

***Studien zu Cecropin P1 – einem antimikrobiellen Peptid***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Julia Herfurth

aus Schönebeck/Elbe  
April 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Strukturelle und Medizinische Biochemie am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Bayer

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Willbold

3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung:

04.07.2014

---

*„Gegen die Infamitäten des Lebens sind die besten Waffen: Tapferkeit, Eigensinn und Geduld.  
Die Tapferkeit stärkt, der Eigensinn macht Spaß, und die Geduld gibt Ruhe.“*

Hermann Hesse

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

---

Inhaltsverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Antimikrobielle Peptide.....	11
1.1.1 Einteilung nach Herkunft.....	11
1.1.2 Einteilung nach strukturellen Merkmalen.....	13
1.1.3 Kationische $\alpha$ -helikale AMPs und ihr Wirkmechanismus.....	13
1.1.4 Intrazelluläre Angriffspunkte.....	15
1.1.5 Potentielle Anwendungen.....	15
1.1.6 Resistenzen.....	15
1.2 Cecropine.....	16
1.3 Cecropin P1.....	17
1.1.7 Toxizität von Cecropin P1.....	18
1.1.8 Cecropin P1 und Membranen .....	19
1.1.9 Anwendungsansätze für Cecropin P1.....	19
1.4 Zielsetzung.....	20
2. Materialien und Methoden .....	21
2.1 Materialien .....	21
2.1.1 Chemikalien .....	21
2.1.2 Marker .....	22
2.1.3 Puffer, Lösungen und Kits.....	22
2.1.4 Nährmedien.....	24
2.1.5 Antibiotika .....	26
2.1.6 Bakterienstämme .....	26
2.1.7 Peptide .....	27
2.1.8 Enzyme .....	27
2.1.9 Plasmide und Oligonukleotide .....	27
2.1.10 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.11 Geräte.....	29
2.2 Datenauswertung und verwendete <i>Software</i> .....	30
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	30
2.3.1 DNA-Isolation und Reinigung .....	30
2.3.2 PCR.....	30
2.3.3 Restriktion .....	32
2.3.4 Zielgerichtete Mutagenese.....	33

2.3.5	Klonierung mit Oligonukleotiddimeren als <i>Insert</i> .....	34
2.3.6	Ligation .....	34
2.3.7	DNA-Transformation .....	35
2.4	Mikrobiologische Methoden .....	36
2.4.1	Kultur von <i>E. coli</i> .....	36
2.4.2	Expression .....	36
2.4.3	MIC-Test .....	39
2.4.4	Fluoreszenzmikroskopie .....	40
2.5	Biochemische Methoden .....	41
2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.5.2	Photometrische Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration .....	41
2.5.3	Zellaufschluss .....	42
2.5.4	Proteinreinigung .....	42
2.5.5	Tris/Tricin-PAGE .....	43
2.5.6	Western Blot .....	44
2.5.7	Analytische Gelfiltration (SEC) .....	44
2.5.8	Lipidpräparationen .....	44
2.6	Biophysikalische Methoden .....	45
2.6.1	MALDI-Massenspektrometrie .....	45
2.6.2	CD-Spektroskopie .....	45
2.6.3	NMR-Spektroskopie .....	46
3.	Ergebnisse .....	51
3.1	Klonierung von Cecropin P1 .....	51
3.2	Expression und Reinigung von Cecropin P1 .....	52
3.2.1	Optimierung der Expressionsbedingungen für das Histidin- <i>tag</i> -SUMO-Cecropin P152 .....	
3.2.2	Optimierung der Protein-Ausbeute .....	54
3.2.3	Nachweis der Funktionalität der SUMO-Protease .....	55
3.2.4	Optimierung der Expression von <sup>15</sup> N-markiertem His-SUMO-Cecropin P1-Fusionsprotein .....	56
3.2.5	Optimierung der Expressionsbedingungen für das Histidin- <i>tag</i> -SUMO-Cecropin P1-StrepII- <i>tag</i> -Konstrukt .....	59
3.2.6	Etablierung der Reinigung von Cecropin P1 .....	59
3.3	Bestimmung der Toxizität von Cecropin P1 .....	61
3.3.1	Etablierung des MIC-Tests .....	61
3.3.2	Etablierung einer Dreifach-Färbung zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Toxizität von Cecropin P1 .....	63
3.4	Strukturelle Charakterisierung von Cecropin P1 .....	64

3.4.1	Untersuchung einer möglichen Multimerisierung des Cecropin P1 .....	64
3.4.2	Struktur und Dynamik von Cecropin P1 .....	67
3.5	Interaktion von Cecropin P1 mit membranähnlichen Systemen .....	73
3.6	Funktionelle Charakterisierung von Cecropin P1 .....	77
3.6.1	Die Rolle der Hydrophobizität des C-terminalen Bereichs von Cecropin P1.....	78
3.6.2	Die Rolle der Länge des C-terminalen hydrophoben Bereichs des Cecropin P1.....	80
3.6.3	Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Toxizität der Cecropin P1-Varianten .....	82
4.	Diskussion.....	85
4.1	Das toxische Cecropin P1 ist in <i>E. coli</i> exprimierbar und reinigbar .....	85
4.2	Die Struktur und Dynamik von Cecropin P1 in hydrophiler Umgebung.....	87
4.2.1	Cecropin P1 bildet in hydrophiler Umgebung keine Multimere .....	87
4.2.2	Cecropin P1 ist ein dynamisches und kaum strukturiertes Peptid in hydrophiler Umgebung .....	87
4.3	Determinanten der Toxizität für Cecropin P1 und möglicher Interaktionsmechanismus mit bakteriellen Membranen .....	90
4.3.1	Toxizität von synthetischem und rekombinantem Wildtyp-Cecropin P1 und dem His-SUMO-Cecropin P1-Fusionsprotein.....	91
4.3.2	Toxizität des FITC- $\Delta$ S1W2-Cecropin P1 .....	92
4.3.3	Toxizität des hydrophoben C-Terminus .....	92
4.3.4	Cecropin P1 und mögliche Membraninteraktionen.....	94
5.	Zusammenfassung.....	97
	Abstract.....	98
	Literaturverzeichnis .....	99
	Abbildungsverzeichnis .....	108
	Tabellenverzeichnis.....	110
	Anhang .....	111
	Danksagung.....	120
	Lebenslauf.....	121
	Erklärungen.....	122

## Abkürzungsverzeichnis

---

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weigth per volume</i>
Å	Ångström
<i>ad</i>	<i>adjusted</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
c	Konzentration
CD	Cirulardichroismus
c-Terminus/terminal	Carboxy-Terminus/terminal
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
dd	doppelt destilliert
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	<i>free induction decay</i>
h	Stunde
H	Wasserstoff
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton
KO	Kontrolle
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar (mol/l)
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
min	Minuten
μ	mikro
mM	Millimolar (mmol/l)
N	Stickstoff
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus/terminal	Amino-Terminus/terminal
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
OD	optische Dichte
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
ü. N.	über Nacht

s

SEC

TOCSY

TPPI

Sekunde

*size exclusion chromatography*

*total correlation spectroscopy*

*time proportional phase incrementation*

## 1. Einleitung

---

Der Begriff der Antibiose wurde bereits 1889 von Paul Vuillemin geprägt und leitet sich aus den griechischen Wörtern *antí* (gegen) und *bíos* (Leben) ab [1]. Grob ist darunter die Beziehung verschiedener Organismen einer Art oder unterschiedlicher Arten zu verstehen, in der ein Organismus den anderen schädigt, am Wachstum hindert und/oder tötet.

Die Antibiose wurde 1922 von Sir Alexander Fleming beobachtet als er das Protein Lysozym entdeckte, welches z.B. in menschlicher Tränenflüssigkeit und Hühnereiweiß vorkommt und in der Lage ist, Bakterienkulturen abzutöten [2]. Dieser antibiotische Effekt trat allerdings nur bei Bakterien auf, die nicht humanpathogen sind. Bei einer mit einem Pilz kontaminierten Staphylokokkenkultur auf einer Agar-Platte entdeckte Fleming 1928 erneut einen antibiotischen Effekt, der von dem Pilz auszugehen schien. Er identifizierte diesen Pilz als *Penicillium notatum* und nannte die chemische Substanz mit dem antibiotischen Effekt Penicillin [3]. Er kultivierte den Pilz, testete unterschiedliche humanpathogene Bakterienstämme und identifizierte diejenigen Stämme auf die Penicillin eine antibiotische Wirkung hatte. Auch stellte er fest, dass Penicillin im Gegensatz zu anderen antibiotischen Substanzen nicht für humane Lymphozyten toxisch ist. Die Extraktion konzentrierten, reinen Penicillins gelang ihm jedoch nicht. Erst nach Einführung der chemisch synthetisierten Sulfonamide [4, 5] als Antibiotika und der Entdeckung des ersten antimikrobiellen Peptids [6] wurden Dr. Chain und Sir Florey aufmerksam auf Penicillin und publizierten 1940 die erfolgreiche Herstellung konzentrierten Penicillins aus *Penicillium notatum* [7]. Bereits 1945 während seines Nobelpreisvortrages machte Fleming auf die bestehende Gefahr der raschen Resistenzentwicklung der Bakterien aufmerksam [4].

Dem Penicillin, welches zu den  $\beta$ -Lactamen gehört, folgten weitere Substanzklassen mit anderen Wirkmechanismen (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1 Einführung neuer antibakterieller Substanzklassen für die Therapie am Menschen nach [8]**

Jahr	Klasse	Target	Beispiel
1935	Sulfonamide (synth.)	Folsäuresynthese	Prontosil
1940	$\beta$ -Lactame	Zellwandbiosynthese	Penicillin G
1949	Polyketide	Proteinbiosynthese	Tetracyclin
1949	Phenylpropanoide	Proteinbiosynthese	Chloramphenicol
1950	Aminoglykoside	Proteinbiosynthese	Tobramycin
1952	Makrolide	Proteinbiosynthese	Erythromycin A
1958	Glycopeptide	Zellwand	Vancomycin
1962	Chinolone (synth.)	DNA-Replikation	Ciprofloxacin
1962	Streptogramine	Proteinbiosynthese	Pristinamycin
:			
2000	Oxazolidione (synth.)	Proteinbiosynthese	Linezolid
2003	Lipopeptide	Bakterielle Membran	Daptomycin

Durch die Behandlung mit einer antibiotischen Substanz entsteht für Bakterien ein Evolutionsdruck, der das selektive Überleben resistenter Bakterienzellen begünstigt. Es sind bereits eine Vielzahl an Resistenzmechanismen [9] beschrieben und die medizinische Relevanz multiresistenter Organismen wird immer größer [8].

## 1.1 Antimikrobielle Peptide

---

Bereits 1939 entdeckte Dubos das erste antimikrobielle Peptid (AMP) in einem *Bacillus*-Stamm (*Bacillus brevis*), welchen er aus dem Erdreich isolierte [6]. Dieses Peptid nannte er Gramicidin und es wird noch heute in antibiotischen Kombinationspräparaten zur äußeren Anwendung verwendet. Daraufhin folgte die Entdeckung weiterer antimikrobieller Peptide wie Tyrocidin, welches gegen Gram<sup>+</sup> und Gram<sup>-</sup>-Bakterien wirkt, aber auch für menschliche Blutzellen toxisch ist [10]. Dieses wird noch heute in Kombination mit Gramicidin bei Infektionen der Mundhöhle und des Rachenraums eingesetzt. Es folgten die Isolation des pflanzlichen Purothionins, welches für Pilze und einige pathogene Bakterienstämme toxisch ist [11] und des Defensins, das erste entdeckte tierische AMP, isoliert aus den Leukozyten von Kaninchen [12]. Mit der Zeit wurden immer neue AMPs entdeckt und charakterisiert. Sie kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor und haben für tierische Organismen meist eine bedeutende Funktion bei der Immunabwehr. Auch ihr Wirkungsspektrum stellt sich als deutlich breiter heraus, als zu Beginn gedacht. So sind inzwischen nicht nur antibakterielle, sondern auch antivirale, antifungale [13], antiparasitäre und antitumorale Peptide bekannt [14, 15]. Einige haben zusätzlich chemotaktische Aktivität [16]. Für Invertebraten sind AMPs die Haupteffektormoleküle des Immunsystems und ihre Produktion wird oft durch Kontakt mit pathogenen Bakterien ausgelöst [17]. In Vertebraten beeinflussen AMPs auch das adaptive Immunsystem [18].

Bei antimikrobiellen Peptiden handelt es sich zumeist um maximal 100 Aminosäuren lange Peptide, welche keine Funktions-spezifische Konsensussequenz sondern ähnliche Eigenschaften wie positive Ladung, hydrophobe Bereiche und amphipathische Strukturen besitzen. Klassifiziert werden können AMPs aufgrund ihrer hohen Variabilität bisher nach Herkunft, biologischer Aktivität (antibakteriell, antiviral etc.) und nach strukturellen Gesichtspunkten [14].

### 1.1.1 Einteilung nach Herkunft

Antimikrobielle Peptide kommen ubiquitär vor. Die Abbildung 1.1 zeigt die Häufigkeiten der AMPs, die in der *Antimicrobial Peptide Database* (ADP) [19, 20] im März 2013 erfasst waren. Die häufigsten Quellen sind dabei in aufsteigender Reihenfolge Bakterien, Pflanzen und Tiere.

#### Bacteriocine

Die AMPs der Bakterien werden Bacteriocine genannt und dienen der Antibiose gegenüber konkurrierenden Bakteriengattungen. Das erste entdeckte Bacteriocin war Colicin, welches toxisch für *E. coli* ist [21]. Es folgten das schon erwähnte und von Dubos *et al.* entdeckte Gramicidin [6] und die Bacteriocine von Milchsäurebakterien (*lactic acid bacteria*, LAB) welche für die Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt werden [14]. Bacteriocine aus Gram<sup>+</sup>-Bakterien werden grob in zwei unterschiedliche Klassen unterteilt: Lantibiotika und Nicht-Lantibiotika. Lantibiotika werden posttranslational modifiziert und wurden aufgrund eines ihnen gemeinsamen intramolekularen Rings der von den

Thioether-Aminosäuren Lan und Methylanthionin geformt wird, Lantibiotika genannt. Zu den bekanntesten Vertretern gehören Nisine, Ericine und Lactacine. Die Nicht-Lantibiotika sind eine sehr heterogene Gruppe von Peptiden die kein Lanthionin enthalten und aus Aminosäuren ohne chemische Modifikationen bestehen. Die Bacteriocine von Gram<sup>-</sup>-Bakterien werden in posttranslational modifizierte Microcine (<5 kDa), Microcine mit Disulfidbrücken oder lineare Peptide mit C-terminaler chemischer Modifikation (5-10 kDa) und Colicine (>10 kDa) unterteilt [14].

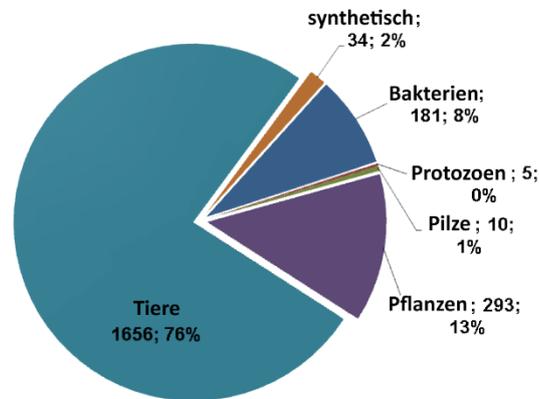


Abbildung 1.1 Ursprünge der in der ADP erfassten AMPs nach [22] modifiziert

### Pflanzliche AMPs

Pflanzliche AMPs werden nach Sequenzähnlichkeit und Cysteinmotiven in 7 Familien unterteilt [23]. Dazu gehören die Defensine und Thionine als bekannteste Familien. Diese werden sowohl konstitutiv als auch bei mikrobieller Infektion von Pflanzen gebildet. Die meisten dieser Peptide attackieren die äußere Membran der Mikroben [14]. Sie sind vorwiegend positiv geladen und besitzen meist eine durch die Disulfidbrücken stabilisierte Tertiärstruktur. Thionine wirken antibakteriell [24] und Defensine eher antifungal [13]. Eine weitere Familie der pflanzlichen AMPs sind die Cyclotide, welche 27-37 Aminosäuren lang sind und sechs Cysteine besitzen die drei Disulfidbrücken ausbilden. Dadurch bildet sich ein typisches Cystein-Knoten-Motiv aus [25]. Cyclotide sind insektizide Peptide, die aber auch antimikrobielle und antivirale Eigenschaften besitzen [14].

### Tierische AMPs

Sowohl Vertebraten als auch Invertebraten produzieren AMPs, meistens insbesondere dort, wo sie Kontakt zu Mikroben haben (z.B. Epithelien) [26]. Diese AMPs sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Eine Klassifizierung ist hier sehr komplex. Die entdeckten AMPs der Amphibien, der Insekten und der Säugetiere sind zahlenmäßig dominierend. Die AMPs der Amphibien sind sequentiell sehr divers und werden nach strukturellen Gesichtspunkten geordnet. So gibt es lineare kationische amphipathische  $\alpha$ -helikale Peptide und kationische Peptide mit einem C-terminalen über eine Disulfidbrücke verbundenen *Loop*. Die Magainine, Dermaseptine und Temporine gehören zur Gruppe der linearen  $\alpha$ -helikalen Peptide, während die Brevinine einen C-terminalen Disulfid-*Loop* besitzen. Viele dieser AMPs haben eine weitreichende Toxizität gegen Bakterien, Pilze und Protozoen [15]. Zu den AMPs der Insekten gehören die linearen  $\alpha$ -helikalen Cecropine, Disulfidbrücken-ausbildende Defensine und Prolin-reiche Peptide [14]. Diese sind meist antibakteriell und antifungal und werden als Antwort auf eine Infektion produziert.

Die bekanntesten Familien der AMPs in Säugetieren sind die Defensine, die Cathelicidine und die Histatine. Cathelicidine bilden eine Gruppe von Peptiden mit einer konservierten N-terminalen „Cathelin-Vorläufer“-Domäne [27] und einem C-terminalen antimikrobiellen kationischen Peptid (Cathelicidin) welches sehr variabel sein kann. Diese AMPs wirken schnell und haben ein breites antimikrobielles Wirkspektrum [28, 29]. Bekannte Cathelicidine sind das humane LL-37, das murine CRAMP, PR-39 aus dem Schwein und Protegrine. Die Defensine der Säugetiere sind Cystein-reiche Peptide mit intramolekularen Disulfidbrücken und entfernt verwandt mit den Insekten- und Pflanzen-Defensinen [30]. Sie sind aktiv gegen Bakterien, Pilze und behüllte Viren [31, 32]. Sie werden anhand der Disulfidbrücken eingeteilt in  $\alpha$ -Defensine,  $\beta$ -Defensine und  $\theta$ -Defensine. Viele dieser AMPs haben zusätzlich chemotaktische Wirkungen. Histatine sind Histidin-reiche Peptide, hemmen bakterielle Proteasen und sind sowohl antibakteriell als auch antifungal aktiv [33].

### 1.1.2 Einteilung nach strukturellen Merkmalen

AMPs können grundlegend nach  $\alpha$ -helikalen,  $\beta$ -Faltblatt und unstrukturierten Peptiden unterschieden werden [14].

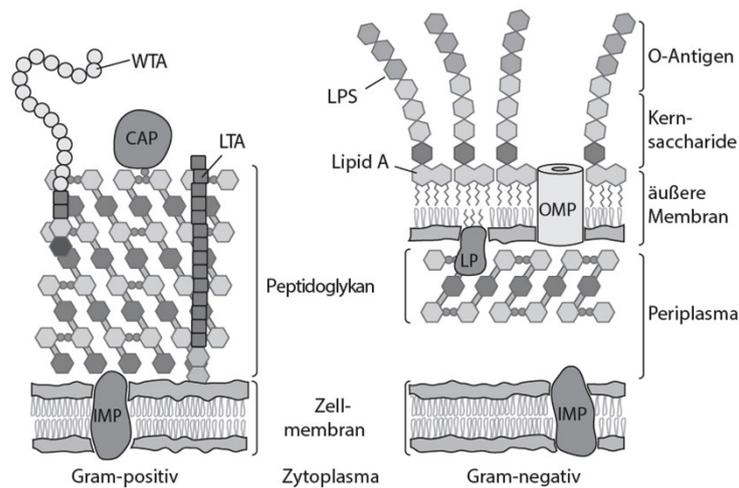
Zu den  $\beta$ -Faltblatt-haltigen AMPs gehören die  $\beta$ -*hairpin*-Peptide und die Defensine. Bekannte Vertreter sind Protegrin I [34], Lactoferricin [35] und  $\beta$ -Defensin-3 (HBD-3) [36]. Diese attackieren die Bakterienmembran, haben allerdings häufig auch intrazelluläre Zielstrukturen mit denen sie interagieren und die Bakterien schädigen. Zusätzlich besitzen einige Defensine chemotaktische Aktivität [16].

Unstrukturierte AMPs sind meist sehr Arginin-, Tryptophan- und Prolin-haltig, wie Indolicidin und Tritrpticin, welche antibakteriell wirksam sind. Diese Peptide stören meist nicht nur die Membrintegrität, sondern haben intrazelluläre Angriffspunkte [37-40].

Die  $\alpha$ -helikalen Peptide nehmen ihre Struktur meist erst in hydrophober Umgebung an und sind sehr gut untersucht. Bekannte Vertreter sind LL-37 [41], Magainin [42], sowie die Cecropine [43]. Diese Peptide sind dafür bekannt vorrangig die Membran zu schädigen [37]. Buforin II bildet mit seiner Fähigkeit durch die Membran zu translozieren und mit DNA zu interagieren eine Ausnahme unter den  $\alpha$ -helikalen AMPs [44, 45].

### 1.1.3 Kationische $\alpha$ -helikale AMPs und ihr Wirkmechanismus

Der Großteil der positiv geladenen  $\alpha$ -helikalen Peptide interagiert mit Membranbestandteilen der Bakterien. Interessanterweise haben viele dieser AMPs eine Spezifität für Prokaryoten-Membranen und innerhalb dieser Gruppe wiederum viele eine Spezifität für Gram<sup>-</sup> oder Gram<sup>+</sup>-Bakterien. Der genaue Grund für die Selektivität konnte noch nicht definitiv bestimmt werden. Dies hängt sicherlich damit zusammen, dass noch kaum definitive Mechanismen der Interaktion von Peptid mit Membran aufgeklärt sind, was wiederum seine Ursache in dem recht vagen Wissen über die bakterielle Membranarchitektur und Zusammensetzung hat, da diese sowohl innerhalb eines Bakterienstammes als auch zwischen den Bakterienstämmen variiert (Abbildung 1.2) [46].

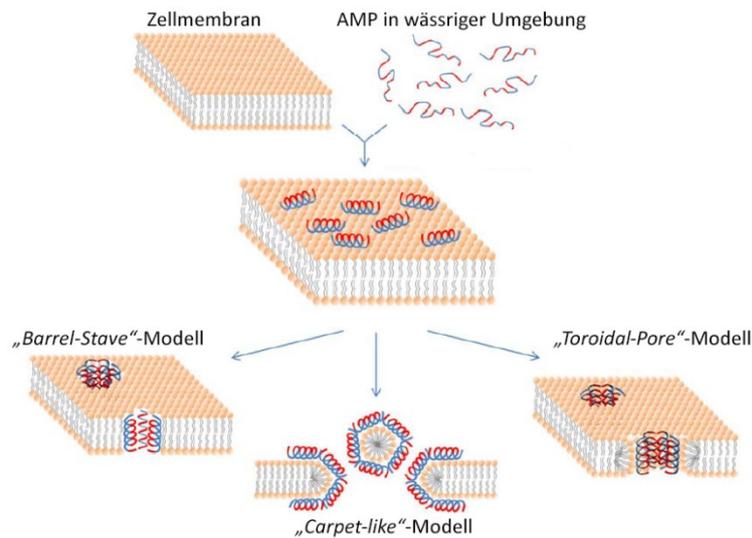


**Abbildung 1.2 Aufbau bakterieller Biomembranen nach [46] modifiziert**

CAP = kovalent gebundenes Protein (*covalently attached protein*), IMP = integrales Membranprotein, LP = Lipoprotein, LPS = Lipopolysaccharid, LTA = Lipoteichonsäure, OMP = äußeres Membranprotein (*outer membrane protein*), WTA = Zellwand Teichonsäure (*wall teichoic acid*)

Die Begründung der Spezifität liegt sicher in der Membranzusammensetzung. Dabei werden als Hauptgründe für die Selektivität die neutrale Lipidkomposition (Phosphatidylcholin, Sphingomyelin) und der Cholesterolgehalt der Eukaryoten-Membran angegeben [47-50]. Viele der Membran-aktiven AMPs können zusätzlich LPS binden und verdrängen damit für die Membranoberflächenstabilität notwendige Kalzium- und Magnesiumionen aus deren Bindetaschen, welche carboxylierte und phosphorylierte Lipidkopfgruppen miteinander quervernetzen. Somit können sie die erste Hürde der LPS-Schicht durchdringen [51, 52].

Für die Interaktion mit der Bakterienmembran gibt es einige Modelle. Dazu gehören das „Barrel-Staff“-Modell [53-55], das „Toroidal-Pore“-Modell [37, 56] und das „Carpet-like“-Modell [57-59] (Abbildung 1.3). Alle drei Modelle haben als Ausgangssituation unstrukturierte AMPs in wässriger Umgebung gemeinsam, die sich durch Binden an die Bakterienmembran zu amphipathischen  $\alpha$ -Helices strukturieren und mit dem hydrophoben Anteil parallel zur Membran orientieren. Das „Barrel-Staff“-Modell ist das älteste Modell und beschreibt, dass die AMPs durch direktes Eindringen in die Membran Poren formen. Dabei bilden sie innerhalb der Membran Oligomere. Durch Rekrutierung weiterer AMP-Monomere kann die Pore vergrößert werden. Die hydrophilen Anteile der AMPs bilden dabei das Lumen der Pore. Im „Toroidal-Pore“-Modell formen die AMPs ein Bündel innerhalb der Membran, was die Lipidschicht dazu zwingt sich zu krümmen, sodass die Membranlipide mit den AMPs die Pore formen. Im „Carpet-like“-Modell bedecken die Peptide die Membran und wirken ab einer bestimmten Konzentration wie ein Detergens, die Membran zerfällt, was zur Lyse der Bakterien führt [60].



**Abbildung 1.3 Membraninteraktionsmodelle der AMPs nach [60] modifiziert**  
 Dargestellt sind drei Interaktionsmodelle  $\alpha$ -helikaler AMPs. Die hydrophoben (blau) Anteile der AMPs und die hydrophilen Anteile (rot) sind gekennzeichnet.

#### 1.1.4 Intrazelluläre Angriffspunkte

Neben den AMPs, welche vorrangig Membranen angreifen gibt es, wie bereits erwähnt, AMPs die durch die Bakterienmembran gelangen und mit intrazellulären Strukturen interagieren und so Bakterien abtöten. Einige inhibieren die DNA- und Proteinsynthese wie Buforin II [61], Indolicidin [40] und PR-39 [27].

#### 1.1.5 Potentielle Anwendungen

Antimikrobielle Peptide besitzen eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Zur äußeren Anwendung bei Infektionen werden Substanzen wie Gramicidin, Tyrocidin, Polymyxin B und Daptomycin verwendet [62]. Auch der Einsatz von freien [63] sowie Oberflächen-gebundenen AMPs [64, 65] zur Biofilmbekämpfung wird untersucht. Systemische Anwendungen der AMPs wurden ebenfalls untersucht, waren aber bisher wenig erfolgreich da hier verstärkt Toxizitätsprobleme auftreten [66].

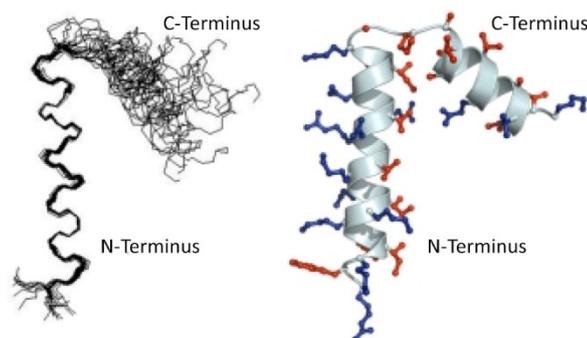
#### 1.1.6 Resistenzen

Wie bei den Antibiotika gibt es auch gegen AMPs Resistenzentwicklungen. AMP-resistente Bakterien besitzen häufig verschiedene und überlappende Resistenzstrategien die über Operon-regulierte Stressreaktionen kontrolliert werden [67]. Ein Mechanismus ist die Veränderung der bakteriellen Membranzusammensetzung. Ein Beispiel ist die Reduzierung der negativen Ladung der Oberfläche durch Maskierung des negativ-geladenen LPS Lipid A durch Anfügen von Ethanolamin und 4-Amino-4-deoxy-T-arabinose in Gram<sup>-</sup>-Bakterien [68] und die D-Alanylierung von Teichonsäuren bzw. die Inkorporation von T-Lysin in Phosphatidylglycerol bei Gram<sup>+</sup>-Bakterien [69]. Einige Bakterien haben sogar die Fähigkeit, kationische AMPs in ihrer Umgebung zu detektieren und daraufhin die enzymatische LPS-Modifikation zu aktivieren [70]. Andere Bakterienstämme steigern durch verschiedene Mechanismen die Rigidität der Membran oder produzieren Kapseln [71, 72]. Weitere Mechanismen sind die Modulation der AMP-Genexpression, die Ausbildung widerstandsfähiger Biofilme die Kationen-chelatierende DNA sekretieren [73, 74], Abbau der Peptide durch bakterielle Proteasen [75,

76], Efflux-Pumpen [77] und das Abfangen von AMPs durch sekretierte Proteine mit AMP-Affinität [78] und bakterielle Oberflächenproteine [79]. Bei diesen Resistenzmechanismen handelt es sich zumeist um durch Koevolution von Wirtsorganismus und Pathogen entstandene Mechanismen [67]. Generell treten Resistenzen gegen AMPs deutlich seltener auf als bei der Antibiotikatherapie [66]. Nicht zuletzt, weil AMPs häufig mehrere antibakterielle Mechanismen verfolgen und eine komplette Resistenz im Falle vieler AMPs zum Beispiel nur durch eine gravierende Änderung der Membranarchitektur erreichbar wäre [60].

## 1.2 Cecropine

Cecropine gehören zu den  $\alpha$ -helikalen antimikrobiellen Peptiden, welche Teil des zell-freien Immunsystems in Insekten sind und deren Expression durch Infektion induziert wird. Benannt wurden sie von Hultmark *et al.* und Steiner *et al.* die sie zuerst aus den Puppen des Nachtfalters *Hyalophora cecropia* isolierten und charakterisierten [80, 81]. Sie isolierten Cecropin A und B und später auch Cecropin D [82] aus *Hyalophora cecropia*. In den folgenden Jahren wurden Äquivalente dieser Cecropine aus anderen Schmetterlingsarten, Fliegenarten und Spulwürmern isoliert. Alle Cecropine haben einen N-Terminus mit vielen positiven Ladungen und einen hydrophoben meist amidierten C-Terminus. Konserviert sind das Tryptophan an Position 2, die Lysine an Position 8 und 9, sowie Arginin an Position 12 [17]. Cecropine werden als größere Vorläuferproteine mit ungefähr 60 Aminosäuren exprimiert und von einer Dipeptidylpeptidase prozessiert [83]. Die erste Struktur eines Cecropins wurde 1987 von Holak *et. al* in 15 % 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) gelöst und als ein Peptid aus zwei  $\alpha$ -Helices die durch ein Glycin-Prolin-„Gelenk“ verbunden sind, charakterisiert. 2011 wurde die Struktur von Papiliocin (aus *Papilio xuthus*), ein Cecropin-ähnliches Peptid (78 % Sequenzhomologie zu Cecropin A), in Dodecylphosphocholin-Mizellen (DPC) mit NMR-Spektroskopie gelöst. Die Struktur besteht ebenfalls aus zwei Helices die durch ein flexibles Glycin-Prolin-„Gelenk“ miteinander verbunden sind (Abbildung 1.4) [84].



**Abbildung 1.4 Struktur von Papiliocin in 300 mM  $\mu$ DPC-Mizellen nach [84] modif.**

Dargestellt sind die 20 besten berechneten Strukturen (links) und die durchschnittliche Struktur von Papiliocin (rechts) mit den hydrophoben (rot) und hydrophilen (blau) Aminosäuren.

Die Cecropine besitzen ein breites Wirkspektrum. So sind Cecropin A und B toxisch für Gram<sup>+</sup>- und Gram<sup>-</sup>-Bakterien, während Cecropin D nur für *E. coli* und *Acinetobacter calcoaceticus* toxisch ist [85]. Es wurde auch gezeigt, dass Cecropine selektiv Bakterien lysieren und nicht eukaryotische Zellen und, dass diese bakterielle Lyse stöchiometrisch verläuft [81]. Über die Synthese von D-Enantiomeren und

die Determinierung der Toxizität der L-Cecropine und D-Cecropine konnte gezeigt werden, dass diese nicht mit bakteriellen Strukturen interagieren, welche Chiralität für die Interaktion erfordern (z.B. Rezeptoren) [86]. Neueste Studien am Cecropin-ähnlichen Peptid Papiliocin mit LPS-stimulierten Mausemakrophagen weisen dem Peptid anti-inflammatorische Aktivität nach [84].

Als positiv geladene  $\alpha$ -helikale Peptide gehören Cecropine zu den AMPs, die bakterielle Membranen lysieren. Der Mechanismus ist hierbei nicht eindeutig geklärt, aber es gibt für jedes Modell unterstützende Studien. Studien von Christensen *et al.* mit Cecropinen und künstlichen Lipiddoppelschichten propagieren spannungsabhängige Poren [87], Gazit *et al.* propagieren für die Cecropine aus Fadenwürmern einen „Carpet-like“-Mechanismus [88, 89] und Gregory *et al.* sprechen von einer ungeordneten undefinierten Pore die dem „Toroidal-Pore“-Modell am nächsten kommt [90].

### 1.3 Cecropin P1

Cecropin P1 (P = *porcine* engl. für aus dem Schwein stammend) wurde 1989 aus dem Schweinedarm isoliert und zunächst für das erste Säugetier-Cecropin gehalten [91]. Erst 2003 wurde klar, dass Cecropin P1 von Spulwürmern (*Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*) gebildet wird, welche im Darm ihres Wirts einer Vielzahl von Bakterien ausgesetzt sind [92]. Pillai *et al.* suchten nach der Entdeckung der für Gram<sup>+</sup>-Bakterien toxischen ASABFs (*Ascaris suum* antibacterial factors) nach neuen Transkripten, welche durch bakterielle Injektion in *Ascaris suum* induziert werden. Dabei identifizierten sie Cecropin P1 und drei weitere Varianten, welche sie Cecropin P2, P3 und P4 nannten [93]. Abbildung 1.5 zeigt die Sequenzen der vier Proteine. Die Cecropin P Peptide werden als größere Vorläuferproteine mit einer sekretorischen Signalsequenz am N-Terminus und einer C-terminalen Pro-Region die durch die Prozessierung entfernt wird, produziert. Die tetrabasische Sequenz R↓(R/H)RR wird von Proteasen erkannt und geschnitten (Pfeil). Auch die N-terminale Sequenz ES↓SWLSKT wird entfernt. Cecropin P1 liegt im Gegensatz zu den Insektencecropinen nicht amidiert vor, ist amidiert aber toxischer für Gram<sup>+</sup>-Bakterien [91]. Auch Cecropin P2-4 sind wie Cecropin P1 am C-Terminus nicht amidiert [93].

	Sekretorisches Signal 1                      10                      20	reifes Peptid 30                      40                      50	Pro-Region 60                      70                      80
cecropin P1	MFATRALLCMFLIYLLVQTAES	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIATAIQGGPR	RRRFVAEQDAIHSRVSRVPTLSDSV
cecropin P2	MFATRRALCMFLIYLLVQTAES	SWLSKTYKKLENSAKKRISEGIATAIQGGPR	RRRFVQDDISPRLEVDERFLPNSVQEQI
cecropin P3	MFATRALLCMFLIYLLVQTAES	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIATAIQGGSR	RRRSVGEEDAIPSHIEVNFLLRKPAAEHI
cecropin P4	MFAARRALCMFLIYLLVQTIES	SWLSKTYKKLENSAKKRISEGVATAIQGGLR	HRRSVAHQEEASLHVKTDELPSPDIVREQL
consensus	M*AxRRA**CM***YL*VQTxEs	SWLSKTxKKLENSAKKRISEG*AIAI xGGxR	+RRxV*±---x*xx+*#x#xxxxx#x*±E±*
		berechneter pI	berechneter pI
cecropin P1		10.56	4.75
cecropin P2		10.29	4.18
cecropin P3		10.66	6.00
cecropin P4		10.29	4.63

Abbildung 1.5 Sequenzen der Cecropin P Peptide von *Ascaris suum* nach [93] modif.

Gezeigt sind die Sequenzen der Vorläuferproteine. Die tetrabasische Schnittstelle ist unterstrichen. \* = hydrophobe Aminosäuren (AS), # = hydrophile AS, + = basische AS, - = saure AS, ± = geladene AS, x = nicht konserviert

### 1.1.7 Toxizität von Cecropin P1

Die Toxizität antimikrobieller Substanzen wird durch verschiedene Methoden ermittelt, welche als Resultat eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) der Substanz ermitteln, die für die getesteten Erreger tödlich ist.

Während Lee *et al.* die Toxizität des Cecropin P1 bestimmten und zu dem Schluss kamen, dass es hauptsächlich aktiv gegen Gram<sup>-</sup>-Bakterien ist (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*), schien es in den von Pillai *et al.* durchgeführten Tests gleich toxisch zu sein (auch in *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*). Diese Unterschiede können nur durch die Methodik der Toxizitätsermittlung erklärt werden, da z.B. der gleiche *S. aureus*-Stamm genutzt wurde (Tabelle 1.2). Innerhalb der vier Cecropin P Peptide gab es kaum Toxizitätsunterschiede, sodass die vorhandenen Sequenzvariationen keinen signifikanten Unterschied für die Toxizität machen (Abbildung 1.5) [93].

**Tabelle 1.2 Bestimmte MIC-Werte für Cecropin P1**

Organismus	MIC [µM]	Quelle
<i>E. coli</i> (verschied. Stämme)	0,2-0,9	[94]
	0,3	[88]
	0,4-0,8	[91]
	1,6	[95]
	1,8	[93]
	3	[96]
<i>S. typhimurium</i>	1,7	[91]
	1,8	[93]
<i>A. calcoaceticus</i>	0,5	[91]
	0,42	[88]
<i>P. vulgaris</i>	12	[91]
<i>P. aeruginosa</i>	0,6	[93]
	13	[91]
	16,9	[88]
	25	[95]
<i>A. baumannii</i> (Polymyxin B resistent)	2	[97]
<i>K. pneumoniae</i>	1,6	[95]
<i>P. mirabilis</i>	> 100	[95]
<i>S. marcescens</i>	6	[93]
<i>E. faecalis</i>	> 100	[95]
<i>B. megaterium</i>	4,7	[88]
	5,3	[91]
<i>B. subtilis</i>	0,6	[93]
<i>S. epidermidis</i>	> 100	[95]
<i>M. luteus</i>	2,4	[93]
<i>S. pyogenes</i>	44	[91]
<i>S. aureus</i>	> 520	[91]
	0,6	[93]
<i>S. cerevisiae</i>	90	[93]
<i>C. albicans</i>	60	[93]

Cecropin P1 lysiert Bakterien wie Insektencecropine auf eine stöchiometrische Weise und ist für *E. coli* gleichbleibend toxisch, unabhängig von einer vorgeschädigten äußeren Bakterienmembran [94]. Arcidiacono *et al.* stellten fest, dass Bakterien die mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration von Cecropin P1 inkubiert werden in weniger als 30 min getötet werden. Weiterhin weisen sie nach, dass Cecropin P1 LPS bindet, diese Bindung aber nicht Konzentrations-abhängig ist [96].

Vunnam *et al.* synthetisierten und testeten unterschiedliche Cecropin P1-Variationen. Dazu gehörten das D-Enantiomer, Cecropin P1 Retrosequenz und die Retrosequenz ausschließlich mit D-Aminosäuren. Zusätzlich wurden all diese Peptide mit N-terminaler Acetylierung bzw. C-terminaler Amidierung getestet. Die Untersuchung des Effektes auf die Toxizität der C-terminalen Amidierung

von Cecropin P1 von Vunnam *et al.* bestätigte die schon von Lee *et al.* beobachtete gesteigerte Toxizität gegenüber Gram<sup>+</sup>-Bakterien. Die N-terminal acetylierten Peptide waren inaktiv, wodurch die Autoren schlussfolgerten, dass ein freier N-Terminus für die Toxizität wichtig ist. Die Verwendung von D-Enantiomer Cecropin P1 hatte keinen signifikanten Effekt, sodass vermutet wurde, dass die Chiralität des Peptids die Toxizität nicht beeinflusst [98].

Gazit *et al.* entwarfen ein Cecropin P1 mit einem Prolin an Position 22, welches in den Insektencecropinen konserviert ist. Dies führte zu einer deutlichen Verminderung der Toxizität in allen getesteten Bakterienstämmen [88].

### 1.1.8 Cecropin P1 und Membranen

Im Jahr 1992 publizierten Sipos *et al.* die mittels NMR-Spektroskopie ermittelte dreidimensionale Struktur von Cecropin P1 in 30 % deuteriertem HFIP, welches als hydrophobe Umgebung die Membran nachahmen sollte. Sie postulierten, dass Cecropin P1 im Gegensatz zu den Insektencecropinen eine durchgehende  $\alpha$ -helikale Struktur einnimmt, da das Prolin an Position 22 zu dem flexiblen Glycin-Prolin-„Gelenk“ wie es in Insektencecropinen vorkommt, fehlt [99]. Daraus wurde geschlossen, dass Cecropin P1 anders mit der Bakterienmembran interagiert als die Insektencecropine [89]. Gazit *et al.* führten mit nicht in ihrer Toxizität beeinträchtigten N-terminal Fluorophor-markiertem Cecropin P1-Peptiden Bindungsstudien durch, die zeigten, dass Cecropin P1 besser an saure Phosphatidylserin/Phosphatidylcholin-(PS/PC)-Vesikel bindet als an zwitterionische Phosphatidylcholin-Vesikel. Außerdem stellten sie fest, dass Cecropin P1 die Vesikel bei Peptidkonzentrationen, die zur Ausbildung einer durchgehenden Peptidschicht genügen, permeabilisiert [88]. In weiteren Studien untersuchen sie die Orientierung des Cecropin P1 an multiplen Phosphatidylethanolamin/Phosphatidylglycerol-(PE/PG)-Lipiddoppelschichten, welche die bakterielle Membran imitieren sollten. Sie stellen dabei eine überwiegend  $\alpha$ -helikale Struktur des Peptids fest und maßen eine annähernd parallele Orientierung zur Membranoberfläche, wobei Cecropin P1 nicht in den Kohlenwasserstoffkern der Membranen eindringt. Aus diesem Grund postulierten sie einen „Carpet-like“-Mechanismus [89].

### 1.1.9 Anwendungsansätze für Cecropin P1

Smeianov *et al.* untersuchten die Toxizität von FA-LL37 und Cecropin P1 für sechs uropathogene Bakterienstämme und fünf *Lactobacillus*-Stämme. Für alle uropathogenen Stämme stellte sich Cecropin P1 als toxisch heraus, während es für keinen der *Lactobacillus*-Stämme toxisch war. Smeianov *et al.* sehen darin potentiellen Nutzen bei der lokalen Behandlung von Harnwegsinfektionen [95].

Zakharchenko *et al.* generierten transgene Pflanzen (Leindotter, *Camelina sativa*), welche das synthetische Gen für Cecropin P1 trugen und auch exprimierten. Deren Pflanzenextrakte waren antimikrobiell aktiv gegen das Pflanzenpathogen *Erwinia carotovora* und die Pflanzen der F<sub>0</sub>- und F<sub>1</sub>-Generation wiesen keine phänotypische Veränderung auf. Zusätzlich waren die transgenen Pflanzen resistenter gegenüber Stress durch hohe Salzkonzentrationen [100]. Zakharchenko *et al.* diskutieren aufgrund ihrer Ergebnisse das Verwenden von Cecropin P1 als Transgen im Pflanzenschutz.

Weiterhin wurde die potentielle Verwendung von Cecropin P1 als Biosensor untersucht. Gregory *et al.* banden dafür Cecropin P1 kovalent auf Mikrotiterplatten und immobilisierten so *E. coli* K12 und

*E. coli* O157:H7, wobei die Immobilisation von *E. coli* O157:H7 deutlich stärker ausfiel [101]. Diese Arbeiten wurden von Strauss *et al.* fortgeführt. Sie immobilisierten Cecropin P1 auf unterschiedlichen Oberflächen und untersuchten den Einfluss dieser unterschiedlichen Oberflächen auf die Toxizität des Cecropin P1. Die Toxizität war dabei stark abhängig von der Immobilisationsmethode. C-terminal über eine Thiolbindung auf Gold immobilisiertes Cecropin P1-Cys konnte nur 4 der 12 getesteten *E. coli*-Stämme töten, während das an Silikonitrit gebundene Cecropin P1 alle 12 Stämme töten konnte. Weiterhin stellten sie fest, dass die Anhaftung der Bakterien an Cecropin P1 für *E. coli*-Stämme mit langen O-Antigen am stärksten war [102]. Im Zusammenhang mit der Nutzung von AMPs als Biosensoren untersuchten Han *et al.* ebenfalls die Cecropin P1-Immobilisierung und Konformation auf einer Polymeroberfläche. Sie verwendeten wie Strauss *et al.* Cecropin P1 mit C-terminalem Cystein und zeigten, dass das auf der Polystyren-Maleimid-Oberfläche immobilisierte Cecropin P1 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5 eine  $\alpha$ -helikale Struktur einnimmt, obwohl es in wässrigen Puffer-Lösungen unstrukturiert vorliegt [103].

#### 1.4 Zielsetzung

---

Antimikrobielle Peptide sind natürlich vorkommende Peptide mit einem breiten Wirkspektrum gegen eine Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen. Ihre Toxizität ist dabei selektiv für diese Pathogene und multifaktoriell, sodass eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlicher wird. Ein weiterer Vorteil gegenüber konventionellen Antibiotika ist die Toxizität gegenüber multiresistenten Erregern, die Fähigkeit Endotoxine zu neutralisieren und das Immunsystem durch verschiedene Mechanismen zu unterstützen (z.B. Chemotaxis) [66]. Dies macht sie für die medizinische Anwendung äußerst interessant. Die  $\alpha$ -helikalen kationischen AMPs, wie die Cecropine, sind sehr gut untersucht und greifen selektiv Membranen von Mikroben an. Bekannt ist, dass diese AMPs in Lösung unstrukturiert vorliegen, sich aber in Membran-ähnlicher Umgebung zu amphipathischen  $\alpha$ -helikalen Strukturen falten und die Membranen lysieren. Um diese Peptide medizinisch einsetzen zu können, müssen diese pharmakologisch optimiert werden (z.B.  $\uparrow$ Stabilität,  $\downarrow$ Größe,  $\uparrow$ Spezifität). Für die Optimierung solcher Peptide ist es hilfreich den genauen Wirkmechanismus möglichst detailliert aufzuklären und die für die Toxizität und Spezifität notwendigen Charakteristika der Peptide zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung eines bekannten  $\alpha$ -helikalen AMPs mit bakteriellen Membranen als Zielstruktur. Zu diesem Zweck sollte zunächst das AMP Cecropin P1 rekombinant und  $^{15}\text{N}$ -markiert hergestellt werden, um anschließend eine Charakterisierung der Struktur und Dynamik des Peptides durchzuführen. Weiterhin sollten Methoden zur Erfassung der Toxizität von Cecropin P1 laborintern etabliert werden, um mit Hilfe von entwickelten Cecropin P1-Varianten die für die Toxizität wichtigen Parameter (Hydrophobizität, Länge, Ladung) qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Diese Arbeiten sollen die Grundvoraussetzung für die Entschlüsselung des Membraninteraktionsmechanismus und die systematische Charakterisierung der für die Toxizität wichtigen Eigenschaften schaffen. Anschließend sollte es möglich sein dieses Wissen auf ähnliche Peptide zu übertragen und ein rationales *Design* medizinisch einsetzbarer antimikrobieller Peptide zu erleichtern.

## 2. Materialien und Methoden

---

### 2.1 Materialien

---

#### 2.1.1 Chemikalien

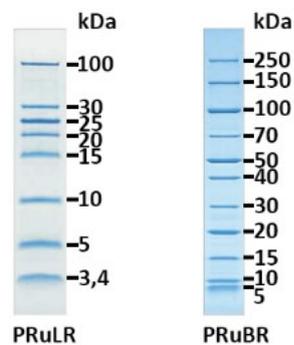
Alle nicht gesondert aufgeführten Laborchemikalien wurden von den Herstellern Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Name	Hersteller
AA/Bis Rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose	Roth
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid ( <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl)	Cambridge Isotopes
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Antifoam	Sigma
Biotin	AppliChem
BSA	NEB/Roth
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)tetrazolium chloride (CTC)	Sigma
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O) 99,9 %	Deutero GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Biomol
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
D-Saccharose	Roth
Eisen(III)Citrat	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Calbiochem
Fleischextrakt	Fluka
Hefeextrakt	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Appllichem
Glucose	Roth
Glycerin 86%	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
Magnesiumsulfat	Fluka
Natriumazid	Roth
Natriumcholat	Appllichem
Natriumdihydrogenphosphat Heptahydrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei)	Roth

Natriumchlorid	Roth
Orange G	Roth
Pepton	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
POPE	Avanti Polar Lipids
POPG	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
TB-Medium	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Thiaminchlorid-hydrochlorid (Vitamin B <sub>1</sub> )	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Tricin	Roth
Triton X-100	Applichem
Trypton	Roth
Tween20	Roth

### 2.1.2 Marker

Als DNA-Marker wurden die 100 bp und 1 kb *Quickload*-Marker von NEB genutzt. Die verwendeten Proteinmarker sind der *Page Ruler unstained broad range* und *low range* der Firma Thermo Scientific (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1 verwendete Proteinmarker**  
 PRuLR = *Page Ruler unstained broad range*, PRuBR = *Page Ruler unstained broad range*

### 2.1.3 Puffer, Lösungen und Kits

Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie BB 250-G
	227 ml Ethanol
	46 ml Essigsäure
	227 ml H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	50 ml Essigsäure
	75 ml Ethanol
	875 ml H <sub>2</sub> O

FPLC-Puffer			
Basispuffer		50 mM	Tris/HCl pH 8.0
		150 mM	NaCl
		20 mM	Imidazol
Bindepuffer	Basispuffer +	1%	Triton
Waschpuffer	Basispuffer +	50 mM	Natriumcholat
Elutionspuffer	Basispuffer +	0,25 M	Imidazol
Gelfiltrationspuffer		50 mM	Tris/HCl pH 8,0
		150 mM	NaCl
NMR-Probenpuffer			
Kaliumphosphatpuffer		50 mM	pH 6,5
Transferpuffer			
		25 mM	Tris pH 8-8,3
		192 mM	Glycin
		20 %	Methanol
Tris-Tricin-Gele [104]			
Anoden-Puffer		0,2 M	Tris/HCl pH 8,9
Gel-Puffer			
		3 M	Tris/HCl pH 8,45
		0,3 %	SDS
Kathoden-Puffer			
		0,1 M	Tris
		0,1 M	Tricin
		0,1 %	SDS
Probenpuffer (4x)	4 ml	0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
	4,8 ml	86 %	Glycerin
	1,6 g		SDS
	4 mg		Coomassie BB 250-G
		<i>ad</i>	10 ml mit ddH <sub>2</sub> O
	optional	0,05 M	DTT vor Gebrauch
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (1x) (TAE-Puffer)			
		40 mM	Tris pH 8,5
		1 mM	EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz
		20 mM	Essigsäure
TS2 (50x)			
		2 M	Tris-Acetat pH 8,3
		50 mM	EDTA

## 10 x PBS

80 g	NaCl
2 g	KCl
14,19 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad pH 7,4	HCl
ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O

## 1000 x Spurenelemente

20 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	MnCl <sub>2</sub>
10 mM	ZnSO <sub>4</sub>
2 mM	CoCl <sub>2</sub>
2 mM	CuCl <sub>2</sub>
2 mM	NiCl <sub>2</sub>
2 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
2 mM	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
2 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

➔ autoklavieren und danach mit 100 mM FeCl<sub>3</sub> (in 120 mM HCl gelöst) 1:1 mischen.

## Kits

DNA Präparationskit Mini:

*Nucleo Spin<sup>®</sup>Plasmid* (Macherey-Nagel)

Gelreinigungs-Kit:

*Nucleo Spin<sup>®</sup>Extract II* (Macherey Nagel)

Zielgerichtete Mutagenese

*QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies)

Pierce *ECL Substrate*

Thermo Scientific

## 2.1.4 Nährmedien

### Autoinduktionsmedium N-5052-Medium [105]

50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 g	NH <sub>4</sub> Cl
2 mM	MgSO <sub>4</sub>
0,2 x	Spurenelemente 1000 x
0,5 %	Glycerol
0,05 %	Glucose
0,2 %	Lactose
ad	1 l mit ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4 eingestellt mit NaOH

## LB-Medium

5 g Hefeextrakt  
10 g Trypton  
10 g NaCl  
*ad* 1 l mit ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 eingestellt mit NaOH

## LB-Agar-Platten

15 g Agar  
*ad* 1 l LB-Medium

## MH-Medium (Fluka)

23 g MH-Medium  
*ad* 1 l mit ddH<sub>2</sub>O

## MH-Agar (Roth)

38 g MH-Agar  
*ad* 1 l mit ddH<sub>2</sub>O

## M9-Minimalmedium

48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,5 g NaCl  
1 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl  
2 mM MgSO<sub>4</sub>  
2 ml TS2 50 x  
10 mM Fe(III)Citrat  
20 ml 20 % Glucose  
100 µl 1M CaCl<sub>2</sub>  
100 µl 0,5 % Vitamin B<sub>1</sub>  
*ad* 1 l mit ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 eingestellt mit NaOH

## Minimales Phosphatmedium (Medium P) [105]

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
2 mM MgSO<sub>4</sub>  
*ad* 1 l mit ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 und autoklavieren  
56 mM NH<sub>4</sub>Cl  
4 g/l Glucose  
10 mg Thiaminhydrochlorid  
10 mg Biotin

## SOC-Medium

5 g Pepton  
3 g Fleisch-Extrakt  
*ad* 1 l mit ddH<sub>2</sub>O

## TB-Medium

50,8 g	TB-Medium (Roth)
4 ml	86 % Glycerin
ad	1 l mit ddH <sub>2</sub> O

### 2.1.5 Antibiotika

Alle Antibiotikastocklösungen wurden 1:1000 eingesetzt. Kanamycin und Ampicillin lagen in ddH<sub>2</sub>O gelöst vor, Chloramphenicol in Isopropanol. Die Stocklösungen wurden bei -20 °C gelagert und nach Anbrechen bei 4 °C.

**Tabelle 2.1 Übersicht über verwendete Antibiotika-Stocklösungen**

Antibiotikum	Stocklösung [mg/ml]
<b>Ampicillin</b>	100
<b>Chloramphenicol</b>	34
<b>Kanamycin</b>	50

### 2.1.6 Bakterienstämme

Für die Vermehrung der Plasmid-DNA wurden *E. coli ElectroSHOX* der Firma Bioline verwendet. Die Expressionsanalysen wurden mit den *E. coli* – Stämmen BL21(DE3)-T1<sup>R</sup>, C43 DE3, C43 pLys DE3, C41 DE3 durchgeführt. Für die MIC-Tests und die Fluoreszenzmikroskopie wurde der *E. coli* - Stamm ML3 mit der DSM - Nummer 1058 verwendet.

**Tabelle 2.2 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Firma
<b><i>E. coli</i> ElectroSHOX competent cells</b>	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 ara Δ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK - rpsL (Str <sup>R</sup> ) nupG λ <sup>-</sup>	Bioline
<b><i>E. coli</i> BL21(DE3)-T1<sup>R</sup></b>	F- ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm λ(DE3) tonA	Sigma
<b><i>E. coli</i> C43 DE3</b>	F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	Erhalten von AG Ehrmann
<b><i>E. coli</i> C43 pLys DE3</b>	F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CmR)	Erhalten von AG Ehrmann
<b><i>E. coli</i> C41 DE3</b>	F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	
<b><i>E. coli</i> ML3 DSM- Nummer: 1058 Sero- typ: O13:H11</b>		DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

## 2.1.7 Peptide

Tabelle 2.3 Genutzte Peptide

Sequenz	Bezeichnung	Firma
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	wildtyp Cecropin P1 (WT)	China Peptides
FITC-Ahx-LSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	FITC- $\Delta$ S1W2-Peptid	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	$\Delta$ 21-31	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAEAIQGGPR	I24E	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGALAVAIGGPR	21-27 ALAVAI	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGKKGKSEEGGPR	21-27 KGKSEE	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGVVLVVLGGPR	21-27 VVLVVL	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIQGGPR	$\Delta$ 22-26	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	$\Delta$ 25-26	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIAIQGGPR	+A27, I28	Caslo Aps
SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIAIAIQGGPR	+A27, I28, A29, I30	Caslo Aps

## 2.1.8 Enzyme

DNA – Ligase	T4 DNA Ligase (Metabion)
DNA – Polymerase	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (Metabion)
Polynukleotidkinase	T4 Polynukleotidkinase (NEB)
Lysozym	Serva
SUMO – Protease	laborintern exprimiert und gereinigt von Alma Ruppel
Restriktionsenzyme	BsaI (NEB)
	BamHI (fast digest) (Fermentas)
	BamHI (NEB)
	SacII (NEB)
	DpnI (Agilent Technologies)

## 2.1.9 Plasmide und Oligonukleotide

Für alle während dieser Arbeit generierten Konstrukte wurden folgende Ausgangsplasmide verwendet (Tabelle 2.4). Das von GeneArt bestellte Plasmid enthielt das für Cecropin P1 codierende Gen. Der pET-SUMO-Vektor von Invitrogen wurde laborintern modifiziert und als Vektor-Gerüst für alle generierten Konstrukte genutzt.

Tabelle 2.4 Verwendete Plasmide

Vektor	laborinterne BC-Nummer	Firma
Cecropin P1 in pMK-T-Kana	952	GeneArt
pET-SUMOadapt	903.1	Invitrogen (modif.)

In Tabelle 2.5 sind alle genutzten Oligonukleotide aufgeführt. Für PCR (2.3.2) und Klonierung (2.3.5) wurden diese mittels FPLC gereinigt. Für die zielgerichtete Mutagenese (2.3.4) wurden die Oligonukleotide mittels HPLC gereinigt. Die Synthese und Reinigung aller Oligonukleotide wurde durch die Firma Metabion durchgeführt.

Tabelle 2.5 Verwendete Oligonukleotide

Die bindenden Bereiche sind jeweils unterstrichen. Mutationen sind rot gekennzeichnet.

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung
996F	CACACA GGTCTCATGGT <u>TCTTGGCTGTCGAAAAC</u>
997R	GGTTGG GGATCC ATTA <u>ACGAGGACCACCCTGAA</u>
1009F	<u>GGGTGGT CCGCGG TAATGGATCCAAGC</u>
1010R	<u>GCTTGGATCCATTA CCGCGG ACCACCC</u>
1011F	GG GGC TGGTCACATCCTCAGTTCGAGAAA TAAG
1012R	GATCC CTTA TTTCTCGAACTGAGGATGTGACCA GCC CC GC

Die Oligonukleotide 966F/997R wurden für die Vervielfältigung des Cecropin P1 Gens aus dem pMK-T-Kana-Vektor genutzt. Die Oligonukleotide 1009F/1010R dienten der zielgerichteten Mutagenese der Restriktionsschnittstelle SacII um anschließend mit Hilfe der Oligonukleotide 1011F/1012R einen StrepII-tag mittels der SacII- und der BamHI-Schnittstelle einzufügen. Tabelle 2.6 gibt eine Übersicht über die erstellten Konstrukte.

Tabelle 2.6 Generierte Konstrukte

Insert	Vektor	Modifikation	laborinterne Nummer	BC- genutzte Oligonukleotide
Cecropin P1	pET-SUMOadapt	Insertion via Bsal/BamHI	955	996F/997R
Cecropin P1	pET-SUMOadapt	SacII	975	1009F/1010R
Cecropin P1-Strep-tag	pET-SUMOadapt	Insertion Strep-tag via SacII/BamHI	976	1011F/1012R

#### 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

24-Well-Platten	Greiner
96-Well-Platten	Greiner
Einmalküvetten	Roth

Handschuhe	VWR
Nitrocellulosemembran (0,22 µM Poren)	Whatman
Objektträger	Thermo scientific
Papiertücher	Kimberly-Clark
Pipettenspitzen	Sarstedt
Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen	BD Bioscience
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml; 50 ml	Sarstedt
Filter-Papier	Albet

### 2.1.11 Geräte

Autoklav	H+P Varioklav 2T	Oberschleißheim
CD-Spektrometer	Jasco J-715	Jasco Analytical Instruments
Einkanal Pipetten		Eppendorf
Elektrophorese-Kammer	XCell <i>SureLock</i> XCell II™ XCell Mini Protean 3	Invitrogen Biorad
<i>Semi-Dry-Blotting</i>	<i>blotting table</i>	Biometra
Feinwaage	ABJ 80-4M	Kern
FPLC	Äkta FPLC P920 Duo Flow	GE Healthcare Biorad
Inkubatoren	Thermomixer <i>comfort</i> Mikrobiol. Inkubator BD53	Eppendorf Binder
Konzentratoren	Vivaspin 2000 MWCO, 15R Vivaspin 10 000 MWCO, 20	Sartorius Sartorius
Laborwaage	EG 620-3N	Kern
Magnetrührgeräte	Assistant RM5	Heidolph Instruments
MALDI-Massenspektrometer	Autoflex <i>speed</i> MALDI-TOF	Bruker
Mikroskop	Nikon Eclipse Ti <i>Yokogawa CSU X-1 spinning disc unit</i> ×100, 1.49 NA Objektiv Andor iXon X3 EMCCD (Kamera)	Nikon
PCR-Gerät	Mastercycler egradient	Eppendorf
pH-Meter		Mettler Toldeo
Photometer	Bio Photometer UV/Vis ND-1000	Eppendorf peqlab
Pumpen	Hochvakuumpumpe RZ 2.5	Vacuubrand GmbH
Rotoren	Ti45 JL-25.5	Beckman Beckman
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments
Spektrometer	NMR-Spektrometer 700 MHz	Bruker

Sterilbank	Hera safe	Thermo Scientific
Stromversorgungseinheit		Biometra
Ultraschallsonde	Sonoplus HD2200	Bandelin
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasseraufbereitung	Milli-Q Biocel	Millipore
Zentrifugen	Tisch-Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R		Eppendorf
Tischzentrifuge	Minispin Plus	Eppendorf
Avanti JE		Beckman
Optima LE-80K Ultrazentrifuge		Beckman

## 2.2 Datenauswertung und verwendete *Software*

**Tabelle 2.7 Verwendete *Software***

<b>Programm</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Referenz/Firma</b>
Bioedit Version 7.0.9.0	Sequenzalignments (DNA)	Ibis Biosciences
SnapGene Viewer Version 2.2.2	Sequenzalignments (DNA)	GSL Biotech LLC
T-Coffee	Multiple Sequenzalignments (Protein)	[106]
Pymol Version 1.2r.1	Visualisierung von Proteinstrukturen	[107]
Topspin 3.0	NMR-Spektrenaufnahme und Prozessierung	Bruker
CCPN Analysis 2.3	Visualisierung und Auswertung der NMR-Spektren	[108]
Cyana 2.1	Strukturberechnung	
Spectramanager 2.0	Auswertung der CD-Spektren	Jasco
GraphpadPrism Version 5	Allgemeine Datenauswertung	GraphPad Software

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA-Isolation und Reinigung

Um reine Plasmid-DNA zu erhalten, wurde zunächst eine *E. coli*-Kultur angezogen und anschließend durch Zentrifugieren geerntet (4000 x g, 10 min, 4 °C). Die Isolierung und Reinigung des in der Bakterienkultur enthaltenen Plasmids wurde mit Hilfe der entsprechenden Kits der Firma Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Auch aus der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und der Restriktion resultierende DNA wurde mit Hilfe des *Nucleo Spin®Extract II*-Kits aufbereitet.

### 2.3.2 PCR

Mit Hilfe der PCR kann durch Einsatz der entsprechenden *Primer*, ein genau definierter DNA-Abschnitt synthetisiert und vervielfältigt werden. Dabei wird zu Beginn die eingesetzte *Template*-DNA bei 95 °C denaturiert. Dem folgt das *Annealing*, im Verlaufe dessen die *Primer* mit der DNA hyb-

ridisieren. Anschließend wird während der Elongation durch die DNA-Polymerase der *antisense*-Strang synthetisiert. Dieser Zyklus wird zwischen 20-30 Mal wiederholt, wobei nun auch bereits die neu synthetisierte DNA als *Template* dient. Als Polymerase wurde die thermostabile *Pfu*-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) verwendet. Sie besitzt eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität, die Exzisionsreparaturen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von GeneArt synthetisierte Gen für Cecropin P1 mittels PCR vervielfältigt, um es anschließend in den pET-SUMOadapt-Vektor einzubringen. Das zu erwartende PCR-Produkt ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abbildung 2.2 Sequenz des zu erwartenden PCR-Produktes und der genutzten Primer**

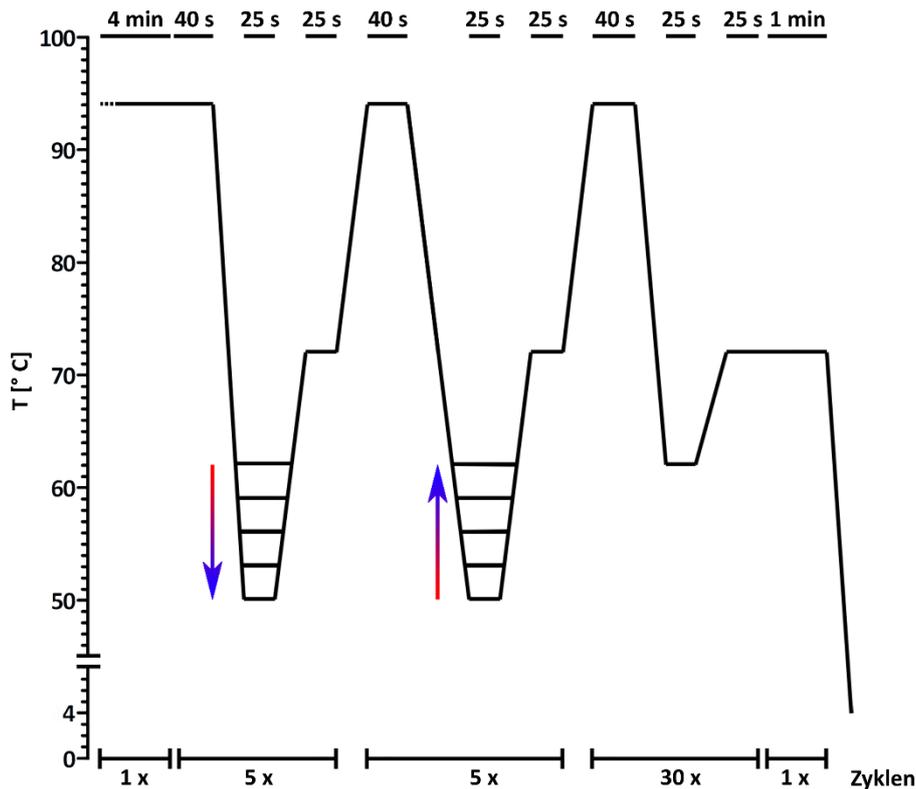
In Grau sind die verwendeten *Primer* abgebildet. Die für Cecropin P1 codierende Sequenz ist schwarz und das Stopcodon in kursiv dargestellt.

Der Tabelle 2.8 ist die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zu entnehmen. Als Primer wurden die Oligonukleotide 996F und 997R genutzt (Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.8 PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>PCR-Puffer 10 x</b>	5 µl
<b>dNTPs 10 mM</b>	4 µl
<b>Primer (10 pmol/µl)</b>	je 2 µl
<b>Template-DNA</b>	500 ng
<b>Pfu- Polymerase(5 units/µl)</b>	1 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 50 µl</b>

Abbildung 2.3 zeigt den bei der Amplifikation des Cecropin P1-Gens verwendeten Temperaturzyklus. Dabei wurde mit einer sehr hohen *Annealing*-Temperatur begonnen, um vorrangig eine sehr spezifische Amplifikation des korrekten PCR-Produktes zu gewährleisten. Bei sehr hohen *Annealing*-Temperaturen, über der erwarteten Schmelztemperatur, binden die *Primer* entweder hochspezifisch oder überhaupt nicht. Deshalb wurde anschließend die *Annealing*-Temperatur schrittweise gesenkt. Mit dieser Methodik, die *Touchdown*-PCR genannt wird, können beispielsweise *Primer*dimere und andere ungünstige Nebenprodukte vermieden werden. Die Elongationszeit wurde an die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes angepasst, da bei zu langen Elongationszeiten ebenfalls unerwünschte Nebenprodukte entstehen können. Die *Pfu*-Polymerase benötigt für 1 kb zwei Minuten, weswegen in dieser PCR nur über 25 s elongiert wurde.



**Abbildung 2.3 Temperaturzyklus zur Amplifikation des Cecropin P1 – Fragmentes**

Die Denaturierung der Template-DNA wurde bei 95 °C durchgeführt. Im ersten Abschnitt wurde über 5 Zyklen jeweils die *Annealing*temperatur um 3 °C gesenkt. Im zweiten Abschnitt wurde sie nach dem gleichen Schema um 3 °C erhöht. Anschließend wurde mit 62 °C über 30 Zyklen gearbeitet. Am Ende des Zyklus wurde einmal für 1 min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

### 2.3.3 Restriktion

Restriktionsendonukleasen dienen dem gezielten Ausschneiden eines DNA-Fragmentes aus Plasmiden oder größeren DNA-Fragmenten. Hierbei werden die Phosphodiester-Bindungen der DNA-Stränge an der Erkennungsstelle der Restriktionsenzyme gespalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme BsaI (GGTCTCA|TGGT), BamHI (G|GATCC) und SacII (CCGC|GG) verwendet. Für die Generierung des ersten Konstruktes, bestehend aus der für Cecropin P1 codierenden DNA-Sequenz in einem pET-SUMO*adapt* Vektor, wurde der Restriktionsansatz in Tabelle 2.9 verwendet. Die Restriktion erfolgte hierbei bei 37 °C für 1 h.

**Tabelle 2.9 Restriktionsansatz für *Insert*-DNA und Vektor-DNA I**

Bestandteil	Menge
NEB-Puffer 3 10 x	5 µl
BamHI	1 µl
BsaI	1 µl
BSA	5 µl
DNA	1 µg
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 50 µl</b>

Für das zweite Konstrukt wurde nach zielgerichteter Mutagenese (2.3.4) innerhalb des ersten Konstruktes mit resultierender SacII-Schnittstelle (Tabelle 2.6 ) verdaut, um später eine für den StreptII-*tag* codierende DNA-Sequenz einzufügen. Es wurde in diesem Ansatz (siehe Tabelle 2.10) zunächst für 1 h bei 37 °C nur mit SacII verdaut und anschließend für 15 min mit BamHI.

**Tabelle 2.10 Restriktionsansatz für *Insert*-DNA und Vektor-DNA**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>Puffer G 10 x</b>	5 µl
<b>BamHI (<i>fast digest</i>)</b>	1 µl
<b>SacII</b>	2 µl
<b>DNA</b>	1 µg
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 50 µl</b>

Die Restriktionsansätze wurden direkt weiter verwendet. Vektor-DNA und *Insert*-DNA wurden mit Hilfe der entsprechenden Kits vor der Ligation gereinigt (2.3.1).

#### 2.3.4 Zielgerichtete Mutagenese

Mit der zielgerichteten Mutagenese ist es möglich Basen in einer DNA-Sequenz zu mutieren, zu deletieren oder auch einzufügen. Innerhalb dieser Arbeit wurde hierfür das *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* Kit von Agilent Technologies verwendet. Dieses Kit ermöglicht es über eine PCR mit mutagenen Oligonukleotiden und doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Hilfe der *PfuTurbo* DNA Polymerase die gewünschten Veränderungen am Ausgangsplasmid vorzunehmen. Anschließend wird das resultierende Produkt mit DpnI (5'-Gm6ATC-3') verdaut. Diese Endonuklease ist spezifisch für methylierte DNA, was dazu führt, dass das ursprünglich eingesetzte Ausgangsplasmid verdaut und nur die mutierte neu synthetisierte DNA erhalten wird. Dies ist möglich, da die DNA aus den meisten *E. coli*-Stämmen methyliert vorliegt und aufgrund dessen durch DpnI verdaut werden kann. Die erhaltene neu synthetisierte DNA mit den gewünschten Mutationen wird anschließend in kompetente *E. coli ElectroSHOX* transformiert (Tabelle 2.2).

Die zielgerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit für die Generierung einer SacII-Schnittstelle mittels zweier Punktmutationen genutzt. Das Ausgangskonstrukt hierfür war das Cecropin P1 Gen im pET-SUMO*adapt* Vektor. Dieser wurde als *Template* für eine PCR mit den mutagenen *Primern* 1009F und 1010R (Tabelle 2.5) verwendet. Der PCR-Ansatz ist der Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Der genutzte Temperaturzyklus wurde den Herstellerangaben des Kits entnommen und mit 16 Zyklen durchgeführt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde dem Ansatz 0,5 µl DpnI (10 U/µl) hinzugefügt und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde 1 µl des Ansatzes in *E. coli ElectroSHOX* transformiert (2.3.7). Die erhaltenen Klone wurden kultiviert, die DNA isoliert und anschließend sequenziert.

**Tabelle 2.11 PCR-Ansatz für die zielgerichtete Mutagenese**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>PCR-Puffer 10 x</b>	2,5 µl
<b>dNTP-Mix</b>	0,5 µl
<b>Primer (10 pmol/µl)</b>	je 1,4 µl
<b>Template-DNA</b>	50 ng
<b>PfuTurbo Polymerase(2,5 units/µl)</b>	0,5 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 25 µl</b>

### 2.3.5 Klonierung mit Oligonukleotiddimeren als *Insert*

Ausgangsplasmid für diese Klonierung war das durch die zielgerichtete Mutagenese erzeugte Konstrukt mit *SacII*-Schnittstelle (2.3.4). Als *Insert* dienten die Oligonukleotide 1011F und 1012R (Tabelle 2.5), welche für den *StreptII-tag* codieren. Für die nachfolgende Ligation wurden diese erst mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase am 5'-Hydroxyterminus phosphoryliert (Tabelle 2.12).

**Tabelle 2.12 Ansatz zur 5'-Phosphorylierung**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>T4 Ligase-Puffer 10 x</b>	2,5 µl
<b>Oligonukleotide (10 µM)</b>	je 10 µl
<b>T4 Polynukleotidkinase (2,5 units/µl)</b>	0,5 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 25 µl</b>

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 63 °C über 1,5 h und eine Abkühlungsphase von 30 min bei RT. Das Ausgangsplasmid wurde wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben verdaut und gereinigt, um danach mit den erzeugten 5'-phosphorylierten Oligonukleotiddimeren ligiert werden zu können (2.3.6).

### 2.3.6 Ligation

Mit Hilfe der T4 Ligase wird die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxygruppe zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente katalysiert. Um das Cecropin P1 Gen in den pET-SUMO*adapt*-Vektor einzuführen, wurden vor der Ligation beide mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut (2.3.3). Anschließend konnten dann die komplementär überstehenden Enden von *Insert* und Vektor ligiert werden. Die Zusammensetzung dieses Ligationsansatzes sind in Tabelle 2.13 dargestellt.

**Tabelle 2.13 Zusammensetzung der Ligationsansätze**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>T4 Ligase-Puffer 10 x</b>	2 µl
<b>Vektor-DNA</b>	50 ng
<b>Insert-DNA</b>	150 ng (1:3)/50 ng (1:1)/ 0 ng (KO)
<b>T4 Ligase</b>	1 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 20 µl</b>

Es wurden drei Ansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor:*Insert* bzw. zur Kontrolle auch ohne *Insert* pipettiert. Die Ansätze wurden für 1 h bei 16 °C inkubiert und anschließend die Ligase bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Je 2 µl der Ligationsansätze wurden in *E. coli ElectroSHOX* transformiert (2.3.7), einzelne Kolonien von den Agarplatten gepickt, angezogen und die DNA isoliert (2.3.1) und sequenziert.

Eine weitere Ligation wurde mit den durch die PNK 5'-phosphorylierten Oligonukleotiddimeren die für den *StreptII-tag* codieren (*Insert*) und dem mit *SacII* und *BamHI* verdauten Cecropin pET-SUMO*adapt* Konstrukt durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ligationsansätze ist der Tabelle 2.14 zu entnehmen. Diese wurden bei 16 °C über Nacht inkubiert und am darauf folgenden Tag 10 min bei 65 °C die Ligase hitzeinaktiviert. Anschließend wurde jeweils 1 µl in *E. coli ElectroSHOX* transformiert (2.3.7).

**Tabelle 2.14 Zusammensetzung der Ligationsansätze**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
<b>T4 Ligase-Puffer 10 x</b>	2 µl
<b>Vektor-DNA</b>	50 ng
<b>Insert-DNA</b>	2 µl/1 µl/0,1 µl/0 µl (KO)
<b>T4 Ligase</b>	1 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>ad 20 µl</b>

### 2.3.7 DNA-Transformation

Alle Arbeiten bei der Transformation von DNA wurden steril durchgeführt. DNA-Transformationen wurden nach den Ligationsreaktionen und für das Einbringen fertiger Konstrukte in *E. coli*- Expressionsstämme genutzt.

#### Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen

Diese Transformation von DNA wurde für alle Stämme außer dem *E. coli* BL21(DE3)-T1<sup>R</sup>-Stamm (Tabelle 2.2) in elektrokompente *E. coli*- Zellen durchgeführt. Hierbei wurden zunächst ein

40 µl-Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Die gewünschte Menge der entsprechenden DNA wird auf die kompetenten Zellen pipettiert, sanft gemixt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden anschließend in die vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, elektroporiert und sofort in ein Reaktionsgefäß mit 300 µl vorgewärmtem SOC-Medium überführt. Der Transformationsansatz wird 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert.

#### Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Einem 40 µl Aliquot des chemisch kompetenten *E. coli* BL21(DE3)-T1<sup>R</sup>-Stammes wurde die gewünschte Menge der entsprechenden DNA hinzugefügt und 20 min auf Eis gelagert. Dann wurden die Zellen für 45 s bei 42 °C und anschließend wieder bei 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 300 µl vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 600 rpm geschüttelt.

Nach der Transformation wurden die Ansätze auf LB-Selektivplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert oder direkt in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und bei 37 °C schüttelnd kultiviert.

## 2.4 Mikrobiologische Methoden

---

### 2.4.1 Kultur von *E. coli*

*E. coli* – Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, im entsprechenden Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Ausgestrichene *E. coli* – Kulturen wurden auf den entsprechenden Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen bei 37 °C kultiviert.

### 2.4.2 Expression

#### Expressions- und Löslichkeitstests

##### Expressionstests

Für die Expressionstests wurde das entsprechende Plasmid in die gewünschten *E. coli* – Stämme transformiert (2.3.7), auf LB-Selektivplatten mit Kanamycin ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde von einer der frisch transformierten *E. coli*-Kolonien ÜN eine Flüssigkultur angezogen (2.4.1). Es wurden unterschiedliche Bakterienstämme, Medien, Induktions-Zeitpunkte, Expressionszeiten, Temperaturen und IPTG-Konzentrationen getestet. Der grundlegende Aufbau der Tests ist dabei identisch. Im Folgenden werden nur die ausschlaggebenden Tests detailliert aufgeführt.

Der erste Expressionstest wurde in *E. coli*-BL21(DE3)-T1<sup>R</sup> (Tabelle 2.2) mit dem Cecropin P1 im pET-SUMO<sup>adapt</sup> Vektor durchgeführt. Dafür wurden 160 ml TB-Medium (30 µg/ml Kanamycin) mit 2 % [v/v] der ÜN-Kultur beimpft und bei 37 °C und 160 rpm schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,0 wurde die Kultur in 3 x 50 ml Kulturen geteilt mit 0,5 mM IPTG induziert. Die verbleibenden 10 ml wurden als nicht induzierte Kontrolle bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Bakterienpellet bei -20 °C gelagert. Je eine der drei Flüssigkulturen wurde bei 25 °C, 30 °C und 37 °C bei 160 rpm inkubiert. Vom Zeitpunkt der Induktion mit IPTG wurde nach 2 h, 4 h, 6 h und 18 h die OD<sub>600</sub> gemessen und 10 ml

jeder Bakterienkultur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei -20 °C gelagert.

Ein zweiter Expressionstest von Cecropin P1 im pET-SUMO $adapt$ -Vektor wurde mit *E. coli* C43 DE3 (Tabelle 2.2) durchgeführt. Dafür wurden 500 ml LB – Medium (30 µg/ml Kanamycin) mit 1,5 % [v/v] einer ÜN-Kultur beimpft. Die Stimulation mit IPTG erfolgte hier bei einer OD<sub>600</sub> von 0,9. Zuvor wurden wie oben beschrieben 10 ml der Kultur als Kontrolle abgenommen, zentrifugiert und das resultierende Bakterienpellet bei -20 °C gelagert. Für diesen Test wurde ebenfalls mit 50 ml-Kulturen gearbeitet. Die getesteten Parameter sind der Tabelle 2.15 zu entnehmen. Es wurden ebenso zu den entsprechenden Zeitpunkten die OD<sub>600</sub> gemessen, 10 ml der Bakterienkulturen abgenommen, zentrifugiert und die entstandenen Bakterienpellets bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.15 Verwendete Parameter für Expressionstests**

<b>Parameter</b>	<b>Werte</b>
Temperatur [°C]	25/30/37
IPTG-Konzentration [mM]	0,25/0,75/1
Expressionsdauer [h]	2/4/6/18

Basierend auf den Ergebnissen des zweiten Expressionstests, wurde ein weiterer Expressionstest durchgeführt. Dabei wurde mit 0,75 mM IPTG bei einer variablen OD<sub>600</sub> (1,0/2,0/2,5) der Bakterienkulturen induziert. Nach 2 h Expression bei 37 °C und 160 rpm wurden die Bakterienkulturen zu je 5 x 10 ml aliquotiert, zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Alle so entstandenen Proben wurden wie folgt behandelt: Alle Arbeiten wurden hierbei auf Eis ausgeführt. Die bei -20 °C gelagerten Bakterienpellets wurden in je 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl mit 1 mM PMSF aufgenommen und 3 x 30 s bei 30 % mit Hilfe einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Anschließend wurde für 1 h bei 4 °C und 13,2 krpm zentrifugiert, um die löslichen Bestandteile im Überstand von den unlöslichen Bestandteilen im Bakterienpellet zu trennen. Von dem entstandenen Überstand wurden 20 µl abgenommen und mit der gleichen Menge 2 x Tris/Tricin-Gel-Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Der Rest der Überstände wurde verworfen und das verbleibende Pellet wiederum in 500 µl des oben genannten Puffers resuspendiert und 20 µl davon mit der gleichen Menge 2 x Tris/Tricin-Gel-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben eine Tris/Tricin-PAGE durchgeführt.

### Löslichkeitstest

Mit den aus dem letzten Expressionstest erhaltenen Aliquots (Induktion mit 0,75 mM IPTG bei OD<sub>600</sub>= 2,5, Expression 2 h bei 160 rpm) wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt. Der beim Zellaufschluss verwendete Grundpuffer bestand erneut aus 50 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 150 mM NaCl und 1 mM PMSF. Zusätzlich wurde dieser Puffer mit 1 % [v/v] Triton X-100, 1 % [w/v] CHAPS oder 1 % [v/v] Nonidet-P40 versetzt. Anschließend wurden die Zellen, wie oben beschrieben, aufgeschlossen und SDS-Proben der Überstände und der Pellets erzeugt, um analysieren zu können, ob die verwendeten Detergenzien in der Lage sind, das unlösliche Protein im Pellet zu lösen. Dabei wurde der

restliche Überstand nicht verworfen sondern jeweils mit 5 µl SUMO-Protease für 18 h bei 4 °C inkubiert um auch die Proteaseaktivität unter Detergenseinfluss nachweisen zu können.

### Expressionstest in minimalen Phosphatmedien

Für die Expressionstests in Phosphatmedium wurden die transformierten *E. coli* C43 DE3 im Autoinduktionsmedium <sup>14</sup>N-5052 und (2.1.4) und zum Vergleich auch in M9-Medium (Induktion mit 0,25 mM IPTG bei OD<sub>600</sub> = 1,0) bei einer Temperatur von 20 °C bzw. 37 °C und bei 160 rpm schüttelnd kultiviert [105]. Es wurden nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h für das Autoinduktionsmedium und 2 h und 18 h Stunden nach Induktion für das M9-Medium Proben abgenommen und wie bereits unter „Expressionstests“ beschrieben, die erhaltenen Bakterienpellets aufgeschlossen und zur Analyse des Expressionstest SDS-Proben generiert.

In einem weiteren Expressionstest wurden unterschiedliche Beimpfungsmöglichkeiten in Medium P (2.1.4) getestet. Marley *et al.* [109] beschreiben eine Verbesserung der Ausbeute von Isotopenmarkiertem rekombinanten Protein durch Nutzung einer Vorkultur in Vollmedium (OD<sub>600</sub> = 0,8-1) die dann in nur einem Viertel des Volumens minimalem Phosphatmediums inokuliert wird.

Es wurden also zum Vergleich Kulturen direkt mit 1 % [v/v] einer transformierten *E. coli* C43 DE3-ÜN-Kultur beimpft, bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bei einer OD<sub>600</sub> = 2,2 mit 0,75 mM IPTG induziert und wie bereits beschrieben nach 2 h, 4 h und 18 h Proben abgenommen. Für die zweite Gruppe an Kulturen wurde eine Kultur transformierter *E. coli* C43 DE3 in LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,95 kultiviert und bei 21 °C 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das resultierende Bakterienpellet wurde in einem Viertel des Volumens der ursprünglichen Kultur in Medium P inokuliert und nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C und 180 rpm mit 0,75 mM IPTG induziert. Es wurden 2 h, 4 h und 18 h nach Induktion wie beschrieben Proben abgenommen und SDS-Proben generiert.

### Expression des Fusionsproteins

Die Expression des mit einem N-terminalen 5x Histidin-*tag* versehenen SUMO-Cecropin P1-Fusionsproteins wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Frisch transformierte *E. coli* C43 DE3 wurden ÜN in LB-Medium kultiviert. Mit 1-2 % [v/v] dieser Kultur wurden vier 5 l Kolben (je 1 l LB-Medium mit 35 µg/ml Kanamycin) beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 2,5 bei 37 °C und 160 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Expression mit 0,75 mM IPTG induziert und die Zellen nach 2 h Expression bei 6000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden anschließend in Bindepuffer (2.1.3) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Die Expression des <sup>15</sup>N-markierten Fusionsproteins wurde wie folgt durchgeführt: vier 5 l Kolben mit je 1 l LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) wurden mit 1-2 % [v/v] einer ÜN-Kultur bestehend aus frisch transformierten *E. coli* C43 DE3 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2,5-3,0 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen bei 25 °C und 5000 rpm für 15 min zentrifugiert und die resultierenden Bakterienpellets vorsichtig in je 1 l Medium P (5 l Schikanekolben, 50 µg/ml Kanamycin) inokuliert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 130 rpm wurde die Expression mit 0,75 mM IPTG induziert und die Bakterienkulturen nach 4 h der Expression bei 4 °C und 6000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die resultierenden Bakterienpellets wurden in Bindepuffer (2.1.3) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 MIC-Test

Der hier durchgeführte MIC-Test, dient der Ermittlung einer minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) von antimikrobiellen Substanzen. Die MIC ist dabei die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, bei der unter den bestehenden Testbedingungen das sichtbare Bakterienwachstum inhibiert wird. In dieser Arbeit wurde die von Wiegand *et al.* etablierte *Microplate Broth Dilution* Methode zur Ermittlung von MICs genutzt [110]. Dabei handelt es sich um einen Test im 96-Well-Format.

Für die MIC-Tests wurden *E. coli* ML3 (Tabelle 2.2) genutzt, da diese nicht zu den K-12-Stämmen gehören. Somit ist *E. coli* ML3 ein nicht signifikant genetisch veränderter Laborstamm und ähnelt *E. coli*-Wildtyp-Stämmen [111]. Vor Einsatz im MIC-Test wurde die Korrelation zwischen der OD<sub>600</sub> und der Anzahl der Kolonie-formenden Einheiten pro Milliliter (cfu/ml), wie von Wiegand *et. al* [110] beschrieben, ermittelt, um definierte Zellzahlen für die MIC-Tests verwenden zu können.

Der grundsätzliche Aufbau ist Abbildung 2.4 zu entnehmen. Die Peptide wurden, wenn nicht anders erwähnt in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 mit 150 mM NaCl gelöst. Es wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, die den mit der gleichen Methode determinierten MIC-Wert (3 µM) von Cecropin P1 abdeckt [96]. Die verdünnten Peptide wurden 1:10 im MIC eingesetzt, wobei das Endvolumen in den *Wells* 100 µl betrug. Die OD<sub>600</sub> der erstellten ÜN-Kultur von *E. coli*-ML3 wurde gemessen und für den Einsatz in den MICs eine Zellsuspension mit ungefähr 2 x10<sup>6</sup> cfu/ml erstellt.

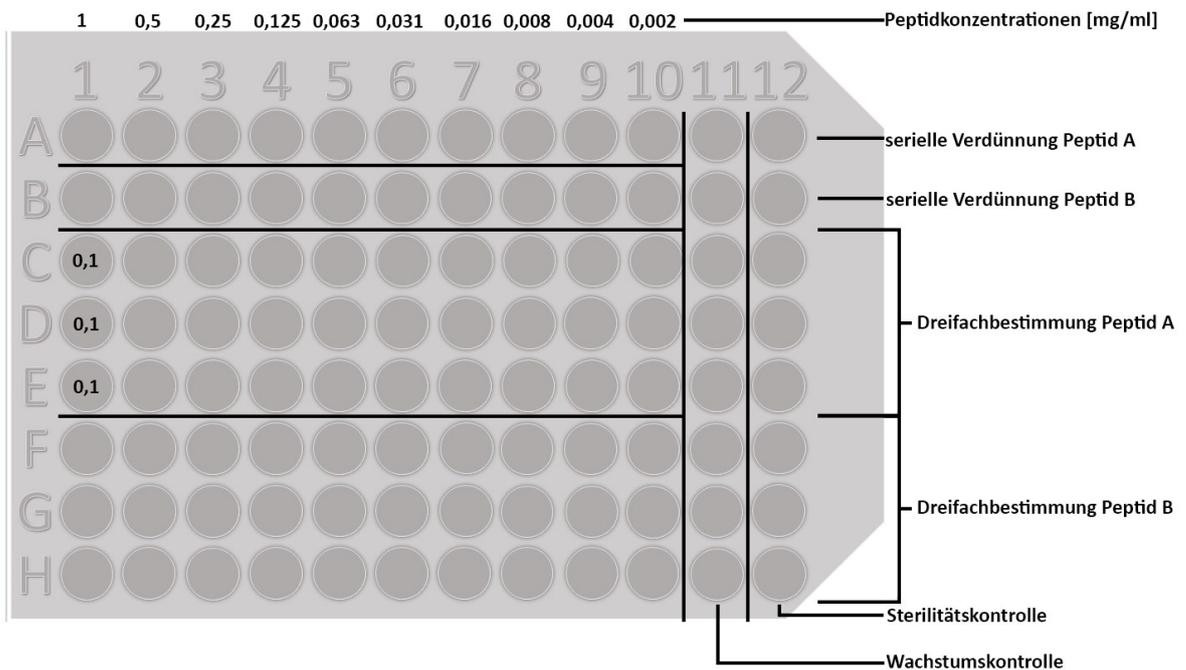


Abbildung 2.4 Aufbau des MIC-Tests

Die Sterilitäts- und Wachstumskontrollen wurden jeweils 1:10 mit dem entsprechenden Lösungsmittel der Peptide versetzt. Die verwendete Zellsuspension wurde 1:100 und 1:1000 in MH-Medium verdünnt und jeweils 100 µl auf MH-Agarplatten ausplattiert, um die verwendete Zellzahl zu überprüfen. Nach Inkubation bei 37 °C für 18 h wurde die OD<sub>600</sub> (*Platereader*) gemessen und der MIC ermittelt. Die gewachsenen Kolonien auf den Agarplatten wurden gezählt und die verwendete Zellzahl

[cfu/ml] berechnet. Die Daten wurden mit Graphpad Prism 5.0 ausgewertet. Es wurden die Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen und den Kontrollen berechnet und Graphen erstellt. Als MIC wurde die geringste Konzentration an Peptid, bei der die OD<sub>600</sub> der Sterilitätskontrolle entsprach, determiniert.

#### 2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht Zellen und intrazelluläre Strukturen mittels Markierung mit Fluorophoren zu visualisieren. Innerhalb dieser Arbeit wurde eine dreifache Färbung mit den Fluorophoren 5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)tetrazolium-chlorid (CTC), 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) und Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) durchgeführt. CTC wurde hierbei genutzt, um metabolisch aktive Mikroorganismen nachzuweisen. DAPI wurde für die Markierung der Bakterien-DNA verwendet. FITC kann hingegen nur intrazellulär vorliegen, wenn die Membranen der Bakterien bereits vorgeschädigt und somit permeabler sind [112].

#### Herstellung der Präparate

Die Präparate wurden wie von Mangoni *et al.* [112], [113] beschrieben vorbereitet. *E. coli* ML3 in 20 ml MH-Medium (Tabelle 2.2) wurden ÜN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 3000 rpm und 27 °C zentrifugiert und in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (NaPP) resuspendiert. Nach zweifacher Wiederholung dieses Waschschrattes wurde die OD<sub>600</sub> gemessen und die Zellsuspension mit Hilfe von NaPP auf  $2 \times 10^8$  cfu/ml eingestellt. Jeweils 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Peptidlösung in NaPP versetzt und für 1 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Die verwendeten Endkonzentrationen der Peptide sind der Tabelle 2.16 zu entnehmen. Als Kontrollen wurden einmal 50 µl Zellsuspension in 50 µl NaPP und einmal 50 µl mit 50 µl NaPP mit 5 % [v/v] Triton (in Endkonzentration) verwendet.

**Tabelle 2.16 verwendete Peptidkonzentrationen**

Peptid	Konzentration	
	subletal	letal
Wildtyp Cecropin P1	-	250 µg/ml
FITC-ΔS1W2-Peptid	Identische Konzentration, wie die im MIC verwendete Ausgangskonzentration	5 fache Konzentration, wie die im MIC verwendete Ausgangskonzentration (nicht letal)
Δ21-31	100 µg/ml	-
21-27 ALAVAI	1,5 µg/ml	250 µg/ml
21-27 VVLVVL	1,5 µg/ml	250 µg/ml

Nach Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Peptiden wurden den Ansätzen 900 µl einer 5 mM CTC-Lösung in 1 x PBS hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C bei 300 rpm für 90 min. Anschließend wurden die Ansätze auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen in einer 24-Well-Platte gegeben und für 45 min bei 30 °C inkubiert, um die Adhäsion der Bakterienzellen zu

ermöglichen. Danach wurde die CTC-Lösung verworfen und 5 x mit NaPP gewaschen. Die Bakterienzellen wurden dann mit 1 ml (20 µg/ml) DAPI in 1 x PBS für 30 min bei 30 °C inkubiert, anschließend 3 x mit NaPP gewaschen und dann unter den gleichen Bedingungen mit 1 ml FITC (10 µg/ml in 1 x PBS) inkubiert und 5 x gewaschen. Das FITC-ΔS1W2-Peptid wurde nicht mit FITC inkubiert, sondern einfach in NaPP gelassen. Anschließend wurden die Präparate hergestellt. Tropfen von *Mounting* Medium wurden auf Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit der Oberseite nach unten darauf leicht angedrückt. Die fertigen Präparate wurden ÜN bei RT lichtgeschützt getrocknet und dann bei 4 °C gelagert.

## 2.5 Biochemische Methoden

---

### 2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen. Die Agarosekonzentration im Gel beeinflusst die Porengröße und somit die Geschwindigkeit mit der die negativ geladenen DNA-Fragmente bei Anlegen einer konstanten Spannung von der Kathode zur Anode durch das Gel wandern.

Abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden 0,8 %-1,2 %ige [w/v] Gele genutzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer (2.1.3) gelöst und bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht. Dem noch flüssigen Agarosegel wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugefügt. Dieses interkaliert in die später aufgetragenen DNA-Fragmente und ermöglicht eine Visualisierung dieser unter UV-Licht. Das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt und mit den Proben beladen, die vorher mit dem Farbstoff Orange G versetzt wurden. Als Größenreferenz dienten ein 100 bp Marker und ein 1 kb Marker (2.1.2). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Proben mittels UV-Licht visualisiert und mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert. DNA, die zur weiteren Verarbeitung diente, wurde mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel entfernt und nach Herstellerangaben aus dem Gel gelöst und gereinigt (2.3.1).

### 2.5.2 Photometrische Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration

Die DNA- und Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe von Ultraviolet-Absorptionsspektroskopie am Nanodrop (Peqlab) durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde das charakteristische Absorptionsmaximum bei 260 nm genutzt.

Zur Konzentrationsbestimmung der Peptide bzw. der Proteine wurde das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren bei 280 nm gemessen. Mit Hilfe eines anhand der Aminosäurezusammensetzung abgeschätzten Extinktionskoeffizienten (wildtyp-Cecropin P1 = 5500 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>) wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 2.1) bestimmt [114].

$$E_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \times c \times d$$

#### Formel 2.1 Lambert-Beer'sches-Gesetz

$I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichtes [W x m<sup>-2</sup>];  $I_1$  = Intensität des Lichtes nach Probendurchtritt [W x m<sup>-2</sup>];  $\varepsilon_{\lambda}$  = molarer (dekadischer) Extinktionskoeffizient [m<sup>2</sup> x mol<sup>-1</sup>] bei der Wellenlänge  $\lambda$ ;  $C$  = Konzentration der Probe [mol x L<sup>-1</sup>],  $d$  = Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe [m]

### 2.5.3 Zellaufschluss

Die nach der Expression bei -20 °C gelagerten Bakterienpellets wurden bei RT aufgetaut und mit dem Proteaseinhibitor PMSF (EK: 1 mM), 5 mg/ml Lysozym und der entsprechenden Menge einer 1000 x Antifoam-Lösung versetzt. Die Bakteriensuspension wurde für ca. 1 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen auf Eis mittels einer Ultraschallsonde aufgeschlossen (bis 10 x 30 s bei 60 % Intensität). Die aufgeschlossenen Bakterienzellen wurden anschließend bei 4 °C ca. 1 h mit 35000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen, filtriert und zur weiteren Proteinreinigung verwendet.

### 2.5.4 Proteinreinigung

#### His-tag-Affinitätschromatografie

Die Reinigung des Fusionsproteins, bestehend aus dem SUMO-Protein mit N-terminalem 6 x Histidin-tag und Cecropin P1, wurde mittels einer His-tag-IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) durchgeführt. Die Matrix der für die Reinigung verwendeten Säule ist dabei mit einem Ni<sup>2+</sup>-Nitroloessigsäurekomplex versehen. Die Nickel-Ionen sind in der Lage, je zwei Histidinreste zu binden, wodurch nur Proteine mit poly-Histidinsequenzen an der Säulenmatrix gebunden werden. Für die anschließende Elution wird dabei zur Steigerung der Reinheit des Proteins ein Gradient mit dem Eluenten Imidazol verwendet und das zu reinigende Protein aufgefangen.

Das nach dem Zellaufschluss (2.5.3) erhaltene, filtrierte Proteingemisch wurde mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule an der FPLC-Anlage (ÄktaFPLC) gereinigt. Das Protokoll der durchgeführten Reinigung ist Tabelle 2.17 zu entnehmen.

Tabelle 2.17 Protokoll der an der FPLC-Anlage durchgeführten Reinigung

	<b>Puffer</b>	<b>Volumen [ml]</b>	<b>Flussrate [ml/min]</b>
<b>Äquilibration</b>	Bindepuffer	50	2
<b>Auftrag</b>		~ 150 ml	1
<b>Waschschritt I</b>	Bindepuffer	50	2
<b>Waschschritt II</b>	Waschpuffer	50	2
<b>Waschschritt III</b>	Basispuffer	50	2
<b>Elutionsgradient</b>	Basispuffer/Elutionspuffer (0 – 80 %)	50	1
<b>Elution</b>	Elutionspuffer	30	1

Während der Elutionsschritte wurde die eluierte Proteinlösung fraktioniert. Der Reinigungsverlauf wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die das Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden zusammengeführt, konzentriert (Vivaspin 15000 MWCO 20, Sartorius), anschließend in

50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 und 150 mM NaCl umgepuffert und auf 2,5 – 3,0 ml konzentriert.

### Spaltung des Fusionsproteins mit Hilfe der SUMO-Protease

Um reines Cecropin P1 zu erhalten, wurde das Fusionsprotein in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mM DTT und 20 µl SUMO-Protease (5 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation bei 4 °C ÜN wurde die Proteinlösung für 10 min bei 4 °C mit 13 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das geschnittene Protein mittels einer Spritze direkt auf eine äquilibrierte (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0, 150 mM NaCl) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule gegeben und mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe über 50 ml mit dem gleichen Puffer das geschnittene Cecropin P1 eluiert und aufgefangen. Das SUMO-Protein mit dem N-terminalen 6 x His-*tag* bleibt dabei an der Säule gebunden und wurde nach der Elution des Cecropin P1 mit Elutionspuffer (2.1.3) ebenfalls von der Säule eluiert.

Das nun reine Cecropin P1 wurde wiederum konzentriert (Vivaspin 2000 MWCO 15R, Sartorius) und in NMR-Probenpuffer umgepuffert, bis auf ein Volumen von ca. 600 µl konzentriert, lyophilisiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.5.5 Tris/Tricin-PAGE

Durch die Tris/Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Das SDS im Probenpuffer denaturiert die Proteine und verursacht eine einheitliche negative Ladung dieser. So werden sie durch das Anlegen einer Spannung vorwiegend anhand ihrer Größe aufgetrennt. Mit Hilfe standardisierter Marker ist die Größe der in der Probe enthaltenen Proteine bestimmbar (2.1.2). In dieser Arbeit wurden Tris/Tricin-Gele nach Schägger und Jagow [104] verwendet, da diese besonders für die Größenbestimmung kleiner Proteine (< 20 kDa) geeignet sind. Die Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 2.18 zu entnehmen.

**Tabelle 2.18 Zusammensetzung der Tris/Tricin-Gele nach Schägger und Jagow [104]**

	<b>12,5 % Trenngel</b>	<b>10 % Spacer-Gel</b>	<b>6 % Sammelgel</b>
<b>30 % AA/Bis</b>	4,2 ml	1,66 ml	1 ml
<b>Gel-Puffer</b>	3,5 ml	1,75 ml	1,25 ml
<b>Glycerin (86 %)</b>	1,66 ml	-	-
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	0,58 ml	1,56 ml	2,72 ml
<b>10 % APS</b>	50 µl	25 µl	25 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl
<b>Endvolumen</b>	10 ml	5 ml	5 ml

Die Elektrophorese wurde bei RT durchgeführt. Während die Proben durch das Sammelgel wanderten, war eine konstante Spannung von 30 V angelegt. Bei Durchwanderung des *Spacer*-Gels wurde die Spannung auf konstante 70 V erhöht und bei Erreichen des *Trenngel*s nochmal auf konstante 150 V eingestellt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit Entfärber entfärbt, bis Proteine in Form von blauen Banden erkennbar sind.

### 2.5.6 Western Blot

Nach Durchführung einer Tris/Tricin- oder SDS-PAGE kann man die Proteine innerhalb der Gele auf eine Membran transferieren und anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers das Zielprotein nachweisen. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde für 45 min bei 120 mA (konstant) durchgeführt. Danach wurde die Membran für 1 h mit 10 % Milchpulver in PBST (1 x PBS mit 0,05 % Tween) geblockt. Die Membran wurde anschließend mit dem 1. Antikörper (*mouse-anti-His-Antikörper*, Quiagen, Verdünnung 1:2000 in 3 % BSA in PBST) ÜN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit PBST gewaschen und dann mit dem 2. Antikörper (*anti-mouse AK HRP-gekoppelt*, Amersham, Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA in PBST) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut 3 x 5 min mit PBST gewaschen und das Signal mit Hilfe eines ECL-Kits (Amersham) auf Grundlage der Chemilumineszenz detektiert.

### 2.5.7 Analytische Gelfiltration (SEC)

Die Gelfiltration ist eine Größenausschlusschromatografie. Die Poren der verwendeten Säulenmatrix besitzen eine homogene, definierte Größe. Größere Proteine können dadurch schneller durch die Säulenmatrix wandern als kleine Proteine, die in die Säulenmatrix diffundieren können und somit länger benötigen, um die Säule zu durchwandern.

Die analytische SEC wurde mit einer Superdex Peptide (30 pg) 10/300 GL (GE Healthcare) an der ÄktaFPLC-Anlage bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurde ein 50 µl-Probenschlauch verwendet und über 35 ml mit 0,5 ml/min eluiert. Alle Durchläufe wurden im identischen Gelfiltrationspuffer (Kapitel 2.1.3) durchgeführt. Zunächst wurde ein Kalibrierungslauf mit Proteinen bzw. Substanzen bekannter Größe durchgeführt (Tabelle 2.19). Anschließend wurde sowohl synthetisches als auch rekombinantes Cecropin P1 in unterschiedlichen Konzentrationen unter den gleichen Bedingungen eingesetzt.

**Tabelle 2.19 Für die Kalibrierung genutzte Substanzen**

<b>Protein</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>	<b>Größe [kDa]</b>
Lysozym	20	14,6
Aprotinin	3	6,5
Vitamin B <sub>12</sub>	10	1,9
Tryptophan	10	0,2

### 2.5.8 Lipidpräparationen

Große unilamellare Vesikel (engl. *large unilamellar vesicles*, LUV)

Für die LUV-Präparation wurden die Lipide 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol), kurz POPG, und 1-Hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, kurz POPE, benutzt. Dabei wurden die Lipide POPE:POPG im Verhältnis 80:20 eingesetzt, welches Morein *et al.* [115] als das natürliche Verhältnis in Wildtyp-*E. coli* beschreiben. Die Lipide wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 gelöst und 4 x im Wechsel mit Flüssigstickstoff schockgefroren und für 5 min bei 40 °C bei 400 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz

für 7 min bei 14200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen und für die Circular dichroismus-Messungen (2.6.2) genutzt.

## Bizellen

Für die Präparation von Bizellen wurde ein gefriergetrocknetes Gemisch (Avanti Polar Lipids) von 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) und 1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DHPC) mit einem molaren Verhältnis von 3,25:1 verwendet. Diese wurden in Wasser mit 10 % D<sub>2</sub>O gelöst und mehrfach mit Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend 5 min bei 38 °C inkubiert. Anschließend wurde gefriergetrocknetes Cecropin P1 in 600 µl der Bizellpräparation gelöst.

## 2.6 Biophysikalische Methoden

---

### 2.6.1 MALDI-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Peptide und Proteine wurde an einem Autoflex *speed* MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Die Proben wurden mittels Supel-Tips C18 (Sigma-Aldrich, Seelze) entsalzt und mit 2 µl eines 50:50-Gemisches (v/v) aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) (in Wasser) eluiert. Anschließend wurde das eluierte Protein in einem Verhältnis von 1:1:1 (v/v) mit 2 % TFA (in Wasser) und Matrixlösung gemischt. Die Matrixlösung wurde hergestellt, indem 7,6 mg 2',5'-Dihydroxyacetophenon in 375 µl analytischem Ethanol so weit wie möglich gelöst und 125 µl einer 18 mg/ml-Lösung von Di-Ammoniumhydrogencitrat (in Wasser) hinzugefügt wurden. 0,5 µl des 1:1:1-Gemisches wurden auf eine MTP 384 *ground steel Target*-Platte (Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen. Die aufgetragene Probe wurde bei RT getrocknet (*Dried droplet* Methode). Anschließend wurden die Proben auf der Target-Platte mit dem Massenspektrometer mit Methoden aus der Bruker Standardbibliothek untersucht.

### 2.6.2 CD-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie wird zirkular polarisiertes Licht verwendet. Dieses Licht ist in der Lage mit chiralen Molekülen, wie Proteinen, zu interagieren. Es wird abwechselnd die gleiche Menge an rechts und links zirkular polarisiertem Licht auf eine Proteinprobe eingestrahlt. Die Differenz in der Wellenlängen-abhängigen Absorption ist hierbei der sogenannte Circular dichroismus und ergibt ein charakteristisches CD-Spektrum, welches Aussagen über die Sekundärstrukturen innerhalb einer Proteinprobe zulässt.

Alle Messungen wurden am J-715 (Jasco) mit synthetischem Cecropin P1 in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 bei 37 °C durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Für alle Messungen wurde eine Absorptionsküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm verwendet (Hellma Analytics, Müllheim). Von den erhaltenen Spektren wurde das gemessene Spektrum des Puffers abgezogen. Die Messparameter für die unterschiedlichen Experimente sind Tabelle 2.20 zu entnehmen.

Tabelle 2.20 Verwendete Parameter für die CD-Spektrometrie

Experiment	Proteinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	<i>data pitch</i> [nm]	Datenpunkte	Verzögerung [s]	Bandbreite [nm]	Wellenlängenbereich [nm]
Titration mit LUV	65,17	0,1	701	1	1,0	260-190
Titration mit SDS	32,59	0,1	701	1	1,0	260-190
Konzentrationsabhängigkeit	5; 10; 20; 30; 40; 50; 60	0,1	701	1	1,0	260-190
Temperaturabhängigkeit	60	0,1	601	1	1,0	260-200

### 2.6.3 NMR-Spektroskopie

Kernmagnetische Resonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) tritt bei Atomkernen mit einem Eigendrehimpuls (Kernspin  $\neq 0$ ) auf, während sie innerhalb eines statischen Magnetfeldes einem Radiofrequenzpuls (RF-Puls) ausgesetzt sind. Wenn der RF-Puls die Rotationsfrequenz der Kernspins trifft, kommt es zur Resonanz, was eine veränderte Ausrichtung des Eigendrehimpulses zur Folge hat. Die dabei absorbierte Energie wird über Relaxationsprozesse wieder abgegeben, sodass das System in den energieärmeren Zustand der Gleichgewichtsmagnetisierung zurückfällt. Diese Änderungen lassen sich mit geeigneter instrumenteller Anordnung messen. Die gemessenen Signale sind abhängig von der chemischen Umgebung der Atomkerne und der Atomtypen innerhalb der gemessenen Probe. Mit den Informationen, die man aus den unterschiedlichen NMR-Experimenten erhält, ist es möglich innerhalb eines Proteins kovalent verknüpfte Atome zu identifizieren und auch ihre geometrische Anordnung zueinander zu analysieren. Auch räumlich benachbarte nicht kovalent miteinander verknüpfte Atome können über dipolare Wechselwirkungen (Kern-Overhauser Effekte) identifiziert werden.

#### Probenvorbereitung

Für die Aufnahme von homonuklearen 2D-Spektren  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC wurde synthetisches Cecropin P1 in Konzentrationen von 1-4 mM in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6 verwendet. Für die heteronuklearen 2D- und 3D-Spektren wurde rekombinantes  $^{15}\text{N}$ -markiertes Cecropin P1 in Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  bis 1 mM in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 genutzt. Alle Proben (Endvolumen 600  $\mu\text{l}$ ) wurden mit 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  und 1  $\mu\text{l}$  30 mM DSS als internen Standard versetzt.

#### Messbedingungen

Die Messungen wurden an einem Bruker Ultrashield 700-NMR-Spektrometer (Bruker, Biospin) bei einer Protonenfrequenz von 700 MHz durchgeführt. Als Probenkopf wurde ein inverser Triple-Resonanz-Cryo-Probenkopf (700 MHz) mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen in alle drei Raumrichtungen verwendet. Die Temperatur wurde bei den Messungen über eine BVT3000-Kontrolleinheit (Bruker, Biospin) gesteuert. Das den Proben zugesetzte  $\text{D}_2\text{O}$  diente als interner Feldfrequenz-Lock. Alle verwendeten Pulsprogramme wurden der Bruker Standardbibliothek entnom-

men, sofern nicht anders angegeben. Tabelle 2.21 stellt alle durchgeführten NMR-Experimente mit Pulsprogrammen und wichtigen Parametern dar. Alle Spektren wurden bei 35 °C aufgenommen, sofern nicht anders angegeben.

**Tabelle 2.21** Verwendete Parameter für die verwendeten NMR-Spektren

<sup>1</sup>number of scans, <sup>2</sup>sweep width, <sup>3</sup>size of FID

Experiment (Pulsprogramm)	F1		F2		F3		Ref.	
	NS <sup>1</sup>	SW <sup>2</sup> (Hz)	TD <sub>3</sub>	SW (Hz)	TD	SW		TD
<sup>1</sup> H (zgpr)				-	-	-	-	
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY (cosygpprqf)	64	10504,189	512	10504,202	2048	-	-	[116]
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY (dipsi2etgpsi19)	128	11203,597	512	11160,714	2048	-	-	[117]; [118]; [119],
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY (noesygpph19)	128	10504,189	512	10504,202	2048	-	-	[117]; [119]; [120]
<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC (hsqcetf3gpsi)	4	2838,433	256	11261,262	2048	-	-	[121]; [122]; [123]
<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-SOFAST-HMQC (sfhmqcf3gpph)	800	2412,668	256	9803,922	1024	-	-	[124]
<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC-TOCSY (dipsihsqcf3gpsi3d)	16	9102,903	128	1986,903	80	9090,909	2048	[121]

## Relaxations- und Dynamikmessungen

Wenn die angeregten Kernspins in den Gleichgewichtszustand zurückkehren, spricht man von Relaxation. Dabei unterscheidet man zwei Arten der Relaxation. Die longitudinale Relaxation erfolgt in Richtung des Hauptmagnetfeldes. Die longitudinale Relaxationszeitkonstante  $T_1$  gibt die Zeit an, die gebraucht wird um 63 % der Energie des Grundzustandes nach Anregung zu erreichen. Die transversale Relaxation beschreibt die zeitlich abnehmende Phasenkohärenz der Spins. Bei diesem Prozess wird die Energie zwischen benachbarten Kernen ausgetauscht und nicht an die Umgebung abgegeben. Die transversale Relaxationszeitkonstante  $T_2$  nimmt mit höherer Anzahl an Protonen ab, da diese über dipolare Wechselwirkungen miteinander interagieren. Die Rückkehr in den Gleichgewichtszustand erfolgt so, dass sich beide Relaxationsprozesse über exponentielle Gesetze beschreiben lassen (Formel 2.2) [125]. Das Verhältnis von  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeitkonstante kann mit dem Molekulargewicht der Moleküle in der Probe korreliert werden. Dies wird über die Berechnung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  bestimmt (Formel 2.3). Die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  beschreibt dabei die Rotationsdiffusion von Partikeln in Lösung. Dabei handelt es sich um eine Zeitkonstante, die die Dauer beschreibt, die ein Partikel benötigt, um um ein Bogenmaß zu rotieren. Somit ist die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  von der Partikelgröße abhängig.

$$I = I_0 \times e^{-\frac{\tau}{T}}$$

**Formel 2.2 Signal-Intensitäten in Abhängigkeit von der für die Relaxation verwendeten Zeiten ( $\tau$ )**

$I$  = Intensität;  $I_0$  = Intensität im Grundzustand;  $\tau$  = Relaxationszeit in ms;  $T = T_1$  bzw.  $T_2$

$$\tau_c = \frac{1}{4 \times \pi \times \nu_N} \times \sqrt{6 \times \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

**Formel 2.3 Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$**

$\nu_N$  = Resonanzfrequenz von  $^{15}\text{N}$  [Hz] die bei 700 MHz (entspricht 16,44 T)  $70,971 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  beträgt

Zur weiteren Charakterisierung der Dynamik von Cecropin P1 wurde ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCNOE (Tabelle 2.23) aufgenommen, welches nach dem Prozessieren zwei Spektren ergibt. Die Signalintensität der gemessenen NOEs ist abhängig von den Bewegungen des jeweiligen detektierten  $\text{H}_\text{N}$ -Bindungsvektors. Beeinflusst wird der NOE von der Gesamtrotation des Peptides, welches als starre Kugel angenommen wird und auch durch lokale Fluktuationsbewegungen. Dabei enthält der erhaltene NOE alle Bewegungsmöglichkeiten, die die dipolaren Kopplungen im ns-Bereich beeinflussen. Die zwei resultierenden Spektren aus dieser Messung enthalten sowohl nur positive ( $I_{\text{eq}}$ ) als auch positive und negative Signale ( $I_{\text{sat}}$ ). Berechnet wird der hetNOE über den Quotienten aus  $I_{\text{sat}}$  und  $I_{\text{eq}}$  (Formel 2.4).

$$\eta = I_{\text{sat}}/I_{\text{eq}}$$

**Formel 2.4 heteronuklearer NOE ( $\eta$ )**

Die Relaxations- und Dynamikmessungen wurden für die bessere Vergleichbarkeit mit Literaturwerten bei 25 °C durchgeführt. Dafür wurde 1,5 mM  $^{15}\text{N}$ -Cecropin P1 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,6 verwendet. Für die Ermittlung der  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeitkonstanten wurde bei den Messungen die Zeit  $\tau$  [ms] zwischen den Pulsen variiert, um den angeregten Kernen zu ermöglichen, in den Grundzustand zurückzukehren. Die verwendeten Zeiten sind der Tabelle 2.22 zu entnehmen.

**Tabelle 2.22 Verwendete Zeiten ( $\tau$ ) für die Relaxation**

	$\tau$ [ms]
$T_1$	20, 100, 150, 200, 300, 500, 750, 1000, 1400
$T_2$	10, 30, 50, 90, 130, 170, 210, 250

Die bei den Messungen der Dynamik verwendeten Pulsprogramme und Parameter sind der Tabelle 2.23 zu entnehmen.

**Tabelle 2.23 Verwendete Parameter für die Dynamik-Messungen**

Experiment (Pulsprogramm)	F1		F2		Referenz	
	NS	SW [Hz]	TD	SW [Hz]		TD
$T_1$ -Zeiten (hsqct1etf3gpsi.2)	8	1986,909	128	9090,909	2048	
$T_2$ -Zeiten (hsqct2etf3gpsi)	8	1986,909	128	9090,909	2048	
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCNOE (hsqcnoef3gpsi)	52	1986,909	256	9090,909	2048	[126], [127]

## Prozessieren der Spektren

Für die Aufnahme und das Prozessieren der Spektren wurde das Programm Topspin 3.0 (Bruker Biospin) verwendet. Die FIDs (*free induction decays*) wurden vor der Fourier-Transformation in F2 auf eine Menge von 4096 Datenpunkten aufgefüllt (*zero filling*), um die digitale Auflösung zu verbessern. Als Filterfunktionen wurden  $\pi/4$ - bis  $\pi/2$ -verschobene Sinus- oder Sinusquadratfunktionen verwendet [128]. Die Basislinienkorrektur wurde standardmäßig mit den in Topspin 3.0 implementierten *abs*-Befehl, im Falle von 2D-Spektren, und dem *tabs*-Befehl, im Falle von 3D-Spektren, durchgeführt. Die alternierend aufgenommenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCNOE-Spektren wurden durch den *split 2* geteilt und ebenfalls prozessiert und die Basislinie korrigiert.

## Auswertung der Spektren

### Strukturaufklärung

Die Zuordnung aller Protonen des Peptid-Rückgrats und der Seitenketten mittels des *Chaintracing*-Verfahrens [129] erfolgte mit Hilfe von  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY- und  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektren (Tabelle 2.21). Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-TOCSY wurde unterstützend genutzt, um die Zuordnung des  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSYs durch eine zusätzliche Dimension zu erleichtern. Die Signale im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY wurden als Eingabedaten für Cyana 2.1 verwendet, welches die Strukturrechnung mit dem automatischen NOE-Assignment kombiniert. Cyana behandelt dabei das Peptid als eine Reihe von Festkörpern, welche über drehbare Verbindungen verknüpft sind. Dabei werden die Torsionswinkel der drehbaren Verbindungen dokumentiert. Die Abbildung 2.5 bietet einen Überblick über die Funktionsweise von Cyana.

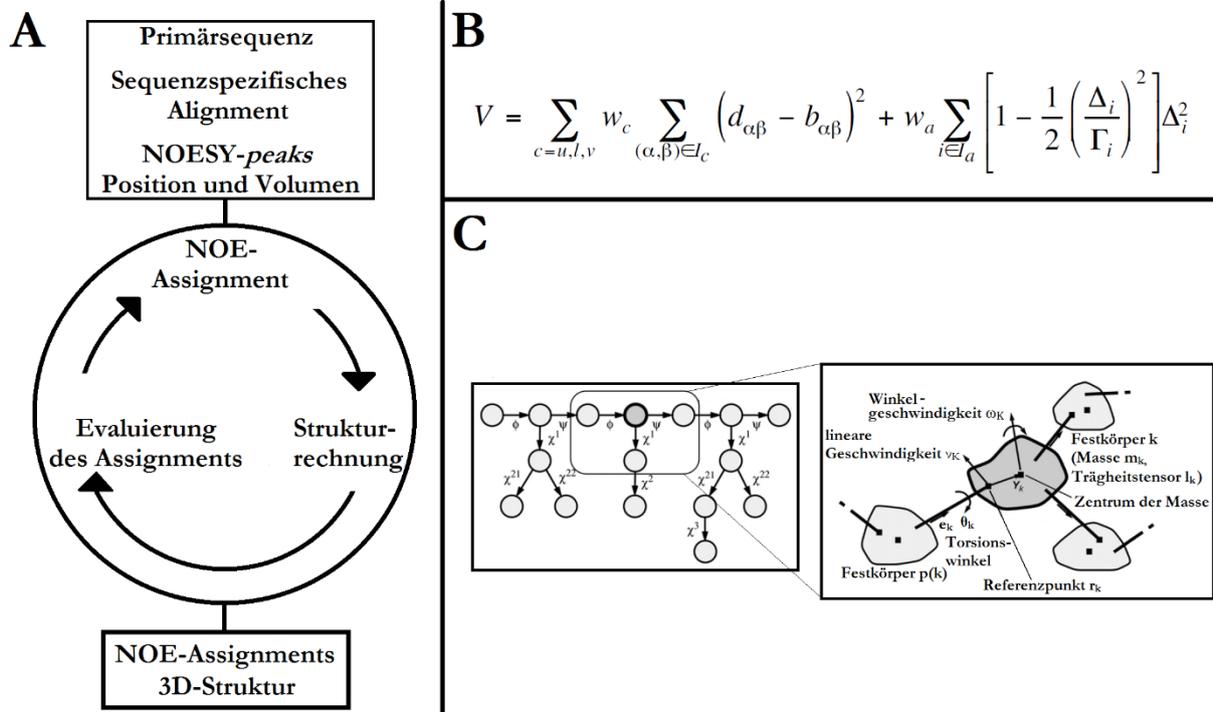


Abbildung 2.5 Cyana 3.0 nach [130, 131]

**A:** Schema der Funktionsweise von Cyana 3.0. Das NOE-Assignment ist an die Strukturrechnung gekoppelt und durchläuft mehrere (meist 7) Zyklen. **B:** Cyana-Zielfunktion. Es wurden obere und untere Grenzen,  $b_{\alpha\beta}$ , für die Distanzen  $d_{\alpha\beta}$  zwischen zwei Atomen  $\alpha$  und  $\beta$  und constraints  $\theta_i$  in Form erlaubter Intervalle  $[\theta_{\text{imin}}, \theta_{\text{imax}}]$  angenommen.  $I_u$ ,  $I_l$ , and  $I_v$  stellen eine Reihe von Atompaaaren  $(\alpha, \beta)$  mit oberen, unteren oder von der Waals-Distanzbegrenzungen dar.  $I_a$

ist eine Reihe von Torsionswinkel-restraints.  $w_u$ ,  $w_l$ ,  $w_v$ , und  $w_a$  sind die Wichtungsfaktoren für die verschiedenen constraints.  $\Gamma_i = \pi - (\theta_{i\max} - \theta_{i\min})/2$  benennt die halbe verbotene Spannweite der Torsionswinkel-restraints und  $\Delta_i$  ist die Größe der Torsionswinkel-constraint-Verletzung. **C:** Schematische Darstellung der verschiedenen Teilnehmer in Strukturberechnungen mittels Torsionswinkel. Abbildung nach [130, 131].

## Relaxations- und Dynamikmessungen

Die Signale der Spektren aus den Relaxationsmessungen wurden mit Hilfe eines vollständig zugeordneten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums entsprechend identifiziert. Aus den Signalintensitäten wurden mit Hilfe von CCPN (Tabelle 2.7) und der Formel 2.2 die jeweiligen Relaxationszeiten berechnet. Die erhaltenen Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  je Aminosäure wurden über die Peptidsequenz gemittelt und anschließend für die Berechnung der Rotationskorrelationszeit (Formel 2.3) verwendet. Die zwei durch das Prozessieren erhaltenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCNOE-Spektren wurden ebenfalls mit Hilfe eines vollständig zugeordneten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums von Cecropin P1 identifiziert, die Intensitäten mit Hilfe von CCPN bestimmt und der hetNOE für die einzelnen Aminosäuren berechnet (Formel 2.4).

### 3. Ergebnisse

---

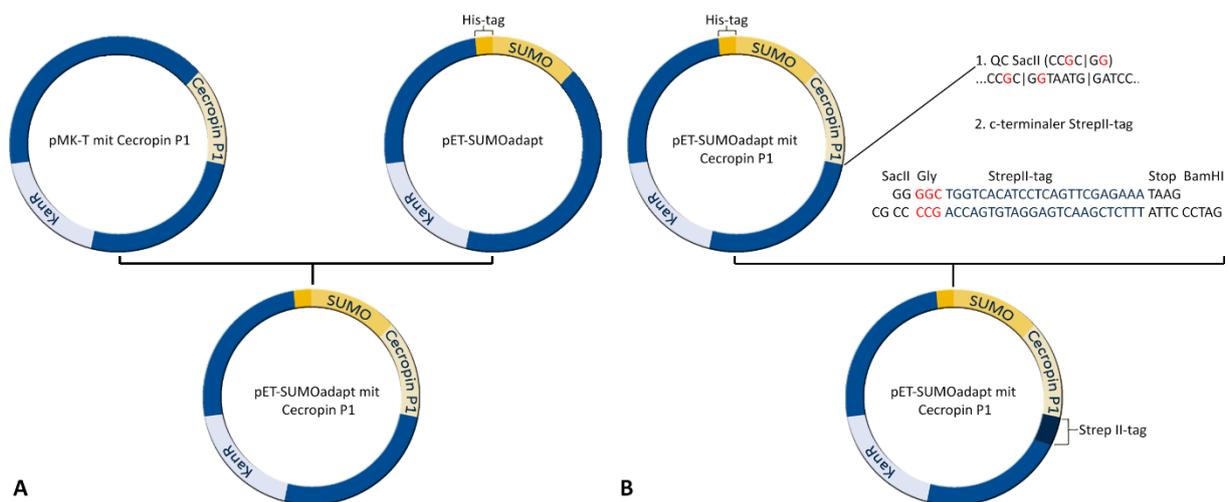
Die strukturelle Charakterisierung von Cecropin P1, die Analyse der Dynamik und auch die Untersuchungen zur Interaktion mit unterschiedlichen Membran-ähnlichen Systemen mittels NMR-Spektroskopie erforderten die Synthese von  $^{15}\text{N}$ -Isotopenangereichertem Cecropin P1. Dafür wurde das Cecropin P1 codierende Gen in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend die Expression des Proteins in *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen analysiert und optimiert. Die NMR-Spektroskopie erfordert außerdem eine hohe Reinheit des zu untersuchenden Proteins. Nach der Optimierung der Expression wurde die Reinigung des exprimierten Fusionsproteins, bestehend aus N-terminalem His-*tag*, SUMO-Protein und Cecropin P1 etabliert, um reines Peptid mit nativer Aminosäuresequenz zu erhalten.

#### 3.1 Klonierung von Cecropin P1

---

Für die rekombinante Expression in *E. coli* wurde zunächst das für Cecropin P1 codierende Gen in einen Expressionsvektor mit T7-Promotor kloniert. Dazu wurde das von der Firma *GeneArt* erhaltene Gen (geliefert im pMK-T Vektor), welches für Cecropin P1 codiert, amplifiziert (Abbildung A 1), geschnitten (BsaI/BamHI) und in einen pET-SUMOadapt-Vektor mit N-terminalem Histidin-*tag* und SUMO-Fusionsprotein kloniert (Abbildung 3.1 A). Dieses Fusionsprotein hat den Vorteil, dass es mit Hilfe der SUMO-Protease Ulp1 spezifisch geschnitten werden kann und man letztendlich natives Cecropin P1 erhält. Die durch die Ligation erhaltenen Klone wurden anschließend durch die Firma Metabion sequenziert (Anhang, Sequenzierungen) und ein korrekter Klon in Form einer bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Glycerin gelagerten *E. coli*-Kultur und in Form von gereinigter Plasmid-DNA konserviert.

Da das Protein Cecropin P1 potentiell sehr toxisch für *E. coli* ist, wurde ein weiteres Konstrukt generiert, um zusätzlich zum N-Terminus auch den C-Terminus bei der Expression mit einem Strep-*tag* zu maskieren. Dazu wurde zunächst in das bestehende Konstrukt aus dem Cecropin P1-Gen und pET-SUMOadapt-Vektor mittels zielgerichteter Mutagenese eine SacII-Schnittstelle am 3'-Ende des Cecropin P1-Gens eingefügt. Anschließend war es möglich die mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase hybridisierten Oligonukleotide (Kapitel 2.3.5), welche für den StrepII-*tag* codieren, über die SacII- und BamHI-Schnittstellen einzufügen (Abbildung 3.1 B). Dieser StrepII-*tag* kann nach Expression und Reinigung durch Thrombin vom Cecropin P1 abgespalten werden, sodass nach Verdau mit SUMO-Protease und anschließendem Verdau mit Thrombin natives Cecropin P1 vorliegt.



**Abbildung 3.1 Klonierstrategie für die Cecropin P1 Konstrukte**

**A** zeigt das generierte Konstrukt (pET-SUMOadapt mit Cecropin P1, unten) aus dem Cecropin P1-Gen in einem pMK-T-Vektor (Mr. Gene, oben links) und dem pET-SUMOadapt-Vektor (oben rechts). Beide Vektoren besitzen ein Kanamycin-Resistenzgen (KanR). **B** In das erhaltene Konstrukt wurde anschließend eine SacII-Schnittstelle eingeföhrt. Die mutierten Basen sind dabei rot gefärbt. Dann konnten die hybridisierten Oligonukleotide, welche für den Strep-tag codieren via SacII und BamHI eingeföhrt werden. Der für den Strep-tag codierende Bereich ist blau gefärbt. Zwischen der SacII-Schnittstelle und der StrepII-tag codierenden Sequenz wurde noch das für Glycin codierende Basentriplet (rot) eingeföhrt um ein späteres Schneiden des exprimierten Fusionsproteins mit Thrombin zu erleichtern.

### 3.2 Expression und Reinigung von Cecropin P1

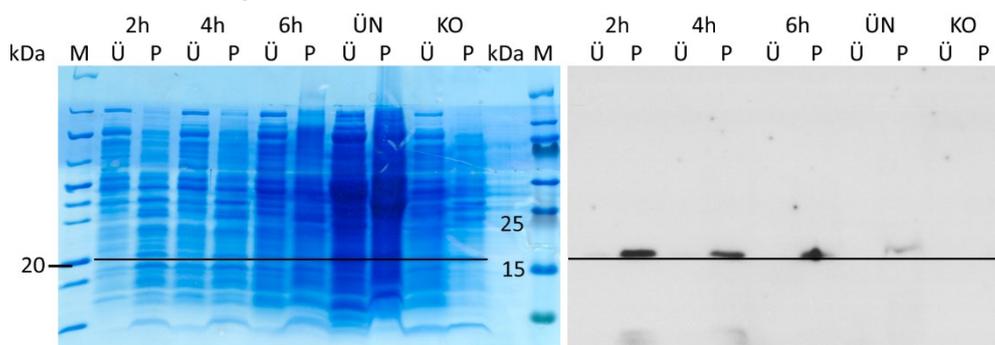
Nach der erfolgreichen Klonierung der für Cecropin P1 codierenden Plasmide, sollte das Fusionsprotein bestehend aus SUMO und Cecropin P1 exprimiert und gereinigt werden.

Trotz der zu erwartenden Toxizität des Proteins, war es vorteilhaft dieses in *E. coli* zu exprimieren. Zum einen wird <sup>15</sup>N-markiertes Protein für die NMR-Spektroskopie benötigt, welches relativ kostengünstig zurzeit nur in *E. coli* hergestellt werden kann. Auch die zu erwartenden Ausbeuten sind im Vergleich zu anderen genutzten Expressionssystemen wie Hefe- oder Insektenzellen hoch. Die Toxizität der Konstrukte sollte hierbei durch die N-terminale bzw. N- und C-terminale Maskierung durch das SUMO-Protein bzw. den Strep-tag möglichst reduziert werden. Für die Expression von Cecropin P1 wurden zunächst die Expressionsbedingungen in Vollmedium und auch in Phosphatmedium mit <sup>15</sup>N-angereichertem Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle getestet und optimiert.

#### 3.2.1 Optimierung der Expressionsbedingungen für das Histidin-tag-SUMO-Cecropin P1

Zunächst wurden die optimalen Expressionsbedingungen für das Konstrukt His-SUMO-Cecropin P1 ermittelt. Es wurden zunächst die laborinternen Standardparameter (Expressionsdauer, Temperatur, Medium) variiert. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch ein Tris/Tricin-Gel nach Induktion der Expression des Histidin-tag-SUMO-Cecropin P1 Konstruktes in *E. coli* BL21 durch 0,5 mM IPTG. Auf dem Tris/Tricin-Gel konnte die Expression nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Mittels eines Westernblots (Kapitel 2.5.6), konnte aber eine schwache Proteinexpression nachgewiesen werden (Belichtungszeit 1h). Das Protein ist dabei immer im Pellet lokalisiert und das Signal ist nach 2 h der Expression am stärksten und nimmt über die Expressionsdauer ab. Zusätzlich konnte schon vor Induktion der Expression mit IPTG ein stark verlangsamtes Wachstum (OD<sub>600</sub> = 0,3 2,5 h nach Animpfen mit 2 % einer ÜN-Kultur) der *E. coli*-Kulturen beobachtet werden.

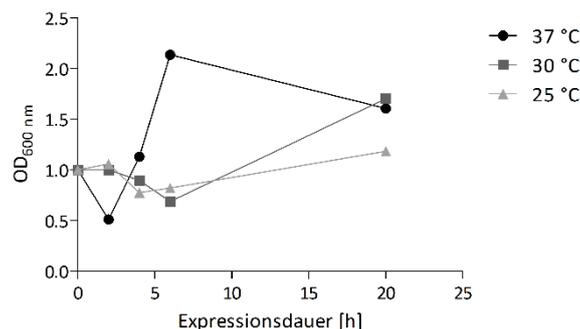
Die Zelldichte wurde während des Versuchs bei Entnahme der Proben mittels UV-Spektroskopie bei 600 nm bestimmt (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.2 Proteinnachweis nach Expression in *E. coli* BL21 bei 37 °C**

Links ist das Tris/Tricin-Gel zum Expressionstest abgebildet. Als Größenmarker (M) wurde der PRuBR (links) und der PRp<sup>+</sup> (rechts) von Thermo Scientific verwendet. Als Negativkontrolle (KO) diente *E. coli*-Lysat aus einer nicht mit IPTG stimulierten Probe. Um eine Aussage über die Löslichkeit treffen zu können, wurden jeweils Proben des Überstandes (Ü) und des Pellets (P) aufgetragen. Es ist keine Proteinexpression erkennbar. Rechts ist der dazugehörige Western Blot (1. AK: 1:2000 anti-His-tag, 2. AK: 1:1000 anti-mouseHRP) abgebildet. Bei einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa des Fusionsproteins, liegt die entsprechende Bande laut Western Blot kurz über der 20 kDa-Bande des PRuBR-Markers.

Die Zelldichte nimmt nach Induktion der Expression ( $t = 0$  h Expressionsdauer) bei allen drei getesteten Temperaturen ab und dann wieder zu. Der Effekt ist am deutlichsten im Falle der Expression bei 37 °C erkennbar. Schon nach 2 h hat sich die Zelldichte um die Hälfte verringert, was der generellen Proteinausbeute abträglich ist und auf eine Toxizität des exprimierten Proteins hindeutet.

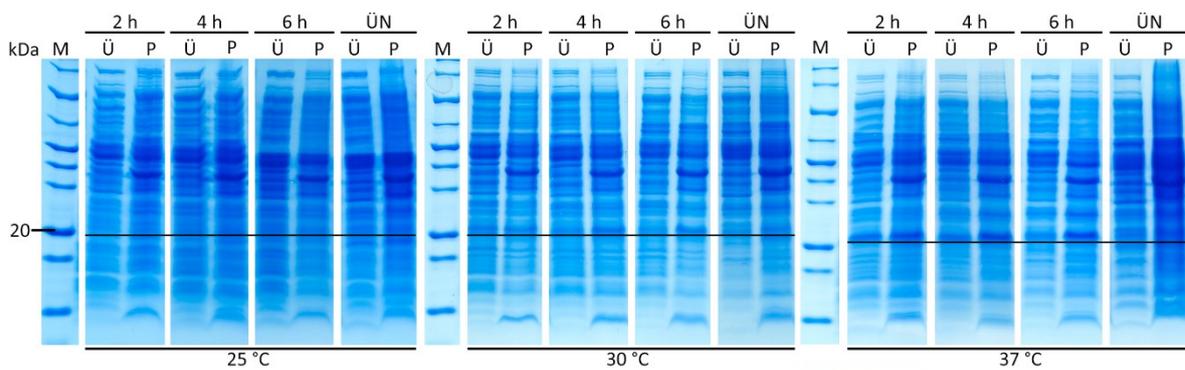


**Abbildung 3.3 Zelldichten während der Expression in *E. coli* BL21**

Die Zelldichten sinken tendenziell bei allen Temperaturen nach Induktion der Expression mit IPTG um dann relativ langsam anzusteigen. Bei der Expression bei 37 °C ist dieser Effekt am stärksten zu beobachten. Die Zelldichten bei Expression bei 30 °C und 25 °C verlaufen ähnlich.

Die unter den getesteten Bedingungen nachgewiesene Proteinexpression ist zu gering, um mit dem daraus erzeugten Protein NMR-spektroskopische Experimente durchzuführen.

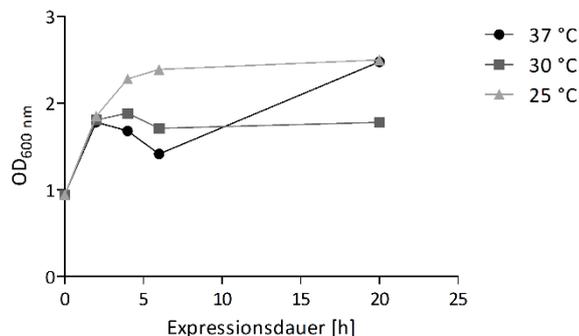
Das Problem der möglichen Toxizität des Fusionsproteins aus SUMO und Cecropin P1 erforderte eine andere Herangehensweise an die Expressionsproblematik. So wurde die Expression des Fusionsproteins in anderen *E. coli*-Stämmen getestet (Tabelle 2.2), welche generiert wurden um die Expression von toxischen Proteinen und auch Membranproteinen in *E. coli* zu erleichtern. Bei diesen Stämmen handelt es sich um *E. coli* BL21-Abkömmlinge mit Mutationen die phänotypisch anhand ihrer Toxizitätstoleranz ausgesucht wurden. Der *E. coli*-Stamm C43 lieferte dabei die besten Ergebnisse in den ersten Expressionstests (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4 Proteinnachweis nach Expressionstest in *E. coli* C43**

Tris/Tricin-Gele zum Nachweis der Proteinexpression. Als Marker (M) diente der PRuBR. Die Expression bei 37 °C über 2 h, 4 h und 6 h zeigt leichte Proteinbanden bei 20 kDa. Nach 2 h und 4 h der Expression liegt das Protein zu ungefähr 50 % im Pellet (P) und 50 % im Überstand (Ü) vor. Bei einer Expression über 6 h ist die Bande im Überstand deutlich schwächer als im Pellet. Die Expression bei 30 °C resultiert in deutlich schwächeren Proteinbanden bei 20 kDa, während sie bei einer Expression bei 20 °C nicht zu erkennen sind.

Der Test zeigt, dass eine Expression des Proteins bei 37 °C in der größten Proteinmenge resultiert. Allerdings nur bei einer Expressionsdauer von maximal 6 h, da in der über Nacht exprimierten Kultur kein Protein mehr nachgewiesen werden kann. Eine Expression bis zu 6 h scheint jedoch nicht sinnvoll zu sein, da die Proteinbanden nach einer Expressionsdauer von 2 h, 4 h und 6 h etwa gleich stark sind. Die Zelldichten wurden erneut über die Expressionsdauer dokumentiert (Abbildung 3.5). Das Wachstum der *E. coli* C43-Kultur vor der Induktion der Expression mit IPTG war vergleichbar mit dem Wachstum in *E. coli* BL21. Nach Induktion erhöhte sich die Zelldichte im Gegensatz zur *E. coli* BL21-Kultur und fiel auch nur bei der Expression bei 30 °C und 37 °C nach 4 – 6 h leicht ab. Die sinkenden Zelldichten könnten daher ein Indiz für die Expression des vermutlich toxischen Fusionsproteins sein, da unter diesen Temperaturen auch eine Proteinexpression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.5 Zelldichten während der Expression in *E. coli* C43**

Die Zelldichten steigen bei Expression zunächst an und sinken nach 4 h Expressionsdauer bei 30 °C und 37 °C leicht ab. Bei Expression bei 20 °C nimmt die Zelldichte hingegen zu.

### 3.2.2 Optimierung der Protein-Ausbeute

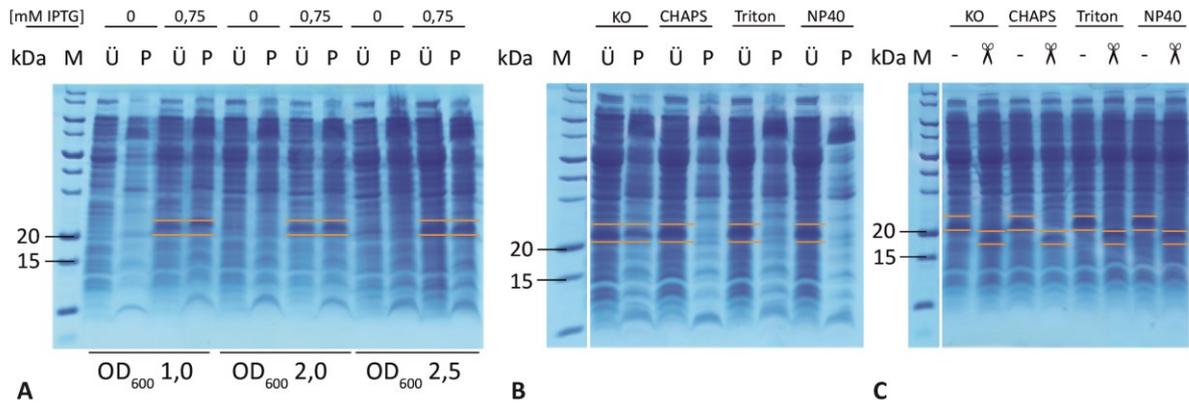
Die Expression in *E. coli* C43 erwies sich als effektiver als die in *E. coli* BL21. Dennoch war eine weitere Optimierung zur Steigerung der Proteinausbeute notwendig um ausreichend konzentrierte Proteinproben für die NMR-Spektroskopie zu generieren. Dazu wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt: Zum einen wurde die initiale Zelldichte der *E. coli*-Kulturen bei Induktion der Expression

variiert. Bei einer sehr kurzen Expressionsdauer über nur 2 h könnte einer Erhöhung der initialen Zellanzahl auch die Ausbeute an Fusionsprotein erhöhen. Aus diesem Grund wurde ein Expressionstest in *E. coli* C43 über 2 h bei 37 °C mit variierenden initialen Zelldichten (vor Induktion mit 0,75 mM IPTG) durchgeführt (Abbildung 3.6 A). Sind die Proteinbanden bei einer initialen optischen Dichte von 1,0 und 2,0 noch vergleichbar stark, so sind sie bei einer optischen Dichte von 2,5 etwas stärker. Die aus dieser Kondition gewonnenen Bakterienpellets wurden anschließend gleich für den zweiten Lösungsansatz zur Erhöhung der Proteinausbeute genutzt. Aus Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 A wird ersichtlich, dass ungefähr 50 % der gesamten Proteinausbeute in der Pelletfraktion der generierten Bakterienlysate vorliegt. Durch Lösen dieses Proteinanteils aus dem Pellet, könnte somit die Ausbeute an löslichem Protein nahezu verdoppelt werden. Dazu wurden die Bakterienpellets im gleichen Puffer mit variierenden Detergenzien (1 % [v/v] Triton X-100, 1 % CHAPS [w/v], 1 % Nonidet P40 [v/v]) aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. In Abbildung 3.6 B ist das Ergebnis erkennbar. Im Vergleich zur Kontrolle, welche im Puffer ohne Detergens aufgeschlossen wurde, wurde das Protein bei allen drei getesteten Detergenzien komplett aus der Pelletfraktion gelöst.

### 3.2.3 Nachweis der Funktionalität der SUMO-Protease

Nach Etablierung der Expression ausreichender Mengen des His-SUMO-Cecropin P1-Fusionsproteins wurde die Proteinausbeute durch Verwendung höherer Zelldichten und Herauslösen des Fusionsproteins aus der Pelletfraktion erhöht. Im letzten Schritt der Optimierung musste nun noch die Aktivität der SUMO-Protease in Gegenwart dieser Detergenzien getestet werden (Abbildung 3.6 C), um letztendlich reines vom SUMO-Protein getrenntes Cecropin P1 erhalten zu können. Dafür wurden die Überstände aus dem Löslichkeitstest direkt weiter verwendet und mit SUMO-Protease versetzt. Durch das Schneiden mit der SUMO-Protease sollte die Fusionsprotein-Bande auf der Höhe von kurz über 20 kDa verschwinden und zwei neue Proteinbanden bei ca. 3,3 kDa (Cecropin P1) und ca. 13 kDa (His-SUMO-Protein) sichtbar werden. Bei allen getesteten Konditionen ist eine deutliche Verschiebung der Bande von über 20 kDa auf unter 20 kDa erkennbar, was die Funktionalität der Protease nachweist. Bei 3 kDa sind keine Proteinbanden nachweisbar. Diese sind zu schwach für eine Detektion unter den gewählten Bedingungen.

Anhand der gegebenen Informationen aus den Expressionstests wurde die Expression des rekombinanten Cecropin P1 in Vollmedium mit 0,75 mM IPTG bei einer optischen Dichte von ca. 2,5 bei 37 °C über 2 h durchgeführt.



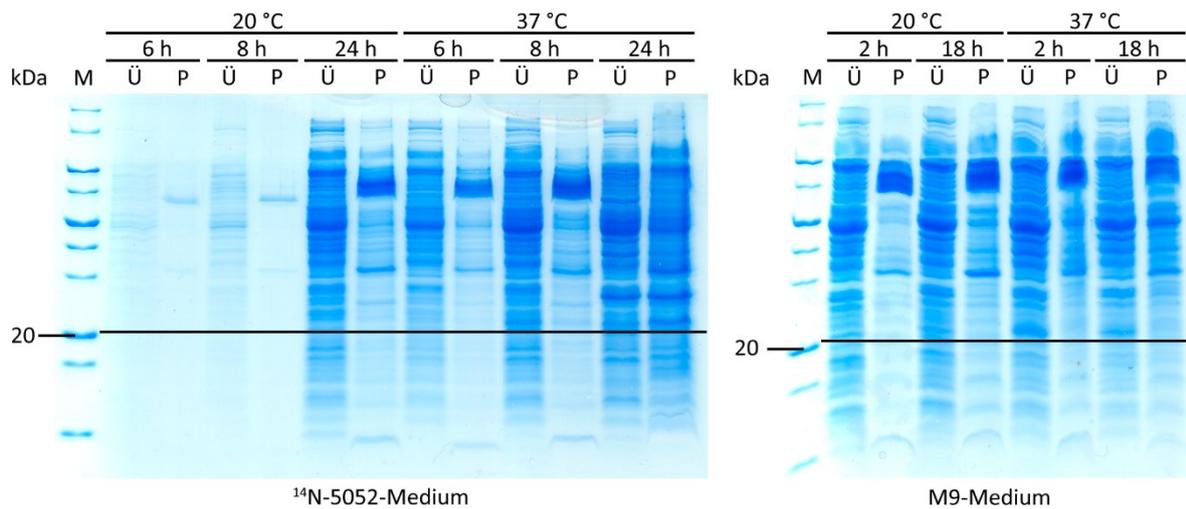
**Abbildung 3.6 Proteinnachweis nach Expressions- und Löslichkeitstest zur Erhöhung der Proteinausbeute**

Tris/Tricin-Gele zum Nachweis der Proteinausbeute und Löslichkeit. Als Marker (M) diente der PRuBR. **A** zeigt die Expression des Fusionsproteins nach Induktion mit 0,75 mM IPTG der Expression bei unterschiedlichen Zelldichten. Die Proteinbanden bei knapp über 20 kDa sind bei Induktion bei einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1 und 2 vergleichbar stark. Die Proteinbanden bei einer initialen optischen Dichte von 2,5 sind deutlich stärker. **B** zeigt die Proteinverteilung im Löslichkeitstest. Im Kontrollansatz (KO) mit Aufschlusspuffer ohne Detergens, liegt das Protein zur Hälfte im Pellet vor. Bei allen verwendeten Detergenzien (1 % [v/v] Triton, 1 % [w/v] CHAPS, 1 % [v/v] Nonidet P40) wurde das Protein aus der Pelletfraktion gelöst. **C** zeigt die Funktionalität der Protease unter Detergenseinfluss. Hier ist unter allen Konditionen die Funktionalität der SUMO-Protease nachweisbar. Zu erkennen ist dies an einer Verschiebung der Proteinbande von knapp über 20 kDa zu deutlich unter 20 kDa.

### 3.2.4 Optimierung der Expression von $^{15}\text{N}$ -markiertem His-SUMO-Cecropin P1-Fusionsprotein

Nach Optimierung der Expression des rekombinanten Cecropin P1-Fusionsproteins in Vollmedium wurde eine erste Expression in 4 l minimalem Phosphatmedium (M9) durchgeführt. Dabei zeigte sich erneut, dass die laborinternen standardisierten Expressionsmethoden nicht geeignet für die Expression dieses Cecropin P1-Fusionsproteins waren. Die Bakterienzellen wurden in 1 l Vollmedium bis zu einer optischen Dichte von 1,2 herangezogen und anschließend in 4 l M9-Medium inokuliert. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen war im Vergleich zur Verwendung von Vollmedium stark reduziert und erreichte über 8 h nur eine optische Dichte von 1,8. Die Proteinausbeute war dabei zu gering für die weitere Verwendung (Abbildung 3.9). Daher musste die Expression von  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertem Cecropin P1 unter Verwendung von Phosphatmedium optimiert werden. Bei allen in Phosphatmedien durchgeführten Expressionstests wurden die Zellen anschließend mit 1 % [v/v] Triton X-100 im Aufschlusspuffer aufgeschlossen, weshalb sich das gesamte exprimierte Cecropin P1-Fusionsprotein im Überstand der Bakterienlysate befinden sollte.

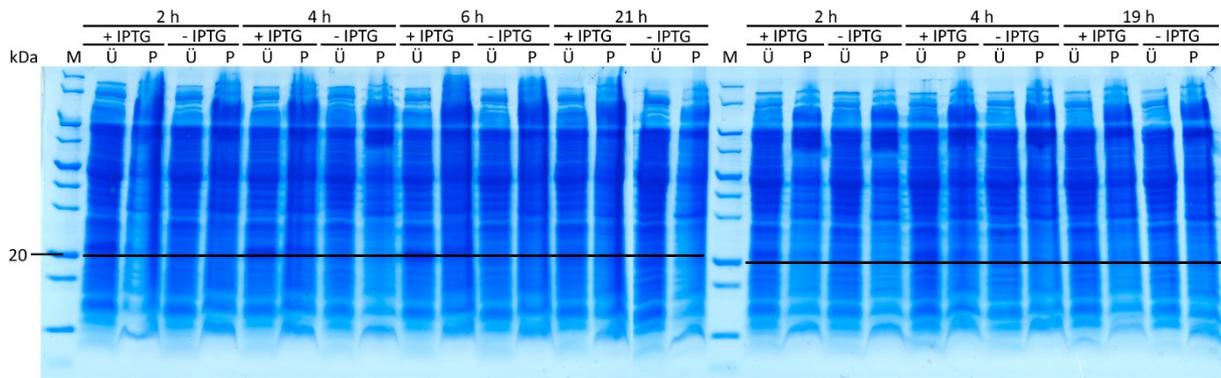
Zunächst wurde die Expression in einem Autoinduktionsmedium (5052-Medium) mit der Expression in M9-Medium verglichen (Abbildung 3.7). Erkennbar ist, dass die Expression im Autoinduktionsmedium noch deutlich geringer ist, als in M9-Medium. Nach 24 h Inkubation in Autoinduktionsmedium sind sehr schwache Proteinbanden bei 20 kDa erkennbar. Bei Expression des Cecropin P1-Fusionsproteins in M9-Medium bei 37 °C ist hingegen eine deutlich stärkere Proteinbande zwei Stunden nach Induktion erkennbar, welche 18 h nach Induktion schwächer ausfällt.



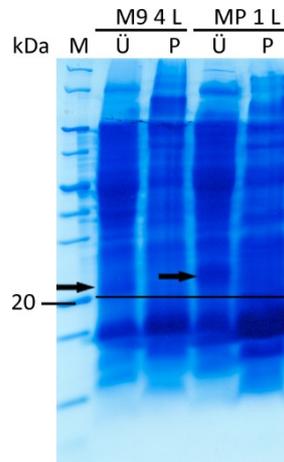
**Abbildung 3.7 Proteinnachweis nach Expressionstest in Phosphatmedien**

Tris/Tricin-Gele zum Proteinnachweis. Als Größenmarker (M) wurde der PRuBR verwendet. Im Autoinduktionsmedium 5052 ist bei Expression bei 20 °C keine Proteinbande bei den erwarteten 20 kDa sichtbar. Erst nach 24 h sind im Überstand leichte Banden erkennbar. Im Expressionstest unter Verwendung von M9-Medium ist bei 20 °C ebenfalls keine Proteinexpression des gewünschten Proteins nachweisbar. Bei 37 °C ist nach 2 h und nach 18 h eine leichte Proteinbande auf erwarteter Höhe zu erkennen.

Da die Expression unter diesen Bedingungen für die NMR-Spektroskopie keine ausreichend hohen Ausbeuten liefert, mussten andere Lösungsansätze getestet werden. Hierfür wurde ein modifiziertes Phosphatmedium (Medium P, Kapitel 2.1.1) mit höherem Ammoniumchloridgehalt (3 g/l statt 1 g/l), anderer Spurenelementzusammensetzung und 10 µg/ml Biotin getestet [105]. Zusätzlich wurden unterschiedliche Beimpfungstechniken für die Bakterienkulturen in Phosphatmedium untersucht. Die erste war das direkte Beimpfen des Phosphatmediums mit 2 % einer *E. coli*-ÜN-Kultur und anschließender Induktion der Expression bei einer optischen Dichte von 2,2 (Abbildung 3.8 B). Die zweite Beimpfungsmethodik erforderte eine Vorkultur in Vollmedium deren Volumen dem Vierfachen der finalen Kultur in Phosphatmedium entsprach. Dazu wurden die Zellen in 400 ml LB-Medium bis zu einer  $OD_{600} = 1$  kultiviert, zentrifugiert und in nur 100 ml Phosphatmedium inokuliert. Nach 1 h fortgesetzter Kultivierung wurde die Expression induziert. Die Abbildung 3.8 A zeigt den Proteinnachweis zu dieser Beimpfungstechnik. Beide Methoden zeigen deutliche Expressionsbanden leicht über der 20 kDa-Bande des Markers. Wieder ist das Cecropin P1-Fusionsprotein nicht mehr bei einer Expressionsdauer von 19 – 21 h nachweisbar. Die Stärke der Proteinbanden nimmt nach 2 h der Expression auch nicht weiter zu. Bei Vergleich der Proteinbanden beider Beimpfungsmethoden erscheinen die der direkten Beimpfung (Abbildung 3.8 B) schwächer.



**Abbildung 3.8 Proteinnachweis nach Expressionstest bei 37 °C in Medium P mit verschiedenen Beimpfungsmethoden**  
 Tris/Tricin-Gele zum Proteinnachweis. Als Größenmarker (M) wurde der PRuBR verwendet. **A** zeigt den Proteinnachweis nach Expressionstest mit Beimpfung durch eine Vorkultur. Über Expressionsdauern von 2 h, 4 h und 6 h ist eine nahezu gleich stark bleibende Proteinbande in den Überständen nachweisbar, welche nach 21 h nicht mehr zu sehen ist. **B** zeigt den Proteinnachweis nach Expressionstest mit direkter Beimpfung des Phosphatmediums mit 2 % einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Flüssigkultur. Über Expressionsdauern von 2 h und 4 h sind die erwarteten Proteinbanden im Überstand kurz über 20 kDa der Markerbande zu erkennen. Diese fallen im Vergleich zur Beimpfungsmethode in **A** deutlich schwächer aus. Die Beimpfung mit einer Vorkultur mit dem Vierfachen des Volumens der Kultur in Phosphatmedium, in dem die eigentliche Expression des <sup>15</sup>N-isotopenangereicherten Cecropin P1-Fusionsproteins abläuft, ist bei einer Expression in 4 l Phosphatmedium nicht praktikabel. Deshalb wurde in einem letzten Test eine *E. coli* C43-Kultur in 1 l LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 2,6 kultiviert, zentrifugiert und in 1 l des Medium P inokuliert. Nach einer Stunde der Kultivierung bei 37 °C erfolgte dann die Induktion der 4 stündigen Expression mit 0,75 mM IPTG. Abbildung 3.9 zeigt die Expression in Phosphatmedium nach Aufschluss der Zellen mit 1 % Triton-haltigem Aufschlusspuffer vor und nach der Optimierung.



**Abbildung 3.9 Vergleich der Expression in Phosphatmedien vor und nach der Optimierung**  
 Tris/Tricin-Gel zum Proteinnachweis. Als Größenmarker (M) PRuBR genutzt. Verglichen wird hier die Expression des Cecropin P1-Fusionsproteins aus 4 l M9-Medium (M9) vor und 1 l Medium P (MP) nach der Optimierung der Expression in Phosphatmedien. Die Bande des in Cecropin P1-Fusionsproteins ist bei der Expression in Medium P sehr viel stärker (Pfeile).

Es ist zu erkennen, dass die Bande des Cecropin P1-Fusionsproteins in der Expression mit 1 l Medium P deutlich stärker ist als die Bande bei Expression in 4 l M9-Medium. Die Expression des <sup>15</sup>N-isotopenangereicherten Cecropin P1-Fusionsproteins wurde anschließend immer mit dieser Vorgehensweise durchgeführt. Dazu wurden die *E. coli* C43-Kulturen in 4 l LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub>

von ca. 2,5 – 3,0 herangezogen, anschließend in 4 l Medium P inokuliert und nach einer Stunde mit 0,75 mM IPTG die 4-stündige Expression induziert.

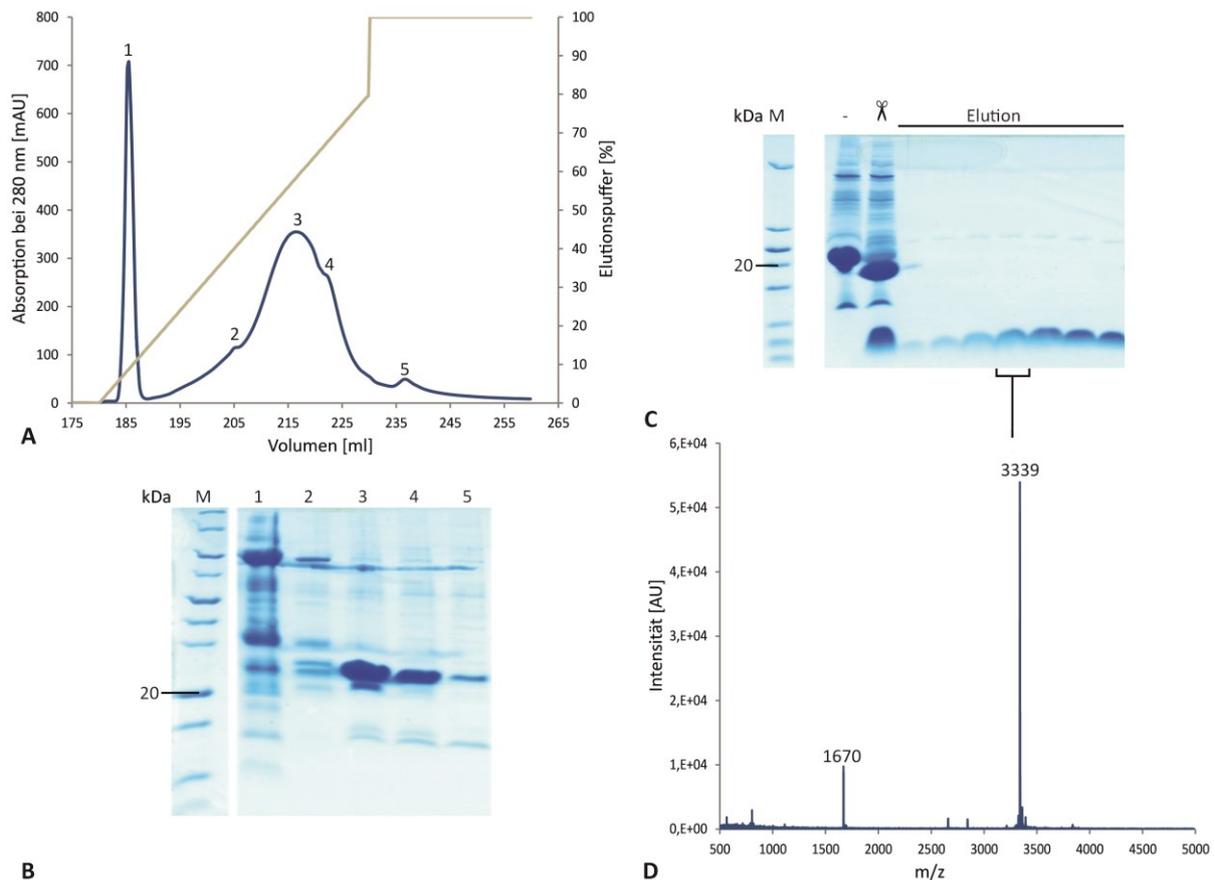
### 3.2.5 Optimierung der Expressionsbedingungen für das Histidin-*tag*-SUMO-Cecropin P1-StrepII-*tag*-Konstrukt

Auch die Expression dieses Konstruktes wurde zunächst unter Variation der laborinternen Standardparameter wie Temperatur, Expressionsdauer etc. untersucht. Allerdings konnte unter allen getesteten Bedingungen keine oder nur eine geringfügige Expression nachgewiesen werden. Auch die Nutzung des *E. coli*-C43 Stammes und der hohen Zelldichten bei Induktion der Expression ergaben nur eine geringfügige Expression des Cecropin P1-Fusionsproteins im Vergleich zum verwendeten Konstrukt ohne Strep-*tag*. Aus diesem Grund und weil dieses Fusionsprotein einen zusätzlichen Verdau zur Entfernung des Strep-*tag* benötigen würde, um Cecropin P1 mit nativer Sequenz zu erhalten, wurde auf die Expression dieses Konstruktes im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet.

### 3.2.6 Etablierung der Reinigung von Cecropin P1

Für die geplanten NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde sehr reines Cecropin P1 benötigt. Dazu musste das Cecropin P1-Fusionsprotein mit Hilfe des 6xHistidin-*tag* über eine His-*tag*-IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) (Kapitel 2.5.4) gereinigt und das Cecropin P1 vom SUMO-Protein getrennt werden. Dafür wurden die aus der Expression (Kapitel 2.4.2) erhaltenen Bakterienpellets zunächst aufgeschlossen (Kapitel 2.5.3) und das erhaltene Gemisch aus löslichen Proteinen für die His-*tag*-IMAC verwendet. Abbildung 3.10 zeigt eine Übersicht des Reinigungsverlaufs. Zunächst wurde das Proteingemisch auf die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule gegeben, gefolgt von Waschschritten. Der elementarste Waschschriff war hierbei der mit Natriumcholat-haltigem Puffer. Dieser hatte zwei positive Effekte. Zum einen wurde eine Vielzahl der unspezifisch bindenden Verunreinigungen bereits während dieses Waschschriffes eliminiert. Zum zweiten ist es durch Natriumcholat möglich, auch das im Aufschluss- und Bindepuffer enthaltene Triton X-100 restlos zu eliminieren. Im Gegensatz zu Triton X-100 lässt sich Natriumcholat anschließend durch einfaches Spülen der Säule entfernen. Das Entfernen des Tritons ist aus zweierlei Gründen sinnvoll: Der Reinigungsverlauf wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm, bei der sowohl aromatische Aminosäuren als auch Triton X-100 absorbieren, verfolgt, sodass das Triton die Detektion der Proteinsignale zum Teil überdeckt. Aus diesem Grund und um am Ende Detergens-freies Protein für die weiteren Messungen zu erhalten, wurde der Natriumcholat-haltige Waschpuffer verwendet, um das Triton X-100 zu entfernen. Abbildung 3.10 A zeigt den Verlauf des Elutionsschriffes der His-*tag*-IMAC. Um restliche schwach bindende Verunreinigungen zu entfernen und vom gewünschten Protein zu trennen, wurde ein Gradient von 0-80 % des 270 mM Imidazol-haltigen Elutionspuffers über das zehnfache Säulenvolumen verwendet. Anschließend wurde über das sechsfache Säulenvolumen mit reinem Elutionspuffer eluiert. Während der Elutionsschriffes wurde das gesamte Eluat in fraktionierter Form aufgefangen. Zu erkennen ist, dass gleich zu Beginn des Elutionsgradienten ein scharfes hohes Signal detektiert wird. Daran schließt sich ein breiteres Signal mit drei Maxima und ein schwaches Signal während der Elution mit 100 % Elutionspuffer an. Um die Größen der enthaltenen Proteine nachzuweisen, wurden von den entspre-

chenden Signalen SDS-Proben generiert und eine Tris/Tricin-PAGE (2.5.5) durchgeführt (Abbildung 3.10 B). In Abbildung 3.10 B wird deutlich, dass das erste starke Signal nur aus schwach an der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix bindenden Proteinen besteht. Danach folgen die Signale, deren Fraktionen Cecropin P1-Fusionsprotein enthalten. Die aufgefangenen Fraktionen dieser Signale wurden zusammengeführt und in einen für die SUMO-Protease geeigneten Puffer ohne Imidazol diafiltriert und anschließend konzentriert (Kapitel 2.5.4).



**Abbildung 3.10 Reinigungsverlauf von rekombinantem Cecropin P1**

**A** zeigt den Verlauf der Elutionsschritte. Der Konzentrationsverlauf des Elutionspuffers während des Gradienten und danach ist in grau dargestellt. Die einzelnen Signalmaxima wurden nummeriert (1-5) und von den Fraktionen SDS-Proben generiert. Der Verlauf der Absorption bei 280 nm ist in blau dargestellt. **B** stellt den Proteinnachweis zu den Signalmaxima aus der Elution dar. Die Nummerierung der Signalmaxima entspricht dabei der Nummerierung des Tris/Tricin-Gels. Als Größenmarker (M) wurde der PRuBR verwendet. Der Großteil des Cecropin P1-Fusionsproteins liegt in den Signalmaxima 3 – 5 vor. **C** zeigt den Proteinnachweis des diafiltrierten und konzentrierten Cecropin P1-Fusionsproteins vor (-) und nach (Scher) dem Schneiden mit der SUMO-Protease. In den nachfolgenden Gelteichen ist der Verlauf der erneuten Elution über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule zu sehen, in dem hier das abgetrennte Histidin-tag-SUMO-Protein an die Säulenmatrix gebunden wird und so eine Trennung vom Cecropin P1-Peptid ermöglicht. **D** zeigt das MALDI-Massenspektrum einer der eluierten Cecropin P1-Fraktionen. Die Signale entsprechen dabei der erwarteten Masse von Cecropin P1 (3339 Da) und dessen halber Masse (1670). Der Mangel an weiteren Signalen nicht passender Größen ist außerdem ein Nachweis für die Reinheit des Proteins.

Die Abbildung 3.10 C zeigt das diafiltrierte, konzentrierte Fusionsprotein vor (-) und nach (Scher) dem Schneiden mit Hilfe der SUMO-Protease. Nach dem Trennen von Cecropin P1 und dem His-tag-SUMO-Protein wurde das Protein erneut über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule gegeben, wobei das His-tag-SUMO-Protein und die restlichen endogenen Histidin-haltigen *E. coli*-Proteine an der Säule gebunden werden und das freie Cecropin P1 eluiert, gesammelt, in NMR-Puffer diafiltriert und konzentriert wurde. Zum Nachweis der korrekten Größe und der Reinheit des gereinigten Cecropin P1 wurde ein MALDI-Massenspektrum aufgenommen (Abbildung 3.10 D). Detektiert werden konnten zwei Signale

bei der korrekten Massenzahl von 3339 Da sowie der halben Massenzahl von 1670 Da. Die Abwesenheit weiterer signifikanter Signale beweist die Reinheit des Cecropin P1, die notwendig ist für die NMR-Spektroskopie.

### 3.3 Bestimmung der Toxizität von Cecropin P1

#### 3.3.1 Etablierung des MIC-Tests

Für die Bestimmung der Toxizität von Cecropin P1 und dessen zukünftigen Mutanten musste zunächst ein passendes Testsystem innerhalb dieses Labors etabliert werden. Dafür wurde auf schon anderorts etablierte Methoden zurückgegriffen [110]. Diese Methoden ermöglichen die Determinierung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC = *minimal inhibitory concentration*) getesteter Substanzen. Die MIC ist dabei die niedrigste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, welche unter den getesteten Bedingungen das sichtbare Bakterienwachstum inhibiert. Wiegand *et al.* [110] beschreiben zwei unterschiedliche Ansätze, die Agar- und die Flüssigmedium-Verdünnungsmethode. Die Flüssigmedium-Methode besitzt mehrere Vorteile: Bei der Agar-Verdünnungsmethode werden Bakterienkulturen mit definierter Zellzahl auf Agar-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen der antimikrobiellen Peptide verteilt und nach Inkubation die erhaltenen Kolonien gezählt. Dies erfordert höhere Peptidmengen durch das größere Volumen der Agar-Platten (mehrere Milliliter) und eine langwierigere Auswertung mit höherem Fehlerpotential durch manuelles Auszählen der Kolonie-formenden Einheiten. Aus diesen Gründen wurde für diese Arbeit die Flüssigmedium-Verdünnungsmethode gewählt (Kapitel 2.4.3). Durchgeführt wurde diese in 96-Well-Platten mit nur 100 µl Endvolumen im Well, was die Menge an benötigten Peptiden deutlich verringert. Zusätzlich wurden alle verwendeten Peptidkonzentrationen dreifach getestet, um handwerkliche Fehler zu minimieren. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Photometers, welches Platten-kompatibel ist, bei einer Wellenlänge von 600 nm. Als Sterilitätskontrolle wurde Medium und als Wachstumskontrolle die verwendete Zellsuspension, beides mit gleicher genutzter Menge des Peptidlösungsmittels, verwendet. Für die genutzten seriellen Peptidverdünnungen wurde sich an den Literaturwerten (Tabelle 1.2) von Cecropin P1 orientiert. Als *E. coli*-Stamm wurde ein, im Gegensatz zu *E. coli* K12-Stämmen, kaum genetisch veränderter *E. coli* ML3 Laborstamm genutzt. Um ungefähr die gleichen Zellzahlen bei den Tests verwenden zu können, wurde die optische Dichte bei 600 nm der ÜN-Kulturen von *E. coli* ML3 mit der Anzahl an Kolonie-formenden Einheiten (cfu = *colony forming units*) korreliert (Tabelle 3.1).

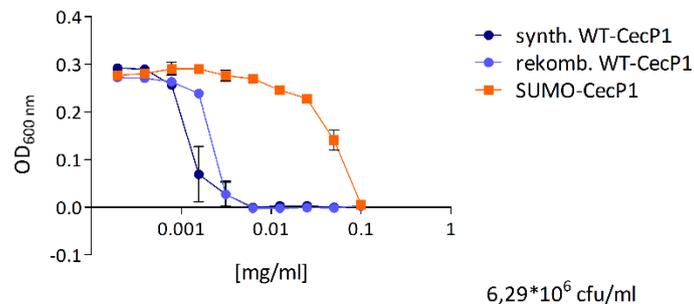
**Tabelle 3.1 Korrelation der gemessenen Zelldichten bei 600 nm und der Kolonie-formenden Einheiten pro ml**

ÜN-Kultur <i>E. coli</i> ML3 Nr.	OD <sub>600</sub> 1:30 Verd. der ÜN-Kultur	cfu (10 <sup>-5</sup> Verd.)	cfu (10 <sup>-6</sup> Verd.)	cfu/ml (10 <sup>-5</sup> Verd.)	cfu/ml (10 <sup>-6</sup> Verd.)
1	0,18	728	208	7,28 x 10 <sup>8</sup>	2,08 x 10 <sup>9</sup>
2	0,17	808	206	8,08 x 10 <sup>8</sup>	2,06 x 10 <sup>9</sup>
3	0,19	1088	480	1,09 x 10 <sup>9</sup>	4,8 x 10 <sup>9</sup>
<b>Mittelwert</b>	<b>0,18</b>	<b>875</b>	<b>289</b>	<b>8,75 x 10<sup>8</sup></b>	<b>2,98 x 10<sup>9</sup></b>

Für das Einstellen der ungefähren Zellzahl wurde anschließend die Korrelation OD<sub>600</sub> = 0,18 entspricht ungefähr 2,98 x 10<sup>9</sup> cfu/ml, genutzt. Nach Verwenden der Zellsuspension im MIC wurden zur genau-

en Überprüfung der tatsächlichen Zellzahl 100 µl einer 1:100 und 1:1000 Verdünnung der Zellsuspension auf Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert, anschließend die kolonieformenden Einheiten gezählt und die Zellkonzentration in cfu/ml berechnet.

Nach ersten Tests mit kommerziell erwerblichen Antibiotika, wurde die MIC von synthetisiertem und rekombinantem Cecropin P1 sowie die des His-tag-SUMO-Cecropin P1-Proteins bestimmt (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11** Determinierung der MICs (n=3)

Aufgetragen wurden hier die gemessenen Werte der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) gegen die verwendeten Peptidkonzentrationen in log<sub>10</sub> [mg/ml]. Synthetisches und rekombinantes Cecropin P1 haben eine identische MIC, auch wenn die Zelldichte bei Inkubation mit synthetischen Peptid schon bei kleineren Peptidkonzentrationen stärker sinkt. Auch das His-tag-SUMO-Cecropin P1-Protein erweist sich als toxisch. Erkennbar ist, dass

synthetisches und rekombinantes Cecropin P1 die gleiche MIC aufweisen. Allerdings beginnt die Verringerung der Zelldichte im Falle des synthetischen Peptids schon bei kleineren Peptidkonzentrationen als beim rekombinanten Cecropin P1. Die schon vermutete Toxizität des His-tag-SUMO-Cecropin P1-Proteins wurde ebenfalls nachgewiesen. Allerdings liegt die MIC bei diesem Konstrukt über das 10-fache höher als im Falle der kurzen Peptide. Die MICs der einzelnen Peptide sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

**Tabelle 3.2** Übersicht über die MIC von Cecropin P1 und SUMO-Cecropin P1-Fusionsprotein

	MIC [µg/ml]	MIC [µM]	n
<b>synthet. WT-CecP1</b>	6,25	1,9	3
<b>rekomb. WT-CecP1</b>	6,25	1,9	3
<b>SUMO-CecP1*</b>	50 -100	15-30	3

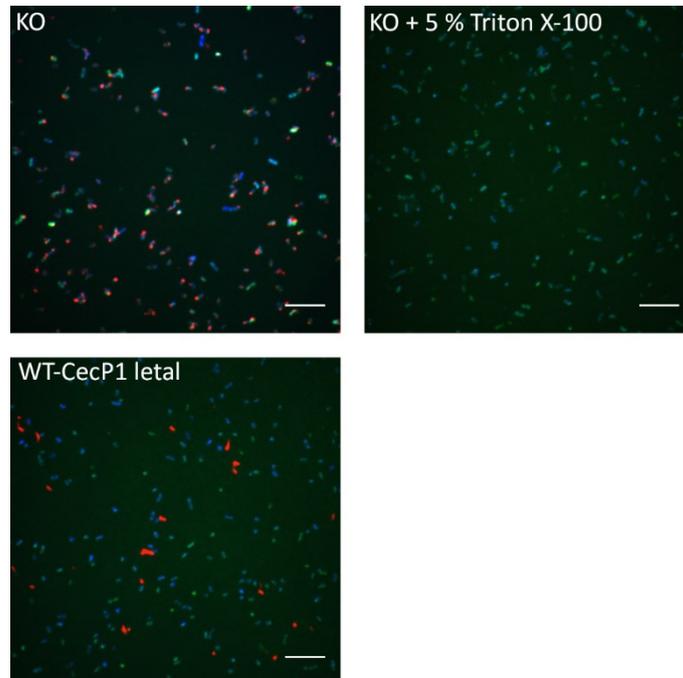
\*Konzentrationsangaben beziehen sich zur besseren Vergleichbarkeit nur auf den Cecropin P1-Anteil des Fusionsproteins

Für die bessere Vergleichbarkeit der MIC beziehen sich die Konzentrationsangaben für das Fusionsprotein nur auf den Cecropin P1-Anteil des Proteins.

### 3.3.2 Etablierung einer Dreifach-Färbung zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Toxizität von Cecropin P1

Zusätzlich zur Bestimmung der MIC des Cecropin P1 wurde eine Dreifach-Fluoreszenzfärbung nach Mangoni *et al.* [113] zur genaueren Untersuchung der Toxizität etabliert (Kapitel 2.4.4). Diese Dreifach-Färbung nach Inkubation von Bakterien mit antimikrobiellen Substanzen ermöglicht es, Aussagen über die metabolische Aktivität der Bakterien (CTC), die Membranpermeabilität (FITC) und die totale Anzahl an Bakterien (DAPI) (Kapitel 2.4.4) zu treffen. Das mit den Bakterien inkubierte 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) bildet bei Reduktion ein intrazelluläres, rot fluoreszierendes Formazan (CTF), welches als Indikator der respiratorischen Aktivität verwendet wird. Die Färbung mit FITC (grün) soll eine reduzierte Membranintegrität nachweisen, da es nur durch geschädigte Membranen in die Zellen gelangen kann. DAPI (blau) wurde verwendet um die Bakterien-DNA anzu färben und damit möglichst alle Bakterien zu detektieren.

Zunächst wurde die zu verwendende optimale Zelldichte auf  $2 \times 10^8$  cfu/ml bestimmt und sowohl die verwendeten Konzentrationen von DAPI (20  $\mu\text{g/ml}$ ) als auch FITC (10  $\mu\text{g/ml}$ ) angepasst. Die Abbildung 3.12 zeigt erste Ergebnisse dieser Färbung.



**Abbildung 3.12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen**

Der Messbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . Es ist die Überlagerung aller drei Fluoreszenzen gezeigt. DAPI ist in blau, CTC in rot und FITC in grün dargestellt. Als Kontrolle (KO) wurden Bakterienzellen in Puffer inkubiert.

Die zur Kontrolle (KO) nur mit zur Lösung der Peptide verwendeten Puffer anstatt mit Peptid inkubierten Bakterien sind mehrheitlich metabolisch aktiv, was man anhand der roten Färbung der Bakterienzellen erkennt. Einige wenige Zellen sind nur positiv für die DAPI und die FITC-Fluoreszenz, was auf eine Schädigung der Membran hinweist und auf fehlende metabolische Aktivität. Die mit Puffer mit 5 % Triton inkubierten Bakterien sind hingegen von Beginn der Inkubation an nicht mehr Stoffwechsel-aktiv. Aber auch das Signal für die FITC-Fluoreszenz ist im Vergleich zur Kontrolle, welche normalerweise keine Membranschädigung und somit keine Fluoreszenz bei 488 nm zeigen dürfte,

schwächer. Die mit synthetischem Wildtyp-Cecropin P1 (WT-CecP1) inkubierten Bakterien zeigen einige wenige Formazansignale (CTC in rot) die nicht mit der DAPI-Fluoreszenz überlappen. Die Fluoreszenz bei 488 nm (FITC) ist wieder geringer als die der Negativkontrolle. Die Bakterien werden durch die letale Dosis mit Wildtyp-Cecropin P1 getötet, was durch die wenigen nicht intrazellulär liegenden Formazansignale erkennen kann. Die Zellen sind aber weder bei der Positivkontrolle mit 5 % Triton noch beim WT-CecP1 positiv für das FITC-Signal, was darauf hindeutet, dass die Zellen nicht ausreichend permeabilisiert wurden um das FITC-Molekül in die Zellen gelangen zu lassen.

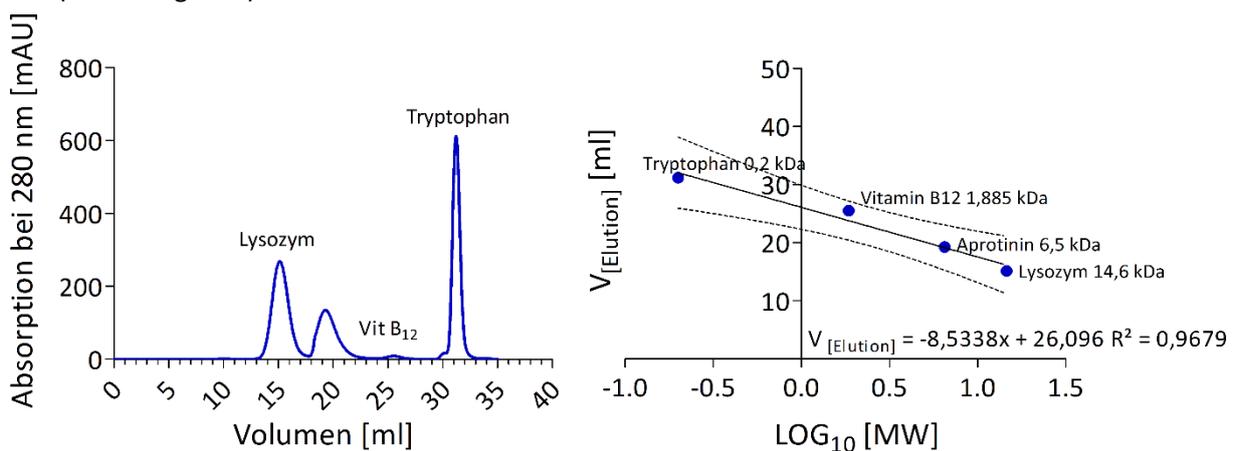
### 3.4 Strukturelle Charakterisierung von Cecropin P1

Die strukturelle Charakterisierung des Cecropin P1 ist interessant, da sie zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus beitragen könnte. Dabei treten mehrere Fragestellungen auf. Ist es möglich, dass Cecropin P1 unter bestimmten Bedingungen Multimere bildet, wie Christensen *et al.* und Durell *et al* für die Cecropine postulierten [87, 132]? Ist Cecropin P1 in wässriger Lösung wirklich unstrukturiert, wie Sipos *et. al* festgestellt haben [99]? Welche Informationen über die Dynamik von Cecropin P1 kann man gewinnen? Wie verhält sich Cecropin P1 in wässriger Umgebung und wie, wenn es die Möglichkeit hat mit Membranen zu interagieren?

#### 3.4.1 Untersuchung einer möglichen Multimerisierung des Cecropin P1

##### Analytische Größenausschlusschromatografie des Cecropin P1

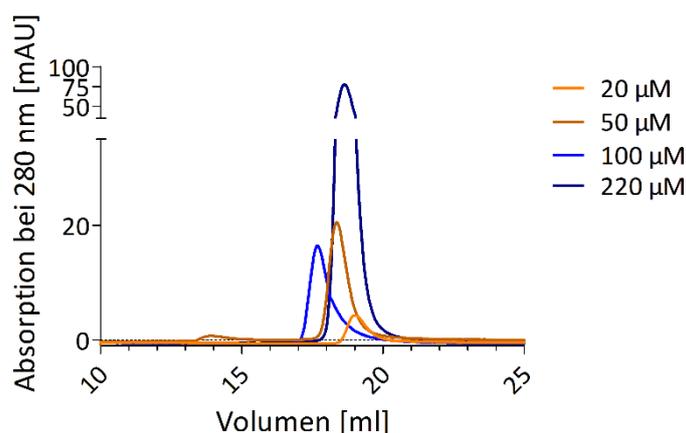
Zum Nachweis einer möglichen Multimerisierung wurden zunächst analytische Gelfiltrationen in 50 mM Tris pH 8,0 und 150 mM NaCl (SEC = *size exclusion chromatography*) unter Variation der Peptidkonzentration durchgeführt (Kapitel 2.5.7). Für diese Gelfiltrationen musste zunächst ein Kalibrierungslauf mit geeigneten monomeren Proteinen/Substanzen bekannter Größen durchgeführt werden, um das Molekulargewicht ( $\text{LOG}_{10} [\text{MW}]$ ) mit dem Zeitpunkt der Elution ( $V_{[\text{Elution}]}$  [ml]) zu korrelieren (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13 Chromatogramm zur SEC des Kalibrierungslaufs und dessen Auswertung**

Auf der linken Seite ist das Chromatogramm zur Größenausschlusschromatografie (SEC) zu sehen. Aufgetragen ist dabei der Verlauf der Absorption bei 280 nm (mAU) gegen das Elutionsvolumen (ml). In der Auswertung dieser SEC (rechts) wurden die jeweiligen Elutionsvolumina der Proteine/Substanzen ( $V_{[\text{Elution}]}$  [ml]) gegen den  $\text{log}_{10}$  des entsprechenden Molekulargewichts in kDa aufgetragen.

Anschließend an die Kalibrierung wurden analytische SEC-Läufe mit unterschiedlichen Konzentrationen an synthetischem Cecropin P1 durchgeführt (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14 analytische konzentrationsabhängige SEC des synthetischen Cecropin P1**

Der Verlauf der Absorption bei 280 nm (blau) wurde gegen das Elutionsvolumen [ml] aufgetragen. Die Signale aller verwendeten Peptidkonzentrationen kommen zwischen den Elutionsvolumina 17-21 ml. Bei einer Konzentration von 50 µM Cecropin P1 gibt es ein schwaches Signal bei 14 ml Elutionsvolumen.

Die Maxima der Signale der unterschiedlichen genutzten Peptidkonzentrationen kommen zwischen den Elutionsvolumina 17-21 ml. Die Tabelle 3.3 zeigt die mit Hilfe der Formel aus Abbildung 3.13 berechneten Molekulargewichte in kDa mit Hilfe der eingesetzten Elutionsvolumina der Signalmaxima aus der analytischen SEC.

**Tabelle 3.3 Übersicht über die Ergebnisse der analytischen SEC von Cecropin P1**

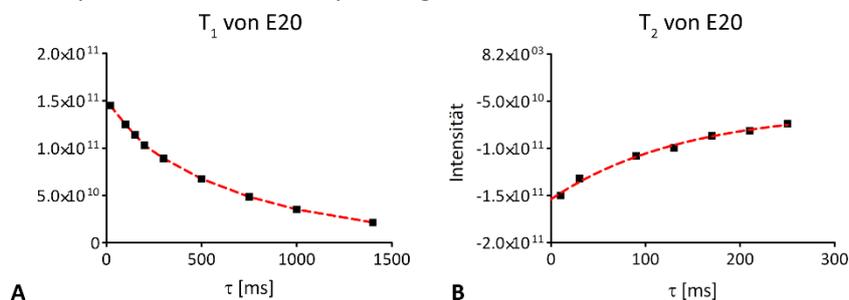
Peptidkonzentrationen [mM]	$V_{[Elution]}$ [ml]	$\log_{10}$ [MW]	MW [kDa]
20	19,04	0,83	6,72
50	18,36	0,91	8,06
100	17,71	0,98	9,62
220	18,63	0,87	7,49

Die kalkulierten Werte für das Molekulargewicht schwanken bei den einzelnen Konzentrationen zwischen 6,7 und 9,6 kDa. Dies würde der Größe eines Dimers bzw. eines Trimers des Cecropin P1 entsprechen.

#### Relaxationsmessungen und Abschätzung der Rotationskorrelationszeit von Cecropin P1

In einem weiteren Schritt wurde  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertes Cecropin P1 NMR-spektroskopisch untersucht. Zunächst wurden Relaxationsmessungen und eine daraus resultierende Abschätzung der Rotationskorrelationszeit durchgeführt (2.6.3), wodurch wiederum Rückschlüsse auf die unter NMR-Bedingungen vorliegende Größe des Cecropin P1 und somit die potentielle Multimerisierung gezogen werden können. Hierfür notwendig war ein möglichst vollständig zugeordnetes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-

Spektrum zur Auswertung der Relaxationsmessungen (Kapitel 3.4.2). Es wurde eine Reihe von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren unter Variation der Zeit  $\tau$  aufgenommen, was zu Intensitätsunterschieden der einzelnen Signale der Aminosäuren führt. Die zu den unterschiedlichen Zeiten gemessenen Intensitäten der Signale der jeweiligen Aminosäure wurden anschließend mit der Formel 2.2 gefittet. Abbildung 3.15 zeigt exemplarisch die Kurvenanpassung der  $T_1$ - und  $T_2$ -Werte von Glutamat 20.

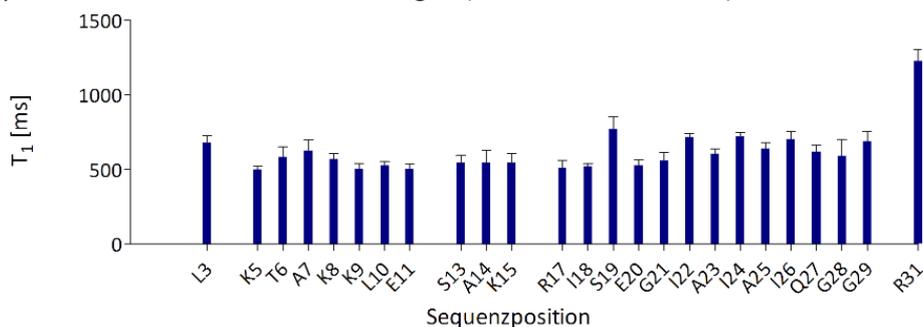


**Abbildung 3.15 Exemplarische  $T_1$ - und  $T_2$ -Kurvenanpassungen**

**A** zeigt die Kurvenanpassung der Intensitäten von Glutamat 20 (E20) über die verwendeten Zeiten ( $\tau$  [ms]). **B** stellt die Kurvenanpassung der Intensitäten von Glutamat 20 (E20) über die verwendeten Zeiten dar.

Für die Aussagen zu den  $T_1$ - und den  $T_2$ -Zeiten der einzelnen Aminosäuren wurden nur eindeutige Kurvenanpassungen mit  $R^2 \geq 0,99$  ( $T_1$ ) und  $R^2 \geq 0,9$  ( $T_2$ ) verwendet.

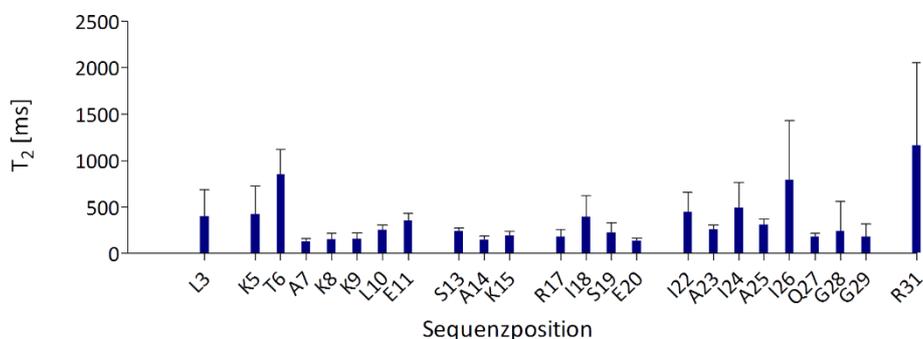
Die Abbildung 3.16 stellt die mit Hilfe der Kurvenanpassungen berechneten  $T_1$ -Zeiten dar, welche über die Sequenz verteilt um die 600 ms betragen (Mittelwert: 623,6 ms).



**Abbildung 3.16 Berechnete  $T_1$ -Zeiten für Cecropin P1**

Dargestellt sind die aus den Kurvenanpassungen gewonnenen  $T_1$ -Zeiten mit Standardabweichung aufgetragen gegen die Aminosäure mit ihrer Sequenzposition.

Abbildung 3.17 zeigt die berechneten  $T_2$ -Zeiten. Dabei ist zu erkennen, dass diese über die Sequenz stärker variieren als die  $T_1$ -Zeiten. Die gemittelte  $T_2$ -Zeit des Cecropin P1 liegt bei 349,3 ms.



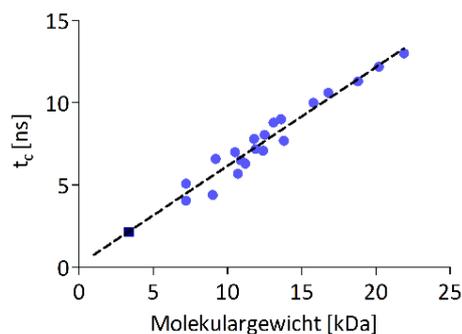
**Abbildung 3.17 Berechnete  $T_2$ -Zeiten für Cecropin P1**

Die aus den Kurvenanpassungen der einzelnen Aminosäuren erhaltenen  $T_2$ -Werte mit Standardabweichung sind aufgetragen gegen die entsprechenden Aminosäuren einschließlich deren Sequenzposition.

Die gemittelten  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten des Cecropin P1 wurden zur Berechnung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  mit Hilfe der Formel 2.3 (Kapitel 2.6.3) verwendet.

$$\tau_c = \frac{1}{4 \times \pi \times 70,971 \times 10^6 \text{s}^{-1}} \times \sqrt{6 \times \frac{623,6 \text{ ms}}{349,3 \text{ ms}} - 7} = 2,16 \times 10^{-9} \text{ s} = 2,16 \text{ ns}$$

Es ergibt sich dabei für Cecropin P1 eine Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  von 2,16 ns. Abbildung 3.18 zeigt die  $\tau_c$ -Werte unter vergleichbaren Bedingungen gemessener Proteine bekannter Größe [133] und deren lineare Regression ( $R^2 = 0,94$ ). Zum Vergleich ist in dunkelblau die berechnete  $\tau_c$  von Cecropin P1 gegen das Molekulargewicht, unter Berücksichtigung der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenanreicherung (3,4 kDa), aufgetragen. Die Verlängerung der Regressionslinie der Vergleichsproteine zeigt, dass eine monomere Cecropin P1-Form mit einer  $\tau_c$  von 2,16 ns am wahrscheinlichsten ist. Daraus kann geschlossen werden, dass Cecropin P1 unter den gegebenen Messbedingungen (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,6;  $c = 1,5 \text{ mM}$ ,  $T = 25 \text{ °C}$ ) als Monomer vorliegt.



**Abbildung 3.18 Vergleich der  $\tau_c$  von Cecropin P1 mit denen von bekannten Proteinen [133]**

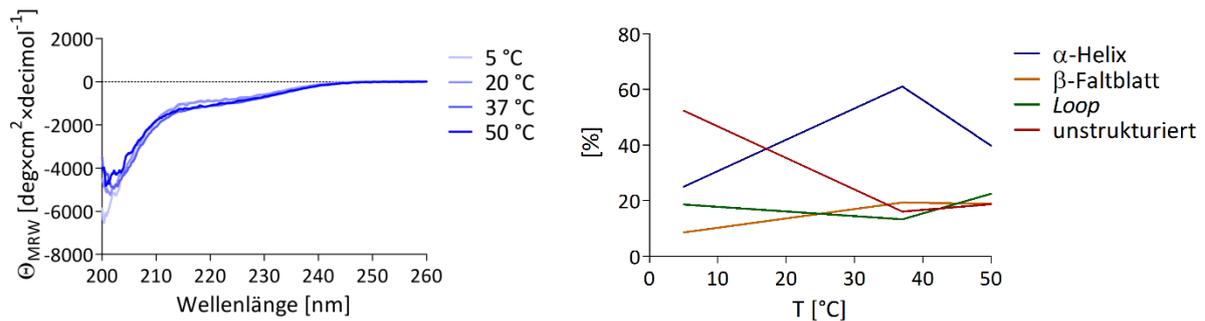
Aufgetragen sind die berechneten  $\tau_c$ -Werte gegen die Molekulargewichte unter Berücksichtigung der verwendeten Isotopen-Markierung. Cecropin P1 ist in dunkelblau, alle anderen Proteine in hellblau dargestellt. Die lineare Regression wurde zur besseren Anschaulichkeit verlängert (bis  $x=1$ ).

### 3.4.2 Struktur und Dynamik von Cecropin P1

Vorausgehende Arbeiten an Cecropinen und Cecropin P1 konzentrierten sich auf die Struktur in Membran-ähnlicher Umgebung in Form von 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) und künstlichen Membransystemen [43, 88, 89, 99, 134, 135]. Um die Interaktion von Cecropin P1 mit Membranen näher untersuchen zu können, sollte deshalb zu Beginn als Ausgangspunkt die Struktur und Dynamik des Peptids in wässriger Lösung genauer untersucht werden. Zunächst wurden Sequenzabhängige Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt (Abbildung 3.19), welche auf eine überwiegend  $\alpha$ -helikale Struktur des Peptids hindeuten. Die Sekundärstrukturvorhersagen decken sich dabei sehr gut, was die vorhergesagten Sekundärstrukturanteile in den verschiedenen Bereichen betrifft.



bleibender Peptidkonzentration (60  $\mu\text{M}$ ) aufgenommenen CD-Spektren. Dabei sind um 220 nm leichte Differenzen zwischen den Spektren bei 5 °C und 20 °C im Vergleich zu den Spektren bei 37 °C und 50 °C festzustellen. Die mit der CONTIN-LL-Methode durchgeführte Sekundärstrukturanalyse (Abbildung 3.21 B) zeigt den höchsten  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil von 61 % bei einer Temperatur von 37 °C. Der anfänglich hohe Anteil an unstrukturierten Bereichen nimmt bis dahin auf ein Minimum ab. Die Anteile an  $\beta$ -Faltblatt und *Loop* sind nahezu gleich bleibend. Die CD-Spektroskopischen Analysen ergeben, dass die Zunahme des Anteils an  $\alpha$ -helikalen Strukturen und die Abnahme an unstrukturierten Anteilen mit Zunahme der Peptidkonzentration und Zunahme der Temperatur bis 37 °C korrelieren.



**Abbildung 3.21 Temperaturabhängige CD-Spektroskopie und Sekundärstrukturanalyse von Cecropin P1**

Die Abbildung zeigt die bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommenen CD-Spektren von Cecropin P1 (links). Um 220 nm gibt es eine leichte Differenz zwischen den Spektren der beiden niedrigeren Temperaturen verglichen mit den Spektren der beiden höheren Temperaturen. Rechts ist die mit der CONTIN-LL durchgeführte Sekundärstrukturanalyse abgebildet. Bei 37 °C hat der  $\alpha$ -helikale Anteil sein Maximum und der unstrukturierte Anteil sein Minimum. Die Anteile an *Loop*-Strukturen und unstrukturierten Bereichen ist dabei über die gemessenen Temperaturen nahezu konstant.

### NMR-Spektroskopische Analyse der Struktur von Cecropin P1

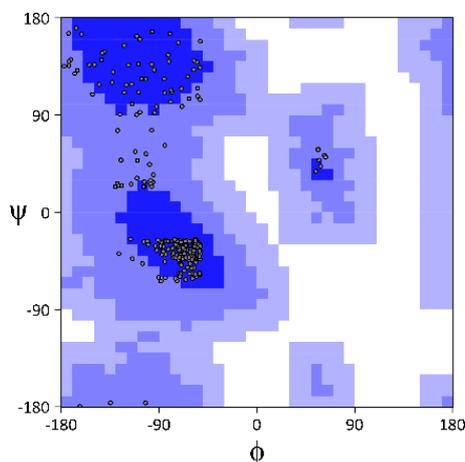
Im nächsten Schritt wurden NMR-Spektroskopische Analysen durchgeführt um die dreidimensionale Struktur des Cecropin P1 in hydrophiler Umgebung näher zu untersuchen. Die entsprechenden Spektren  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC wurden (Tabelle 2.21) aufgenommen. Für die Aufnahme homonuklearer Spektren zur Detektion der Resonanzen der Protonen wurde synthetisches Cecropin P1 verwendet, für das heteronukleare  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC wurde rekombinantes  $^{15}\text{N}$ -markiertes Cecropin P1 genutzt.

Die erhaltenen Signale aus den einzelnen Spektren wurden mittels *Chaintracing* nach Wüthrich *et al.* [129] den entsprechenden Atomen zugeordnet (Anhang) und für die Strukturrechnung (Kapitel 2.6.3) verwendet. Die Tabelle 3.4 listet die Daten zu den 10 Strukturen aus 100 gerechneten Strukturen auf. Dabei wurden insgesamt 156 NOE-Signale für die Strukturrechnung verwendet. Die RMSD (*root mean square deviation*) über das Peptidrückgrat ist mit 3,12 Å sehr hoch. Überlagert man die Helices (Helix 1 AS 3-7, Helix 2 AS 13-20) der 10 Strukturen miteinander wird die RMSD mit Werten zwischen 0,25 Å (Helix 1) und 0,57 Å (Helix 2) deutlich geringer. Die berechneten Strukturen haben einen durchschnittlichen Sekundärstrukturanteil von 44,8 %  $\alpha$ -Helix und 55,2 % eher unstrukturierten Bereichen.

**Tabelle 3.4** Statistik des mit Cyana 2.0 berechneten Ensembles aus 10 Cecropin P1-Strukturen

<b>Zuordnung-Vollständigkeit (H<sub>X</sub>/H<sub>N</sub>)</b>	
insgesamt	170
fehlend	18
Vollständigkeit	88,1 %
<b>NOE-Abstandsbeschränkungen</b>	
Intraresidual (i,i)	74
Sequentiell (i, i+1)	58
Mittelweit (≤i, i+4)	12
Weitreichend (>i, i+4)	12
Total	156
<b>Ramachandranplot-Regionen (% aller Aminosäuren)</b>	
Favorisiert	80,4
Erlaubt	19,6
Außerhalb liegend	0
<b>Root mean square deviation (RMSD [Å])</b>	
Peptidrückgrat (durchschnittl.)	3,12 ± 0,75
Schwere Atome (durchschnittl.)	4,04 ± 0,70
Helix 1 (AS 3-7)	0,25 ± 0,05
Helix 2 (AS 13-20)	0,57 ± 0,29
<b>Durchschnittlicher Sekundärstrukturgehalt [%]</b>	
α-Helix	44,8
Schleife/ungeordnet	55,2

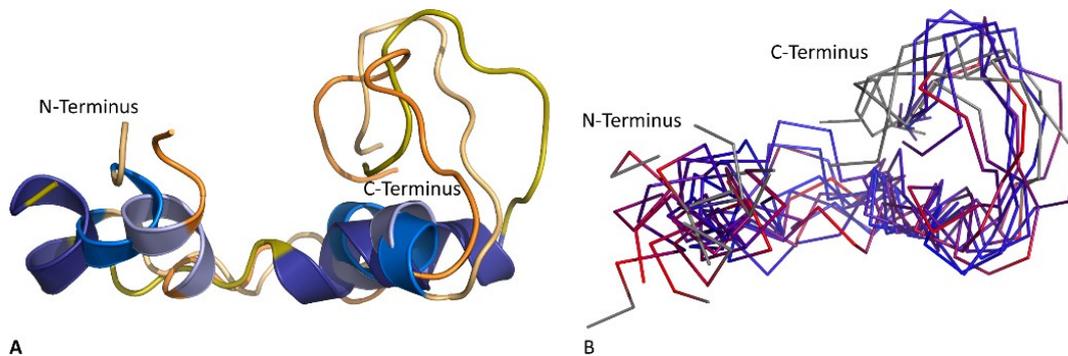
Der ebenfalls von Cyana ausgegebene Ramachandran-Plot für das Ensemble aus den 10 Cecropin P1 Strukturen ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Dabei befinden sich 80,4 % der Aminosäuren in favorisierten und 19,6 % in zusätzlich erlaubten Bereichen.



**Abbildung 3.22** Ramachandran-Plot des Cecropin P1 Ensembles

In Abbildung 3.23 ist das Ergebnis aus der Strukturrechnung mit Cyana 2.0 visualisiert. Die Abbildung 3.23 A zeigt beispielhaft drei Strukturen aus dem 10 Strukturen beinhaltenden Ensemble. Es sind zwei Bereiche identifizierbar, welche als α-Helix vorliegen. Eine kürzere Helix ist direkt am N-Terminus lokalisiert (Helix 1 AS 3-7) an die sich unterbrochen durch einen *Loop* eine zweite minimal längere Helix anschließt (Helix 2 AS 13-20). Der C-Terminus (ab G21) liegt unstrukturiert vor, ist aber in allen Strukturen des Ensembles zur zweiten Helix hin gebogen. Abbildung 3.23 B zeigt das

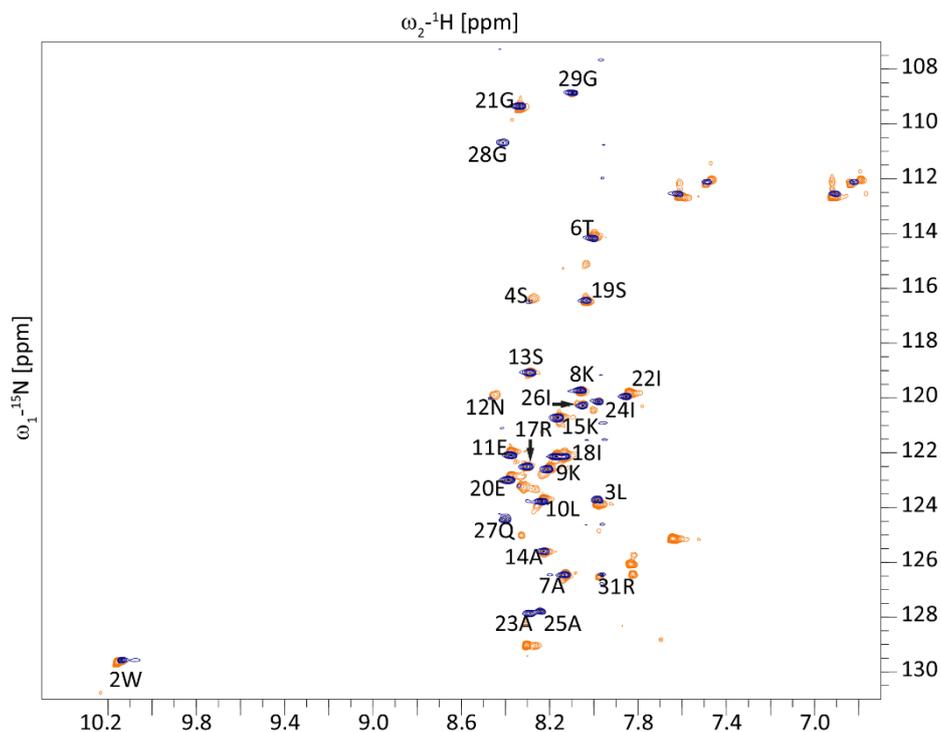
Proteinrückgrat der 10 berechneten Strukturen des Ensembles. Diese wurden ausgerichtet am häufigsten vorkommenden  $\alpha$ -Helix-Bereich (S13 – E20). Die Färbung gibt dabei hohe RMSD-Werte (rot) und niedrige RMSD-Werte (blau) an. Grau gefärbte Bereiche wurden nicht berücksichtigt. Es wird deutlich, dass der Hauptteil der Strukturen mit nur geringen Abweichungen überlagert werden kann.



**Abbildung 3.23 Die Struktur von Cecropin P1**

**A** zeigt drei Cecropin P1 Strukturen des Ensembles in der *Cartoon*-Darstellung. Die *Loop*-Bereiche sind in Orangetönen dargestellt, die helikalen Bereiche in Blautönen. Die Länge und Ausrichtung der Helices zueinander variieren. Der C-terminale Bereich (G21-R31) ist unstrukturiert und mit der C-terminalen Aminosäure zur zweiten Helix hin gebogen. **B** stellt die Peptidrückgrate der 10 berechneten Strukturen von Cecropin P1 dar. Diese wurden anhand des im Strukturen-Ensemble am häufigsten vorkommenden Helix-Bereiches (S13-E20) ausgerichtet. Die Färbung bezieht sich auf die RMSD der Strukturen. Blau zeigt geringe RMSD-Werte während Rot für hohe RMSD-Werte steht. Grau gefärbte Bereiche wurden nicht aligniert.

Für weitere NMR-Spektroskopische Untersuchungen des Cecropin P1 war ein vollständig zugeordnetes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum notwendig (Kapitel 3.4.1 Relaxationsmessungen, 3.4.2. Dynamik). Zunächst wurde ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC unter Nutzung des natürlich vorkommenden  $^{15}\text{N}$ -Isotops im synthetischen Cecropin P1 aufgenommen und mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -Zuordnung aus den homonuklearen 2D-Spektren die  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet. Die durchzuführenden Messungen (Kapitel 3.4.1 Relaxationsmessungen, 3.4.2. Dynamik) erforderten die Verwendung von rekombinantem  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertem Cecropin P1, da die Mengen an natürlich vorkommendem  $^{15}\text{N}$ -Isotop zu gering sind und die Messzeiten dadurch untragbare Ausmaße annehmen würden. Das aufgenommene und zugeordnete  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAS-HMQC des synthetischen Cecropin P1 wurde mit dem aufgenommenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des rekombinanten  $^{15}\text{N}$ -markierten Cecropin P1 verglichen, um zu überprüfen, ob sich rekombinantes und synthetisches Peptid unter gleichen Messbedingungen (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5, 37 °C) auch vergleichbar verhalten (Abbildung 3.24). Es zeigt sich, dass die Spektren bis auf einige zusätzliche Signale im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des rekombinanten Cecropin P1 deckungsgleich sind. Diese zusätzlichen Signale werden über die Messzeit stärker und es ist zu vermuten, dass es sich dabei um Signale die durch Peptid-Abbau entstehen, handelt. Anhand der Abbildung 3.24 wird deutlich, dass sich synthetisches und rekombinantes Cecropin P1 unter gleichen Messbedingungen auch gleich verhalten. Somit sind alle mit rekombinanten Protein gemessenen Spektren und daraus resultierende Erkenntnisse für Cecropin P1 unabhängig von den verwendeten Synthesemethoden gültig.



**Abbildung 3.24 Überlagerung des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCs von rekombinatem und des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQCs vom synthetischen Cecropin P1**

Aufgenommen wurden die Spektren unter gleichen Messbedingungen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 bei 37 °C. In den Spektren sind die jeweiligen Kopplungen zwischen den  $\text{H}_\text{N}$ -Protonen und den N-Atomen der einzelnen Aminosäuren erkennbar. Das Spektrum des rekombinanten Cecropin P1 ist orange dargestellt und das Spektrum des synthetischen Cecropin P1 ist in dunkelblau dargestellt. Die den Signalen zugeordneten Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit Sequenzposition gekennzeichnet. Evident wird, dass die Spektren, bis auf einige zusätzliche Signale im Spektrum des rekombinanten Cecropin P1, deckungsgleich sind. Diese sind wahrscheinlich auf einen Abbau des Peptids zurückzuführen.

### Untersuchung zur Dynamik von Cecropin P1

Bis heute wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen der Cecropine nur in Membran-ähnlicher Umgebung zur strukturellen Charakterisierung durchgeführt [43, 99, 134]. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Dynamik wurde in Ermangelung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Peptid bisher vernachlässigt. Die Untersuchung des Cecropin P1 in Hinblick auf die Dynamik in hydrophiler Umgebung ist aufgrund seiner geringen Strukturierung (45 %  $\alpha$ -Helix, 55 % unstrukturiert) und der hohen Flexibilität (RMSD über Peptidrückgrat = 3,12) sehr interessant.

Zur Charakterisierung der Dynamik von Cecropin P1 wurde ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQCNOE (Tabelle 2.23) aufgenommen und ausgewertet (Kapitel 2.6.3). Die Zuordnung der NOE-Signale des Spektrums erfolgte mit Hilfe eines vollständig zugeordneten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums (Abbildung 3.24). Die Signalintensität des gemessenen hetNOEs ist abhängig von den Bewegungen des jeweiligen detektierten  $\text{H}_\text{N}$ -Bindungsvektors. Das hetNOE-Signal enthält alle Bewegungsmöglichkeiten, die die dipolaren Kopplungen im ns-Bereich beeinflussen. Berechnet wird der hetNOE über den Quotienten aus  $I_{\text{sat}}$  und  $I_{\text{eq}}$  (Formel 2.4).

Jegliche Dynamik wird dabei beeinflusst von der Größe eines Peptids oder Proteins. Peptide bzw. Proteine deren Produkt aus der Lamorfrequenz von Stickstoff ( $\omega_\text{N}$ ) und der Rotationskorrelationszeit

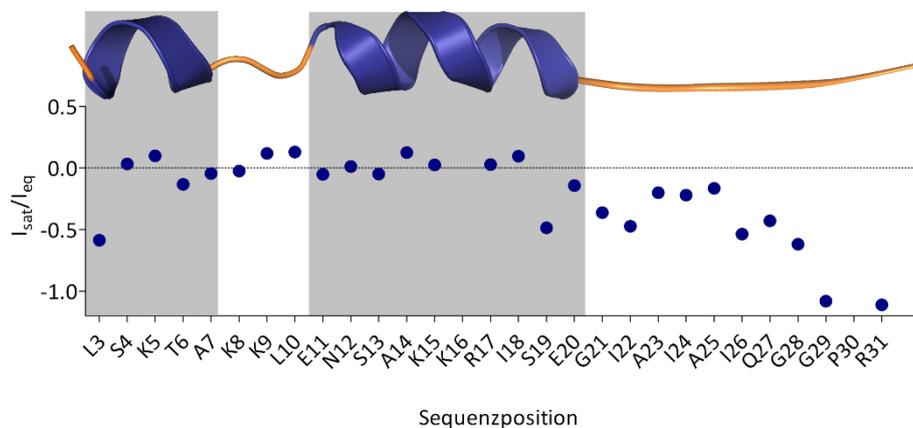
( $\tau_c$ ) deutlich kleiner als 1 ( $\omega_N \cdot \tau_c \ll 1$ ) sind schnelle rotierende Grenzfälle [140]. Dies gilt nicht für Cecropin P1.

$$\text{Denn: } \omega_N = 2 \times \pi \times \nu_N = 2 \times \pi \times 70,971 \times 10^6 \text{ s}^{-1} = 4,4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}.$$

Dabei ist  $\nu_N$  die Resonanzfrequenz von  $^{15}\text{N}$ , welche bei 700 MHz (entspricht 16,44 T)  $70,971 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  beträgt. Wenn  $\omega_N = 4,4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  beträgt und  $\tau_c$  mit 2,16 ns berechnet wurde (Kapitel 3.4.1), dann ist

$$\omega_N \times \tau_c = 4,4 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \times 2,16 \times 10^{-9} \text{ s} = 0,96 \approx 1.$$

Für Cecropin P1 ist das Produkt  $\omega_N \cdot \tau_c$  nicht deutlich kleiner als 1 aber es gilt:  $\omega_N \cdot \tau_c < 1$ . Bei kleinen Peptiden wie Cecropin P1 mit  $\omega_N \cdot \tau_c < 1$  werden dabei hetNOE-Werte im Bereich von  $\leq -0,5$  erwartet [141]. Der durch Auswertung der Spektren erhaltene heteronukleare NOE ist dabei das Maß für die Dynamik Formel 2.4 berechnet (Kapitel 2.6.3). Abbildung 3.25 stellt die berechneten hetNOEs der einzelnen Aminosäuren dar.



**Abbildung 3.25 Die heteronuklearen NOEs des Cecropin P1**

Abgebildet sind die heteronuklearen NOEs für die einzelnen Aminosäuren des Cecropin P1. Grau unterlegt sind die Bereiche die laut berechneter Struktur  $\alpha$ -helikal sind. Die abgebildete Struktur des Peptids ist modifiziert, um eine bessere Vergleichbarkeit mit dem hetNOE zu ermöglichen. Deutlich wird, dass die Aminosäuren im Bereich der  $\alpha$ -Helices mit überwiegend positiven Werten unflexibler sind als der C-terminale Loop (G21-R31) welcher deutlich negativere Werte besitzt und somit flexibler zu sein scheint.

Die errechneten hetNOE-Werte zeigen, dass die N-terminale Hälfte des Cecropin P1 weniger flexibel ist, als die C-terminale Hälfte. Während die N-terminale Hälfte des Cecropin P1 (AS 4-18) positive und schwach negative hetNOE-Werte annimmt, ist der hetNOE der C-terminalen Hälfte von Cecropin P1 (AS 19-31) durchgehend negativ.

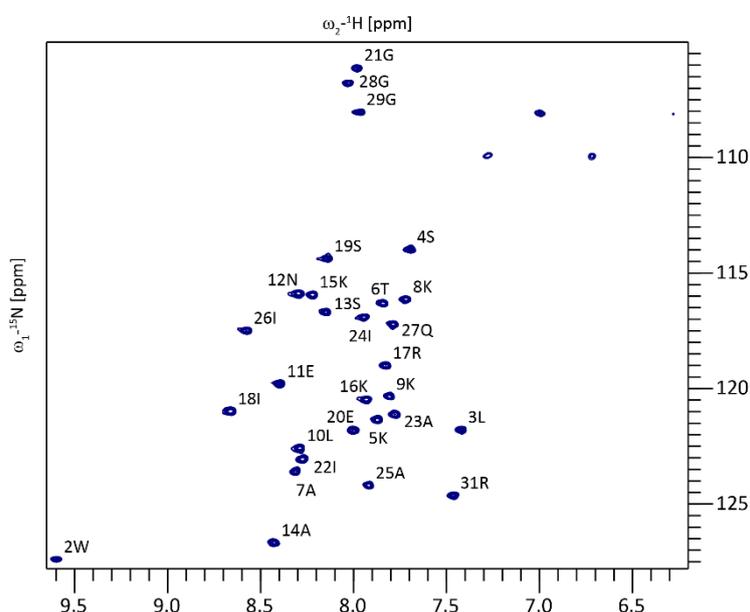
### 3.5 Interaktion von Cecropin P1 mit membranähnlichen Systemen

Die Untersuchung der Interaktion von Cecropin P1 mit Membranen ist nicht nur interessant, weil gezeigt wurde, dass die Cecropine sich in Membran-ähnlicher Umgebung falten [43, 88, 89, 99, 134, 135], sondern auch weil ihre Toxizität in Bakterien auf eine Interaktion mit der Bakterienmembran zurückgeführt wird [94, 142-144]. Der genaue Mechanismus dieser Interaktion wird dabei weiterhin diskutiert.

Die Interaktion von Cecropin P1 mit Bakterienmembranen näher zu verstehen, setzt voraus, dass man sowohl geeignete Messmethoden als auch die geeigneten Membransysteme zur Verfügung hat. Sipos *et al.* nutzten dafür die CD- und NMR-Spektroskopie mit synthetischem Cecropin P1 in 30 %, im Falle der NMR-Messungen deuteriertem, HFIP [99]. Mittels CD-Spektroskopie zeigten sie, dass bei

30 % HFIP ein maximaler  $\alpha$ -helikaler Sekundärstrukturanteil (23,8 AS) von Cecropin P1 erreicht wird und lösten daraufhin die Struktur des Peptides mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in 30 % deuteriertem HFIP.

Für einen direkten Vergleich wurden zunächst mit synthetischem Cecropin P1 in 30 % deuteriertem HFIP  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC-Spektren aufgenommen und die Signale im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -SOFAST-HMQC-Spektrum zugeordnet. Die Abbildung 3.26 zeigt das zugeordnete Spektrum von synthetischem Cecropin P1 in 30 % deuteriertem HFIP. Die Signale sind hier sehr gut verteilt und die Zuordnung deckt sich mit der von Sipos *et al.* [99]. Nachfolgend wurden Titrationsmessungen mit steigenden bzw. sinkenden HFIP-Konzentrationen durchgeführt um den Übergang vom Zustand des Cecropin P1 in 30 % HFIP in ein hydrophiles Milieu (und umgekehrt) näher analysieren zu können. Während der Titrationsmessungen kam es bei Zugabe von 5 % HFIP zu einem sprunghaften Übergang zwischen dem Zustand des Cecropin P1 in wässriger Umgebung zu dem Zustand, welcher bei 30 % HFIP vorliegt (Abbildung 3.26).

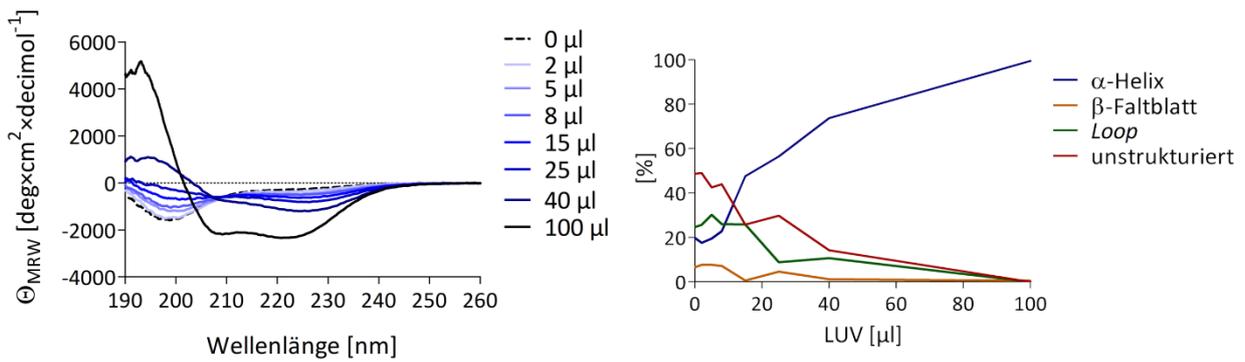


**Abbildung 3.26** Zugeordnetes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Cecropin P1 in 30 % HFIP<sub>d2</sub>

Das Spektrum zeigt die Kopplungen zwischen den H<sub>N</sub>-Protonen und den N-Atomen jeder einzelnen Aminosäure des Peptids. Die Signale sind gut verteilt und ihre Frequenzen decken sich mit denen von Sipos *et al.* [99].

Da es mit Hilfe der Titrationsexperimente unter Nutzung von HFIP nicht möglich war, den Übergang zwischen den Zuständen des Cecropin P1 von hydrophilen zu hydrophobem Milieu näher zu untersuchen, sollten andere Membran-ähnliche Systeme getestet werden.

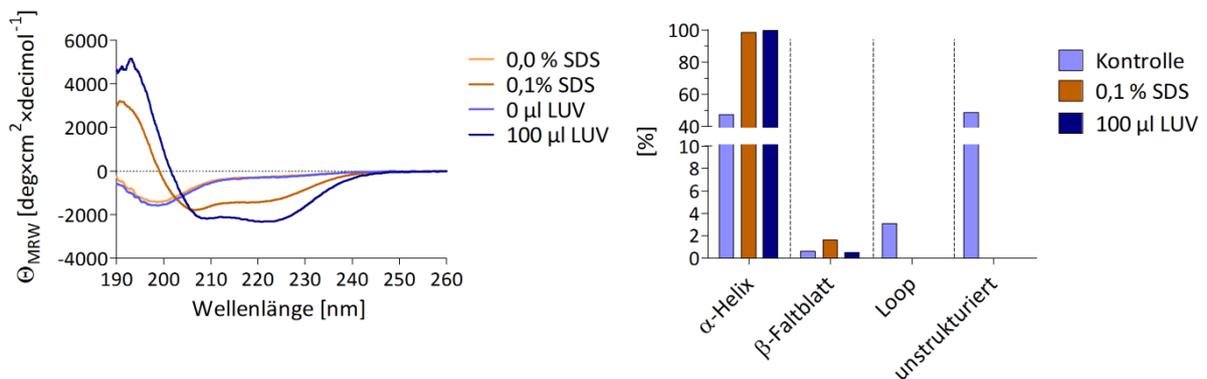
Dafür wurden zunächst CD-Spektren mit synthetischem Cecropin P1 und unterschiedlichen Membran-ähnlichen Umgebungen aufgenommen (Kapitel 2.6.2). Eine erste Titrationsreihe wurde mit LUV (*large unilamellar vesicles*) durchgeführt, welche nach Morein *et. al* in ihrer Lipidzusammensetzung (POPE:POPG im Verhältnis 80:20) *E. coli* Membranen ähneln [115] (Kapitel 2.5.8) (Abbildung 3.27). Zu erkennen ist, dass mit zunehmender Menge an Vesikeln der Anteil an  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelementen sichtbar zunimmt. Das CD-Spektrum des Titrationsendpunktes (100  $\mu\text{l}$  LUV-Präparation) nimmt dabei ein für ein  $\alpha$ -helikales Peptid charakteristisches Spektrum an. Die Gegenwart von Vesikeln induziert nachweislich die Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Sekundärstrukturen.



**Abbildung 3.27 CD-Spektren der LUV-Titration**

Die CD-Spektren (links) zeigen mit zunehmender LUV-Konzentration (hellblau zu schwarz) einen zunehmenden  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteil. Rechts ist die Sekundärstrukturanalyse CONTIN-LL über den Titrationsverlauf dargestellt.

LUV eignen sich aufgrund ihrer variablen Größe und ihrer fortschreitenden Fusion über die Zeit nicht für die NMR-Spektroskopie. Um einzuschätzen, wie ähnlich sich dazu ein sehr viel artifizielles, aber für die NMR-Spektroskopie geeigneteres System in Form von SDS-Mizellen verhält, wurde eine zweite Titration mit SDS durchgeführt und die Spektren der Anfangs- und Endpunkte der Titrationsreihen miteinander verglichen (Abbildung 3.28). Die Endpunkt-Spektren beider Titrationsreihen, deuten auf das Vorhandensein von  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturen hin. Die Sekundärstrukturanalyse (CONTIN-LL) sieht sowohl für das Spektrum nach Zugabe von 100 µl LUV als auch für das Spektrum nach Zugabe von 0,1 % SDS nahezu 100 %  $\alpha$ -Helix-Anteil voraus. Trotzdem verhalten sich die Spektren in ihrem Verlauf nicht identisch, was auf nicht durch CD-Spektroskopie quantifizierbare Unterschiede hinweist.

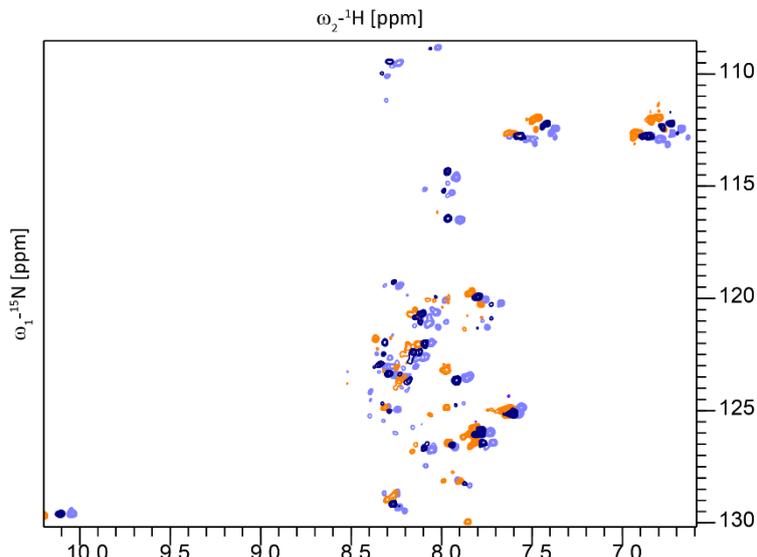


**Abbildung 3.28 Vergleich der CD-Spektren aus den Titrationsexperimenten mit LUV und SDS**

Die Abbildung zeigt die CD-Spektren der Ausgangs- und Endpunkte der SDS- und LUV-Titration mit Cecropin P1 (links). Beide Spektren zeigen eine charakteristische Veränderung von einem unstrukturierten zu einem überwiegend  $\alpha$ -helikalem Peptid. Die Spektren der Endpunkte sind dabei nicht identisch. Rechts ist die Sekundärstrukturanalyse der Spektren (CONTIN-LL) dargestellt. Ausgangspunkt ist ein Peptid mit ca. 45 %  $\alpha$ -helikalem Sekundärstrukturanteil und nahezu gleich viel unstrukturiertem Anteil. Die Zugabe von 0,1 % SDS und 100 µl LUV-Präparation bewirkt ein nahezu rein  $\alpha$ -helikales Peptid im Vergleich zur Kontrolle bestehend aus in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 gelöstem Peptid.

Aufgrund der CD-Messungen wurde anschließend ein Membransystem getestet, dass sowohl eine Doppellipidschicht als auch die Möglichkeit besitzt mittels NMR-Spektroskopie untersucht zu werden. Dafür wurde gefriergetrocknetes <sup>15</sup>N-markiertes Cecropin P1 (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5) in 600 µl einer Bizellpräparation (90 % H<sub>2</sub>O und 10 % d<sub>2</sub>O) aufgenommen (Kapitel 2.5.8). Zunächst wurden bei verschiedenen Temperaturen <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren aufgenommen, da die Bizellen sich abhängig von der Temperatur unterschiedlich verhalten. Zu beobachten war, dass die Probe bei 15 °C klar, bei 25 °C milchig und bei 39 °C wieder klar war. Die Abbildung 3.29 zeigt die drei

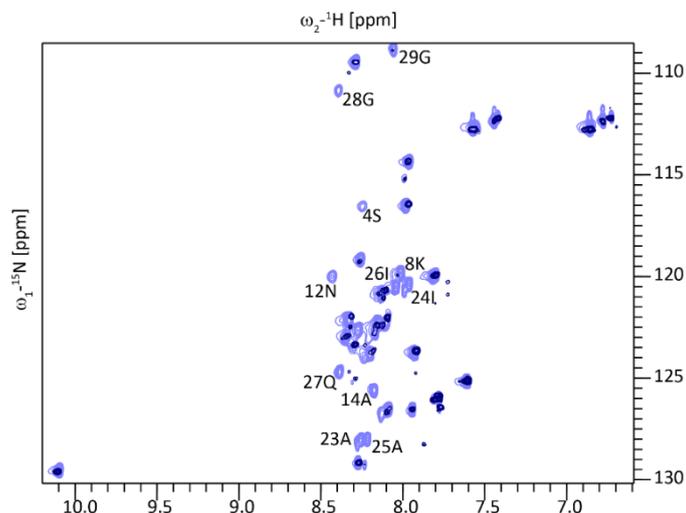
überlagerten Spektren, die bei den verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden. Deutlich zu erkennen ist hier, dass eine Steigerung der Messtemperatur zu weniger Signalen in den Spektren führt. Eine breitere Verteilung der Signale verglichen mit dem Spektrum in 30 % HFIP ist nicht zu beobachten.



**Abbildung 3.29**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von CecP1 mit Bizellpräparation bei variierenden Temperaturen

Gezeigt sind die Spektren gemessen bei 15 °C (hellblau), 25 °C (dunkelblau) und 39 °C (orange). Deutlich zu erkennen ist, dass die Signale mit zunehmender Messtemperatur teilweise verschwinden.

Bei Vergleich der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Cecropin P1 mit und ohne Bizellen bei 25 °C fällt auf, dass die Signale der Aminosäuren 23 bis 29 in den Spektren mit der Bizellpräparation durchgehend fehlen (Abbildung 3.30). Dabei handelt es sich um den hydrophoben C-Terminus (23-AIAIQGG-29) des Cecropin P1.

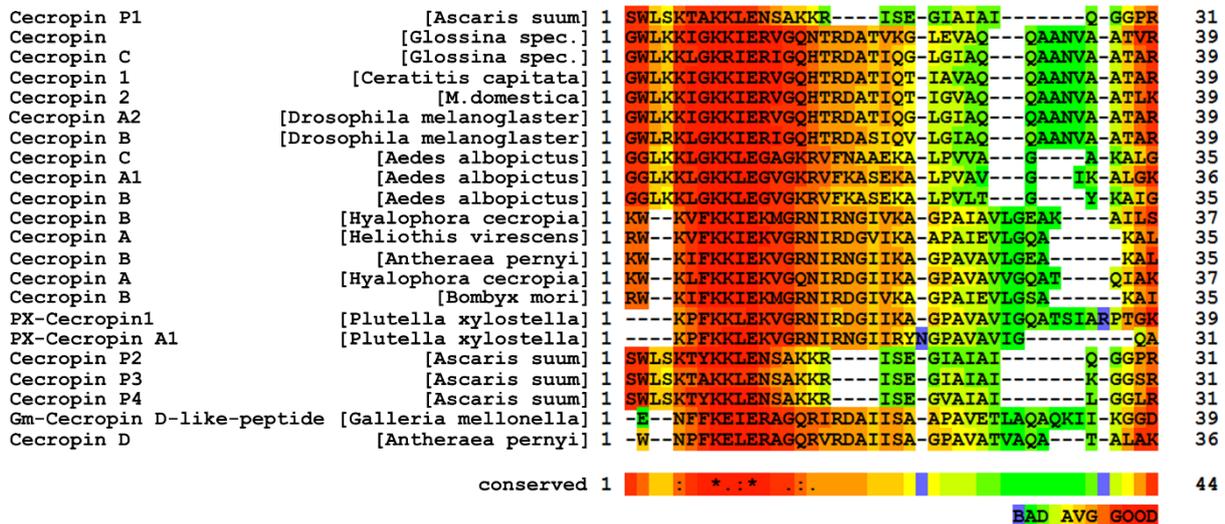


**Abbildung 3.30**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von CecP1 mit und ohne Bizellpräparation bei 25 °C

Die Abbildung zeigt die Spektren von Cecropin P1 mit (dunkelblau) und ohne Bizellpräparation (hellblau) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5. Gekennzeichnet sind alle Aminosäuresignale, die im Spektrum mit Bizellen verschwinden. Auffällig ist dabei besonders, dass die Signale der C-terminalen Aminosäuren 23-29 (AIAIQGG) komplett verschwinden.

### 3.6 Funktionelle Charakterisierung von Cecropin P1

Um die Determinanten (z.B. Hydrophobizität, Länge) der Toxizität von Cecropin P1 näher bestimmen zu können und Rückschlüsse auf den dahinterliegenden Mechanismus zu ziehen, wurden verschiedene Varianten des Cecropin P1 entworfen und in *E. coli* auf ihre Toxizität hin getestet. Um Varianten von Cecropin P1 zu entwerfen, wurde zunächst nach schon vorhandenen und getesteten Peptiden gesucht und ein aktuelles multiples Sequenzalignment aller Cecropine angefertigt, um konservierte und nicht konservierte Bereiche innerhalb der Cecropine zu identifizieren. Die Abbildung 3.31 zeigt das multiple Sequenzalignment (T-Coffee [106]) der bekannten Cecropine [106]. Hier wird deutlich, dass der N-terminale Abschnitt (AS 1-16 in Cecropin P1) mit seinem hohen Anteil an geladenen Aminosäuren (Lysin, Glutamat) relativ stark konserviert ist. Der C-terminale Sequenz-Bereich (AS 17-30 in Cecropin P1), welcher vorrangig aus hydrophoben Aminosäuren besteht ist in Hinblick auf die Aminosäuresequenz nicht konserviert. Die C-terminalen Positionen (2-3 AS) sind laut Sequenzalignment hingegen eine Gemeinsamkeit der Cecropine.



**Abbildung 3.31 Multiples Sequenzalignment der Cecropine**

Das multiple Sequenzalignment umfasst alle Cecropin-Sequenzen aus der *Antimicrobial Peptide Database* [19, 20]. Es zeigt eine stärkere Sequenz-Konservierung (rot) in der N-terminalen Hälfte der analysierten Sequenzen. Die C-terminale Hälfte der Sequenzen ist schwach konserviert (grün und blau). Die C-terminale Aminosäure ist hingegen wieder gut konserviert.

Die meisten bereits durchgeführten Modifikationen der Cecropine wurden innerhalb der konservierten Aminosäuren durchgeführt und untersucht [88, 143, 145]. Dies Bezieht das N-Terminale Tryptophan (W2) und die Glycin-Prolin-Sequenz (G21, P22) mit ein. Christensen *et al.* tauschten innerhalb der Cecropine (Cecropin A, B und D) ganze Bereiche mit unterschiedlichen Eigenschaften (Amphipathie, Hydrophobizität, Flexibilität) gegeneinander aus [87] und Vunnam *et al.* untersuchten unter anderem das Verhalten von D-Cecropin P1, amidierem Cecropin P1, Retro-Cecropin P1 und vielen mehr [98]. In den meisten Studien wurde dem N-terminalen Bereich der Cecropine aufgrund seiner Amphipathie mehr Bedeutung zugesprochen als dem hydrophoben C-Terminus mit der geringen Sequenzhomologie innerhalb der Cecropine.

### 3.6.1 Die Rolle der Hydrophobizität des C-terminalen Bereichs von Cecropin P1

Aufgrund der vorausgehenden durchgeführten Studien und des multiplen Sequenzalignments der Cecropine (Abbildung 3.31) wurden zunächst Variationen von Cecropin P1 entworfen, die sich im hydrophoben C-Terminus des Peptides unterscheiden. Dieser wurde bisher kaum untersucht und wenn auch die Sequenzhomologie in diesem Bereich innerhalb der Cecropine nicht sehr hoch ist, so ist ihnen das häufige Vorkommen hydrophober Aminosäuren gemeinsam.

Abbildung 3.32 bietet eine Übersicht über die entworfenen und getesteten Peptide. Mit Cecropin P1  $\Delta$ 21-31 sollte zunächst die Notwendigkeit des C-Terminus für die Toxizität getestet werden. Mit Cecropin P1 I24E sollte überprüft werden, inwiefern eine einzige negative Ladung im hydrophoben Bereich des C-Terminus, die Toxizität beeinflusst. Cecropin P1 22-27 ALAVAI wurde als eine alternative ebenfalls hydrophobe Sequenz gewählt, um zu testen, wie Sequenz-spezifisch die Toxizität sich verhält. Bei Cecropin P1 22-27 KGKSEE wurde der hydrophobe Anteil durch einen hydrophilen,  $\alpha$ -helikalen Bereich aus Troponin C ersetzt (1NCX.pdb) [146]. Letztendlich wurde ein weiteres Peptid mit alternativer hydrophober Sequenz entworfen, bei der die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix unwahrscheinlich ist (Cecropin P1 22-27 VVLVVL). Durch die letzten beiden Peptide, wurde somit der Fragestellung nachgegangen, inwiefern eine mögliche  $\alpha$ -Helix-Formation unabhängig von der Hydrophobizität für die Toxizität nötig wäre.

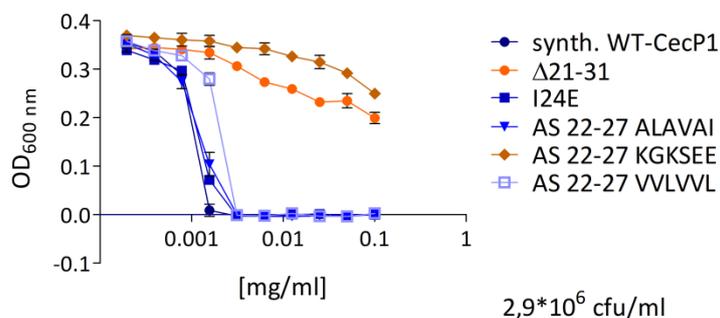
Zusätzlich wurde ein Peptid entworfen, welches anstatt des gut konservierten hydrophoben Tryptophans am N-Terminus, einen hydrophoben Farbstoff (FITC) über einen Aminohexan-Linker (Ahx) gebunden hat. Es sollte hier überprüft werden, inwiefern der Farbstoff das nachweislich für die Toxizität nötige Tryptophan [145] ersetzen kann und sollte gleichzeitig eine Visualisierung des Peptides in Membranen ermöglichen.

Peptid	Sequenz
Wildtyp-Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRIS <del>EGIAIAI</del> QGGPR
FITC-Ahx- $\Delta$ S1W2-CecP1	<b>FITC-Ahx-</b> LSKTAKKLENSAKKRIS <del>EGIAIAI</del> QGGPR
Cecropin P1 $\Delta$ 21-31	SWLSKTAKKLENSAKKRIS <del>E</del>
Cecropin P1 I24E	SWLSKTAKKLENSAKKRIS <del>EGIAE</del> AIQGGPR
Cecropin P1 22-27 ALAVAI	SWLSKTAKKLENSAKKRIS <del>E</del> GA <b>ALAVAI</b> GGPR
Cecropin P1 22-27 KGKSEE	SWLSKTAKKLENSAKKRIS <del>E</del> GA <b>KGKSEE</b> GGPR
Cecropin P1 22-27 VVLVVL	SWLSKTAKKLENSAKKRIS <del>E</del> GA <b>VVLVVL</b> GGPR

**Abbildung 3.32 Übersicht über die entworfenen Cecropin P1-Variationen I**

Übersicht über die modifizierten Peptide und deren Sequenzen im Vergleich zum Wildtyp-Cecropin P1. Modifizierte Bereiche sind dabei in Blau gekennzeichnet.

Die Toxizität der Peptide wurde dann mit Hilfe des etablierten MIC-Tests (Kapitel 3.3.1), unter Determinierung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) untersucht. Abbildung 3.33 zeigt einen der mit den entworfenen Peptiden durchgeführten MIC-Tests. Durch das völlige Fehlen des C-Terminus (Cecropin P1  $\Delta$ 21-31) und die Umkehrung der Hydrophobizität (Cecropin P1 AS 22-27 KGKSEE) ist keine MIC unter den getesteten Peptidkonzentrationen mehr determinierbar. Die restlichen hydrophoben Peptide besitzen hingegen die gleiche MIC wie das Wildtyp-Cecropin P1, auch das Peptid dessen hydrophober Bereich durch eine negative Ladung unterbrochen wird (Cecropin P1 I24E) (Tabelle 3.5).



**Abbildung 3.33 MIC-Determinierung für Cecropin P1 Varianten I (n=3)**

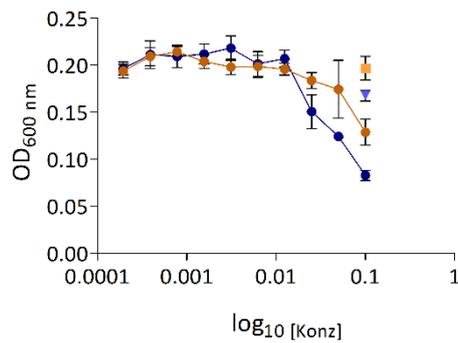
Die Zelldichte, gemessen bei 600 nm ist aufgetragen gegen den dekadischen Logarithmus der verwendeten Peptidkonzentration. Alle überwiegend hydrophoben Peptide sind in Blau dargestellt, während Peptide mit einem hydrophilen oder fehlenden C-Terminus durch Orangetöne dargestellt sind. Die hydrophoben Peptide verhalten sich in allen durchgeführten MIC-Tests (n=3) gleich.

Die MICs wurden mit vergleichbaren Zellzahlen von  $2,5-3,8 \times 10^6$  cfu/ml durchgeführt. Dabei lag die toxische Konzentration aller in Tabelle 3.5 aufgeführten Peptide mehrheitlich bei  $3,13 \mu\text{g/ml}$ , was  $0,94 \mu\text{M}$  Cecropin P1 entspricht. Im Folgenden werden für die bessere Vergleichbarkeit mit Literaturwerten die MICs in  $[\mu\text{g/ml}]$  und  $[\mu\text{M}]$  angegeben.

**Tabelle 3.5 MICs der Cecropin P1-Peptide**

Peptid	MIC $[\mu\text{g/ml}]/[\mu\text{M}]$			
	Versuch [n]	1	2	3
WT-CecP1		3,13/0,94	6,25/1,9	3,13/0,94
I24E		3,13/0,94	3,13/0,94	3,13/0,94
22-27 ALAVAI		3,13/0,94	6,25/1,9	3,13/0,94
22-27 VVLVVL		3,13/0,94	6,25/1,9	3,13/0,94

Das Cecropin P1 Peptid mit N-terminalem FITC-Molekül (FITC-Ahx- $\Delta\text{S1W2}$  CecP1) konnte nicht wie die anderen Peptide in einer Konzentration von  $1 \text{ mg/ml}$  in  $50 \text{ mM}$  Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 und  $150 \text{ mM}$  NaCl gelöst werden. Es wurden  $2 \text{ mg}$  des Peptides nur unvollständig in diesem Puffer vermengt mit  $60 \%$  (Endkonz.) DMSO gelöst. Die Konzentration konnte nicht bestimmt werden, da es nicht möglich war, eine definierte Masse an Peptid vollständig zu lösen und das DMSO eine Konzentrationsbestimmung über das Fluoreszenzsignal des FITC verfälscht. Somit kann nur gesagt werden, dass die Ausgangskonzentration dieses Peptides  $<1 \text{ mg/ml}$  ist. Die Stocklösung unbekannter Konzentration wurde dann wie die aller Peptide 1:10 in der höchsten Konzentration eingesetzt und dann seriell verdünnt. Abbildung 3.34 zeigt die bei einer Zellzahl von  $3,3 - 3,5 \text{ cfu/ml}$  getesteten FITC-Peptide und die dazugehörigen Wachstumskontrollen (im jeweils gleichen Farbton). Bei Betrachtung der Wachstumskontrollen in Abbildung 3.34 fällt auf, dass der Puffer in dem das Peptid gelöst ist, allein scheinbar toxischer ist als die meisten Ansätze mit Peptid. Die Wachstumskontrollen sind dabei mit dem Lösungsmittel des Peptides 1:10 versetzt (Endkonz  $6 \%$  DMSO).



**Abbildung 3.34 MIC-Test für FITC-Ahx-ΔS1W2 CecP1**

Gezeigt ist der Verlauf der Zelldichte gegen die verwendeten Peptidkonzentrationen (dunkelblau und braun). Die verwendeten Konzentrationen reichen nicht aus, um das sichtbare Bakterienwachstum zu unterdrücken. Der Verlauf der Zelldichte und die dazugehörige Wachstumskontrolle (orange und hellblau) mit Peptidlösungsmittel sind jeweils im gleichen Farbton aufgetragen.

### 3.6.2 Die Rolle der Länge des C-terminalen hydrophoben Bereichs des Cecropin P1

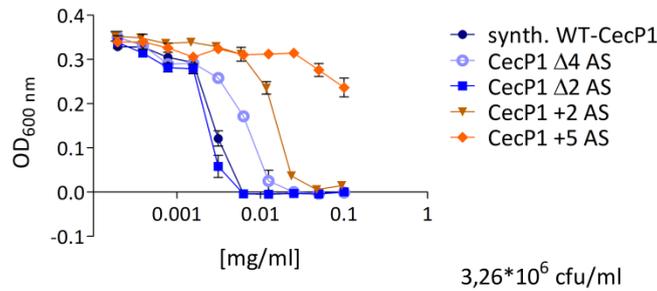
Die geringe Toxizität des CecP1 Δ21-31-Peptids lieferte Hinweise auf eine Notwendigkeit des C-Terminus von Cecropin P1. Der Austausch der hydrophoben Aminosäuren gegen hydrophile Aminosäuren verdeutlichte auch die Notwendigkeit der Hydrophobizität dieses Bereiches für die Toxizität. Eine zweite Gruppe entworfenen Peptide sollte klären, inwieweit die Länge des nachweislich notwendigen hydrophoben Bereichs des Cecropin P1 eine Rolle für die Toxizität spielt. Die Abbildung 3.35 zeigt die dafür entworfenen Peptide. Dabei wurde das ursprüngliche hydrophobe IAIAI-Motiv gekürzt oder verlängert.

Peptid	Sequenz
Cecropin P1 Δ4 AS	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIQGGPR
Cecropin P1 Δ2 AS	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGI <b>IAI</b> QGGPR
Wildtyp-Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGI <b>IAIAIAI</b> QGGPR
Cecropin P1 +2 AS	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGI <b>IAIAIAIAI</b> QGGPR
Cecropin P1 +5 AS	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGI <b>IAIAIAIAIAIAI</b> QGGPR

**Abbildung 3.35 Übersicht über die entworfenen Cecropin P1-Variationen II**

Die Abbildung zeigt die entworfenen Peptide und das Wildtyp-Cecropin P1. Der veränderte Bereich ist in allen Peptiden in blau dargestellt.

Diese Peptide wurden ebenfalls im direkten Vergleich zum Wildtyp-Cecropin P1 im MIC-Test getestet (Abbildung 3.36). Dabei wird deutlich, dass die MIC des um zwei Aminosäuren reduzierten Peptides (CecP1 Δ2 AS) mit der MIC des Wildtyps identisch ist (6,25 µg/ml). Eine weitere Reduktion um insgesamt 4 Aminosäuren vergrößert die MIC auf das Zwei- bis Vierfache (12,5 - 25 µg/ml). Das Hinzufügen von 2 Aminosäuren hat hingegen eine viel größere negative Auswirkung auf die Toxizität (MIC = 23,5 µg/ml), während für das um 5 Aminosäuren verlängerte Peptid keine MIC mehr feststellbar ist.



**Abbildung 3.36 MIC-Determinierung für Cecropin P1 Varianten II (n=2)**

Aufgetragen sind die Zelldichten gemessen bei 600 nm gegen die verwendeten Peptidkonzentrationen. Die verkürzten Peptide sind in Orangetönen und die verlängerten Peptide in Blautönen dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass sowohl die Verkürzung als auch die Verlängerung des Cecropin P1 einen negativen Effekt auf die Toxizität hat. Dabei ist der Effekt bei einer Verlängerung des Peptides größer als bei einer Verkürzung.

Tabelle 3.6 zeigt die gemessenen MIC für die Peptide. Hier zeigt sich deutlich, dass das um zwei Aminosäuren gekürzte Peptid bei sehr viel geringeren Konzentrationen toxisch ist (MIC = 6,25 µg/ml), als das um zwei Aminosäuren verlängerte Peptid (23,5 µg/ml).

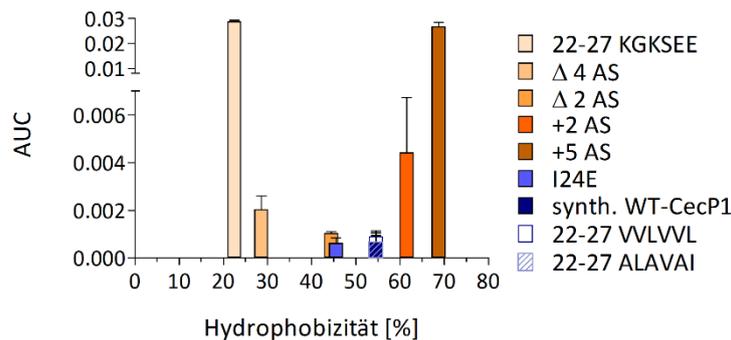
**Tabelle 3.6 MIC der Cecropin P1-Peptide II**

Peptid	MIC [µg/ml]/[µM]	
	Versuch [n]	
Δ4 AS	25/8,4	12,5/4,2
Δ 2 AS	6,25/1,98	6,25/1,98
+2 AS	-	23,5/6,6

Viele der getesteten Peptide haben die gleiche MIC, aber unterschiedliche Kurvenverläufe. Die identische MIC hängt damit zusammen, dass die Peptide seriell verdünnt und somit immer die gleichen Peptidkonzentrationen miteinander verglichen wurden. Die tatsächliche MIC kann dabei auch im Konzentrationsbereich zwischen zwei getesteten Peptidkonzentrationen liegen, wird aber nicht erfasst. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe (flache Neigung, steile Neigung) bei gleicher MIC verdeutlichen diesen nicht detektierten Unterschied in der MIC. Um die Unterschiede im Kurvenverlauf zu quantifizieren und die Auswirkungen der veränderter Hydrophobizität und Länge des C-terminalen Bereichs des Cecropin P1 genauer zu analysieren, wurde mit GraphPad Prism die AUC (*area under the curve*) für die einzelnen Peptidkurven berechnet und gegen die Länge bzw. Hydrophobizität aufgetragen (Abbildung 3.37 und Abbildung 3.38). Dabei gilt, je höher der Wert für die AUC, desto geringer ist die Toxizität. Als Grenzen für die Berechnung AUC wurden die höchste und niedrigste verwendete Peptidkonzentration genutzt.

Abbildung 3.37 zeigt die AUC der Peptide aufgetragen gegen die Hydrophobizität dieser. Die prozentuale Hydrophobizität bezieht sich hier nur auf den C-terminalen Teil der Peptide (ab AS 21), da der N-terminale Bereich bei allen Peptiden identisch und somit vernachlässigbar ist. Dabei wird deutlich,

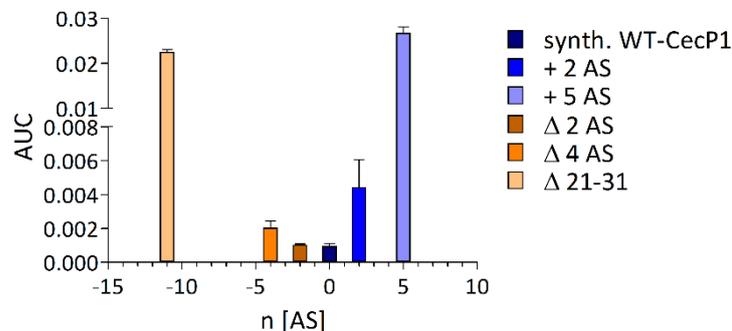
dass eine Hydrophobizität des C-Terminus von ca. 45 – 55 % benötigt wird um die toxische Wirkung des Cecropin P1 zu erhalten. Höhere und niedrigere Werte führen zu einer Abnahme der Toxizität.



**Abbildung 3.37 Einfluss der Hydrophobizität des C-terminalen Bereichs des Cecropin P1**

Aufgetragen ist die AUC (*area under the curve*) als Maß für die Toxizität ( $\uparrow$ AUC =  $\downarrow$ Toxizität) gegen die prozentuale Hydrophobizität des C-Terminus der Peptide ab Aminosäureposition 21. Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar (SEM). Erkennbar ist, dass die Toxizität im Bereich von ca. 45 %-55 % der Hydrophobizität des C-terminalen Bereichs mit der des Wildtyp-CecP1 (dunkelblau) übereinstimmt. Werte außerhalb dieses Bereiches haben negative Auswirkungen auf die Toxizität.

Abbildung 3.38 zeigt den Zusammenhang zwischen der Toxizität und der Länge des C-terminalen Bereichs der Cecropin P1-Peptide. Während die Verkürzung des Wildtyp-CecP1 um zwei Aminosäuren ( $\Delta$  2 AS) keinen Effekt auf die Toxizität hat, führt eine weitere Verkürzung zur Abnahme der toxischen Wirkung. Den gleichen Effekt auf die Toxizität hat auch eine Verlängerung des hydrophoben C-terminalen Bereichs.



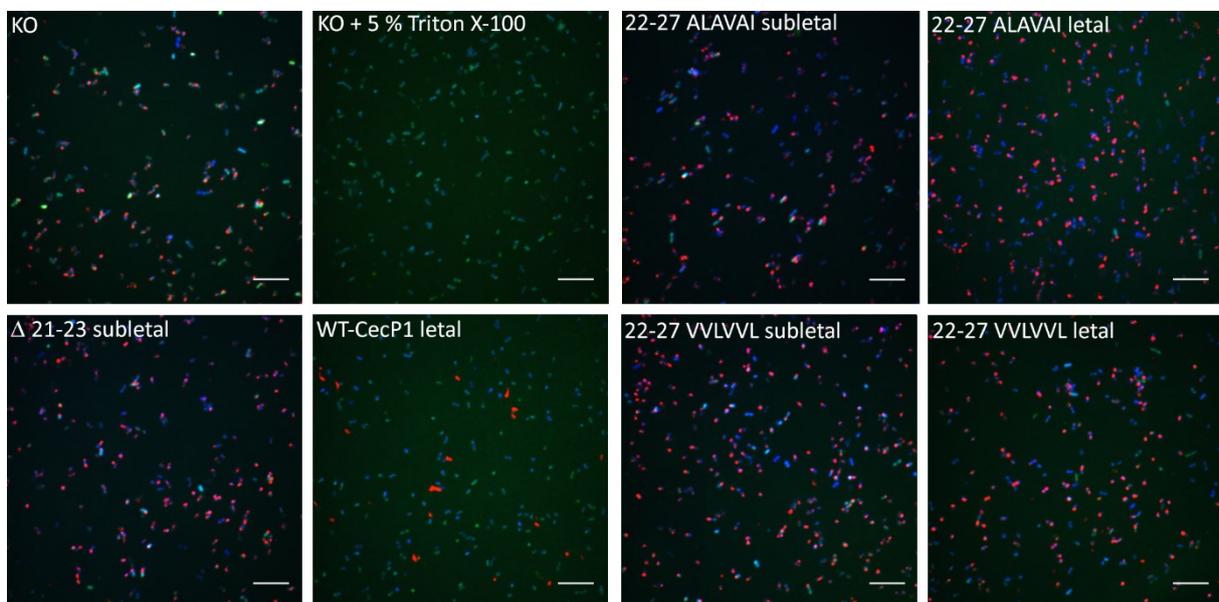
**Abbildung 3.38 Einfluss der Länge des hydrophoben C-Terminus des Cecropin P1**

Aufgetragen ist die AUC gegen die Länge des C-Terminus (n [AS]). Dabei wurde die Länge des Wildtyp-CecP1 null gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Es zeigt sich, dass eine Reduktion um 2 AS kaum einen Effekt auf die Toxizität hat. Eine weitere Reduktion führt aber zur Verringerung der Toxizität. Auch eine Verlängerung um 2 und 5 Aminosäuren wirkt sich stark negativ auf die Toxizität aus.

### 3.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Toxizität der Cecropin P1-Varianten

Zusätzlich zur Determinierung der minimalen inhibitorischen Konzentration der Cecropin P1 Varianten, sollte die Toxizität auch mit Hilfe der Dreifach-Fluoreszenzfärbung (Kapitel 3.3.2) näher untersucht werden. Die Zellen wurden dafür mit subletalen und letalen Dosen der Peptide (Kapitel 2.4.4) für eine Stunde inkubiert und anschließend gefärbt. Diese Dreifach-Färbung nach Inkubation von

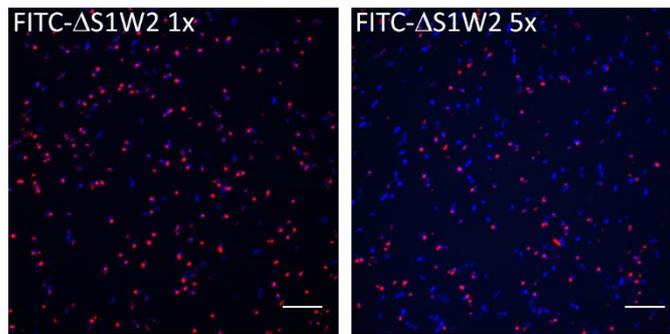
Bakterien mit antimikrobiellen Substanzen ermöglicht Aussagen über die metabolische Aktivität der Bakterien (CTC), die Membranpermeabilität (FITC) und die totale Anzahl an Bakterien (DAPI) (Kapitel 2.4.4) nach Inkubation mit den Peptiden. Abbildung 3.39 zeigt die mit verschiedenen Peptiden inkubierten Bakterien in Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Es fällt auf, dass auch die Kontrolle ohne vorheriger Peptidinkubation positiv für die FITC-Fluoreszenz ist. Zusätzlich ist die FITC-Fluoreszenz in den Proben, die mit Peptiden inkubiert wurden, mit der Kontrolle vergleichbar. Die Färbung lässt deswegen keine Schlussfolgerungen über die Membranintegrität der mit Peptid inkubierten Bakterienzellen zu. Bis auf die mit der letalen Dosis an Wildtyp-CecP1 und Triton inkubierten Bakterien, sind alle weiteren Bakterien nach 1 h der Inkubation mit letalen und subletalen Dosen der Peptide immer noch metabolisch aktiv, wie das rote Fluoreszenzsignal beweist. Obwohl also die Peptide CecP1 22-27 ALAVAI und CecP1 22-27 VVLVVL die gleiche MIC besitzen wie das Wildtyp-Peptid (Tabelle 3.5), gibt es trotzdem einen Unterschied in der Toxizität. Da die Peptide hier im Gegensatz zum MIC nur für eine Stunde mit den Bakterien inkubiert wurden, liegt ein zeitlicher Unterschied in der toxischen Wirkung nahe.



**Abbildung 3.39** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit CecP1-Peptiden inkubierten Bakterien

Der Messbalken entspricht 10  $\mu$ m. Die Aufnahmen zeigen die Überlagerung der CTC (rot), FITC (grün) und DAPI (blau) Fluoreszenz. Die Kontrolle (KO) wurde nur mit Peptidlösungsmittel inkubiert, die Kontrolle mit Triton diente als Negativkontrolle für die metabolische Aktivität und auch als Positivkontrolle für die FITC-Fluoreszenz. Für Letzteres erwies sich das Triton als ungeeignet (Vgl. KO). Bis auf die mit einer letalen Dosis des Wildtyp-CecP1 inkubierten Bakterien sind alle mit Peptiden inkubierten Bakterien respiratorisch aktiv.

Zusätzlich wurde auch das Peptid FITC- $\Delta$ S1W2 CecP1 untersucht. Die Färbung wurde dabei unter Auslassung der FITC-Färbung durchgeführt, um stattdessen die FITC-Fluoreszenz des Peptides detektieren zu können. Die Bakterien wurden mit der 1x initialen Dosis aus dem MIC und dem 5x der initialen Dosis inkubiert (Abbildung 3.40). Die Überlagerung der drei Fluoreszenzen zeigt, dass bei der Inkubation mit 1x Peptiddosis deutlich mehr Bakterien respiratorisch aktiv sind, als bei der Inkubation mit der 5x Dosis. Es ist bei beiden Proben keine FITC-Fluoreszenz erkennbar. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass das FITC- $\Delta$ S1W2-CecP1 nicht in die Bakterien eindringt und auch nicht intrazellulär lokalisiert ist.



**Abbildung 3.40** Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen nach Inkubation mit FITC- $\Delta$ S1W2 CecP1

Der Messbalken entspricht 10  $\mu$ m. Dargestellt ist die Überlagerung dreier Fluoreszenzen (DAPI, CTC, FITC). Die FITC-Fluoreszenz war dabei nicht detektierbar. Die mit der einfachen Dosis an Peptid inkubierten Zellen sind scheinbar respiratorisch aktiver als die mit der fünffachen Dosis inkubierten.

## 4. Diskussion

---

Als das Arbeits-übergreifende Hauptinteresse, kann man sicherlich die grundlegende und gründliche Untersuchung eines antimikrobiellen Peptides ansehen, um letztendlich definitive Aussagen über die Interaktion mit Biomembranen und über die Determinanten seiner Toxizität zu tätigen. Dafür mussten innerhalb dieser Arbeit zunächst die erforderlichen Grundvoraussetzungen geschaffen werden. Um zum Beispiel einen detaillierten Blick auf atomarem Level zu erhalten, erweist sich die NMR-Spektroskopie als geradezu ideal. Für viele der interessanten NMR-Experimente in hydrophiler und auch in Membran-ähnlicher Umgebung ist mindestens eine Anreicherung des Peptids mit dem Isotop  $^{15}\text{N}$  notwendig. So stand zu Beginn die Etablierung der Expression des  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereicherten Cecropin P1 in *E. coli* in ausreichenden Mengen im Vordergrund. Viele der bei der Etablierung der Expression erworbenen Erkenntnisse könnten anschließend auch bei der Produktion anderer antimikrobieller Peptide äußerst nützlich sein. Bis heute ist die Produktion  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereicherten Proteins durch Expression in *E. coli* die ertragreichste und dabei kostengünstigste Möglichkeit und ermöglicht eine Vielzahl an Experimenten, die für die Aufklärung des Wirkungsmechanismus sehr nützlich sein könnten.

Weiterhin sind die Informationen zu Cecropin P1 in hydrophiler Umgebung ohne Interaktion mit Membranen äußerst begrenzt, obwohl die Charakterisierung des Peptides in eben dieser Umgebung als Ausgangspunkt für die Interaktion mit Membranen ebenfalls Einsichten in den Mechanismus geben könnte. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit, den Zustand in hydrophiler Umgebung so gut wie möglich zu charakterisieren, sowohl strukturell als auch dynamisch.

Darauf aufbauend sollte die Interaktion von Cecropin P1 mit Membranen charakterisiert werden. Auch hierfür müssen erst die Voraussetzungen geschaffen werden. Die einzige dreidimensionale Struktur des Cecropin P1 in „Membrenumgebung“ ist eine NMR-Struktur in 30 % deuteriertem HFIP [99]. Dabei ist diese „Membrenumgebung“ recht weit entfernt von relevanten Biomembranen. Es ist also prinzipiell von Interesse Cecropin P1 in Interaktion mit natürlicheren Membransystemen zu untersuchen um der Charakterisierung der Membraninteraktion näher zu kommen. Dazu wurden aufgrund der Komplexität innerhalb dieser Arbeit zunächst erste Vorversuche realisiert.

Hinzu kommt, dass die Determinanten der Toxizität von Cecropin P1 bis heute nicht systematisch und zusammenhängend untersucht wurden. Dazu war es zunächst nötig, geeignete Testmethoden zur Abschätzung und Charakterisierung der Toxizität zu finden, anzupassen und laborintern zu etablieren. Anschließend wurden innerhalb dieser Arbeit verfügbare Informationen aus der Literatur, Beobachtungen aus der Etablierung der Expression und die Analyse eines multiplen Sequenzalignments genutzt, um erste Cecropin P1-Variationen zu entwickeln und deren Toxizität vergleichend zu determinieren und zu charakterisieren.

### 4.1 Das toxische Cecropin P1 ist in *E. coli* exprimierbar und reinigbar

---

Das insbesondere für *E. coli* und andere Gram<sup>-</sup> Bakterien hoch toxische Cecropin P1 sollte in *E. coli* exprimiert werden, was auf den ersten Blick aufgrund seines toxischen Charakters als ein Wagnis erscheint, aber auch gleichzeitig die kostengünstigste und ertragreichste Methode ist, um Isotopenangereichtes Peptid zu erhalten. Dass es durchaus möglich ist antimikrobielle Peptide und Proteine

in *E. coli* Isotopen-angereichert in ausreichenden Mengen zu produzieren, wurde gezeigt [147-150]. Dies geschah zumeist unter Verwendung von Fusionsproteinen, wodurch die exprimierten Proteine in *inclusion bodies* [148, 149] oder unlöslich vorlagen [147, 150]. Diese mussten dann aufwendig aus den unlöslichen Einschlusskörperchen isoliert und gereinigt werden. Anschließend wurde das Fusionsprotein durch Spaltung mit toxischem Bromcyan vom gewünschten Zielpeptid getrennt [148, 149] oder musste danach noch zurückgefaltet werden, um ein Schneiden mit der *yeast ubiquitin hydrolase* zu ermöglichen [147]. Zudem waren diese Fusionsproteine zum Teil immer noch toxisch und die Expressions-Strategie musste weiter angepasst werden. Die Verwendung eines löslichen Fusionsproteins, wie dem SUMO-Protein, für die Expression eines antimikrobiellen Peptids birgt ebenso die Gefahren der Toxizität für *E. coli*. Allerdings ist die Reinigung eines solchen löslichen Fusionsproteins unkomplizierter und das Schneiden mit Hilfe der SUMO-Protease ist spezifisch, ungiftig und man erhält Peptid mit nativer Aminosäuresequenz. Eine sehr ähnliche Strategie verfolgten Xu *et al.* welche für die Expression von Cecropin in *E. coli* einen Vektor konstruierten der als Fusionsprotein das lösliche *E. coli*-Protein Thioredoxin versehen mit einem 6 x Histidin-*tag* trug. Über die Enterokinase erhielten sie ebenfalls Cecropin mit nativer Aminosäuresequenz [151]. Eine Expression von <sup>15</sup>N-markiertem Protein wurde dabei nicht durchgeführt. Ein chimeres Peptid aus Cecropin A und D wurde mit dem SUMO-Fusionsprotein erfolgreich exprimiert [152]. Für die Expression wurde ein *B. subtilis*-Expressionssystem genutzt, welches für die Expression mit Isotopen-markiertem Protein nicht nutzbar ist. Bommarius *et al.* optimierten die Expression und Reinigung von 7 kationischen AMPs (u. a. LL-37) mit Hilfe eines SUMO-pET28a Vektors. Keines der 7 Fusionsproteine war toxisch [153]. Dies war für die Fusion aus Cecropin P1 und dem SUMO-Protein in dieser Arbeit nicht der Fall. Deswegen wurde auf das *E. coli* BL21 DE3 Derivat C43 [154, 155] zurückgegriffen, welches für die Expression toxischer und membranständiger Proteine optimiert wurde. Es sind laut Herstellerfirma bis heute 350 für *E. coli* toxische oder Membranproteine mit Hilfe der *E. coli*-Stämme C43 und C41 exprimiert worden. Darunter ist bis zum heutigen Zeitpunkt kein einziges AMP aufgeführt. Auffällig ist, dass die meisten etablierten Expressionssysteme für die Herstellung rekombinanter antimikrobieller Peptide auf die Herstellung anderer antimikrobieller Peptide übertragbar sein sollen. Dies ist jedoch meist nicht der Fall. Oft handelt es sich um maßgeschneiderte Expressions- und Reinigungsstrategien, die für andere antimikrobielle Peptide nicht funktionieren, was man an den fehlenden Folgepublikationen zu diesem Expressionssystemen erkennt. Auch innerhalb dieser Arbeit verdeutlicht sich dieser Eindruck. Allein das Hinzufügen eines C-Terminalen Strep-*tags* führte dazu, dass das Fusionsprotein unter den getesteten Bedingungen nicht mehr exprimierbar war. Die Verwendung der löslichen Fusionsproteine Thioredoxin und SUMO scheint aber eine erfolgreiche und effiziente Strategie bei der Herstellung rekombinanter AMPs zu sein. Laut Li wurden 25 % der exprimierten AMPs erfolgreich mit Thioredoxin als Fusionsprotein exprimiert, aber auch SUMO wurde als erfolgreicher Fusionspartner gewertet, welcher zu diesem Zeitpunkt (2010) aber noch recht neu war [156].

## 4.2 Die Struktur und Dynamik von Cecropin P1 in hydrophiler Umgebung

---

Die strukturelle Charakterisierung des Cecropin P1 in hydrophober Umgebung als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen in Verbindung mit Biomembranen und künstlichen Membransystemen führte zu folgenden wesentlichen Erkenntnissen:

### 4.2.1 Cecropin P1 bildet in hydrophiler Umgebung keine Multimere

Ein Teil der vorausgehenden Arbeiten zum Mechanismus der Membraninteraktion von Cecropinen thematisierte Dimere, welche mit der Membran interagieren und letztendlich Poren ausbilden [87, 132]. Die zunächst durchgeführten analytischen Größenausschlusschromatografien mit variierender Peptidkonzentration deuteten ebenfalls auf eine nicht Peptidkonzentrations-abhängige Ausbildung von Dimeren hin. Die Größenausschlusschromatografie ist aber nicht nur abhängig vom Molekulargewicht, sondern auch von der Molekülstruktur und dem hydrodynamischen Radius eines Moleküls [157]. Dabei wird vom Idealfall eines strukturierten, globulären Proteins ausgegangen. Ist ein zu analysierendes Peptid wie Cecropin P1 unstrukturiert und flexibel, so vergrößert sich der hydrodynamische Radius im Vergleich zu einem strukturierten globulären Peptid mit gleichem Molekulargewicht. Demzufolge würde Cecropin P1 aufgrund seines größeren hydrodynamischen Radius weniger Zeit benötigen um durch die Säulenmatrix zu wandern. Die tatsächliche Größe des Proteins würde somit überschätzt werden. Zusätzlich könnte es zu einer ungewollten Interaktion des Peptides mit der Säulenmatrix kommen [157], was das Laufverhalten des Peptides während der Größenaustauschchromatografie ebenfalls beeinflusst und somit das Ergebnis verfälschen könnte. Die Ergebnisse der Relaxationsmessungen und die daraus resultierende berechnete Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  zeigten ein unter den Messbedingungen (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 1,5 mM Peptid, 25 °C) als Monomer vorliegendes Cecropin P1. Ein Vergleich mit Rotationskorrelationszeiten anderer kationischer  $\alpha$ -helikaler bis unstrukturierter AMPs ist leider nicht möglich, da hierzu keine Daten gefunden werden konnten. Ein Grund dafür ist, dass für die Mehrheit der Studien und Experimente unmarkiertes synthetisches Protein verwendet wurde. Die Herstellung von  $^{15}\text{N}$ -markierten AMPs ist sehr aufwendig in *E. coli* und deren chemische Synthese teuer, weshalb darauf meist verzichtet wird. Für die Messungen der Dynamik von AMPs mittels NMR ist die Verwendung  $^{15}\text{N}$ -markierter Peptide aber Voraussetzung.

### 4.2.2 Cecropin P1 ist ein dynamisches und kaum strukturiertes Peptid in hydrophiler Umgebung

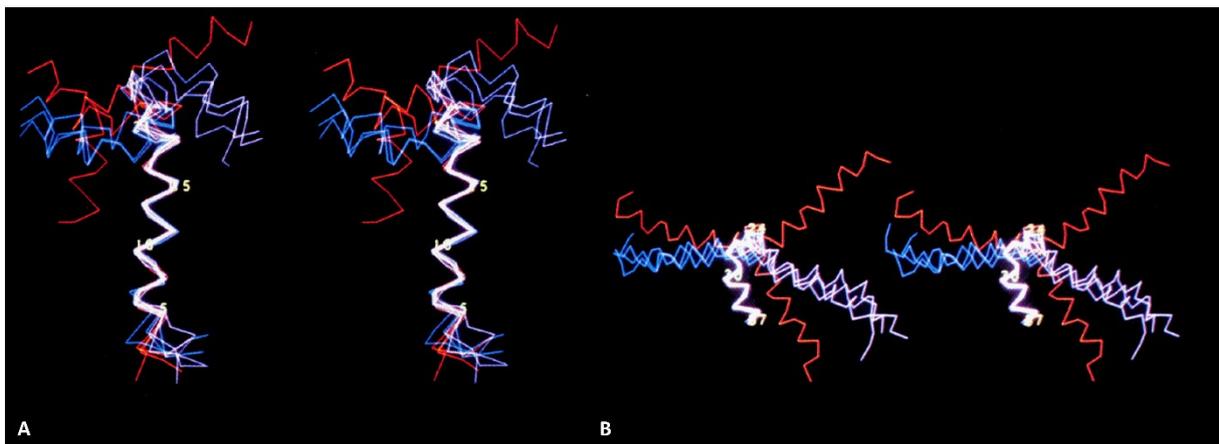
Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden nur die dreidimensionalen Strukturen von Cecropin A in 15 % HFIP [43], Cecropin P1 in 30 % HFIP [99] und einem Hybrid aus Cecropin A und Melittin in 30 % HFIP [134] aufgelöst. Die Struktur der Cecropine in Wasser wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht und als unstrukturiert (*random coil*) beschrieben [99, 142, 143].

Innerhalb dieser Arbeit wurden CD-Messungen durchgeführt die mittels des CONTIN-LL-Algorithmus analysiert wurden. Unter den hier vorherrschenden Bedingungen von 60  $\mu\text{M}$  Peptid in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8 gemessen bei 37 °C konnte ein prozentualer Sekundärstrukturanteil von bis zu 60 %  $\alpha$ -Helix kalkuliert werden. Dies ist ein deutlich höherer Anteil als in

den in Wasser gemessenen CD-Spektren von Sipos *et al.* [99] (15 %  $\alpha$ -Helix bei 25 °C und 40 °C). Die durchgeführten Sekundärstrukturvorhersagen (Abbildung 3.19), berechneten einen Anteil von 55-71 %  $\alpha$ -Helix. Für die Detektion relativ instabiler Sekundärstrukturelemente innerhalb vermutlich dynamischer Peptide, ist die CD-Spektroskopie aber eher ungeeignet. Auch wenn die Peptide in hydrophiler Umgebung eher unstrukturiert vorliegen, könnte eine genauere Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie Aufschlüsse über Bereiche geben, die schon in hydrophiler Umgebung erste, wenig stabile Sekundärstrukturen ausbilden. Die dominierend in den 10 besten berechneten Strukturen des Cecropin P1 vorkommenden  $\alpha$ -Helices (Helix 1 AS 3-7, Helix 2 AS 13-20) machen einen Anteil von 44,8 % aus. Die berechneten RMSD-Werte für die beiden Helices ( $\text{RMSD}_{\text{Helix 1}} = 0,25 \text{ \AA}$ ,  $\text{RMSD}_{\text{Helix 2}} = 0,57 \text{ \AA}$ ), zeigen, dass diese gut definiert sind während die RMSD über das Peptidrückgrat mit  $3,12 \text{ \AA}$  sehr hoch ist und auf ein insgesamt flexibles Peptid hindeutet.

Unter der Berücksichtigung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Cecropin P1 (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5), deren Signalverteilung der eines unstrukturierten Peptides entspricht und den nur 170 für die Strukturrechnung genutzten NOE-Signalen (Tabelle 3.4), mit gerade für die wenigen mittelweit und weitreichenden NOE-Signalen schlechten QF-Werten (*quality function*) (Anhang, NMR, NOE-restraints), kann man von einem überwiegend unstrukturierten Peptid ausgehen. Die Charakterisierung der Dynamik mit Hilfe der hetNOEs der Aminosäuren von Cecropin P1 bestätigt aber, dass der N-terminale Bereich mit den  $\alpha$ -Helices im Vergleich zum C-Terminus (ab S19 durchgehend negative Werte) weniger flexibel ist.

Die erste Struktur eines Cecropins wurde von Holak *et al.* [43] von synthetischem Cecropin A in 15 % HFIP gelöst. Diese Struktur beinhaltet zwei gut definierte  $\alpha$ -Helices von AS 5-21 und AS 24-37, welche durch ein innerhalb der Cecropine konserviertes flexibles Glycin-Prolin-„Gelenk“ getrennt sind. Der Winkel der beiden Helices zueinander konnte nicht näher bestimmt werden. Propagiert wurde aber, dass alle berechneten Konformationen gleich wahrscheinlich sind. Abbildung 4.1 zeigt die berechneten Strukturen. Dabei wurden die Strukturen zunächst an der N-terminalen eher amphipathischen Helix orientiert (Abbildung 4.1 A) und anschließend an der eher hydrophoben C-terminalen Helix (Abbildung 4.1 B) [43].



**Abbildung 4.1** Strukturen von Cecropin A nach Holak *et al.* [43]

**A** zeigt die Überlagerung des  $\text{C}^\alpha$ -Rückgrats der gerechneten Strukturen gefittet an den Aminosäuren 5-21 der N-terminalen Helix. **B** zeigt selbiges gefittet an den Aminosäuren 24-37 der zweiten Helix.



### 4.3 Determinanten der Toxizität für Cecropin P1 und möglicher Interaktionsmechanismus mit bakteriellen Membranen

---

Um herauszufinden welche Charakteristika des Cecropin P1 ausschlaggebend sind für dessen Toxizität in Bakterien, wurden Variationen des Cecropin P1 entworfen (Abbildung 3.32, Abbildung 3.35).

Um sinnvolle Varianten von Cecropin P1 zu entwerfen, wurden zunächst bereits durchgeführte Modifikationen und die damit durchgeführten Messungen recherchiert.

Andreu *et al.* untersuchten 6 modifizierte Cecropin A Sequenzen mittels CD-Spektroskopie und an vier verschiedenen bakteriellen Testorganismen (Cecropin A 2-37, W2E Cecropin A, L4P Cecropin A, E6K Cecropin A, L6K Cecropin A, E8P Cecropin A). Das aromatische Tryptophan an Position 2 stellte sich für alle getesteten Organismen als wichtig für die Aktivität heraus. Andreu *et al.* resümieren, dass die  $\alpha$ -helikale Region (AS 1-11) von Cecropin A für die Toxizität in *E. coli* keine signifikante Rolle spielt, aber für die Toxizität gegen *P. aeruginosa*, *B. megaterium* und *M. luteus* [143].

Auch Steiner *et al.* untersuchten die Rolle des konservierten Tryptophans (W2) von Cecropin A und unterbrachen die N-Terminale  $\alpha$ -Helix durch das Einfügen von Prolinen (L4P, E8P). Getestet wurden die Peptide mit Hilfe eines Liposomen-Lyse-Assay. Die Deletion des Tryptophans führte zur Inaktivierung des Peptids, das heißt die Liposomen wurden nicht mehr lysiert. Durch Substitution eines Phenylalanins konnte die Aktivität wieder gesteigert werden. Das Schwächen der Helixstabilität der N-terminalen  $\alpha$ -Helix durch die eingefügten Proline, führte ebenfalls zu einer erniedrigten Lyse der Liposomen [145].

Christensen *et al.* untersuchten die bis dahin bekannten Cecropin A, B und D und Variationen dieser. Die Wildtyp-Cecropine wurden für die Modifikationen in 3 Bereiche unterteilt: Einer amphipathischen N-terminalen Sequenz, einer flexiblen zentralen Sequenz mit dem konservierten Glycin-Prolin-Motiv als Abschluss und einer anschließenden hydrophoben Sequenz. Anschließend wurden diese Bereiche verschieden kombiniert und die Stromstärkeänderungen an planaren Lipiddoppelschichten durch Kanalbildung innerhalb der Membranen gemessen. Keine Aktivität konnte bei alleiniger Verwendung der amphipathischen Sequenz des Cecropin A (AS 1-11) und bei Verwendung von Cecropin D  $\Delta$ 1-8 mit fehlender amphipathischer Sequenz festgestellt werden [87].

Cecropin P1 wurde das erste Mal von Lee *et al.* aus dem Schweinedarm isoliert. Es wurde gezeigt, dass die Toxizität des C-terminal amidierten Cecropin P1 gegenüber Gram<sup>+</sup>-Bakterien erhöht ist, aber Cecropin P1 natürlicherweise nicht amidiert vorliegt und überwiegend für Gram<sup>-</sup>-Bakterien toxisch ist [91].

Die Toxizität unterschiedlicher Cecropin P1-Analoga auf Bakterien wurde von Vunnam *et al.* untersucht. Getestet wurden das D-Enantiomer, die Retrosequenz, eine Retro-D-Enantiomer-Sequenz - alle mit und ohne N-terminale Acetylierung und C-terminaler Amidierung. Die Toxizität der Retro-Peptide war gegenüber dem Wildtyp reduziert. Die C-terminale Amidierung zeigte eine gesteigerte Toxizität gegenüber Gram<sup>+</sup>-Bakterien wie sie auch schon Lee *et al.* zeigten [91]. Die N-terminal acetylierten Peptide waren inaktiv, wodurch die Autoren schlussfolgerten, dass ein freier N-Terminus für die Toxizität wichtig ist. Die D-Enantiomere waren für die Gram<sup>-</sup>-Bakterienstämme etwas weniger toxisch, für die Gram<sup>+</sup> Testorganismen zeigte sich hingegen eine geringfügig gesteigerte Toxizität. Der

Effekt ist allerdings so gering, dass die Chiralität des Peptids die Toxizität nur sehr geringfügig beeinflusst [98].

Es lässt sich feststellen, dass sich viele der durchgeführten Studien auf den amphipathischen N-terminalen Bereich der Cecropine konzentrieren [143, 145]. Andere befassen sich wiederum mit dem generellen Aufbau [87, 98], testeten die modifizierten Cecropine aber nur an künstlichen Membransystemen [87, 145].

Das aktuelle multiple Sequenzalignment mit allen Cecropinen aus der *Antimicrobial Peptide Database* [19, 20] verdeutlicht noch einmal deren Gemeinsamkeiten, welche auch schon Christensen *et al.* erkannten [87]. Sie bestehen aus einem N-terminalen amphipathischen sequenziell stärker konservierten Bereich und einem C-terminalen hydrophoben Anteil, dessen Sequenz von hydrophoben Aminosäuren (A, V, I, L) dominiert wird (Abbildung 3.31). Konserviert und wichtig für die Toxizität ist dabei nachweislich das Tryptophan an Position 2 (W2) [143, 145]. Auf Basis der bereits durchgeführten Studien und des multiplen Sequenzalignments wurde beschlossen sich zunächst systematisch mit der Rolle der bis dahin kaum untersuchten Hydrophobizität des C-Terminus von Cecropin P1 zu beschäftigen und die Auswirkungen der Cecropin P1-Varianten direkt an *E. coli* zu testen (MIC-Test, Fluoreszenzmikroskopie) statt an künstlichen Membransystemen.

#### 4.3.1 Toxizität von synthetischem und rekombinantem Wildtyp-Cecropin P1 und dem His-SUMO-Cecropin P1-Fusionsprotein

Zu Beginn wurde die Toxizität des synthetischen und rekombinanten Wildtyp-Cecropin P1 verglichen, um nachzuweisen, dass diese sich in ihrer Toxizität äquivalent verhalten, was der Fall ist. Dann wurde unter Verwendung des synthetischen Wildtyp-Cecropin P1 eine Dreifachfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie nach Mangoni *et al.* etabliert [113]. Das Wildtyp-Cecropin P1 verhält sich im Vergleich zur Negativkontrolle (Bakterien in Peptidlösemittel) toxisch. Das FITC-Signal ist jedoch nicht stärker als in der Negativkontrolle und bei weitem nicht so eindeutig wie bei Mangoni *et al.* die diese Färbung mit Temporin L durchführten. Möglich ist, dass Cecropin P1 die Membran nicht stark genug permeabilisiert, sodass das über 300 Dalton große FITC in die Zellen gelangen könnte. Um dies auszuschließen, sollte anstatt Triton X-100 als Positivkontrolle, Temporin L genutzt werden. Fällt die FITC-Färbung unter Nutzung von Temporin L eindeutig positiv aus, wirkt Cecropin P1 in *E. coli* einfach unterschiedlich zum Temporin L, was auch bei vielen anderen AMPs wie Sarcotoxin, Mellitin und Magainin der Fall ist [113].

Zusätzlich wurde das His-SUMO-Cecropin P1 Fusionsprotein auf seine Toxizität hin untersucht. Dabei ließ sich eine MIC feststellen, die im Vergleich zum Wildtyp-Cecropin P1 um das 8-15 fache erhöht und damit weniger toxisch war. Der freie N-Terminus scheint also wie von Vunnam *et al.* postuliert wichtig für die Toxizität zu sein [98]. Dieses N-terminal maskierte Cecropin P1 ist dabei toxischer als das Cecropin P1  $\Delta$  21-31, bei dem keine MIC unter den getesteten Peptidkonzentrationen mehr feststellbar ist. Interessant wäre hier, ob die Toxizität des Cecropin P1 durch eine C-terminale Maskierung statt durch eine Deletion des C-Terminus ( $\Delta$  21-31) wieder gesteigert werden könnte oder nicht. Würde es durch die C-terminale Maskierung nicht zu einer Steigerung der Toxizität im Vergleich zu Cecropin P1  $\Delta$  21-31 kommen, läge die Vermutung nahe, dass der C-terminale Bereich des

Cecropin P1 für die Toxizität gegen *E. coli* notwendiger ist, als der N-terminale Bereich. Andreu *et al.* zeigten bereits für Cecropin A, dass die ersten 11 Aminosäuren für die Toxizität in *E. coli* nicht so entscheidend sind, wie für Gram<sup>+</sup>-Bakterien [143].

#### 4.3.2 Toxizität des FITC-ΔS1W2-Cecropin P1

Das FITC-ΔS1W2-Cecropin P1-Peptid wurde zum einen entworfen, um die Rolle des Tryptophans an Position 2 zu untersuchen. Es sollte die Toxizität dieses Peptides abgeschätzt werden, um zu sehen ob das hydrophobe FITC-Molekül in der Lage ist das Tryptophan zu substituieren. Steiner *et al.* zeigten bereits, dass das ebenfalls aromatische und hydrophobe Phenylalanin die Toxizität der Cecropine teilweise wiederherstellen kann [145]. Zusätzlich ermöglicht das FITC-Label weitere methodische Ansätze um die Wirkungsweise des Cecropin P1 z.B. über Fluoreszenzmikroskopie genauer zu charakterisieren. Gazit *et al.* zeigten, dass mit Rhodamine und Nitrobenzoxdiazol N-terminal gelabelte Cecropin P1-Peptide im Inhibitions-Zonen-Assay mit vier verschiedenen Bakterienstämmen nahezu genauso toxisch sind wie das Wildtyp-Cecropin P1 [88]. Dies scheint bei dem hier verwendeten FITC-ΔS1W2-Cecropin P1 nicht der Fall zu sein. Selbst wenn aufgrund der schlechten Löslichkeit des Peptids die verwendete Ausgangsverdünnung statt 100 µg/ml eventuell nur 25 µg/ml betrug, hätte eine MIC feststellbar sein müssen ( $MIC_{\text{Wildtyp-Cecropin P1}} = 6,25 \mu\text{g/ml}$ ). Die Unterschiede liegen hier in der Verwendung unterschiedlicher Assays für die Ermittlung der MIC, der Verwendung eines Ahx-Linkers (FITC-ΔS1W2-Cecropin P1) im Vergleich zum direktem Binden des Fluorophors an den N-Terminus und der dritte Unterschied liegt in der Abwesenheit der ersten zwei N-terminalen Aminosäuren im FITC-ΔS1W2-Cecropin P1 im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz welche von Gazit *et al.* verwendet wurde. Zu vermuten ist, dass das fehlende Tryptophan an Position zwei hauptverantwortlich ist für die geringe Toxizität, da die Abwesenheit dieses Tryptophans innerhalb der Cecropin-Familie nachweislich einen negativen Einfluss auf die Toxizität hat [143, 145].

In Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war die FITC-Fluoreszenz bei beiden verwendeten Konzentrationen (1 x und 5 x konzentriert im Vgl. zu den MIC-Tests) des FITC-ΔS1W2-Cecropin P1 weder Membran-lokalisiert noch intrazellulär nachweisbar. Haukland *et al.* stellten mit Hilfe von Transmissionmikroskopie fest, dass Cecropin P1 in *E. coli* nicht intrazellulär, sondern Membran-gebunden vorliegt [158]. Wenn sich das FITC-ΔS1W2-Cecropin P1 genauso verhalten sollte, müsste ein FITC-Fluoreszenzsignal an den Bakterienmembranen feststellbar sein. Dass das Peptid im Verlauf des Experimentes vollständig von den Bakterienmembranen gespült wurde, ist unwahrscheinlich. In den Expressionstests hat sich gezeigt, dass nur ein Sonifizieren mit Hilfe von Detergens-haltigem Puffer das Cecropin P1 aus den unlöslichen Membranbestandteilen der Bakterien löst. Wahrscheinlicher ist, dass das FITC-ΔS1W2-Cecropin P1 nur schwach oder gar nicht an die Bakterienmembran bindet, was auch die geringe Toxizität im MIC-Test und des Fluoreszenzmikroskopie-Experimentes erklären würde.

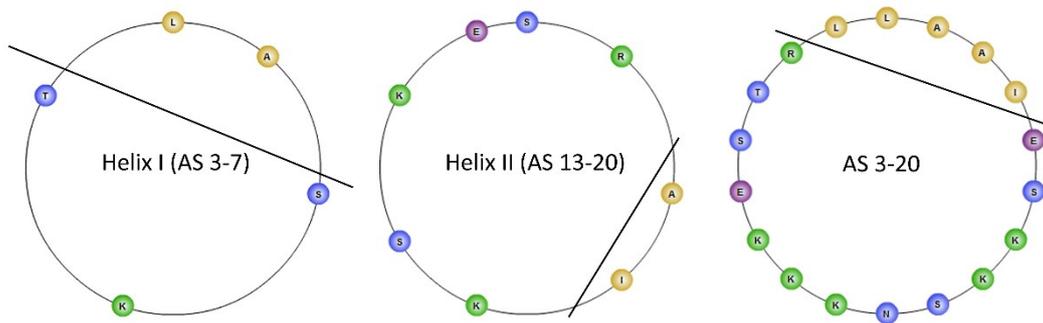
#### 4.3.3 Toxizität des hydrophoben C-Terminus

Weiterhin wurden Cecropin P1-Peptide getestet, deren Hydrophobizität im C-terminalen Bereich von AS 22-IAIAIQ-27 variiert wurden. Zunächst wurde eine einzelne positive Ladung in diesen hydrophoben Bereich gesetzt (Cecropin P1 I24E) oder auch die komplette hydrophobe Sequenz durch eine

hydrophile  $\alpha$ -helikale Sequenz ausgetauscht (Cecropin P1 22-27 KGKSEE). Das Hinzufügen einer Ladung an dieser Position hat dabei noch keinen Einfluss auf die MIC. Pillai *et al.* verglichen die Cecropin P-Peptide in Hinblick auf ihre Toxizität und stellten fest, dass die Nettoladung durch ein Lysin an Position 27 in Cecropin P3 (Nettoladung +6) im Vergleich zu Cecropin P1 mit Glutamin an Position 27 (Nettoladung +5) die Toxizität nicht signifikant beeinflusst [93]. Durch das Austauschen der kompletten hydrophoben Sequenz lässt sich hingegen unter den getesteten Peptidkonzentrationen keine MIC mehr feststellen. Alle Cecropin P1-Peptide mit hydrophoben Aminosäuren (Cecropin P1 22-27 ALAVAI, 22-27 VVLVVL) besitzen die gleiche MIC wie das Wildtyp-Cecropin P1 – egal ob die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix in diesem Bereich wahrscheinlich (Cecropin P1 22-27 ALAVAI) oder unwahrscheinlich (Cecropin P1 22-27 VVLVVL) ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Hydrophobizität in diesem Bereich ein ausschlaggebender Faktor für die Toxizität von Cecropin P1 gegenüber *E. coli* ist. Die mit diesen Peptiden durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie zeigte allerdings, dass Bakterien nach einstündiger Inkubation mit letalen Dosen (je 250  $\mu\text{g/ml}$  Cecropin P1 22-27 ALAVAI, Cecropin P1 22-27 VVLVVL) noch vital waren, im Gegensatz zu mit Wildtyp-Cecropin P1 (250  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubierten Bakterien. Der Unterschied zum MIC-Test liegt dabei nur in der Inkubationsdauer (1 h vs. 18 h) mit Peptid und in der verwendeten Zellzahl (ca.  $2 \times 10^6$  cfu/ml vs.  $2 \times 10^8$  cfu/ml). Die Toxizitätsreaktion von Cecropin P1 verhält sich, wie Boman *et al.* gezeigt haben, stöchiometrisch [94]. Um mehr Zellen zu töten, muss also mehr Peptid eingesetzt werden. Dies wurde aber über Dosen die weit über der MIC liegen (MIC = 3,13-6,25  $\mu\text{g/ml}$  bei  $2 \times 10^6$  cfu/ml im Vergleich zu eingesetzten 250  $\mu\text{g/ml}$  bei  $2 \times 10^8$  cfu/ml) berücksichtigt. Diese Dosis reicht bei Verwendung von 250  $\mu\text{g/ml}$  Wildtyp-Cecropin P1 auch aus um die Bakterien zu töten, was man an nur vereinzelt CTC-Signalen die nicht mit der DAPI-Fluoreszenz überlappen, erkennt. Bei Cecropin P1 22-27 ALAVAI und Cecropin P1 22-27 VVLVVL ist dies nicht der Fall. Die beiden Peptide scheinen also nach 18 h Inkubation mit *E. coli* die gleiche MIC zu haben, doch die Toxizitätsreaktion scheint langsamer abzulaufen. Andere hydrophobe Motive im Bereich der Aminosäuren 22-27 des Cecropin P1 verändern somit zwar nicht die MIC des Peptids, aber die Kinetik der Toxizität. Arcidiacono *et al.* bestimmten die MIC (3  $\mu\text{M}$ ) von Cecropin P1 via *Microplate Broth Dilution Assay* in *E. coli* ML35 und stellten fest, dass die Bakterien ( $1 \times 10^5$  cfu/ml) durch Inkubation für maximal 30 min mit 3  $\mu\text{M}$  Cecropin P1 vollständig eliminiert wurden [96]. Aus diesem Grund sollten die MIC-Tests für alle toxischen Peptide zeitabhängig wiederholt werden, um diesen Effekt näher zu untersuchen.

Um den Einfluss der Länge dieser C-terminalen hydrophoben Sequenz (AS 22-27 IAIAIQ) auf die Toxizität zu untersuchen wurden weitere Peptide entworfen, in denen das IAIAI-Motiv verkürzt oder um alternierende Isoleucin-Alanin-Sequenzen verlängert wurde. Sowohl die Verkürzung als auch die Verlängerung dieser Sequenz haben einen negativen Effekt auf die Toxizität des Cecropin P1 in *E. coli*. Im Vergleich zur Verlängerung des Cecropin P1 um zwei Aminosäuren (MIC = 23,5  $\mu\text{g/ml}$ ), hat die Verkürzung des Peptids um zwei Aminosäuren keinen negativen Effekt auf die Toxizität (MIC = 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Vergleichbare Studien wurden bisher kaum getätigt. Was die Länge der AMPs generell angeht, werden aber 7-8 Aminosäuren als notwendig betrachtet um eine amphipatische  $\alpha$ -Helix mit sich gegenüberliegenden hydrophoben und hydrophilen Bereichen auszubilden [60], was für die Toxizität dieser AMPs nachweislich notwendig ist [87, 143, 145]. Dies ist bei den hier verwen-

deten Cecropin P1-Varianten gegeben, wenn man die *Helical Wheel* Darstellungen in Abbildung 4.3 betrachtet.



**Abbildung 4.3 Helical Wheel Projektionen von Cecropin P1**

Dargestellt sind die *Helical Wheel* Projektionen erstellt über [http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Proteomic\\_tools/Helical\\_wheel/](http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Proteomic_tools/Helical_wheel/) von John K. Everett. In den strukturell in wässriger Lösung identifizierten Helices (links und Mitte) sowie unter Nutzung der Aminosäuren 3-20 liegen sich hydrophobe Aminosäuren (beige) und geladene Aminosäuren (grün und violett) gegenüber, wie es in einer amphipatischen  $\alpha$ -Helix der Fall wäre.

Um bakterielle Membranen im Sinne des *Barrel-Stave*-Modells zu durchspannen, wären bei einem  $\alpha$ -helikalen Peptid mindestens 22 Aminosäuren notwendig [159]. Dies würde für alle verkürzten getesteten Peptide, bis auf das Cecropin P1  $\Delta$ 21-31 welches aber auch nicht mehr toxisch ist, zutreffen. Eine neue Erkenntnis ist, dass bei Verlängerung dieses hydrophoben Bereiches die Toxizität gegen *E. coli* negativ beeinflusst wird. Ein Grund könnte die mit der erhöhten Hydrophobizität einhergehende beobachtete erschwerte Löslichkeit der Peptide sein. Antimikrobielle Peptide sind von Natur aus gut lösliche Peptide. Dies macht auch für Cecropin P1 Sinn, da es vor der Interaktion mit Bakterien in wässriger Umgebung vorliegt und nach der Interaktion mit der äußeren Membran von *E. coli* durch den periplasmatischen Spalt, einer eher hydrophilen Umgebung, zur inneren Membran gelangen muss um mit dieser interagieren zu können [46]. Eine erniedrigte Löslichkeit in wässrigem Milieu ist somit für die AMPs generell nicht vorteilhaft.

#### 4.3.4 Cecropin P1 und mögliche Membraninteraktionen

Für das grundsätzliche Verständnis der Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden ist die Charakterisierung der Membraninteraktion ein entscheidender Faktor, denn die Bakterienmembran ist in jedem Fall der initiale Interaktionsbereich von antimikrobiellen Peptiden mit Bakterien. Nguyen *et al.* und viele andere beschreiben die verschiedensten Modellmechanismen für die Membraninteraktion. Dabei betonen sie, dass die einzelnen Mechanismen für ein antimikrobielles Peptid meist nicht exklusiv auftreten, sondern mehrere der Mechanismen für ein bestimmtes AMP gültig sind [160]. Eine zusätzliche Problematik besteht darin, dass Informationen aus künstlichen Membransystemen aufgrund völlig verschiedener Messbedingungen (z.B. Peptid/Lipid-Verhältnis) schwer mit aus zellbasierten Experimenten gewonnenen Erkenntnissen verglichen werden können [161] oder Effekte die in künstlichen Membransystemen beobachtet werden nicht in Bakterienzellen auftreten [162]. Dies ist ebenso der Fall für die Gruppe der Cecropine. Verschiedenste Studien wurden mit den Cecropinen durchgeführt, um den Mechanismus der Membraninteraktion zu beschreiben. Gemeinsam haben alle durchgeführten Studien, dass die in Lösung unstrukturierten Cecropine in hydrophober Umge-

bung  $\alpha$ -helikale Strukturen ausbilden. Das konnte auch durch in dieser Arbeit durchgeführte Experimente bestätigt werden. Die CD-spektrometrischen Messungen zeigen eine deutliche Zunahme des  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteils bei Tritrationsexperimenten mit LUV und SDS-Mizellen. Die Spektren unterscheiden sich allerdings, trotz im Ergebnis fast identischer Sekundärstrukturanalyse, visuell voneinander. Es ist davon auszugehen, dass die Auswahl des Membransystems einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis des jeweiligen Experimentes hat.

Je nach Methodik und Membran-Modell kommt es was den Mechanismus der Membraninteraktion betrifft zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen. 1988 postulierten Christensen *et al.* aufgrund von Experimenten an planaren Lipiddoppelschichten (aus Diphytanoylphosphatidylcholin und Phosphatidylserin), dass Cecropine in der bakteriellen Plasmamembran Poren bilden [87]. Durell *et al.* modellierten aufgrund dieser experimentellen Daten in Lösung vorliegende Cecropin-Dimere und die Struktur von Cecropin-Ionenkanälen (Typ I und II) in der bakteriellen Membran [132]. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cecropin P1 in Lösung als flexibles unstrukturiertes Monomer vorliegt, also keine Dimere bildet. Falls Cecropin P1 wie Temporin L Poren bildet, hätten die für die Fluoreszenzmikroskopie mit Cecropin P1 inkubierten Bakterien positiv für die FITC-Fluoreszenz sein müssen. Diese Experimente sollten zum besseren Vergleich noch einmal mit Temporin L als Positivkontrolle wiederholt werden. Falls sich durch Cecropin P1 Poren bilden, sind diese unter den untersuchten Bedingungen jedoch nicht groß genug für das ca. 300 Dalton große FITC-Molekül.

Aktuellere Studien beschreiben für die Cecropine eine parallele Orientierung zur Membran [88, 89, 102, 135, 163]. Wenn es um die anschließende Interaktionsweise mit der Membran geht, ergeben sich neue Differenzen. Gazit *et al.* propagieren nach Untersuchungen mittels ATR-FTIR (abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie) an PE/PG-Multidoppellipidschichten für Cecropin P1 ein *Carpent*-Modell und schließen die Bildung von Poren jeglicher Art aus. Dies begründen sie zum einen mit experimentellen Daten, welche ausschließen, dass Cecropin P1 in den Kohlenwasserstoffkern der Membran eindringt [89]. Hinzu kommen molekulardynamische Studien für die als Ausgangsstruktur eine lineare  $\alpha$ -Helix genutzt wurde, wie Sipos *et al.* sie in 30 % HFIP beschreiben [99]. Weiterhin führen sie aus, dass ATR-FTIR ideal ist zur Untersuchung der Orientierung von Peptiden mit einer einzelnen gestreckten  $\alpha$ -Helix im Gegensatz zu den Insektencecropinen mit ihrer Helix-„Gelenk“-Helix-Struktur. Dass die Cecropin P-Peptide den Insektencecropinen wahrscheinlich strukturell ähnlicher sind als bis jetzt vermutet, wurde bereits ausgeführt (Kapitel 4.2.2). Eine gewisse Flexibilität ist in diesem Bereich gegeben, was auch Sipos *et al.* beobachteten [99]. Gazit *et al.* begründen ihre Hypothese, dass Cecropin P1 nicht in die Doppellipidschicht eindringen kann, aber genau mit der Abwesenheit dieser flexiblen Region um das Glycin an Position 21.

Gregory *et al.* stellten bei Untersuchung von Cecropin A mit POPE- und POPE/POPG-haltigen LUVs fest, dass die Bindung des Peptids an Vesikeln reversibel ist und die Peptide an der Membran keine Oligomere ausbilden, was das Ausbilden einer stabilen Pore unwahrscheinlich macht [90]. Es wurden auch *solid-state* NMR-spektroskopische Messungen mit selektiv  $^{15}\text{N}$ -markiertem Cecropin A (V11 in Helix 1 und A27 in Helix 2) an Phospholipiddoppelschichten (DMPC/DMPG) durchgeführt [163]. Marassi *et al.* stellten in diesen Studien fest, dass die NH-Bindungen von V11 und A27 ungefähr parallel zur Doppellipidschicht orientiert sind. Sie räumen aber ein, dass eine exakte Analyse der Orientierung

von Cecropin A nur mit voll aufgelösten und zugeordneten Resonanzen aus homonuklearen multidimensionalen *solid-state* NMR-Spektren möglich ist. Ihr vorgeschlagener Membraninteraktionsmechanismus ist bei hohen Peptidkonzentrationen und dadurch nahender Ausbildung einer monomolekularen Peptid-Schicht auf der Membran die Porenbildung. Sie argumentieren, dass eine Porenbildung zu diesem Zeitpunkt nicht mehr mit *solid-state* NMR oder Fluoreszenzmessungen detektiert werden kann, da die parallel zur Membran orientierten Peptide den Hauptanteil an Peptid ausmachen und nur ein kleiner nicht messbarer Anteil an Peptid senkrecht zur Membran orientiert wäre. Zum ersten Mal ist es nun möglich vollständig  $^{15}\text{N}$ -markiertes Cecropin P1 rekombinant herzustellen. Mit Hilfe der vollständigen Markierung verbunden mit verschiedenen NMR-spektroskopischen Experimenten ist es nun möglich, die Struktur und Dynamik des Cecropin P1 in Membransystemen detailliert zu analysieren. Erste Versuche hierzu wurden in Bizellen durchgeführt, die Herstellung dieser mit Cecropin P1 muss aber zunächst weiter optimiert werden. Die hier gemessenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren zeigen keine Veränderung der Signalverteilung wie man sie bei einem bei Membraninteraktion  $\alpha$ -helikalen und strukturierten Cecropin P1 erwarten würde. Einzige Auffälligkeit ist, dass die Signale der C-terminalen überwiegend hydrophoben Aminosäuren 23-29 verschwinden. Dies deutet eher auf gelöste Lipide hin, die an die hydrophobe Region des Cecropin P1 binden und somit die Signalintensität schwächen. Auch andere Membransysteme sollten in Erwägung gezogen werden. So wäre auch der Einsatz von *nanodiscs* unter Verwendung unterschiedlicher Lipidkompositionen denkbar [164]. Vergleichend dazu wäre auch *in-cell* NMR in *E. coli* als nicht artifizielles Membransystem interessant [165].

## 5. Zusammenfassung

---

Antimikrobielle Peptide sind in allen Lebewesen verbreitete Peptide, welche ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, aber auch Pilze, Parasiten und Viren besitzen. Ihre Toxizität ist meist spezifisch und die Gefahr der Resistenzbildung im Vergleich zu medizinisch angewendeten Antibiotika gering. Dies macht sie für die medizinische Forschung und Anwendung sehr interessant. Um diese Peptide rational pharmakologisch zu optimieren ohne die Vorteile der AMPs gegenüber der Antibiotika einzubüßen, müssen der grundlegende Mechanismus der AMP-Bakterien-Interaktion entschlüsselt und die für die Toxizität nötigen Eigenschaften der Peptide identifiziert werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurde das Peptid Cecropin P1 aus dem Spulwurm des Schweins ausgewählt, welches spezifisch mit bakteriellen Membranen interagiert und Bakterien lysiert. Für die Charakterisierung der Struktur und Dynamik mittels NMR-Spektroskopie wurde das synthetische Cecropin P1-Gen in einen pET-SUMO-Vektor mit His-tag kloniert, in *E. coli* C43 <sup>15</sup>N-markiert exprimiert und das Peptid anschließend über eine His-tag-Affinitätschromatografie gereinigt. Die erstmals durchgeführte NMR-spektroskopische Analyse des Cecropin P1 in wässriger Umgebung ergab das Bild eines monomeren Peptides mit einer überwiegend  $\alpha$ -helikalen amphipathischen N-terminalen Hälfte und einer im Vergleich dazu flexibleren unstrukturierten C-terminalen Hälfte mit einer hydrophoben Sequenz. Auffällig ist dabei, dass der flexible Bereich nahe des Glycins an Position 21 beginnt, was darauf hindeutet, dass Cecropin P1 den Insektencecropinen mit ihrer  $\alpha$ -Helix-„Gly-Pro-Gelenk“- $\alpha$ -Helix-Struktur in Membrenumgebung ähnlicher ist als bisher angenommen.

Weiterhin wurden Cecropin P1-Varianten entworfen um systematisch die Rolle der Hydrophobizität und Länge des hydrophoben Bereichs im C-terminalen Abschnitt von Cecropin P1 für die Toxizität in *E. coli* zu untersuchen. Die Toxizität der Cecropin P1 Varianten wurde dafür über die Ermittlung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) im laborintern etablierten *Microplate Broth Dilution*-Test abgeschätzt und zusätzlich mit einer Dreifach-Fluoreszenzfärbung näher charakterisiert. Diese Art der Charakterisierung lässt Aussagen über die totale Zellzahl, Viabilität und Membranintegrität der *E. coli*-Zellen nach Inkubation mit den Peptiden zu. Die größte Toxizität hatten hier Peptide mit einem 45 bis 55 % hydrophoben C-Terminus. Die Substitution der hydrophoben Aminosäuren an Position 22 bis 27 durch andere hydrophobe Aminosäuren ergab zwar eine identische MIC, veränderte jedoch die Kinetik der Toxizität. Eine Verlängerung und Verkürzung der hydrophoben Sequenz im C-terminalen Bereich des Cecropin P1 um weitere hydrophobe Aminosäuren führte zu einer Verminderung der Toxizität. Dabei war eine Verkürzung um 2 Aminosäuren noch genauso toxisch wie das Wildtyp-Cecropin P1, die Verlängerung um 2 Aminosäuren verringerte die Toxizität signifikant. Die Arbeiten zeigen, dass weiterführende Studien zur Kinetik der Toxizitätswirkung der einzelnen Cecropin P1-Varianten und Visualisierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie einen noch detaillierteren Einblick in den Toxizitätsmechanismus des Cecropin P1 geben könnten. Die erstmalige Expression von Isotopen-markiertem Cecropin P1 erlaubt zudem eine strukturelle und auch dynamische Analyse des Cecropin P1 mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in verschiedenen Membransystemen und ermöglicht den Interaktionsmechanismus von Cecropin P1 mit Biomembranen detailliert zu untersuchen.

## Abstract

---

Antimicrobial peptides are common in all living organisms. They have broad-spectrum activity against bacteria, fungi, parasites and viruses. Their toxicity is specific and the development of resistances less probable compared to conventional antibiotics. These characteristics make the medical use of antimicrobial peptides a matter of interest. For this reason the peptides have to be pharmacologically optimized without losing their benefits. Therefore it is reasonable to get insights into the molecular basis of peptide-membrane interaction mechanism and the determinants of the toxicity.

Here Cecropin P1 from the porcine round worm *Ascaris suum* was chosen, which is known to interact with bacterial membranes and finally causes lysis of bacteria. To enable the structural and dynamical characterization of the peptide the synthetic gene encoding Cecropin P1 was cloned into a pET-SUMO vector with a His-tag, afterwards the <sup>15</sup>N-labeled peptide was expressed in *E. coli* C43 and purified via immobilized metal ion affinity chromatography.

First NMR-spectroscopy studies on Cecropin P1 in an aqueous environment indicate a monomeric peptide with an N-terminal  $\alpha$ -helical structured part and a comparatively more flexible unstructured C-terminal half including a hydrophobic sequence. The enhanced flexibility starts around the conserved glycine at position 21, which is part of the flexible hinge in the helix-hinge-helix structure well known for the Cecropins of insects. This suggests a higher structural similarity of Cecropin P1 to the Cecropins of insects as expected.

Furthermore Cecropin P1 variants were designed to analyze the relevance of hydrophobicity and length of the hydrophobic sequence of the C-terminal part of the peptide for the toxicity in *E. coli*.

The toxicity of the variants was quantified with an established microplate broth dilution assay, which results in a minimal inhibitory concentration (MIC) of the peptide needed to completely kill the bacteria. Additionally a triple fluorescence staining of bacteria incubated with peptide variants which gives information about total cell number, viability and membrane integrity was used to characterize the toxicity in detail. Cecropin P1 variants with 45-55 % hydrophobic C-terminus were most toxic, while the substitution of the hydrophobic amino acids 22-27 with different hydrophobic amino acids led to an identical MIC but altered kinetics of toxicity. Elongation with additional hydrophobic amino acids and shortening of the hydrophobic C-terminal sequence of Cecropin P1 resulted in a decreased toxicity.

These experiments indicate, that future studies on the kinetics of toxicity of the Cecropin P1 variants and visualization of bacteria threatened with peptide via fluorescence microscopy could give deeper insights into the mechanism of toxicity of Cecropin P1. For the first time <sup>15</sup>N-labeled Cecropin P1 was produced and enables a structural and dynamical characterization of the peptide with different membrane models, which facilitates the detailed analysis of peptide-membrane interaction.

## Literaturverzeichnis

---

1. Vuillemin, P., *Antibiose et symbiose*.
2. Fleming, A., *On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Containing Papers of a Biological Character, 1922. **93**(653): p. 306-317.
3. Fleming, A., *On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzae*. British Journal of Experimental Pathology, 1929. **10**(3): p. 226-236.
4. Fleming, A. *Nobel Lecture: Penicillin*. 1945; Available from: Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Web. 20 Mar 2014. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html)>
5. *Organische Chemie*. 2., verb. Aufl., 4. Nachdr. ed. 1989, Weinheim u.a.: Verl. Chemie. XXVII, 1930 S.
6. Dubos, R.J., *Bactericidal effect of an extract of a soil bacillus on gram positive cocci*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1939. **40**(2): p. 311-312.
7. Chain, E., et al., *Penicillin as a chemotherapeutic agent*. Lancet, 1940. **2**: p. 226-228.
8. von Nussbaum, F., et al., *Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie – Exodus oder Renaissance?* Angewandte Chemie, 2006. **118**(31): p. 5194-5254.
9. Walsh, C., *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 775-81.
10. Dubos, R.J. and R.D. Hotchkiss, *The Production of Bactericidal Substances by Aerobic Sporulating Bacilli*. J Exp Med, 1941. **73**(5): p. 629-40.
11. Ohtani, S., et al., *Complete primary structures of two subunits of purothionin A, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour*. J Biochem, 1977. **82**(3): p. 753-67.
12. Hirsch, J.G., *Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes*. J Exp Med, 1956. **103**(5): p. 589-611.
13. Lay, F.T. and M.A. Anderson, *Defensins - Components of the innate immune system in plants*. Current Protein & Peptide Science, 2005. **6**(1): p. 85-101.
14. Wang, G., *Antimicrobial peptides discovery, design, and novel therapeutic strategies*. 2010, Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI. XVII, 230 S.
15. Dutton, C.J., *Peptide antibiotics : discovery, modes of action, and applications*. 2002, New York: Marcel Dekker. viii, 296 p.
16. Territo, M.C., et al., *Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils*. J Clin Invest, 1989. **84**(6): p. 2017-20.
17. Boman, H.G., et al., *Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins*. Eur J Biochem, 1991. **201**(1): p. 23-31.
18. Lai, Y. and R.L. Gallo, *AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense*. Trends Immunol, 2009. **30**(3): p. 131-41.
19. Wang, G., X. Li, and Z. Wang, *APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D933-7.
20. Wang, Z. and G. Wang, *APD: the Antimicrobial Peptide Database*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D590-2.

21. Gratia, A., *A remarkable example of antagonism between two strains of escherichia coli*. Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales, 1925. **93**: p. 1040-1041.
22. Wang, G., *Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(6): p. 728-58.
23. Egorov, T.A., et al., *Diversity of wheat anti-microbial peptides*. Peptides, 2005. **26**(11): p. 2064-73.
24. Decaleya, R.F., et al., *Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins in-Vitro*. Applied Microbiology, 1972. **23**(5): p. 998-&.
25. Craik, D.J., et al., *Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif*. Journal of Molecular Biology, 1999. **294**(5): p. 1327-1336.
26. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
27. Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo, *Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain*. FEBS Lett, 1995. **374**(1): p. 1-5.
28. Gennaro, R., B. Skerlavaj, and D. Romeo, *Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils*. Infect Immun, 1989. **57**(10): p. 3142-6.
29. Agerberth, B., et al., *Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides*. Eur J Biochem, 1991. **202**(3): p. 849-54.
30. Raj, P.A. and A.R. Dentino, *Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **206**(1): p. 9-18.
31. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
32. Lehrer, R.I., et al., *Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes*. J Virol, 1985. **54**(2): p. 467-72.
33. Oudhoff, M.J., et al., *Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay*. FASEB J, 2008. **22**(11): p. 3805-12.
34. Fahrner, R.L., et al., *Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes*. Chem Biol, 1996. **3**(7): p. 543-50.
35. Hwang, P.M., et al., *Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin*. Biochemistry, 1998. **37**(12): p. 4288-98.
36. Schibli, D.J., et al., *The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8279-89.
37. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 238-50.
38. Mattila, J.P., K. Sabatini, and P.K. Kinnunen, *Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(10): p. 2041-50.
39. Rokitskaya, T.I., et al., *Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(1): p. 91-7.
40. Marchand, C., et al., *Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): p. 5157-65.

41. Wang, G., *Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32637-43.
42. Gesell, J., M. Zasloff, and S.J. Opella, *Two-dimensional 1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution*. J Biomol NMR, 1997. **9**(2): p. 127-35.
43. Holak, T.A., et al., *The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study*. Biochemistry, 1988. **27**(20): p. 7620-9.
44. Nicolas, P., *Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides*. FEBS J, 2009. **276**(22): p. 6483-96.
45. Lan, Y., et al., *Structural contributions to the intracellular targeting strategies of antimicrobial peptides*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(10): p. 1934-43.
46. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000414.
47. White, S.H., W.C. Wimley, and M.E. Selsted, *Structure, function, and membrane integration of defensins*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(4): p. 521-7.
48. Hristova, K., M.E. Selsted, and S.H. White, *Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24224-33.
49. Yount, N.Y. and M.R. Yeaman, *Multidimensional signatures in antimicrobial peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7363-8.
50. Jenssen, H., P. Hamill, and R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): p. 491-511.
51. Chen, C.Z. and S.L. Cooper, *Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes*. Biomaterials, 2002. **23**(16): p. 3359-68.
52. Giacometti, A., et al., *In-vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(5): p. 641-5.
53. Zhang, L., A. Rozek, and R.E. Hancock, *Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35714-22.
54. Ehrenstein, G. and H. Lecar, *Electrically gated ionic channels in lipid bilayers*. Q Rev Biophys, 1977. **10**(1): p. 1-34.
55. Shimazaki, K., et al., *Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin*. J Dairy Sci, 1998. **81**(11): p. 2841-9.
56. Wu, M., et al., *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): p. 7235-42.
57. Pouny, Y., et al., *Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12416-23.
58. Bechinger, B., *Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: a 31P solid-state NMR spectroscopy study*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1712**(1): p. 101-8.
59. Bolintineanu, D.S. and Y.N. Kaznessis, *Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review*. Peptides, 2011. **32**(1): p. 188-201.
60. Bahar, A.A. and D. Ren, *Antimicrobial peptides*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(12): p. 1543-75.
61. Cho, J.H., B.H. Sung, and S.C. Kim, *Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(8): p. 1564-9.

62. Pirri, G., et al., *Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective*. Central European Journal of Biology, 2009. **4**(3): p. 258-273.
63. Singh, P.K., et al., *A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development*. Nature, 2002. **417**(6888): p. 552-5.
64. Gao, G., et al., *The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides*. Biomaterials, 2011. **32**(16): p. 3899-909.
65. Price, J.S., et al., *Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants*. J Biomed Mater Res, 1996. **30**(3): p. 281-6.
66. Marr, A.K., W.J. Gooderham, and R.E. Hancock, *Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(5): p. 468-72.
67. Guilhelmelli, F., et al., *Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 353.
68. Hankins, J.V., et al., *Amino acid addition to Vibrio cholerae LPS establishes a link between surface remodeling in gram-positive and gram-negative bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8722-7.
69. Guo, L., et al., *Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides*. Cell, 1998. **95**(2): p. 189-98.
70. Strandberg, E., et al., *Lipid shape is a key factor for membrane interactions of amphipathic helical peptides*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(7): p. 1764-76.
71. Shireen, T., et al., *Differential adaptive responses of Staphylococcus aureus to in vitro selection with different antimicrobial peptides*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(10): p. 5134-7.
72. Campos, M.A., et al., *Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 7107-14.
73. Chan, C., L.L. Burrows, and C.M. Deber, *Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38749-54.
74. Mulcahy, H., L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza, *Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000213.
75. Schmidtchen, A., et al., *Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 157-68.
76. Le Sage, V., et al., *An outer membrane protease of the omptin family prevents activation of the Citrobacter rodentium PhoPQ two-component system by antimicrobial peptides*. Mol Microbiol, 2009. **74**(1): p. 98-111.
77. Shafer, W.M., et al., *Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1829-33.
78. Frick, I.M., et al., *SIC, a secreted protein of Streptococcus pyogenes that inactivates antibacterial peptides*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16561-6.
79. Lauth, X., et al., *M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition*. J Innate Immun, 2009. **1**(3): p. 202-14.
80. Hultmark, D., et al., *Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 1980. **106**(1): p. 7-16.

81. Steiner, H., et al., *Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity*. Nature, 1981. **292**(5820): p. 246-8.
82. Hultmark, D., et al., *Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae**. Eur J Biochem, 1982. **127**(1): p. 207-17.
83. Boman, H.G., et al., *Insect immunity--a gene system for antibacterial proteins*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1987. **82 Suppl 3**: p. 115-24.
84. Kim, J.K., et al., *Structure and function of papiliocin with antimicrobial and anti-inflammatory activities isolated from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus**. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41296-311.
85. Hultmark, D., et al., *Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia**. EMBO J, 1983. **2**(4): p. 571-6.
86. Wade, D., et al., *All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4761-5.
87. Christensen, B., et al., *Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5072-6.
88. Gazit, E., et al., *Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles*. Biochemistry, 1995. **34**(36): p. 11479-88.
89. Gazit, E., et al., *Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes*. J Mol Biol, 1996. **258**(5): p. 860-70.
90. Gregory, S.M., et al., *A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A*. Biophys J, 2008. **94**(5): p. 1667-80.
91. Lee, J.Y., et al., *Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9159-62.
92. Andersson, M., A. Boman, and H.G. Boman, *Ascaris nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(3): p. 599-606.
93. Pillai, A., et al., *Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum**. Biochem J, 2005. **390**(Pt 1): p. 207-14.
94. Boman, H.G., B. Agerberth, and A. Boman, *Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine*. Infect Immun, 1993. **61**(7): p. 2978-84.
95. Smeianov, V., K. Scott, and G. Reid, *Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora*. Microbes Infect, 2000. **2**(7): p. 773-7.
96. Arcidiacono, S., et al., *Membrane permeability and antimicrobial kinetics of cecropin P1 against *Escherichia coli**. J Pept Sci, 2009. **15**(6): p. 398-403.
97. Urban, C., et al., *Polymyxin B-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate Susceptible to Recombinant BPI and Cecropin P1*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(3): p. 994-5.
98. Vunnam, S., P. Juvvadi, and R.B. Merrifield, *Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine*. J Pept Res, 1997. **49**(1): p. 59-66.
99. Sipos, D., M. Andersson, and A. Ehrenberg, *The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR*. Eur J Biochem, 1992. **209**(1): p. 163-9.

100. Zakharchenko, N.S., M.A. Kaliaeva, and I. Bur'ianov Ia, [*Expression of cecropin P1 gene increases resistance of Camelina sativa (L.) plants to microbial phytopathogenes*]. *Genetika*, 2013. **49**(5): p. 609-16.
101. Gregory, K. and C.M. Mello, *Immobilization of Escherichia coli cells by use of the antimicrobial peptide cecropin P1*. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(3): p. 1130-4.
102. Strauss, J., et al., *Binding, inactivation, and adhesion forces between antimicrobial peptide cecropin P1 and pathogenic E. coli*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010. **75**(1): p. 156-64.
103. Han, X., et al., *Solvent effect and time-dependent behavior of C-terminus-cysteine-modified cecropin P1 chemically immobilized on a polymer surface*. *Langmuir*, 2011. **27**(11): p. 7042-51.
104. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. *Anal Biochem*, 1987. **166**(2): p. 368-79.
105. Studier, F.W., *Protein production by auto-induction in high density shaking cultures*. *Protein Expr Purif*, 2005. **41**(1): p. 207-34.
106. Notredame, C., D.G. Higgins, and J. Heringa, *T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment*. *J Mol Biol*, 2000. **302**(1): p. 205-17.
107. Schrodinger, LLC, *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*. 2010.
108. Vranken, W.F., et al., *The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline*. *Proteins*, 2005. **59**(4): p. 687-96.
109. Marley, J., M. Lu, and C. Bracken, *A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins*. *J Biomol NMR*, 2001. **20**(1): p. 71-5.
110. Wiegand, I., K. Hilpert, and R.E. Hancock, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(2): p. 163-75.
111. Baldwin, W.W., et al., *Growth and buoyant density of Escherichia coli at very low osmolarities*. *J Bacteriol*, 1995. **177**(1): p. 235-7.
112. Giuliani, A., *Antimicrobial peptides methods and protocols*. *Methods in molecular biology*. 2010, New York, NY u.a.: Humana Press. XV, 424 S.
113. Mangoni, M.L., et al., *Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of Escherichia coli*. *Biochem J*, 2004. **380**(Pt 3): p. 859-65.
114. Pace, C.N., et al., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. *Protein Sci*, 1995. **4**(11): p. 2411-23.
115. Morein, S., et al., *Wild-type Escherichia coli cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(12): p. 6801-9.
116. Ernst, R.R., *Citation-Classic - Two-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear-Magnetic-Resonance*. *Current Contents/Engineering Technology & Applied Sciences*, 1987(25): p. 14-14.
117. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*. *J Biomol NMR*, 1992. **2**(6): p. 661-5.
118. Cavanagh, J. and M. Rance, *Sensitivity Improvement in Isotropic Mixing (Tocsy) Experiments*. *Journal of Magnetic Resonance*, 1990. **88**(1): p. 72-85.
119. Pucek, L. and V. Sklenar, *A Simple Approach to Elimination of Phase Gradients in Nmr-Spectra Obtained with Selective Excitation Sequences for Water Suppression*. *Journal of Magnetic Resonance*, 1990. **86**(2): p. 376-383.

120. Jeener, J., et al., *Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy*. Journal of Chemical Physics, 1979. **71**(11): p. 4546-4553.
121. Schleucher, J., et al., *A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients*. J Biomol NMR, 1994. **4**(2): p. 301-6.
122. Palmer, A.G., et al., *Sensitivity Improvement in Proton-Detected 2-Dimensional Heteronuclear Correlation Nmr-Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1991. **93**(1): p. 151-170.
123. Kay, L.E., P. Keifer, and T. Saarinen, *Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(26): p. 10663-10665.
124. Schanda, P. and B. Brutscher, *Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(22): p. 8014-5.
125. Kay, L.E., et al., *Pulse Sequences for Removal of the Effects of Cross-Correlation between Dipolar and Chemical-Shift Anisotropy Relaxation Mechanism on the Measurement of Heteronuclear T1 and T2 Values in Proteins*. Journal of Magnetic Resonance, 1992. **97**(2): p. 359-375.
126. Kay, L.E., D.A. Torchia, and A. Bax, *Backbone dynamics of proteins as studied by 15N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease*. Biochemistry, 1989. **28**(23): p. 8972-9.
127. Farrow, N.A., et al., *Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by 15N NMR relaxation*. Biochemistry, 1994. **33**(19): p. 5984-6003.
128. Cavanagh, J., *Protein NMR spectroscopy principles and practice*. 2. ed. 2007, Amsterdam u.a.: Elsevier Acad. Press. XXV, 885 S.
129. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. A Wiley-Interscience publication. 1986, New York, NY <etc.>: Wiley. XV, 292 S.
130. Lederer, C., *Strukturelle und phylogenetische Analyse des Parvulins NmPin aus Nitrosopumilus maritimus*. 2012, Duisburg-Essen: Essen.
131. Guntert, P., *Automated NMR structure calculation with CYANA*. Methods Mol Biol, 2004. **278**: p. 353-78.
132. Durell, S.R., G. Raghunathan, and H.R. Guy, *Modeling the ion channel structure of cecropin*. Biophys J, 1992. **63**(6): p. 1623-31.
133. Rossi, P., et al., *A microscale protein NMR sample screening pipeline*. J Biomol NMR, 2010. **46**(1): p. 11-22.
134. Sipos, D., et al., *Two-dimensional proton-NMR studies on a hybrid peptide between cecropin A and melittin. Resonance assignments and secondary structure*. Eur J Biochem, 1991. **199**(2): p. 285-91.
135. Silvestro, L. and P.H. Axelsen, *Membrane-induced folding of cecropin A*. Biophys J, 2000. **79**(3): p. 1465-77.
136. Combet, C., et al., *NPS@: network protein sequence analysis*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 147-50.
137. Chou, P.Y. and G.D. Fasman, *Prediction of protein conformation*. Biochemistry, 1974. **13**(2): p. 222-45.
138. Chou, P.Y. and G.D. Fasman, *Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins*. Biochemistry, 1974. **13**(2): p. 211-22.

139. Provencher, S.W. and J. Glockner, *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*. Biochemistry, 1981. **20**(1): p. 33-7.
140. Cho, H.S., et al., *Yeast heat shock transcription factor N-terminal activation domains are unstructured as probed by heteronuclear NMR spectroscopy*. Protein Sci, 1996. **5**(2): p. 262-9.
141. Neuhaus, D.a.W., M. P., *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. 2. ed. 2000, New York u.a.: Wiley-VCH. XXVII, 619 S.
142. Steiner, H., *Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia**. FEBS Lett, 1982. **137**(2): p. 283-7.
143. Andreu, D., et al., *N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties*. Biochemistry, 1985. **24**(7): p. 1683-8.
144. Vaara, M. and T. Vaara, *Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(10): p. 2498-501.
145. Steiner, H., D. Andreu, and R.B. Merrifield, *Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects*. Biochim Biophys Acta, 1988. **939**(2): p. 260-6.
146. Rao, S.T., et al., *X-ray structures of Mn, Cd and Tb metal complexes of troponin C*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 1996. **52**: p. 916-922.
147. Moon, W.J., et al., *Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin*. Protein Expr Purif, 2007. **51**(2): p. 141-6.
148. Park, T.J., et al., *Cloning, expression, isotope labeling, purification, and characterization of bovine antimicrobial peptide, lactophorin in *Escherichia coli**. Protein Expr Purif, 2009. **65**(1): p. 23-9.
149. Li, Y., X. Li, and G. Wang, *Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies*. Protein Expr Purif, 2006. **47**(2): p. 498-505.
150. Vidovic, V., et al., *Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification*. J Pept Sci, 2009. **15**(4): p. 278-84.
151. Xu, X., et al., *Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli**. Protein Expr Purif, 2007. **53**(2): p. 293-301.
152. Chen, X., et al., *Novel expression vector for secretion of cecropin AD in *Bacillus subtilis* with enhanced antimicrobial activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3683-9.
153. Bommarius, B., et al., *Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli**. Peptides, 2010. **31**(11): p. 1957-65.
154. Dumon-Seignovert, L., G. Cariot, and L. Vuillard, *The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3)*. Protein Expr Purif, 2004. **37**(1): p. 203-6.
155. Miroux, B. and J.E. Walker, *Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels*. J Mol Biol, 1996. **260**(3): p. 289-98.
156. Li, Y., *Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review*. Protein Expr Purif, 2011. **80**(2): p. 260-7.
157. Joyce, J.G., et al., *Chromatographic separation of low-molecular-mass recombinant proteins and peptides on Superdex 30 prep grade*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994. **662**(2): p. 325-34.

158. Haukland, H.H., et al., *The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm*. FEBS Lett, 2001. **508**(3): p. 389-93.
159. Westerhoff, H.V., et al., *Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6597-601.
160. Nguyen, L.T., E.F. Haney, and H.J. Vogel, *The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action*. Trends Biotechnol, 2011. **29**(9): p. 464-72.
161. Wimley, W.C. and K. Hristova, *Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions*. J Membr Biol, 2011. **239**(1-2): p. 27-34.
162. Silvestro, L., J.N. Weiser, and P.H. Axelsen, *Antibacterial and antimembrane activities of cecropin A in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 602-7.
163. Marassi, F.M., et al., *Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy*. Biophys J, 1999. **77**(6): p. 3152-5.
164. Denisov, I.G., et al., *Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(11): p. 3477-87.
165. Robinson, K.E., P.N. Reardon, and L.D. Spicer, *In-cell NMR spectroscopy in Escherichia coli*. Methods in molecular biology (Clifton, N J ), 2012. **831**: p. 261-77.

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1.1 Ursprünge der in der ADP erfassten AMPs nach [22] modifiziert.....	12
Abbildung 1.2 Aufbau bakterieller Biomembranen nach [46] modifiziert .....	14
Abbildung 1.3 Membraninteraktionsmodelle der AMPs nach [60] modifiziert .....	15
Abbildung 1.4 Struktur von Papiliocin in 300 mM $\alpha$ DPC-Mizellen nach [84] modif.....	16
Abbildung 1.5 Sequenzen der Cecropin P Peptide von <i>Ascaris suum</i> nach [93] modif. ....	17
Abbildung 2.1 verwendete Proteinmarker .....	22
Abbildung 2.2 Sequenz des zu erwartenden PCR-Produktes und der genutzten Primer.....	31
Abbildung 2.3 Temperaturzyklus zur Amplifikation des Cecropin P1 – Fragmentes.....	32
Abbildung 2.4 Aufbau des MIC-Tests.....	39
Abbildung 2.5 Cyana 3.0 nach [130, 131] .....	49
Abbildung 3.1 Klonierstrategie für die Cecropin P1 Konstrukte .....	52
Abbildung 3.2 Proteinnachweis nach Expression in <i>E. coli</i> BL21 bei 37 °C.....	53
Abbildung 3.3 Zelldichten während der Expression in <i>E. coli</i> BL21 .....	53
Abbildung 3.4 Proteinnachweis nach Expressionstest in <i>E. coli</i> C43 .....	54
Abbildung 3.5 Zelldichten während der Expression in <i>E. coli</i> C43 .....	54
Abbildung 3.6 Proteinnachweis nach Expressions- und Löslichkeitstest zur Erhöhung der Proteinausbeute .....	56
Abbildung 3.7 Proteinnachweis nach Expressionstest in Phosphatmedien .....	57
Abbildung 3.8 Proteinnachweis nach Expressionstest bei 37 °C in Medium P mit verschiedenen Beimpfungsmethoden .....	58
Abbildung 3.9 Vergleich der Expression in Phosphatmedien vor und nach der Optimierung .....	58
Abbildung 3.10 Reinigungsverlauf von rekombinantem Cecropin P1 .....	60
Abbildung 3.11 Determinierung der MICs (n=3).....	62
Abbildung 3.12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen .....	63
Abbildung 3.13 Chromatogramm zur SEC des Kalibrierungslaufs und dessen Auswertung .....	64
Abbildung 3.14 analytische konzentrationsabhängige SEC des synthetischen Cecropin P1.....	65
Abbildung 3.15 Exemplarische T <sub>1</sub> - und T <sub>2</sub> -Kurvenanpassungen .....	66
Abbildung 3.16 Berechnete T <sub>1</sub> -Zeiten für Cecropin P1.....	66
Abbildung 3.17 Berechnete T <sub>2</sub> -Zeiten für Cecropin P1.....	66
Abbildung 3.18 Vergleich der $\tau_c$ von Cecropin P1 mit denen von bekannten Proteinen [133] .....	67
Abbildung 3.19 Sequenz-abhängige Sekundärstrukturvorhersagen für Cecropin P1 .....	68
Abbildung 3.20 Konzentrationsabhängige CD-Spektroskopie von Cecropin P1 und Sekundärstrukturanalysen.....	68
Abbildung 3.21 Temperaturabhängige CD-Spektroskopie und Sekundärstrukturanalyse von Cecropin P1.....	69
Abbildung 3.22 Ramachandran-Plot des Cecropin P1 Ensembles.....	70
Abbildung 3.23 Die Struktur von Cecropin P1 .....	71
Abbildung 3.24 Überlagerung des <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC von rekombinantem und des <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-SOFAST-HMQCs vom synthetischen Cecropin P1 .....	72

Abbildung 3.25 Die heteronukleare NOEs des Cecropin P1 .....	73
Abbildung 3.26 Zugeordnetes $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Cecropin P1 in 30 % HFIP <sub>d2</sub> .....	74
Abbildung 3.27 CD-Spektren der LUV-Titration.....	75
Abbildung 3.28 Vergleich der CD-Spektren aus den Titrationsexperimenten mit LUV und SDS....	75
Abbildung 3.29 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von CecP1 mit Bizellpräparation bei variierenden Temperaturen.....	76
Abbildung 3.30 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von CecP1 mit und ohne Bizellpräparation bei 25 °C.....	76
Abbildung 3.31 Multiples Sequenzalignment der Cecropine .....	77
Abbildung 3.32 Übersicht über die entworfenen Cecropin P1-Variationen I.....	78
Abbildung 3.33 MIC-Determinierung für Cecropin P1 Varianten I (n=3).....	79
Abbildung 3.34 MIC-Test für FITC-Ahx- $\Delta\text{S1W2}$ CecP1 .....	80
Abbildung 3.35 Übersicht über die entworfenen Cecropin P1-Variationen II.....	80
Abbildung 3.36 MIC-Determinierung für Cecropin P1 Varianten II (n=2).....	81
Abbildung 3.37 Einfluss der Hydrophobizität des C-terminalen Bereichs des Cecropin P1 .....	82
Abbildung 3.38 Einfluss der Länge des hydrophoben C-Terminus des Cecropin P1 .....	82
Abbildung 3.39 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit CecP1-Peptiden inkubierten Bakterien.....	83
Abbildung 3.40 Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen nach Inkubation mit FITC- $\Delta\text{S1W2}$ CecP1 ...	84
Abbildung 4.1 Strukturen von Cecropin A nach Holak <i>et al.</i> [43] .....	88
Abbildung 4.2 Alignment von Cecropin A und Cecropin P1 nach [91] modif.....	89
Abbildung 4.3 <i>Helical Wheel</i> Projektionen von Cecropin P1 .....	94

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1.1 Einführung neuer antibakterieller Substanzklassen für die Therapie am Menschen nach [8] .....	10
Tabelle 1.2 Bestimmte MIC-Werte für Cecropin P1 .....	18
Tabelle 2.1 Übersicht über verwendete Antibiotika-Stocklösungen .....	26
Tabelle 2.2 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	26
Tabelle 2.3 Genutzte Peptide .....	27
Tabelle 2.4 Verwendete Plasmide .....	28
Tabelle 2.5 Verwendete Oligonukleotide .....	28
Tabelle 2.6 Generierte Konstrukte .....	28
Tabelle 2.7 Verwendete <i>Software</i> .....	30
Tabelle 2.8 PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA.....	31
Tabelle 2.9 Restriktionsansatz für <i>Insert</i> -DNA und Vektor-DNA I.....	32
Tabelle 2.10 Restriktionsansatz für <i>Insert</i> -DNA und Vektor-DNA .....	33
Tabelle 2.11 PCR-Ansatz für die zielgerichtete Mutagenese .....	34
Tabelle 2.12 Ansatz zur 5'-Phosphorylierung .....	34
Tabelle 2.13 Zusammensetzung der Ligationsansätze .....	35
Tabelle 2.14 Zusammensetzung der Ligationsansätze .....	35
Tabelle 2.15 Verwendete Parameter für Expressionstests.....	37
Tabelle 2.16 verwendete Peptidkonzentrationen .....	40
Tabelle 2.17 Protokoll der an der FPLC-Anlage durchgeführten Reinigung .....	42
Tabelle 2.18 Zusammensetzung der Tris/Tricin-Gele nach Schägger und Jagow [104] .....	43
Tabelle 2.19 Für die Kalibrierung genutzte Substanzen .....	44
Tabelle 2.20 Verwendete Parameter für die CD-Spektrometrie .....	46
Tabelle 2.21 Verwendete Parameter für die verwendeten NMR-Spektren .....	47
Tabelle 2.22 Verwendete Zeiten ( $\tau$ ) für die Relaxation .....	48
Tabelle 2.23 Verwendete Parameter für die Dynamik-Messungen .....	48
Tabelle 3.1 Korrelation der gemessenen Zelldichten bei 600 nm und der Kolonie-formenden Einheiten pro ml.....	61
Tabelle 3.2 Übersicht über die MIC von Cecropin P1 und SUMO-Cecropin P1-Fusionsprotein.....	62
Tabelle 3.3 Übersicht über die Ergebnisse der analytischen SEC von Cecropin P1 .....	65
Tabelle 3.4 Statistik des mit Cyana 2.0 berechneten Ensembles aus 10 Cecropin P1-Strukturen .	70
Tabelle 3.5 MICs der Cecropin P1-Peptide .....	79
Tabelle 3.6 MIC der Cecropin P1-Peptide II .....	81



```

|||||
Seq_2 407 GCTGTGCGAAAACCTGCTAAAAAACTGGAAAACCTCGGCGAAAAAACGTATCAGTGAGGGCAT 466

A I A I Q G G P R * W I Q A C G R L E K
Seq_1 719 TGCCATTGCCATTGAGGGTGGTCTCGTTAATGGATCCAAGCTTGGCGCCGCTCGAGAA 778
|||||
Seq_2 467 TGCCATTGCCATTGAGGGTGGTCTCGTTAATGGATCCAAGCTTGGCGCCGCTCGAGA- 525

T S L G I Y S A Q S A S G D A A N L V E
Seq_1 779 GACAAGCTTAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTATGCTGCCAACTTAGTCTGA 838
|||||
Seq_2 526 GACAAGCTTAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTATGCTGCCAACTTAGTCTGA 585

H H H H H H * D P A A N K A R K E A E L
Seq_1 839 GCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTT 898
|||||
Seq_2 586 GCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTT 645

A A A T A E Q * L A * P L G A S K R V L
Seq_1 899 GGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAACGGGTCTT 958
|||||
Seq_2 646 GGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAACGGGTCTT 705

R G F L L K G G T I S G L A N G T R P V
Seq_1 959 GAGGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGT 1018
|||||
Seq_2 706 GAGGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGT 765

A A H * A R R V W W L R A A * P L H L P
Seq_1 1019 AGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC 1078
|||||
Seq_2 766 AGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC 825

A P * R P L L S L S S L P F S P R S P A
Seq_1 1079 AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGC 1138
|||||
Seq_2 826 AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGC 885

F P V K L * I G G S L * G S D L V L Y G
Seq_1 1139 TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGG 1198
|||||
Seq_2 886 TTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTcCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGG 945

T S T P K N L I R V M V H V V G H R P D
Seq_1 1199 CACCTCGACCCCAAAAACTTGATTA-GGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTG 1257
|||||
Seq_2 946 CACCTCGACCCCaAAAACTTGATTaaggGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTG 1005

R R F F A L * R W S P R S L I V D S C S
Seq_1 1258 ATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTT 1317
|||||
Seq_2 1006 ATAGACGGTTTTTCgcCctTGACGTTGGantCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTT 1065

K L E Q H S T L S R S I L L I Y K G F C
Seq_1 1318 CCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTT 1377
|||||
Seq_2 1066 CCaAACTGGAACAACacTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTnnaagGGattTT 1125

R F R P I G * K M S * F N K N L T R I L
Seq_1 1378 GCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTT 1437
|||||
Seq_2 1126 GCCGaTTTCGGCTaTTGGTTAAAAAaTgnnctgaTttannnAAAAATTTAACgcgAATTT 1185

T K Y * R L Q F R W H F S G K C A R N
Seq_1 1438 TAA-CAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGAAC 1496
|||#:|||||#####
Seq_2 1186 Taann-aAatataAcg----- 1201

```



```

|||||
Seq_2 709 GGGGTTTTTGTGTAAGGAGGAACATATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAG 768

A H * A R R V W W L R A A * P L H L P A
Seq_1 1021 CGGCGCATTAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG 1080
|||||
Seq_2 769 CGGCGCATTAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG 828

P * R P L L S L S S L P F S P R S P A F
Seq_1 1081 CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTT 1140
|||||
Seq_2 829 CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTT 888

P V K L * I G G S L * G S D L V L Y G T
Seq_1 1141 TCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCA 1200
|||||
Seq_2 889 TCCCGTCAAGCTCTaAATCggGgGCTCCCTTTAgGGTCCGATTTAGTGCTTTAcggCA 948

S T P K N L I R V M V H V V G H R P D R
Seq_1 1201 CCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATA 1260
|||||
Seq_2 949 CCTCGACCCCaAAAACTTGATTAGGGTgatGGTTCACGTantggGCCAtcgcCCTGATa 1008

R F F A L * R W S P R S L I V D S C S
Seq_1 1261 GA-CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTC 1319
#|#:#|||||:|||||:|||||:|#####
Seq_2 1009 Aann-gtTTTTcnnCttTGacgtTGgantCCAcGTTcTTAataGTgna----- 1057

```

## BC976

Alignment of Sequence\_1: [BC976\_Sollsequenz.gb.xdna] with Sequence\_2: [StrepII\_BC975\_K2-T7.seq]

Similarity : 976/5793 (16,85 %)

```

* Q F P S R N N F V * L * E G D I H M G
Seq_1 241 GATAACAATCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGG 300
#####|##|###|###|:|:|
Seq_2 1 -----atatTTTGTTTaCTTTAnGangGaGaTaTaCaTATGG 37

S S H H H H H G S G L V P R G S A S M
Seq_1 301 GCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGCTAGCA 360
|||||:|:|
Seq_2 38 GCAGCAGCcanentCATCatcATCACGGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGCTAGCA 97

S D S E V N Q E A K P E V K P E V K P E
Seq_1 361 TGTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTG 420
|||||
Seq_2 98 TGTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTG 157

T H I N L K V S D G S S E I F F K I K K
Seq_1 421 AGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTCAAGATCAAAA 480
|||||
Seq_2 158 AGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTCAAGATCAAAA 217

T T P L R R L M E A F A K R Q G K E M D
Seq_1 481 AGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGG 540
|||||
Seq_2 218 AGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGG 277

S L R F L Y D G I R I Q A D Q T P E D L
Seq_1 541 ACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATTCAGCTGATCAGACCCCTGAAGATT 600
|||||
Seq_2 278 ACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATTCAGCTGATCAGACCCCTGAAGATT 337

```

D M E D N D I I E A H R E Q I G G S W L  
Seq\_1 601 TGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTTCTTGGC 660  
|||||  
Seq\_2 338 TGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTTCTTGGC 397

S K T A K K L E N S A K K R I S E G I A  
Seq\_1 661 TGTCGAAAACCTGCTAAAAAAGCTGGAAAACCTCGGCGAAAAAACGTATCAGTGAGGGCATTG 720  
|||||  
Seq\_2 398 TGTCGAAAACCTGCTAAAAAAGCTGGAAAACCTCGGCGAAAAAACGTATCAGTGAGGGCATTG 457

I A I Q G G P R G W S H P Q F E K \* G S  
Seq\_1 721 CCATTGCCATTGAGGGTGGTCCGCGGGGCTGGTCACATCCTCAGTTCGAGAAATAAGGAT 780  
|||||  
Seq\_2 458 CCATTGCCATTGAGGGTGGTCCGCGGGGCTGGTCACATCCTCAGTTCGAGAAATAAGGAT 517

K L A A A S R R Q A \* V F I R R K V R R  
Seq\_1 781 CCAAGCTTGCGGCGCCTCGAGAAGACAAGCTTAGGTATTTATTTCGCGCAAAGTGCCTC 840  
|||||  
Seq\_2 518 CCAAGCTTGCGGCGCCTCGAGA-GACAAGCTTAGGTATTTATTTCGCGCAAAGTGCCTC 576

V M L P T \* S S T T T T T T E I R L L T  
Seq\_1 841 GGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGCACCACCACCACCACCAGTTCGAGATCCGGCTGCTAA 900  
|||||  
Seq\_2 577 GGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGCACCACCACCACCACCAGTTCGAGATCCGGCTGCTAA 636

K P E R K L S W L L P P L S N N \* H N P  
Seq\_1 901 CAAAGCCCAGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC 960  
|||||  
Seq\_2 637 CAAAGCCCAGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC 696

L G P L N G S \* G V F C \* K E E L Y P D  
Seq\_1 961 CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGG 1020  
|||||  
Seq\_2 697 CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGG 756

W R M G R A L \* R R I K R G G C G G Y A  
Seq\_1 1021 ATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACG 1080  
|||||  
Seq\_2 757 ATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACG 816

Q R D R Y T C Q R P S A R S F R F L P F  
Seq\_1 1081 CGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTCCCT 1140  
|||||  
Seq\_2 817 CGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTCCCT 876

L S R H V R R L S P S S S K S G A P F R  
Seq\_1 1141 TCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA 1200  
|||||:|||||  
Seq\_2 877 TCCTTTCTCGcncGTTTCGCCGGCTTTcCCCGTCAAGCTCTAAATCgGGGGCTCcTTTA 936

V P I \* C F T A P R P Q K T \* L G \* W F  
Seq\_1 1201 GGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGCTGATTAGGGTGGTGGT 1260  
|||||:|||||:|||||#####  
Seq\_2 937 gGGTTCcGaTttantGCTTTACGGCACCTngaCcccaAAAAACTt----- 981

## NMR

**Tabelle A 1 Auflistung aller zugeordneten Protonen- und Stickstoffresonanzen (IUPAC Nomenklatur)**

AS	H <sub>N</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	H <sub>γ</sub>	H <sub>δ</sub>	H <sub>ε</sub>	N
1S	-	-	-	-	-	-	-
2W	-	-	3.309	-	7.288	10.139	-
3L	7.981	4.131	1.469	1.469	0.914	-	123.722
4S	8.283	4.462	3.878	-	-	-	116.484
5K	8.128	4.288	-	-	1.681	3.000	-
6T	8.006	4.279	4.200	1.196	-	-	114.173

AS	H <sub>N</sub>	H <sub>α</sub>	H <sub>β</sub>	H <sub>γ</sub>	H <sub>δ</sub>	H <sub>ε</sub>	N
7A	8.133	4.304	1.403	-	-	-	126.455
8K	8.062	4.261	1.759	-	-	-	119.718
9K	8.217	4.288	1.775	-	1.691	2.996	122.607
10L	8.241	4.340	1.650	1.650	0.889/0.929	-	123.780
11E	8.380	4.296	1.965/2.075	2.277	-	-	122.091
12N	8.465	-	2.851	-	6.909/7.611	-	120.015
13S	8.291	4.472	3.876	-	-	-	119.079
14A	8.224	4.304	1.425	-	-	-	125.601
15K	8.165	4.246	1.801	1.424	1.725	2.990	120.712
16K	8.166	4.246	1.801	1.424	1.725	2.990	-
17R	8.315	4.354	1.780/1.863	1.661/1.610	3.211	7.154	122.502
18I	8.177	4.194	1.903	1.216/0.933	-	-	122.148
19S	8.029	4.329	3.815/3.904	-	-	-	116.442
20E	8.389	4.332	1.964/2.075	2.276	-	-	122.988
21G	8.339	3.960	-	-	-	-	109.350
22I	7.856	4.180	1.868	1.456/1.177/0.916	-	-	119.949
23A	8.293	4.367	1.377	-	-	-	127.875
24I	7.980	4.131	1.847	1.195/1.469/0.913	-	-	120.140
25A	8.245	4.360	1.374	-	-	-	127.795
26I	8.054	4.155	1.864	1.475/1.207/0.904	-	-	120.275
27Q	8.409	4.366	2.129/2.017	2.392	-	6.825/7.485	124.462
28G	8.412	4.004	-	-	-	-	110.688
29G	8.097	4.069/4.176	-	-	-	-	108.864
30P	-	4.197	1.8847/1.464	1.623	2.986/3.217	-	-
31R	7.958	4.199	1.874/1.725	1.625	3.211	7.154	126.450
	H <sub>ε3</sub>	H <sub>ζ2</sub>	H <sub>ζ3</sub>	H <sub>η2</sub>	N <sub>ε</sub>	N <sub>δ2</sub>	
2W	7.520	7.649	7.260	7.173	129.570	-	-
12N	-	-	-	-	-	112.543	-
27Q	-	-	-	-	112.124	-	-

### 5.1.2 Verwendete NOE restraints

#### Intraresidual(i,j)

17	ARG	H	17	ARG	QB	3.43	#peak639	
17	ARG	H	17	ARG	QG	4.42	#peak658	
17	ARG	HA	17	ARG	QG	3.23	#peak869	
17	ARG	QB	17	ARG	QD	3.66	#peak934	
8	LYS	H	8	LYS	QB	3.27	#peak653	
10	LEU	H	10	LEU	QQD	4.09	#peak721	
11	GLU	H	11	GLU	QB	3.27	#peak631	
11	GLU	QB	11	GLU	QG	2.44	#peak1108	
18	ILE	HA	18	ILE	QG2	3.28	#peak1214	#SUP0.97#QF0.92
22	ILE	HA	22	ILE	QG2	3.55	#peak1214	#SUP0.97#QF0.92
3	LEU	HA	3	LEU	QQD	3.43	#peak1216	#SUP0.94#QF0.48
15	LYS	HA	15	LYS	QD	4.59	#peak882	#SUP0.99#QF0.92
16	LYS	HA	16	LYS	QD	4.85	#peak882	#SUP0.99#QF0.92
15	LYS	QB	15	LYS	QE	5.50	#peak935	#SUP0.99#QF0.53
16	LYS	QB	16	LYS	QE	5.50	#peak935	#SUP0.99#QF0.53
15	LYS	QD	15	LYS	QE	2.98	#peak939	#SUP1.00#QF0.98
5	LYS	QD	5	LYS	QE	2.58	#peak944	#SUP0.98#QF0.90
9	LYS	QD	9	LYS	QE	2.76	#peak945	#SUP0.34#QF0.34
15	LYS	QB	15	LYS	QG	2.97	#peak975	#SUP0.78#QF0.45
15	LYS	QG	15	LYS	QD	2.58	#peak976	#SUP0.51#QF0.30
16	LYS	QG	16	LYS	QD	2.77	#peak976	#SUP0.51#QF0.30
3	LEU	QB	3	LEU	QQD	3.80	#peak1005	#SUP0.86#QF0.35
27	GLN	HB2	27	GLN	QG	2.62	#peak1105	#SUP0.81#QF0.81
11	GLU	HB3	11	GLU	QG	2.84	#peak1106	#SUP0.75#QF0.51
27	GLN	HB3	27	GLN	QG	2.62	#peak1107	#SUP0.80#QF0.80
11	GLU	HB2	11	GLU	QG	2.84	#peak1108	#SUP0.93#QF0.75
6	THR	HA	6	THR	QG2	3.03	#peak1211	#SUP0.59#QF0.59
5	LYS	H	5	LYS	HA	2.85	#peak516	#SUP0.44#QF0.44
6	THR	H	6	THR	HB	4.01	#peak527	#SUP0.86#QF0.80
31	ARG	HA	31	ARG	HE	4.99	#peak529	#SUP0.50#QF0.50

21	GLY	H	21	GLY	QA	2.92	#peak560	#SUP0.93#QF0.93
4	SER	H	4	SER	QB	4.05	#peak570	#SUP1.00#QF0.93
2	TRP	QB	2	TRP	HD1	3.53	#peak580	#SUP0.99#QF0.99
17	ARG	H	17	ARG	QD	5.50	#peak583	#SUP0.87#QF0.87
11	GLU	H	11	GLU	QG	4.42	#peak618	#SUP1.00#QF0.90
20	GLU	H	20	GLU	QG	4.84	#peak618	#SUP1.00#QF0.90
18	ILE	H	18	ILE	HB	3.81	#peak636	#SUP0.58#QF0.38
22	ILE	H	22	ILE	HB	3.12	#peak640	#SUP0.94#QF0.94
26	ILE	H	26	ILE	HB	3.27	#peak641	#SUP0.70#QF0.70
24	ILE	H	24	ILE	HB	3.56	#peak642	#SUP0.70#QF0.60
9	LYS	H	9	LYS	QB	3.63	#peak651	#SUP0.99#QF0.99
17	ARG	H	17	ARG	HG2	5.21	#peak658	#SUP0.93#QF0.93
10	LEU	H	10	LEU	QB	3.11	#peak659	#SUP0.88#QF0.88
17	ARG	H	17	ARG	HG3	5.21	#peak664	#SUP0.93#QF0.93
3	LEU	H	3	LEU	QB	3.59	#peak675	#SUP1.00#QF0.99
22	ILE	H	22	ILE	HG13	3.80	#peak677	#SUP0.99#QF0.99
14	ALA	H	14	ALA	QB	3.49	#peak679	#SUP0.99#QF0.99
7	ALA	H	7	ALA	QB	3.50	#peak686	#SUP0.99#QF0.99
23	ALA	H	23	ALA	QB	3.10	#peak690	#SUP1.00
25	ALA	H	25	ALA	QB	3.13	#peak691	#SUP1.00
18	ILE	H	18	ILE	QG1	3.71	#peak698	#SUP0.90#QF0.90
6	THR	H	6	THR	QG2	4.14	#peak703	#SUP0.79#QF0.40
6	THR	H	6	THR	HG1	4.57	#peak703	#SUP0.79#QF0.40
22	ILE	H	22	ILE	HG12	3.80	#peak707	#SUP0.99#QF0.99
18	ILE	H	18	ILE	QG2	4.03	#peak716	#SUP0.99#QF0.99
22	ILE	H	22	ILE	QG2	3.92	#peak719	#SUP0.99#QF0.99
10	LEU	H	10	LEU	QD1	4.83	#peak721	#SUP0.99#QF0.34
10	LEU	H	10	LEU	QD2	4.83	#peak721	#SUP0.99#QF0.34
3	LEU	H	3	LEU	QQD	4.18	#peak722	#SUP1.00#QF0.86
24	ILE	H	24	ILE	QG2	4.49	#peak722	#SUP1.00#QF0.86
26	ILE	H	26	ILE	QG2	4.26	#peak723	#SUP1.00#QF0.30
9	LYS	HA	9	LYS	QD	3.78	#peak799	#SUP0.39#QF0.39
18	ILE	HA	18	ILE	QG1	3.68	#peak825	#SUP0.48#QF0.48
10	LEU	HA	10	LEU	HG	3.95	#peak868	#SUP0.98#QF0.94
11	GLU	HA	11	GLU	QG	4.25	#peak871	#SUP0.87#QF0.59
20	GLU	H	20	GLU	QB	3.48	#peak631	
22	ILE	HA	22	ILE	QG1	3.48	#peak832	
24	ILE	H	24	ILE	QG1	4.58	#peak703	
24	ILE	HB	24	ILE	QG1	2.47	#peak978	
26	ILE	QG2	26	ILE	QG1	3.22	#peak1009	
27	GLN	H	27	GLN	QE2	5.34	#peak1219	
27	GLN	QB	27	GLN	QG	2.22	#peak1105	
31	ARG	H	31	ARG	QB	3.49	#peak642	
31	ARG	HA	31	ARG	QB	2.64	#peak801	

Sequentiell(i,i+1)

24	ILE	QG1	25	ALA	H	4.77	#peak701	
22	ILE	QG1	23	ALA	H	4.84	#peak704	
20	GLU	QB	21	GLY	H	4.27	#peak625	
17	ARG	QB	18	ILE	H	3.31	#peak636	
17	ARG	QG	18	ILE	H	5.34	#peak665	
17	ARG	QG	18	ILE	HA	3.94	#peak804	
19	SER	QB	20	GLU	H	4.17	#peak569	
16	LYS	QG	17	ARG	HA	5.50	#peak812	#SUP0.84#QF0.67
8	LYS	HA	9	LYS	QD	4.18	#peak803	#SUP0.45#QF0.45
17	ARG	HG2	18	ILE	HA	4.82	#peak804	#SUP0.92#QF0.92
17	ARG	HG3	18	ILE	HA	4.82	#peak806	#SUP0.45#QF0.45
12	ASN	H	13	SER	H	4.77	#peak755	#SUP0.24#QF0.24
24	ILE	QG2	25	ALA	H	4.97	#peak721	#SUP0.99#QF0.34
26	ILE	QG2	27	GLN	H	4.66	#peak720	#SUP1.00
22	ILE	QG2	23	ALA	H	3.62	#peak717	#SUP0.94#QF0.94
21	GLY	H	22	ILE	QG2	5.47	#peak715	#SUP0.24#QF0.24
18	ILE	QG1	19	SER	H	4.07	#peak699	#SUP0.63#QF0.42
24	ILE	HG12	25	ALA	H	5.50	#peak701	#SUP0.98#QF0.98

6	THR	QG2	7	ALA	H	5.49	#peak702	#SUP0.99#QF0.97
6	THR	HG1	7	ALA	H	5.50	#peak702	#SUP0.99#QF0.97
23	ALA	QB	24	ILE	H	3.75	#peak692	#SUP1.00
25	ALA	QB	26	ILE	H	4.51	#peak689	#SUP0.98#QF0.79
7	ALA	QB	8	LYS	H	3.69	#peak681	#SUP0.82#QF0.82
14	ALA	QB	15	LYS	H	3.75	#peak685	#SUP0.73#QF0.73
16	LYS	QG	17	ARG	H	5.50	#peak678	#SUP1.00#QF0.45
10	LEU	QB	11	GLU	H	4.33	#peak660	#SUP0.89#QF0.89
11	GLU	H	12	ASN	H	4.09	#peak53	#SUP0.53#QF0.53
10	LEU	H	11	GLU	H	4.89	#peak62	#SUP0.67#QF0.67
17	ARG	H	18	ILE	H	5.06	#peak64	#SUP0.25#QF0.25
13	SER	H	14	ALA	H	3.80	#peak73	#SUP0.54#QF0.54
16	LYS	H	17	ARG	H	5.45	#peak93	#SUP1.00#QF0.36
4	SER	H	5	LYS	H	4.74	#peak104	#SUP0.66#QF0.66
19	SER	H	20	GLU	H	5.17	#peak116	#SUP1.00#QF0.43
26	ILE	H	27	GLN	H	5.50	#peak116	#SUP1.00#QF0.43
3	LEU	H	4	SER	H	4.93	#peak126	#SUP1.00#QF0.86
21	GLY	H	22	ILE	H	4.37	#peak149	#SUP0.96#QF0.96
22	ILE	H	23	ALA	H	4.65	#peak150	#SUP0.98#QF0.98
25	ALA	HA	26	ILE	H	3.38	#peak498	#SUP0.62#QF0.21
23	ALA	HA	24	ILE	H	2.88	#peak499	#SUP0.53#QF0.53
10	LEU	HA	11	GLU	H	3.38	#peak503	#SUP1.00#QF0.29
9	LYS	HA	10	LEU	H	2.96	#peak513	#SUP0.57#QF0.29
8	LYS	HA	9	LYS	H	2.99	#peak522	#SUP0.47#QF0.47
22	ILE	HA	23	ALA	H	2.64	#peak534	#SUP0.68#QF0.68
24	ILE	HA	25	ALA	H	2.77	#peak542	#SUP0.73#QF0.73
21	GLY	QA	22	ILE	H	2.74	#peak561	#SUP1.00
20	GLU	H	21	GLY	QA	5.50	#peak563	#SUP0.49#QF0.34
2	TRP	QB	3	LEU	H	4.63	#peak581	#SUP0.98#QF0.98
17	ARG	QD	18	ILE	H	5.50	#peak584	#SUP0.97#QF0.97
20	GLU	HB3	21	GLY	H	4.91	#peak625	#SUP0.70#QF0.70
20	GLU	HB2	21	GLY	H	4.91	#peak630	#SUP0.78#QF0.78
26	ILE	HB	27	GLN	H	4.70	#peak638	#SUP1.00#QF0.99
24	ILE	HB	25	ALA	H	4.18	#peak643	#SUP0.96#QF0.96
16	LYS	QB	17	ARG	H	4.05	#peak649	#SUP0.98#QF0.57
9	LYS	QB	10	LEU	H	4.12	#peak651	#SUP0.99#QF0.99
3	LEU	QB	4	SER	H	5.03	#peak671	#SUP0.92#QF0.84
24	ILE	HG13	25	ALA	H	5.50	#peak674	#SUP0.98#QF0.97
16	LYS	QD	17	ARG	HA	4.78	#peak798	#SUP0.32#QF0.32
21	GLY	H	22	ILE	QG1	5.34	#peak673	

Mittelweit( $\leq i, i+4$ )

26	ILE	QG1	28	GLY	H	5.34	#peak670	
20	GLU	QB	22	ILE	H	5.34	#peak1247	
20	GLU	HA	22	ILE	H	5.50	#peak506	#SUP0.38#QF0.38
14	ALA	HA	17	ARG	H	3.30	#peak511	#SUP0.53#QF0.53
3	LEU	QB	5	LYS	H	5.50	#peak669	#SUP0.64#QF0.49
3	LEU	QB	7	ALA	H	5.50	#peak669	#SUP0.64#QF0.49
25	ALA	QB	28	GLY	H	5.50	#peak693	#SUP0.28#QF0.28
14	ALA	HA	17	ARG	HB2	4.02	#peak790	#SUP0.46#QF0.46
14	ALA	HA	17	ARG	HB3	4.02	#peak874	#SUP0.88#QF0.80
3	LEU	QQD	5	LYS	H	5.50	#peak1246	#SUP0.61#QF0.48
3	LEU	QQD	7	ALA	H	5.50	#peak1246	#SUP0.61#QF0.48
14	ALA	HA	17	ARG	QB	3.39	#peak790	

Weitreichend( $> i, i+4$ )

15	LYS	H	31	ARG	H	4.32	#peak129	#SUP0.79#QF0.79
14	ALA	HA	31	ARG	H	4.78	#peak509	#SUP0.75#QF0.75
15	LYS	HA	31	ARG	H	4.03	#peak519	#SUP0.72#QF0.72
15	LYS	HA	30	PRO	HB3	3.83	#peak782	#SUP0.56#QF0.56
15	LYS	QB	30	PRO	HA	4.11	#peak788	#SUP0.58#QF0.58
15	LYS	HA	30	PRO	HB2	3.83	#peak811	#SUP0.59#QF0.25
14	ALA	HA	31	ARG	QB	5.34	#peak775	
14	ALA	QB	31	ARG	QB	4.90	#peak979	

15	LYS	H	30	PRO	QB	3.71	#peak668
15	LYS	H	30	PRO	QG	5.35	#peak665
15	LYS	HA	30	PRO	QB	3.07	#peak811
15	LYS	HA	30	PRO	QG	4.68	#peak881

## Danksagung

---

Danken möchte ich in aller erster Linie Prof. Dr. Peter Bayer dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben diese Dissertation überhaupt anzufertigen, für das Vertrauen in mich und die Freiheiten, von denen ich das Gefühl hatte sie genießen zu dürfen. Außerdem danke ich Dr. Anja Matena für die fachliche und moralische Unterstützung und für die Möglichkeit dieses spannende Thema der antimikrobiellen Peptide von Beginn an mitzugestalten.

Dann danke ich Anne, dafür dass sie mir die AG Bayer überhaupt erst vorgestellt hat. Für moralische und fachliche Unterstützung und auch all das, was ich jetzt einfach unter Freundschaft zusammenfasse.

Danke auch an die aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der AG Bayer und auch den überaus freundlichen und hilfsbereiten Arbeitskollegen aus anderen AGs des ZMBs. Ich habe von jedem von euch viel lernen und hoffentlich einigen auch ein bisschen davon zurückgeben können. Danke an Tina, Peter (Binz), Daniel, Johannes, Lukas, André, Jenny, Edisa, Dana, Franzi, Irina, Andrey, Alma, Gila, Christoph, Cristina, Helmut, Melisa und Monika.

Dank gilt ebenso meiner Familie und Antje dafür, dass ihr mich in allem unterstützt was mir wichtig ist. Ohne das wäre Alles Nichts.

## Lebenslauf

---

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Erklärungen

---

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Studien zu Cecropin P1 – einem antimikrobiellen Peptid“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Julia Herfurth befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden