbereich der Aminosäuren ausgewertet.

Als Beispiel ist hier der Amidprotonenbereich zwischen Lysin 9 bis zu Alanin 18 gezeigt. Mittels der bekannten Primärstruktur und der Identifizierung der Aminosäuren aus den TOCSY-Spektren wurden so die Nachbarn der jeweiligen Aminosäuren über die Kreuzsignale identifiziert (Abbildung 12).

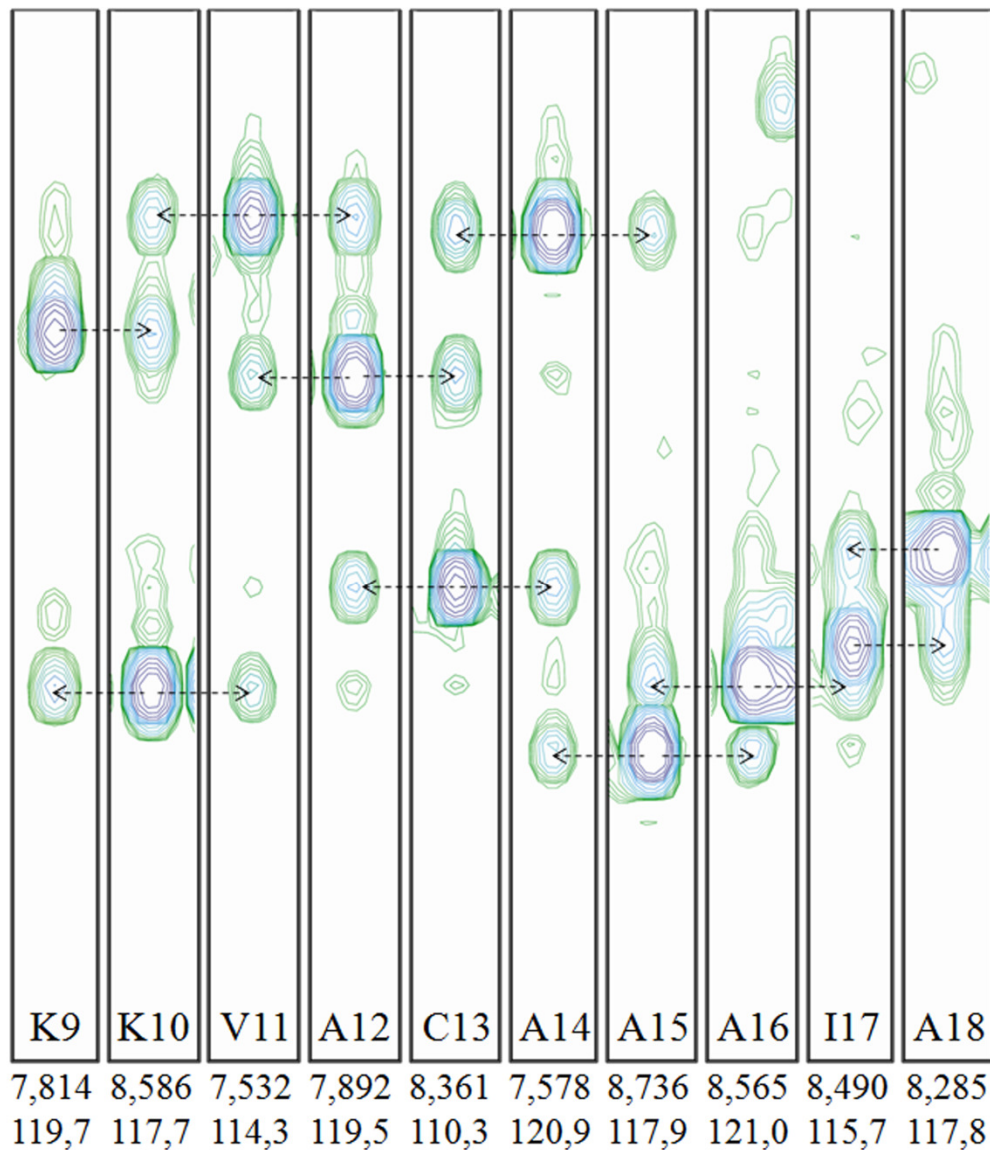


Abbildung 12: Streifendarstellungen aus dem 3D- ^{15}N -editierten NOESY-HSQC-Spektrum. Die einzelnen Streifen der Aminosäuren Lysin 9 bis Alanin 18 sind bei der jeweiligen Protonen- und Stickstofffrequenz dargestellt. Benachbarte Aminosäuren zeigen Kreuzsignale (grün) im Amidprotonenbereich, da die Entfernung $\text{H}^{\text{N}(i-1)}$ -, $\text{H}^{\text{N}(i)}$ - und $\text{H}^{\text{N}(i+1)}$ kleiner als 5 Å ist. So konnten die im TOCSY-Experiment identifizierten Spinsysteme der Sequenz zugeordnet werden. Die intensiveren Signale (violett) zeigen die Amidprotonen des eigenen Spinsystems an.

Durch die bekannte Resonanzfrequenz der Aminosäuren aus dem 3D- ^{15}N -editierten TOCSY-HSQC konnten die Kreuzsignale auch bei Überlappung zweier Spinsysteme im zweidimensionalen NOESY-Spektrum eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 13).

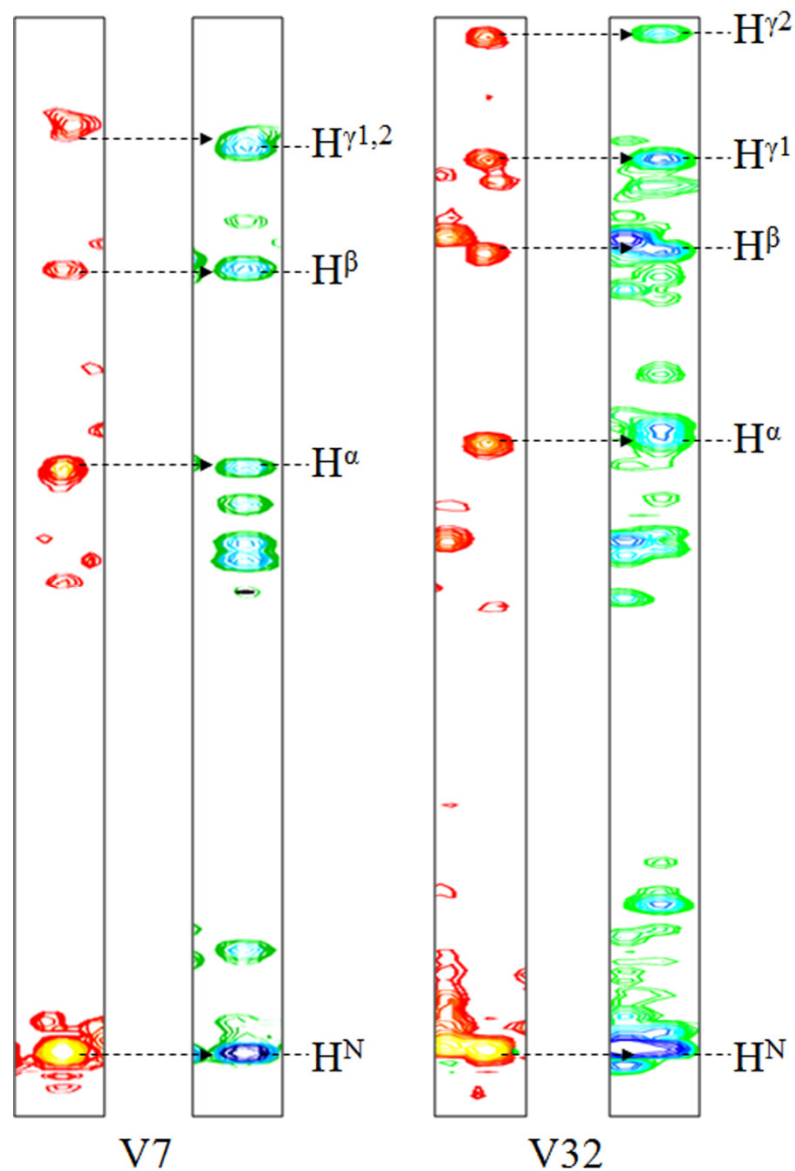


Abbildung 13: Streifenrepräsentationen der Aminosäuren Valin 7 und Valin 32 aus den $3D\text{-}^{15}\text{N}$ -editierten NOESY- (grün) und TOCSY-Spektren (rot). Die in beiden Spektren erscheinenden Signale korrelieren mit den intraresidualen Protonen des Spinsystems. Alle anderen stellen interresiduale Kreuzsignale mit anderen Aminosäuren dar.

Alle identifizierten Aminosäuren wurden in das $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum übertragen. Dieses fasste zum einen die sequenzspezifische Zuordnung aus den $3D\text{-}^{15}\text{N}$ -editierten NOESY- und TOCSY-Spektren zusammen, zum anderen diente es aber auch als qualitativer Nachweis, dass ^{15}N -angereichertes rCulbicin in nur einer Konformation vorlag.

Bei zehn Cysteinen wären in Folge der Ausbildung von Disulfidisomeren mehrere Konformationen möglich.

Im 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum erscheinen alle auf Amidprotonen gekoppelten Spinsysteme. Jede Aminosäure, außer Prolin, sowie zusätzlich die Amidprotonen der Seitenketten von Arginin, Tryptophan, Glutamin und Asparagin zeigen ein Signal im Spektrum. Der N-Terminus ist wegen seiner hohen Austauschrate ebenfalls nicht zu erkennen. Daher wären bei Vorhandensein einer Mischung von Disulfidisomeren von rCulbicin mehr als 59 Signale zu erwarten. Die 59 zu erwartenden Signale weisen somit auf eine homogene Konformation des ^{15}N -angereicherten rCulbicins hin (Abbildung 14).

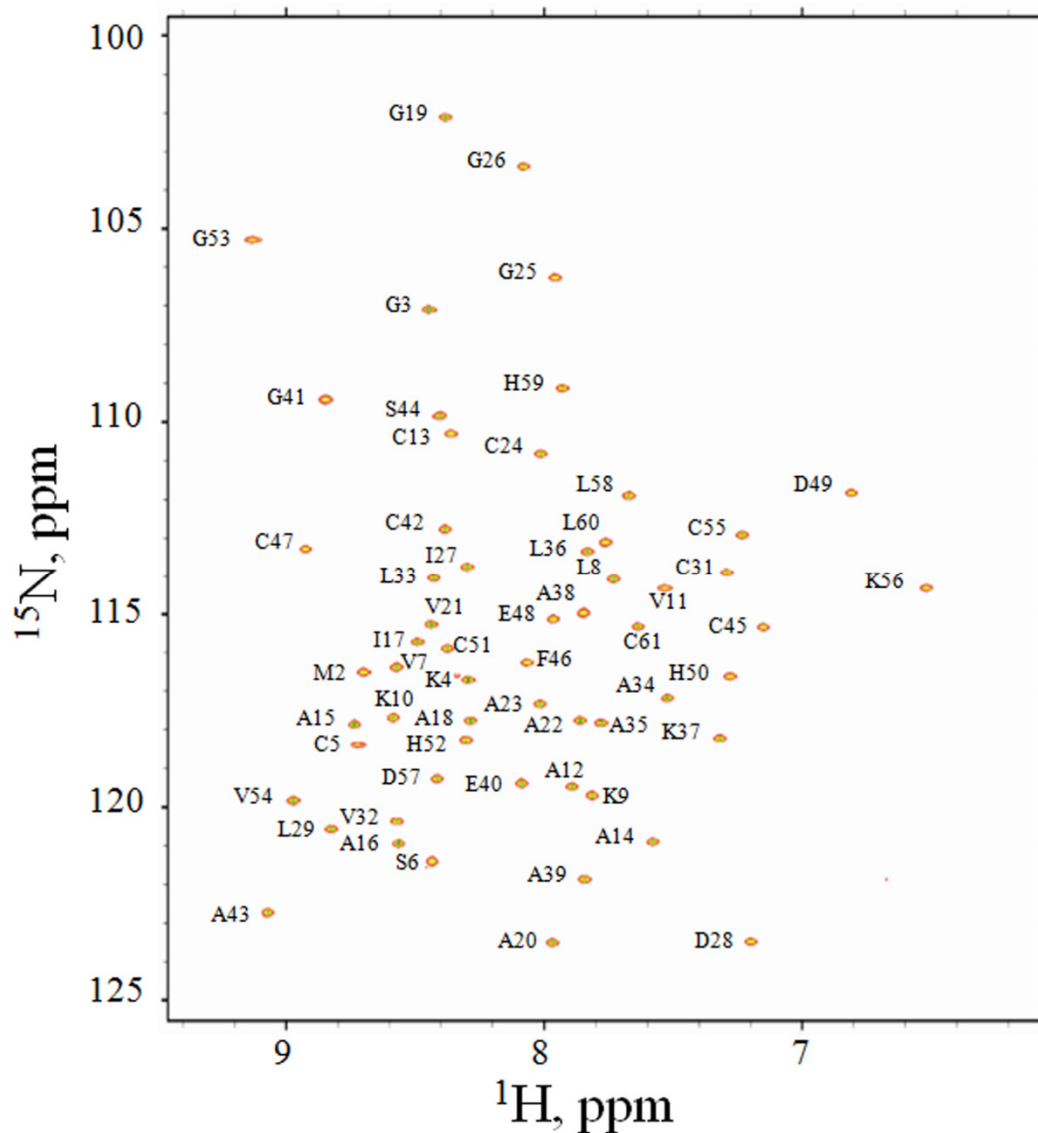


Abbildung 14: 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des rCulbicins. Die sequenzspezifischen Positionen sind als Zahlen dem Einbuchstabencode der Aminosäuren an den Resonanzsignalen zugeordnet. Der N-Terminus (A1) sowie Prolin 30 geben im Experiment keine Signale. Daher sind 59 Signale bei einer homogenen Konformation von ^{15}N -angereichertem rCulbicin zu erwarten.

3.5.4 Die Sekundärstrukturelemente

Die CD-Messungen wiesen auf hauptsächlich α -helikale Sekundärstrukturelemente im rCulbicin hin (Abbildung 7). Alpha-Helices zeichnen sich im NOESY-Spektrum durch charakteristische Kontakte aus. Diese sind zum einen zwischen den Amidprotonen $H^N(i)$ - $H^N(i+1)$ und $H^N(i)$ - $H^N(i+2)$ und zum anderen zwischen den $H^\alpha(i)$ - $H^N(i+3)$ - und $H^\alpha(i)$ - $H^\beta(i+3)$ -Protonen zu erwarten. Solche Kontakte (*medium-range contacts*) wurden sowohl in den 2D homonuklearen NOESY- als auch in den 3D- ^{15}N -editierten NOESY-HSQC-Spektren des rCulbicins gefunden. Abbildung 15 fasst die für sekundäre Strukturmerkmale charakteristischen Kontakte der Struktur vom rCulbicin zusammen.

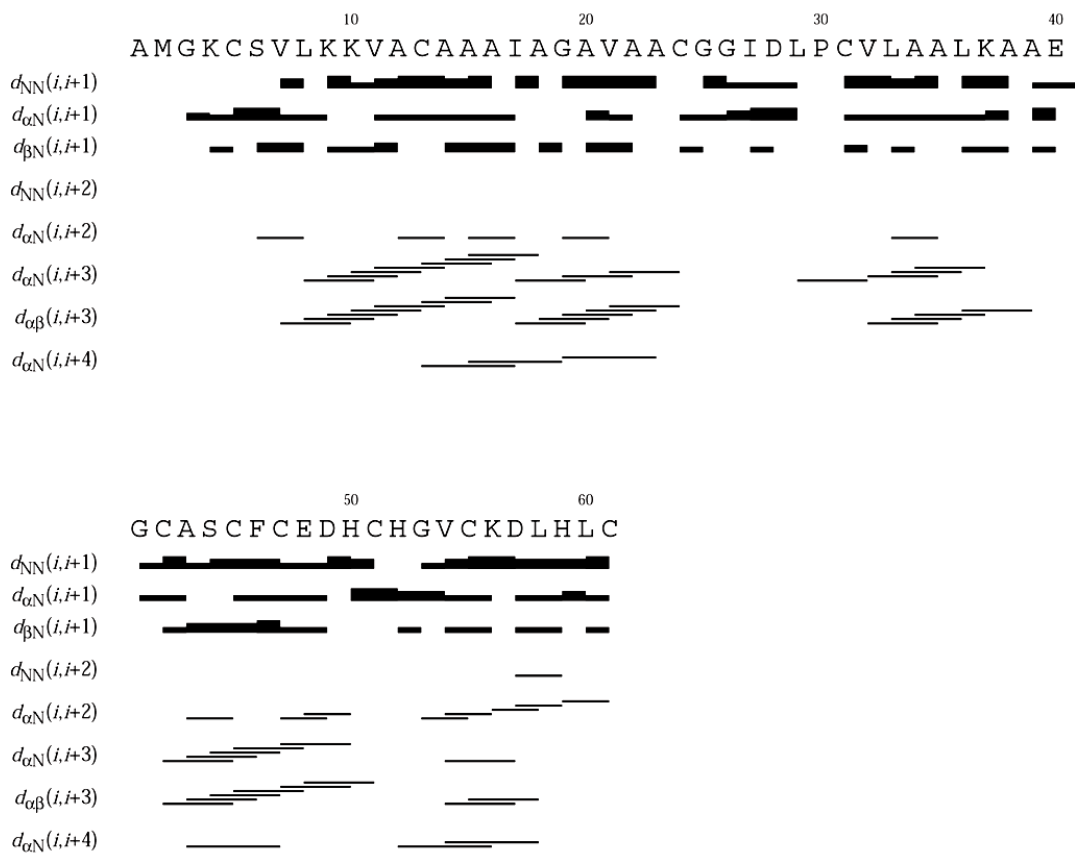


Abbildung 15: Schematische Darstellung der sequentiellen und *medium-range* Kontakte, die die Sekundärstruktur des rCulbicins definieren. Die Höhe der Balken unterhalb der Primärsequenz im Einbuchstabencode ist relativiert zu den Intensitäten der NOE-Signale.

3.5.5 Die Tertiärstruktur

Für die Aufklärung der Tertiärstruktur wurden zu den Sekundärstruktur-bedingten Kontakten noch Kontakte zwischen Aminosäuren hinzugezogen, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt, aufgrund der räumlichen Struktur aber näher als 5 Å liegen. Diese werden als *long-range* Kontakte bezeichnet. Dafür wurde das zweidimensionale homonukleare NOESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 200 ms ausgewertet, denn im dreidimensionalen ^{15}N -editierten NOESY-HSQC-Experiment werden die ^1H -Protonen mit dem ^{15}N -Kern gekoppelt, und deswegen sind die für die *long-range* Kontakte entscheidenden Kopplungen zwischen aliphatischen Seitenketten der Aminosäuren nicht vorhanden. Zur Verdeutlichung ist hier die ^1H -Resonanzfrequenz der Methylgruppe 2 von Valin 32 gezeigt, welche mit den Protonen des Phenylrings des Phenylalanins 46 koppelt. Die Methylgruppe 2 des Valins 32 zeigt dabei eine Verschiebung zum Hochfeld. Sie ist ein klassisches Beispiel für eine Atomgruppe, die ober- oder unterhalb der Bindungsebene eines Phenylrings liegt, und dessen chemische Verschiebung durch den sogenannten Ringstromeffekt beeinflusst wird (Abbildung 16).

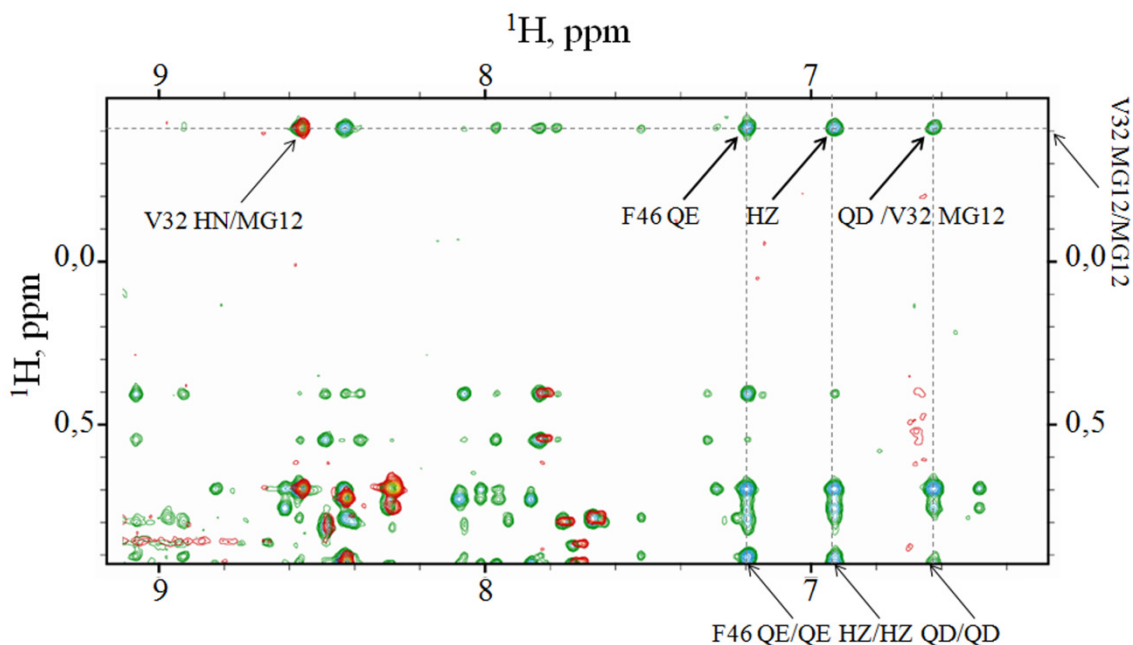


Abbildung 16 : Ausschnitt aus dem überlagerten 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum (grün) mit dem 2D- ^1H - ^1H -TOCSY-Spektrum (rot). Die Methylgruppe 2 (MG12) des Valins 32 bildet zahlreiche Kreuzsignale aus. Das rot markierte (V32 HN/MG12) Signal ist Teil des Spinsystems (TOCSY) und koppelt mit dem eigenen HN des Valins 32. Alle anderen Signale resultieren auf sequentiellen, *medium-range* und *long-range* Kontakten. Zu letzteren gehören die drei markierten Kreuzsignale (F46 QE, HZ, QD/V32 MG12), die sich aufgrund dipolarer Kopplung mit den Wasserstoffen des Phenylrings von Phenylalanin 46 (F46 QE/QE, HZ/HZ, QD/QD) entwickeln.

In Abbildung 17 sind die Abstandsbeschränkungen aufgeführt, die für die Generierung der Struktur verwendet wurden. Dabei sind die Verteilungen der intraresidualen, sequentiellen, *medium-range* und *long-range* Kontakte für jede Aminosäure dargestellt. Viele *long-range* Kontakte treten vor allem bei den Aminosäuren des hydrophoben Kerns wie zum Beispiel bei I17, L29, V32, L36 und F46 auf.

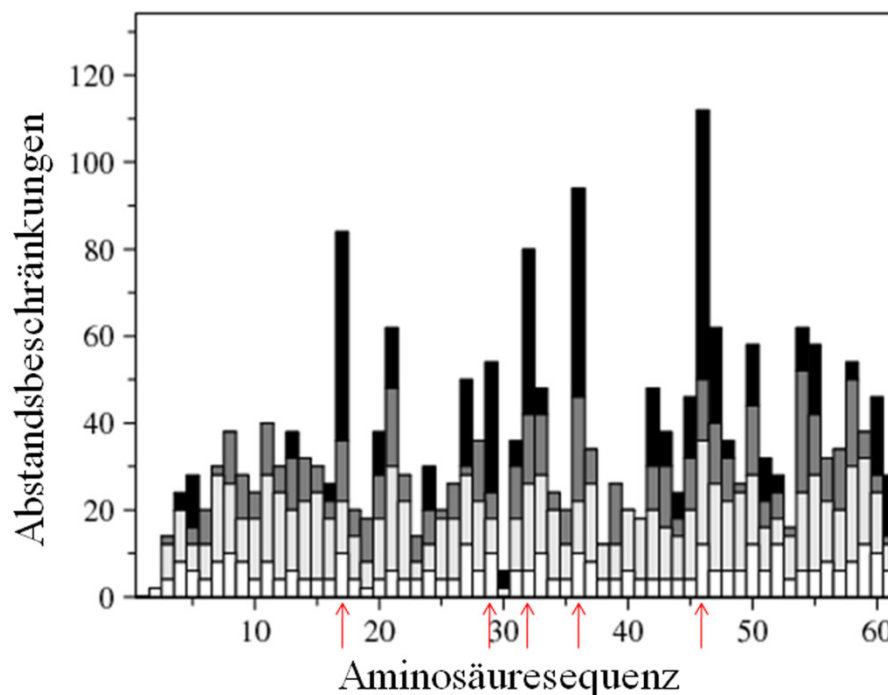


Abbildung 17: Anzahl der Abstandsbeschränkungen, die für die Generierung der Strukturkonformere implementiert wurden. Intraresiduale (weiß), sequentielle (hellgrau), *medium-range* (grau) und *long-range* (schwarz) Kontakte sind nach Anzahl der jeweiligen Aminosäure zugeordnet. Die Aminosäuren, die den hydrophoben Kern des Proteins bilden, zeigen viele *long-range* Kontakte (rote Pfeile).

3.5.6 Die Disulfidbindungen

Die Primärstruktur des rCulbicins enthält zehn Cysteine. Durch Bestimmung der Masse des gereinigten ^{15}N -angereicherten Proteins wurde gezeigt, dass die Differenz von 10 Da zwischen theoretischer (6064,6 Da) und experimentell ermittelter Masse (6054,9 Da) auf die Ausbildung von fünf Cystinen zurückzuführen ist. Als weiterer Nachweis, dass in der NMR-Probe keine Disulfidisomere vorliegen, diente das $2\text{D-}^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum, das nur ein Signal für die jeweiligen Aminosäuren zeigte. Bei isomeren Peptiden wären mehr Signale oder eine Signalverbreitung zu erwarten (siehe 3.5.3).

In der Tertiärstruktur des rCulbicins liegen die Sulfhydrylgruppen der Cysteine 5, 13, 42 und 45, sowie die Cysteine 47, 51, 55 und 61 räumlich nahe beieinander. Die letzten beiden Cysteine 24 und 31 liegen an einer völlig abgeschiedenen Position und bilden bereits eine Brücke durch die Strukturberechnung aus.

Um die genaue Verknüpfung der übrigen Cysteine zu bestimmen, wurden alle möglichen Kombinationen mit Rücksicht auf die Position im Molekül in die Strukturberechnung als Abstandsvorgabe implementiert. Anschließend wurden die Ensembles aus 20 Strukturen miteinander verglichen. Als Kriterium für die richtige Konformation diente das Ensemble mit der niedrigsten Energie, orientiert an der r.m.s.d., der Anzahl der Strukturabweichungen und der Ramachandran-Darstellung (Tabelle 5). Demnach lieferte die Cysteinverbindung 5-42, 13-45, 24-31, 47-55 und 51-61 die energetisch günstigste Struktur. Hier lag nach 100 Strukturberechnungen eine r.m.s.d. von 0,93 vor. Weiterhin gab es insgesamt nur 3 Strukturabweichungen, die jedoch kleiner als 0,5 Å waren. Die Ramachandran-Darstellung gab für diese Konformation die energetisch günstigste Verteilung an (Abbildung 18).

Tabelle 5: Cysteinverbindungen als Vorgaben für die Strukturberechnung.

<i>Cystin-Kombination</i>	<i>r.m.s.d.*</i>	<i>Abweichungen[†]</i>	<i>Ramachandran[‡]</i>
<i>C5-C13//C42-C45//C47-C51//C55-C61</i>	1,10 (±0,23)	8	61,8/32,7/4,4/1,1
<i>C5-C13//C42-C45//C47-C55//C51-C61</i>	0,82 (±0,19)	4	56,9/37,1/4,6/1,3
<i>C5-C13//C42-C45//C47-C61//C51-C55</i>	1,17 (±0,3)	5	57,6/36,2/4,5/1,7
<i>C5-C42//C13-C45//C47-C51//C55-C61</i>	0,99 (±0,19)	5	63,7/31,0/4,6/0,8
<i>C5-C42//C13-C45//C47-C55//C51-C61</i>	0,93 (±0,17)	3	62,5/31,7/5,0/0,8
<i>C5-C42//C13-C45//C47-C61//C51-C55</i>	0,97 (±0,15)	6	65,1/29,5/4,5/0,9
<i>C5-C45//C13-C42//C47-C51//C55-C61</i>	1,15 (±0,28)	5	63,8/30,3/5,8/0,2
<i>C5-C45//C13-C42//C47-C55//C51-C61</i>	1,14 (±0,29)	3	63,0/31,2/5,7/0,2
<i>C5-C45//C13-C42//C47-C61//C51-C55</i>	1,07 (±0,24)	6	62,2/31,5/5,6/0,7
Keine Abstandsvorgabe	1,02 (±0,21)	4	61,2/34,8/3,7/0,4

* r.m.s.d. = *root mean standard deviation*, † Anzahl der Strukturabweichungen < 0,5 Å, ‡ Ramachandran-Darstellung für 20 Konformere in der Reihenfolge am meisten begünstigte/zusätzlich erlaubte/generell erlaubte/verbotene Bereiche der Torsionswinkel in % (Abbildung 18).

3.6 Die Tertiärstruktur von Culbicin

Die 1194 Abstandsinformationen aus den NOESY-Experimenten wurden in die Strukturberechnung implementiert. Auf Grundlage von 400 durch das Programm CYANA berechneten Strukturen wurden 20 mit der niedrigsten Zielfunktion ausgewählt und als Basis für die Berechnung einer mittleren Struktur verwendet. Daraus ergaben sich die in Tabelle 6 aufgeführten qualitativen Merkmale der Berechnung sowie die Diederwinkelpaare des Proteinrückgrats (Abbildung 18).

Tabelle 6: Statistik der Strukturberechnung der 20 energieärmsten Konformere von rCulbicin. In keiner der Strukturen wurden die Abstandsbeschränkungen um mehr als 0,5 Å überschritten. Bei einem pH-Wert von 5,4 handelt es sich um das Monomer, bei pH 8,0 um das Dimer. r.m.s.d. = *root mean square deviation*.

Abstandsvorgaben	pH: 5,4	pH:8,0
Intraresidual ($i-j = 0$)	364	488
Sequentiell ($ i-j = 1$)	332	444
<i>medium range</i> ($2 \leq i-j \leq 4$)	244	184
<i>long range</i> ($ i-j \geq 5$)	224	240
Disulfidbindungen	30	60
Insgesamt	1194	1416
<i>Paarweise r.m.s.d für die Reste 3-61 in Å</i>		
Mittlere r.m.s.d. des Rückgrats	0,68 ± 0,12	1,80 ± 0,33
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	1,02 ± 0,17	2,37 ± 0,32
<i>Paarweise r.m.s.d. der Sekundärstrukturelemente für die Reste 7-24, 32-36, 42-47, 54-58 in Å</i>		
Mittlere r.m.s.d. des Rückgrats	0,52 ± 0,09	1,51 ± 0,32
Mittlere r.m.s.d. der schweren Atome	0,78 ± 0,12	2,14 ± 0,31
<i>Ramachandran Darstellung für 20 Konformere in %</i>		
Meistbegünstigte Bereiche	62,0	42,2
Zusätzlich erlaubte Bereiche	33,1	42,0
Allgemein erlaubte Bereiche	4,1	12,9
Nicht erlaubte Bereiche	0,8	2,9

In Abbildung 18 sind die Torsionswinkel Phi (Φ) und Psi (Ψ) des Proteinrückgrats der berechneten 20 Konformere des rCulbicins im Ramachandran-Diagramm dargestellt. Hierbei werden den Winkeln Bereiche potentieller Energie zugeordnet. Flächen mit niedrigster potentieller Energie sind am meisten begünstigt (tief blau). Darin sind 62 % der Torsionswinkel der 20 Konformere enthalten. In den zusätzlich erlaubten (blau) und allgemein erlaubten Bereichen (hellblau) liegen 33,1 % beziehungsweise 4,1 % der Torsionswinkel. In unerlaubten Bereichen mit hoher potentieller Energie (weiss) liegen nur 0,8 % der Winkel vor. Die zugehörigen Aminosäuren sind im Diagramm angegeben. Es handelt sich bei ihnen ausschließlich um Aminosäuren, die in flexiblen Schleifenbereichen des Proteins liegen.

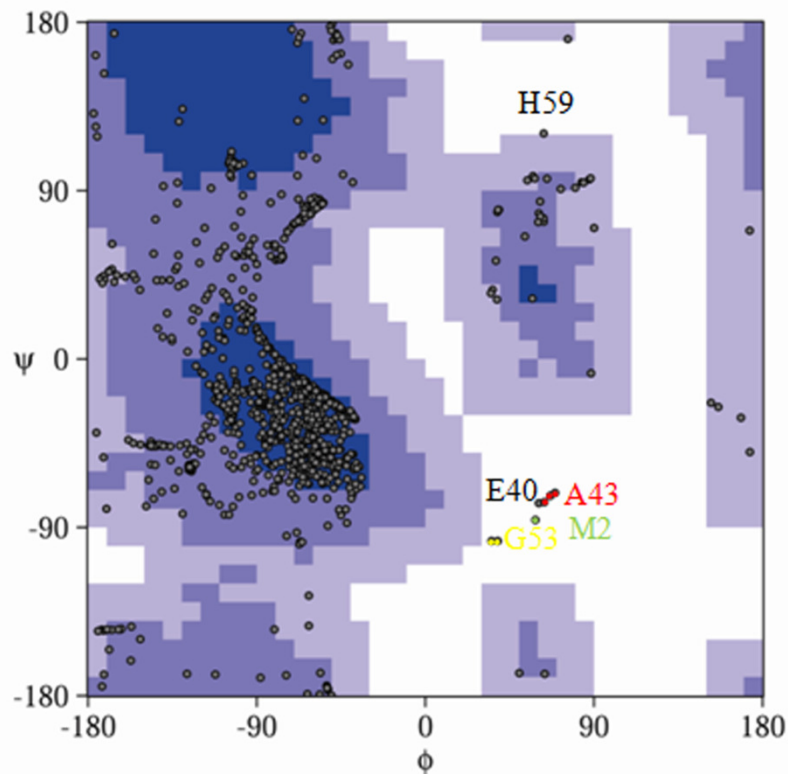


Abbildung 18: Ramachandran-Diagramm für die 20 Konformere der Strukturberechnung. Die in den unerlaubten Bereichen liegenden Aminosäuren sind im Bild angegeben.

Das Ensemble der unabhängig voneinander berechneten 20 Konformere mit niedrigster Zielfunktion ist in Abbildung 19 in der Spaghetti-Darstellung abgebildet. Abweichungen von der einheitlichen Konformation sind an C- und N-Terminus sowie in den flexiblen Schleifenbereichen des Proteins zu erkennen.

Aus dem Ensemble wurde eine mittlere Struktur generiert, welche anschließend energieminiert wurde. Diese Struktur diente als Vorlage für das Bandmodell (Abbildung 19 B), welches die Strukturelemente des rekombinant exprimierten Culbicins anzeigt. Auf eine lange N-terminale α -Helix, von Valin 7 bis Cystein 24, folgen, verbunden über drei Schleifenbereiche, drei weitere kurze α -Helices (Valin 32 bis Leucin 36, Cystein 42 bis Cystein 47 und Valin 54 bis Leucin 58), die im rechten Winkel zu der N-terminalen Helix stehen. Stabilisiert wird die Struktur durch fünf kovalente, intramolekulare Disulfidbindungen. Dabei liegen die Cystine 5-42, 13-45 und 47-55 innerhalb des hydrophoben Kerns des Proteins, wohingegen die Cystine 24-31 und 51-61 der Umgebung exponiert vorliegen. Die Termini des rCulbicins erscheinen weitestgehend flexibel (Abbildung 19).

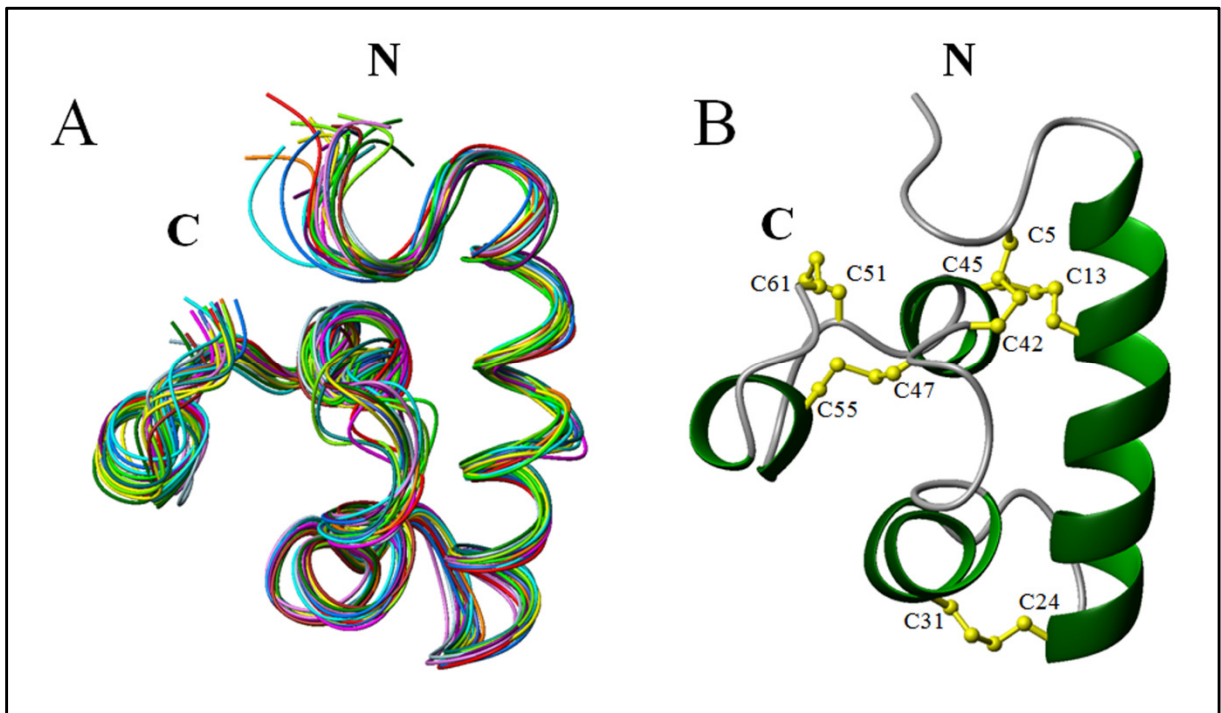


Abbildung 19: Tertiärstruktur von rCulbicin. A) Die Spaghetti-Darstellung zeigt das Ensemble der 20 Konformere der Strukturberechnung. B) Das Bandmodell der gemittelten, energieminierten Struktur des rCulbicins verdeutlicht die α -Helices (grün), die Schleifen (grau), sowie die Konnektivität der Disulfidbindungen (gelb). Der N- und C-Terminus ist mit N beziehungsweise C gekennzeichnet.

Die Berechnung des elektrostatischen Oberflächenpotentials von rCulbicin lässt eine ungleichmäßige Verteilung der geladenen Aminosäureseitenketten erkennen (Abbildung 20 A). Interessanterweise sind die drei Histidine von rCulbicin, H50, H52 und H59, alle an der kleinen C-terminalen α -Helix lokalisiert und bilden mit Lysin 56 bei einem pH-Wert unter 6,0

einen stark positiven Ladungspol. Dieser positive Ladungspol ist für die Funktion des Proteins unerlässlich (siehe 4.1).

Die Darstellung der hydrophoben Bereiche im Molekül lässt erkennen, dass die N-terminale α -Helix ausschließlich hydrophob ist. Die Helix und der Ladungspol geben dem rCulbicin einen amphipathischen Charakter (Abbildung 20 B).

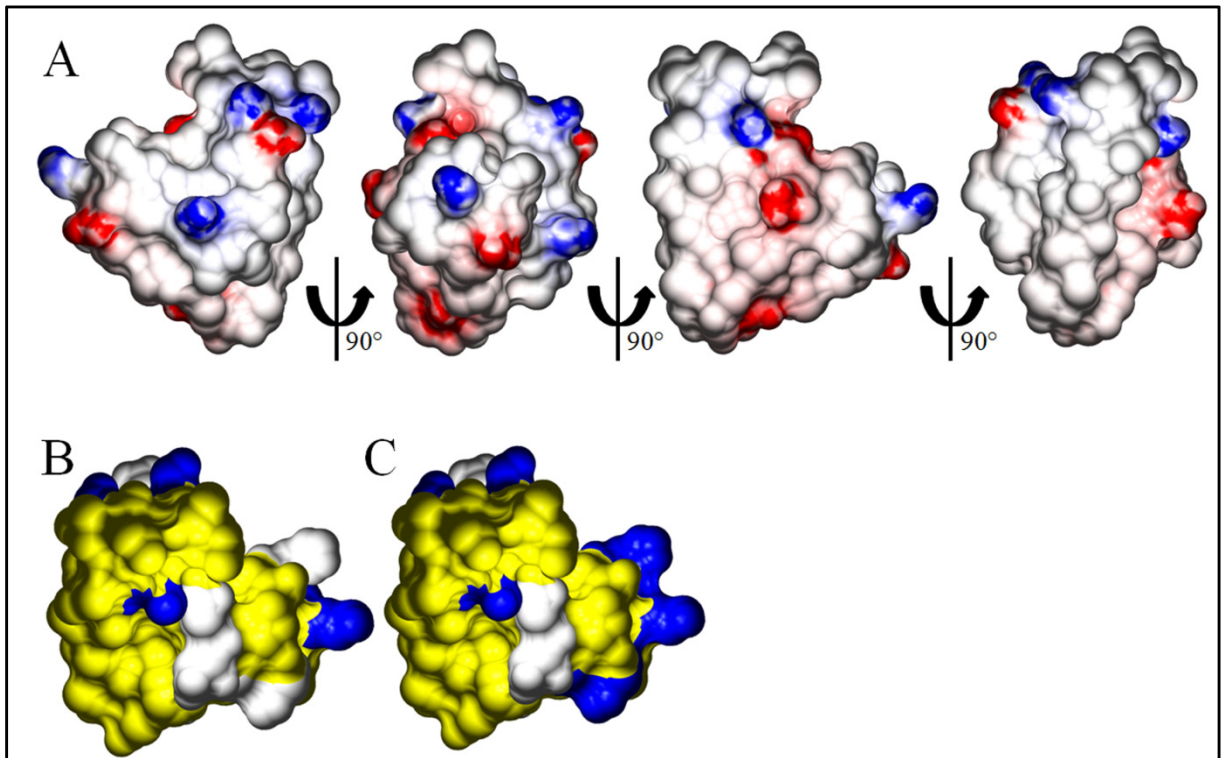


Abbildung 20: Die molekulare Oberfläche von rCulbicin. A) Das elektrostatische Oberflächenpotential ist durch die Ladung der anionischen (rot) und kationischen (blau) Seitenketten der Aminosäuren von rCulbicin auf der Oberfläche gezeigt. Alle ungeladenen Aminosäuren sind weiss dargestellt. Die Orientierung des ersten Moleküls in A entspricht der in Abbildung 19. B) Der amphipathische Charakter des rCulbicins wird bei der Darstellung der hydrophoben (gelb) und der kationischen Aminosäuren (blau) nachvollziehbar. Die Ausbildung eines kationischen Ladungspols wird durch die Protonierung von Histidinen unterhalb eines pH-Wertes von 6,0 deutlich (in B weiss, in C blau).

3.6.1 Strukturhomologien zur Struktur des Culbicins

Mit Hilfe des DALI-Servers wurde die Proteindatenbank auf Strukturhomologien zu der Struktur des rCulbicins analysiert [99]. Der *Z-score* ist eine quantitative Aussage über den Vergleich zwischen zwei Proteinstrukturen, wobei ein Wert größer als 2,0 überhaupt erst eine Ähnlichkeit zwischen Strukturen angibt [99]. Dabei wurde im Fall des rCulbicins ein *Z-score* von 3,7 zu funktionell völlig unterschiedlichen, sehr grossen Proteinen wie der

Glykogenphosphorylase (A, B; Muskel- und Leberform) gefunden. Ebenso wird ein Prozentwert für die Strukturübereinstimmung zwischen zwei Proteinstrukturen angegeben. Dieser Wert war im Falle des rCulbicins stets unterhalb von 12 %. Eine Übereinstimmung oberhalb von 20 % liegt bei Mitgliedern von Superfamilien vor.

Aufgrund dieser Analyse wurde dem rCulbicin eine neue Faltungstopologie zugesprochen. Somit stellt rCulbicin das erste Mitglied einer neuen Superfamilie dar.

3.7 Untersuchungen zur Oligomerisierung des Culbicins

3.7.1 pH-Wert-abhängige Dimerisierung von Culbicin

Mit dem rCulbicin wurde bei unterschiedlichen pH-Werten eine Größenausschlusschromatographie durch Gelfiltration durchgeführt. Abbildung 21 A zeigt die Überlagerung aller Chromatogramme. Zur Übersicht sind die Elutionszeiten der Kalibriersubstanzen ebenfalls dargestellt. Aus den Kalibriergeraden konnten die hydrodynamischen Massen errechnet werden (Abbildung 21 B).

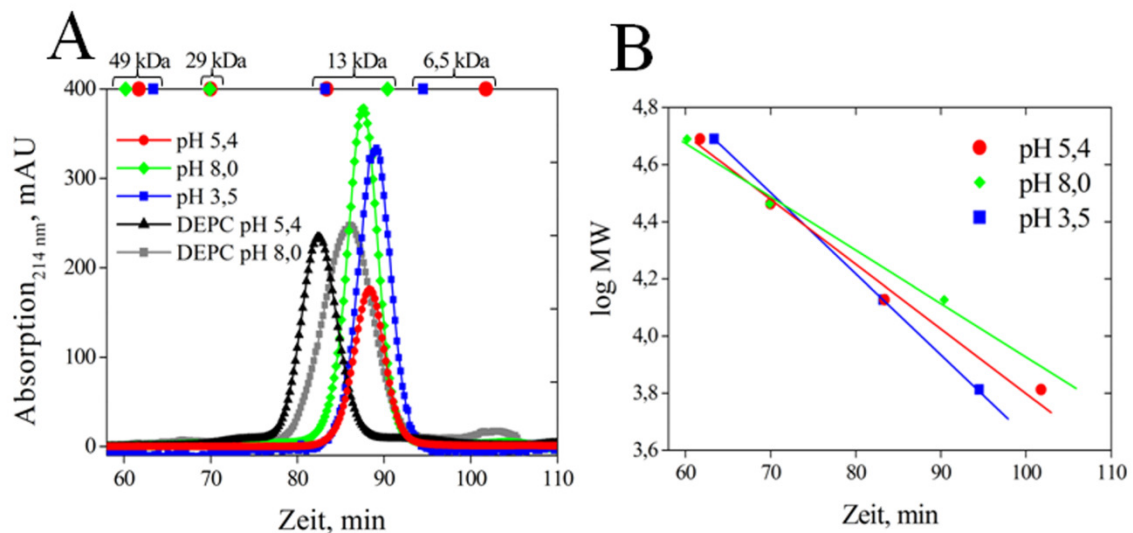


Abbildung 21: Größenausschlusschromatographie bei unterschiedlichen pH-Werten. A) Chromatogramme von rCulbicin und mit DEPC modifiziertem rCulbicin bei den pH-Werten 3,5 sowie 5,4 und 8,0. Zum Vergleich sind die Elutionszeiten der Kalibriersubstanzen aus B dargestellt. B) Die Kalibriergeraden bei den pH-Werten 3,5 sowie 5,4 und 8,0 von Ovalbumin (49 kDa, pI 4,6), Carboanhydrase (29 kDa, pI 7,0), Ribonuclease A (13,4 kDa, pI 9,6) und Aprotinin (6,5 kDa, pI 10,5) dienen als Grundlage für die Berechnung der hydrodynamischen Massen von rCulbicin bei unterschiedlichen pH-Werten.

Das rCulbicin eluierte bei einem pH-Wert von 5,4 nach 88 min, was nach der Kalibrierung einer hydrodynamischen Masse von 7627 Da entsprach.

Das mit DEPC modifizierte rCulbicin eluierte dahingegen bei pH 5,4 nach 82 min und bei pH 8,0 nach 86 min. Diese Zeiten ergaben auf Basis der Kalibrierung hydrodynamische Massen von 10643 Da beziehungsweise von 16995 Da. Für die pH-Werte 3,5 und 8,0 wurden Elutionszeiten von 89 min und 87 min nachgewiesen, woraus die hydrodynamischen Massen von 6406 Da und 15617 Da bestimmt wurden. Nach diesen Messungen lag das rCulbicin bei einem pH-Wert von 5,4 und 3,5 als Monomer, bei einem pH-Wert von 8,0 als Dimer vor. Das an den Histidinen mit DEPC modifizierte rCulbicin lag bei den pH-Werten von 5,4 und 8,0 als Dimer vor.

3.7.2 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten

Es wurden 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von ¹⁵N-angereichertem rCulbicin bei den pH-Werten 3,5 (blau), 5,4 (rot) und 8,0 (grün), sowie von DEPC modifizierten, ¹⁵N-angereicherten rCulbicin bei pH 5,4 (schwarz) aufgenommen. Abbildung 22 zeigt eine Überlagerung dieser Spektren. Bei einem pH-Wert von 5,4 liegt rCulbicin als Monomer vor, und die Frequenzen wurden bereits, wie in Abbildung 14 dargestellt, den Aminosäuren zugeordnet. Änderungen in der chemischen Verschiebung der Aminosäurereste bei Variation des pH-Wertes können zum einen von Konformationsänderungen des Moleküls zum anderen durch Oligomerisierung hervorgerufen werden. Da rCulbicin bei pH 8,0 und DEPC modifiziertes rCulbicin bei pH 5,4 als Dimer vorliegen (Abbildung 21), können Änderungen in der chemischen Verschiebung durch die Ausbildung einer Interaktionsfläche im Dimer verursacht werden. Auf Basis des zugeordneten 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrums bei pH 5,4 wurden die Änderungen der chemischen Verschiebung bei unterschiedlichen pH-Werten und bei DEPC-Modifikation berechnet (Abbildung 23). Für einen pH-Wert von 3,5 ergeben sich nur für C5, D28, E40 und G41 Verschiebungen, die größer als 0,3 ppm sind. Diese Aminosäuren liegen in flexiblen Schleifenbereichen des Moleküls. Alle anderen Aminosäuren erscheinen nahezu bei derselben chemischen Verschiebung wie bei pH 5,4. Daher liegt rCulbicin bei beiden pH-Werten in nahezu identischer Konformation vor.

Die Verschiebungen, die sich bei der Modifikation von rCulbicin mit DEPC bei pH 5,4 zeigen, resultieren aus der chemischen Modifikation und aus der Dimerisierung. Für die Aminosäuren G3, S6, V11, A14, A16, D28, A34, E40, F46, C47, H52 und G53

ließen sich Änderungen größer als 0,3 ppm berechnen (Abbildung 23). Die große Verschiebung von H52 erfolgt vermutlich zusätzlich aus der DEPC-Modifikation. Demnach liegen die anderen Aminosäuren teilweise in der Interaktionsfläche der beiden Monomere.

Das $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-HSQC}$ -Spektrum bei einem pH-Wert von 8,0 weist sowohl auf eine Konformationsänderung als auch auf Dimerisierung hin. Die Frequenzen der Aminosäuren V11, A22, G26, I27, D28, L29, V32, F46, C47, E48, D49, H50, C51, H52, V54, C55, D57 und H59 sind mehr als 0,3 ppm verschoben (Abbildung 23). Die Amidprotonen der Aminosäuren A1, M2, G3, K4, C5, S6, A15, A38, G41, A43, S44 und G53 befinden sich in flexiblen Bereichen auf der Oberfläche des Moleküls und tauschen bei einem pH-Wert von 8,0 mit dem umgebenden Wasser aus, so dass sie nicht nachweisbar sind. Daher können sie nicht Teil der Dimerisierungsfläche sein.

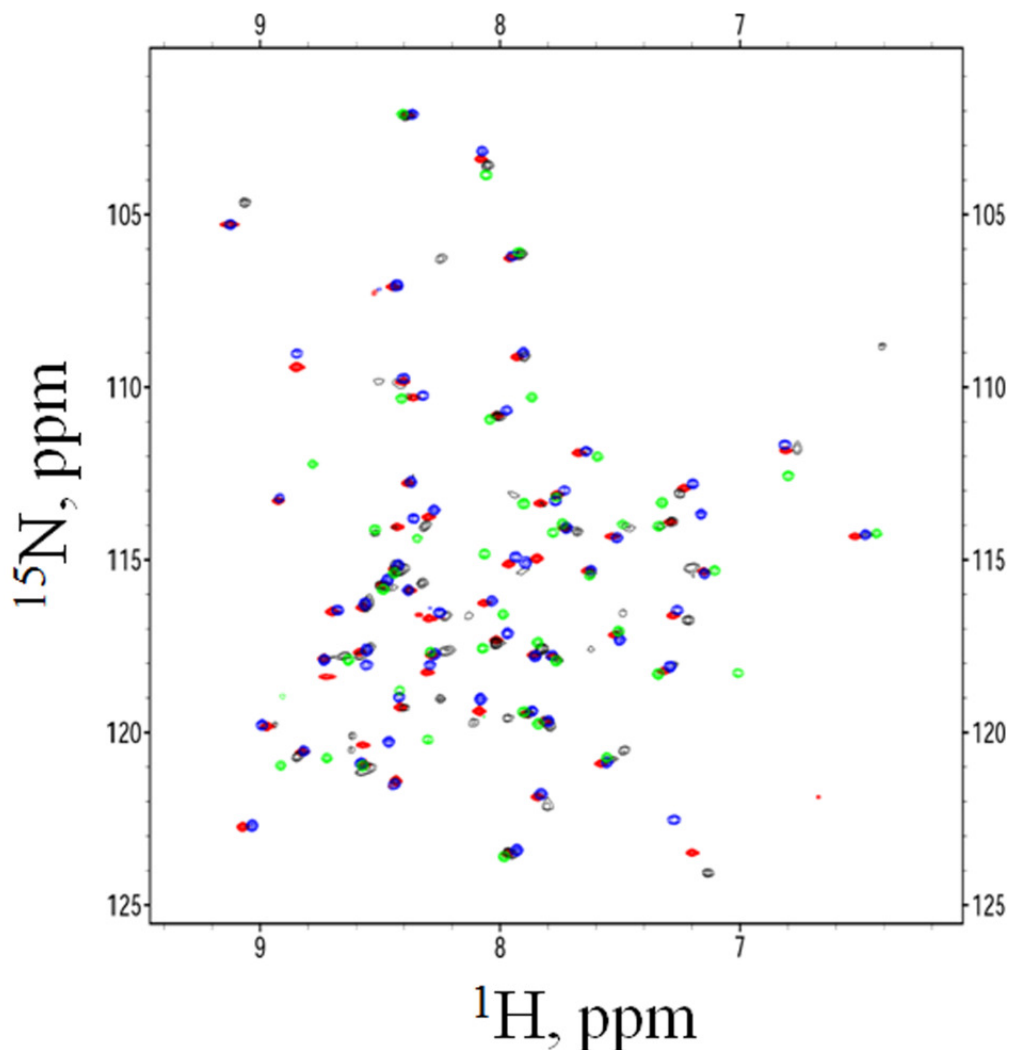


Abbildung 22: Überinandergelagerte $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-HSQC}$ -Spektren von rCulbicin bei unterschiedlichen pH-Werten. Über das $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-HSQC}$ -Spektrum bei pH 5,4 (rot) wurden die Spektren bei pH 3,5 (blau) und pH 8,0 (grün) positioniert. Zusätzlich wurde das $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-HSQC}$ -Spektrum des mit DEPC modifizierten rCulbicins bei pH 5,4 (schwarz) hinzugefügt.

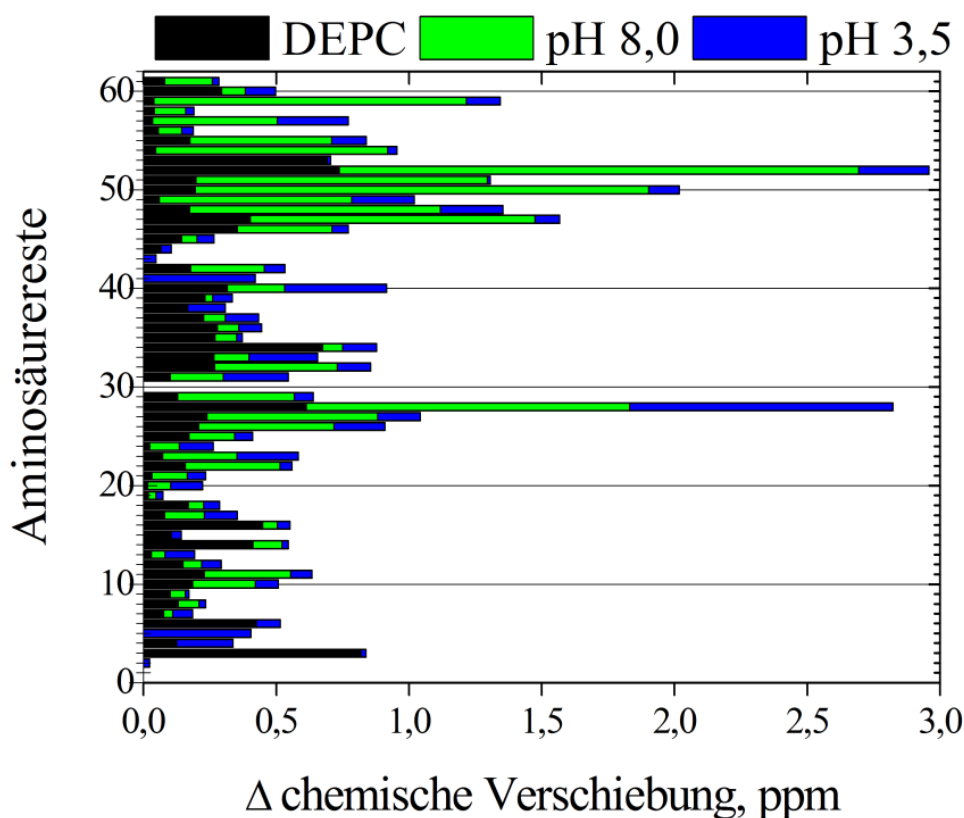


Abbildung 23: Darstellung der Änderung der chemischen Verschiebungen bei unterschiedlichen pH-Werten. Auf Basis des zugeordneten 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums bei pH 5,4 (Abbildung 14) wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungen bei den pH-Werten 3,5 (blau) und 8,0 (grün) sowie des mit DEPC modifizierten rCulbicins bei pH 5,4 (schwarz) aus den jeweiligen 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren errechnet.

3.7.3 Die Struktur des inaktiven Culbicin-Dimers bei pH 8,0

Für die Aufklärung der Struktur des rCulbicins bei einem pH-Wert von 8,0 wurden 3D- ^{15}N -editierte NOESY- und TOCSY-HSQC-Spektren aufgenommen und analog zu denen von pH 5,4 ausgewertet. Zusätzlich wurden homonukleare 2D-NOESY- und TOCSY-Experimente in 100 % D_2O durchgeführt, um die Kreuzsignale der aliphatischen Seitenketten, des Phenylrings von F46 und den drei Imidazolringen von H50, H52 und H59 in die Strukturberechnung einzufügen. In Abbildung 24 ist das homonukleare 2D-NOESY-Spektrum bei einer Mischzeit von 150 ms abgebildet. Alle labilen Protonen, zum Beispiel die Amidprotonen des Peptidrückgrats, tauschen mit D_2O aus und zeigen kaum Kreuzsignale auf der vertikalen Frequenzlinie des Amidprotonenbereichs (Vergleich Abbildung 11).

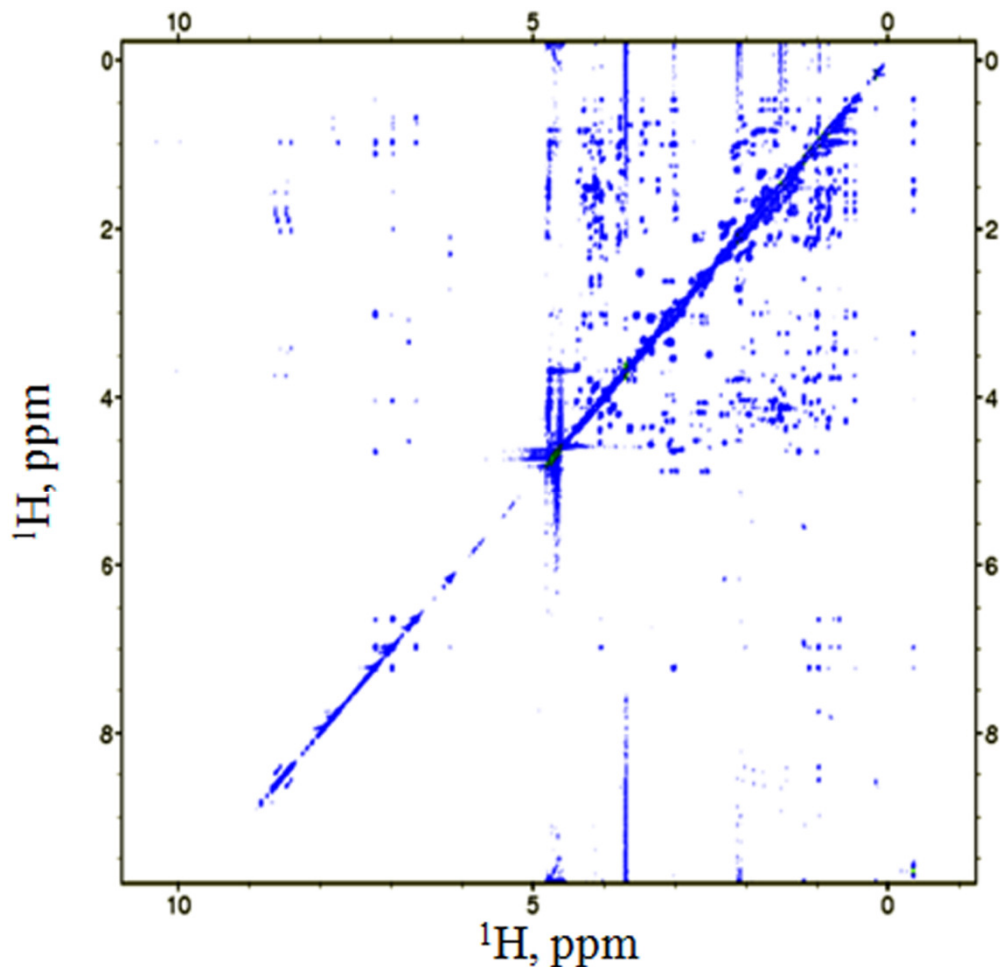


Abbildung 24: 2D- ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von rCulbicin bei pH 8,0 in 100% D_2O .

Aus den erhaltenen Spektren wurden zunächst die bekannten Kreuzsignale identifiziert, die ebenfalls in der Struktur des monomeren rCulbicins bei pH 5,4 vorlagen. Bei einem pH-Wert von 8,0 tauschen labile Protonen in flexiblen Schleifenbereichen des Proteins schnell aus und sind daher ebenfalls nicht zu detektieren (Abbildung 23). Aus diesem Grund sind keine Abstandinformationen für die Aminosäuren A1, M2, G3, K4, C5, S6, A15, A38, G41, A43, S44 und G53 enthalten.

Auf Grundlage des detektierten 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums wurde ersichtlich, dass es sich um ein symmetrisches Dimer handeln muss, da die Anzahl der HN-Signale gleich der des Monomers ist (Abbildung 22). Zusätzlich zu den Abstandinformationen des Monomers wurden acht intermolekulare Kreuzsignale gefunden, die auf die Dimerisierung zurückgehen.

In die Strukturberechnung wurden alle erhaltenen Abstandsbegrenzungen sowie die Disulfidverbindungen und die intermolekularen Abstandsbegrenzungen implementiert. In Tabelle 6 sind die statistischen Werte der Strukturberechnung aufgelistet.

Aus 400 unabhängig voneinander berechneten Strukturen wurden die 20 besten, gemessen an der Zielfunktion, ausgewählt und eine mittlere Struktur generiert. In Abbildung 25 ist die Bandmodellldarstellung des dimeren, inaktiven rCulbicins bei pH 8,0 dargestellt.

Das Ensemble von 20 Konformeren zeigte eine größere Dispersion, als das des Monomers (Abbildung 19). Das ist auf die fehlenden Signale der zwölf Aminosäuren zurückzuführen, die bei einem pH-Wert von 8,0 keine Abstandsinformation für die Berechnung der Struktur vorgeben. Daher ist die räumliche Position dieser Aminosäuren variabler (Abbildung 25 B).

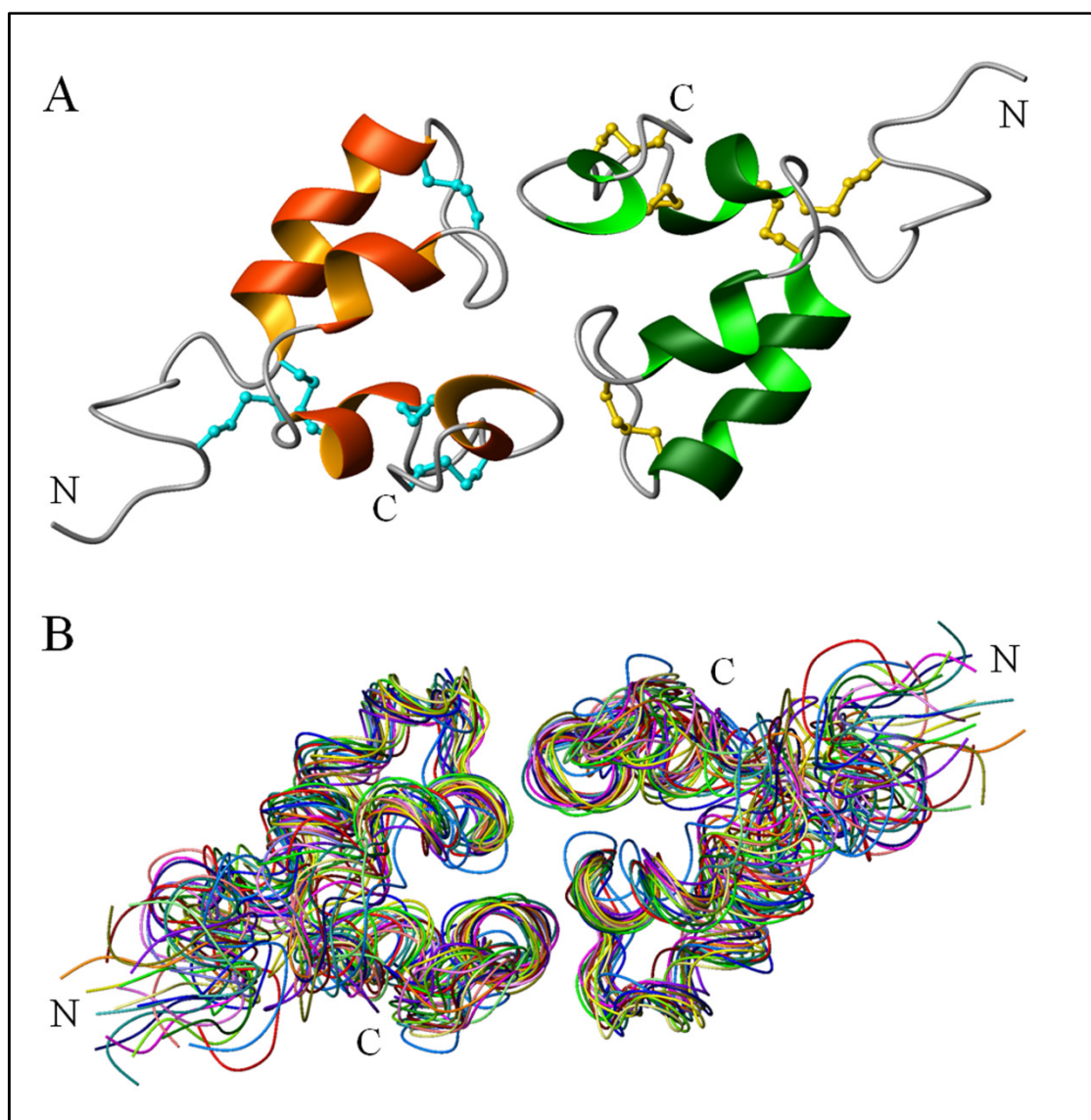


Abbildung 25: Tertiärstruktur des dimeren rCulbicins bei einem pH-Wert von 8,0. A) Bandmodellldarstellung und B) Spaghettidarstellung der 20 besten Konformere nach Strukturberechnung des dimeren rCulbicins. Die jeweiligen Termini sind mit den Buchstaben C und N angegeben.

In Abbildung 26 ist die Verteilung der Diederwinkel in der Ramachandran-Darstellung wiedergegeben. In der energetisch meist begünstigten Region (dunkelblau) liegen 42,2 % der Diederwinkel der 20 Konformere.

In den zusätzlich (blau) und allgemein erlaubten Bereichen (hellblau) liegen 42,0 % und 12,9 % der Diederwinkel. Dagegen sind 2,9 % in den energetisch ungünstigen Bereichen (weiss) zu finden (Tabelle 6). Die in den energetisch ungünstigen Bereichen liegenden Aminosäuren sind im Diagramm ebenfalls angegeben. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position der Aminosäuren im Dimer mit 122 Aminosäuren. Nahezu alle angegebenen Aminosäuren befinden sich in den flexiblen Schleifen des Dimers.

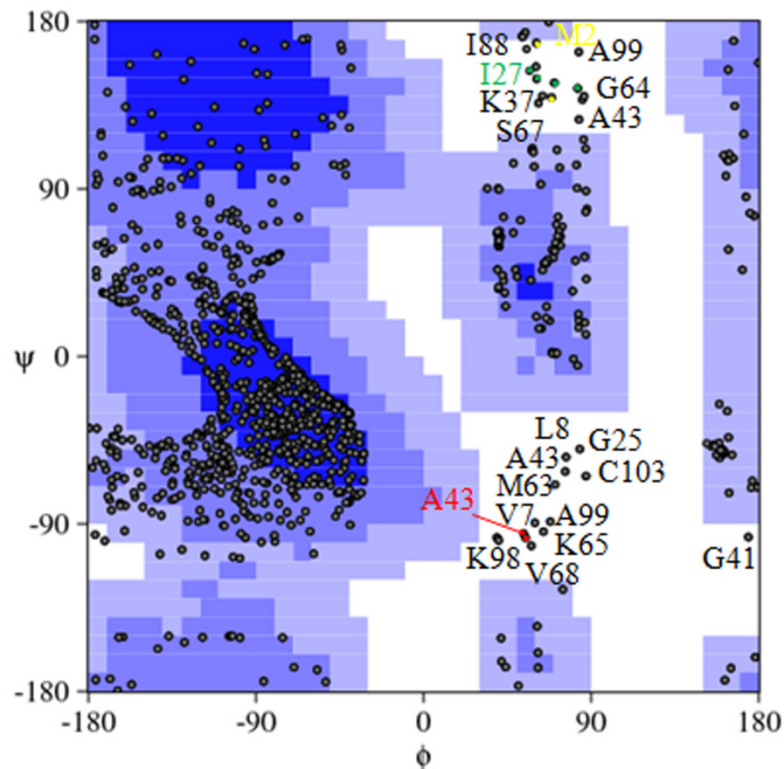


Abbildung 26: Ramachandran-Diagramm der 20 besten Strukturen des Dimers von rCulbicin. Die in den unerlaubten Bereichen liegenden Winkel der betreffenden Aminosäuren sind im Diagramm als Einbuchstabencode mit der Position der Aminosäuren in der Primärstruktur angegeben.

3.7.4 Elektrostatisches Oberflächenpotential des Dimers bei pH 8,0

Von der gemittelten Struktur des dimeren rCulbicins bei einem pH-Wert von 8,0 wurde in Abbildung 27 das elektrostatische Oberflächenpotential dargestellt. Zusätzlich wurde eine Kontur-Darstellung eingefügt, die den Verlauf des Isopotentialfeldes in Abhängigkeit zur coulombschen Ladung angibt. Auffällig ist die Separation der Ladungen des Dimers mit der Ausbildung eines negativen Ladungspols in der Mitte der Oberfläche des Moleküls. Von den N-Termini ausgehend sind die jeweils getrennten, positiven Ladungspole zu erkennen. Die Ausbildung des negativen Ladungspols ist für die Funktion des Dimers von entscheidender Bedeutung (siehe 4.1).

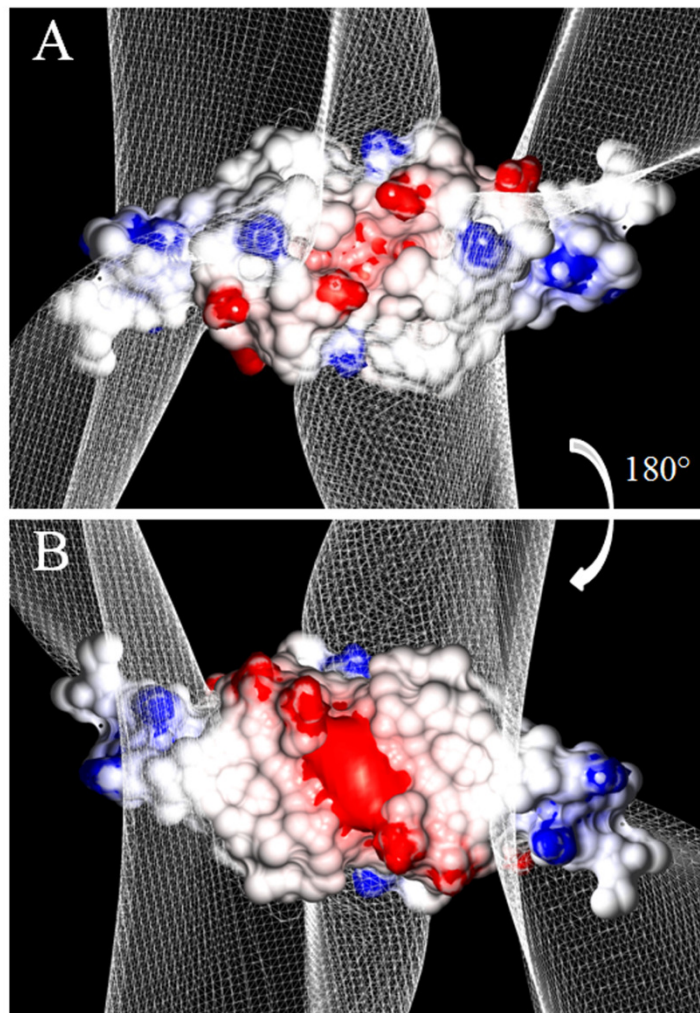


Abbildung 27: Elektrostatisches Oberflächenpotential und Isopotentialfläche des inaktiven Dimers. A) Positiv geladene Aminosäureseitenketten des Dimers von rCulbicin sind in blau, negativ geladene in rot dargestellt. Die Isopotentialfläche ist als weißes Gitter abgebildet. B) Drehung des Moleküls um 180°.

3.7.5 Vergleich der Monomere bei den pH-Werten 5,4 und 8,0

Die Monomere des rCulbicins bei einem pH-Wert von 5,4 und aus dem Dimer bei einem pH-Wert von 8,0 wurden in Abbildung 28 superpositioniert.

Alle Sekundärstrukturelemente sind bei beiden pH-Werten vorhanden. Der große Unterschied in der N-terminalen Helix ist auf die fehlenden Abstandsinformationen bei einem pH-Wert von 8,0 zurückzuführen. Deutlich ist zu sehen, dass die Position der dritten und vierten Helix sich im Dimer (pH 8,0) relativ zu dem Monomer bei einem pH-Wert von 5,4 verschiebt. Vor allem die C-terminale Helix scheint trotz der zwei Disulfidbindungen sehr beweglich zu sein. Diese Konformationsänderung führte im Dimer zu einer gleichartigen Ausrichtung der Ladungen (Abbildung 27), die im Monomer bei pH 5,4 so nicht vorliegt.

Die Beobachtungen deckten sich mit den Messungen aus den 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimenten (Abbildung 22, Abbildung 23). Dort weisen die Amidprotonen der Aminosäuren, die in den Bereichen der Konformationsänderungen lagen, die größten Differenzen in den chemischen Verschiebungen auf.

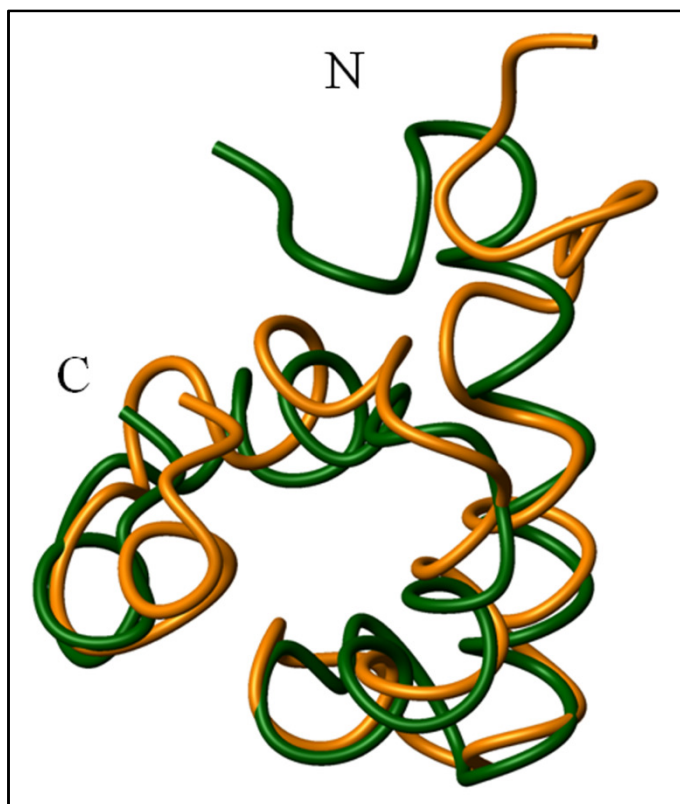


Abbildung 28: Superpositionierung der Monomere von rCulbicin bei pH 5,4 (grün) und 8,0 (orange).

3.7.6 Quervernetzung von Culbicin an Liposomen

Zur Untersuchung der an Modellmembranen gebildeten Oligomere von rCulbicin wurden die Moleküle quervernetzt. Das rCulbicin wurde in Gegenwart von großen, unilamellaren Vesikeln bestehend aus anionischen Phosphatidylglycerin- (PG) und zwitterionischen Phosphatidylcholinlipiden (PC) eine Stunde bei einem pH-Wert von 5,4 inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Sediment gewaschen und sukzessive mit dem Quervernetzer EDAC inkubiert. Abbildung 29 zeigt die Kinetik der Reaktion in Gegenwart von PG-Liposomen. Schon nach 5 min ist eine vollständige Reaktion erreicht. Die SDS-PAGE-Gele zeigen Oligomere, die bis zu Oktameren quervernetzt sind. In den Kontrollen ohne Liposomen wurden keine Oligomere beobachtet (Abbildung 29 A und B). In Gegenwart von zwitterionischen PC-Liposomen hingegen lässt sich keine Quervernetzung nachweisen (Abbildung 30 A). Um das Verhältnis zwischen Lipid zu Peptid zu erhöhen, wurde die Reaktion mit 18 µg rCulbicin wiederholt. Hier zeigt sich eine vollständige Reaktion erst nach 60 min. Auch scheint die Oligomerisierung nur bis zu quervernetzten Hexameren zu führen, was aber auf die geringe Proteinmenge zurückzuführen sein kann (Abbildung 29 B). Interessanterweise zeigte sich hier auch im Überstand eine Quervernetzung zu höheren Oligomeren. Die geringen Mengen an Dimeren in Gegenwart von EDAC könnten auf eine geringe Präzipitation während des Experiments zurückzuführen sein.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Variation in dem Verhältnis zwischen Lipid und Peptid einen Einfluss auf die Oligomerisierung des rCulbicins in anionischen PG-Liposomen hat (Abbildung 29 C und D). Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen der Liposomensuspension mit rCulbicin inkubiert. Anschließend wurde das Sediment nach Zentrifugation zwei Stunden mit EDAC inkubiert. Hier zeigte sich bei der Reaktion von 10 µl bis 150 µl Lipidsuspension mit 30 µg rCulbicin keine erhöhte Oligomerisierung (Abbildung 29 C). Bei geringeren Volumina an Lipidsuspension nahm die Menge der gebundenen Oligomere stark ab (Abbildung 29 D). Intensitätsunterschiede in diesen Experimenten sind auf unterschiedliche Färbungszeiten der SDS-PAGE-Gele zurückzuführen.

Schließlich wurde untersucht inwiefern das mit DEPC modifizierte rCulbicin zur Oligomerisierung fähig war. Tatsächlich ließ sich nur eine marginale Oligomerisierung im Sediment in Gegenwart von 100 µl PG-Liposomensuspension nachweisen (Abbildung 30 B). Das rCulbicin wurde abschließend bei einem pH-Wert von 8,0 mit 150 µl der Suspension mit PG-Liposomen inkubiert und sukzessive mit dem Quervernetzer DSS im gleichen Verhältnis wie EDAC in den vorherigen Experimenten inkubiert.

Der Quervernetzer EDAC ist kurz und sorgt für die Verbindung von Carboxylgruppen mit primären Aminen und bildet bei sauren pH-Werten eine neue Amidbindung zwischen beiden funktionellen Gruppen aus. Bei alkalischen Bedingungen verbindet DSS die primären Amine der Moleküle bis zu einem Abstand von $11,8 \text{ \AA}$ unter Bildung von Amidbindungen.

Mit DSS ließ sich keine Oligomerisierung nachweisen (Abbildung 30 B). Interessanterweise konnten für die mit DEPC modifizierte Probe und für die unmodifizierte Probe bei einem pH-Wert von 8,0 Dimere bereits in den unbehandelten Proben nachgewiesen werden. Dieses steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gelfiltration (siehe 3.7.1).

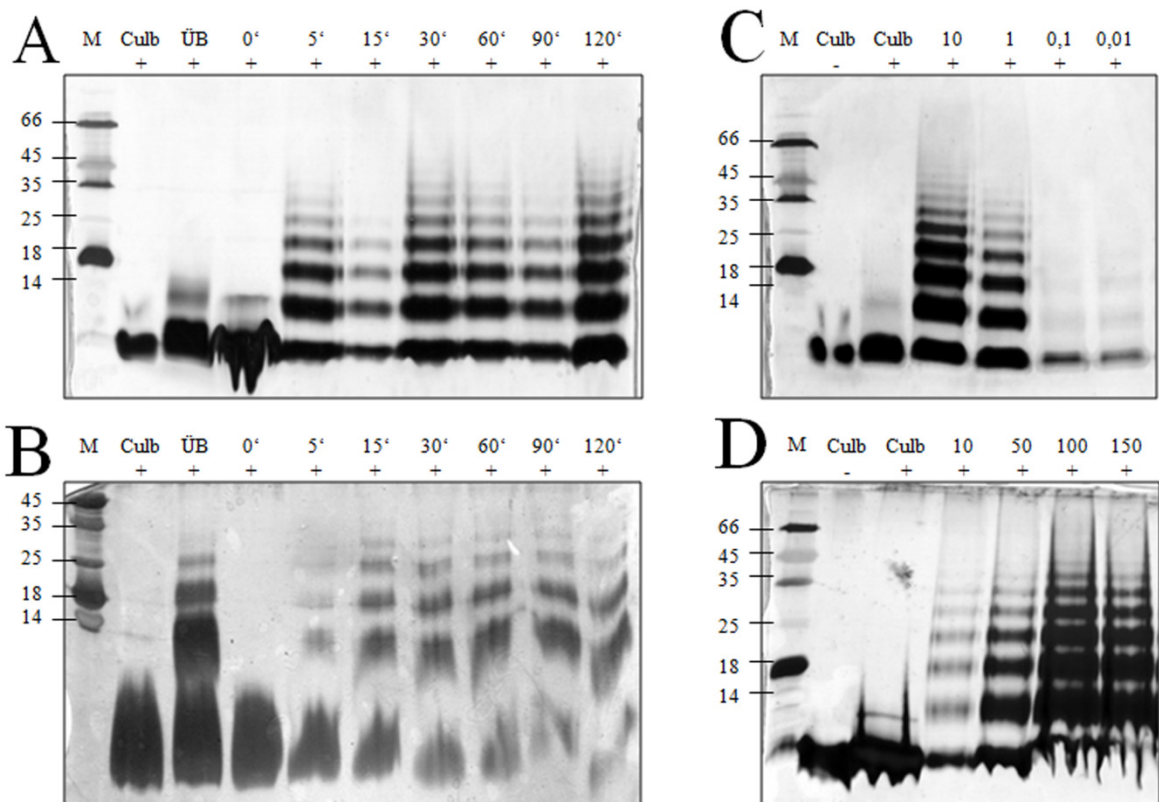


Abbildung 29: Quervernetzungsexperimente von rCulbicin an anionischen Modellmembranen. Kinetik der Reaktion von $30 \mu\text{g}$ (A) und $18 \mu\text{g}$ (B) rCulbicin mit $100 \mu\text{l}$ der PG-Liposomensuspension bei einem pH-Wert von 5,4 ausgedrückt in Minuten. Als Kontrollen dienten Reaktionen mit EDAC des Überstands (ÜB +) nach Sedimentation und von rCulbicin ohne Liposomen (Culb +). In Gegenwart von anionischen PG-Liposomen sind Reaktionen zu sehen, die Oligomere aus bis zu acht Monomeren quervernetzten. Untersuchungen von verschiedenen Verhältnissen zwischen Lipidvolumina und $30 \mu\text{g}$ rCulbicin zeigten keine Unterschiede in dem Oligomerisierungsverhalten (C und D). Die Menge an eingesetzten Lipiden ist in μl dargestellt. Der Molekulargewichtsmarker (M) markiert die Laufzeiten der unterschiedlichen Proteinmassen im 18 %igen SDS-PAGE-Gel. Reaktionen mit EDAC (+) und ohne EDAC (-) sind mit den Beschriftungen dargestellt. Alle SDS-PAGE-Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt.

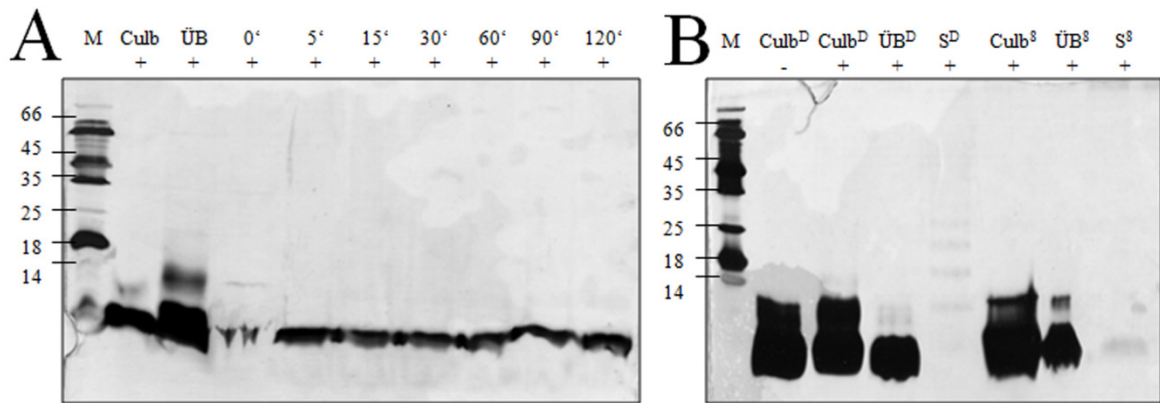


Abbildung 30: Quervernetzungsexperimente von rCulbicin bei unterschiedlichen Bedingungen. A) Kinetik der Reaktion von 30 µg rCulbicin mit 100 µl der PC-Liposomensuspension bei einem pH-Wert von 5,4 ausgedrückt in Minuten. Als Kontrollen dienten Reaktionen mit EDAC des Überstands (ÜB +) nach Sedimentation und von rCulbicin ohne Liposomen (Culb +). Eine Oligomerisierung blieb in Gegenwart der zwitterionischen PC-Liposomen aus. B) Mit DEPC modifiziertes rCulbicin (Culb^D) wurde mit 100 µl der PG-Liposomensuspension bei einem pH-Wert von 5,4 und mit EDAC inkubiert. Der Überstand (ÜB^D) und das Sediment nach Zentrifugation (S^D) zeigen nur eine marginale Oligomerisierung. Zusätzlich wurde das Experiment mit nicht modifiziertem rCulbicin bei einem pH-Wert von 8,0 in Gegenwart von 150 µl PG-Liposomensuspension durchgeführt (Culb^S, ÜB^S, S^S). Dabei konnte keine Oligomerisierung festgestellt werden. Der Molekulargewichtsmarker (M) markiert die Laufzeiten der unterschiedlichen Proteinmassen im 18 %igen SDS-PAGE-Gel. Reaktionen mit EDAC (+) und ohne EDAC (-) sind mit den Beschriftungen dargestellt. Alle SDS-PAGE-Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt.

3.8 Darstellungen von Porenmodellen des Culbicins

RCulbicin bildet Poren an Membranen aus [21]. Auf Grundlage der Quervernetzungsexperimente wurden mithilfe des Programms MOLMOL [93] mögliche Poren mit der Monomerstruktur des rCulbicins bei einem pH-Wert von 5,4 nachgestellt. Da die Stöchiometrie der Poren nicht eindeutig erschien, wurden die generierten Modelle auf Hexamere, Heptamere und Oktamere bezogen. Unter Berücksichtigung des van-der-Waals Abstands von 1,4 Å wurden die Monomere assembliert. Die für eine Oligomerisierung in Frage kommenden Ionenpaare waren K4-E48, K10-E40 und K37-D49, da sie an den Flanken des rCulbicins liegen (siehe 4.1). Bis auf K10 waren alle genannten Aminosäuren in flexiblen Schleifenbereichen positioniert. Daher wurde ein räumlicher Abstand von 4 bis 7 Å für diese Ionenpaare bei der Assemblierung der Monomere gewählt. In Abbildung 31 und Abbildung 32 sind die Modelle der Poren als Bandmodell und als elektrostatisches Oberflächenpotential dargestellt.

Für die Orientierung der hydrophoben N-terminalen α -Helix in der Pore gab es zwei unterschiedliche Möglichkeiten (Abbildung 31 A und C).

Anhand der hier abgebildeten Hexamere wurde deutlich, dass es sich um Poren mit hydrophilem (Abbildung 31 A und B) oder hydrophobem (Abbildung 31 C und D) Lumen handelte. Der Durchmesser der Pore des Hexamers mit hydrophilem Lumen beträgt 0,8 nm. Das hydrophobe Lumen der hexameren Pore besitzt einen Durchmesser von 1,9 nm.

Die Modelle der heptameren und oktameren Pore mit hydrophilem Lumen besitzen einen Poreninnendurchmesser von jeweils 1,5 nm (Abbildung 31 E und G). Durch die Generierung des elektrostatischen Oberflächenpotentials ist der amphipatische Charakter der hexameren, heptameren und oktameren Poren mit hydrophilem Lumen ersichtlich (Abbildung 31 B und Abbildung 32 F und G). Nach außen sind die hydrophoben Bereiche gerichtet. Die Ladungen der Oligomere sind auf beiden Seiten der Pore verteilt. In welcher Orientierung die Pore in die Membran eintaucht, bleibt bis zu diesem Zeitpunkt ungeklärt.

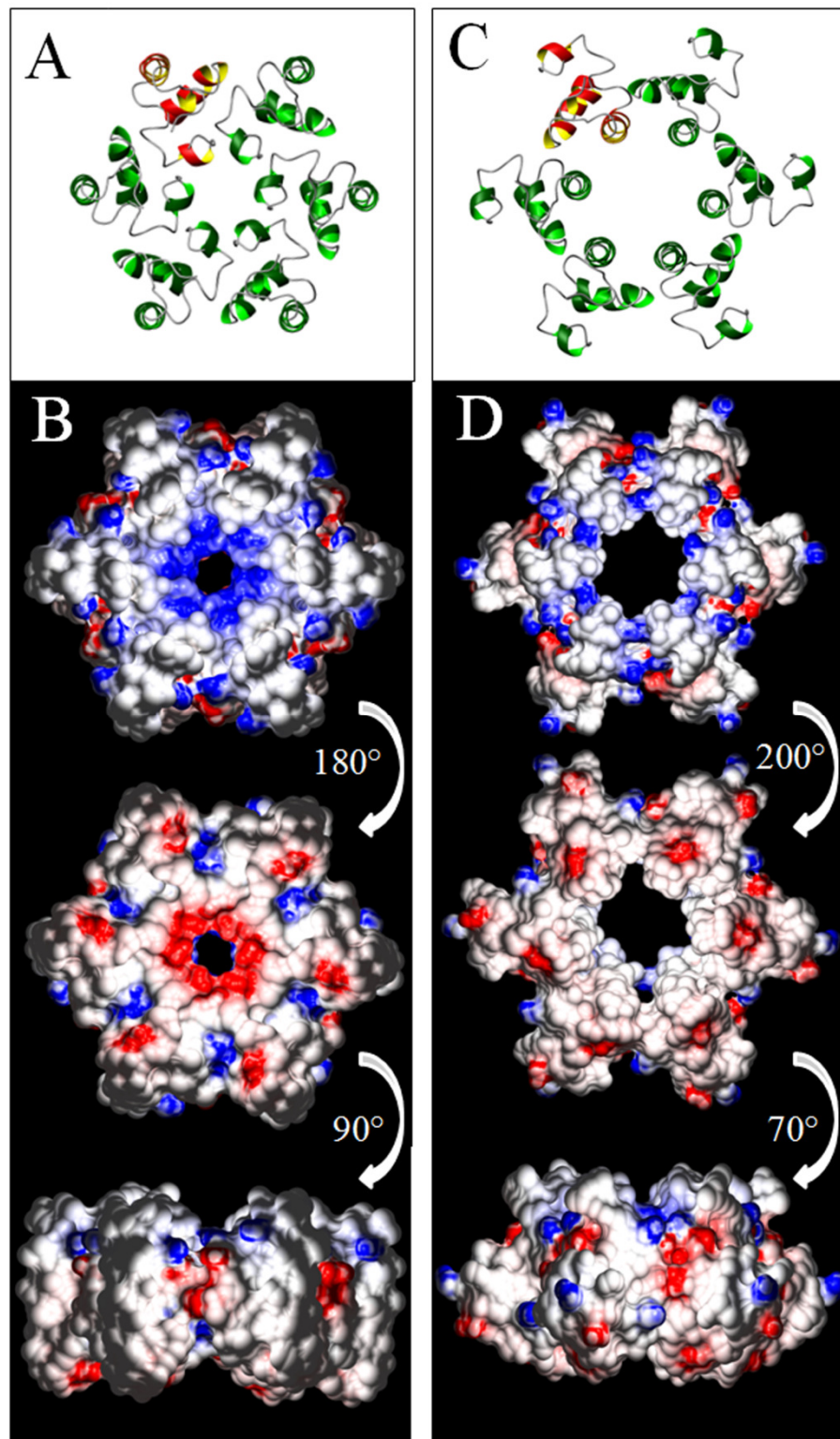


Abbildung 31: Hexamere Porenmodelle von rCulbicin. Die hexameren Porenmodelle von rCulbicin sind in A für eine Pore mit hydrophilem und in C für eine Pore mit hydrophobem Lumen in Aufsicht abgebildet. Ein Monomer in der oligomeren Pore ist als Bandmodell in rot und gelb hervorgehoben. Das elektrostatische Oberflächenpotential ist für A in B und für C in D als Sicht von oben und unten, sowie von der Seite gezeigt. Die Sicht in D ist für die Einsicht in das Lumen gewählt. Positive Ladungen sind in blau, negative in rot, nicht geladene Bereiche in weiss dargestellt.

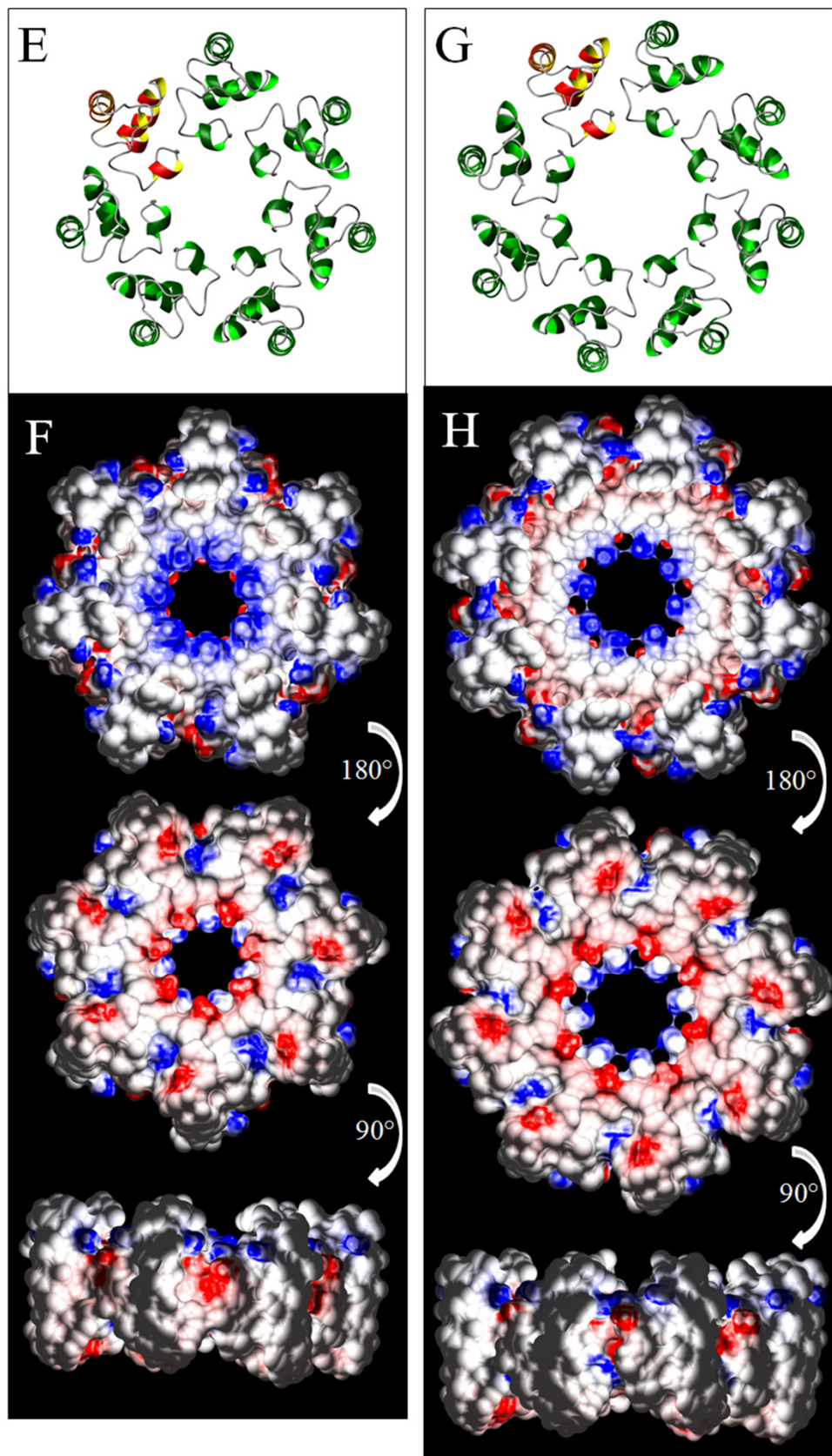


Abbildung 32: Heptameres und oktameres Porenmodell von rCulbicin. In E ist das heptamere und in G das oktamere Porenmodell abgebildet. Ein Monomer in der oligomeren Pore ist in rot und gelb in der Bandmodelldarstellung hervorgehoben. Die Sicht auf das elektrostatische Oberflächenpotential für das Heptamer (F) und das Oktamer (H) ist von oben, unten und von der Seite gewählt. Positive Ladungen sind in blau, negative in rot, nicht geladene Bereiche in weiss dargestellt.

3.9 Cytotoxizität des Culbicins gegenüber Neuroblastomazellen

Humane Neuroblastomazellen SH-SY5Y wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rCulbicin bei einem pH-Wert von 5,5 inkubiert. Der Anteil metabolisch inaktiver Zellen wurde über die Fluoreszenz mittels *CellTiter-blue* Reagenz bestimmt. Die Abnahme der Fluoreszenz im Vergleich zu lebenden Zellen wurde in Prozent dargestellt. Zusätzlich wurde die Zusammensetzung der isoosmolaren Puffer in den Experimenten variiert. Dabei zeigte der Gehalt an Natriumchlorid einen inhibierenden Einfluss auf die cytotoxische Aktivität (Abbildung 33). Ohne Natriumchlorid ergab sich schon bei einer Konzentration von 1,5 μM rCulbicin eine halbmaximale Cytotoxizität (Abbildung 33). Bereits bei 50 mM Natriumchlorid wurde eine Konzentration von 7,2 μM rCulbicin für eine halbmaximale Cytotoxizität benötigt (Abbildung 33). Bei 100 mM und 150 mM Natriumchlorid wurde die circa 50 %ige Cytotoxizität erst bei einer Konzentration von 50 μM sowie 30 μM rCulbicin erreicht (Abbildung 33). Als Positivkontrolle diente Melittin, welches im Mittel über alle durchgeführten Experimente eine halbmaximale Cytotoxizität bei einer Konzentration von 0,5 μM bewirkte (Abbildung 33).

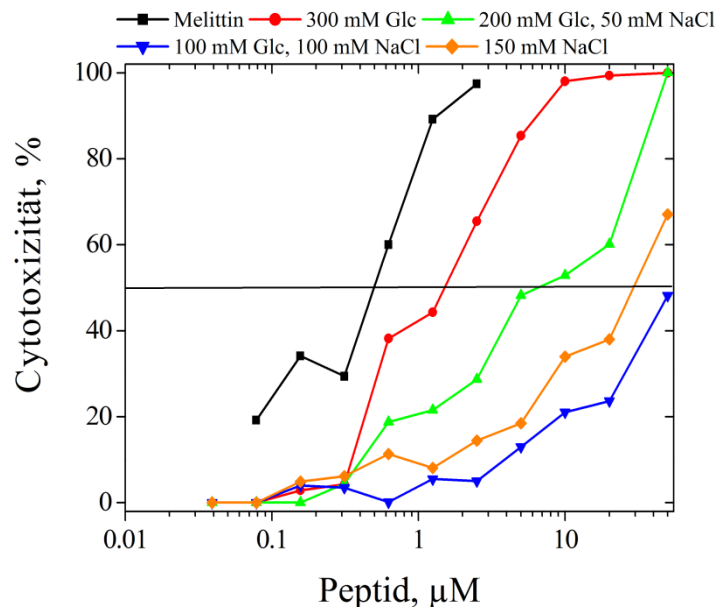


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der Cytotoxizitätsexperimente. Die Inkubation von unterschiedlichen Konzentrationen von rCulbicin mit SH-SY5Y humanen Neuroblastomazellen führte zum Absterben der Zellen. Als Positivkontrolle diente Melittin. Mehrere Pufferbedingungen, die nur in der Zusammensetzung der Isoosmolarität variierten, offenbarten die inhibierende Wirkung von NaCl auf die cytotoxische Aktivität des rCulbicins. Das Diagramm gibt die Mittelwerte aus acht Messwerten, von zwei unabhängigen Versuchsansätzen mit je vier parallelen Experimenten wieder. Die Melittinkurve wurde aus allen Versuchen gemittelt.

4 Diskussion

Acanthamoeba culbertsoni ist eine ubiquitär lebende Amöbenart, die in ihrer natürlichen Umgebung Bakterien als Nahrungsquelle nutzt. Die Amöben wurden als fakultative Pathogene der granulomatösen amöboiden Enzephalitis sowie der Amöbenkeratitis identifiziert. Als Virulenzfaktoren wurden Cystein- und Serinproteasen postuliert, die dem Protisten die Passage in das Gewebe durch Spaltung von Zell-Adhäsionsmolekülen ermöglicht. In einem kontakt-abhängigen Weg vermag die Amöbe über ein *Digipodium* eukaryotische Zellen zu attackieren. Da jüngst aus anderen Amöbenarten, wie zum Beispiel *Entamoeba histolytica*, cytolytische Effektorproteine isoliert und strukturell sowie funktional charakterisiert wurden [52], weitete sich die Suche nach cytolytischen Virulenzfaktoren auch auf *Acanthamoeba* spp. aus [20].

Das aus *A. culbertsoni* isolierte Culbicin konnte in dieser Arbeit gleichzeitig rekombinant exprimiert und mit dem ^{15}N -Isotop angereichert werden. Die konforme Disulfidverbindung der zehn Cysteine wurde durch Massenspektrometrie, RP-HPLC und zweidimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren verifiziert. Die Untersuchungen der Tertiärstruktur mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie offenbarte ein vier- α -Helix-Protein mit einer bisher einzigartigen Faltungstopologie. Insgesamt sind 60173 Strukturen in der SCOP-Datenbank [100] hinterlegt. Davon wurden 2009 bisher 5201 Strukturen hinzugefügt (Stand 15.09.09) [101]. Von den bisher 1283 bekannten Faltungstopologien wurden die letzten vier im Jahre 2007 entdeckt. In den darauffolgenden beiden Jahren kamen keine weiteren hinzu. Damit ist die neue Faltungstopologie des Culbicins nicht nur die erste seit zwei Jahren, sondern stellt womöglich auch das letzte noch fehlende Glied in der Möglichkeit der Anordnung von Sekundärstrukturelementen bei Proteinen dar.

Die N-terminale, lange und hydrophobe α -Helix ist über kleinere Schleifenbereiche mit drei beinahe rechtwinklig angeordneten α -Helices verbunden. Stabilisiert wird diese Struktur durch fünf intramolekulare Cystine. Die Verteilungen der anionischen und kationischen Seitenketten der Aminosäuren geben dem Protein einen amphipathischen Charakter.

Darüber hinaus konnte die Cytotoxizität von Culbicin gegenüber humanen Neuroblastomzellen festgestellt werden. In diesen Experimenten führte der Zusatz von Natriumchlorid zu einer verminderten Cytotoxizität des Culbicins.

Demzufolge kann von einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Protein und der Membran der Neuroblastomazellen ausgegangen werden. Somit erhält Culbicin die Bedeutung eines potenziellen Virulenzfaktors in der Entwicklung nekrotischer Gewebläsionen, die durch die Amöbe hervorgerufen werden.

Für Culbicin wurde die Fähigkeit, prokaryotische Membranen und anionische Modellmembranen durch Porenbildung permeabilisieren zu können, bereits nachgewiesen [21]. Jedoch kann Culbicin nicht zu der für porenbildende, cytolytische Proteine parasitischer Amöben bekannten Superfamilie der SAPLIPs gezählt werden. Bei Culbicin liegen fünf statt der für die SAPLIP-Familie charakteristischen drei intramolekularen Disulfidbindungen vor [19]. Viel gewichtiger ist jedoch, dass Culbicin nicht die kennzeichnende *folded-leaf*-Topologie der SAPLIPs, sondern eine bisher nicht bekannte, einzigartige Faltung aufweist. Somit stellt Culbicin das erste Mitglied einer neuen Superfamilie von cytolytischen Proteinen parasitischer Amöben dar.

4.1 Modell des Wirkmechanismus von Culbicin

Die Aktivität von rCulbicin gegenüber Modellmembranen in Abhängigkeit von der Ladung der Kopfgruppen der Phospholipide und vom pH-Wert der Umgebung wurde durch vorherige Untersuchungen [66] und durch die vorliegende Arbeit gezeigt. Quervernetzungsexperimente zeigten, dass Culbicin bei einem pH-Wert kleiner als 6,0 an negativ geladene Phosphatidylglycerin-Membranen bindet und oligomerisiert. Dieser Effekt ist bei einem pH-Wert von 8,0 nicht zu beobachten. An zwitterionischen Phosphatidylcholinmembranen findet weder bei pH-Werten von 5,4 noch von 8,0 eine Oligomerisierung statt.

Das bedeutet, dass Culbicin nur mit anionischen oder teilweise anionischen Membranen über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren kann [66]. Eine Oligomerisierung in Lösung wurde bei einem pH-Wert von 5,4 nicht beobachtet, was zeigt, dass Culbicin nur in Gegenwart von Membranen oligomerisiert.

Phosphatidylglycerinlipide sind Bestandteile prokaryotischer Plasmamembranen [102]. Durch die Quervernetzung des Culbicins an Modellmembranen wurde belegt, dass der Wirkort von Culbicin die Plasmamembran ist, was im Einklang mit früheren Experimenten steht [21, 66].

Die pH-Wert-abhängige Aktivität des Culbicins wurde auf die Protonierung von Histidinen zurückgeführt. Dieses wurde umso deutlicher durch die chemische Modifikation der Histidine mit DEPC. Zwar wurde eine vollständige Modifikation aller Histidine nicht erreicht, jedoch hatte die Modifikation sowohl eine Dimerisierung des Moleküls als auch eine geringere Oligomerisierung an PG-Membranen zur Folge. Dieses Verhalten war vergleichbar mit den Beobachtungen für unmodifiziertes Culbicin bei einem pH-Wert von 8,0.

Der Imidazolring eines Histidins hat einen pKs-Wert von *circa* 6,0. Daraus ergibt sich, dass nur unterhalb eines pH-Wertes von 6,0 das Stickstoffatom (HN^+) protoniert und positiv geladen vorliegt. Diese positive Ladung ist für die Funktion des Culbicins in zweierlei Hinsicht von entscheidender Bedeutung:

Zum einen wurde aus der durch die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur von Culbicin ersichtlich, dass die Position der drei protonierten Histidine H50, H52 und H59 zusammen mit dem Lysin 56 zu einer Ansammlung von positiven Ladungen an der C-terminalen α -Helix führt (Abbildung 34 A). Die Seitenketten von H52, H59 und K56 sind dem Lösungsmittel zugewandt und flexibel (Abbildung 34 B). Dieser flexible, positive Ladungspol ist für die initiale elektrostatische Wechselwirkung zwischen Culbicin und den Phospholipiden der Membran essentiell. Da bei einem pH-Wert von 8,0 die Histidine deprotoniert sind, ist eine elektrostatische Wechselwirkung mit anionischen Membranen nicht möglich.

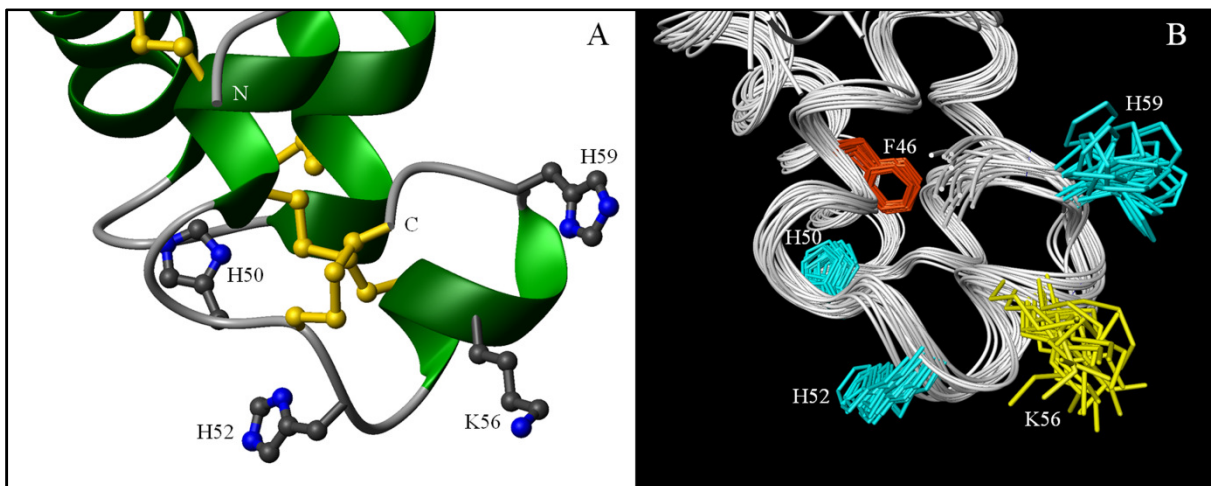


Abbildung 34: Darstellung des positiven Ladungspols bei einem pH-Wert von 5,4. A) Die Bandmodelldarstellung des Culbicins zeigt die α -Helices (grün) nebst Disulfidbindungen (gelb). Zusätzlich sind die Histidine und das Lysin (H50, H52, H59 und K56) angegeben, die an der Bildung eines positiven Ladungspols beteiligt sind. N und C markieren die Termini von Culbicin. B) Darstellung des Ensembles aus den 20 unabhängig berechneten Strukturen mit den flexiblen Seitenketten von H50, H52, H59 (hellblau) und K56 (gelb). Zum Vergleich ist die im hydrophoben Kern liegende, nicht flexible Seitenkette von F46 (orange) gezeigt.

Zum anderen wurden bei einem pH-Wert von 8,0 Dimere des Culbicins beobachtet, was auf die Deprotonierung der drei Histidine zurückgeführt wird. Durch die Interaktionsfläche des Homodimers sind sowohl H50 als auch H52 maskiert. Zusätzlich liegen dort die negativ geladenen Seitenketten von D28 und D57. Diese verleihen dem Dimer einen negativen Ladungspol in der Mitte des Moleküls (Abbildung 35).

Der negative Ladungspol führt zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen Dimer und anionischen Kopfgruppen der Membran. Daher kann bei einem pH-Wert von 8,0 keine initiale Wechselwirkung mit anionischen Membranen beobachtet werden.

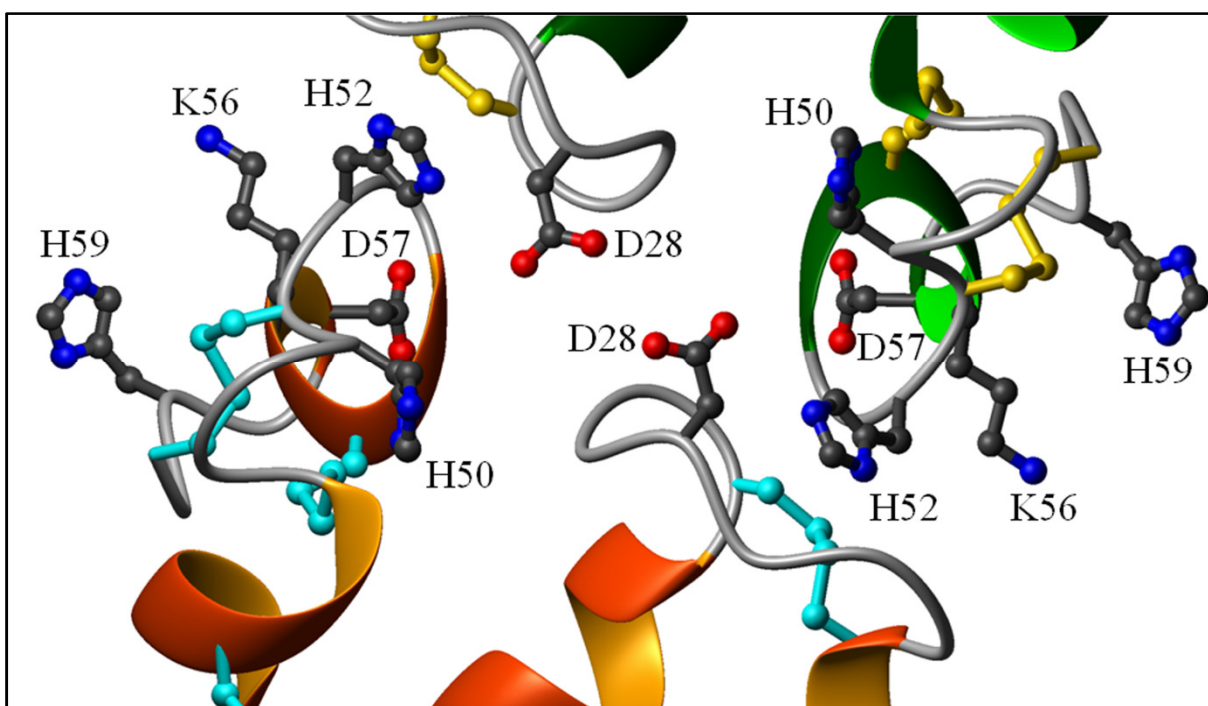


Abbildung 35: Darstellung der an der Dimerisationsfläche beteiligten Aminosäuren. Die beiden Monomere sind in orange und grün in der Bandmodell-darstellung mit Disulfidbrücken (gelb und cyan) abgebildet. Die Seitenketten von D28 und D57 sind maßgeblich für die Ausbildung eines negativen Ladungspols. Die Histidine H50 und H52 befinden sich in der Dimerisationsfläche. Der im Monomer vorhandene positive Ladungspol steht nicht für eine elektrostatische Wechselwirkung mit Membranen zur Verfügung.

Gestützt werden die Beobachtungen der Dimerisierung durch die $2D$ - 1H - ^{15}N -HSQC-Experimente mit DEPC modifiziertem Culbicin. Dieses bildet bei einem pH-Wert von 5,4 ebenfalls Dimere aus und zeigt im $2D$ - 1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ähnliche Differenzen in der chemischen Verschiebung wie das Spektrum bei einem pH-Wert von 8,0. Die Unterschiede bei der Größenausschlusschromatographie in den Elutionszeiten des Dimers bei pH 8,0 und des mit DEPC modifizierten Culbicins bei pH 5,4 sind auf die verschiedenen hydrodynamischen Volumina der Moleküle zurückzuführen.

Da vermutlich nicht alle drei Histidine in allen Molekülen gleichsam modifiziert wurden, tragen die Seitenketten der nicht modifizierten Histidine oder der N-Termini ($pK_s = 7,8$) zum unterschiedlichen hydrodynamischen Volumen bei beiden pH-Werten bei.

Eine Histidin-vermittelte, antiparallele Dimerisierung ist bei einem anderen cytolytischen Effektorprotein, Amoebapore-A, aus *E. histolytica* bekannt und untersucht worden. Amoebapore-A ist ein cytolytisches und antimikrobielles Protein, welches unterhalb eines pH-Wertes von 6,0 stabile und ionenselektive Poren an Modelmembranen bildet [96, 103]. Das für die Porenbildung vorgeschlagene Modell geht von einer elektrostatischen, intermolekularen Wechselwirkung der Amoebapore-A-Monomere aus. Dabei bewirkt die Interaktion von H75 mit D63 und E2 mit K64 die Bildung eines antiparallelen Homodimers [52]. Die Histidine (H75) der Monomere tragen nur unterhalb eines pH-Wertes von 6,0 die für die Interaktion essentiell positive Ladung und stehen somit für die Bildung des Dimers zur Verfügung [52, 104]. Das postulierte Modell basiert auf der für die Aktivität von Amoebapore-A pH-Wert-abhängigen Dimerisierung, was sich mit der membranolytischen Aktivität bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 deckt. Demzufolge wäre der Mechanismus der Dimerisierung von Amoebapore-A dem von Culbicin entgegengesetzt:

Beide Proteine liegen bei einem pH-Wert kleiner als 4,0 monomer vor. Die Asparaginsäuren und Glutaminsäuren sind protoniert und stehen für die Ausbildung der für die Dimerisierung von Amoebapore-A wichtigen Ionenpaare nicht zu Verfügung. Für Culbicin sind diese protonierten Aminosäuren für die Dimerbildung nicht entscheidend. Bei einem pH-Wert unter- beziehungsweise oberhalb von 6,0 verhalten sich die beiden Proteine differenzierter. Im Falle des Culbicins stoßen sich die Monomere vermutlich wegen der Bildung des positiven Ladungspols ab, und die Moleküle verbleiben monomer. Bei Amoebapore-A bildet das protonierte Histidin 75 des einen Monomers mit dem Asparagin 63 des anderen ein Ionenpaar aus und es erfolgt die antiparallele Dimerisierung in Lösung. Bei pH-Werten oberhalb von 6,0 kann das deprotonierte H75 von Amoebapore-A an das Asparagin 63 des anderen Monomers nicht binden und es liegt monomer vor. Im Culbicin ist hingegen der positive Ladungspol bei diesen Bedingungen nicht vorhanden und es findet keine elektrostatische Abstoßung statt. Die Dimerisierung ist hier auf hydrophobe sowie auf Wechselwirkungen zwischen Kationen des Lösungsmittels mit den Asparaginsäuren D28 und D57 zurückzuführen. Wasserstoffbrückenbindungen liegen in der Interaktionsfläche nicht vor.

Beide Mechanismen der Dimerisierung sind vollständig reversibel, da die Überführung in Bedingungen unterhalb von pH 6,0 die Aktivität der Proteine wieder herstellt. Das spricht bei Culbicin dafür, dass die Abstoßung durch die Protonierung der Histidine und somit durch die Regeneration des positiven Ladungspols stärker ist, als die Anziehung durch die negativ geladenen Asparaginsäuren.

Die pH-Wert abhängige Funktion von Histidinen wird in der Literatur an zahlreichen Beispielen bakterieller Toxine und antimikrobieller Peptide beschrieben. Beim Anthraxtoxin von *Bacillus anthracis* führt die pH-Wert abhängige Abstoßung von insgesamt sieben Histidinen an den Domänen zwei und vier des protektiven Antigens im endosomalen Lumen zur Freisetzung einer hydrophoben Schleife. Diese Schleife ist für den Übergang von der heptameren Präpore zur Pore wesentlich und ermöglicht die Translokation der enzymatisch aktiven Bereiche, des Lethalfaktors und des Ödemfaktors, ins Cytoplasma [105].

Antimikrobielle Peptide wie Piscidin und Clavanin A zeigten bei pH-Werten unterhalb von 6,0 erhöhte antimikrobielle Aktivität, was auf jeweils vier Histidine zurückgeführt wurde [106, 107]. Auch konnten synthetische Histidin-reiche Peptide generiert werden, die einzig bei sauren pH-Wert Bedingungen antimikrobiell aktiv waren [108]. Bei den genannten Beispielen und Culbicin wirken Histidine als molekulare Schalter und ermöglichen der synthetisierenden Zelle, diese hochaktiven Proteine inaktiv zu speichern und diese nach Verschmelzung der speichernden cytoplasmatischen Granula mit dem Phagolysosom aktiv zur Lyse von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen einzusetzen.

Der weitere Mechanismus der Membranpermeabilisierung und die Stöchiometrie einer transmembranen Pore von Culbicin sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die N-terminale, hydrophobe α -Helix ist bei der Bildung einer transmembranen Pore von entscheidender Bedeutung. Mit einer Länge von *circa* 30 Å kann sie eine Lipiddoppelschicht durchspannen. Bei einer Porenbildung könnte sie zu den hydrophoben Acylketten der Membran hin gerichtet sein. Ob die Pore jedoch mithilfe der Membranlipide gebildet wird, wie im Falle der toroidalen Poren oder sie einzig aus Culbicinmonomeren besteht, die sich wie die Dauben eines Fasses assemblieren, bleibt bisher ungeklärt. Die Quervernetzungsexperimente zeigten jedoch einen kontinuierlichen Grad an Oligomeren unabhängig von dem Verhältnis an Peptid zu Lipid. Die bekannten Mechanismen der Bildung einer transmembranen Pore, das *toroidal-pore* und das *barrel-stave* Modell, unterscheiden sich hingegen von der Dauer und von der Größe der ausgebildeten Poren.

Im *toroidal-pore* Modell wird angenommen, dass die Stöchiometrie der Pore abhängig von der Konzentration der Peptid-Moleküle ist. Diese Poren werden als Übergangszustand des *carpet-like* Modells bei hoher Peptid-Konzentration gesehen und sind demnach transient. Für AMPs wie Magainin [43], Melittin [109], Polyphemusin [110] und Piscidin [106] wurde dies gezeigt.

Im *barrel-stave*-Mechanismus wird von einer stöchiometrisch gleichen und stabilen Pore ausgegangen. Nur wenige Vertreter von Peptiden bis Proteinen, die anscheinend entsprechend dieses Modells wirken, wie Alamethicin [111], Amoebapore-A [52], Pardaxin [112], Gaegurin 4 [113] und S100A7/Psoriasin [53] wurden bisher beschrieben. Da Culbicin stets eine ähnliche Oligomerisierung unabhängig von seiner Konzentration zeigte, entspricht der Mechanismus am ehesten dem *barrel-stave*-Modell.

Festzuhalten bleibt, dass die Absättigung der anionischen Membran mit polykationischen Peptiden zu einer verminderten Affinität der initialen elektrostatischen Bindung und zu einer sterischen Abstoßung der Moleküle untereinander führen kann. Insofern ist die weitere Verteilung der Ladungen des Culbicins abgesehen, von den bereits diskutierten N- und C-Termini, interessant. Die auffälligen Positionen von K4, K37, E40 und K10, E48 und D49 auf den Flanken des Moleküls könnten für die Porenbildung nach Bindung an die Membran entscheidend sein. Diese geladenen Aminosäurereste stünden für die elektrostatische Attraktion weiterer Culbicinmonomere zur Verfügung, wobei E48 mit K4, K10 mit E40 und D49 mit K37 Ionenpaare ausbilden könnten (Abbildung 36).

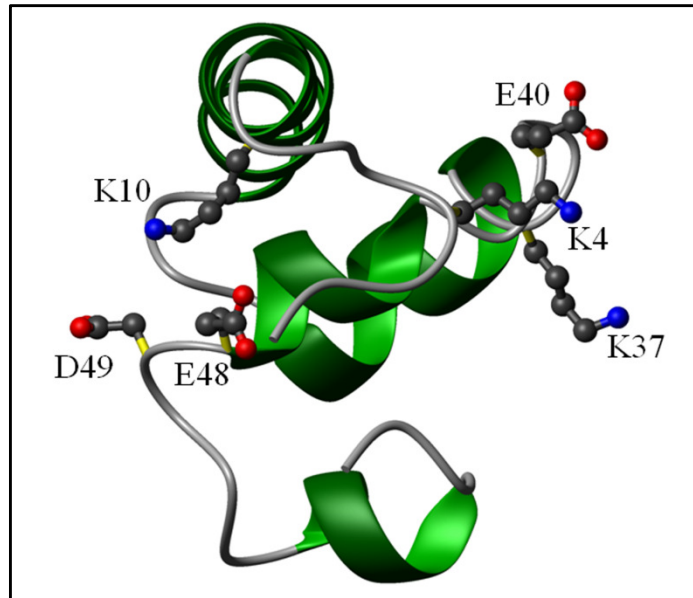


Abbildung 36: Darstellung der geladenen Seitenketten, die für eine Oligomerisierung denkbar sind. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit der jeweiligen Position in der Primärstruktur angegeben. Die Disulfidbrücken wurden zur Übersicht weggelassen. Positive Ladungen sind blau, negative rot angegeben.

Da nur in Gegenwart von anionischen Membranen eine Oligomerisierung beobachtet wurde, müssten Konformationsänderungen nach Bindung an die Membran zur optimalen Positionsverschiebung der Seitenketten führen. Die genannten Aminosäuren befinden sich bis auf K10 in flexiblen Schleifenbereichen, bei denen Konformationsänderungen nach der Bindung von Culbicin an die Membran denkbar wären. Solche Änderungen in der räumlichen Position der Aminosäuren und ganzer Sekundärstrukturelemente wurden beispielsweise bei der Bildung der Pore des bakteriellen Toxins aus *E. coli*, Cytolysin A, anschaulich beschrieben [114].

Auf Grundlage der genannten Ionenpaare wurden Porenmodelle generiert, die im Einklang zu den Poren des *barrel-stave* Mechanismus stehen. Für die Positionierung der N-terminalen α -Helix ergaben sich zwei Orientierungsmöglichkeiten, in das Lumen der Pore hinein, was zu einem hydrophobem Lumen der Pore führen würde oder nach außen gerichtet unter Bildung eines hydrophilen Lumens. Gegen das Modell einer Pore mit hydrophobem Lumen sprechen die nach außen gerichteten Ladungen der Pore, die in den hydrophoben Acylkettenbereich einer Plasmamembran zeigen würden und einen energetisch ungünstigen Zustand zur Folge hätten. Zudem wäre ein hydrophobes Lumen nicht zugänglich für das Lösungsmittel. Ein Efflux von Ionen wäre durch eine hydrophobe Pore nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Porenmodelle mit hydrophilem Lumen favorisiert.

Die hexamere Assemblierung der Culbicinmonomeren führte zu einem Poreninnendurchmesser von 0,8 nm, die heptameren und oktameren Porenmodelle ergäben einen Innendurchmesser von 1,5 nm.

Die in der Literatur beschriebenen Poreninnendurchmesser, die durch antimikrobielle Peptide erzeugt werden, variieren, was im Zusammenhang mit dem angenommenen Mechanismus der Porenbildung steht. Peptide, für die das toroidale Porenmodell vorgeschlagen wurde, wie Magainin 2 oder Melittin, bilden von der Membranzusammensetzung abhängige variable Poren mit einem Innendurchmesser von 3 - 5 nm [115, 116]. Im Gegensatz dazu wurde für die oktamere Pore von Alamethicin ein Innendurchmesser von 1,8 nm vorgeschlagen [117]. Für das hexamere Modell von Amoebapore-A wurde ein Innendurchmesser von 2 nm postuliert [104]. Im Falle des Culbicins deckte sich der Innendurchmesser einer heptameren oder oktameren Pore mit den beschriebenen Modellen von Peptiden und Proteinen, die nach dem *barrel-stave* Modell wirken. Zwar sind auch Poren aus höheren Oligomeren möglich, jedoch sind größere Poren instabiler und anfälliger gegen Scherkräfte und Deformationen.

Die Ladungsverteilung aller Porenmodelle des Culbicins mit hydrophilem Lumen zeigte eine Ansammlung von positiven Ladungen auf der einen und von negativen Ladungen auf der anderen Seite der Pore, die dem extrazellulären Raum beziehungsweise dem Cytoplasma zugewandt sind. Eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den geladenen Flächen benachbarter Poren kann nicht ausgeschlossen werden. In welche Richtung die Pore in eine Membran eintaucht, bleibt zwar bisher ungeklärt, jedoch lässt sich durch die Polarisierung der Porenflächen eine Ionenselektivität erkennen. Demnach müssten die von Culbicin gebildeten Poren zu einem selektiven Ionenstrom führen, dem es experimentell nachzugehen gilt.

Zur Verifizierung des vorgeschlagenen Modells und des Mechanismus von Culbicin könnten weitreichende ortsspezifische Mutagenese-Experimente dienen, wie sie beispielsweise anschaulich an den antimikrobiellen Peptiden Curvacin [118], Clavanin [119] und Cryptdin 4 [120] durchgeführt wurden. So könnte der sukzessive Austausch der Histidine H50, H52 und H59 gegen Alanine zu einer verminderten Aktivität gegen Bakterien und an Modellmembranen führen, da der positive Ladungspol nicht mehr gebildet werden könnte. Außerdem sollten diese Versuche klären, welche Histidinreste für die Dimerisierung verantwortlich sind. Aminosäuren wie Lysin und Arginin an den Positionen der Histidine müssten hingegen dem Molekül eine weitestgehend pH-Wert-unabhängige Aktivität verleihen, sowie die Bildung eines inaktiven Dimers verhindern, da die Seitenketten bis zu

einem pH-Wert von *circa* 10 stets positiv geladen wären. In Experimenten mit Defensinmutanten wurde die Bedeutung von Argininen für die Ionen-unabhängige Aktivität herausgestellt [34]. Demzufolge müssten mutierte H50R, H52R, H59R sowie K56R Culbicinmoleküle unempfindlich in ihrer Aktivität für hohe Ionenstärke sein. Über die Einführung von Tryptophanen an der N-terminalen α -Helix könnte die Orientierung der Moleküle durch Tryptophanfluoreszenz-Emissionsspektren innerhalb der Lipiddoppelschicht analysiert werden wie es für das antimikrobielle Peptid Ci-MAMA aus *Ciona intestinalis* und das lantibiotische Peptid Nisin durchgeführt wurde [35, 121]. Hierfür würden sich die Glycine 3 und 25 anbieten.

Die Fähigkeit zur Oligomerisierung beziehungsweise der Porenbildung von Culbicin könnte über die Ionenpaare K4, K37, E40 und K10, E48, D49 untersucht werden. Der Austausch gegen nicht geladene, wenig hydrophobe Aminosäuren wie Alanin könnte die Assemblierung der Monomere verhindern und so das vorgeschlagene Modell zur Porenbildung bestärken. Aufgrund dessen müsste die antimikrobielle Aktivität dieser mutierten Proteine reduziert sein. Zusätzlich könnten an den Flanken nahe den Ionenpaaren liegende Alanine wie A38 auf der einen und A14 auf der anderen Flanke, durch geladene Aminosäuren ausgetauscht werden und somit die elektrostatische Wechselwirkung verstärken. Das könnte die Porenbildung begünstigen und hätte womöglich eine erhöhte antimikrobielle Aktivität zur Folge. Der Austausch der ionischen durch eine hydrophobe Interaktion könnte die Löslichkeit von mutiertem Culbicin allerdings nachteilig beeinflussen.

Zusätzlich könnten mutierte Culbicinmoleküle, wie D28A und D57A, die Dimerisierung von Culbicin verhindern, wenn für die Stabilisierung der Dimere eine Wechselwirkung von Kationen mit den Asparaginsäuren essentiell ist. Die membran-permeabilisierende Aktivität des Proteins könnte durch derart gerichtete Mutationen ebenfalls beeinflusst werden, da die genannten Asparaginsäuren an der Polarisierung der Porenflächen beteiligt sind. Jedoch könnten diese mutierten Moleküle Aufschluss über die Art der Wechselwirkung in der Dimerinteraktionsfläche geben. Der Austausch gegen Lysine an dieser Stelle müsste eine Dimerisierung ermöglichen, wenn die Stabilisierung durch Wechselwirkung von Ionen aus dem Lösungsmittel mit den geladenen Seitenketten stattfindet. Die Kenntnis darüber inwieweit die dimeren D28K- und D57K-Moleküle des Culbicins die Fähigkeit behielten an anionische Membranen zu binden und porenbildende Aktivität zu entfalten, könnte die Frage beantworten, ob ein negativer Ladungspol in der Mitte des Dimers oder die Maskierung des positiven Ladungspols für die initiale Bindung entscheidend ist.

4.2 Culbicin als *pars pro toto* für das Arsenal von *A. culbertsoni*

Mit Culbicin verfügt *A. culbertsoni* über ein cytotoxisches, antimikrobielles und porenbildendes Peptid mit dem Prokaryoten wie Eukaryoten gleichsam wirkungsvoll attackiert werden können. Als Nahrungsquelle in ihrer natürlichen Umgebung werden phagozytierte Bakterien mit Culbicin in Kontakt gebracht und lysiert. Wie bereits bei *E. histolytica* bekannt, speichern amöboide Parasiten ihre Effektormoleküle in Granula [122, 123]. In einer früheren Arbeit konnte auch Culbicin über Immunofluoreszenz mit anti-Culbicin-Antikörpern in cytosolischen Granula von *A. culbertsoni* nachgewiesen werden [21]. Die Verschmelzung dieser Granula mit dem Phagolysosom liefert den Culbicinmolekülen die optimalen sauren Bedingungen, um ihre höchste Aktivität entfalten zu können. Als Virulenzfaktor, zum Beispiel im menschlichen Hirngewebe, kann die Amöbe auf diese Waffe zurückgreifen, um auch eukaryotische Zellen zu lysieren und zu metabolisieren. Sicherlich stellt Culbicin dabei nur einen Teil des ganzen Arsenal von Effektormolekülen dieser Amöbe dar. Culbicin ist allerdings bisher für die von parasitischen Amöben beschriebenen Moleküle einzigartig.

Die neue Faltungstopologie von Culbicin erschließt neben einer neuen Superfamilie von Proteinen auch eine bisher nicht beschriebene Familie von Effektormolekülen parasitischer Protozoen. Dass bereits ein Homolog von Culbicin auch in anderen *Acanthamoeba*-Spezies über Western-Blot-Analysen nachgewiesen wurde [21], lässt auf die Entdeckung weiterer Mitglieder dieser Familie in naher Zukunft hoffen.

Abkürzungsverzeichnis

1 D	eindimensional
2 D	zweidimensional
3 D	dreidimensional
A	Alanin
AMP	antimikrobielles Peptid
APS	Ammoniumperoxydisulfat
C	Cystein
D	Asparaginsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>
DSS	Disuccinimidyl-Suberat
E	Glutaminsäure
EDAC	1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	lat.: <i>et altera</i>
F	Phenylalanin
FID	engl.: <i>free-induction decay</i>
H	Histidin
HSQC	engl.: <i>heteronuclear-single quantum coherence</i>
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
MeCN	Acetonitril

MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
NMR	engl.: <i>nuclear-magnetic resonance</i>
NOESY	engl.: <i>Nuclear-Overhauser effect and exchange spectroscopy</i>
OD ₆₀₀	engl.: <i>optical density at 600 nm</i>
P	Prolin
PC	Phosphatidylcholin
pdb	engl.: <i>protein database</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
ppm	engl.: <i>parts per million</i>
R	Arginin
r.m.s.d.	engl.: <i>root mean square deviation</i>
S	Serin
SAPLIP	engl.: <i>Saposin-like Protein</i>
SCOP	engl.: <i>structural classification of proteins</i>
spp.	Spezies
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TFA	engl.: <i>trifluoric acid</i>
TOCSY	engl.: <i>total-correlation spectroscopy</i>
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	engl.: <i>units</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Valin
W	Tryptophan
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

1. Culbertson, C.G., J.W. Smith und J.R. Minner, *Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity*. Science, 1958. **127**(3313): 1506.
2. Culbertson, C.G., J.W. Smith, H.K. Cohen und J.R. Minner, *Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba*. Am J Pathol, 1959. **35**(1): 185-97.
3. Fowler, M. und R.F. Carter, *Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp.: a preliminary report*. Br Med J, 1965. **2**(5464): 740-2.
4. Butt, C.G., *Primary amebic meningoencephalitis*. N Engl J Med, 1966. **274**(26): 1473-6.
5. Cerva, L., K. Novak und C.G. Culbertson, *An outbreak of acute, fatal amebic meningoencephalitis*. Am J Epidemiol, 1968. **88**(3): 436-44.
6. Sarica, F.B., K. Tufan, M. Cekinmez, B. Erdogan und M.N. Altinors, *A rare but fatal case of granulomatous amebic encephalitis with brain abscess: the first case reported from Turkey*. Turk Neurosurg, 2009. **19**(3): 256-259.
7. Naginton, J., P.G. Watson, T.J. Playfair, J. McGill, B.R. Jones und A.D. Steele, *Amoebic infection of the eye*. Lancet, 1974. **2**(7896): 1537-40.
8. Jones, D.B., G.S. Visvesvara und N.M. Robinson, *Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1975. **95**(2): 221-32.
9. Joslin, C.E., E.Y. Tu, M.E. Shoff, G.C. Booton, P.A. Fuerst, T.T. McMahon, R.J. Anderson, M.S. Dworkin, J. Sugar, F.G. Davis und L.T. Stayner, *The association of contact lens solution use and Acanthamoeba keratitis*. Am J Ophthalmol, 2007. **144**(2): 169-180.
10. Kumar, R. und D. Lloyd, *Recent advances in the treatment of Acanthamoeba keratitis*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(4): 434-41.

11. Niedrig, M., Reinhardt, B., Buchard, G.D., Schmitz, H., Tannich, E., Tintelnot, K., Laude, G., Alpers, K., Stark, K. und Mehlhose, J., *Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten*. Robert Koch-Institut, 2006.
12. Hadas, E. und T. Mazur, *Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of Acanthamoeba spp.* Trop Med Parasitol, 1993. **44**(3): 197-200.
13. Mitro, K., A. Bhagavathiammai, O.M. Zhou, G. Bobbett, J.H. McKerrow, R. Chokshi, B. Chokshi und E.R. James, *Partial characterization of the proteolytic secretions of Acanthamoeba polyphaga*. Exp Parasitol, 1994. **78**(4): 377-85.
14. Ferrante, A. und E.J. Bates, *Elastase in the pathogenic free-living amoebae Naegleria and Acanthamoeba spp.* Infect Immun, 1988. **56**(12): 3320-1.
15. Mattana, A., F. Bennardini, S. Usai, P.L. Fiori, F. Franconi und P. Cappuccinelli, *Acanthamoeba castellanii metabolites increase the intracellular calcium level and cause cytotoxicity in wish cells*. Microb Pathog, 1997. **23**(2): 85-93.
16. Mattana, A., M.G. Tozzi, M. Costa, G. Delogu, P.L. Fiori und P. Cappuccinelli, *By releasing ADP, Acanthamoeba castellanii causes an increase in the cytosolic free calcium concentration and apoptosis in wish cells*. Infect Immun, 2001. **69**(6): 4134-40.
17. Pettit, D.A., J. Williamson, G.A. Cabral und F. Marciano-Cabral, *In vitro destruction of nerve cell cultures by Acanthamoeba spp.: a transmission and scanning electron microscopy study*. J Parasitol, 1996. **82**(5): 769-77.
18. Marciano-Cabral, F., R. Puffenbarger und G.A. Cabral, *The increasing importance of Acanthamoeba infections*. J Eukaryot Microbiol, 2000. **47**(1): 29-36.
19. Bruhn, H., *A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 2): 249-57.
20. Herbst, R., *Molekulare Charakterisierung von cytolytischen Proteinen parasitischer Protozoen*. Dissertation, Hamburg, Der Andere Verlag, 2001.

21. Simanski, M., *Molekulare Charakterisierung von antimikrobiellen und cytolytischen Polypeptiden von Acanthamoeba culbertsoni, einem freilebenden und potenziell humanpathogenen Protozoon*. Dissertation, Kiel, 2007.
22. Hoskin, D.W. und A. Ramamoorthy, *Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(2): 357-75.
23. Wade, D., A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman und R.B. Merrifield, *All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): 4761-5.
24. Dubos, R.J., *The adaptive production of enzymes by bacteria*. Bacteriol Rev, 1940. **4**(1): 1-16.
25. Wallace, B.A., *Gramicidin channels and pores*. Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1990. **19**: 127-57.
26. Bakker, E.P., *Ionophor-Antibiotika*. Antibiotics, 1975. **III**: 67-97.
27. Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton und R.I. Lehrer, *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): 1427-35.
28. Wang, Z. und G. Wang, *APD: the antimicrobial peptide database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): D590-2.
29. Dennison, S.R., J. Howe, L.H. Morton, K. Brandenburg, F. Harris und D.A. Phoenix, *Interactions of an anionic antimicrobial peptide with Staphylococcus aureus membranes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(4): 1006-10.
30. Schitteck, B., R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner und C. Garbe, *Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): 1133-7.
31. Boman, H.G., *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: 61-92.

32. Jenssen, H., P. Hamill und R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): 491-511.
33. Yeaman, M.R. und N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): 27-55.
34. Zou, G., E. de Leeuw, C. Li, M. Pazgier, C. Li, P. Zeng, W.Y. Lu, J. Lubkowski, und W. Lu, *Toward understanding the cationicity of defensins. Arg and Lys versus their noncoded analogs*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): 19653-65.
35. Fedders, H., M. Michalek, J. Grötzinger und M. Leippe, *An exceptional salt-tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of haemocytes of the marine invertebrate Ciona intestinalis*. Biochem J, 2008. **416**(1): 65-75.
36. Dathe, M., H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann und M. Bienert, *Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge*. FEBS Lett, 2001. **501**(2-3): 146-50.
37. Wieprecht, T., M. Dathe, M. Beyermann, E. Krause, W.L. Maloy, D.L. MacDonald und M. Bienert, *Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes*. Biochemistry, 1997. **36**(20): 6124-32.
38. Chen, Y., M.T. Guarnieri, A.I. Vasil, M.L. Vasil, C.T. Mant und R.S. Hodges, *Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): 1398-406.
39. Kayser, F.H., Bienz, K. A., Eckert, J. und Lindenmann, J., *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Verl., New York, **7. Aufl.**, 1989.
40. Hancock, R.E., *Peptide antibiotics*. Lancet, 1997. **349**(9049): 418-22.
41. Shaw, N., *Lipid composition as a guide to the classification of bacteria*. Adv Appl Microbiol, 1974. **17**(0): 63-108.
42. Chen, F.Y., M.T. Lee und H.W. Huang, *Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation*. Biophys J, 2003. **84**(6): 3751-8.

43. Huang, H.W., *Action of antimicrobial peptides: two-state model*. Biochemistry, 2000. **39**(29): 8347-52.
44. Chen, F.Y., M.T. Lee und H.W. Huang, *Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin*. Biophys J, 2002. **82**(2): 908-14.
45. van den Bogaart, G., J.V. Guzman, J.T. Mika und B. Poolman, *On the mechanism of pore formation by melittin*. J Biol Chem, 2008. **283**(49): 33854-7.
46. Shai, Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1462**(1-2): 55-70.
47. Huang, H.W., *Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(9): 1292-302.
48. Zhang, L., A. Rozek und R.E. Hancock, *Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): 35714-22.
49. Wu, M., E. Maier, R. Benz und R.E. Hancock, *Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of Escherichia coli*. Biochemistry, 1999. **38**(22): 7235-42.
50. Ehrenstein, G. und H. Lecar, *Electrically gated ionic channels in lipid bilayers*. Q Rev Biophys, 1977. **10**(1): 1-34.
51. Yang, L., T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding und H.W. Huang, *Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores*. Biophys J, 2001. **81**(3): 1475-85.
52. Hecht, O., N.A. Van Nuland, K. Schleinkofer, A.J. Dingley, H. Bruhn, M. Leippe, und J. Grötzinger, *Solution structure of the pore-forming protein of Entamoeba histolytica*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): 17834-41.
53. Michalek, M., C. Gelhaus, O. Hecht, R. Podschun, J.M. Schröder, M. Leippe und J. Grötzinger, *The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(6): 740-6.

54. Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii und K. Miyajima, *An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation*. *Biochemistry*, 1996. **35**(35): 11361-8.
55. Lottspeich, F. und H. Zorbas, *Bioanalytik*. Elsevier, GmbH, Spektrum Akad. Verl., **1. Aufl.**, 1998.
56. Bloch, F. und W. W. Hansen, *Phys. Rev.*, 1946. **69**(127).
57. Purcell, E.M., H. C. Torrey und R. V. Pound, *Phys. Rev.*, 1946. **69**(37).
58. Ernst, R.R. und W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instr.*, 1966. **37**: 93.
59. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. Jon Wiley and Sons Inc., New York, 1986.
60. Fiaux, J., E.B. Bertelsen, A.L. Horwich und K. Wüthrich, *NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex*. *Nature*, 2002. **418**(6894): 207-11.
61. Inomata, K., A. Ohno, H. Tochio, S. Isogai, T. Tenno, I. Nakase, T. Takeuchi, S. Futaki, Y. Ito, H. Hiroaki und M. Shirakawa, *High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells*. *Nature*, 2009. **458**(7234): 106-9.
62. Sakakibara, D., A. Sasaki, T. Ikeya, J. Hamatsu, T. Hanashima, M. Mishima, M. Yoshimasu, N. Hayashi, T. Mikawa, M. Walchli, B.O. Smith, M. Shirakawa, P. Güntert und Y. Ito, *Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy*. *Nature*, 2009. **458**(7234): 102-5.
63. Ernst, R.R., G. Bodenhausen und A. Wolkaun, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. 1987.
64. LaVallie, E.R., E.A. DiBlasio, S. Kovacic, K.L. Grant, P.F. Schendel und J.M. McCoy, *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. *Biotechnology (N Y)*, 1993. **11**(2): 187-93.
65. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1951. **62**(3): 293-300.

66. Michalek, M., *Charakterisierung des rekombinant exprimierten antimikrobiellen Peptids Culbicin*. Diplomarbeit, Kiel, 2006.
67. Dingley, A.J., I. Lorenzen und J. Grötzinger, *NMR analysis of viral protein structures*. *Methods Mol Biol*, 2008. **451**: 441-62.
68. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): 680-5.
69. De Moreno, M.R., J.F. Smith und R.V. Smith, *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure*. *Anal Biochem*, 1985. **151**(2): 466-70.
70. Poehling, H. und Neuhoff, V., *Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis*. *Electrophoresis*, 1981. **2**: 141-147.
71. *ProteinCalculator v3.3.*, <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>.
72. Gill, S.C. und P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. *Anal Biochem*, 1989. **182**(2): 319-26.
73. Smith, P.K., *et al.*, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal. Biochem.*, 1985. **150**: 76-85.
74. Chen, G.C. und J.T. Yang, *Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid*. *Analytical Letters*, 1977. **10**(14): 1195-1207.
75. Noggle, J. und R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser effect: chemical Applications*. Academic Press, 1971.
76. Neuhaus, D. und M. Williamson, *The Nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. VCN Publishers, 1989.
77. Braunschweiler, L. und R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1983. **53**: 512.
78. Bodenhausen, G. und D. Ruben, *Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy*. *Chem. Phys. Lett.*, 1980. **69**: 185-189.

79. Piotto, M., V. Saudek und V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*. J Biomol NMR, 1992. **2**(6): 661-5.
80. Sklenár, V., *et al.*, *Gradient-tailored water suppression of 1H-15N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity*. J. Magn. Reson. Ser. A, 1993. **102**: 241-245.
81. Palmer, A.G., *et al.*, *Sensitivity improvement in proton-detected two dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy*. J. Magn. Reson., 1991. **93**: 151-170.
82. Schleucher, J., M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen und C. Griesinger, *A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients*. J Biomol NMR, 1994. **4**(2): 301-6.
83. Zhang, O., *et al.*, *Backbone 1H and 15N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques*. J. Biomol. NMR, 1994. **4**: 845-858.
84. Markley, J.L., A. Bax, Y. Arata, C.W. Hilbers, R. Kaptein, B.D. Sykes, P.E. Wright und K. Wüthrich, *Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids*. J Mol Biol, 1998. **280**(5): 933-52.
85. Delaglio, F., S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer und A. Bax, *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes*. J Biomol NMR, 1995. **6**(3): 277-93.
86. Goddard, T. und Kneller, D.G., *Sparky 3*. University of California, San Francisco, USA.
87. Johnson, B.A., *Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules*. Methods Mol Biol, 2004. **278**: 313-52.
88. Güntert, P., *Automated NMR structure calculation with CYANA*. Methods Mol Biol, 2004. **278**: 353-78.

89. Güntert, P., W. Braun und K. Wüthrich, *Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA*. J Mol Biol, 1991. **217**(3): 517-30.
90. Güntert, P., C. Mumenthaler und K. Wüthrich, *Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA*. J Mol Biol, 1997. **273**(1): 283-98.
91. Vriend, G., *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. J Mol Graph, 1990. **8**(1): 52-6, 29.
92. van Gunsteren, W.F., *et al.*, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. 1996: 1-1042.
93. Koradi, R., M. Billeter und K. Wüthrich, *MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): 51-5, 29-32.
94. Nicholls, A., K.A. Sharp und B. Honig, *Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons*. Proteins, 1991. **11**(4): 281-96.
95. Pick, U., *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. Arch Biochem Biophys, 1981. **212**(1): 186-94.
96. Andrä, J. und M. Leippe, *Pore-forming peptide of Entamoeba histolytica. Significance of positively charged amino acid residues for its mode of action*. FEBS Lett, 1994. **354**(1): 97-102.
97. Biedler, J.L., L. Helson und B.A. Spengler, *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. Cancer Res, 1973. **33**(11): 2643-52.
98. Herbst, R., C. Ott, T. Jacobs, T. Marti, F. Marciano-Cabral und M. Leippe, *Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon Naegleria fowleri*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): 22353-60.

99. Holm, L., S. Kaariainen, P. Rosenstrom und A. Schenkel, *Searching protein structure databases with DaliLite v.3*. Bioinformatics, 2008. **24**(23): 2780-1.
100. Murzin, A.G., S.E. Brenner, T. Hubbard und C. Chothia, *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. J Mol Biol, 1995. **247**(4): 536-40.
101. *PDB-Statistik*,
http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html.
102. Gennis, R.B., *Biomembranes*. Springer-Verl., New York, 1989.
103. Keller, F., W. Hanke, D. Trissl und T. Bakker-Grunwald, *Pore-forming protein from Entamoeba histolytica forms voltage- and pH-controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates*. Biochim Biophys Acta, 1989. **982**(1): 89-93.
104. Leippe, M., H. Bruhn, O. Hecht und J. Grötzinger, *Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A*. Trends Parasitol, 2005. **21**(1): 5-7.
105. Iacovache, I., F.G. van der Goot und L. Pernot, *Pore formation: an ancient yet complex form of attack*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(7-8): 1611-23.
106. Campagna, S., N. Saint, G. Molle und A. Aumelas, *Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin*. Biochemistry, 2007. **46**(7): 1771-8.
107. Lee, I.H., Y. Cho und R.I. Lehrer, *Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins*. Infect Immun, 1997. **65**(7): 2898-903.
108. Kacprzyk, L., V. Rydengard, M. Morgelin, M. Davoudi, M. Pasupuleti, M. Malmsten und A. Schmidtchen, *Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(11): 2667-80.
109. Ladokhin, A.S. und S.H. White, *'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1514**(2): 253-60.

110. Powers, J.P., A. Tan, A. Ramamoorthy und R.E. Hancock, *Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes*. *Biochemistry*, 2005. **44**(47): 15504-13.
111. Baumann, G. und P. Mueller, *A molecular model of membrane excitability*. *J Supramol Struct*, 1974. **2**(5-6): 538-57.
112. Hallock, K.J., D.K. Lee, J. Omnaas, H.I. Mosberg und A. Ramamoorthy, *Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption*. *Biophys J*, 2002. **83**(2): 1004-13.
113. Eun, S.Y., H.K. Jang, S.K. Han, P.D. Ryu, B.J. Lee, K.H. Han und S.J. Kim, *A helix-induced oligomeric transition of gaegurin 4, an antimicrobial peptide isolated from a Korean frog*. *Mol Cells*, 2006. **21**(2): 229-36.
114. Mueller, M., U. Grauschopf, T. Maier, R. Glockshuber und N. Ban, *The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism*. *Nature*, 2009. **459**(7247): 726-30.
115. Ludtke, S.J., K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang und H.W. Huang, *Membrane pores induced by magainin*. *Biochemistry*, 1996. **35**(43): 13723-8.
116. Yang, L., T.M. Weiss, T.A. Harroun, W.T. Heller und H.W. Huang, *Supramolecular structures of peptide assemblies in membranes by neutron off-plane scattering: method of analysis*. *Biophys J*, 1999. **77**(5): 2648-56.
117. He, K., S.J. Ludtke, D.L. Worcester und H.W. Huang, *Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores*. *Biophys J*, 1996. **70**(6): 2659-66.
118. Haugen, H.S., P.E. Kristiansen, G. Fimland und J. Nissen-Meyer, *Mutational analysis of the class IIa bacteriocin curvacin A and its orientation in target cell membranes*. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(21): 6766-73.
119. van Kan, E.J., A. van der Bent, R.A. Demel und B. de Kruijff, *Membrane activity of the peptide antibiotic clavanin and the importance of its glycine residues*. *Biochemistry*, 2001. **40**(21): 6398-405.

120. Cummings, J.E. und T.K. Vanderlick, *Binding orientation and activity determinants of the antimicrobial peptide cryptdin-4 revealed by potency of mutants*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **60**(2): 236-42.
121. Breukink, E., C. van Kraaij, A. van Dalen, R.A. Demel, R.J. Siezen, B. de Kruijff und O.P. Kuipers, *The orientation of nisin in membranes*. Biochemistry, 1998. **37**(22): 8153-62.
122. Saito-Nakano, Y., T. Yasuda, K. Nakada-Tsukui, M. Leippe und T. Nozaki, *Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): 49497-507.
123. Andrä, J., Herbst, R. und Leippe, M., *Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(4): 291-304.

Lebenslauf

Name: Matthias Michalek
Geburtsdatum: 24. April 1980
Geburtsort: Eckernförde
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Bildungsweg

1987-1991	Grundschule Gettorf
1991-2000	Gymnasium Kronshagen
24.06.2000	Allgemeine Hochschulreife
2001-2005	Studium im Fach Biochemie und Molekularbiologie an der CAU zu Kiel
2005-2006	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. J. Grötzinger im Biochemischen Institut an der CAU zu Kiel mit dem Thema „Charakterisierung des rekombinant exprimierten antimikrobiellen Peptids Culbicin“
13.04.2006	Diplomarbeit und Erhalt des akademischen Grades Diplom-Biochemiker
2006-2009	Promotionsarbeit und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Zoologie bei Herrn Prof. Dr. M. Leippe und im Institut für Biochemie bei Herrn Prof. Dr. J. Grötzinger mit dem Thema „Struktur und Funktion eines porenbildenden Proteins aus <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> “ an der CAU zu Kiel

Publikationen, Poster und Kongressvorträge

Publikationen

Bruhn, O., Regenhard, P., **Michalek, M.**, Paul, S., Gelhaus, C., Jung, S., Thaller, G., Podschun, R., Leippe, M., Grötzinger, J., Kalm, E., *A novel horse α -defensin: gene transcription, recombinant expression and characterization of the structure and function.* Biochem J. 2007; 407 (2): 267-76.

Fedders, H., **Michalek, M.**, Grötzinger, J., Leippe, M., *An exceptional salt tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of hemocytes of the marine invertebrate Ciona intestinalis.* Biochem J. 2008; 15; 416 (1): 65-75.

Michalek, M., Gelhaus, C., Hecht, O., Podschun, R., Schröder, J.M., Leippe, M., Grötzinger, J., *The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes.* Dev. Comp. Immunol. 2009; 33 (6): 740-6.

Bens, S., Mohn, A., Yüksel, B., Kulle, A., **Michalek, M.**, Chiarelli, F., Özbek, M. N., Leuschner, I., Grötzinger, J., Holterhus, P.-M. and Riepe, F.G., *Molecular characterization of three novel mutations in the steroid acute regulatory protein gene in two families causing congenital lipoid adrenal hyperplasia.* 2009 (in revision).

Poster

Michalek, M., Simanski, M., Herbst, R., Leippe, M., Grötzinger, J., *Structural characterization and antimicrobial activity of a pore-forming polypeptide from the protozoan parasite Acanthamoeba culbertsoni.*

Second EU-NMR annual meeting and CA annual meeting, a joint annual meeting of (I3) EU-NMR and (CA) NMR-LIFE. January 23-25, 2008, Frankfurt, Germany.

Michalek, M., Simanski, M., Herbst, R., Leippe, M., Grötzinger, J., *Structural characterization and antimicrobial activity of a pore-forming polypeptide from the protozoan parasite Acanthamoeba culbertsoni.*

23. Deutsche Gesellschaft für Parasitologie e.V. (DGP)- Tagung. März 05-07, 2008, Hamburg, Germany.

Bruhn, O., Regenhard, P., **Michalek, M.**, Paul, S., Gelhaus, C., Jung, S., Thaller, G., Podschun, R., Leippe, M., Grötzinger, J. und Kalm, E., *A novel α -defensin of the horse: gene transcription, recombinant expression and characterisation of the structure and function.*

8th International Veterinary Immunology Symposium, August 15-19, 2007, Ouro Preto, Brazil.

Michalek, M., Wechselberger, R., Simanski, M., Leippe, M. und Grötzinger, J., *Structure and function of the pore-forming peptide culbicin from A. culbertsoni.*

Zweites Biophysiker-Treffen, Januar, 23, 2009, Borstel, Germany.

Michalek, M., Wechselberger, R., Simanski, M., Leippe, M. und Grötzinger, J., *Structure and function of the pore-forming peptide culbicin from A. culbertsoni*.

Third EU-NMR annual meeting and CA annual meeting, a joint annual meeting of (I3) EU-NMR and (CA) NMR-LIFE. January 27-30, 2009, Autrans, France.

Michalek, M., Wechselberger, R., Simanski, M., Leippe, M. und Grötzinger, J., *Structure and function of the pore-forming peptide culbicin from A. culbertsoni*.

First International Symposium on Structural Systems Biology, September 24-25, 2009, Hamburg, Germany.

Kongressvorträge

Michalek, M., Wechselberger, R., Simanski, M., Leippe, M. und Grötzinger, J., *Structure and function of the pore-forming peptide culbicin from A. culbertsoni*.

Zweites Biophysiker-Treffen, Januar, 23, 2009, Borstel, Germany.

Danksagung

Die Zeit während meiner Doktorarbeit war eine inspirierende, lehrreiche, fordernde und beflügelnde Phase meines Lebens und dafür möchte ich ganz vielen Personen meinen Dank aussprechen:

Herrn Professor Dr. Joachim Grötzinger und Herrn Professor Dr. Matthias Leippe möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung, kritischen Diskussionen, motivierenden Hinweise und nicht zuletzt für die Überlassung des höchst fesselnden Themas dieser Arbeit ganz herzlich danken. Es war mir eine ganz besondere Freude im Institut für Zoologie als auch im Institut für Biochemie arbeiten zu dürfen. Nicht zuletzt danke ich auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Stefan Rose-John für die freundliche Aufnahme im Institut für Biochemie danken sowie kritischer Auseinandersetzung und vielen konstruktiven Tipps zu meiner Arbeit.

Mein Dank richtet sich ebenfalls an Herrn Professor Dr. Rolf Boelens vom Bijvoet Forschungszentrum der Utrecht-Universität für die tolle Zeit in Utrecht und bei den NMR-Spektrometern. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Dr. Rainer Wechselberger für die Aufnahme hervorragender NMR-Spektren und Herrn Dr. Hans Wienk für stete Bereitschaft, Probleme mit Sparky zu bewältigen, sowie die „Utrecht-Spektren“ zu prozessieren, meinen Dank aussprechen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Frank Sönnichsen (Institut für Organische Chemie, CAU zu Kiel) ganz besonders für die Aufnahme von exzellenten NMR-Spektren sowie die unschätzbaren Hilfestellungen beim Prozessieren und Auswerten der Spektren danken.

Herrn Dr. Christoph Gelhaus gilt mein Dank für die permanente Zusammenarbeit auch bei weiteren Fragestellungen rund um die AMP-Welt, sowie für die Aufnahme von ausgezeichneten MS-Spektren, die mich in meiner Arbeit „nach vorne brachten“.

Bei meinem Kollegen Herrn Dr. Sascha Jung möchte mich herzlichen bedanken. Die immerwährende Diskussionsbereitschaft auch gerne weit über die angrenzenden Themen der Biochemie hinaus, die gemeinsame Meinungsfindung zu weltpolitischen Begebenheiten zum Klang eines Klaviersolos, als auch die konstante Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen

während der gemeinsamen Zeit waren mir eine große Freude und unschätzbare Hilfe. Nicht zuletzt möchte ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Auch den weiteren (und ehemaligen) Kollegen und Mitstreitern der Arbeitsgruppe Grötzinger, Dr. Inken Lorenzen, Dr. Justina Mysliwy, Björn Spudy, Ahmad Trad, Mohammad Shomali, Verena Pawlak, Madlen Mohr, Sonja Hollmer, Britta Hansen, Ursula Mundt, Jessica Schneider und Janina Schröder möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und eine gemeinsame Zeit danken.

Ich möchte der Familie Zimmermann (Pamela, Eike und Maja) für die außerordentliche Motivierung, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für das große Interesse an dem Thema meiner Arbeit danken.

Zuletzt möchte ich meinen tiefsten Dank meinen Eltern, Brunhild und Martin Michalek, sowie meinem Bruder, Marc Michalek, aussprechen. Zum Glück entzündet Ihr die Kerze immer wieder, wenn es arg dunkel wird!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Matthias Michalek, gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung meines Betreuers selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Des Weiteren erkläre ich, bisher kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Kiel,.....

Matthias Michalek

