

**Molekulare Charakterisierung
von antimikrobiellen und cytolytischen Polypeptiden
von *Acanthamoeba culbertsoni*, einem
freilebenden und potenziell humanpathogenen Protozoon**

Dissertation

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



vorgelegt von
Maren Simanski
aus Iserlohn

Kiel 2007

1. Gutachter (in): Prof. Dr. Matthias Leippe

2. Gutachter (in): Prof. Dr. J. Grötzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2007

Zum Druck genehmigt:

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung.....	1
1.1.1	<i>Acanthamoeba</i>	1
1.1.2	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	2
1.1.3	<i>Naegleria fowleri</i>	2
1.2	Biologie der <i>Acanthamoeba</i>	3
1.3	Medizinische Relevanz der <i>Acanthamoeba</i>	5
1.3.1	<i>Acanthamoeba</i> -Keratitis.....	5
1.3.2	Granulomatöse Amöbenencephalitis.....	6
1.3.3	Intrazelluläre Bakterien	7
1.4	Cytotoxische Faktoren von pathogenen Amöben	8
1.4.1	Adhäsion.....	9
1.4.2	Proteasen	9
1.4.3	Amoebapores und Naegleriapores	10
1.5	Culbicin	11
1.6	Zielsetzung	12
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Kits	14
2.1.3	PCR-Reagenzien und DNA-Längenstandard.....	14
2.1.4	Protein-Größenstandards	14
2.1.5	Enzyme und Inhibitoren	15
2.1.6	Oligonukleotide	15
2.1.7	Antikörper und Antiserum	15
2.1.8	Allgemeine Puffer	16
2.2	Programme	17
2.3	Bakterien und Kulturmedium.....	17
2.3.1	Transformation chemisch transformationskompetenter <i>E. coli</i>	18
2.4	Amöben und Zellkultur	18
2.5	Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren.....	20
2.5.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	20
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	20
2.5.3	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	20
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.5.5	Reinigung von PCR-Produkten und Vektoren	21
2.5.6	Sequenzanalyse	21
2.5.7	RNA-Isolation	21
2.5.8	mRNA-Isolation.....	22
2.5.9	cDNA-Synthese (Erst-Strang).....	22
2.5.10	5'-RACE und 3'-RACE vom Culbicin-Precursor.....	22
2.6	Enzymatische Modifikation von DNA.....	23
2.6.1	Restriktionsverdau.....	23
2.6.2	Ligation	23
2.6.3	Klonierung.....	23
2.7	Expression von rekombinantem Trx-Culbicin in <i>E. coli</i> C43	24
2.8	Reinigung von rCulbicin	25

2.8.1	IMAC (Ionenmetallaffinitätschromatographie)	25
2.8.2	Dialyse	26
2.8.3	Enzymatische Spaltung des Fusionsproteins	26
2.8.4	Kationenaustauschchromatographie	26
2.9	Expression von KURZ in <i>E. coli</i> BL21 DE3 [pAPlacI ^Q]	26
2.10	Reinigung von KURZ	27
2.10.1	SDS-PAGE (PrepCell)	27
2.10.2	Reinigung von KURZ mit HPLC	27
2.11	Untersuchungen zur molekularen Identität und strukturellen Integrität	28
2.11.1	Massenspektrometrie	28
2.11.2	Cirkularer Dichroismus	28
2.12	Tests zur Charakterisierung der Peptide	29
2.12.1	Mikrosuszeptibilitätstest	29
2.12.2	Bakterienmembran-Permeabilitätstest	30
2.12.3	Test auf fungizide Wirkung	31
2.12.4	Liposomendepolarisationstest	32
2.12.5	Test der Cytotoxizität von Peptiden mit AlamarBlue	33
2.12.6	Test auf hämolytische Aktivität	34
2.13	Immunolokalisation der natürlichen Peptide	34
2.14	Reinigung der natürlichen Peptide	35
2.14.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	35
2.14.2	Gefriertrocknung	36
2.15	Proteinanalyse	36
2.15.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.15.2	Silbernitrat-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	36
2.15.3	Coomassie-Färbung	36
2.15.4	Immunoblotting (Westernblot-Analyse)	37
2.15.5	Markierung von Cysteinresten mit Monobromobimane	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Aufklärung der Nukleotidsequenz des Culbicingens	39
3.2	Sequenzanalyse des Culbicingens und der abgeleiteten Aminosäuresequenz	40
3.2.1	Signalpeptidanalyse	40
3.2.2	Sequenzanalyse	41
3.3	Rekombinante Expression und Isolation von Culbicin	43
3.4	Molekulare Identität und strukturelle Integrität von rCulbicin	44
3.4.1	Bestimmung der Molekularen Masse von rCulbicin	44
3.4.2	Nachweis der Disulfidbrücken mit Monobrombimane	45
3.4.3	Analyse der Sekundärstruktur von rCulbicin mittels CD-Spektroskopie	46
3.5	Funktionelle Charakterisierung von rCulbicin	46
3.5.1	Antimikrobielle Aktivität von rCulbicin	46
3.5.2	Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von rCulbicin	48
3.5.3	Fungizide Wirkung von rCulbicin	50
3.5.4	Nachweis der Porenbildung von rCulbicin an Liposomen	51
3.5.5	Hämolytische Aktivität von rCulbicin	52
3.5.6	Cytotoxische Wirkung von rCulbicin	53
3.6	Lokalisation von natürlichem Culbicin in <i>A. culbertsoni</i>	55
3.6.1	Immunolokalisation	55
3.7	Rekombinante Expression und Isolation von KURZ	57
3.8	Molekulare Identität und strukturelle Integrität von KURZ	57
3.8.1	Bestimmung der Molekularen Masse von KURZ	57

3.8.2	Nachweis von Disulfidbrücken von KURZ mit Monobromobimane	58
3.8.3	Analyse der Sekundärstruktur von KURZ mittels CD-Spektroskopie.....	59
3.9	Funktionelle Charakterisierung von KURZ	60
3.9.1	Antimikrobielle Aktivität von KURZ	60
3.9.2	Fungizide Wirkung von KURZ.....	62
3.9.3	Nachweis der Porenbildung von KURZ an Liposomen.....	62
3.9.4	Hämolytische Aktivität von KURZ.....	64
3.10	Lokalisation von natürlichem KURZ	65
3.10.1	Immunolokalisation.....	65
3.11	Nachweis und Isolierung von natürlichem Peptiden.....	67
3.11.1	Westernblotting mit <i>A. culbertsoni</i> -Fraktionen.....	67
3.11.2	Nachweis von Cysteinresten mittels Monobromobimane.....	68
3.11.3	Proteinidentifizierung mit MALDI TOF /TOF	69
3.12	Lokalisation vom Culbicin- und KURZ-Homolog in <i>A. castellanii</i>	69
3.12.1	Immunolokalisation eines Culbicin-Homologs in <i>A. castellanii</i>	69
3.12.2	Reinigung von natürlichem Castellanicin	71
3.12.3	Castellanicin in online-cDNA-Banken.....	72
4	DISKUSSION	74
4.1	cDNA von Culbicin.....	74
4.2	Sequenzanalyse der cDNA und abgeleiteten Aminosäuresequenz	75
4.3	Rekombinante Expression und Isolierung von Culbicin.....	76
4.4	Untersuchungen zur molekularen Identität und strukturellen Integrität von rCulbicin 78	
4.5	Funktionsanalysen von Culbicin	79
4.5.1	Antibakterielle Wirkung von rCulbicin.....	79
4.5.2	Fungizide Wirkung von rCulbicin.....	81
4.5.3	Porenbildende Aktivität von Culbicin.....	81
4.5.4	Hämolytische Wirkung von rCulbicin	82
4.5.5	Cytotoxische Wirkung von rCulbicin	83
4.5.6	Wirkmechanismus von rCulbicin.....	84
4.6	Rekombinante Expression und Reinigung von KURZ	85
4.7	Untersuchungen zur molekularen Identität und strukturellen Integrität von KURZ	86
4.8	Funktionsanalysen von KURZ	86
4.8.1	Antibakterielle Wirkung von KURZ.....	86
4.8.2	Fungizide Wirkung von KURZ.....	87
4.8.3	Porenbildende Aktivität von KURZ.....	87
4.8.4	Hämolytische und cytotoxische Wirkung von KURZ	88
4.9	Culbicin-Ortholog von <i>Acanthamoeba castellanii</i>	89
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
5	SUMMARY	92
6	LITERATUR.....	93
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A.	<i>Acanthamoeba</i>
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
as	"Antisense"
ATCC	american type culture
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Biochemie
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	" B asic L ocal A lignment S earch T ool"
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumine")
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA ("complementary")
CF	<i>Cap Finder</i>
CFU	"colony forming units"
CV	Säulenvolumen
Cul	Culbicin
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ("deoxyribonucleic acid")
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E 64	trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido(4-Guanidino)-Butan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	"European Molecular Biology Laboratory"
EP	Elektroporation
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EST	<i>expressed sequence tags</i>
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung [m/s]

GAE	Granulomatöse Amoebenencephalitis
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HPLC	"high performance liquid chromatography"
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid; induziert die Expression am lac-Promotor
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kit	(alle notwendigen Komponenten für ein Experiment in einer Box)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar [Mol/Liter]
mA	Milliampère
Mb	Megabasenpaare
mBBr	Monobromobimane, 4-bromomethyl-3,6,7-trimethyl-1,5-diazabicyclo [3,3,0]octa-3,6-dien-2,8-dion
MBC	"minimal bactericidal concentration"
mcs	"multiple cloning site"
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MIC	"minimal inhibitory concentration"
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ("messenger-RNA")
ms	Millisekunde
MTP	Mikrotiterplatte
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
<i>N.</i>	<i>Naegleria</i>
NBT	Nitroblautetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ("open reading frame")
ori	Replikationsstart ("origin of replication")
p	pico
p.A.	zur Analyse ("per analysis")

p.S.	zur Synthese
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase-chain-reaction")
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	"rapid amplification of cDNA-ends"
rCulbicin	rekombinantes Culbicin
rek.	rekombinant
rG	riboGuanin
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RNase	Ribonuklease
RNAsin	Inhibitor der Ribonuklease
RT	Raumtemperatur <i>oder</i> : Reverse Transkriptase
s	"sense"
SAPLIP	Saposin-ähnliches Protein ("Saposin-like-protein")
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecylsulfate")
sec	Sekunde
ssRNA	einzelsträngige RNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Puffer mit Tris-Acetat und EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Puffer mit Tris, Borsäure und EDTA
TBS	"Tris buffered saline"
TE	Tris-Puffer mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"unit"; definierte Aktivitätseinheit eines Enzyms
ÜN	über Nacht (16-20 Stunden)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (prozentual)
w/v	Masse pro Volumen (prozentual; "weight per volume")
XGal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Z	Zellen

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Amöben sind einzellige Lebewesen, die zu den Protozoa gehören. Sie sind in den Stamm Sarcomastigophora, den Unterstamm Sarcodina, die Klasse Lobosea, die polyphyletische Gruppe Amoebida zusammengefasst, deren Stellung und Hierarchie in der Systematik unklar ist [Levine *et al.*, 1980, Hausmann & Hülsmann, 1996]. Dabei unterscheidet man obligat parasitische und freilebende Amöben. Definitionsgemäß sind obligate Parasiten Lebewesen, welche in oder auf einem Wirt leben, diesem Schaden zufügen und nur kurze Zeit ohne einen Wirt überleben können. In den letzten Jahrzehnten sind jedoch einige Arten freilebender Amöben bekannt geworden, die tödliche Krankheiten bei Menschen verursachen. Zu diesen fakultativen Parasiten zählen einige Spezies der Gattung *Acanthamoeba*, die zur gleichen Familie gehörende Art *Balamuthia mandrillaris*, der Amöboflagellat *Naegleria fowleri* und seit kurzem auch *Sapponia diploidea* [Gelman *et al.*, 2001].

Der bekannteste Vertreter der parasitischen Amöben ist *Entamoeba histolytica*, der Erreger der Amoebiasis, eine Krankheit, die in jährlich bis zu 70.000 Fällen letal verläuft [WHO]. Die Amoebiasis tritt hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Regionen der Erde auf und ist auf verunreinigtes Trinkwasser zurückzuführen.

Freilebende Amöben kommen überall in der Umwelt vor, vornehmlich im Boden und Wasser, wo sie sich hauptsächlich von Bakterien ernähren.

1.1.1 *Acanthamoeba*

Als Verursacher einer tödlich verlaufenden Krankheit wurden Acanthamöben erstmals 1958 von Culbertson und seinen Mitarbeitern beschrieben [Culbertson *et al.*, 1958]. Sie infizierten Mäuse und Affen mit Acanthamöben, die daraufhin eine tödliche Meningoencephalitis entwickelten. Der erste Fall einer humanen granulomatösen Amöbenencephalitis (GAE), verursacht durch *Acanthamoeba spec.*, wurde 1965 in Australien beschrieben [Fowler & Carter, 1965]. Diese tödliche Gehirnentzündung tritt hauptsächlich bei immunsupprimierten Personen auf, wie z.B. AIDS-Patienten, Diabetikern und Patienten nach einer Organtransplantation.

Die durchaus schmerzhaft aber nicht tödlich verlaufende Acanthamöbenkeratitis wurde erstmals 1974 beschrieben [Nagington *et al.*, 1974]. Im Gegensatz zur granulomatösen Amöbenencephalitis sind hiervon auch Menschen mit intaktem Immunsystem betroffen. Die Infektion ist auf fehlerhafte Reinigung von weichen Kontaktlinsen zurückzuführen und die Infektionsrate nimmt mit dem zunehmenden Gebrauch solcher Linsen stetig zu.

1.1.2 *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris ist bisher die einzige bekannte Art dieser Gattung [Visvesvara *et al.*, 1993] und wurde erst 1986 entdeckt. Nach dem Tod eines Mandrill-Weibchen im Zoo von San Diego, USA wurde bei der Autopsie aus seinem Gehirn eine Amöbe der Ordnung Leptomyxida isoliert [Visvesvara *et al.*, 1990]. Die Trophozoiten haben eine Größe von 15 – 60 µm und können zwei Zellkerne besitzen. Wie bei den Acanthamöben gehört auch zum Lebenszyklus dieser Amöbe ein Cystenstadium. Später erhielt diese Amöbe den Namen *Balamuthia mandrillaris* [Visvesvara *et al.*, 1993]. Sie verursacht auch beim Menschen granulomatöse Amöbenencephalitis. Im Gegensatz zu der durch Acanthamöben verursachten Encephalitis sind bei dieser Infektion auch immunkompetente Menschen betroffen. Es ist ein Fall bekannt, bei denen derselbe Stamm des Patientenisolats in der Blumenerde einer Zimmerpflanze nachgewiesen wurde [Schuster *et al.*, 2003].

Anhand der Symptome der granulomatösen Amöbenencephalitis kann man nicht die verursachende Amöbengattung erkennen; den Erreger kann man nur anhand einer Biopsie identifizieren. Tatsächlich findet die Klassifizierung meist erst *post mortem* statt, da in den meisten Fällen die Diagnose zu spät gestellt wird und die Heilungschancen allgemein sehr schlecht sind. Deetz *et al.* beschrieben 2003 allerdings zwei Fälle von Patienten, die eine von *B. mandrillaris* verursachte GAE überlebten [Deetz *et al.*, 2003].

1.1.3 *Naegleria fowleri*

Die Gattung *Naegleria* umfasst 24 Arten, von denen *Naegleria fowleri* als humanpathogen bekannt ist. Zusätzlich zum Trophozoiten- und Cystenstadium kann *N. fowleri* sich im Wasser innerhalb von 30-60 Minuten in einen Amöboflagellat transformieren. Dieses Stadium kann keine Nahrung aufnehmen und sich nicht teilen, sondern dient der schnellen Fortbewegung an einen Ort mit besseren Lebensbedingungen.

Naegleria fowleri bevorzugt warme stehende Gewässer als Habitat. Dort können sich immunkompetente Menschen beim Schwimmen oder Baden infizieren, wenn *N. fowleri* z.B. mit Spritzwasser in die Nase gelangt. Die Amöben wandern über den Riechnerv ins Gehirn, wo sie eine primäre Amöbenmeningoencephalitis (PAME) verursachen. Anders als bei der durch Acanthamöben verursachten granulomatösen Amöbenencephalitis liegen zwischen der Infektion und den ersten Symptomen 1-7 Tage. Spätestens nach weiteren 14 Tagen tritt der Tod des Patienten ein.

Welche Faktoren die Pathogenität dieser Arten verursachen ist bisher noch nicht geklärt. Die Beteiligung von porenbildenden Peptiden, welche mit Lipidmembranen interagieren, ist jedoch wahrscheinlich. Solche Peptide werden von allen Eukaryonten synthetisiert und dienen den Amöben vermutlich dazu, phagozytierte Bakterien zu töten [Leippe, 1997]. In höheren Organismen hingegen gehören porenbildende Peptide zum Repertoire des angeborenen Immunsystems.

1.2 Biologie der *Acanthamoeba*

Die erste Beschreibung einer Acanthamöbe stammt von Sir A. Castellani [Castellani, 1930]. Sie wurde anfangs der Gattung *Hartmanella* zugeordnet [Douglas, 1930], als M. Volkonsky jedoch ein Jahr später den Genus *Acanthamoeba* etablierte, wurde das Isolat von Sir A. Castellani als *A. castellanii* reklassifiziert [Volkonsky, 1931].

Von F.C. Page wurden die Acanthamöben der Familie Acanthamoebidae, Ordnung Acanthopodida in der Klasse der Lobosea eingeordnet [Page, 1988].

Die Acanthamöben weisen zwei verschiedene Stadien auf: das vegetative Trophozitenstadium und das dormante Cystenstadium, in dem sie Zeiten schlechter Lebensbedingungen wie Nährstoffmangel, sowie Schwankungen von pH-Wert, Temperatur und Osmolarität überdauern.

Die Trophoziten sind zwischen 15-45 µm groß und weisen eine flache, nicht fest definierte Form auf. An ihrer gesamten Zelloberfläche sind die Acanthamöben mit stacheligen Fortsätzen, den so genannten Acanthopodien (acanth, gr.: Stachel, Dorn) besetzt (s. Abb. 1.1). Die Acanthopodien sind ein Charakteristikum dieser Gattung und

spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an die zu phagozytierende Zelle [Khan, 2001].

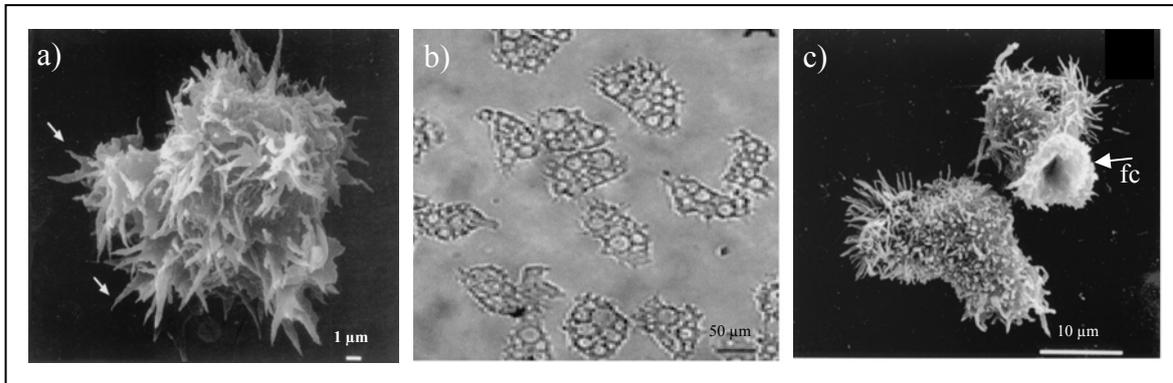


Abb. 1.1: Mikroskopische Aufnahmen von *Acanthamoeba*-Trophozoiten

a) Scanning-Elektronenmikroskopische (SEM) Aufnahme, bei der die über die gesamte Zelloberfläche verteilten Acanthopodien deutlich erkennbar sind (Pfeil). b) Lichtmikroskopische Aufnahme einer *A. astronyx*-Kultur. c) SEM-Aufnahme von *A. culbertsoni*-Trophozoiten. Der "food cup" (fc; auch "Amoebastom") taucht temporär auf und dient der Aufnahme von Nahrung. (Quelle: F. Marciano-Cabral, 2003).

Die partiell aus Cellulose aufgebauten Cysten weisen einen Durchmesser von ca. 10-25 µm auf [Tomlinson & Jones, 1962]. Sie bestehen aus einer äußeren gefalteten Ektocyste und einer inneren Endocyste. Die Endocyste ist an einigen Stellen mit der Ektocyste verbunden, was ihr eine sternförmige, polygonale oder runde Gestalt gibt.

Anhand ihrer Cystenmorphologie wurden die 18 *Acanthamoeba*-Spezies in drei Gruppen unterteilt [Pussard & Pons, 1977].

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. divionensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. royreba</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. hatchetti</i>	<i>A. lenticulata</i>
	<i>A. lugdunensis</i>	
	<i>A. mauritaniensis</i>	
	<i>A. polyphaga</i>	
	<i>A. quina</i>	
	<i>A. rhyodes</i>	
	<i>A. triangularis</i>	

Tab. 1.1: Einteilung der Acanthamöben anhand ihrer Cystenmorphologie nach Pussard und Pons, 1977

Neuere molekularbiologische Untersuchungen, die auf Vergleichen der 18S rDNA-Sequenzen beruhen, zeigen keinen Zusammenhang zwischen der cystenmorphologischen

Gruppeneinteilung und den Ergebnissen der 18S rDNA-Studien [Stothard *et al.*, 1998]. Mittlerweile sind 15 verschiedene Genotypen (T1 –T15) bekannt. Die Arbeitsgruppe um J. Walochnik untersucht eine weitergehende Differenzierung innerhalb des Genotyps T4, dem die meisten Isolate von Acanthamöbenkeratitispatienten angehören [Walochnik & Aspöck, 2005]. Dazu wurden *internal transcribed spacer* (ITS1), eine circa zehnmal variabelere Region als das 18S RNA-Gen, sequenziert und es konnte eine weitere Differenzierung innerhalb des T4 Stamms erzielt werden [Köhler *et al.*, 2006].

Acanthamoeba spp. sind die häufigsten und am weitesten verbreiteten Amöben in der Umwelt, sie sind in nahezu jeder Bodenprobe zu finden [Page, 1988]. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens lässt sich auch erklären, warum viele gesunde Menschen Anti-Acanthamöben-Antikörper in sich tragen [Cursons *et al.*, 1980, Cerva, 1989].

1.3 Medizinische Relevanz der *Acanthamoeba*

Frei lebende Amöben wurden bereits in den 1970er Jahren als "fakultative Parasiten", "opportunistische Pathogene" und "amphizoische Amöben" bezeichnet [Page, 1974]. Zu den durch Acanthamöben beim Menschen hervorgerufenen Krankheiten gehören die *Acanthamoeba*-Keratitis (Hornhautentzündung des Auges) und die granulomatöse Amöbenencephalitis (GAE), eine Entzündung des Zentralen Nervensystems. In schwerwiegenden Fällen können auch Hautläsionen und Pneumonien ausgelöst werden, wobei es sich meist um Lokalinfektionen an den Eintrittspforten der Amöben bei immunsupprimierten GAE-Patienten handelt. Eine weitere Beachtung kommt den Acanthamöben als Wirtszellen pathogener Bakterien zu.

1.1.4 *Acanthamoeba*-Keratitis

Die *Acanthamoeba*-Keratitis tritt bei immunkompetenten Menschen auf, von denen 80-90 % Kontaktlinsenträger sind [Berneuer *et al.*, 1996, Radford *et al.*, 1998]. Die Infektion ist auf fehlerhafte Reinigung der Kontaktlinsen zurückzuführen. Da Acanthamöben auch im Leitungswasser vorkommen, kann ein Abspülen mit diesem ohne die notwendigen Sterilisationsmaßnahmen zu der äußerst schmerzhaften Hornhautentzündung führen.

Die Symptome treten meist wenige Tage nach dem Kontakt mit den Amöben an nur einem Auge auf und ähneln stark denen einer viralen oder bakteriellen Keratitis. Zu den ersten

Krankheitszeichen gehören Schmerzen, Lichtempfindlichkeit, sowie gerötete und tränende Augen. Zudem können die Patienten nicht mehr scharf sehen und auch Lidschwellungen sind häufig zu beobachten. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einem Ringinfiltrat und zur Entzündung der Hornhaut und der radialen Nerven. Die Aussicht auf Heilung ist bei frühzeitiger Diagnose und Behandlung gut. Dabei werden mehrere Antibiotika kombiniert und die ersten Wochen stündlich, später alle 2 Stunden genommen. Wegen der resistenten Cysten wird eine Antibiotika-Gabe bis zu einem Jahr empfohlen. Bleibt eine Medikation aus, kann es zur Ablösung der Hornhaut kommen. In diesem Fall kann nur eine Hornhauttransplantation eine Erblindung verhindern.

Als Erreger der *Acanthamoeba*-Keratitis wurden bisher folgende Arten der *Acanthamoeba* beschrieben: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina* und *A. griffini* [Schaumberg *et al.*, 1998], die bis auf *A. culbertsoni* in die cystenmorphologische Gruppe II eingeordnet sind.

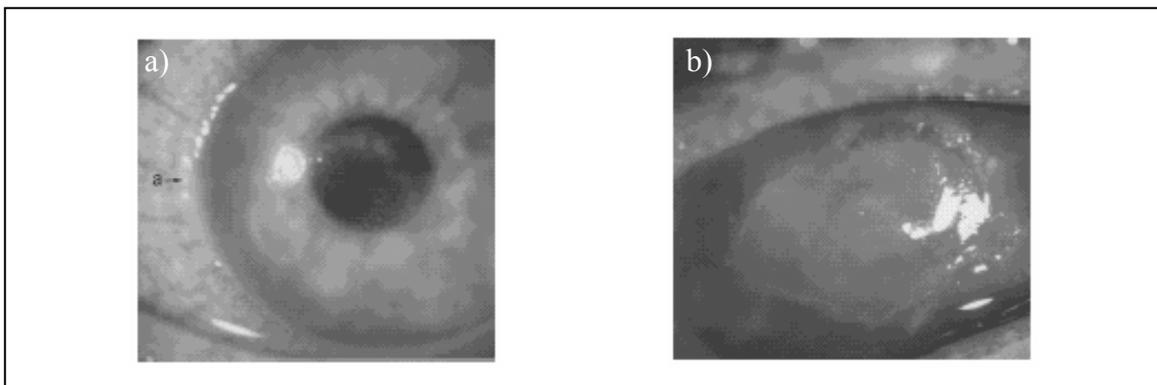


Abb. 1.2: Symptome einer *Acanthamoeba*-Keratitis

(a) geschwollener Limbus und (b) abgelöste Hornhaut eines Patienten mit *Acanthamoeba*-Keratitis (Quelle: Armstrong, M., 2000)

1.1.5 Granulomatöse Amöbenencephalitis

Im Gegensatz zur *Acanthamoeba*-Keratitis sind von der granulomatösen Amöbenencephalitis meist immunsupprimierte Menschen betroffen.

Da die Acanthamöben ubiquitär vertreten sind, kann man den Kontakt mit ihnen kaum vermeiden. Eintrittspforten sind z.B. Hautverletzungen, von denen die Amöben über die Blutbahn zum zentralen Nervensystem (ZNS) vordringen, um dort nekrotische Läsionen zu

verursachen. Eine weitere Infektionsmöglichkeit besteht durch Cysten, welche über den Respirationstrakt eingeatmet werden. Nach der Excystierung erreichen die Trophozoiten über den olfaktorischen Nerv das Gehirn. Dabei werden nicht alle Areale infiziert, sondern nur das Großhirn, Kleinhirn und der Hirnstamm.

Die GAE ist in den meisten Fällen chronisch und von der Infektion bis zu den ersten Symptomen, wie Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, später auch Fieber, können mehrere Wochen bis Monate vergehen. Die Krankheit endet fast immer mit dem Tod. Vor allem bei AIDS-Patienten wurden verschiedene von Acanthamoeben verursachte Koinfektionen beschrieben, welche die Haut, Lunge und Atemwege, sowie innere Organe betreffen [Torno *et al.*, 2000, Recavarren-Arce *et al.*, 1999, Im & Kim, 1998, Kim *et al.*, 2000]. In den Patienten wurden die folgenden *Acanthamoeba*-Spezies nachgewiesen: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. divisionensis*, *A. griffini*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenitculata*, *A. mauretaniensis*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. royreba* und *A. terricola* [Martinez & Visvesvara, 1997]. Was diese Spezies von den apathogenen unterscheidet, ist bisher nicht eindeutig geklärt, es konnte jedoch bei verschiedenen Stämmen eine deutlich unterschiedliche Virulenz festgestellt werden.

Weltweit waren im Jahr 2005 ca. 3.000 Fälle von *Acanthamoeba*-Keratitis (AK) bekannt und ungefähr 250 Fälle von granulomatösen Amöbenencephalitis, wovon ca. 150 von Acanthamoeben und 100 von Balamuthien ausgelöst wurden. Man geht allerdings von einer Dunkelziffer aus, da die granulomatöse Amöbenencephalitis teilweise noch unbekannt ist und in Entwicklungsländern die Möglichkeiten der Diagnosestellung eingeschränkt sind.

1.1.6 Intrazelluläre Bakterien

Eine weitere Bedeutung kommt den *Acanthamoeba* als Wirtszellen für Bakterien zu. Dabei wird zwischen vorübergehenden und ständigen, endosymbiontischen Beziehungen zwischen Amöben und intrazellulären Bakterien unterschieden.

Mara Proca-Ciobanu und Mitarbeiter waren 1975 die Ersten, die von endosymbiontischen Bakterien im Cytoplasma von *Acanthamoeba* berichteten [Proca-Ciobanu *et al.*, 1975]. Seitdem wurden viele verschiedene Bakterienstämme in den Acanthamoeben, aber auch in anderen Amöben, beobachtet. TR. Fritsche und Kollegen haben in 25 % ihrer Umwelt- und Patientenisolat obligate Endosymbionten entdeckt, die außerhalb der Wirtszellen nicht

kultiviert werden können [Fritsche *et al.*, 1993]. Die Endosymbionten wurden unter anderem von M. Horn erforscht und klassifiziert [Horn & Wagner, 2004].

In den 1980er Jahren beschrieb Rowbotham intrazelluläre Legionellen in *Acanthamoeba* [Rowbotham, 1983, 1986, 1993]. Dabei handelte es sich um die humanpathogenen Erreger der Legionärskrankheit *Legionella pneumophila*. Diese benutzen die Amöben als Vektor, um z.B. im chlorhaltigen Leitungswasser zu überleben. Nach der Phagozytose verhindern die Legionellen eine Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom und können so in den *Acanthamoeba*-Trophozoiten und -Cysten überleben und sich sogar vermehren, statt von diesen verdaut zu werden [Bozue & Johnson, 1996]. Zudem wurde eine Steigerung der Bakterienvirulenz nach der Amöbenpassage festgestellt [Cirillo *et al.*, 1997, Cirillo *et al.*, 1999]. Barker und Brown zogen für diese Parasiten-beherbergenden Amöben den passenden Vergleich mit dem Trojanischen Pferd [Barker & Brown, 1994].

Seitdem wurden zahlreiche humanpathogene Bakterien in *Acanthamoeba* beschrieben, darunter *Chlamydia spp.* [Amann *et al.*, 1997, Birtles *et al.*, 1997], *Mycobacterium avium* [Steinert *et al.*, 1998], *Listeria monocytogenes* [Ly & Muller, 1990], *Pseudomonas aeruginosa* [Wang & Ahearn, 1997], *Vibrio cholerae* [Thom *et al.*, 1992], *Burkholderia spp.* [Marolda *et al.*, 1999] und pathogene *E. coli* [Barker *et al.*, 1999]. Da die Bakterien in den Amöben teilweise dieselben Mechanismen wie in humanen Makrophagen anwenden, wird vermutet, dass die Bakterien in den einzelligen Wirtszellen ihr Überleben im Menschen "trainiert" haben [Cirillo *et al.*, 1999, Molmeret *et al.*, 2005].

1.4 Cytotoxische Faktoren von pathogenen Amöben

Der Prozess der Zell- bzw. Gewebeerstörung, der von den genannten pathogenen Amöben ausgelöst wird, ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Effektormoleküle, die in die einzelnen Schritte des Prozesses involviert sind, sind jedoch schon bekannt. Die Amöben binden zunächst rezeptorvermittelt an die Zielzelle. Darauf folgt die Cytolyse, gegebenenfalls die Invasion in das Gewebe und letztendlich die Phagozytose der Zielzelle.

1.1.7 Adhäsion

Am Anfang steht die Adhäsion der Amöbe an die Zielzelle. Bei den *Acanthamoeba spp.* wird diese über einen Mannose-Bindungsrezeptor vermittelt, welcher von den Trophozoiten exprimiert wird [Yang *et al.*, 1997]. Die Adhäsion kann durch Zugabe von Mannose, nicht aber durch andere Zucker inhibiert werden [Morton *et al.*, 1991]. Auch *Entamoeba histolytica* benötigt Glycoproteine als Rezeptorliganden, um an die Darmepithelzellen binden zu können [Chadee *et al.*, 1987].

Leher *et al.* konnten für *Acanthamoeba castellanii* zusätzlich eine kontaktunabhängige Freisetzung von cytopathischen Faktoren feststellen, die durch Mannose induziert wurde [Leher *et al.*, 1998].

1.1.8 Proteasen

Nachdem die Amöbe an die Zielzelle gebunden hat, sezerniert sie Proteasen, um in die Zielzelle bzw. in das Gewebe einzudringen.

Für pathogene *Acanthamoeba spp.* und *Naegleria* wurde eine Elastase beschrieben, von der angenommen wird, dass sie das Eindringen der Acanthamöben in das Hornhautstroma ermöglicht [Ferrante *et al.*, 1988]. Van Klink und seine Mitarbeiter konnten fibrinolytische und collagenolytische Aktivität in Amöbenkeratitis-Patientenisolaten nachweisen, nicht aber in Bodenisolaten [Van Klink *et al.*, 1992].

Aus pathogenen *Acanthamoeba*-Stämmen wurden zwei Serinproteasen isoliert, die *in vitro* Kornealzellläsionen verursacht haben [Na *et al.*, 2001, Cho *et al.*, 2000, Blaschitz *et al.*, 2006].

Serinproteasen, Cysteinproteasen und Metalloproteasen, welche die Hauptkomponente des Hornhautstromas, das Typ I Collagen, degradieren können, wurden auch von Mitro und Mitarbeitern beschrieben [Mitro *et al.*, 1994], und Hadas und Mazur postulieren, dass pathogene Acanthamöbenstämme über größere Mengen an Cysteinproteasen verfügen als apathogene [Hadas & Mazur, 1993].

Die Arbeitsgruppe um NA. Khan konnte bei *B. mandrillaris* eine Metalloprotease identifizieren, welche unter anderem Collagen I und III und Elastin, Bestandteile der Extrazellulärmatrix, degradieren kann [Matin *et al.*, 2006].

Auch aus *Naegleria fowleri* wurde eine Cysteinprotease isoliert, welche *in vitro* Extrazellulärmatrix degradiert [Aldape *et al.*, 1994]. Dieselbe Arbeitsgruppe fand heraus,

dass die apathogene Spezies *N. gruberi* eine ähnliche Protease exprimiert, die allerdings anders als die der pathogenen Form, inaktiv über 30 °C ist.

Die Arbeitsgruppe von D. Mirelman konnte mit Antisense-Inhibition einer Cysteinprotease von *Entamoeba histolytica* die Phagozytose hemmen, aber nicht die cytopathische und hämolytische Aktivität [Ankri *et al.*, 1998].

1.1.9 Amoebapores und Naegleriapores

Entamoeba histolytica verfügt außerdem über so genannte Amoebapores, Peptide, die Ionenkanäle in der Zielzellmembran bilden und so zur Zerstörung der Zelle führen [Leippe *et al.*, 1994]. Amoebapore A ist ca. 8,2 kDa groß und hitze- und säuretolerant, was auf drei Disulfidbrücken zurückzuführen ist, die das Peptidgerüst in seiner Tertiärstruktur stabilisieren [Leippe *et al.*, 1992, Hecht *et al.*, 2004]. Dieses Peptid besitzt sowohl antibakterielle als auch cytolytische Aktivität.

In *Naegleria fowleri* konnten Proteine derselben Proteinsuperfamilie SAPLIPs (Saposin-like Proteins) wie die Amoebapores nachgewiesen werden, weshalb sie Naegleriapores genannt wurden [Munford *et al.*, 1995, Herbst *et al.*, 2002]. Die Naegleriapores sind Glycoproteine, die in Multipeptidprecursor-Strukturen organisiert sind. Besonders bemerkenswert ist, dass nicht alle Naegleriapores die gleichen Aktivitäten aufweisen, ebenso wenig die Amoebapores.

Den SAPLIPs ist strukturell ein Cysteinmuster aus 6 Cysteinen gemein und die funktionelle Gemeinsamkeit beruht auf der Interaktion mit Membranen; letzteres auf vielfältige Art und Weise. So sind die Namensgeber der Familie, die humanen Saposine, als Kofaktoren in den Katabolismus von Sphingolipiden involviert, das Surfactant Protein B dient der Stabilisierung des Lungen-"Surfactants", NK-Lysin aus den natürlichen Killerzellen vom Schwein und humanes Granulysin weisen wie die Amoebapores und Naegleriapores antimikrobielle und cytolytische Aktivität auf. Andere Proteine der SAPLIP-Familie sind an der Regulation der Zellproliferation beteiligt oder wirken als Lipasen [Bruhn, 2005].

1.5 Culbicin

Culbicin ist ein Peptid, welches aufgrund seiner porenbildenden Aktivität aus *Acanthamoeba culbertsoni* isoliert und aminoterminal ansequenziert wurde (Prof. M. Leippe und Dr. R. Herbst). Seine Aminosäuresequenz weist keinerlei Ähnlichkeit zu Proteinen und translatierten Nukleotidsequenzen in den Proteindatenbanken auf.

Das Peptid ist, gleich den Amoebapores, sehr stabil bei hohen Temperaturen und niedrigem pH-Wert. Allerdings weist es in seiner Aminosäuresequenz mehr als sechs Cysteine auf, die zudem nicht dem charakteristischen SAPLIP-Muster entsprechen. Daher kann die Zugehörigkeit des Culbicins zu Familie der SAPLIPs mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Durch Anlegen einer cDNA-Bank konnte ein entsprechender cDNA-Klon von Culbicin identifiziert werden, dessen 5'-Ende allerdings nicht geklärt war.

1.6 Zielsetzung

Die von Dr. R. Herbst übermittelte Nukleotidsequenz sollte verifiziert und der 5'-Bereich stromaufwärts untersucht werden, da in der bisherigen Sequenz kein Startcodon identifiziert werden konnte.

Nach der Aufklärung der Gensequenz sollte ein geeignetes System zur rekombinanten Expression des Culbicins etabliert werden, um funktionelle und strukturelle Eigenschaften des Peptids zu analysieren.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde bereits festgestellt, dass die von *A. culbertsoni* synthetisierten Mengen von Culbicin zu gering sind, um eine Reinigung des nativen Peptids in ausreichender Menge vorzunehmen.

Bei den Funktionsstudien stand die Frage, ob Culbicin Bakterien töten kann und damit ein Effektormolekül in der Phagocytose von *A. culbertsoni* ist, an erster Stelle. Damit verbunden waren weiterführende Untersuchungen über das Spektrum der getöteten Bakterien und über den Wirkmechanismus.

Des Weiteren sollte die Fähigkeit zur Cytolyse eukaryontischer Zellen analysiert werden. So sollte geklärt werden, ob Culbicin ein möglicher cytotoxischer Faktor bei der durch *Acanthamoeba culbertsoni* verursachten Keratitis und granulomatösen Amöben-encephalitis ist.

Zur Culbicin-Lokalisation in den Acanthamöben-Trophozoiten sollten spezifische anti-Culbicin-Antikörper erzeugt werden. Mit Hilfe dieser spezifischen Antikörper sollte außerdem untersucht werden, ob ein Culbicin-Ortholog in *A. castellanii* existiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in dem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

Agarose peqGold	- Peqlab, Erlangen
Alamethicin	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumcarbonat	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	- Roche Applied Sciences, Mannheim
BSA min. 96 % electrophoresis	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calcein	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Blau G250	- Serva, Taufkirchen
Cystein	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	-Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehydsg., 37%	- Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	- GibcoBRL (über Invitrogen, Karlsruhe)
Kaliumhydroxid-Plätzchen p.A:	- Merck, Darmstadt
Low melting NuSieveGTGagarose	- FMC BioProducts Europe, Denmark
Melittin	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Monobromobimane	- CalBiochem (über Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat f. d. Zellkultur	- AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen p.A.	- Merck, Darmstadt
Natronlauge	- Merck, Darmstadt
Nickel-NTA-Resin	- Qiagen, Hilden
PenStrep-Mix (10000 U/ml Penicilin, 100 mg/ ml Streptomycin)	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L- α -Phosphatidylcholin Typ II-S(soy bean)	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Proteose-Pepton	- Oxoid / GibcoBRL (über Invitrogen, Karlsruhe)
RPMI-1640 Medium HEPES-Modifikation	- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saponin	-Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-Polystyren-Partikel, 0,82 µM	- Kisker-Biotech, Steinfurt
SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain	- Molecular Probes (über Invitrogen, Karlsruhe)
SYTOX green Nucleic Acid Gel Stain, 5 mM in DMSO	- Molecular Probes (über Invitrogen, Karlsruhe)
TRIzol	- Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	- Serva, Taufkirchen
Yeast Extract (select)	- GibcoBRL (über Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.2 Kits

Nucleo-Spin zur Plasmidpräparation	- Macherey und Nagel, Düren
Jet quick purification zur PCR-Produktreinigung	- Genomed, Löhne
pDrive Kloning Kit	- Qiagen, Hilden

2.1.3 PCR-Reagenzien und DNA-Längenstandard

Die PCR-Reagenzien und DNA-Längenstandard wurden, sofern nicht anders angegeben, von MBI Fermentas (St. LeonRot) bezogen.

2.1.4 Protein-Größenstandards

#SM0431	- MBI Fermentas (St. LeonRot)
Mark 12™ #LC5677	- Invitrogen, Karlsruhe
MultiMark®	- Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue Plus2	- Invitrogen, Karlsruhe
Kalibrierungskit für SDS-PAGE Electran	- VWR International, BDH, Darmstadt

2.1.5 Enzyme und Inhibitoren

RNA-Polymerase	- MBI Fermentas, St. LeonRot
Reverse Transkriptase (Superskript)	- Invitrogen, Karlsruhe
Enterokinase EKMax 1 U/ μ l	- Invitrogen, Karlsruhe
Endonuclease Cfr 421, 10 U/ μ l	- MBI Fermentas, St. LeonRot
Endonuclease Pac I, 10 U/ μ l	- New England Biolabs, Frankfurt
Trypsin, bovine, <i>sequencing grade</i>	- Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase, 5 U/ μ l	- MBI Fermentas, St. LeonRot

2.1.6 Oligonukleotide

M13 forward	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 reverse	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G
T7 Promoter primer	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA G
T7 Terminator primer	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G
Cul RACE- as1	5'-CA AAG ATG CAG GTC CTT GCA C
Cul RACE- as2	5'-ATG GTC CTC GCA GAA GCA AG
Cul RACE- as3	5'-CTC AGC AGC CTT CAA GGC AG
Cul RACE- as4	5'-GTC AAT ACC ACC GCA GGC AG
Cul RACE- as5	5'-A GGC AAC CTT CTT CAG CAC G
Cul RACE- as6	5'-C CTT CTT CAG CAC GGA CCC CT
CF B1 rG	5'-GAG AGA ACG CGT GAC GAG AGA CTG ACA rGrGrG
CF B2	5'-GAG AGA ACG CGT GAC GAG AGA CTG ACA G
Biotin-OdT T7 I	5'-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G (T) ₂₅ A/C/G
Prec(KspI)-s	5'-ATC GAA GGC CGC GGC GAC GTA CGT GAG TGC A
KURZ(PacI)Stop-as	5'-CAT GGT TTT AAA TAA TCA GCA CTG TGT GGC G

2.1.7 Antikörper und Antiserum

Anti-Penta-His	- monoklonaler Mausantikörper gegen 5xHistidin (Qiagen)
Anti-rabbit AP-Konjugat	- anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Sigma-Aldrich)

Anti-rabbit CY3-Konjugat - anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege, konjugiert mit CY3 (Dianova, Hamburg)

Anti-Culbicin-Antikörper - Kaninchenserum gegen Culbicin (Eurogentec, Belgien)

Anti-KURZ-Antikörper - Kaninchenserum gegen KURZ (Eurogentec, Belgien)

Zur Antikörpergewinnung von anti-Culbicin und anti-KURZ wurden je 1 mg Antigen (rekombinantes Culbicin und rek. KURZ) in lyophilisierter Form an Eurogentec (Belgien) geschickt. Dort wurden nach Protokoll je 2 Kaninchen pro Antigen immunisiert. Für die Immunlokalisation und Westernblots wurden die letzten Seren ("final bleeding") verwendet. Für die Immunlokalisation wurde die Seren gegen Sedimente, die bei der Zentrifugation nach Aufschluß der *A. culbertsoni* entstanden, vorabsorbiert [modifiziert nach Gruber & Zengales, 1995]: je 100 µl Serum wurden mit 1 ml 0,1 % BSA in 1x TBS, pH 7,4 mit einem Sediment für 2 h bei 10 °C inkubiert. Die festen Bestandteile wurden durch Zentrifugation mit 20.000 xg sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine Glycerolkonzentration von 20 % eingestellt und bei -20 °C gelagert.

2.1.8 Allgemeine Puffer

Die folgenden Stocklösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, für die Experimente auf eine einfache Endkonzentration verdünnt.

TBS, 10x: 100 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4

PBS, 10x: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2 g KH₂PO₄; ad 1L H₂O

TE, 1x: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1mM EDTA

2.2 Programme

Programm	Verwendungszweck	Quelle
AnnHyb	DNA-Sequenzanalyse und Vergleich	http://bioinformatics.org/annhyb/
BioEdit	DNA-Sequenzanalyse und Vergleich	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
BLAST	Vergleicht eingegebene Protein- oder DNA-Sequenzen mit Sequenzen in der Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ClustalW	Alignment von 2 o. mehr DNA-u. Protein-Sequenzen	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
MS- Fit	Bestimmung der theoretischen Molekularmasse eines Proteins u.a.	http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msfit.htm
PeptideCutter	Vorhersage von Erkennungssequenzen von Proteasen	http://www.expasy.org/tools/#ptm
Protein Calculator	Bestimmung des theor. pI, Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient u.a. von Proteinen	http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html
ProtParam tool	Zur Bestimmung von Proteinparametern wie AS-Verteilung, theor. Molekulargewicht u. a.	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html
SignalP 3.0	Vorhersage zur Wahrscheinlichkeit, dass es sich um bei der angegebenen AS-Sequenz um ein Signalpeptid	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

Tab. 2.1: verwendete Programme mit Anwendungszweck und Quellenangabe

2.3 Bakterien und Kulturmedium

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet.

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die folgenden *E. coli*-Stämme verwendet:

C43 (DE3)

- Avidis

BL21(DE3) [pAPlacI^Q]

- wurde freundlicherweise von Dr. Heike Bruhn, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

<u>LB-Medium:</u>	10 g Trypton
(Miller-Formel)	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	Ad 1 L H ₂ O, autoklavieren
<u>LB-Agar:</u>	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	15 g Agar-Agar
	Ad 1 L H ₂ O, autoklavieren
<u>ÜN-Kultur:</u>	10 ml LB-Medium wurden gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt und mit Bakterien beimpft. Die ÜN-Kultur wurde bei 37 °C für ca. 16 h unter Agitation inkubiert.

2.3.1 Transformation chemisch transformationskompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente Bakterien wurden mit der Calciumchlorid-Methode nach Hanahan hergestellt [Hanahan, 1983].

Zur Hitzeschock-Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit 5 µl DNA für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden die transformierten Bakterien mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C unter Agitation inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 1 M IPTG und 40 µl 2 % XGal in DMSO wurden 200 µl der Bakteriensuspension auf vorgewärmte (37 °C) LB-Amp-Platten ausplattiert und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.4 Amöben und Zellkultur

Acanthamoeba culbertsoni- Trophozoiten wurden von Prof. Dr. Francine Marciano-Cabral (Medical College of Virginia, Richmond, VA, USA) kultiviert und als Amöbenextrakt in 10 %iger Essigsäure zur Verfügung gestellt. Für die Immunolokalisation wurden *A. culbertsoni*-Trophozoiten, in 2 % Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer fixiert, gesendet.

Der *A. castellanii*-Stamm wurde von Prof. Dr. Matthias Leippe, Universität Kiel, bereitgestellt, ebenso die humane Leukämie-T-Zelllinie "Jurkat".

Humane Neuroblastomazellen (86 HG39) sind eine freundliche Gabe von Dr. Thomas Jacobs, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg.

PYG 712: 20 g Proteasepepton (GibcoBRL)
(für *A. castellanii*) 1 g Hefeextrakt (GibcoBRL)
10 ml 400 mM MgSO₄*7 H₂O
8 ml 50 mM CaCl₂
1 g Natrium-Citrat*2H₂O
14 ml 5 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂* 6H₂O
10 ml 250 mM Na₂HPO₄* 7 H₂O
10 ml 250 mM KH₂PO₄
900 ml ddH₂O

→ autoklaviert, 50 ml 2 M Glucose (sterilfiltriert) hinzu

Die Acanthamoeben wurden in 250 ml Kulturflaschen mit 20 ml PYG 712-Medium unter sterilen Bedingungen bei 21 °C im klimatisierten Raum kultiviert.

Medium für Jurkatzellen: 3,7 g RPMI 1640
0,4 g NaHCO₃ für Zellkultur
20 ml fötales Kälberserum (1h bei 56°C im Wasserbad inaktiviert, durch 0,2 µm sterilfiltriert)
2 ml PenStrep-Mix
178 ml ddH₂O
→ Sterilfiltriert (0,2 µm)

Die Jurkatzellen wurden in 100 ml Kulturflaschen mit gasdurchlässigen Deckeln mit 10 ml Medium unter sterilen Bedingungen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und humider Atmosphäre kultiviert.

Medium für Neuroblastoma: 3,7 g RPMI 1640
0,4 g NaHCO₃ für Zellkultur
10 ml fötales Kälberserum (1h bei 56°C im Wasserbad inaktiviert, durch 0,2 µm sterilfiltriert)
2 ml PenStrep-Mix
188 ml ddH₂O
→ Sterilfiltriert (0,2 µm)

2.5 Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren

2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde der "Nucleo-Spin"-Kit der Firma Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde anschließend photometrisch bestimmt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. Die DNA-Konzentration wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$c_{\text{DNA}} = \Delta\text{OD}_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor} = [\mu\text{g/ml doppelsträngige DNA}]$$

RNA-haltige Proben wurden vor der Messung zehn Minuten auf 60°C erhitzt, um vorliegende Doppelstränge zu trennen. Die RNA-Konzentration wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$c_{\text{RNA}} = \Delta\text{OD}_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor} = [\mu\text{g/ml einzelsträngige RNA}]$$

Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren zu untersuchen, wurde der Quotient der gemessenen Absorptionen von 260 nm /280 nm berechnet. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.5.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde 20 min mit 16.000 xg bei 4 °C zentrifugiert. RNA wurde vor der Zentrifugation 15 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und 5 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während die sedimentierte DNA bei 37 °C getrocknet und anschließend in 10 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 gelöst wurde. RNA wurde in ddH₂O resuspendiert.

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer: 90mM Tris-Borat, 2mM EDTA, pH 8,0

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

6x Probenpuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin

Zur Analyse der DNA-Fragmente oder linearisierter Vektoren wurden diese in einem 1 bzw. 2 %igen Agarosegel in TBE-Puffer bei einer Spannung von 74 V elektrophoretisch voneinander getrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,1 µg/ml H₂O dest.) inkubiert. Anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht (306 nm) nachgewiesen und mit der Gel-Dokumentationsanlage dokumentiert werden [Maniatis *et al.*, 1989].

Sollte die DNA nach der Elektrophorese aus dem Gel isoliert werden, wurde statt TBE- ein TAE-Puffer verwendet. Die Färbung der DNA erfolgte dabei mit SYBR Gold.

2.5.5 Reinigung von PCR-Produkten und Vektoren

Die PCR-Produkte und Restriktionsverdau-Produkte wurden mit dem "Jet quick PCR Purification Spin"-Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA wurde mit 60 µl 10 mM Tris-HCl -Puffer, pH 7,4 eluiert, welcher zuvor auf 70 °C erhitzt wurde.

2.5.6 Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode [Sanger, *et al.*, 1980]. Verwendet wurden der ABI Prism 310 Genetic Analyzer und MEGABASE mit den Reagenzien und nach Angaben der Hersteller.

Anschließend wurden zu den 10 µl Sequenzieransatz 90 µl ddH₂O, 10 µl Natriumacetat, pH 5,2 und 250 µl Ethanol gegeben. Nach kräftigem Mischen wurde 15 min mit 16.000 xg bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die gefällte DNA mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut 15 min mit 16.000 xg bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde getrocknet und in 30 µl "Template Suppression Reagent" (ABI Prism) gelöst. Die Trennung mittels Kapillarelektrophorese und die Auswertung erfolgten mit Hilfe des ABI Prism.

2.5.7 RNA-Isolation

Die RNA wurde aus *A. culbertsoni*-Trophozoiten gewonnen, die von Prof. Dr. F. Marciano-Cabral (Department of Microbiology & Immunology, Virginia Commonwealth University) in 1 ml TRIzol geschickt wurde.

Die RNA-Isolierung mit TRIzol wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.8 mRNA-Isolation

2x mRNA-Bindungs-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM Na₂-EDTA, 1 M LiCl

mRNA-Wasch-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM Na₂-EDTA, 150 mM LiCl

cDNA-Wasch-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3 75 mM KCl

1 µg RNA wurde mit sterilem ddH₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und 15 Minuten bei 65 °C im Heizblock denaturiert. Dazu wurden mit biotinyliertem OligodT-gekoppelte Streptavidin-Polystyren-Kügelchen gegeben, die sich in 50 µl 2x mRNA-Bindungspuffer befanden. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend drei Minuten mit 16.000 xg zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 50 µl eiskaltem mRNA-Wasch-Puffer und einmal mit 50 µl eiskaltem cDNA-Wasch-Puffer gewaschen und Abschließend in 50 µl cDNA-Wasch-Puffer aufgenommen.

2.5.9 cDNA-Synthese (Erst-Strang)

Die cDNA wurde mit reverser Transkriptase (Superskript III) direkt von der mRNA synthetisiert. Es wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers vorbereitet.

Dieser Ansatz wurde zu den sedimentierten OligodT-Kügelchen gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 42 °C, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubationszeit bei 35 °C. Die Kügelchen wurden dreimal mit 10 mM Tris-HCl -Puffer, pH 7,4 gewaschen und anschließend in 100 µl desselben Puffers aufgenommen. Aliquots der cDNA wurden für 5'-RACE bzw. 3'-RACE –PCR eingesetzt.

2.5.10 5'-RACE und 3'-RACE vom Culbicin-Precursor

Die Amplifikation zur Bestimmung der 5'-Sequenz wurde im "mastercycler gradient" durchgeführt. Dazu wurde der CFB2-Primer mit den Antisense-Primern Cul-RACE-as 1-6 kombiniert.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Je 0,5 µl der PCR-Produkte wurden als Matrize in neue PCR-Ansätze eingesetzt. Dabei entsprachen

sich die neue und alte Primerkombination. Diese PCR-Ansätze wurden ebenfalls mit einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.1 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen mit den entsprechenden Puffersystemen nach Angaben des Herstellers.

2.6.2 Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte mit T4-DNA-Ligase mit dem entsprechenden Puffer nach Angaben des Herstellers.

2.6.3 Klonierung

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das pDrive-Cloning Kit (Qiagen) verwendet.

Je 4 µl gereinigtes PCR-Produkt wurde mit 5 µl 2x Ligationsmix und 1 µl pDrive gemischt und für zwei Stunden bei 8 °C inkubiert.

Die Klonierung der für Culbicin codierenden Sequenz in den Vektor pET32a wurde von Frau Dipl.-Biochem. Inken Lorentzen, Biochem. Institut der CAU Kiel, durchgeführt.

Dazu wurde die Culbicin-DNA mit den Oligonukleotiden Cul-NcoI-s und Cul-XhoI-as amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pET32a wurden mit den Restriktionsenzymen Nco I und Xho I geschnitten und anschließend ligiert. Das resultierende Fusionsprotein ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt.

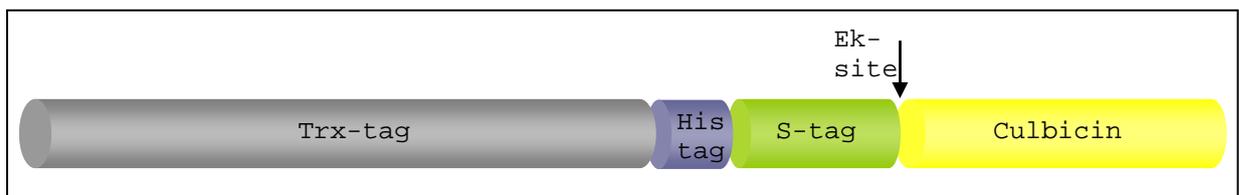


Abb. 2.1: schematischer Aufbau des Trx-Culbicin-Fusionsproteins

Dargestellt sind die vom Vektor codierten Tags, die Enterokinase-Schnittstelle (Ek-site) und das rekombinante Culbicin.

Um den kurzen N-Terminus des Culbicin-Precursors zu exprimieren, wurde die codierende Nukleotidsequenz zunächst amplifiziert und in den Expressionsvektor pIVEX2.4a kloniert. Die amplifizierte DNA wurde nach einer Ethanol-fällung mit den Restriktionsenzymen Cfr 421 und Pac I verdaut. Parallel dazu wurde die Vektor-DNA vorbereitet, um die beiden DNA-Elemente zu ligieren. Das entstandene Konstrukt wird im Folgenden pIVEX-KURZ genannt.

Abbildung 2.2 ist eine schematische Darstellung des entsprechenden rekombinanten KURZ mit N-terminalem 6xHistidinschwanz und einer Faktor Xa-Schnittstelle, um die Fusionspartner zu trennen.



Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Fusionsproteins KURZ mit N-terminalem Histidinschwanz
Grau dargestellt ist der Sequenzabschnitt mit Histidinschwanz und Faktor Xa-Erkennungsstelle, welcher nach der enzymatischen Spaltung mit Faktor Xa vom Protein getrennt wird. Blau unterlegt ist das rekombinante KURZ.

2.7 Expression von rekombinantem Trx-Culbicin in *E.coli* C43

Die Expression im Fermenter wurde von Frau Sonja Vollmer, Biochem. Institut der CAU Kiel, überwacht.

Drei Liter LB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, 2 mM Magnesiumsulfat, 0,2 mM Calciumchlorid) wurden mit 350 ml ÜN-Kultur *E. coli* C43 x pET-Cul inokuliert. Die Bakterien wurden bei 37 °C, pH 7,0 (automatisierte Zugabe von H₃PO₄ bzw. NaOH), 1,5 NL/min, pO₂ = 40% und 650 upm +/- 50 bis zur OD₆₀₀ = 10 inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde durch Entnahme von je 1 ml Probe im Abstand von 30 Minuten kontrolliert. Durch Zugabe von 0,714 g IPTG wurde bei OD₆₀₀ = 10 die Expression induziert. Nach 40 Minuten wurden bei OD₆₀₀ = 11,36 die Bakterien geerntet. Dazu wurde

die Bakteriensuspension 15 Minuten mit 4.000 upm bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor GS3).

Die sedimentierten Bakterien wurden mit 400 ml 1x PBS pH 7,4 , 0,1 % Tween 20 resuspendiert und mit Ultraschall mechanisch aufgeschlossen. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt (20 Minuten, 12.000 upm, 4 °C; Sorvall RC 5B mit Rotor SS34) wurden die *inclusion bodies*, in denen das Gros des Fusionsproteins vorliegt, sedimentiert.

Die *inclusion bodies* wurden mit PBS pH 7,4, 0,1 % Tween 20 gewaschen, bis der Überstand farblos war. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit PBS pH 7,4.

Die *inclusion bodies* wurden in 40 ml 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 rotierend ÜN aufgeschlossen. Nicht gelöste Bestandteile wurden für 20 Minuten bei 4 °C mit 12.000 upm (Sorvall RC 5B; Rotor SS34) sedimentiert und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt.

Kleinere Mengen rCulbicin wurden für biologische Tests in 1 L-Schikanekolben hergestellt. Dazu wurden 200 ml LB-Amp-Medium mit einer ÜN-Kultur von *E. coli* C43 x pET-Cul inokuliert, so dass die Optische Dichte ca. 0,03 war. Bei 37 °C wurden die Bakterien mit 200 upm bis zu einer OD= 0,6 inkubiert. Mit 1 mM IPTG wurde die Expression induziert, nach 40 min erfolgte die Ernte durch Zentrifugation. Die folgenden Schritte wurden wie unter 2.7.1 durchgeführt. Dabei wurde auf die Zugabe von Tween 20 verzichtet.

2.8 Reinigung von rCulbicin

2.8.1 IMAC (Ionenmetallaffinitätschromatographie)

4 ml der 50 %igen Nickel-NTA-Suspension wurden in eine leere Kunststoffsäule gefüllt. Die Säule wurde vor dem Auftrag der Probe mit 5 Säulenvolumen 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 äquilibriert. Proteine ohne Histidinschwanz wurden mit 5 Säulenvolumen 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 von der Säule gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte durch pH-Wertverschiebung mit 5 Säulenvolumen 1 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, 50 mM Na-Acetat, pH 4,0.

2.8.2 Dialyse

Überschüssige Salze wurden durch Dialyse entfernt. Dazu wurden 10 ml Eluat in eine Dialysekammer (Pierce, MWCO 3500) gefüllt. Dialysiert wurde ÜN rührend gegen 1 Liter 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM reduziertes Glutathion, 0,2 mM oxidiertes Glutathion. Am folgenden Tag erfolgte ein weiterer Dialyseschritt gegen 1 Liter frischen Puffer.

2.8.3 Enzymatische Spaltung des Fusionsproteins

Das Dialysat wurde aus der Dialysekammer in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 10 µl 1 M CaCl₂-Lösung wurde eine finale Konzentration von 1 mM CaCl₂ eingestellt. Die Probe wurde für 20 min mit 20.000 xg bei 4 °C zentrifugiert, dann wurden 3 µl Enterokinase hinzu gegeben und 1ml-Aliquots wurden bei 37 °C und 850 upm ÜN inkubiert.

2.8.4 Kationenaustauschchromatographie

Puffer A: 20 mM MES, pH 4,5

Puffer B: 20 mM MES, 1 M NaCl, pH 4,5

Für die Kationenaustauschchromatographie wurde der ÄktaPurifier verwendet.

Der pH-Wert der Probe wurde mit 10 % Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt. Ausgefallene Proteine wurden durch 20 Minuten Zentrifugation mit 20.000 xg bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Kationenaustauschsäule (1 ml ResourceS) geladen. Nur schwach mit der Säulenmatrix interagierende Proteine und Salze wurden mit 3 ml Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0 - 1000 mM über 25 Säulenvolumen. Anschließend wurde die Probe durch hydrophobe Interaktionschromatographie (s. 2.14.1) entsalzt.

2.9 Expression von KURZ in *E. coli* BL21 DE3 [pAPlacI^Q]

Zur Expression von KURZ wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) [pAPlacI^Q] mit pIVEX-KURZ transformiert.

Zweimal 200 ml TY-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin versetzt) in 1 L-Schikanekolben wurden mit einer ÜN-Kultur inokuliert und bei 37 °C und

200 upm inkubiert. Bei $OD_{600} = 1,8$ wurde die Expression mit 5 mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4.000x g für 10 Minuten bei 4 °C geerntet und in 1x TBS, pH 7,4 wieder aufgenommen. Die Bakterien wurden mit Ultraschall (3 x 1 min 9 cycle 10 %, auf Eis) aufgeschlossen. Durch 20minütige Zentrifugation mit 20.000 xg wurden die in TBS unlöslichen Bestandteile sedimentiert und der Überstand mit den TBS-löslichen Proteinen wurde abgenommen. Das Sediment wurde in 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 wieder aufgenommen und die darin enthaltenen *inclusion bodies* ÜN rollend aufgeschlossen.

KURZ wurde mit einer IMAC vorgereinigt und über eine SepPak geschickt, um es anschließend für die Antigengewinnung in 2 ml 20 mM MES, pH 5,0 umzupuffern und abschließend über eine PrepCell zu isolieren.

Für biologische Tests wurde KURZ direkt über eine SepPak gegeben und nach Gefriertrocknung wurde KURZ in 0,1 % TFA aufgenommen und mit einer HPLC gereinigt.

2.10 Reinigung von KURZ

2.10.1 SDS-PAGE (PrepCell)

Für die Reinigung von KURZ wurde eine PrepCell mit einem Einsatz von 28 mm Innendurchmesser verwendet. Es wurde ein 3,5 cm hohes 13%iges Trenngel (s. 2.15.1) gegossen und darüber ein 7,5 %iges Sammelgel mit einer Höhe von 1,5 cm. Als Elutionspuffer diente 20 mM MES-Puffer, pH 5,0, welcher mit 0,2 ml/min von einer Peristaltikpumpe durch die Elutionskammer gepumpt wurde. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die KURZ-haltigen zusammengeführt. Um eine Konzentration von KURZ zu erreichen, wurde eine Acetonfällung durchgeführt.

2.10.2 Reinigung von KURZ mit HPLC

Eine *reversed Phase*-Säule wurde im ÄktaPurifier verwendet. Die PRP3-Säule wurde mit 0,1 % TFA äquibriert und nach Beladen mit Protein wurden ungebundene Proteine mit der gleichen Lösung gewaschen (750 µl). Anschließend wurde gebundenes Protein mit einem linearen Gradienten von 0-84 % Acetonitril bei einer Flussrate von 250 µl/min in

45 min von der Säule eluiert. Die Detektion erfolgte bei 214 nm mit einem integrierten UV-Lichtdetektor.

2.11 Untersuchungen zur molekularen Identität und strukturellen Integrität

2.11.1 Massenspektrometrie

MS

Die molekulare Identität und Homogenität der Proteine wurden von Dr. Christoph Gelhaus, Zoologisches Institut der CAU Kiel, mittels *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) überprüft.

Dazu wurde ein Aliquot des Proteins mit einer gesättigten Matrix-Lösung von Sinapinsäure in 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA gemischt und auf einen Probenhalter gegeben.

Die Massenspektren wurden mit einem MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer aufgenommen, wobei die "positive ion linear"-Einstellung und eine Kalibrierung mit einem externen Standard gewählt wurden. Die durchschnittliche Masse (*average mass*) des Proteins wurde mit der anhand der Primärstruktur errechneten Masse von rCulbicin bzw. KURZ verglichen (unter Beachtung der potentiellen Disulfidbrücken).

2.11.2 Cirkularer Dichroismus

100 µl einer 10 µM Peptidlösung und der entsprechende Probenpuffer wurden zur Messung des CD-Spektrums an Prof. Dr. Joachim Grötzinger (CA-Universität Kiel, Biochemisches Institut) weitergereicht. Die Messung erfolgte mit einem Jasco J-720-Spektrometer (Jasco, Tokyo, Japan) mit einer spektralen Bandbreite von 2,0 nm. Verwendet wurden Küvetten aus Quarzglas mit einer Schichtdicken von 0,1 cm (Hellma GmbH, Müllheim). Zunächst wurde die zu analysierende Proteinlösung gemessen, anschließend in der gleichen Küvette, der Puffer in welchem sich das Protein befand. Letzteres Spektrum wurde von dem Spektrum der Proteinlösung subtrahiert, so dass das eigentliche CD-Spektrum erhalten wurde. Die Kalibrierung des CD-Spektrometers erfolgte nach Chen und Yang. Die gemessene Elliptizität Θ_λ wurde auf die mittlere Molmasse der Aminosäurereste des Proteins und die Schichtdicke der Probenlösung sowie ihre

Konzentration bezogen:

$$\Theta_{\lambda}^{\text{MRW}} = \frac{\Theta_{\lambda} \text{ MRW}}{d \cdot c}$$

Θ_{λ} : Elliptizität in Grad
 MRW: mittlere Molekularmasse (*mean residue weight*) der Aminosäurereste des Proteins in g/mol
 d: Schichtdicke der Lösung in cm
 c: Konzentration der Probe in g/cm³

2.12 Tests zur Charakterisierung der Peptide

2.12.1 Mikrosuszeptibilitätstest

Verwendete Bakterienstämme:

<i>Escherichia coli</i> K12 D31	OD ₆₀₀ 0,1 = 2,5x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	OD ₆₀₀ 0,1 = 2,8 x 10 ⁶ CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	OD ₆₀₀ 0,1 = 2,2x 10 ⁶ CFU/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 (type strain)	OD ₆₀₀ 0,1 = 2,8x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	OD ₆₀₀ 0,1 = 6,1x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	OD ₆₀₀ 0,1 = 1,8x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Yersinia enterocolitica</i> 96-C, ohne Plasmid, Serotyp 0:9	OD ₆₀₀ 0,1 = 2,8x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Serratia marcescens</i> (von Dr. H. Bruhn, ZINF Würzburg)	OD ₆₀₀ 0,1 = 2,5x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Klebsiella aerogenes</i> (von Prof. M. Maniak Univ. Kassel)	OD ₆₀₀ 0,1 = 7,5x 10 ⁷ CFU/ml

Aus einer ÜN-Kultur wurden 25 ml LB-Medium inokuliert. Diese wurde bei 37 °C mit 200 upm bis zu einer Optischen Dichte von OD₆₀₀=0,1 -0,2 inkubiert.

Eine 96well-Mikrotiterplatte (Rundboden) wurde mit 0,1 % BSA (AppliChem) blockiert, bevor 1:2- Peptid-Verdünnungsreihen von je 90 µl in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,2 bzw. pH 7,4 pipettiert wurden. Zu den je 90 µl wurden 10 µl Bakteriensuspension (2x 10² CFU) in LB-Medium gegeben und die Platte mit Deckel in einer feuchten Kammer bei 37 °C ÜN inkubiert. Die Peptidkonzentration, bei der gerade kein Bakterienwachstum sichtbar war, wurde als MIC ("*minimal inhibitor concentration*") bezeichnet.

Zur anschließenden Bestimmung der MBC ("*minimal bactericidal concentration*") wurden 40 µl dieser MIC-Verdünnung und der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe

entnommen, jeweils mit 60 µl 10 mM Natriumphosphatpuffer verdünnt und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, die ÜN bei 37 °C inkubiert wurde. Zur Kontrolle wurden 10 µl der nächst höheren Verdünnungsstufe (in der Bakterienwachstum erkennbar war) mit 90 µl Natriumphosphat-Puffer verdünnt ausplattiert.

Der MBC-Wert ist jene Peptidkonzentration, bei der keine Kolonien auf dem Agar gewachsen waren.

2.12.2 Bakterienmembran-Permeabilitätstest

MES-Puffer: 20 mM Morpholinoethansulfonsäure, 25 mM NaCl, pH 5,2

HEPES-Puffer: 10 mM Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure, 25 mM NaCl, pH 7,4

Aus einer ÜN-Kultur wurden 50 ml LB-Medium inokuliert. Diese wurde bei 37 °C mit 200 upm bis zu einer Optischen Dichte von $OD_{600} = 0,1-0,4$ inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde in zwei Hälften aufgeteilt und beide für 2 Minuten (*B. megaterium*) bzw. 3 Minuten (*E. coli*) mit 1.400 xg bei 4 °C zentrifugiert. Von beiden wurde der Überstand abgenommen und das Bakteriensediment zweimal mit MES- bzw. HEPES-Puffer gewaschen.

Das eine Sediment wurde anschließend in 4 ml MES- bzw. HEPES-Puffer resuspendiert. 1 ml wurde zur Bestimmung der OD_{600} abgenommen. Mit der verbliebenen Suspension wurde eine Bakterienkonzentration von $2 \cdot 10^7$ *E. coli*/ml bzw. $2 \cdot 10^6$ *B. megaterium*/ml im entsprechenden Puffer eingestellt.

Das andere Sediment wurde in 1 ml 70 % Ethanol p.A. resuspendiert, 1 Minute mit maximaler Geschwindigkeit geschüttelt (Vortex) und 5 Minuten bei RT inkubiert (tote Bakterien für die Bestimmung der maximalen Fluoreszenz). Nach einem Zentrifugationsschritt wurde wie mit ersterem Sediment verfahren.

Eine 96well-Mikrotiterplatte (Flachboden) wurde mit 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich) blockiert, bevor 1:2- Peptid-Verdünnungsreihen von je 25 µl/ Vertiefung im entsprechenden Puffer pipettiert wurden. Zu je 25 µl Probe wurden 25 µl 4 µM SYTOX[®] green und 50 µl Bakteriensuspension ($2 \cdot 10^7$ *E. coli*/ml, $2 \cdot 10^6$ *B. megaterium*/ml) im entsprechenden Puffer gegeben.

In eine Reihe wurden pro Vertiefung 25 µl Puffer gegeben (Negativkontrolle).

In eine Reihe wurden statt 25 µl Peptidlösung je 25 µl Puffer gegeben und statt der 50 µl Bakteriensuspension die mit Ethanol getöteten Bakterien gegeben (Positivkontrolle).

Die Fluoreszenz wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei RT im Fluorometer gemessen. Die Exzitationswellenlänge betrug 495 nm und die Emissionswellenlänge 538 nm. Der Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ permeabilisierte Bakterien} = (F_{\text{Probe}} - F_{\text{Puffer}}) / (F_{\text{Maximum}} - F_{\text{Puffer}}) * 100$$

Wobei:

F = relative Fluoreszenzeinheiten

F_{Probe} = Fluoreszenz der Bakteriensuspension mit SYTOX green und Peptidlösung

F_{Puffer} = Fluoreszenz der "Negativkontrolle"

F_{Maximum} = Fluoreszenz der "Positivkontrolle"

2.12.3 Test auf fungizide Wirkung

Zur Untersuchung auf fungizide Wirkung der Peptide wurde der Pilzstamm *Candida albicans* ATCC 10261 verwendet. *Candida* wurden aus -80 °C-Lagerung auf Sabouraud-Agar ausplattiert und 48 h bei 28 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde in 3 ml Sabouraud-Medium aufgenommen. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) in der Suspension wurde mit einer Neubauerkammer bestimmt (s. 2.12.5) und auf 4x 10³ CFU/ml Medium eingestellt.

Eine Rundboden-Mikrotiterplatte wurde wie unter 2.12.1 beschrieben vorbereitet. Statt der Bakteriensuspension wurden 10 µl *Candida*-Suspension (40 CFU) hinzu gegeben und die Platte in einer feuchten Kammer für 17 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung. Die Peptidkonzentration, bei der gerade kein Pilzwachstum sichtbar war, wurde als MIC ("*minimal inhibitor concentration*") bezeichnet.

Zur anschließenden Bestimmung der MFC ("*minimal fungicidal concentration*") wurden 40 µl dieser MIC-Verdünnung und der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe entnommen, jeweils mit 60 µl 10 mM Natriumphosphatpuffer verdünnt und auf einer Sabouraud-Agarplatte ausplattiert, die ÜN bei 28 °C inkubiert wurde. Zur Kontrolle wurden 10 µl der nächst höheren Verdünnungsstufe (in der Pilzwachstum erkennbar war) mit 90 µl Natriumphosphatpuffer verdünnt ausplattiert.

Der MFC-Wert ist jene Peptidkonzentration, bei der keine Kolonien auf dem Agar gewachsen waren.

2.12.4 Liposomendepolarisationstest

Liposomenpräparation

Liposomenpuffer: 50 mM Tris-Maleat, 50 mM K₂SO₄, 500 mM Na-EDTA, 0,02 % (w/v) Natriumazid; pH 5,2 mit KOH eingestellt

Zur Herstellung von Liposomen wurden 60 mg eines Phospholipidgemisches aus Sojabohnen in 1,5 ml Chloroform vorsichtig in einem Rundkolben gelöst. Anschließend wurde die Lösung unter Stickstoff-Begasung durch Drehen des Kolbens eingetrocknet, bis ein dünner Lipidfilm an der Kolbenwand entstanden war. Die Chloroformreste wurden im Exsikkator über Nacht abgedampft und der Lipidfilm mit 1,5 ml Liposomenpuffer mit Hilfe einiger Glasperlen resuspendiert. Die Liposomensuspension wurde in ein Reagenzglas überführt und auf Eis mit einem Stabsonifikator 3x 1 min mit 10 % beschallt, dann auf Trockeneis abwechselnd dreimal eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut. Zuletzt wurde dreimal 5 sec auf Eis mit 10 % beschallt [Pick, 1981]. Die Liposomensuspension wurde bei 4 °C gelagert.

Test auf porenbildende Aktivität

Küvettenpuffer: 50 mM Tris-Maleat, 50 mM Na₂SO₄, 500 mM EDTA, 0,02 % (w/v) Natriumazid; pH 5,2 mit NaOH eingestellt
0,5 µM Valinomycin in 90 % Ethanol p.A.

Bei diesem Test wurde die Membrandepolarisation von Liposomen mit Hilfe des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs 3,3'-Diethylthiadicarbocyaniniodid (DTDC, Kodak) mit dem Lumineszenzspektrometer bei 25 °C gemessen [Loew *et al.*, 1983]. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm und die Emissionswellenlänge betrug 670 nm. Die eingestellte Spaltbreite betrug für beide Wellenlängen 10 nm. Für die Messung wurden die Liposomen (2 µl) 1: 4000 mit Küvettenpuffer (8 ml) verdünnt und mit 1 µM Fluoreszenzfarbstoff versetzt (= 100 % Fluoreszenz). Durch Zugabe von 2 µl 0,5 µM Valinomycin in 90 % Ethanol p.A. zu 1 ml Liposomenmesslösung wurde ein K⁺-

Diffusionspotential der Liposomenmembran erreicht, der Farbstoff wanderte in die Liposomenmembran und die Fluoreszenz wurde unterdrückt (= 0 % Fluoreszenz).

Wird ein porenbildendes Protein zugegeben, so wird der Farbstoff durch den darauf folgenden Zusammenbruch des Potentials freigesetzt. Der Anstieg der Fluoreszenz innerhalb einer Minute nach Probenzugabe um 5 % des Wertes vor der Valinomycinzugabe wurde als eine Aktivitätseinheit (U) definiert [Leippe et al., 1991].

2.12.5 Test der Cytotoxizität von Peptiden mit AlamarBlue

MES-Puffer: 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 5,5 mit NaOH eingestellt, 320 mosmol/kg
(gegebenenfalls mit NaCl eingestellt)

HEPES-Puffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4 mit eingestellt, 320 mosmol/kg
(gegebenenfalls mit NaCl eingestellt)

Ca. 1×10^7 Jurkatzellen wurden bei einer Zelldichte von $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ durch 5 Minuten Zentrifugation mit 320 xg bei RT geerntet. Nach zwei Waschschrritten mit MES- bzw. HEPES-Puffer wurde das Zellsediment in 5 ml des entsprechenden Puffers resuspendiert.

Ca. 1×10^7 Glioblastomazellen 86HG 39 wurden mit 1x PBS, pH 7,2 gewaschen und mit 10 ml 0,25 % Trypsin vom Kulturflaschenboden gelöst. Anschließend wurden sie wie die Jurkatzellen behandelt.

Eine 96well-Mikrotiterplatte (Flachboden) wurde mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich) vorbehandelt, bevor 1:2 Peptidverdünnungsreihen von je 50 μ l/ well im entsprechenden Puffer pipettiert wurden. Zu je 50 μ l Probe wurden je 50 μ l Zellen (2×10^4 Z) in 10 % AlamarBlue gegeben. Stoffwechselaktive Zellen reduzieren den Farbstoff AlamarBlue. Wirkt ein Peptid cytotoxisch, wird der Metabolismus eingeschränkt und hat eine verminderte Reduktion des Farbstoffs AlamarBlue zur Folge. Die verminderte Fluoreszenz wurde als indirekter Nachweis der Cytotoxizität des Peptids bestimmt [O'Brien *et al.*, 2000]. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde erstmals die Fluoreszenz im Fluoroskan gemessen, dann nach 60, 90 und 120 Minuten. Die Exzitationswellenlänge betrug 530 nm und die Emissionswellenlänge 595 nm.

2.12.6 Test auf hämolytische Aktivität

MES-Puffer: 20 mM MES, 140 mM NaCl, 320 mosmol, pH 5,5

1 ml humane Erythrocyten (Blutgruppe A, Rh +, 50 % in RPMI-Medium) wurde für 3 Minuten mit 1.000 xg bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierten Erythrocyten mit 1x PBS, pH 7,4 gewaschen, bis der Überstand klar war.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Erythrocyten in 20 mM MES, 140 mM NaCl, 320 mosmol, pH 5,5 aufgenommen. Die Suspension wurde so verdünnt, dass 20 µl Erythrocytensuspension mit 980 µl ddH₂O vermischt bei 412 nm eine Absorption von 1,4 hatte (5×10^8 Z/ml).

Eine 96well-Mikrotiterplatte (MTP, Spitzboden) wurde mit 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich) blockiert, bevor in jede Vertiefung 1:2- Peptid-Verdünnungsreihen von je 80 µl MES-Puffer pipettiert wurden. Dazu wurden 20 µl Erythrocytensuspension gegeben und die MTP 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und humider Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Anschließend wurden die Erythrocyten (5 min Zentrifugation, 550 xg, RT) sedimentiert. 20 µl des Überstandes wurden in einer Flachboden-MTP mit 80 µl MES-Puffer verdünnt und die Absorption des Überstandes bei 405 nm gegen ddH₂O gemessen.

Anhand der folgenden Formel wird die hämolytische Aktivität ausgedrückt:

$$\% \text{ Lyse} = 100 \times (A_{\text{Probe}} - A_{\text{Kontrolle}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{Kontrolle}})$$

wobei:

$A_{\text{Probe}} = A_{412}$ von 20 µl Erythrocytensuspension und 80 µl Probe

$A_{\text{Kontrolle}} =$ Kontrolle, A_{405} von 20 µl Erythrocytensuspension und 80 µl Probenpuffer

$A_{\text{max}} =$ 100 % Lyse, A_{405} von 20 µl Erythrocytensuspension und 80 µl ddH₂O

2.13 Immunolokalisation der natürlichen Peptide

Cacodylatpuffer: 2,14 g Cacodylsäure Natriumsalz, 3,424 g Saccharose, 29,4 mg Calciumchlorid Dihydrat, pH 7,2 mit 0,1 M HCl einstellen, ad 100 ml ddH₂O

40 % Paraformaldehyd-Stammlsg: 4 g in 10 ml ddH₂O bei 70 °C lösen, mit 1 M NaOH titrieren, bis die Lsg. klar ist

PBSS: 0.05 % Saponin in 1x PBS, pH 7,4

Objektträger: "Superfrost Plus" (Menzel)

A. culbertsoni-Trophozoiten, in 2 % Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer fixiert, wurden mit 1x PBS, pH 7,4 gewaschen (320 xg) und rehydriert. Durch 15 min Inkubation mit PBSS wurden die Amöben permeabilisiert. Die Aldehyde wurden mit 50 mM NH₄Cl in 1x PBS, pH 7,4 gesättigt. Nach einem Waschschrift wurden die OT mit 3 % fötalem Kälberserum (FCS) in 1x PBS, pH 7,4 blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (vorabsorbierter Anti-Culbicin und Anti-KURZ, sowie den Präimmunseren, s.2.1.10). Nicht gebundene Antikörper wurden durch einen Waschschrift entfernt, dann folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Anti-rabbit CY3-Konjugat) für 2 h. In den letzten 5 min wurde der Hoechstfarbstoff (1 µg/ml) hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Schließlich wurden die Amöben zweimal 10 min mit 1x PBS, pH 7,4 gewaschen, auf Objektträger gegeben und mit Glycerol und DABCO in PBS eingedeckelt.

A. castellanii-Kultur wurde direkt auf den Objektträger (OT) geimpft und kultiviert, bis ein dichter Rasen entstanden war. Medium und gelöste Amöben wurden mit 1x PBS, pH 7,4 abgewaschen. Die Amöben wurden mit 2 % Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer für 30 min bei RT fixiert, des Weiteren wurde wie mit *A. culbertsoni* verfahren.

Visualisiert wurden sie mit einem Fluoreszenzmikroskop und fotografiert mit einer Digital-Kamera am Fluoreszenz-Mikroskop.

2.14 Reinigung der natürlichen Peptide

2.14.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Eine hydrophobe Matrix (SepPak C₁₈) wurde mit 5 Säulenvolumen (CV) 80 % Acetonitril in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) angefeuchtet und mit 5 CV 0,1 % TFA äquilibriert. Die jeweilige Probe wurde geladen und nur schwach mit der Matrix interagierende Proteine sowie Salze wurden mit zweimal 5 CV 20 % Acetonitril in 0,1% TFA von der Säule gewaschen. Gebundenes Protein wurde stufenweise mit zweimal 5 CV 30, 50 und 80 % Acetonitril in 0,1% TFA eluiert.

2.14.2 Gefriertrocknung

Vor der Trocknung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren und dann bei 0,220 mbar bis zur vollständigen Trockenheit lyophilisiert.

2.15 Proteinanalyse

2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine im niedermolekularen Bereich von 1 bis 100 kDa zu trennen, wurde das System der Tricin/ SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet [Schägger & Jagow, 1987]. Das Gelsystem setzt sich aus einem 4 %igen Sammelgel und einem 13 %igen Trenngel zusammen.

2.15.2 Silbernitrat-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

[Heukeshoven & Dernick, 1986, modifiziert]

Lösung 1: 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Lösung 2: 30 % (v/v) Ethanol, 500 mM Natriumacetat, 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,2 % (w/v) Na_2SO_3

Lösung 3: ddH₂O

Lösung 4: 0,1 % (w/v) AgNO_3 , 0,02 % (v/v) Formaldehyd

Lösung 5: 2,5 % (w/v) Na_2CO_3 , 0,01 % Formaldehyd; pH 11,5

Lösung 6: 50 mM EDTA

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel 10 min in Lösung 1 fixiert und 10 min in Lösung 2 inkubiert. Danach wurde dreimal für je 5 min mit ddH₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte durch ein 15minütiges Bad in Lösung 4. Nach kurzem Waschen mit ddH₂O wurde mit Lösung 5 entwickelt. Mit Lösung 6 wurde die Entwicklung gestoppt.

2.15.3 Coomassie-Färbung

Die Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie-Blau G250 erfolgte nach Neuhoff [Neuhoff et al., 1988]

Färbelösung: 2 % Phosphorsäure

10 % Ammoniumsulfat

0,1 % kolloidales Coomassie-Blau G250
20 % Methanol langsam hinzugeben

Entfärbelösung: 30 % Ethanol
10 % Essigsäure

Das Gel wurde nach der Elektrophorese in der Färbelösung gebadet, bis entweder die Proteinbanden gut erkennbar waren oder das gesamte Gel gleichmäßig blau gefärbt war. Überschüssiger Farbstoff wurde durch ein Bad in der Entfärbelösung entfernt.

2.15.4 Immunoblotting (Westernblot-Analyse)

Blockierlösung: 1x TBS, pH 7,4, 3 % (w/v) BSA

10x Laemmli Elektrophorese-Puffer: 250 mM Tris, 1 % (w/v) SDS, 1,92 M Glycin,
pH 8,3

Blotting-Puffer: 1x Laemmli Elektrophorese-Puffer, 10 % (v/v) Methanol

AP-Puffer: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 9,5

Entwicklungslösung: 10 ml AP-Puffer, 66 µl NBT (50 mg/ml in DMF), 33 µl
BCIP (50 mg/ml in DMF)

Im Anschluss an die elektrophoretische Proteinauftrennung im SDS-Gel erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran nach dem "semidry-Blotting"-Verfahren verändert nach [Towbin, 1979].

3 Lagen Whatman-Papier, welches zuvor in Blotting-Puffer getränkt wurde, wurden auf die anodische Seite gelegt, es folgte die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran, das PAA-Gel, weitere 3 Lagen Whatman-Papier an der kathodischen Seite.

Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² für 40 min. Anschließend wurde die Membran 30 min in der Blockierlösung inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nachdem 5 min mit TBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation ÜN bei 4 °C mit dem ersten Antikörper. Nach 5 min Waschen des Blots wurde mit dem zweiten

Antikörper, Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG in TBS, bei RT für 2 h inkubiert. Darauf folgten wieder drei Waschschritte, bis schließlich die Membran mit AP-Puffer äquilibriert wurde. Der Blot wurde solange in Entwicklungslösung inkubiert, bis Banden deutlich erkennbar waren. Die Reaktion wurde mit ddH₂O gestoppt. Zur Dokumentation wurde die Membran getrocknet und digitalisiert.

2.15.5 Markierung von Cysteinresten mit Monobromobimane

Reduktionspuffer: 200 mM Tris, pH 8,0, 1 % SDS, 3 mM EDTA
3 mM DTT frisch hinzugefügt

Mit dieser Methode wurden die reduzierten Cysteinreste eines Proteins durch kovalente Bindung an den Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane (mBBr) markiert. Hierzu wurde ein Teil der Proben in einem Vakuumkonzentrator getrocknet, die Proteine anschließend in 10 µl Reduktionspuffer aufgenommen und bei 70 °C für 20 min denaturiert und Disulfidbrücken reduziert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Markierung der Cysteinreste durch Zugabe von 0,8 µl 100 mM mBBr für 2 min im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 1,2 µl 100 mM Cystein gestoppt. Zum Reaktionsansatz wurden 5 µl Probenpuffer pipettiert und dieser auf 95 °C für 5 min erhitzt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine für ca. 30 min in 50 %igem Methanol gewaschen und unter UV-Licht analysiert. Markierte Proteine wurden als fluoreszierende Banden erkennbar [O'Keefe, 1994]. Abschließend erfolgte eine Silberfärbung der Proteine im Gel.

3 ERGEBNISSE

3.1 Aufklärung der Nukleotidsequenz des Culbicingens

Aus *A. culbertsoni*-Trophozoiten wurde die RNA isoliert und die mRNA mittels OligodT-gekoppelten Beads isoliert (s. Kapitel 2.6.4). In einer 5'-RACE-PCR wurde ein cDNA-Klon amplifiziert. Mittels Sequenzanalyse wurde dessen Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz bestimmt, die in Abbildung 3.1 dargestellt ist.

1	ATG	CGC	GTG	TAC	CTT	GCC	TTC	GCT	CTT	CTT	GTT	GCT	TCC	TTC	TTC	45
1	M	R	V	Y	L	A	F	A	L	L	V	A	S	F	F	15
46	GTC	GTC	GCC	CAC	TGC	GAC	GTA	CGT	GAG	TGC	ATC	TTA	AAC	AAG	TGC	90
16	V	V	A	H	C	D	V	R	E	C	I	L	N	K	C	30
91	TCT	TCC	GAG	ATC	TCT	GCT	TGC	TAC	AGC	GAC	ACC	AAG	TGC	CTC	AAC	135
31	S	S	E	I	S	A	C	Y	S	D	T	K	C	L	N	45
136	GCC	GTT	CTT	TGC	ATC	TCC	AAG	TGC	AAC	TCG	ACC	GAC	GTT	TCT	TGC	180
46	A	V	L	C	I	S	K	C	N	S	T	D	V	S	C	60
181	GCC	CAG	GCT	TGT	GCT	GCT	AAG	GCT	GGC	ACG	GAT	GGC	GCG	TTC	GGT	225
61	A	Q	A	C	A	A	K	A	G	T	D	G	A	F	G	75
226	GCT	CTT	GCC	AGG	TGC	GCC	ACA	CAG	TGC	CTG	CAC	AGC	GCC	ACT	GCC	270
76	A	L	A	R	C	A	T	Q	C	L	H	S	A	T	A	90
271	GAC	GTC	TTC	GAC	CTG	CTC	CCT	CCC	GCG	CCT	CAG	GGT	AAG	TGC	AGC	315
91	D	V	F	D	L	L	P	P	A	P	Q	G	K	C	S	105
316	GTT	CTT	AAG	AAG	GTT	GCC	TGC	GCT	GCT	GCG	ATC	GCT	GGA	GCC	GTT	360
106	V	L	K	K	V	A	C	A	A	A	I	A	G	A	V	120
361	GCT	GCC	TGC	GGT	GGT	ATT	GAC	CTC	CCG	TGC	GTC	CTG	GCT	GCC	TTG	405
121	A	A	C	G	G	I	D	L	P	C	V	L	A	A	L	135
406	AAG	GCT	GCT	GAG	GGC	TGT	GCC	TCT	TGC	TTC	TGC	GAG	GAC	CAT	TGT	450
136	K	A	A	E	G	C	A	S	C	F	C	E	D	H	C	150
451	CAC	GGT	GTG	TGC	AAG	GAC	CTG	CAT	CTT	TGC	TAG	TGG	TCA	TGA	AAT	505
151	H	G	V	C	K	D	L	H	L	C	*					
506	TAA	ATT	GTT	TTC	CTG	TAA	ACG	AAA	AAG	TAA	AGT	ATA	AAA	CCT	TTT	540
541	TAT	TCG														

Abb. 3.1: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des erhaltenen cDNA-Klons

Abgeleitet von der *A. culbertsoni*-mRNA. In der oberen Zeile steht die Nukleotidsequenz, darunter die translatierte Aminosäuresequenz (1-Letter Code). Die Nummern am Anfang und Ende jeder Zeile geben die jeweilige Position des ersten und letzten Nukleotids, bzw. des entsprechenden Aminosäurerestes der Zeile an. Nukleotidsequenzen, denen keine entsprechenden Aminosäuresequenzen zugeordnet sind, entsprechen dem nichttranslatierten Bereich des Gens.

Die Sequenz ist 546 Basenpaare lang. Zu Beginn steht ein Startcodon, die Culbicin codierende Sequenz beginnt mit dem 304. Nukleotid und endet mit einem Stopcodon an der 493. Nukleotidposition. Nach dem Stopcodon folgt ein nichttranslatierter Bereich von 63 Nukleotiden. Vor der Culbicin codierenden Sequenz ist ein Bereich von 303 Nukleotiden, der einem Peptid von 101 Aminosäuren (AS) entspricht, von denen 10 Cysteine sind. Das Vorhandensein der Cysteine lässt auf ein hitze- und säureresistentes Peptid schließen, welches durch Disulfidbrücken in seiner Tertiärstruktur stabilisiert wird.

3.2 Sequenzanalyse des Culbicingens und der abgeleiteten Aminosäuresequenz

3.2.1 Signalpeptidanalyse

Mit dem Programm SignalP 3.0 (s. 2.2) wurde die Aminosäuresequenz des Precursors auf das Vorhandensein eines Signalpeptids hin untersucht. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der angegebenen Sequenz (AS 1-20) um ein Signalpeptid handelt, wurde mit 1,0 bewertet. Die Signalpeptidase I spaltet die Peptidkette mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,912 zwischen den Aminosäureresten an Position 20 und 21 (AHC-DV). Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeiten wurde für die weitere Arbeit angenommen, dass es sich bei den ersten 20 Aminosäureresten (MRVYLAFALLVASFFVVAHC) um ein Signalpeptid handelt. Das Vorhandensein eines Signalpeptids lässt auf eine extracytosolische Lokalisation schließen.

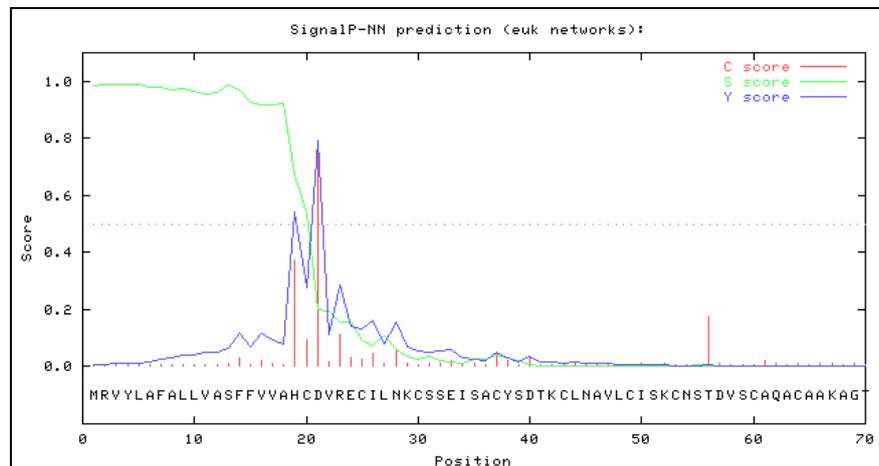


Abb. 3.2: Vorhersage der Wahrscheinlichkeit zum Vorhandensein eines Signalpeptids

Die X-Achse bezeichnet die jeweilige AS-Position, die Y-Achse die Wahrscheinlichkeit.

C Score ("Cleavage site score"): die Wahrscheinlichkeit, dass an dieser Position eine Schnittstelle für die Signalpeptidase vorliegt. S score gibt die Wahrscheinlichkeit jeder einzelnen Aminosäure an, Teil eines Signalpeptids zu sein. Der Y score kombiniert die Wahrscheinlichkeit von C score und S score, wodurch eine bessere Vorhersage über die Signalpeptidase I – Erkennungssequenz getroffen werden kann als mit dem C score alleine. [J.D. Bendtsen *et al.*, 2004]

3.2.2 Sequenzanalyse

Die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz des Vorläufermoleküls ("Precursor") wurden einer BLAST-Sequenzanalyse (s. 2.2) unterzogen. Die Sequenzen wurden mit allen bekannten Proteinsequenzen und translatierten DNA-Sequenzen in der Datenbank verglichen. Dabei wurden keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen erkannt.

Bei der N-terminalen Sequenzierung nach Edman wurde festgestellt, dass Culbicin mit einem Glycin (102. Aminosäureposition des Precursors) beginnt.

Da der aminoterminal Bereich genau wie Culbicin über 10 Cysteine verfügt, wird er als potentielles Peptid angesehen und wird im Folgenden als "KURZ" bezeichnet. In Bezug auf die Culbicinsequenz wurde das 10. Cystein (84. Aminosäureposition) als letzte Aminosäure des potenziellen Peptids KURZ gewählt. Ein vergleichende Sequenzanalyse ("Alignment") von Culbicin und KURZ (erstellt mit ClustalW 1.83, s. 2.2) ergab keine relevante Ähnlichkeit (<20 %) der Peptide. Das Alignment ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

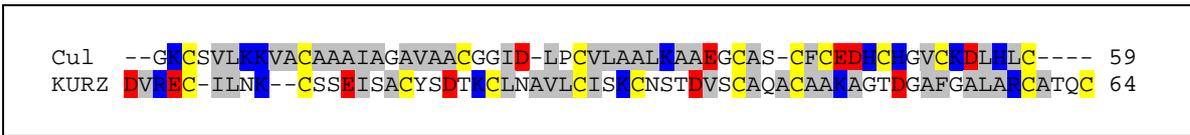


Abb. 3.3: Alignment der AS-Sequenzen von Culbicin und KURZ

Das Alignment wurde mit ClustalW 1.83 erstellt. Positiv geladene Aminosäuren (R, K, H) sind blau, negativ geladene (D, E) rot und hydrophobe (V, I, L, M, F, A, W) grau hinterlegt.

In Tabelle 3.1 ist der Gehalt der einzelnen Aminosäuren in Culbicin und KURZ aufgeführt. Die Anzahl der Cysteine ist identisch, und die Anzahl der positiven und negativen Aminosäuren ist in beiden Peptiden ausgeglichen (5:5 und 6:6). Mit dem "ProtParam tool" (s. 2.2) wurde der theoretische Isoelektrische Punkt für Culbicin auf 6,94 bestimmt, für KURZ liegt der theoretische Isoelektrische Punkt bei 6,2. Das theoretische Molekulargewicht von Culbicin beträgt 5792 Da und von KURZ 6559,6 Da (bestimmt mit "MS-Product", s. 2.2).

Die gesamte Precursorsequenz wurde in 4 Abschnitte eingeteilt, die in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt sind. Die ersten 20 Aminosäurereste bilden das potentielle Signalpeptid. Die folgenden 64 Aminosäurereste bilden das Peptid "KURZ", welches insgesamt 10 Cysteine in seiner Aminosäuresequenz hat. Darauf folgt ein cysteinfreier Sequenzabschnitt von 17 Aminosäuren, der wahrscheinlich eine "linker"-Funktion hat. Die letzten 59 Aminosäuren bilden das Culbicin.

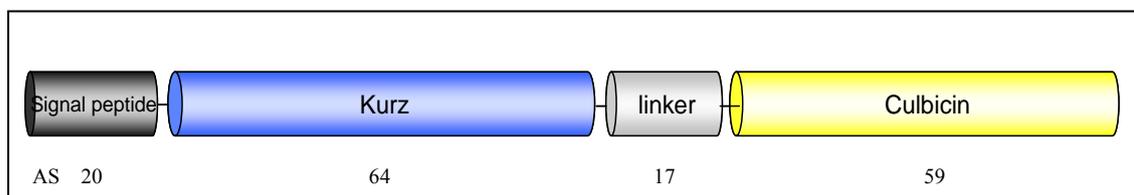


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Precursor-Architektur

Die ersten 20 Aminosäuren bilden ein Signalpeptid, die folgenden 64 Aminosäuren (Position 21-84) KURZ. Zwischen KURZ und Culbicin (Position 102-160) gibt es einen cysteinfreien Sequenzabschnitt von 17 Aminosäuren, der als "linker" bezeichnet wird.

Aminosäure	Culbicin		KURZ	
	Abs. Anzahl	%	Abs. Anzahl	%
Alanin (A)	13	22,0	11	17,2
Arginin (R)	0	0	2	3,1
Asparagin (N)	0	0	3	4,7
Asparaginsäure (D)	3	5,1	4	6,2
Cystein (C)	10	16,9	10	15,6
Glutamin (Q)	0	0	2	3,1
Glutaminsäure (E)	2	3,4	2	3,1
Glycin (G)	6	10,2	3	4,7
Histidin (H)	3	5,1	0	0
Isoleucin (I)	2	3,4	3	4,7
Leucin (L)	6	10,2	4	6,2
Lysin (K)	5	8,5	4	6,2
Methionin (M)	0	0	0	0
Phenylalanin (F)	1	1,7	1	1,6
Prolin (P)	1	1,7	0	0
Serin (S)	2	3,4	7	10,9
Threonin (T)	0	0	4	6,2
Tryptophan (W)	0	0	0	0
Tyrosin (Y)	0	0	1	1,6
Valin (V)	5	8,5	3	4,7
Positive AS	5	8,4	6	9,4
Negative AS	5	8,4	6	9,4
Hydrophobe AS	27	45,8	22	34,4

Tab. 3.1: Aminosäuregehalt von Culbicin und KURZ

Dargestellt sind der absolute und prozentuale Gehalt der einzelnen Aminosäuren in Culbicin und KURZ.

3.3 Rekombinante Expression und Isolation von Culbicin

Culbicin wurde als Fusionsprotein mit einem Thioredoxin (Trx) und einem Histidin-tag rekombinant in *E. coli* C43 pET-Cul exprimiert (s. 2.7), wobei das Fusionsprotein (Trx-Culbicin) in Inclusion bodies vorlag. Die Expression wurde nach 40 min beendet, da das Trx-Culbicin die Bakterien lysierte. Im Anschluss an die Reinigung mittels Nickelionen-affinitätschromatographie (s. 2.8.1) wurde der Fusionspartner durch hydrolytische Spaltung mit Enterokinase von Culbicin getrennt. Die anschließende Kationenaustausch-

chromatographie (2.8.4) lieferte reines rCulbicin. Das reine rCulbicin wurde bis zur völligen Trockenheit lyophilisiert und in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) resuspendiert. Das rekombinante Peptid hat technisch bedingt aminoterminal zusätzlich die 2 Aminosäuren Alanin und Methionin. Die Ausbeute von reinem rCulbicin lag bei etwa 300 µg/l.

3.4 Molekulare Identität und strukturelle Integrität von rCulbicin

3.4.1 Bestimmung der Molekularen Masse von rCulbicin

Zur Untersuchung der Masse von rCulbicin wurde ein Aliquot des rekombinanten Peptids (1mg/ml 0,01% TFA) im Massenspektrometer untersucht (s. 2.11.1). Die theoretische Masse von rCulbicin wurde von MS-Product mit 5994,3 Dalton berechnet. Vorausgesetzt, alle zehn Cysteinreste sind in Disulfidbrücken involviert, läge die theoretische Masse von korrekt gefaltetem rCulbicin bei 5984,3 Dalton. Eine Abweichung bis zu +/- 3 Dalton wird toleriert. Abbildung 3.5 zeigt die Auswertung der Massenbestimmung von rCulbicin. Die Masse beträgt 5985,13 und liegt damit im Rahmen der tolerierten Abweichung. Bei dem gemessenen Protein handelt es sich um rCulbicin, dessen vorhandene Cysteinreste vermutlich alle in Disulfidbrücken involviert sind.

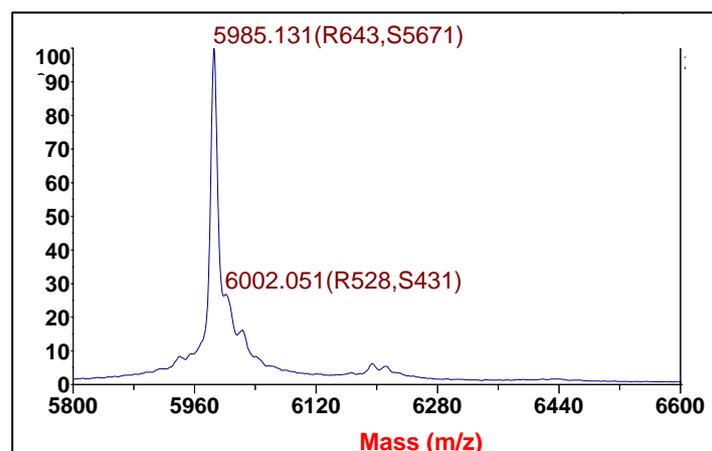


Abb. 3.5: Massenspektrum von rCulbicin in 0,01 % TFA

Auf der Abzisse ist die Masse pro Ladung aufgetragen, auf der Ordinate die Signalintensität in Prozent des Hauptsignals.

3.4.2 Nachweis der Disulfidbrücken mit Monobromobimane

Um nachzuweisen, dass alle Cysteinreste von rCulbicin in Disulfidbrücken involviert sind, wurde ein Aliquot des Peptids reduziert und mit Monobromobimane inkubiert (s. 2.15.5). Dabei handelt es sich um eine Chemikalie, die eine kovalente Bindung mit freien Sulfhydrylgruppen eingeht. Zwei weitere Aliquots des Peptids mit 5- (Spur 2) und 10facher Proteinmenge (Spur 3) wurden nicht reduziert und ebenfalls mit Monobromobimane inkubiert. Monobromobimane fluoresziert unter UV-Licht, was dem Nachweis diene. Die reduzierte Probe (Spur 1 in Abb. 3.6) wurde neben den zwei nicht-reduzierten Proben mit 5- (Spur 2) und 10facher Proteinmenge (Spur 3) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Wanderung im elektrischen Feld unter UV-Licht analysiert (Abb. 3.6a). Anschließend wurde das Gel einer Silbernitratfärbung unterzogen (Abb. 3.6b). In Abbildung 3.6a zeigt die reduzierte rCulbicinprobe (Spur 1) ein deutliches Fluoreszenzsignal, während die nicht reduzierten Proteine (Spur 2 und 3) nicht sichtbar sind. In Abbildung 3.6b ist das Gel nach Silbernitratfärbung dargestellt, um die nicht fluoreszierenden Proteine sichtbar zu machen. Damit lässt sich feststellen, dass in rCulbicin keine freien Sulfhydrylgruppen vorliegen, d.h. die 10 Cysteine sind alle in Disulfidbrücken involviert.

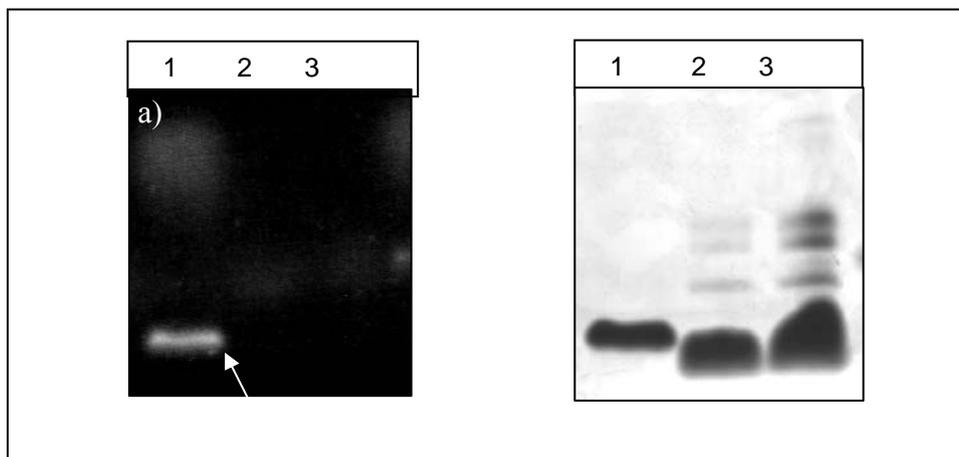


Abb. 3.6: Cysteinnachweis mit Monobromobimane und anschließende Silbernitratfärbung

a) zeigt die Monobromobimane-behandelten Proteine im SDS-Gel unter UV-Licht. b) ist eine Abbildung desselben Gels nach Silbernitratfärbung und dient dem Nachweis der Proteinbanden. In Spur 1 befindet sich das reduzierte rCulbicin, welches mit Monobromobimane unter UV-Licht fluoresziert (Pfeil). In Spur 2 ist die 5fache Menge und in Spur 3 die 10fache Menge nicht reduziertes rCulbicin aufgetragen. Diese Proteine fluoreszieren nicht, weil sie keine freien SH-Gruppen haben. D. h. die 10 Cysteine von rCulbicin sind alle in Disulfidbrücken involviert. Zusätzlich tauchen in den Spuren 2 und 3 höhermolekulare Proteinbanden (Abb. b) auf, die eine Polymerisierung von Culbicinmolekülen erkennen lassen.

3.4.3 Analyse der Sekundärstruktur von rCulbicin mittels CD-Spektroskopie

Bei Culbicin handelt es sich um ein neues Protein, welches keinerlei Ähnlichkeit mit bisher bekannten Proteinen der Datenbanken hat. Um einen Hinweis –abgesehen von der Aminosäuresequenz- auf die Sekundärstruktur zu bekommen, wurde Culbicin im fernen UV-Bereich (180 – 250 nm) mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht (s. 2.11.2). Abbildung 3.7 zeigt das CD-Spektrum von rCulbicin. Anhand des Verlaufs des Spektrums mit den Absorptionsminima bei 208 und 222 nm ergibt sich für die Sekundärstruktur von rCulbicin ein vorwiegend α -helikaler Anteil von 30 % mit 17 % β -Faltblattanteil und 14 % β -Schleifen. Etwa 39 % der Sequenz konnte keinen Sekundärstrukturelementen zugeordnet werden [kalkuliert nach Provencher, 1982].

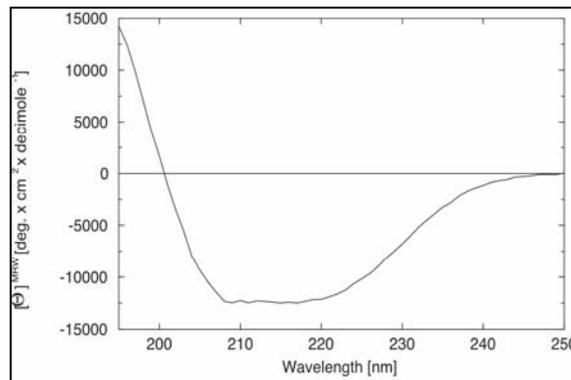


Abb. 3.7: CD-Spektrum von rCulbicin in 0,01 % TFA

Die x-Achse zeigt die Wellenlänge (nm), die y-Achse die Intensität des gemessenen Signals. Anhand des Verlaufs mit den Absorptionsminima bei 208 und 222 nm kann man auf α -helikale-Strukturen mit einem geringeren β -Faltblatt-Anteil schließen.

3.5 Funktionelle Charakterisierung von rCulbicin

3.5.1 Antimikrobielle Aktivität von rCulbicin

Die antimikrobielle Aktivität von rCulbicin auf verschiedene Bakterien wurde in einem Mikrosuszeptibilitätstest untersucht. Dabei wurde zunächst die kleinste wachstumshemmende Peptidkonzentration (MIC) ermittelt, indem 10^2 koloniebildende Einheiten (CFU) verschiedener Bakterienarten über Nacht (ÜN) mit Culbicin in verschiedenen Konzentrationen bei 37 °C inkubiert wurden (s. 2.12.1). Am nächsten Tag

erfolgte die visuelle Auswertung, wobei die MIC jene Peptidkonzentration ist, in der kein Bakterienwachstum zu erkennen war. Zur anschließenden Bestimmung der MBC ("*minimal bactericidal concentration*") wurde ein Aliquot dieses ÜN-Ansatzes, der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe sowie der nächst höheren Peptidverdünnungsstufe (in der Bakterienwachstum erkennbar war) ausplattiert.

Der MBC-Wert ist die Peptidkonzentration, bei der keine Kolonien auf dem Agar nachzuweisen sind.

Als Referenz diente Melittin, ein toxische Peptid der Honigbiene *Apis mellifera*. Alle Experimente wurden mindestens in drei unabhängigen Versuchen mit zweifachem Ansatz durchgeführt.

Wie in Tabelle 3.2 dargestellt, wurden die vier eingesetzten grampositiven Bakterienstämme *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* alle von rCulbicin in mikromolaren Konzentrationen beim sauren pH-Wert von pH 5,2 getötet; für *B. megaterium* reichte eine Konzentration von 25 Pikomol rCulbicin. Dies zeigt, dass rCulbicin eine antibakterielle Wirkung hat.

Bei den gramnegativen Bakterien ist das Ergebnis differenzierter. *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden ähnlich wie die Grampositiven in niedrigen mikromolekularen Konzentrationen in ihrem Wachstum inhibiert. *Klebsiella aerogenes* und *Escherichia coli* wurden mit den eingesetzten Peptidkonzentrationen nicht in ihrem Wachstum gehemmt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass rCulbicin in den eingesetzten Konzentrationen bei einem physiologischen pH-Wert von pH 7,4 keine antibakterielle Wirkung hat.

Zur Ermittlung der bakteriziden Peptidkonzentration (MBC) wurden die Bakterien nach Inkubation mit den Peptiden auf LB-Agarplatten ausplattiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Den Werten der Tabelle 3.2 kann man entnehmen, dass mit der wachstumshemmenden Wirkung von rCulbicin immer auch eine bakterizide Wirkung verbunden ist. Die MBC entspricht bis auf eine Ausnahme immer auch dem MIC-Wert.

Bakterienstamm	rCulbicin (μM)		Melittin (μM)	
	pH 5.2	pH 7.4	pH 5.2	pH 7.4
Gram-Positiv				
<i>Bacillus megaterium</i>	MIC: 0,025	> 5	0,03	0,06
	MBC: 0,025	> 5	0,03	0,06
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC: 5	> 10	0,03	0,03
	MBC: 5	> 10	0,03	0,03
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIC: 5	n.d.	0,25	n.d.
	MBC: 10		0,25	
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC: 5	n.d.	0,25	0,25
	MBC: 5		0,25	0,25
Gram-Negativ				
<i>Escherichia coli</i>	MIC: > 5	> 5	0,3	0,6
	MBC: > 5	> 5	0,3	0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC: 10	n.d.	1,5	n.d.
	MBC: 10		1,5	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC: 1,25	> 10	0,25	0,5
	MBC: 1,25	> 10	0,5	0,5
<i>Serratia marcescens</i>	MIC: 2,5	> 10	> 1	2,5
	MBC: 2,5	> 10	> 1	2,5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	MIC: > 10	> 10	1,25	0,6
	MBC: > 10	> 10	1,25	0,6

Tab. 3.2: MIC- und MBC-Werte von Culbicin

Aufgeführt sind die minimalen Peptidkonzentrationen (in μM) von rCulbicin und Melittin, bei denen eine bakterio-statische (MIC) bzw. bakterizide (MBC) Wirkung bei pH 5,2 bzw. pH 7,4 festgestellt wurde.

3.5.2 Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von rCulbicin

Die antibakterielle Wirkung von rCulbicin warf die Frage nach dem Wirkmechanismus auf. Aufgrund seiner amphipathischen Struktur lag der Verdacht nahe, dass Culbicin mit der Membran interagiert.

Um den Mechanismus der bakteriziden Wirkung von rCulbicin zu untersuchen, wurden Bakterien mit den Peptiden und dem nicht membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Sytox Green® koinkubiert (s. 2.12.2). Wenn Sytox Green® mit der Bakterien-DNA interkaliert, wird eine Fluoreszenz angeregt, die als indirekter Nachweis für die Permeabilisierung der Bakterienmembran dient.

Um einen 100 % Fluoreszenz-Wert zu erhalten, wurden Bakterien mit 70 % Ethanol behandelt.

Dieser Test wurde bei pH 5,2 durchgeführt, da mit Hilfe des Mikrosuszeptibilitätstest gezeigt werden konnte, dass rCulbicin bei pH 7,4 keine antibakterielle Wirkung zeigt.

rCulbicin permeabilisiert *Bacillus megaterium* bereits in Konzentrationen von 10 pM (Abb. 3.8). Bei einer rCulbicinkonzentration von 1nM sind 100 % der Bazillen getötet. Als Referenzpeptide wurden Magainin I (ursprüngl. aus *Xenopus laevis*-Haut isoliert) und Cecropin A (ursprüngl. aus der Seidenspinnermotte *Hyalophora cecropia*) eingesetzt.

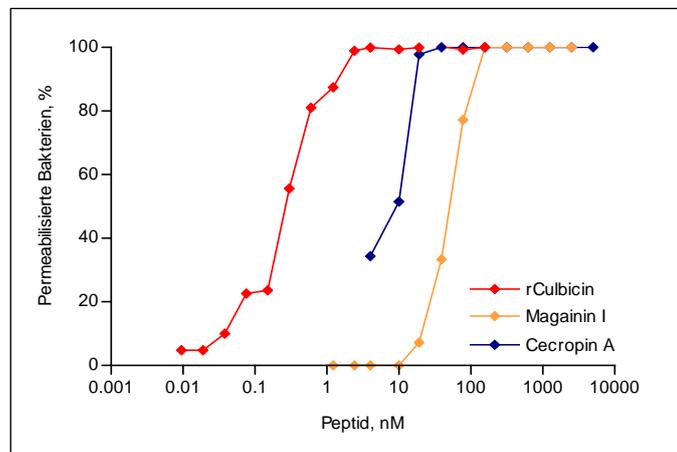


Abb. 3.8: Graphische Darstellung der Bakterienmembran permeabilisierenden Aktivität von Culbicin in Abhängigkeit zur Konzentration

Der rote Graph zeigt die membranpermeabilisierende Wirkung von rCulbicin (roter Graph) in verschiedenen Konzentrationen an *B. megaterium*. Als Referenzpeptide wurden Magainin I (gelber Graph) und Cecropin A (blauer Graph) verwendet. Eine rCulbicinkonzentration von 10 pM reicht aus, um die Bazillenmembranen zu permeabilisieren. Mit 1nM rCulbicin wurden 100 % der Bazillen getötet.

In Abbildung 3.9 ist der zeitliche Verlauf der Permeabilisierung einer Messung dargestellt. Die Zerstörung der *B. megaterium*-Membran findet bereits innerhalb der ersten 5 Minuten statt (3.9), in den folgenden zwei Stunden ist lediglich ein Anstieg der Anzahl von permeabilisierten Bazillen bei den steigenden Peptidkonzentrationen zu messen.

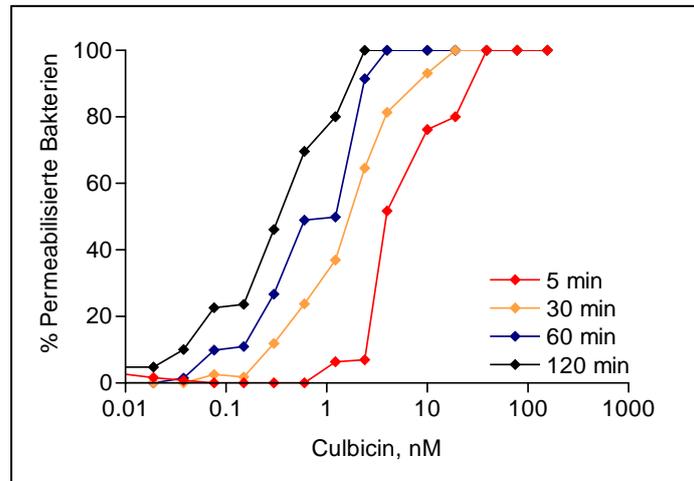


Abb. 3.9: Zeitabhängigkeit der membranpermeabilisierenden Aktivität von rCulbicin

Die Zerstörung der Bazillenmembran durch rCulbicin findet bereits innerhalb der ersten 5 Minuten statt, in den folgenden 2 Stunden ist lediglich ein Anstieg der Anzahl der permeabilisierten Bazillen zu messen.

3.5.3 Fungizide Wirkung von rCulbicin

Die fungizide Wirkung von rCulbicin wurde an dem *Candida albicans*-Stamm ATCC 10261 untersucht (2.12.3). Als Referenz wurde Melittin eingesetzt. Bei einer Konzentration von 10 μM verfügt Culbicin über eine fungizide Wirkung gegen *Candida albicans*. Zur Wachstumshemmung des Pilzes reichen bereits 2,5 μM Culbicin aus. Das entspricht derselben Konzentration, die auch von dem starken Bientoxin Melittin benötigt wird, um eine Wachstumshemmung zu bewirken.

Culbicin:	MIC: 2,5 μM
	MFC: 10 μM
Melittin:	MIC: 2,5 μM
	MFC: 2,5 μM

Tab. 3.3: MIC- und MFC-Werte (*minimal fungicidal concentration*) von rCulbicin

In der ersten Spalte ist das Peptid angegeben, rechts die minimale Peptidkonzentration, bei denen eine fungistate (MIC) bzw. fungizide (MFC) Wirkung eruiert wurde.

3.5.4 Nachweis der Porenbildung von rCulbicin an Liposomen

Im Liposomendepolarisationstest (s. 2.12.4) wies rCulbicin bei der Standardmessung (pH 5,2 und 25 °C) eine porenbildende Aktivität von 3,6 U/pmol auf (Abb. 3.10). Dies entspricht der spezifischen Aktivität des natürlichen Culbicins. Als Nachweis dafür, dass es sich um echte porenbildende Aktivität und nicht um eine undefinierte Zerstörung der Liposomenmembranen handelt, wurde ein Umkehrtest durchgeführt. Dabei wird erst die porenbildende Substanz zu den Liposomen gegeben und anschließend die Liposomenmembran durch Zugabe des Ionophors Valinomycin depolarisiert. Sinkt das Fluoreszenzsignal nach Zugabe von Valinomycin (d.h. der potentialsensitive Fluoreszenzfarbstoff (DISC₂)₅ dringt in die Membran ein), wird dies als Beweis für echte porenbildende Aktivität gewertet, weil ein Absinken des Fluoreszenzsignals nur möglich ist, wenn intakte Liposomen vorhanden sind (ohne Abbildung).

Bei der Untersuchung zur pH-Wertabhängigkeit der porenbildenden Aktivität wurde festgestellt, dass rCulbicin im pH-Wertbereich von pH 4,8 bis pH 5,4 aktiv ist (Abb. 3.11). Der niedrigste messbare pH-Wert, bei dem das System noch zuverlässige Daten liefert, liegt bei pH 4,8. Hier hat rCulbicin eine porenbildende Aktivität von 5,6 U/pmol. Die stärkste Aktivität mit 5,9 U/pmol weist rCulbicin bei pH 5,0 auf. Bei der Standardmessung bei pH 5,2 ist schon eine starke Abnahme der Aktivität zu verzeichnen (3,6 U/pmol) und ab pH 5,6 konnte keine porenbildende Aktivität mehr detegiert werden.

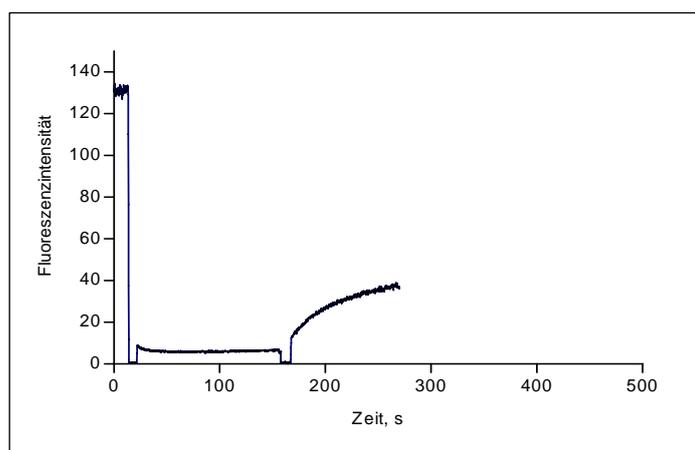


Abb.: 3.10: Darstellung der Liposomenpermeabilisierung durch Culbicin

1 pmol Culbicin in 0,1 % TFA weist eine porenbildende Aktivität von 3,6 Units/ pmol auf. An der y-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen, die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf der Messung in Sekunden wieder.

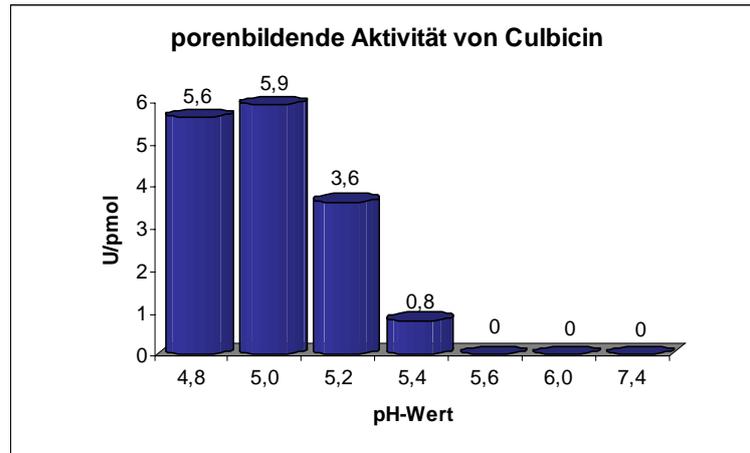


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der porenbildenden Aktivität von rCulbicin in Abhängigkeit des pH-Wertes

Auf der x-Achse ist der pH-Wert aufgetragen, auf der Y-Achse die porenbildende Aktivität von rCulbicin. Die höchste Aktivität erreicht rCulbicin bei pH 5,0 mit 5,9 Units pro Pikomol. Bei pH-Werten über pH 5,6 ist keine Aktivität mehr detegierbar.

3.5.5 Hämolytische Aktivität von rCulbicin

rCulbicin wurde bei verschiedenen Konzentrationen auf seine hämolytische Wirkung auf Human- und Schaf-Erythrocyten analysiert (s. 2.12.6). Die Hämolyse wurde durch Messung der Hämoglobin-Absorption im Überstand bestimmt. Als 100 % Lyse-Wert wurde der Überstand von Erythrocyten in doppelt destilliertem Wasser gemessen. Als Referenzpeptid wurde Melittin eingesetzt.

Bei einer Konzentration von 100 μM hat rCulbicin nach 120 min Inkubation ca. 50 % der humanen Erythrocyten (Blutgr. A, Rh +) lysiert (Abb. 3.12). Bei 50 μM rCulbicin liegt der Hämolysewert bei 7 %. Eine hämolytische Wirkung von Culbicin ist bis zu einer Konzentration von ca. 10 μM nachzuweisen. Melittin hingegen lysiert bei einer Konzentration von 10 μM 100 % der humanen roten Blutkörperchen.

Innerhalb von 120 min werden ca. 15 % der Schaf-Erythrocyten mit 100 μM rCulbicin lysiert (Abb. 3.13). Um einen hämolytischen Effekt nachzuweisen, werden mindestens 3 μM Culbicin benötigt. In derselben Zeit lysieren 10 μM Melittin 80 % der Schaf-Erythrocyten.

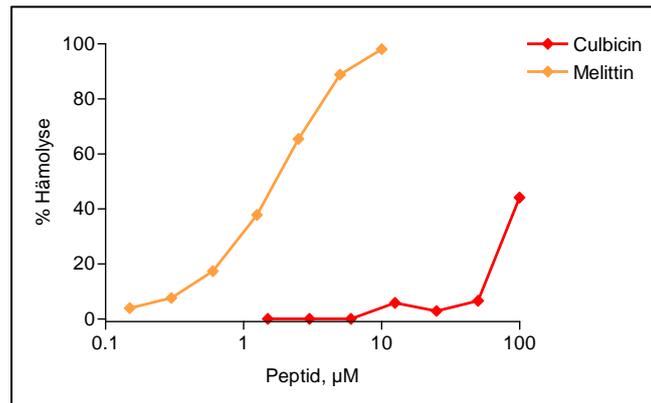


Abb. 3.12: Hämolytische Aktivität von rCulbacin auf humane Erythrocyten

Dargestellt ist die Hämolyse (in %) in Abhängigkeit zur Peptidkonzentration (logarithmische Darstellung der x-Achse). 100 μM rCulbacin (roter Graph) reichen zur Lyse von ca. 50 % der humanen Erythrocyten innerhalb von 120 min aus. Mindestens 10 μM rCulbacin werden benötigt, um einen hämolytischen Effekt nachzuweisen. 10 μM Melittin (gelber Graph) reichen aus, um in derselben Zeit 100 % der Erythrocyten zu lysieren.

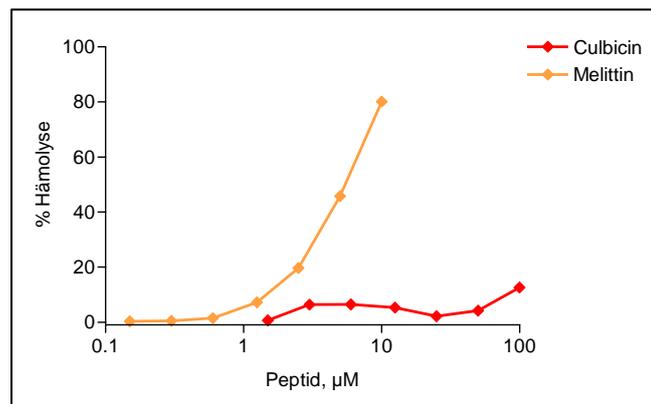


Abb. 3.13: Hämolytische Aktivität von rCulbacin auf Schaf-Erythrocyten

Dargestellt ist die Hämolyse (in %) in Abhängigkeit zur Peptidkonzentration (logarithmische Darstellung der x-Achse). Innerhalb von 120 min werden ca. 15 % der Schaf-Erythrocyten (b) mit 100 μM rCulbacin (roter Graph) lysiert. Um einen hämolytischen Effekt nachzuweisen werden mindestens 3 μM Culbacin benötigt. In derselben Zeit lysieren 10 μM Melittin (gelber Graph) 80 % der Schaf-Erythrocyten.

3.5.6 Cytotoxische Wirkung von rCulbacin

Die Cytotoxizität von rCulbacin wurde an zwei unterschiedlichen humanen Zelllinien untersucht (s. 2.12.5). Bei Jurkatzellen handelt es sich um humane T-Lymphocyten. Im Gegensatz zu den Jurkatzellen wachsen die humanen Glioblastomazellen 86HG39 in

Kulturflaschen adhärent. Sie wurden ausgewählt, da humane Nervenzellen bei der granulomatösen Amöbenencephalitis *in vivo* von den Acanthamöben zerstört werden.

Um 60 % der Jurkatzellen zu töten reichten 10 μM rCulbicin aus (Abb. 3.14). Mit derselben rCulbicinkonzentration wurden im Test gegen die Glioblastomazellen 5 % der Zellen getötet (Abb. 3.15). rCulbicin zeigt gegen beide Zelllinien cytotoxische Aktivität, wobei sich die Menge der getöteten Zielzellen bei gleicher Peptidkonzentration um 55 % unterscheidet.

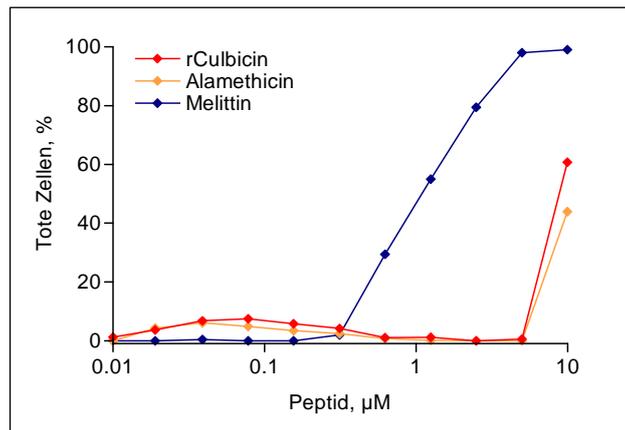


Abb.: 3.14: Cytotoxizität von rCulbicin gegen Jurkatzellen

Prozentual dargestellt sind die getöteten Zellen bei verschiedenen Peptidkonzentrationen. rCulbicin (roter Graph) hat bei der maximal eingesetzten Peptidkonzentration von 10 μM 60 % der Jurkatzellen abgetötet, Alamethicin (gelber Graph) mit ca. 45 % etwas weniger und Melittin (blauer Graph) 100 %. Bei einer eingesetzten Konzentration von 5 μM war keine Cytotoxizität von rCulbicin und Alamethicin nachweisbar.

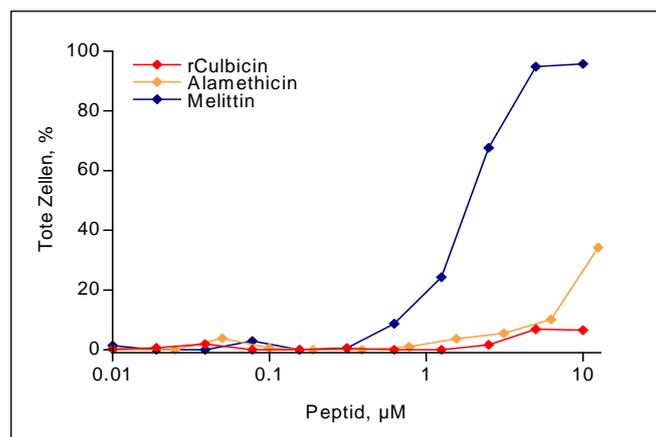


Abb. 3.15: Cytotoxizität von rCulbicin gegen 86HG39-Zellen

Prozentual dargestellt sind die getöteten Zellen bei verschiedenen Peptidkonzentrationen. rCulbicin (roter Graph) hat bei der maximal eingesetzten Peptidkonzentration von 10 μM 5 % der Glioblastomazellen abgetötet, Alamethicin (gelber Graph) tötete dabei ca. die Hälfte der Zellen und Melittin (blauer Graph) 100 %. Ab einer rCulbicinkonzentration von 2,5 μM war ein cytotoxischer Effekt auf die 86HG39-Zellen nachweisbar.

3.6 Lokalisation von natürlichem Culbicin in *A. culbertsoni*

3.6.1 Immunolokalisation

Um nachzuweisen, in welchen Kompartimenten der Amöbe Culbicin zu finden ist, wurden permeabilisierte und fixierte Trophozoiten erst mit dem Anti-Culbicin-Antiserum (aus Kaninchen) und anschließend mit einem Cy3-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert (s. 2.13). Visualisiert wurden sie mit einem Fluoreszenzmikroskop und fotografiert mit einer Digital-Kamera am Fluoreszenz-Mikroskop (Abb. 3.16 u. 3.17). Zur Kontrolle wurden Amöben mit Prä-Immuneserum des Kaninchens statt des Anti-Culbicin-Antikörpers inkubiert (Abb. 3.18). Zusätzlich wurden die Amöben mit dem Farbstoff Hoechst #33258 inkubiert, welcher mit Nukleinsäuren interkaliert und als Kernfärbung dient. Die Belichtungszeit betrug sowohl bei der Probe (Abb. 3.16) als auch bei der Kontrolle (Abb. 3.18) 450 Millisekunden.

Bei der Kontrolle in Abb. 3.18 ist im Cy3-Kanal (3.18a) kein Signal zu erkennen. Die mit Anti-Culbicin-Antikörper inkubierten *A. culbertsoni*-Trophozoiten in Abb. 3.16a) hingegen zeigen über die ganze Zelle verteilt signifikante Signale in Form kleiner punktförmiger Akkumulationen. Eine Amöbe zeigt zusätzlich eine große Anhäufung von Culbicin (Pfeil). Besonders gut lässt sich die Lokalisation von Culbicin bei der Aufnahme einer einzelnen Amöbe in Abb. 3.17 erkennen. Die ungleichmäßige Verteilung und Akkumulation auf kleinem Raum lässt auf eine Lokalisation von Culbicin in Vesikeln schließen

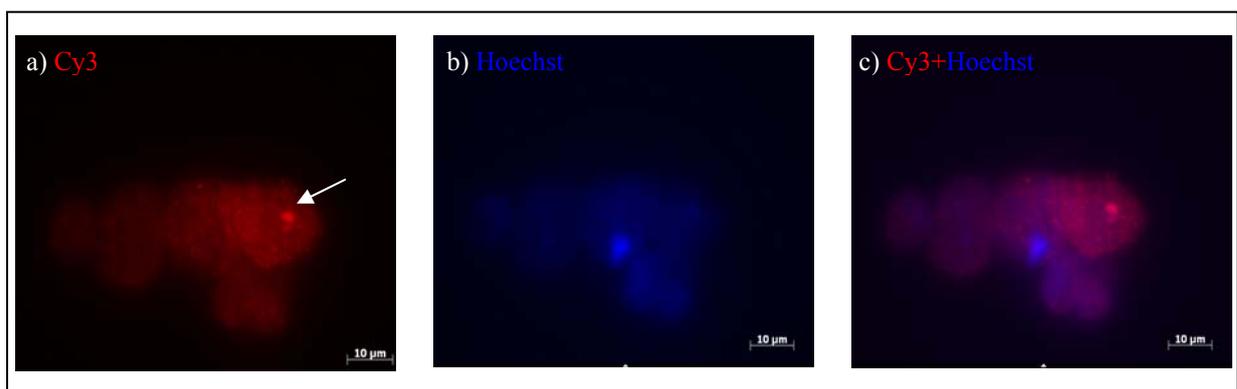


Abb. 3.16: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *A. culbertsoni*-Trophozoiten, die mit Anti-Culbicin inkubiert wurden

Abb. a) zeigt die Amöben im Cy3-Kanal. Über die gesamten Amöben verteilt wird Culbicin vom Antikörper (rot) erkannt. Der Pfeil kennzeichnet eine größere Akkumulation von markiertem Culbicin. In Abb. b) sind die Hoechst-gefärbten Zellkerne zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Kanäle ist in Abb. c) dargestellt. Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung.

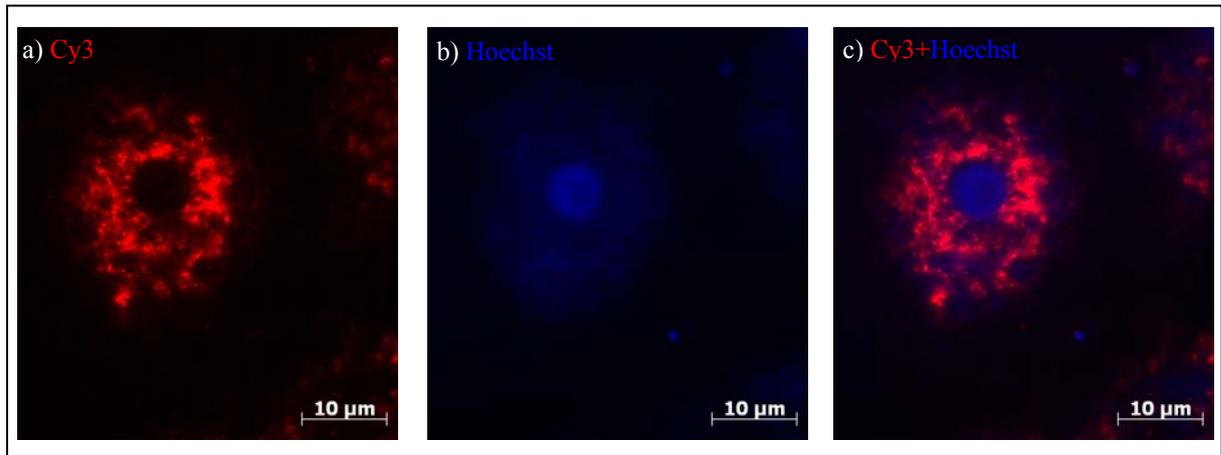


Abb. 3.17: Immunofluoreszenz-Aufnahmen einer einzelnen *A. culbertsoni*, die mit Anti-Culbicin inkubiert wurde

Bild a) zeigt die Amöbe im Cy3-Kanal. Netzwerkartig über die Amöbe verteilt wird Culbicin vom Antikörper (rot) erkannt. In Bild b) ist der Hoechst-gefärbte Zellkern zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Kanäle ist in Bild c) dargestellt. Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung.

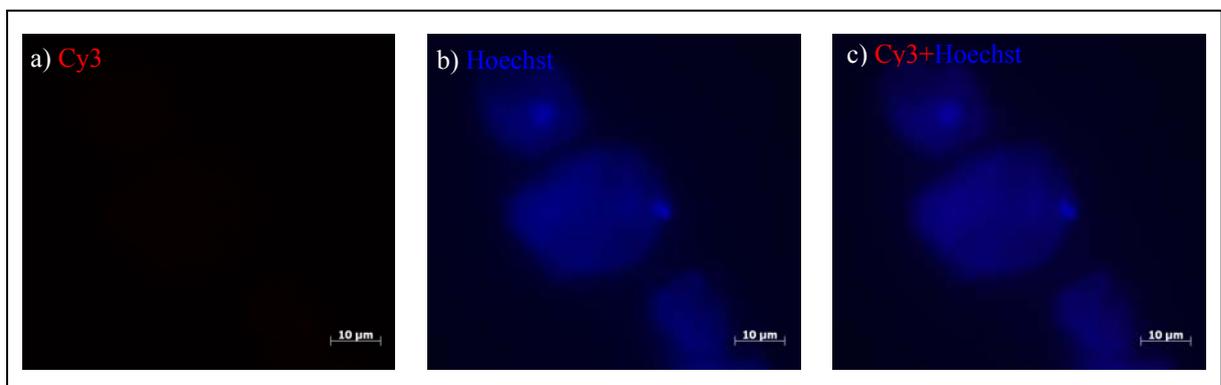


Abb. 3.18: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *A. culbertsoni*-Trophozoiten, die mit Präimmenserum inkubiert wurden

Bild a) zeigt den Cy3-Kanal, indem kein Signal zu erkennen ist. Im Hoechst-Kanal b) sind die blau angefärbten Zellkerne zu sehen und in c) sieht man eine Überlagerung beider Kanäle. Aufgenommen mit 100facher Vergrößerung.

3.7 Rekombinante Expression und Isolation von KURZ

KURZ wurde mit einem Histidinschwanz fusioniert rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) [pABlacI^Q] exprimiert. Das Fusionsprotein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 8,35 kDa und lag größtenteils in Inclusion bodies vor. Der Histidinschwanz konnte nicht mit Faktor Xa von KURZ abgetrennt werden.

3.8 Molekulare Identität und strukturelle Integrität von KURZ

3.8.1 Bestimmung der Molekularen Masse von KURZ

Ein Aliquot des rekombinanten KURZ (1mg/ml 0,01% TFA) wurde zur Untersuchung der Masse im Massenspektrometer untersucht (s. 2.12.1). Die theoretische Masse von KURZ (einschließlich Histidin-Anhang) wurde von MS-Product (s. 2.2) mit 8357,42 Dalton berechnet. Vorausgesetzt, alle zehn Cysteinreste sind in Disulfidbrücken involviert, läge die theoretische Masse von korrekt gefaltetem KURZ bei 8347,42 Dalton. Eine Abweichung bis zu +/- 3 Dalton wird toleriert. Abbildung 3.19 zeigt die Auswertung der Massenbestimmung von KURZ. Die Masse beträgt 8348,11, was im Rahmen der tolerierten Abweichung liegt. Bei dem gemessenen Protein handelt es sich um KURZ, dessen vorhandenen Cysteinreste vermutlich alle in Disulfidbrücken involviert sind.

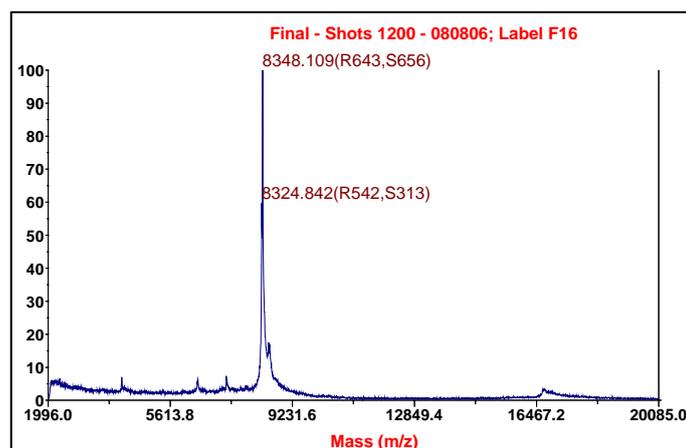


Abb. 3.19: Massenspektrum von KURZ in 0,01 % TFA

Auf der Abzisse ist die Masse pro Ladung aufgetragen, auf der Ordinate die Signalintensität in Prozent des Hauptsignals.

3.8.2 Nachweis von Disulfidbrücken von KURZ mit Monobromobimane

Um zu analysieren, ob alle Cysteinreste von KURZ in Disulfidbrücken involviert sind, wurde ein Aliquot des Peptids reduziert und mit Monobromobimane inkubiert (s. 2.15.5). Zwei weitere Aliquots des Peptids mit 5- (Spur 2) und 10facher Proteinmenge (Spur 3) wurden nicht reduziert und mit Monobromobimane inkubiert.

Die reduzierte Probe (Spur 1 in Abb. 3.20) wurde neben den zwei nicht-reduzierten Proben mit 5- (Spur 2) und 10facher Proteinmenge (Spur 3) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Wanderung im elektrischen Feld unter UV-Licht analysiert (Abb. 3.20a). Anschließend wurde das Gel der Silbernitratfärbung unterzogen (Abb. 3.20b). In Abbildung 3.20a zeigt die reduzierte KURZ-Probe eine deutlich fluoreszierende Bande (Spur 1), während die nicht reduzierten Proteine (Spur 2 und 3) nicht sichtbar sind. Das diffuse Signal ist ein Artefakt. In Abbildung 3.20b ist das Gel nach Silbernitratfärbung dargestellt, um die nicht fluoreszierenden Proteine sichtbar zu machen. Damit lässt sich feststellen, dass in KURZ keine freien Sulfhydrylgruppen vorliegen, d.h. die 10 Cysteine sind alle in Disulfidbrücken involviert.

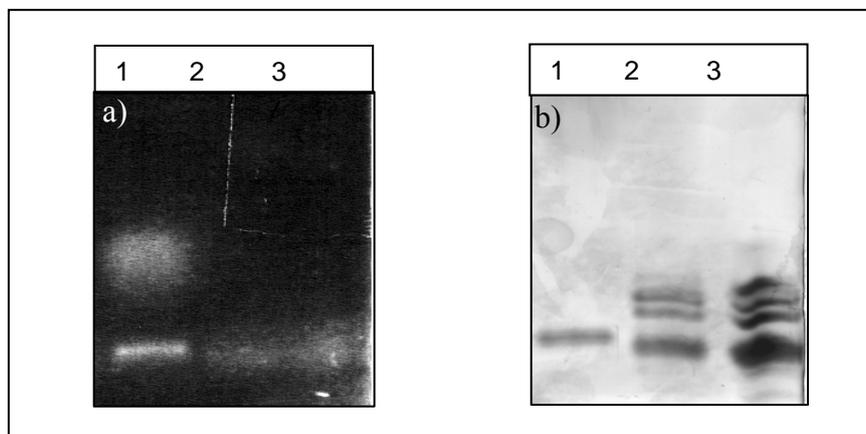


Abb. 3.20: Cysteinnachweis mit Monobromobimane und anschließende Silbernitratfärbung

a) zeigt die Monobromobimane-behandelten Proteine im SDS-Gel unter UV-Licht. b) ist eine Abbildung dieses Gels nach Silbernitratfärbung und dient als Nachweis der Proteinbanden. In Spur 1 befindet sich das reduzierte KURZ, welches mit Monobromobimane unter UV-Licht fluoresziert (Pfeil). In Spur 2 ist die 5fache Menge und in Spur 3 die 10fache Menge nicht reduziertes KURZ aufgetragen. Diese Proteine fluoreszieren nicht, weil sie keine freien SH-Gruppen haben. D. h. die 10 Cysteine von KURZ sind alle in Disulfidbrücken involviert. Zusätzlich tauchen in den Spuren 2 und 3 höhermolekulare Proteinbanden (Abb. b) auf, die auf Polymerisierung von Culbicinmolekülen schließen lässt.

3.8.3 Analyse der Sekundärstruktur von KURZ mittels CD-Spektroskopie

Bei KURZ handelt es sich um ein neues Protein, welches keinerlei Ähnlichkeit mit den bisher bekannten Proteinen der Datenbanken hat. Um einen Hinweis –abgesehen von der AS-Sequenz- auf die Sekundärstruktur zu bekommen, wurde KURZ im fernen UV-Bereich (180 – 250 nm) mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht (s. 2.11.2).

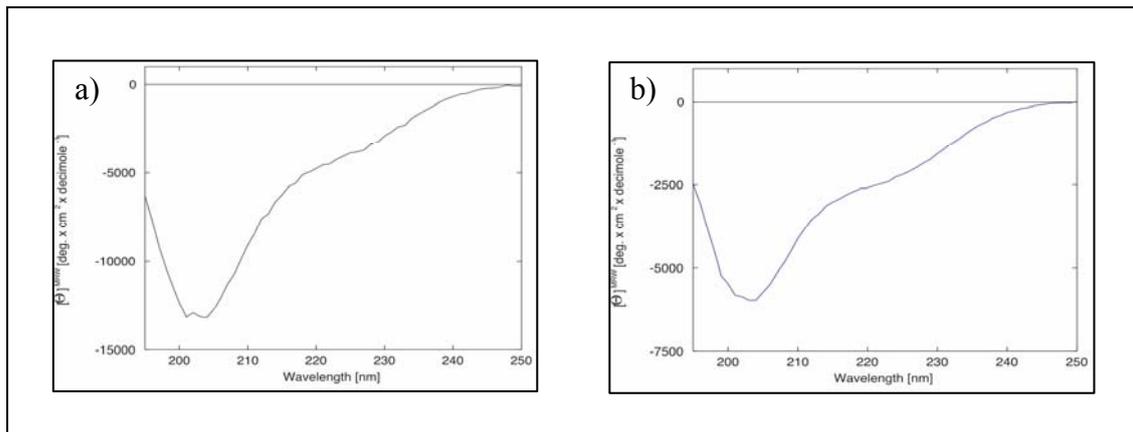


Abb. 3.21: CD-Spektrum von zwei unterschiedlichen Proben von KURZ

Die x-Achse zeigt die gemessene Wellenlänge (nm), die y-Achse die Intensität des gemessenen Signals. Das Spektrum in Abb. a) wurde von einer KURZ-Probe aufgenommen, die normale antibakterielle und antifungale Aktivität aufwies. Die Probe in b) hingegen war inaktiv. KURZ weist hauptsächlich β -Faltblattstrukturen auf

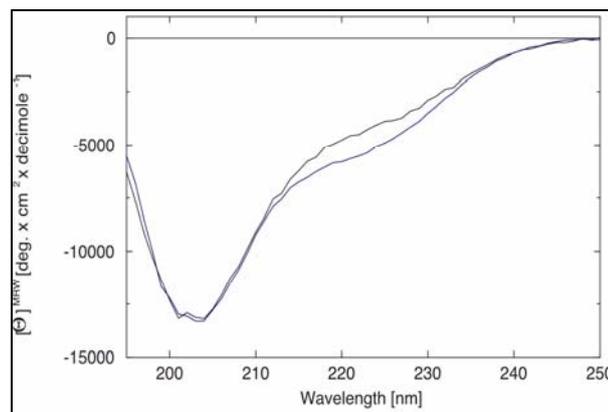


Abb. 3.22: Vergleich der CD-Spektren der beiden KURZ-Proben

Zu sehen ist eine Überlagerung der 2 Spektren von den 2 unterschiedlichen KURZ-Proben. Der blaue Graph weicht nur geringfügig vom Verlauf des schwarzen ab. Dieser Unterschied beeinflusst die Aktivität des Peptids.

Abb. 3.21 zeigt das CD-Spektrum von 2 unterschiedlichen KURZ-Proben. Das Spektrum in 3.21a wurde von einer KURZ-Probe aufgenommen, die antibakterielle und antifungale Aktivität aufwies. Die Sekundärstruktur des Peptids weist einen α -helikalen Anteil von 15 % und 26 % β -Faltblatt-Anteil auf, 23 % liegen als β -Schleife vor und 36 % konnte keinen Sekundärstrukturen zugeordnet werden [kalkuliert nach Provencher, 1982].

Die Probe in 3.20) hingegen war inaktiv. In Abbildung 3.22 sind beide Spektren übereinander gelegt, um den Unterschied zu verdeutlichen.

3.9 Funktionelle Charakterisierung von KURZ

3.9.1 Antimikrobielle Aktivität von KURZ

Die antimikrobielle Aktivität von KURZ auf verschiedene Bakterien wurde in einem Mikrosuszeptibilitätstest untersucht. Dabei wurde zunächst die kleinste wachstumshemmende Peptidkonzentration (MIC) ermittelt, indem 10^2 koloniebildende Einheiten (CFU) verschiedener Bakterienarten über Nacht (ÜN) mit KURZ in verschiedenen Verdünnungsstufen bei 37 °C inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung mit bloßem Auge, wobei die MIC jene Peptidkonzentration ist, in der kein Bakterienwachstum in Form eines Pellets zu erkennen war (s. 2.12.1). Zur anschließenden Bestimmung der MBC ("*minimal bactericidal concentration*") wurde ein Aliquot dieses ÜN-Ansatzes, der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe sowie der nächst höheren Verdünnungsstufe (in der Bakterienwachstum erkennbar war) ausplattiert.

Der MBC-Wert ist jene Peptidkonzentration, bei der keine Kolonien auf dem Agar nachgewiesen werden konnten.

Als Referenz diente Melittin, alle Experimente wurden mindestens in drei unabhängigen Versuchen mit zweifachem Ansatz durchgeführt.

Von den grampositiven Bakterien konnten die 2 Bazillenstämme *B. megaterium* und *B. subtilis* bei pH 5,2 in ihrem Wachstum gehemmt werden (Tab. 3.4). Die MIC und MBC entsprechen einander, d.h. für *B. megaterium* betragen die Werte 1,3 μ M und für *B. subtilis* 5 μ M. Die beiden Staphylococccenstämme *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* wurden in den eingesetzten Peptidkonzentrationen nicht von KURZ in ihrem Wachstum gehemmt.

Beim physiologischen pH 7,4 zeigt KURZ gegen einen getesteten Bakterienstamm, *E. coli* K12 D31, antibakterielle Wirkung in den eingesetzten Konzentrationen von 3,5 μ M bei

pH 5,2 und 6 μM bei pH 7,4. Da die anderen getesteten Stämme bei pH 7,4 nicht auf KURZ reagierten, wurden nicht alle Bakterien bei pH 7,4 getestet.

Bakterienstamm	KURZ (μM)		Melittin (μM)	
	pH 5.2	pH 7.4	pH 5.2	pH 7.4
Gram-Positiv				
<i>Bacillus megaterium</i>	MIC: 1,3 MBC: 1,3	n.d.	0,03 0,03	0,06 0,06
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC: 5 MBC: 5	> 10 > 10	0,03 0,03	0,03 0,03
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MIC: 10 MBC: > 10	n.d.	0,25 0,25	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC: 10 MBC: > 10	n.d.	0,25 0,25	0,25 0,25
Gram-Negativ				
<i>Escherichia coli</i>	MIC: 3,5 MBC: 3,5	6 6	0,3 0,3	0,6 0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	MIC: >10 MBC: >10	n.d.	1,5 1,5	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	MIC: 10 MBC: 10	n.d.	1 1	n.d.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC: > 10 MBC: >10	> 10 >10	0,25 0,5	0,5 0,5
<i>Serratia marcescens</i>	MIC: > 10 MBC: >10	n.d.	> 1 > 1	2,5 2,5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	MIC: > 10 MBC: >10	n.d.	1,25 1,25	0,6 0,6

Tab. 3.4: MIC- und MBC-Werte von KURZ

Aufgeführt sind die minimalen Peptidkonzentrationen (in μM) von KURZ und Melittin, bei denen eine bakterio-statische (MIC) bzw. bakterizide (MBC) Wirkung bei pH 5,2 bzw. pH 7,4 festgestellt wurde.

3.9.2 Fungizide Wirkung von KURZ

Die fungizide Wirkung von KURZ wurde am *Candida albicans*-Stamm ATCC 10261 untersucht. Als Referenz wurde Melittin eingesetzt. Tabelle 3.5 zeigt, dass 7 μM KURZ das Pilzwachstum hemmten und eine Peptidkonzentration von 20 μM fungizid war.

KURZ:	MIC 7 μM
	MFC 20 μM
Melittin:	MIC 2,5 μM
	MFC 2,5 μM

Tab. 3.5: MIC- und MFC-Werte (*minimal fungicidal concentration*) von KURZ

In der ersten Spalte ist das Peptid angegeben, rechts die minimale Peptidkonzentration, bei denen eine fungistate (MIC) bzw. fungizide (MFC) Wirkung eruiert wurde.

3.9.3 Nachweis der Porenbildung von KURZ an Liposomen

Die porenbildende Aktivität von KURZ gegen artifizielle Membranen wurde im Liposomendepolarisationstest bei pH 5,2 und pH 7,4 untersucht. Bei pH 5,2 erreichte KURZ zunächst eine porenbildende Aktivität von 1,4 U/nmol (Abb. 3.23). Dies konnte durch Zugabe von Calciumchlorid (finale Konzentration 1mM) auf 2,3 U /nmol gesteigert werden. Beim physiologischen pH 7,4 hingegen konnte keine porenbildende Aktivität von KURZ detegiert werden (Abb. 3.24).

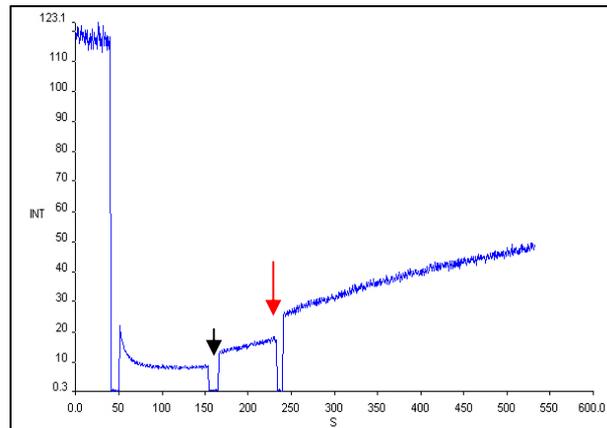


Abb. 3.23: Darstellung der Liposomendepolarisation durch KURZ bei pH 5,2

Die x-Achse gibt die Zeit (in s) an, die y-Achse stellt die Fluoreszenzintensität dar. Zu Beginn befindet sich der Fluoreszenz-Farbstoff außerhalb der Liposomen (maximale Fluoreszenz), durch Zugabe von Valinomycin nach ca. 50 s sinkt die Fluoreszenz auf ein Minimum (0 %). Der schwarze Pfeil markiert die Zugabe des Peptids, die einen Anstieg der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der CaCl_2 -Zugabe. Dies hat eine Steigerung der porenbildenden Aktivität zur Folge.

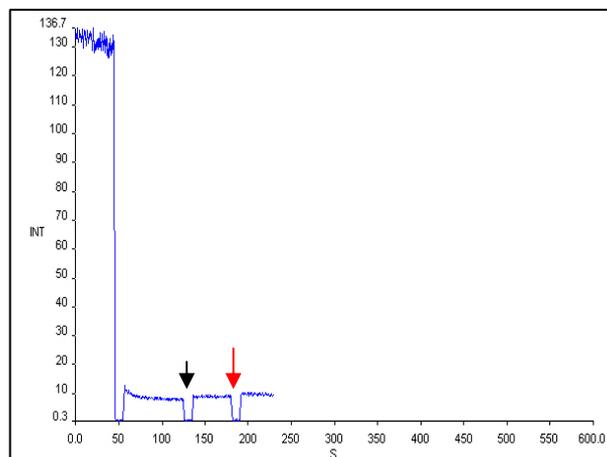


Abb. 3.24: Darstellung der Liposomendepolarisation durch KURZ bei pH 7,4

Die x-Achse gibt die Zeit (s) an, die y-Achse stellt die Fluoreszenzintensität dar. Zu Beginn befindet sich der Fluoreszenz-Farbstoff außerhalb der Liposomen (maximale Fluoreszenz), durch Zugabe von Valinomycin nach ca. 50 s sinkt die Fluoreszenz auf ein Minimum (0 %). Der schwarze Pfeil markiert die Zugabe des Peptids, die keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der CaCl_2 -Zugabe, was auch keine porenbildende Aktivität hervorruft.

3.9.4 Hämolytische Aktivität von KURZ

Die Peptide wurden bei verschiedenen Konzentrationen auf ihre hämolytische Wirkung auf humane und ovine Erythrocyten analysiert (s. 2.13.7). Die hämolytische Aktivität wurde durch photometrische Messung der Hämoglobin-Absorption im Überstand bestimmt. Zur Festlegung des 100 % Lyse-Wertes wurde der Überstand von Erythrocyten in doppelt destilliertem Wasser gemessen. Als Referenzpeptid wurde Melittin eingesetzt. Mit 30 μM KURZ wurden ca. 25 % der humanen Erythrocyten lysiert (Abb. 3.25). Der hämolytische Effekt ist auch noch bei ca. 15 μM zu erkennen. Die Schaf-Erythrocyten (Abb. 3.26) zeigten sich weniger empfindlich gegenüber einer Lyse durch KURZ und Melittin. Mit einer Konzentration von 30 μM erreicht KURZ eine Hämolyse von ca. 5 % der Zellen, auch das Referenzpeptid konnte lediglich 80 % der Erythrocyten zerstören.

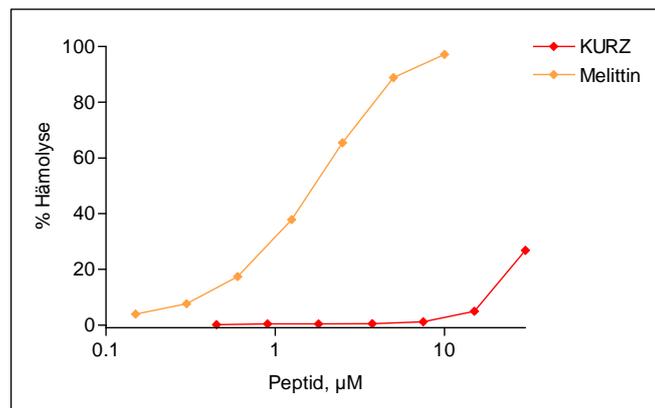


Abb. 3.25: Hämolytische Aktivität von KURZ auf Human-Erythrocyten

Prozentual dargestellt ist die Hämolyse in Abhängigkeit zur Peptidkonzentration. 30 μM KURZ (roter Graph) reichen zur Lyse von ca. 25 % der humanen Erythrocyten innerhalb von 120 min aus. Mindestens 10 μM KURZ werden benötigt, um einen hämolytischen Effekt nachzuweisen. 10 μM Melittin (gelber Graph) hingegen reichen aus, um in derselben Zeit nahezu 100 % der Erythrocyten zu lysieren.

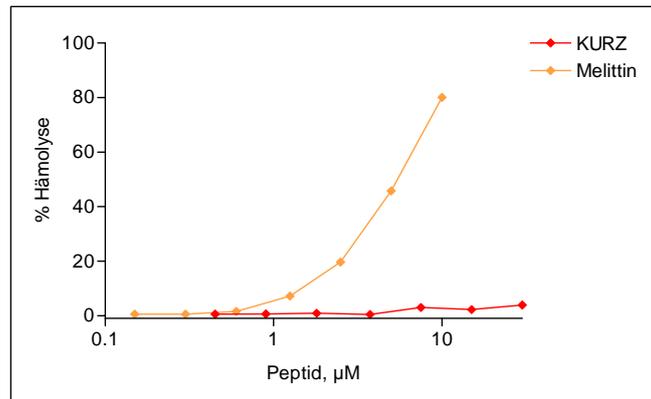


Abb. 3.26: Hämolytische Aktivität von KURZ auf Schaf-Erythrocyten

Prozentual dargestellt ist die Hämolysse in Abhängigkeit zur Peptidkonzentration. 30 µM KURZ (roter Graph) reichen zur Lyse von ca. 5 % der Schaf-Erythrocyten innerhalb von 120 min aus. 10 µM Melittin (gelber Graph) reichen aus, um in derselben Zeit mehr als 80 % der Schaf-Erythrocyten zu lysieren.

3.10 Lokalisation von natürlichem KURZ

3.10.1 Immunolokalisation

Mit Hilfe von Antikörpern sollte untersucht werden, ob eine natürliche Form des KURZ und gegebenenfalls auch des Precursors in Acanthamoeben vorkommt und in welchen Kompartimenten sie zu finden sind. Außerdem sollte gegebenenfalls eine Kolo­kalisierung mit Culbicin nachgewiesen werden. Vom Präimmunserum beider Kaninchen wurden Strukturen in den *A. culbertsoni*-Trophozoiten erkannt, so dass das rote Fluoreszenzsignal in Abb. 3.27 nicht spezifisch durch den Anti-KURZ-Antikörper hervorgerufen wurde. Es konnten keine Fluoreszenzunterschiede zwischen Kontrolle (Abb. 3.28) und Experiment festgestellt werden.

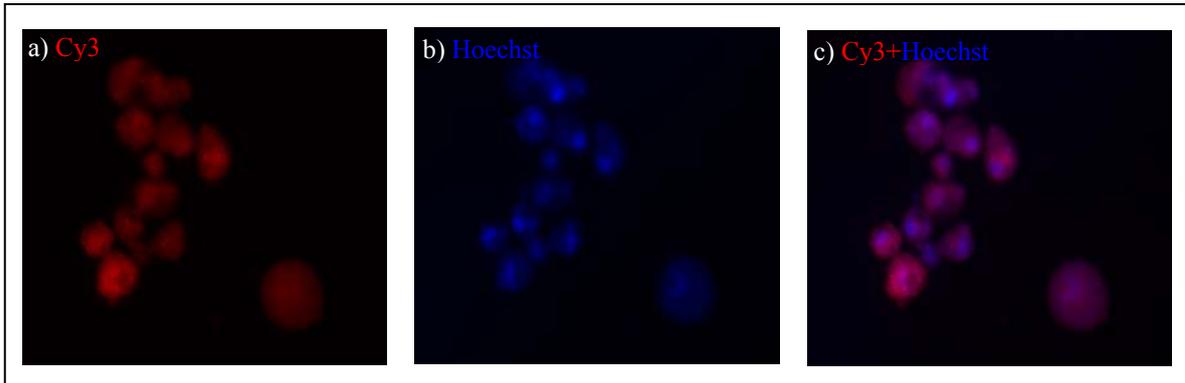


Abb. 3.27: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *A. culbertsoni*-Trophozoiten, die mit Anti-KURZ-Antikörper inkubiert wurden

Abb. a) zeigt die Amöben im Cy3-Kanal. Über die gesamten Amöben verteilt werden Strukturen vom Antikörper (rot) erkannt. In Abb. b) sind die Hoechst-gefärbten Zellkerne zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Kanäle ist in Abb. c) dargestellt. Aufgenommen mit 40facher Vergrößerung.

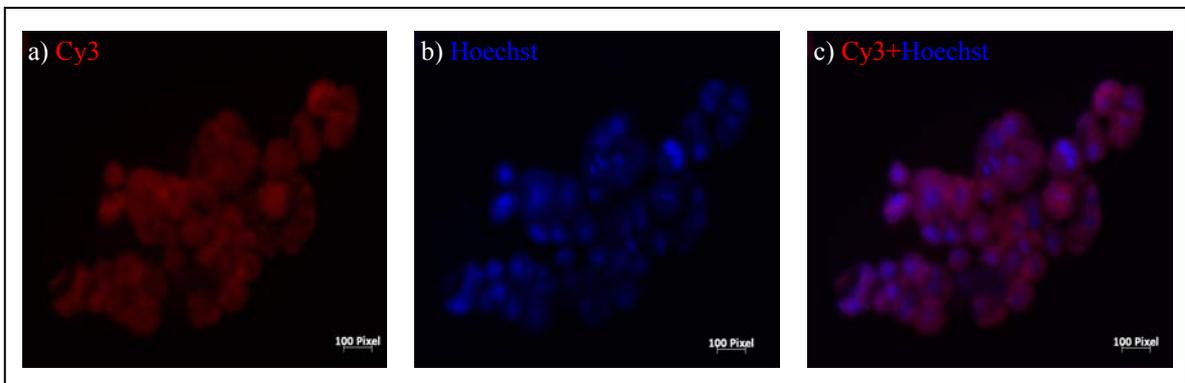


Abb. 3.28: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *A. culbertsoni*-Trophozoiten, die mit Präimmenserum inkubiert wurden

Abb. a) zeigt die Amöben im Cy3-Kanal. Über die gesamten Amöben verteilt werden Strukturen vom Präimmenserum (rot) erkannt. In Abb. b) sind die Hoechst-gefärbten Zellkerne zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Kanäle ist in Abb. c) dargestellt. Aufgenommen mit 40facher Vergrößerung.

3.11 Nachweis und Isolierung von natürlichem Peptiden

3.11.1 Westernblotting mit *A. culbertsoni*-Fraktionen

Mit Hilfe der Antikörper Anti-Culbicin und Anti-KURZ wurden saure *A. culbertsoni*-Extrakte auf das Vorhandensein des Proteins KURZ und des gesamten Precursors untersucht. Dazu wurde der Amöbenextrakt über eine SepPak fraktioniert (s. 2.14.1), indem stufenweise mit ansteigender Acetonitrilkonzentration eluiert wurde. Die entstandenen Fraktionen wurden anschließend mittels Westernblot mit den spezifischen Antikörpern Anti-Culbicin und Anti-KURZ untersucht (Abb. 3.29). Dabei wurde Culbicin vom Anti-Culbicin-Antikörper erkannt (Abb. 3.29, Bande bei ca. 6 kDa der 50%-Fraktion), nicht jedoch vom Anti-KURZ-Antikörper. Der Anti-KURZ-Antikörper hat statt einer distinkten Bande bei ca. 6,5 kDa ein diffuses Antigen erkannt, das von ca. 7-17 kDa reicht. Dieses starke Signal erwies sich als reproduzierbar. Beide Antikörper haben 4 Proteinbanden in der 50 %-Fraktion erkannt, die zwischen ~ 30 und 40 kDa liegen. Da die Antikörper das jeweils andere Antigen nicht erkennen, könnte es sich dabei um den Precursor handeln. Der Precursor hat eine theoretische Masse von 14,1 kDa. Da im N-terminalen Bereich von KURZ eine potentielle N-Glykosylierungsstelle ist (NSTD, Aminosäurereste 54-57), lässt sich über den tatsächlichen Lauf im Gel keine Aussage treffen.

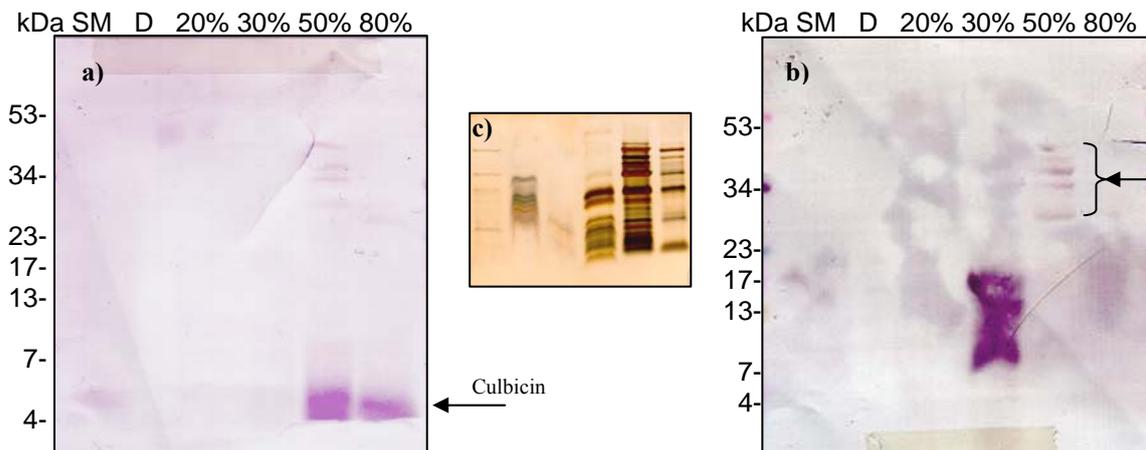


Abb. 3.29: Westernblot von *A. culbertsoni*-Fraktionen

a) der Blot wurde mit Anti-Culbicin-Antikörper inkubiert, b) mit Anti-KURZ-Antikörper. c) zeigt ein entsprechendes silbergefärbtes Gel. Culbicin (~ 6 kDa; Pfeil) wurde über 2 Fraktionen mit 50 % und 80 % Acetonitril eluiert. Ein schwaches Signal ist auch im Startmaterial (SM) zu erkennen. Zwischen ca. 30 und 40 kDa (Klammer, Pfeil) sieht man in den Spuren der 50% und 80% beider Blots Banden. Im Anti-KURZ-Blot zeigt sich reproduzierbar ein starkes Signal in der 30 %-Fraktion im Bereich von ca. 7-17 kDa. (D= Durchfluss. Die Fraktionen sind mit der Acetonitrilkonzentration des Puffers, mit der sie eluiert wurden, bezeichnet.)

3.11.2 Nachweis von Cysteinresten mittels Monobromobimane

Da die Proteinbanden zwischen 30 und 40 kDa (Abb. 3.29), welche von den spezifischen Antikörpern anti-Culbicin und anti-KURZ im Westernblot erkannt wurden, nicht eindeutig dem gesamten Precursor (KURZ-linker-Culbicin, s. Abb. 3.4) zuzuordnen sind, wurde als weiteres Mittel zur Identifikation des Precursors der Nachweis von Cysteinresten mit Monobromobimane (s. 2.15.5) angewandt. Da der Precursor insgesamt 20 Cysteinreste enthält, sollte auch eine dezente Proteinbande ein klares Fluoreszenzsignal zeigen. In Abbildung 3.30a ist bei 6 kDa ein starkes Fluoreszenzsignal zu erkennen, welches Culbicin zuzuordnen ist. Die Proteinbanden zwischen 30 und 40 kDa in der 50 %-Fraktion, die in den Westernblots (Abb. 3.29) von den Antikörpern erkannt wurden, zeigen auch im Cystein-Nachweisverfahren mit Monobromobimane starke Fluoreszenzsignale (Abb. 3.30a). Dies ist ein Indiz dafür, dass diese Proteinbanden mit dem Culbicin-Precursor bzw. Culbicin und KURZ korrelieren. Das diffuse Signal der 30 %-Fraktion, welches in Abbildung 3.29b zu sehen ist, zeigt mit Monobromobimane kein spezifisches Signal. Das Gel aus Abbildung 3.30a wurde anschließend mit Silbernitrat gefärbt (Abb. 3.30b).

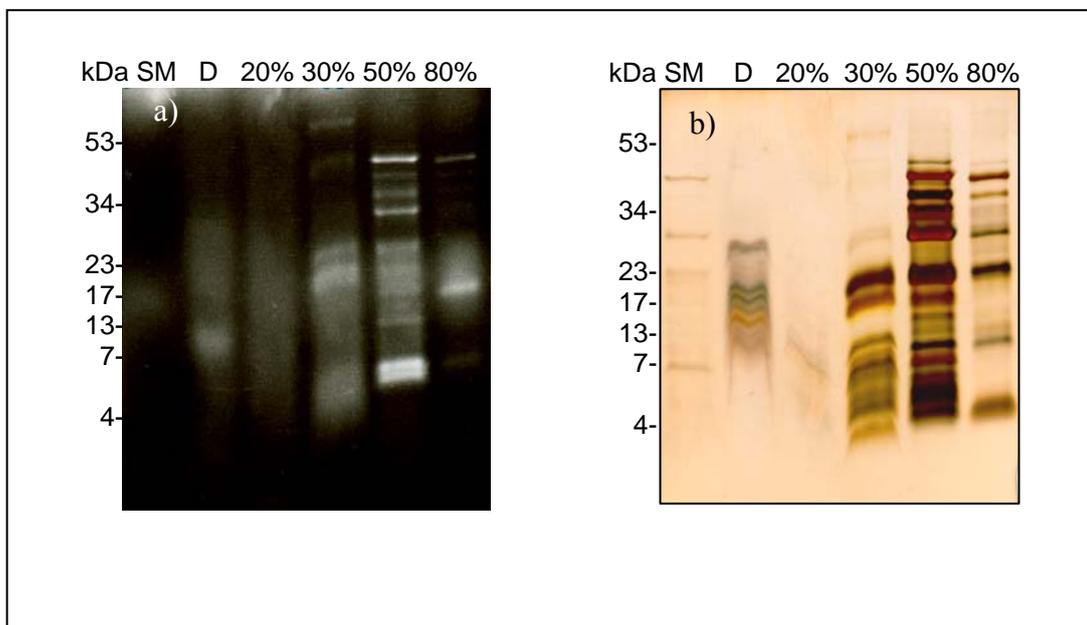


Abb. 3.30: Nachweis des Precursors mit Monobromobimane

a): In der 50 % Fraktion ist bei 6 kDa Culbicin durch ein starkes Fluoreszenzsignal zu erkennen (Pfeil). Zwischen 30 und 40 kDa der 50 %-Fraktion sind 4 Banden zu erkennen, welche mit denen im Westernblot (Abb. 3.28) korrelieren. b) zeigt das Gel nach Silbernitratfärbung. (SM= Starmaterial, D= Durchfluss. Die Fraktionen sind mit der Acetonitrilkonzentration, mit der sie eluiert wurden, bezeichnet.)

3.11.3 Proteinidentifizierung mit MALDI TOF /TOF

Die entsprechenden Proteinbanden wurden aus einem Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel (s. 2.15.3) ausgestanzt und präpariert (s. 2.11.1). Die gemessenen Massen korrelierten nicht mit den theoretischen Massen der Peptide, welche durch Trypsinisierung des Precursors entstehen. Daher konnte der Precursor nicht eindeutig identifiziert werden.

3.12 Lokalisation vom Culbicin- und KURZ-Homolog in *A. castellanii*

Da in der Literatur über die Pathogenität der Acanthamoeba *A. castellanii* in den Vordergrund gerückt ist, war es von Interesse, diese Art ebenfalls auf das Vorhandensein eines porenbildenden Amöbentoxins zu untersuchen.

3.12.1 Immunlokalisation eines Culbicin-Homologs in *A. castellanii*

Um ein Culbicin-Homolog in *A. castellanii* zu lokalisieren, wurde mit diesen Trophozoiten wie mit den *A. culbertsoni* verfahren. Tatsächlich hat der Anti-Culbicin-Antikörper eine Struktur in den Amöben erkannt (Abb. 3.31). Dies kann als spezifische Markierung anerkannt werden, da die Kontrolle mit dem Präimmunserum keine Fluoreszenz zeigt (Abb. 3.32). Die Verteilung in den *A. castellanii*-Trophozoiten sieht etwas anders aus als in *A. culbertsoni*. Die Cy3-Färbung ist in jeder Zelle vorhanden, wenn auch unterschiedlich stark. Man kann anhand der Signale deutlich eine Lokalisation in Vesikeln ausmachen.

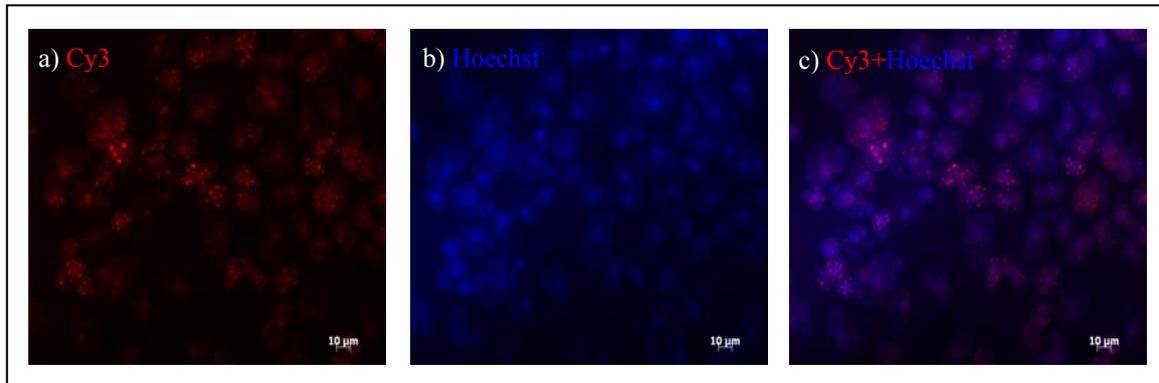


Abb. 3.31: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *A.castellanii*-Trophozoiten, die mit Anti-Culbicin-Antikörper inkubiert wurden

Abb. a) zeigt die Amöben im Cy3-Kanal. Über die gesamten Amöben verteilt wird das Culbicin-Homolog vom Antikörper (rot) erkannt. In Abb. b) sind die Hoechst-gefärbten Zellkerne zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Kanäle ist in Abb. c) dargestellt. Aufgenommen mit 40facher Vergrößerung.

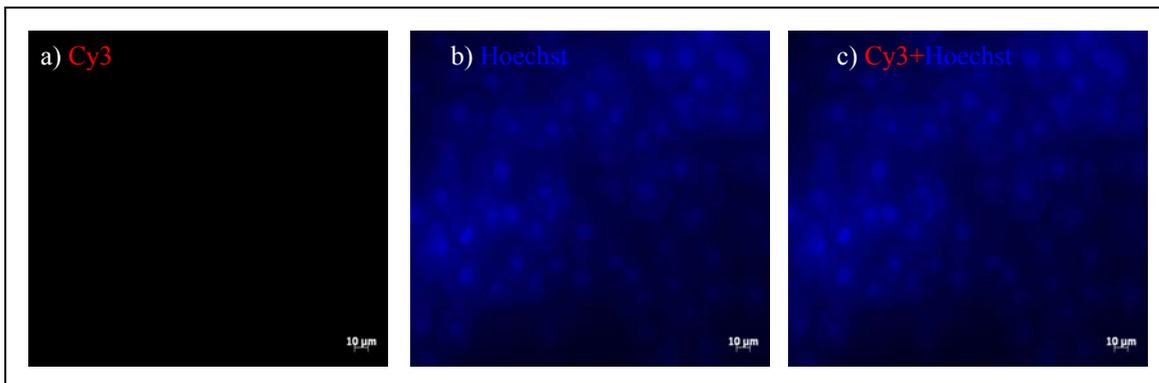


Abb. 3.32: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von *A. castellanii*-Trophozoiten, welche mit Präimmunserum inkubiert wurden

Abb. a) zeigt die Amöben im Cy3-Kanal. In Abb. b) sind die Hoechst-gefärbten Zellkerne zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Kanäle ist in Abb. c) dargestellt. Aufgenommen mit 40facher Vergrößerung.

3.12.2 Reinigung von natürlichem Castellanicin

A. castellanii-Trophozoiten wurden in 10 % Essigsäure aufgeschlossen und die gelösten Proteine mittels hydrophober Interaktionschromatographie (SepPak) fraktioniert (s. 2.14.1). Aliquots der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE ihrer molekularen Größe nach getrennt und mit Silbernitrat angefärbt (s. 2.16.2) bzw. in einem Westernblot (s. 2.16.3) mit Anti-Culbicin-Antikörper analysiert. In Abb. 3.33 sind der Westernblot (b) und das entsprechende silbergefärbte Gel (a) dargestellt. Die Mehrheit der Proteine wurde zwischen 40 und 80 % Acetonitril von der Säule eluiert. Im Westernblot ist eine Protein-Doppelbande bei ca. 6 kDa vom Antikörper erkannt worden. Dabei handelt es sich um das Culbicin-Ortholog, welches in dieser Arbeit "Castellanicin" genannt wird.

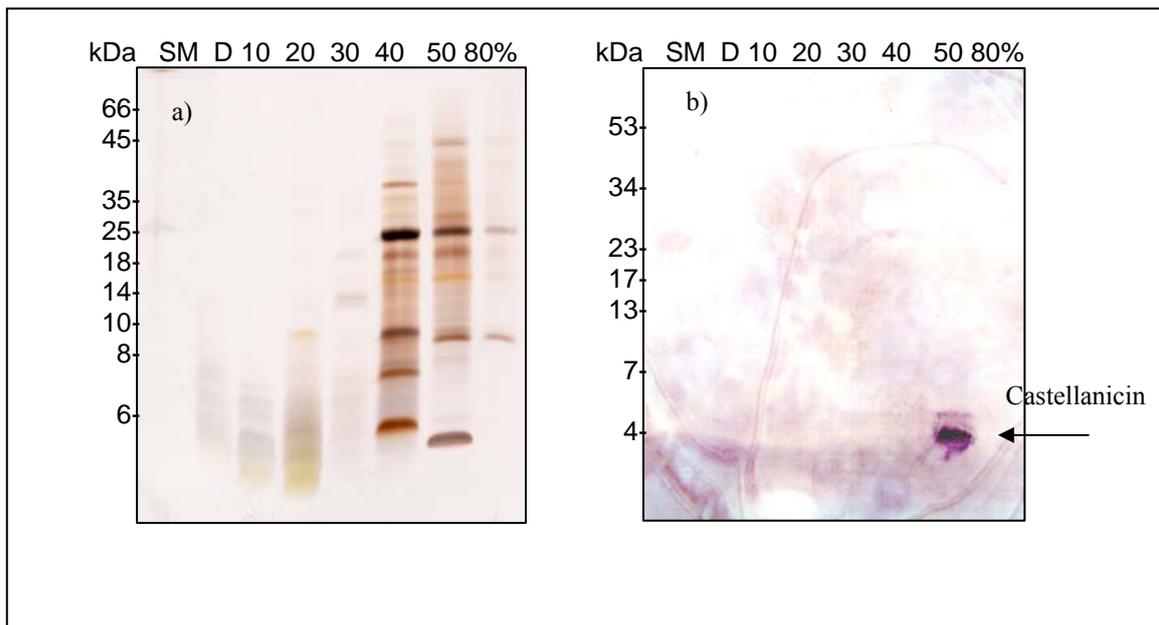


Abb. 3.33: Westernblot von SepPak-Fractionen von *A. castellanii*-Extrakt

a) zeigt *A. castellanii*-Proteine, die mit 10, 20, 30, 40, 50 und 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA von einer SepPak eluiert wurden, mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt und anschließend mit Silbernitrat gefärbt wurden. b) zeigt den entsprechenden Westernblot, der erst mit Anti-Culbicin-Antikörper und anschließend mit Anti-Kaninchen-AK (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) inkubiert wurde. Nach Inkubation mit NBT/BCIP wurde eine Doppelbande bei ca. 6 kDa sichtbar (Pfeil). Dabei handelt es sich um das Culbicin-Ortholog Castellanicin.

3.12.3 Castellanicin in online-cDNA-Banken

Im Januar 2004 wurden erstmalig 7.500 Genomsequenzen von *Acanthamoeba castellanii* veröffentlicht (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>). Durch Homologiesuche (tBLASTn-Search, s. 2.2) mit der Culbicin-Precursor-Sequenz einschließlich des Signalpeptids wurde ein Treffer erzielt (cDNA-Klon *edca172*). Nach Translation und Trimmen der Klonsequenz sind zwischen den beiden Sequenzen beim lokalen Alignment 69 % der Aminosäuren identisch, 75 % weisen eine Ähnlichkeit auf.

Später wurden Daten eines EST-Projekts (*expressed sequence tags*) im Internet veröffentlicht ([http://amoebidia.bcm.umontreal.ca/public/pepdb/est.](http://amoebidia.bcm.umontreal.ca/public/pepdb/est/)), bei denen ebenfalls durch Homologiesuche eine Sequenz (cDNA-Klon *ace14121*) entdeckt wurde, die große Ähnlichkeit zum Culbicin-Precursor zeigt. Bei der Culbicin-Precursor-Sequenz und dem translatierten cDNA-Klon *ace14121* sind 62 % der Aminosäuren identisch und 73 % der Aminosäuren weisen eine Ähnlichkeit auf.

Im Bereich der Culbicinsequenz sind die beiden translatierten cDNAs *edca172* und *ace14121* zu 100 % identisch. Mit der Culbicinsequenz besteht eine 83 %ige Identität und 93 %ige Ähnlichkeit.

Der Treffer einer "exprimierten Sequenz" (EST) ist ein zusätzlicher Beweis, dass es sich bei der Proteinbande im Westernblot (Abb. 3.33b) um das Culbicin-Ortholog handelt. Ein Alignment der Culbicin-Precursor-Sequenz und der beiden homologen translatierten *A. castellanii*-Sequenzen ist in Abbildung 3.34 dargestellt.

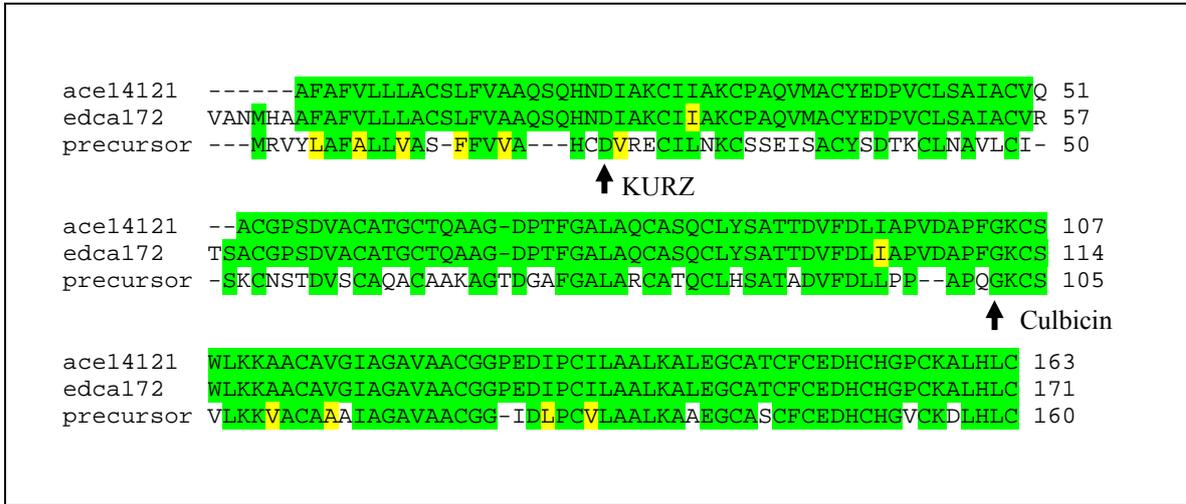


Abb. 3.34: Alignment der Culbicin-Precursor-Sequenz mit Sequenzen von *A. castellanii*

Die Culbicin-Precursor-Sequenz steht in der untersten Zeile ("precursor"), darüber ist die homologe translatierte cDNA von tigr.org ("edca172") und in der ersten Zeile die homologe translatierte cDNA aus der EST-Datenbank ("ace14121"). Mit einem Pfeil ist jeweils die erste Aminosäure von KURZ und Culbicin markiert. Identische Aminosäuren sind grün und ähnliche Aminosäuren gelb hinterlegt.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten funktionelle Eigenschaften des porenbildenden Peptids Culbicin aus *Acanthamoeba culbertsoni* untersucht und die Lokalisation des Peptids in der Zelle gezeigt werden.

Im Laufe der Arbeit wurde festgestellt, dass Culbicin in einem Vorläufermolekül organisiert ist. Die mRNA kodiert am 5'-Ende der Culbicinsequenz ein theoretisches Peptid mit zehn Cysteinresten. Dieses erhielt den Arbeitstitel KURZ und wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit auf seine funktionellen und strukturellen Eigenschaften untersucht. *Acanthamoeba castellanii* ist eine besser erforschte Spezies als *A. culbertsoni*, daher wurde in dieser Art nach einem Culbicin-Ortholog geforscht. Antimikrobielle Peptide, zu denen Culbicin und KURZ zählen, sind in jedem Organismus zu finden, wo sie als Teil des angeborenen Immunsystems der ersten Abwehr von Krankheitserregern dienen.

4.1 cDNA von Culbicin

Zu Beginn der Arbeit wurde die mRNA des Culbicins isoliert. Die Sequenzanalyse des erhaltenen cDNA-Klons zeigte eine Abweichung von der bisher bekannten Sequenz im 3. Codon. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt an der dritten Position ein Cystein statt des Glycins in der alten Version. Damit sind in der Primärstruktur von Culbicin insgesamt 10 Cysteine vorhanden.

Der Fehler beruhte auf einem "wobble"-Oligonukleotid, das eingesetzt wurde, da die mRNA-Sequenz noch unbekannt war. Da die Codon-usage der Acanthamöben nicht aufgeklärt war, war die Anzahl der möglichen Nukleotidkombinationen enorm groß. Um eine überschaubare Anzahl von PCR-Ansätzen zu erhalten, lässt man Oligonukleotidchargen herstellen, in denen die Oligonukleotide verschiedene Nukleotide an ein oder mehreren Positionen beinhalten.

Außerdem wurde die 5'-Region über die bekannte Sequenz hinaus ermittelt. So wurde stromaufwärts das Startcodon des Culbicingens identifiziert. Zwischen Startcodon und Culbicin codierender Sequenz befinden sich 101 weitere Triplets.

4.2 Sequenzanalyse der cDNA und abgeleiteten Aminosäuresequenz

Culbicin ist ein völlig neuartiges Peptid, welches keine signifikante Ähnlichkeit zu den vorhandenen Proteinen der Datenbanken aufweist. Die gesamte cDNA-Sequenz, vom Startcodon bis zum 3'-Ende des Culbicins, wurde einer BLAST-Sequenzanalyse unterzogen, ebenso die Culbicinsequenz ohne die KURZ-Sequenz und die translatierten Aminosäuresequenzen. Dabei wurde keinerlei Ähnlichkeit zu den vorhandenen Proteinen der NCBI-Datenbank festgestellt.

Die ersten 20 Aminosäuren der in dieser Arbeit ermittelten Sequenz wurden als Signalpeptid identifiziert. Das Vorhandensein eines Signalpeptids lässt auf eine extracytosolische Lokalisation schließen. Dies könnte auf eine Funktion des Culbicins in der Phagozytose oder Lyse der phagozytierten Bakterien hindeuten, da es vermutlich in den Lysosomen oder Phagosomen lokalisiert ist. Das porenbildende Peptid Amoebapore A von *Entamoeba histolytica* wird ebenfalls mit einem aminoterminalen Signalpeptid synthetisiert und ist in cytosolischen Granula lokalisiert [Leippe *et al.*, 1994]. Zudem konnte in diesen Kompartimenten eine Kolo-kalisation mit phagozytierten Bakterien nachgewiesen werden [Andrä *et al.*, 2003]. Auch die Naegleriapores, porenbildende Peptide des freilebenden humanpathogenen Amöboflagellats *Naegleria fowleri*, besitzen Signalpeptide und wurden in Granula detegiert, wo sie wahrscheinlich mit Proteinen wie den Lysozymen, Phospholipasen und Proteasen kolo-kalisiert sind [Herbst *et al.*, 2002].

Des Weiteren würde das reduzierende Milieu des Cytosols eine Ausbildung von Disulfidbrücken erschweren. Der sehr hohe Anteil an Cysteinresten an der gesamten Aminosäuresequenz, zehn von 59 Aminosäureresten, und ihre Lokalisation innerhalb der Culbicinsequenz lassen vermuten, dass wenigstens einige dieser Cysteine in Disulfidbrücken involviert sind und deuten ebenfalls darauf hin, dass das Peptid dementsprechend in einem Zellkompartiment lokalisiert ist, welches mit einem oxidativen Milieu die Bildung von Disulfidbrücken ermöglicht.

Zwischen der Signalpeptidsequenz und der Culbicinsequenz der mRNA wurde eine Sequenz von 81 Triplets entdeckt, von denen vermutlich 64 Triplets für ein weiteres neuartiges Peptid codieren, welches KURZ genannt wurde. Es wird vermutet, dass die Peptide Culbicin und KURZ über eine kurze, cysteinfreie Sequenz von 17 Aminosäuren ("Linker") verbunden sind, bevor sie posttranslational getrennt werden.

Auch die cDNA-Sequenzen und translatierte Aminosäuresequenzen von KURZ und dem Linker wurden einer BLAST-Analyse unterzogen und zeigten ebenfalls keine signifikanten Ähnlichkeiten zu vorhandenen Proteinen der Datenbank.

In der abgeleiteten Aminosäuresequenz von KURZ sind zehn Cysteine vorhanden, wie es auch innerhalb der Culbicinsequenz der Fall ist. Eine vergleichende Sequenzanalyse von Culbicin und KURZ legt keine Homologien zwischen den beiden Sequenzen offen und auch das Cysteinmuster von KURZ stimmt nicht mit dem von Culbicin überein. Gemeinsam ist den beiden Sequenzen jedoch die interne Ausgeglichenheit der positiven und negativen Aminosäurereste. Auch die Länge der Aminosäuresequenzen ist mit 59 bzw. 64 Aminosäureresten ähnlich. In dieser Arbeit wurde mit KURZ ein zweites Peptid identifiziert, dessen Primärstruktur absolut neuartig ist und welches eine beispiellose Tertiärstruktur aufweisen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird postuliert, dass Culbicin und KURZ in einem Vorläufermolekül ("Precursor") organisiert sind, da nahezu alle antimikrobiellen Peptide von Mehrzellern von Vorläufermolekülen mit Signalsequenzen abgeleitet werden [Zasloff, 2002]. Auch wurde die Form der Organisation in einem Precursor bereits für andere Amöbentoxine, den Naegleriapores aus *Naegleria fowleri*, beschrieben [Herbst *et al.*, 2002]. Die Naegleriapores sind in zwei Multipeptidvorläufermolekülen organisiert und können einzeln synthetisiert und als Effektormoleküle bereitgestellt werden [Herbst *et al.*, 2004]. Es wird postuliert, dass es sich dabei um eine effiziente Methode zur Bereitstellung von Peptiden in größerer Menge und Vielfalt handelt [Boman, 2000]. Das könnte dann auch für Culbicin und KURZ gelten.

4.3 Rekombinante Expression und Isolierung von Culbicin

Acanthamoeba culbertsoni synthetisiert nur geringe Mengen Culbicin, so dass eine Reinigung des natürlichen Peptids für die geplanten Untersuchungen zu Funktion und Struktur von Culbicin nicht ausreicht. Aufgrund dessen wurde ein Expressionssystem zur heterologen rekombinanten Expression von Culbicin gesucht. In einen GFP-Expressionsvektor sollte das Culbicingen mit "blunt ends" ligiert werden und nur die transformierten *E. coli*-Bakterien, die einen Vektor mit dem Gen beinhaltenen, aufgrund des Konstruktes mit einem grün fluoreszierenden Protein unter UV-Licht fluoreszieren

(Diplomarbeit der Verfasserin). Bemerkenswerter Weise war bei allen untersuchten fluoreszierenden Klonen das Culbicingen entgegen dem Leserahmen in den Vektor ligiert, obwohl die statistische Wahrscheinlichkeit für die Insertion in Richtung des Leserahmens bei 50 % liegt. Dies wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass die Bakterien, in denen das Gen in 5'-3'-Richtung vorlag, nicht überlebt haben oder einen Mechanismus gefunden haben, die Expression zu umgehen oder die fremde DNA entfernt haben.

Mehrere Vektoren wurden gewählt, die mitsamt dem Culbicingen mit einer Vielzahl von Bakterien kombiniert wurden, aber nicht zu einer Expression von Culbicin führten. Ähnliche Fälle, bei denen die Expression toxischer Proteine ohne erkennbaren Einfluss auf die Vitabilität der Bakterien misslang, sind bereits in der Literatur beschrieben [Giovane *et al.*, 1997]. Dies führte zu der Annahme, dass Culbicin antibakteriell wirkt.

Um die Tertiärstruktur mittels NMR aufklären zu können, sollte N¹⁵-markiertes Minimalmedium eingesetzt werden. Dazu ist die Expression in Bakterien notwendig, da höhere Organismen wie z.B. *Dictyostelium discoideum* und *Saccharomyces cerevisiae*, die als eukaryontische Expressionssysteme Verwendung finden, komplexe Medien benötigen, welche bereits Stickstoffquellen enthalten.

Die rekombinante Expression von Culbicin als Fusionsprotein gelang in *E. coli* C43 (DE3) pET32-Cul. Während der Expression kam es zur Bakterienlyse, weshalb die Expressionsdauer auf 40 Minuten reduziert wurde und die Vermutung der antibakteriellen Aktivität untermauert wurde.

Das Fusionsprotein Thioredoxin-Culbicin lag größtenteils in "Inclusion bodies" vor. Diese unlöslichen Aggregate entstehen während der Überexpression eines Proteins, wenn mehr Protein synthetisiert wird als korrekt gefaltet werden kann. Die inkorrekt gefalteten Zwischenprodukte reagieren miteinander und aggregieren [Mitraki & King, 1989]. Besonders Proteine, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, neigen im reduzierenden Milieu der Bakterienzelle zur Bildung von Inclusion bodies.

Inclusion bodies haben den Vorteil, dass das Zielprotein zu ca. 90 % homogen vorliegt. Die Rückfaltung und Reinigung führte mit dem gewählten Protokoll zur völligen Homogenität des rekombinanten Culbicins (rCulbicin), was auf die große Stabilität des Peptids unter harschen Bedingungen zurückzuführen ist. Die Ausbeute von reinem rCulbicin war mit circa 300 µg/L relativ niedrig.

4.4 Untersuchungen zur molekularen Identität und strukturellen Integrität von rCulbicin

Für Culbicin wurde eine theoretische Masse von 5994,3 Dalton berechnet und die mittels MALDI-TOF MS erhaltene Masse beträgt 5985,13 Dalton. Diese Abweichung von etwa 10 Dalton lässt sich erklären, wenn alle zehn Cysteine in Disulfidbrücken involviert sind. Mit der Cysteinmarkierung mittels Monobromobimane konnte gezeigt werden, dass keine freien Sulfhydrylgruppen in rCulbicin vorhanden sind, womit der indirekte Nachweis erbracht wurde, dass alle zehn Cysteinreste von rCulbicin in Disulfidbrücken involviert sind. Die fünf Disulfidbrücken stabilisieren die Tertiärstruktur von rCulbicin insbesondere unter harschen Bedingungen wie Hitze und niedrigem pH-Wert. Welche Cysteine miteinander verbunden sind, konnte nicht festgestellt werden. Dies sollte mit Trypsin-verdaulichem Culbicin im Massenspektrometer mit *peptide mass finger print* analysiert werden, führte aber bisher noch zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Mithilfe der CD-Spektroskopie wurde rCulbicin als vorwiegend α -helikales Peptid (30 %) identifiziert. Stellt man einen Culbicinabschnitt, dessen Aminosäurereste wahrscheinlich in eine α -Helix involviert sind, als solche dar ("Helical wheel projection"), so wird der amphipathische Charakter von Culbicin verdeutlicht. Während eine Seite der α -Helix rein hydrophob ist, finden sich auf der gegenüberliegenden Seite kationische Aminosäurereste. In einer Datenbank für eukaryontische antimikrobielle Peptide [<http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm>] sind von 895 eingetragenen Peptiden 297 α -helikal und 380 Peptide sind durch Disulfidbrücken stabilisiert. Antimikrobielle Peptide von Eukaryonten werden aufgrund ihrer Primär- und Sekundärstruktur in 4 Gruppen unterteilt: die größte Gruppe bilden lineare α -helikale Peptide ohne Disulfidbrücken, zu dieser Gruppe zählen die Cecropine des Seidenspinners *Hyalophora cecropia* und die Maganine des Krallenfrosches *Xenopus laevis* [Zasloff, 1987]. Eine weitere Gruppe bilden Peptide, die sich wie PR-39 durch eine Überrepräsentation von ein oder zwei Aminosäuren (z. B. Prolin, Arginin oder Tryptophan) abzeichnen. Des Weiteren unterscheidet man Peptide mit einer Disulfidbrücke und solche mit zwei oder mehr Disulfidbrücken, die β -Faltblattstrukturen ausbilden, wie z. B. die α - und β -Defensine [Ganz *et al.*, 1985, Greenwald & Ganz, 1987, Jenssen *et al.*, 2006]. In diese Klassifizierung lässt sich Culbicin nicht einordnen, da es α -helikal, aber nicht linear ist und fünf Disulfidbrücken ausbildet.

Die Amoebapores und Naegleriapores entsprechen ebenfalls nicht den Kriterien dieser Einteilung, sie gehören zu der Familie der SAPLIPs (**S**apoin-**l**ike **P**roteins). Die SAPLIPs haben strukturell ein Cysteinmuster aus 6 Cysteinen gemeinsam, die drei Disulfidbrücken bilden und alle SAPLIPs interagieren mit Membranen, letzteres auf unterschiedliche Weise [Munford *et al.*, 1995]. Die Amoebapores, Naegleriapores, NK-Lysin und Granulysin weisen alle antimikrobielle Aktivität auf, welche auf Membranpermeabilisierung beruht [Bruhn, 2005]. Die Tertiärstruktur von NK-Lysin und Amoebapore A wurde mit Hilfe der NMR aufgeklärt und besteht aus 5 α -Helices.

Aufgrund der Tatsache, dass Culbicin nicht dieses Cysteinmuster aufweist, wird es aller Voraussicht nach nicht zu den SAPLIPs gehören. Für Culbicin wird von Sekundärstrukturanalyse-Programmen wie PsiPred und PHD die Ausbildung von 2-3 α -Helices vorausgesagt.

4.5 Funktionsanalysen von Culbicin

4.5.1 Antibakterielle Wirkung von rCulbicin

Culbicin weist eine bakterizide Wirkung auf eine Anzahl getesteter Bakterien auf und ist in den Acanthamöben in Vesikeln lokalisiert. Von Leippe wurde postuliert, dass porenbildende Peptide den Amöben dazu dienen, phagozytierte Bakterien zu töten [Leippe, 1997]. Daher ist anzunehmen, dass Culbicin in den Acanthamöben ein wichtiger Faktor in der Bakterienlyse ist.

Hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung konnte eine Präferenz zu Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden. Dies wurde auch für die Amöbentoxine Naegleriapores und Amoebapore A beschrieben [Herbst *et al.*, 2004, Andrä *et al.*, 2003, Bruhn *et al.*, 2003] und basiert vermutlich auf der zusätzlichen Barriere, die Gram-negative Bakterien mit ihrer äußeren Membran aus LPS den Peptiden entgegensetzen, deren Zielstruktur die Cytoplasmamembran ist [Leippe *et al.*, 1994].

Unter den getesteten Bakterien waren virulente und avirulente Stämme vertreten. Die potentiell humanpathogenen Stämme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* und *Serratia marcescens* konnten wie die apathogenen Stämme *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* mit niedrigen

mikromolaren rCulbicinkonzentrationen getötet werden. Der avirulente *E. coli*-Stamm K12 D31, der einen Defekt im LPS aufweist [Boman, 1974], konnte hingegen nicht getötet werden, ebenso wenig *Klebsiella aerogenes*, ein Stamm mit Pathogenitätspotential, der im Labor als Nahrung für die Amöbe *Dictyostelium discoideum* dient. Culbicin zeigt damit keinen Unterschied in der letalen Wirkung zwischen virulenten und avirulenten Bakterienstämmen. In den Acanthamöben können einige Bakterien die Tötung umgehen und die Amöbe stattdessen als Schutz gegen lebensfeindliche Bedingungen und als Transportvehikel benutzen [Rowbotham, 1983, Barker & Brown, 1994, Miltner & Bermudez, 2000]. Wenn es sich nicht um Endosymbionten handelt, weisen solche intrazellulären Bakterien meist ein humanpathogenes Potential auf, wie es z. B. bei *Chlamydia spp.* [Amann *et al.*, 1997, Birtles *et al.*, 1997], *Mycobacterium avium* [Steinert *et al.*, 1998], *Listeria monocytogenes* [Ly & Muller, 1990], *Vibrio cholerae* [Thom *et al.*, 1992], *Burkholderia spp.* [Marolda *et al.*, 1999], pathogenen *E. coli* [Barker *et al.*, 1999] und *Pseudomonas aeruginosa* [Michel *et al.*, 1995, Wang & Ahearn, 1997] der Fall ist.

Die Tatsache, dass *Ps. aeruginosa* im Mikrosuszeptibilitätstest mit rCulbicin getötet werden konnte, lässt vermuten, dass die Pseudomonaden in der Amöbe wahrscheinlich nicht in Kontakt mit Culbicin kommen oder die in den Acanthamöben vorliegenden Culbicinkonzentrationen nicht ausreichen, um *Ps. aeruginosa* zu töten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der hier getestete *Ps. aeruginosa*-Stamm sich in seiner Suszeptibilität von den intrazellulären Stämmen unterscheidet.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die bakterizide Wirkung von Culbicin auf der Membranpermeabilisierung beruht. Antimikrobielle Peptide können die Bakterien nicht nur durch Membranpermeabilisierung töten, sondern auch durch eine Inhibition des Stoffwechsels im Zellinnern [Brodgen, 2005].

Bei neutralem pH-Wert von 7,4 konnte keine antibakterielle Wirkung von rCulbicin festgestellt werden. Dies lässt darauf hindeuten, dass die drei Histidinreste von Culbicin für dessen Aktivität von Bedeutung sind, da sie bei neutralem pH-Wert ungeladen sind, im Sauren jedoch positiv geladen sind. Bei kationischen antibakteriellen Peptiden ist die Ladung ein wichtiger Faktor bei der Membraninteraktion [Weiss *et al.*, 1983, Oren & Shai, 1998]. Auch für histidinreiche synthetische Peptide und das natürliche Hebraein wurde säureabhängige Aktivität beschrieben [Mason *et al.*, 2006, Kichler *et al.*, 2003, Lai *et al.*, 2004, Kacprzyk *et al.*, 2007], so dass diese Möglichkeit für Culbicin wahrscheinlich ist.

4.5.2 Fungizide Wirkung von rCulbicin

An dem Stamm *Candida albicans* ATCC 10261 wurde die fungizide Wirkung von rCulbicin untersucht. Hier wurde ein avirulenter Stamm des Pilzes getestet, Varianten des Pilzes sind aber weit verbreitete Humanpathogene. Dabei erwies rCulbicin sich als ähnlich potent wie das starke membranolytische Gift der Biene Melittin, welches als Kontrolle eingesetzt wurde [Dempsey, 1990].

Eukaryontische Membranen unterscheiden sich von prokaryontischen grundsätzlich in ihrer Lipidzusammensetzung, so synthetisieren Bakterien z. B. kein Cholesterol und präferieren Phospholipide mit negativ geladenen Kopfgruppen in ihrer Außenmembran, während man bei Eukaryonten in der Außenmembran meist Lipide ohne Nettoladung findet. Gram-negative Bakterien präsentieren zudem Lipopolysaccharide (LPS) an ihrer äußeren Membran, welche die Bindungsaffinität kationischer Peptide noch erhöhen und die Synthese einiger Peptide und anderer Faktoren des Immunsystems induzieren kann [Lehrer & Ganz, 1999].

Fungizide Wirkung von den Naegleriapores wurde bisher nicht untersucht und von den Amöbapores ist bekannt, dass sie nicht fungizid wirken [Andrä & Leippe, 1999]. Synthetische Peptide hingegen, die einen Abschnitt von Amöbapore A repräsentieren und NK-2, ein kurzes synthetisches Peptid, welches von NK-Lysin abgeleitet wurde, weisen ähnliche wachstumshemmende und letale Wirkungen bei *C. albicans* ATCC 10261 auf [Andrä & Leippe, 1999]. Auch natürliche Peptide, wie die Cecropine A und B des Seidenspinners *Hyalophora cecropia* und Magainin 2 des Krallenfrosches *Xenopus laevis* weisen neben ihrer antibakteriellen Aktivität auch eine fungizide Wirkung auf [Helmerhorst *et al.*, 1999, Andrä *et al.*, 2001]. Bei den genannten Peptiden handelt es sich um kurze, 20-30 Aminosäurereste umfassende lineare α -helikale Peptide mit kationischer Nettoladung [Steiner, 1982, Zasloff, 1987]. Die HNP-Defensine 1 und 2 hingegen weisen eine β -Faltblattstruktur auf und sind ebenfalls fungizid, was zeigt, dass die Membranpermeabilisierung eukaryontischer Membranen nicht von der α -helikalen Peptidstruktur abhängig ist.

4.5.3 Porenbildende Aktivität von Culbicin

Der Liposomendepolarisationstest nach Loew *et al.* ist ein etabliertes System, um den Wirkmechanismus der Membranlyse zu untersuchen [Loew, *et al.*, 1983].

Dabei wurde die membranolytische Wirkung des Peptids an multilamellaren Phosphatidylcholin-Liposomen mit einem potentialsensitiven Farbstoff im Lumineszenzspektrometer untersucht. Anhand des Umkehrtests wurde festgestellt, dass Culbicin nicht wie ein Detergenz die artifiziellen Membranen zerstört, sondern Poren in den Membranen bildet, durch welche Kalium-Ionen wandern können. Mit diesem Test wurde sowohl die porenbildende Aktivität des natürlichen Culbicins als auch des rekombinanten rCulbicins untersucht und beide erwiesen sich als identisch. Des Weiteren wurde mit diesem System die pH-Wert abhängige Aktivität eruiert. Culbicin bildet nur in einem sehr engen pH-Bereich von pH 4,8-5,4 Poren. Kationische Aminosäurereste sind wichtige Faktoren für viele membranolytische Peptide [Weiss *et al.*, 1983]. Aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen kationischer Aminosäurereste mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der äußeren Bakterienmembran, und denen zwischen den hydrophoben Bereichen im Peptid und der Membran, ist eine Membranbindung nahezu unumgänglich, wenn kationische amphipathische Peptide mit Bakterienmembranen in Kontakt kommen [Dathe & Wieprecht, 1999, Hancock & Rozek, 2002].

Für die membranpermeabilisierende Aktivität antimikrobieller Peptide wurden verschiedene Mechanismen beschrieben [Oren & Shai, 1998]: der "carpet"-Mechanismus, bei dem die Peptide an die äußere Oberfläche der Membran binden und ab einer bestimmten Konzentration mit ihren hydrophoben Bereichen in die Membran reichen. Die Peptidintegration führt zu Spannungen und die Membran wird zerstört. Bei dem so genannten "barrel-stave"-Mechanismus oligomerisieren die Peptide und kleiden die Pore wie die Dauben eines Fasses aus. Zu diesen porenbildenden Peptiden gehören die Amoebapores und Alamethicin aus *Trichoderma viride* [Andrä *et al.*, 2002, Herbst *et al.*, 2002, Leippe & Müller-Eberhard, 1994, Bechinger, 1997]. Ein weiteres Modell ist die "toroidale Pore", die sich in der Formation vom "barrel-stave"-Modell unterscheidet. Welches Modell auf Culbicin projiziert werden kann, ist noch unklar.

4.5.4 Hämolytische Wirkung von rCulbicin

Im Hämolysetest mit humanen Erythrocyten und Schaf-Erythrocyten konnte gezeigt werden, dass rCulbicin beide Erythrocytentypen lysiert, wobei die humanen Erythrocyten suszeptibler waren. Allerdings ist beim Vergleich der hämolytischen Aktivitäten zu beachten, dass die Erythrocytenanzahl über die Hämoglobin-Absorption bestimmt wurde.

Die Schaf-Erythrocyten sind wesentlich kleiner als die humanen Erythrocyten und haben daher eine größere Membranoberfläche, mit der die Peptide interagieren, um denselben Lysewert zu liefern. Zudem weisen die Schaf-Erythrocyten einen höheren Sphingomyelin-Gehalt auf. Dies kann darauf hindeuten, dass rCulbicin eine Präferenz zu ungeladenen Phospholipiden wie Phosphatidylcholin aufweist.

4.5.5 Cytotoxische Wirkung von rCulbicin

rCulbicin lysiert nicht nur die Membranen humaner Erythrocyten, sondern hat auch einen letalen Effekt auf metabolisch aktive humane Zelllinien. Die Cytotoxizität von rCulbicin wurde an Jurkatzellen, einer entarteten T-Zelllinie, und Glioblastomazellen mit dem Redox-Indikator AlamarBlue nachgewiesen. Der LC_{50} -Wert (*lethal concentration*, 50 % getötete Zellen) von rCulbicin entspricht dem von Alamethicin, einem porenbildenden Peptid von *Trichoderma viride*.

Da *Acanthamoeba culbertsoni* granulomatöse Amöbenencephalitis verursacht, fokussierte sich das Interesse besonders auf die Wirkung von rCulbicin auf die Glioblastomazellen. Die entarteten Nervenzellen erwiesen sich jedoch als weniger suszeptibel für rCulbicin und die Kontrollpeptide Melittin und Alamethicin als die Jurkatzellen. Tumorzellen weisen jedoch eine von gesunden Zellen abweichende Lipidzusammensetzung in der Außenmembran auf, so konnte ein erhöhter Anteil anionischer Phospholipide wie Phosphatidylserin festgestellt werden [Utsugi *et al.*, 1991, Ran *et al.*, 2002]. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Suszeptibilität gesunder Zellen sich von derjenigen der Tumorzellen unterscheidet.

Die Zellen tolerieren einen pH-Wert von minimal 5,5. Im Liposomendepolarisationstest wies Culbicin ab einem pH-Wert von 5,4 jedoch keine porenbildende Aktivität mehr auf. *In vivo* könnten die Amöben bei der Cytolyse an der kleinen Interaktionsfläche mit der Zielzelle ein lokales pH-Optimum für Culbicin schaffen, um die Effizienz des Peptids zu steigern. In den culbicinhaltigen Granula wird ein saures Milieu vorherrschen, so dass bei der Sekretion von Culbicin der pH-Wert an der Interaktionsfläche durch die gleichzeitig ausströmende Salzlösung gesenkt werden kann.

Aufgrund der Cytotoxizität von rCulbicin *in vitro* wird postuliert, dass Culbicin *in vivo* ein cytotoxischer Faktor von *Acanthamoeba culbertsoni* ist und als solcher in den Prozess der Cytolyse involviert ist, welcher die von *Acanthamoeba culbertsoni* verursachten Krankheiten *Acanthamoeba*-Keratitis und granulomatöse Amöbenencephalitis verursacht.

Die Primärfunktion von Culbicin in der freilebenden Amöbe wird vermutlich der Nahrungsaufnahme dienen, wie Leippe 1997 für porenbildende Peptide in Amöben postulierte.

4.5.6 Wirkmechanismus von rCulbicin

Anhand des Liposomendepolarisationstest und der Reaktionsgeschwindigkeit, mit der rCulbicin die Zielmembranen lysiert, kann man auf eine direkte Interaktion des Peptids mit der Membran schließen. Eine rezeptorvermittelte Antwort, welche eine Signaltransduktionskaskade in der Zielzelle auslöst, findet nicht so unmittelbar statt und kann deshalb ausgeschlossen werden.

Culbicin kann ein weites Spektrum von Membranen lysieren, welches Gram-positive und Gram-negative Bakterien umfasst, die artifiziellen Liposomen aus Soja-Phosphatidylcholin und eukaryontische Membranen wie die von *Candida*, Erythrocyten vom Menschen und vom Schaf, sowie die stoffwechselaktiven humanen Tumorzelllinien Jurkat und Glioblastoma. Die Acanthamöben müssen folglich über einen Mechanismus verfügen, sich selbst vor dem cytotoxischen Culbicin zu schützen.

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen von Zellen und Organismen beschrieben, um sich gegen toxische Peptide von außen zu schützen. Dazu zählt das Fehlen spezifischer Affinitäts-Bindungsstellen, wie es für die Bindung von *Staphylococcus* α -Toxin beschrieben wurde [Valeva *et al.*, 1997]. *Bacillus subtilis* schützt sich gegen die eigenen Toxine durch die Synthese von Immunoproteinen, welche die Toxine wie Rezeptoren an der Außenmembran binden und so inhibieren [Ellermeyer *et al.*, 2006]. ABC-Transporter sind Transport-ATPasen mit der Fähigkeit, eine Vielfalt von Molekülen wie Zucker, Ionen und Proteinen durch die Membran zu schleusen. Die ABC-Transporter haben eine große medizinische Bedeutung, da sie z. B. Krebszellen das Ausschleusen von Chemotherapeutika ermöglichen und Bakterien können über diese Transporterproteine Antibiotika aus ihrem Cytoplasma entfernen. Auch bei *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria, führt eine erhöhte Anzahl von ABC-Transportern zur Resistenz gegen das Antimalariamittel Chloroquin [Alberts *et al.*, 2004]. Der Austausch einer Aminosäure im Peptidoglycangerüst vermittelt *Streptococcus milleri* Resistenz gegen die eigene Peptidoglycan-Hydrolase Millericin B [Beukes & Hastings 2001]. Die Toxizität von Equinatoxin II, ein Actinoporin der Seeanemone, ist abhängig

von der Anwesenheit von Sphingomyelin in der Ziellmembran [Belmonte *et al.*, 1993, Bonev *et al.*, 2003].

Bei *Entamoeba histolytica* liegt der Schutzmechanismus in der Zusammensetzung der Lipidmembran begründet [Andrä *et al.*, 2004]. Das ungewöhnliche Phospholipid Ceramidaminoethylphosphonat ist die Hauptkomponente (39 %) der Lipidmembran, dazu kommt ein relativ hoher Anteil von Cholesterol [Aley *et al.*, 1980, Das *et al.*, 2002]. Andrä *et al.* konnten zeigen, dass artifizielle Liposomen, welche die Zusammensetzung der Amöbenmembran simulieren, nur schlecht mit Amöbapore A interagieren [Andrä *et al.*, 2004]. Welcher Mechanismus von *Acanthamoeba culbertsoni* verwendet wird, ist noch nicht geklärt worden. Die Lipidzusammensetzung der Membranen von *Acanthamoeba castellanii* NEFF wurde von Ulsamer *et al.* eruiert [Ulsamer *et al.*, 1969, Ulsamer *et al.*, 1971]. Das Verhältnis von Sterolen zu Phospholipiden in der Plasmamembran ist etwa gleich und unter den Phospholipiden sind die Hauptkomponenten Phosphatidylethanolamin (47,2 %), Phosphatidylserin (26,9 %) und Phosphatidylcholin (18,6 %). Sphingomyelin hingegen konnte gar nicht nachgewiesen werden. Der Schutzmechanismus von *Entamoeba histolytica*, sich durch Abundanz eines speziellen Phospholipids zu schützen, ist nicht auf *Acanthamoeba spec.* übertragbar.

4.6 Rekombinante Expression und Reinigung von KURZ

Bei der Expression von KURZ als Fusionsprotein mit einem Histidinschwanz konnte keine Lyse der Bakterien festgestellt werden. Der Hauptanteil von KURZ lag in Inclusion bodies vor und ein geringer Anteil in der TBS-löslichen Fraktion. Um eine homogene Qualität zu erhalten, wurde KURZ aus den Inclusion bodies gereinigt.

Bei dem Versuch der Reinigung über Kationen- und Anionenaustauschersäulen konnte eine Bindungsaffinität zur Säulenmatrix festgestellt werden, so dass diese Methode ausgeschlossen wurde. Stattdessen konnte KURZ über zwei Chromatographieschritte mit hydrophober Interaktion gereinigt werden, wobei KURZ auch zum Säulenmaterial der *reversed phase*-Säule eine hohe Affinität zeigte und in einem breiten Peak eluiert wurde.

Die proteolytische Abspaltung des Histidinschwanzes mit Faktor Xa gelang nicht, was vermutlich an der sequenzbedingten Faltung von KURZ liegt, indem es den Kontakt zur Xa-Bindungsstelle räumlich blockiert.

4.7 Untersuchungen zur molekularen Identität und strukturellen Integrität von KURZ

Die Molekulare Masse von KURZ wurde im Massenspektrometer analysiert. Unter der Voraussetzung, dass alle 10 Cysteine in Disulfidbrücken involviert sind, wurde die theoretische Masse von 8347,42 Dalton berechnet. Die tatsächliche Masse von KURZ von 8348,11 Dalton stimmte mit der errechneten überein.

Die Markierung freier Sulfhydrylgruppen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane zeigt ebenfalls, dass alle zehn Cysteinreste von KURZ unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Disulfidbrücken involviert sind.

Die definierte Faltung mit stabilisierenden Disulfidbrücken des rekombinanten KURZ könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch in *A. culbertsoni* das natürliche Peptid KURZ existiert.

Die Stabilisierung der Tertiärstruktur durch fünf Disulfidbrücken macht KURZ zu einem hitze- und säureresistenten Peptid. Mithilfe der CD-Spektroskopie wurde für KURZ überwiegend eine β -Faltblatt-Struktur berechnet (36 %). Bekannte antimikrobielle Peptide mit dieser Sekundärstruktur sind die α - und β -Defensine, die als Teil des angeborenen Immunsystems in vielen untersuchten Mehrzellern gefunden wurden [Ganz *et al.*, 1985, Greenwald & Ganz, 1987, Jenssen *et al.*, 2006].

4.8 Funktionsanalysen von KURZ

In *A. culbertsoni* wird KURZ vermutlich in einem Vorläufermolekül mit Culbicin exprimiert. Des Weiteren wird KURZ wie Culbicin in seiner Tertiärstruktur von fünf Disulfidbrücken stabilisiert und ist amphipatisch. Daher wurde KURZ auf membraninteragierende Funktionen untersucht.

4.8.1 Antibakterielle Wirkung von KURZ

KURZ hatte wie rCulbicin auf die beiden Bazillenstämme *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* einen bakteriziden Effekt. Im Gegensatz zu rCulbicin konnte auch der Stamm *E. coli* K12 D31 getötet werden, dieser Stamm war zudem der einzige, der auch beim physiologischen pH von 7,4 für KURZ suszeptibel war.

Die anderen Teststämme konnten mit den eingesetzten KURZ-Konzentrationen nicht getötet werden. Ein synergistischer Effekt vom Zusammenwirken von KURZ und rCulbicin wurde nicht untersucht, ist aber durchaus denkbar. KURZ hat zumindest bei den Bakterien ein anderes Wirkspektrum als Culbicin. Dies wurde auch für die Naegleriapores beschrieben, die von einem Precursor stammen und die von einzelnen Genen translatierten Amoebapores A, B und C sind ebenfalls unterschiedlich effizient [Herbst *et al.*, 2004, Andrä *et al.*, 2003].

4.8.2 Fungizide Wirkung von KURZ

Mit der Untersuchung auf fungizide Wirkung von KURZ am avirulenten Stamm *Candida albicans* ATCC 10261 wurde auch eine Interaktion mit einer eukaryontischen Membran festgestellt, wobei KURZ sich als ähnlich effizient wie rCulbicin erwies. Die Unterschiede zwischen prokaryontischen und eukaryontischen Membranen wurden unter 4.5.2 dargestellt. Die antimikrobielle Aktivität von KURZ beruht also auf mehr als der elektrostatischen Interaktion der kationischen Aminosäurereste mit den negativen Phospholipiden und LPS.

4.8.3 Porenbildende Aktivität von KURZ

KURZ bildet wie Culbicin im Liposomendepolarisationstest nur im sauren pH-Bereich Poren, ist allerdings um den Faktor zehn weniger aktiv. Zusätzlich wurde bei KURZ eine Calciumabhängigkeit der Porenbildung festgestellt. In der Literatur beschriebene calciumabhängige Proteine mit antibakterieller Aktivität sind z. B. Surfactant Protein A [Kuzmenko *et al.*, 2005] und das cyclische Lipopeptid Daptomycin [Jung *et al.*, 2004]. Mittels CD-Spektroskopie wurde festgestellt, dass Calcium essentiell für die Insertion des Daptomycins in eine Modellmembran ist, da es eine für die Membranbindung erforderliche Konformationsänderung vermittelt. Die Abhängigkeit von bivalenten Ionen ist bei antimikrobiellen Peptiden allerdings selten und es ist nicht auszuschließen, dass die membranolytische Aktivität von KURZ auf den artifiziellen Histidinschwanz zurückzuführen ist.

4.8.4 Hämolytische und cytotoxische Wirkung von KURZ

KURZ weist hämolytische Aktivität auf, sowohl bei menschlichen als auch bei Schaf-Erythrocyten. Die humanen Krebszelllinien Jurkat und die Glioblastomazellen waren bei den eingesetzten Konzentrationen nicht suszeptibel für KURZ.

Das Wirkspektrum von KURZ unterscheidet sich von Culbicin und in den Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei der gleichen funktionellen Eigenschaft wie bei der Bakterienmembran-Permeabilisierung und der Hämolyse für denselben Effekt eine höhere Konzentration von KURZ eingesetzt werden musste.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Primärfunktion von KURZ in den Acanthamoeben *in vivo* eine andere als die im Rahmen dieser Arbeit getesteten membraninteragierenden Funktionen bei Bakterien und eukaryontischen Zellen ist.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Culbicin und KURZ synergistisch wirken. So müssen antimikrobielle Peptide nicht membranolytisch sein, um tödlich zu wirken. Der tödliche Effekt kann auch durch Eingreifen in den Metabolismus der Zielzelle hervorgerufen werden [Brodgen, 2005]. Dabei beruht die Interaktion des Peptids mit der Membran auf deren Durchdringen, um im Zellinneren zu wirken. Für die antimikrobiellen, nicht membrandestabilisierenden Peptide Buforin II und Dermaseptin vom Frosch sind z. B. die DNA-Replikation und mRNA-Synthese intrazelluläre Angriffsziele. Die Proteinsynthese wird unter anderem von porkinen PR-39 und bovinen Indolicidin inhibiert, enzymatische Reaktionen werden ebenfalls unterbunden und die Zellwandsynthese ist Ziel von Lantibiotika wie Nisin [Brodgen, 2005, Jenssen *et al.*, 2006].

In einem Synergismus von Culbicin und natürlichem KURZ könnte Culbicin Zielzellmembranen permeabilisieren, damit KURZ eindringen kann und seine Angriffsziele im Zellinneren erreicht. Die essentiellen Zellkomponenten wie Nuklein- und Aminosäuren weisen Ladungen und hydrophobe Bereiche auf, die eine Bindung von KURZ ermöglichen.

4.9 Culbicin-Ortholog von *Acanthamoeba castellanii*

In der Spezies *A. castellanii* wurde mittels Immunoblotting ein Culbicin-Ortholog nachgewiesen. In online-cDNA-Banken wurden cDNA-Klone gefunden, deren abgeleitete Proteinsequenzen 83 % Identität und 93 % Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz von Culbicin aufweisen. Aufgrund dieser hohen Identität, besonders in den hydrophoben Bereichen der Peptide, kann eine unspezifische Kreuzreaktion des Anti-Culbicin-Antikörpers ausgeschlossen werden. Dieses Culbicin-Ortholog wurde "Castellanicin" genannt und ist ebenfalls in einem Vorläufermolekül mit Signalpeptid organisiert. Der Castellanicin-Precursor weist 62 % Identität und 11 % Ähnlichkeit mit dem Culbicin-Precursor aus *A. culbertsoni* auf. Mit der Entdeckung von Culbicin und KURZ wurde der Ausblick auf zwei völlig neue Proteinfamilien eröffnet, die bisher nur in den zwei pathogenen *Acanthamoeba* Spezies *A. culbertsoni* und *A. castellanii* gefunden wurden. In dieser Arbeit wurden Culbicin und KURZ als antimikrobielle Peptide und Culbicin zudem als cytotoxischer Faktor von *A. culbertsoni* identifiziert.

Um zu erfahren, ob das Fehlen von Culbicin und KURZ mit der Avirulenz eines Stammes einhergeht, wäre eine Untersuchung apathogener *Acanthamoeba*-Stämme aufschlussreich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Culbicin ist ein neuartiges Peptid, welches aufgrund seiner porenbildenden Aktivität aus humanpathogenen *Acanthamoeba culbertsoni* isoliert wurde. Die Aufklärung der Nukleotidsequenz von Culbicin zeigte, dass das translatierte Culbicin in einem Precursor mit aminoterminalen Signalpeptid organisiert ist. Es wird postuliert, dass die Nukleotidsequenz zwischen dem 5'-Ende der Culbicinsequenz und der Signalpeptid-codierenden Sequenz ein weiteres Peptid codiert, welches KURZ genannt wurde. KURZ weist weder strukturelle Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen noch zu Culbicin auf.

Für beide Peptide wurde jeweils ein heterologes Expressionssystem etabliert, mit dem ausreichende Mengen der rekombinanten Peptide für die Antikörpergenerierung, Funktions- und Strukturanalysen synthetisiert wurden.

Die prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturelemente wurde untersucht und rCulbicin als ein vorwiegend α -helikales Peptid identifiziert. Die Tertiärstruktur von rCulbicin wird von fünf Disulfidbrücken stabilisiert, die dem Peptid eine enorme Stabilität unter Hitze- und Säureeinwirkung verleiht. KURZ hingegen wurde als vorwiegend β -Faltblatt-strukturiertes Peptid identifiziert, dessen Tertiärstruktur ebenfalls durch fünf Disulfidbrücken stabilisiert wird.

Ferner wurde festgestellt, dass rCulbicin ein breites Wirkspektrum aufweist: es permeabilisiert die Membranen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien, bildet Poren in artifiziellen Liposomen, lysiert Human- und Schaf-Erythrocyten und wirkt cytotoxisch auf *Candida albicans* sowie zwei verschiedene humane Tumorzelllinien.

Bei KURZ wurde ebenfalls antibakterielle, porenbildende und hämolytische Aktivität nachgewiesen.

Mit den rekombinanten Peptiden Culbicin und KURZ wurden spezifische Antikörper generiert, die zur Immunlokalisation der natürlichen Peptide in *Acanthamoeba culbertsoni*-Trophozoiten verwendet wurden. Natürliches Culbicin wurde in cytosolischen Granula der Trophozoiten nachgewiesen, KURZ hingegen konnte nicht lokalisiert werden.

Mit dem spezifischen Anti-Culbicin-Antikörper wurde im Immunoblot ein Protein von *Acanthamoeba castellanii* erkannt, bei dem es sich vermutlich um ein Culbicin-Ortholog handelt. Die Analyse einer online-cDNA-Bank von *A. castellanii* untermauert dieses Postulat, da eine translatierte cDNA-Sequenz 93 % Ähnlichkeit zur Culbicinsequenz

aufweist. Dieses Culbicin-Ortholog, welches in dieser Arbeit den Arbeitstitel Castellanicin erhielt, ist gleichfalls in einem Precursor organisiert. Die Aminosäuresequenz des gesamten Castellanicin-Precursors ist der des Culbicin-Precursors zu 71 % ähnlich. Aufgrund dessen wird postuliert, dass mit Culbicin und KURZ sowie deren Homologen von *Acanthamoeba castellanii* in dieser Arbeit zwei gänzlich neue Proteinfamilien entdeckt wurden, die keine strukturellen Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinfamilien aufweisen.

5 SUMMARY

Culbicin is a new type of peptide which was isolated by its pore-forming activity from *Acanthamoeba culbertsoni* extract. Analysis of its nucleotide sequence showed the translated Culbicin to be organized in a precursor with an aminoterminal signal peptide.

The nucleotide sequence between the sequence coding for the signal peptide and the culbicin coding region is postulated to encode a further peptide, which was named KURZ. KURZ shows structural similarities neither to other known proteins nor to Culbicin.

For functional and structural analysis of these peptides, a heterolog expression system was established. The resulting recombinant peptides were also used for generation of specific antibodies.

rCulbicin was identified to be a predominantly α -helical peptide whose tertiary structure is stabilized by five disulfide bonds. These give rCulbicin immense resistance to heat and acidic conditions. KURZ was identified to consist mainly of β -sheets whose tertiary structure is also stabilized by five disulfide bonds.

rCulbicin interacts with a broad spectrum of membranes: it permeabilizes the membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria and has pore-forming activity on artificial liposomes consisting of soya lecithine. Additionally it shows hemolysis on human and sheep erythrocytes and is cytotoxic for *Candida albicans* and two human tumorcell lines.

KURZ was also shown to have antibacterial, pore-forming and hemolytic activity.

Specific antibodies, generated with the recombinant peptides, were used in immunolocalization of the natural peptides Culbicin and KURZ in *Acanthamoeba culbertsoni* trophozoites. The natural Culbicin was detected in cytosolic granules of the trophozoites while KURZ could not be localized.

Further on a protein of *Acanthamoeba castellanii* was detected in immunoblotting with the specific anti-Culbicin antibody. In this work this protein is postulated to be a Culbicin ortholog. Analysis of an online cDNA-library of *A. castellanii* sequence-tags confirm this postulate by a translated sequence with 93 % similarity to the Culbicin sequence. This Culbicin ortholog got named Castellanicin in this work and is probably organized in a precursor as well. A comparison between the peptide sequences of the Castellanicin precursor and the Culbicin precursor showed 71 % similarity. These results lead to the postulate that with Culbicin, KURZ and their homologs in *A. castellanii* two new protein families without structural similarities to known protein families were identified.

6 LITERATUR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004):** Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Wiley-VCH
- Aldape K., Huizinga, H., Bouvier, J., McKerrow J. (1994):** *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol* **78** (2):230-41.
- Aley, S. B., Scott, W. A., Cohn, Z. A. (1980):** Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **152** (2), 391-404.
- Amann, R., Springer, N., Schonhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E. N., Muller, K. D., Michel, R. (1997):** Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl Environ Microbiol.* **63**,115–121
- Andrä, J., Leippe, M. (1999):** Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores an NK-lysin. *Med Microbiol Immunol* **188**, 117-124
- Andrä, J., Berninghausen, O., Leippe, M. (2001):** Cecropins, antibacterial peptides of insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol* **189**, 169-173
- Andrä, J., Herbst, R., Leippe, M. (2003):** Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev Comp Immun* **27**, 291-304
- Andrä, J., Berninghausen, O., Leippe, M. (2004):** Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Letters* **564**, 109-115
- Ankri, S., Stolarsky, T., Mirelman, D. (1998):** Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* **28**(4) 777-85.
- Armstrong, M. (2000):** The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect Dis Rev* **2**(2) 65-73
- Barker, J., T. J. Humphrey, Brown, M. W. (1999):** Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 291–295
- Barker, J., Brown, M. (1994):** Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**, 1253-59
- Bechinger, B. (1997):** Structure and functions of channel-forming peptides: Magainins, Cecropins, Melittin and Alamethicin. *J Membrane Biol* **156**, 197-211

- Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P., Menestrina, G. (1993):** Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J Membr Biol* **131**(1):11-22.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004):** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795
- Bernauer, W., Duguid, GIG., Dart, JKG. (1996):** Zur klinischen Frühdiagnose der Acanthamoeben-Keratitits. *Klein Monatsbl Augenheilkd* **208**, 282-4
- Beukes, M., Hastings, JW. (2001):** Self-protection against cell-wall lysis in *Streptococcus milleri* NMSCC061, an analysis of the Millericin B operon. *Appl Env Microbiol* **67**, 3888-96
- Birtles, R. J., Rowbotham, T. J., Storey, C., Marrie, T. J., Raoult, D. (1997):** *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* **349**,925–926.
- Blaschitz M., Köhler M., Aspöck H., Walochnik J. (2006):** Detection of a serine proteinase gene in *Acanthamoeba* genotype T6 (Amoebozoa: Lobosea). *Exp Parasitol.*;114(1):26-33
- Boman, HG., Nilsson-Faye, I., Paul, K. und Rasmuson, T., Jr. (1974):** Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthiapupae*. *Infect Immun* **10** (1), 136-145.
- Boman, HG. (2000):** Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* **173**, 5-16
- Bonev, BB., Lam, YH., Anderluh, G., Watts, A., Norton, RS., Separovic, F. (2003):** Effects of the eukaryotic pore-forming cytolysin equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. *Biophysical J* **84**, 2382–2392
- Bozue, JA., Johnson, W. (1996):** Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**, 668-673.
- Brodgen, KA. (2005):** Antibacterial peptides: poreformers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3** (3), 238-50
- Bruhn, H. (2005):** A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J* **389** (2), 249-257.
- Bruhn, H., Riekens, B., Berninghausen, O., Leippe, M. (2003):** Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochem J* **375** (3), 737-744.
- Bruhn, H., Leippe, M. (1999):** Comparative modeling of Amoebapores and granulysin based on the NK-lysin structure – structural and functional implications. *Biol Chem* **380**, 1001-7

-
- Castellani, A. (1930):** Amoeba found in culture of yeast. *J Trop Med Hyg* **33**, 160
- Cerva, L. (1989):** *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **33**, 99–103.
- Chadee, K., Petri, WA. Jr., Innes, DJ., Ravdin, JI. (1987):** Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* **80** (5)1245-54.
- Chen, G. C., and Yang, J. T. (1977):** Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid. *Anal Letters* **10**, 1195-1207
- Cho JH, Na BK, Kim TS, Song CY. (2000):** Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *IUBMB Life* **50** (3) 209-14
- Cirillo, JD., Falkow, S., Tompkins, LS., Bermudez, LE. (1997):** Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* **65** 3759-67.
- Cirillo, JD., Cirillo, SLG., Yan, L., Bermudez, LE., Falkow, S., Tompkins, LS. (1999):** Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **67** (9), 4427-34
- Culbertson, CG., Smith, JW., Minner, MR. (1958):** Observations on animal pathogenity. *Science* **127**, 1506
- Cursons, RTM., Brown, TJ., Keys, EA., Moriarty, KM., Till, D. (1980):** Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun* **29**, 401–407.
- Das, S., Stevens, T., Castillo, C., Villasenor, A., Arredondo, H., Reddy, K. (2002):** Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol* **32** (6), 655-675.
- Dathe, M., Wieprecht, T. (1999):** Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* **1462**, 71-87
- Deetz, TR., Sawyer, MH., Billman, G., Schuster, FL., Visvesvara, GS. (2003):** Successful Treatment of *Balamuthia* Amoebic Encephalitis: Presentation of 2 Cases. *Clin Infect Dis*, **37**,1304–12
- Dempsey, CE. (1990):** The action of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1031**, 143-161
- Douglas, M. (1930):** Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of yeast-like fungus. *J Trop Med Hyg* **33**, 258-259

- Ellermeyer, CD., Hobbs, EC., Gonzales-Pastor, JE., Losick, R. (2006):** A three protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell* **124**, 549-59
- Ferrante, A., Bates, E. J. (1988):** Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect. Immun.* **56**, 3320–3321
- Fowler, M., Carter, RF. (1965):** Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* spp.: a preliminary report. *Br Med J* **2**, 740-742
- Fritsche, TR., Gautom, RK., Seyedirashti, S., Bergeron, DL., Lindquist TD. (1993):** Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* **31**, 1122–1126
- Ganz, T., Selsted, ME., Szklarek, D., Harwig, SS., Daher, K., Bainton, DF., Lehrer, RI. (1985):** Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76** (4), 1427-35.
- Gelman, BB., Rauf, SJ., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. W., Visvesvara, GS. (2001):** Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J Neuropathol Exp Neurol* **285**, 2450–2451.
- Giovane C, Schwalbach G, Weiss E (1997):** In vivo labeling of over-expressed recombinant proteins in *E. coli*. *Biotechniques*. **22**(5), 796-8.
- Greenwald, GE., Ganz, T. (1987):** Defensins mediate the microbicidal activity of human neutrophil granule extract against *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Immun* **55**, 1365-8
- Gruber, A., Zingales, B. (1995):** Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques* **19** (1), 28
- Hadas, E., Mazur, T. (1993):** Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop Med Parasitol* **44**, 197–200.
- Hanahan, D (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580
- Hancock, RE. & Rozek, A. (2002):** Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* **206**, 143-49
- Hausmann, H., Hülsmann, N. (1996):** Protozoology. George Thieme Verlag New York, 2. Ausgabe
- Hecht, O., van Nuland, NA., Schleinkofer, K., Dingley, A. J., Bruhn, H., Leippe, M., Grötzinger, J. (2004):** Solution structure of the pore-forming Protein of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **279**, 17834–17841

- Helmerhorst, E.J., Reijnders, IM., van't Hof, W., Veerman, EC., Nieuw Amerongen, AV. (1999):** A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett* **449**, 105-10
- Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F., Leippe, M. (2002):** Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* **277**, 22353–22360
- Herbst, R., Marciano-Cabral, F., Leippe, M. (2004):** Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J Biol Chem* **279** (25), 25955-25958.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1986):** Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Application Note RE-34
- Horn, M., Wagner, M. (2004):** Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol.*; **51**: 509-14
- Im, K., Kim, DS. (1998):** *Acanthamoebiasis* in Korea: two new cases with clinical cases review. *Yonsei Med J* **39**, 478-84
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, RE. (2006):** Peptide antimicrobial agents. *Clin Mikrobiol Rev* **19**, 491-511
- Jung, D., Rozek, A., Okon, M., Hancock, RE. (2004):** Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem & Biol*. **11**, 949-57
- Kacprzyk, L., Rydengard, V., Mörgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M., Schmidtchen, A. (2007):** Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Ioachim Biophys Acta* **1768** (11), 2667-2680
- Khan, NA. (2001):** Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiol* **43**, 391-395
- Kichler, A., Mason, AJ., Bechinger, B (2006):** Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim Biophys Acta* **1758** (3), 301-307
- Kim, SY., Syms, MJ. , Holtel, MR. , Nauschuetz, KK. (2000):** *Acanthamoeba* sinusitis with subsequent dissemination in an AIDS patient. *Ear Nose Throat J* **79**:168, 171–168, 174.
- Köhler, M., Leitner, B., Blaschitz, M., Michel, R., Aspöck, H., Walochnik, J., (2006):** ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). *Parasitol Res* **98** (2) 86-93
- Kuzmenko, AI., Wu, H., Wan, S., McCormack, FX. (2005):** Surfactant Protein A is a principal and oxidation-sensitive microbial permeabilizing factor in the alveolar lining fluid. *J Biol Chem* **280** (27), 25913-19

- Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, LO., Jonczy, J., Rigden, DJ., Rees, HH., Turner, PC. (2004):** A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J* **18** (12), 1447-9
- Leher, HF., Alizadeh, H., Taylor, WM., Shea, AS., Silvany, RS., Van Klink, F., Jager, M. J., Niederkorn, YJ. (1998):** Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **39**:2666–2673
- Lehrer, RI., Ganz, T. (1999):** Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Op Immunol* **11**, 23-27
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, OL., Horstmann, RD., Müller-Eberhardt, HJ. (1991):** Poreforming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7659-63
- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, RD., Müller-Eberhard, HJ. (1992):** Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Embo J* **11** (10), 3501-3506
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R. Tannich, E., Müller-Eberhardt, H.-J. (1994):** Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* **14**, 895-904
- Leippe, M., Müller-Eberhard, H. J. (1994):** The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* **87** (1-3), 5-18
- Leippe, M. (1997):** Amoebapores. *Parasitol Today* **13**, 178-83
- Levine, ND., Corliss, JO., Cox, FE., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, BM., Leedale, GF., Loeblich III, AR., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, EG., Page, FC., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, FG. (1980):** A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**, 37-58
- Loew, LM., Rosenberg, I., Bridge, M., Gitler, C. (1983):** Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry* **22**, 837-44
- Ly, TMC., Muller, HE. (1990):** Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* **33**, 51–54
- Maniatis, T., Fritsch, EF., Sambrook, J. (1989):** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003):** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* **16** (2), 273-307

- Marolda, CL., Hauröder, B., John, MA., Michel, R., Volvano, MA. (1999):** Intracellular survival and saprophytic growth of isolates of *Burkholderia cepacia* complex in free living amoebae. *Microbiology* **145**, 1509-1517
- Martinez AJ., Visvesvara, GS. (1997):** Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* **7**, 583-89
- Mason, AJ., Gasnier, C., Kichler, A., Prevost, G., Aunis, D., Metz-Boutigue, M., Bechinger, B. (2006):** Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (10), 3305-11
- Matin A, Stins M, Kim KS., Khan NA. (2006):** *Balamuthia mandrillaris* exhibits metalloprotease activities. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**(1), 83-91
- Michel, R., Burghardt, H., Bergmann, H. (1995):** *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **196** (6), 532-44
- Miltner, E., Bermudez, LE. (2000):** *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **44** (7), 1990-94
- Mitraki, A., King, J. (1989):** Protein folding intermediates and inclusion body formation. *BioTechnology* **7**, 690-97
- Mitro, K., Bhagavathiammai, A., Zhou, OM., Bobbett, G., McKerrow, JH., Chokshi, R., Chokshi, B., James, ER. (1994):** Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Exp Parasitol* **78**, 377-385
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Abu Kwaik, Y. (2005):** Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**, 20-28
- Morton, LD., McLaughlin, GL., Whiteley, HE. (1991):** Effects of temperature, amebic strain, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium *in vitro*. *Infect Immun* **59**, 3819-3822
- Munford, RS., Sheppard, PO., O'Hara, PJ. (1995):** Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* **36** (8), 1653-1663
- Na BK., Kim JC., Song CY. (2001):** Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *Microb Pathog* **30** (1), 39-48
- Nagington, F., Watson, PG., Playfair, TJ., McGill, J., Hones, BR., Steele, ADM. (1974):** Amoebic infection of the eye. *Lancet* **2**, 1537-1540
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988):** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at

- nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-62.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000):** Investigation of the AlamarBlue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of the mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **26** (17), 5421-6
- O'Keefe, DO. (1994):** Quantitative Electrophoretic Analysis of Proteins labeled with Monobromobimane. *Anal Biochem* **222**, 86-94
- Oren, Z., Shai, Y. (1998):** Mode of action of linear amphiphatic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolym (Pept Sci)* **47**, 451-63
- Page, FC. (1974):** *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellidae) and the amphizoic tendency in amoeba. *Acta Protozool* **13**, 143-154.
- Page, F.C. (1988):** A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK*, p. 122.
- Pick, U. (1981):** Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch Biochem Biophys* **212**, 186-94
- Proca-Ciobanu, M., Lupascu, GH., Petrovici, A., Ionescu, MD. (1975):** Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol* **5**, 49-56
- Provencher, SW. (1982):** A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Comput Phys Commun* **27**, 213-227
- Pussard, M., Pons, R. (1977):** Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* **8**, 557-598
- Radford, CF., Lehmann OJ., Dart, J. (1998):** *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. *Br J Ophthalmol* **82**, 1387-92
- Ran, S., Downes, A., Thorpe, PE. (2002):** Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res.* **62**, 6132-6140
- Recavarren-Arce, S., Velarde, C., Gotuzzo, E., Cabrera J. (1999):** Amoeba angitic lesions of the central nervous system in *Balamuthia mandrillaris* amoebiasis. *Hum Pathol* **30**, 269-73
- Rowbotham, TJ. (1980):** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**, 1179-1183
- Rowbotham, TJ. (1986):** Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* **22**, 678-689

- Rowbotham, T.J. (1993):** *Legionella*-like amoebal pathogens, *J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A. P. Dufour (ed.), Legionella-current status and emerging perspectives. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 137–140*
- Sanger, F., Coulson, AR., Borell, BG., Smith, AJ., Roe, BA. (1980):** Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* **143**, 161-78
- Schägger, H., v. Jagov, G. (1987):** Tricine-sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79
- Schaumberg, DA., Snow, KK., Dana, MR. (1998):** The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea* **17**, 3-10
- Schuster, FL., Dunnebacke, TH., Booton, GC., Yagi, S., Kohlmeier, CK., Glaser, C., Vugia, D., Bakardjiev, A., Azimi, P., Maddux-Gonzalez, M., Martinez, AJ., Visvesvara, GS. (2003):** Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* Associated with a Case of Amebic Encephalitis. *J Clin Microbiol* **41**, 3175–3180
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström Å., Bennich, H., Boman, HG. (1981):** Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-48
- Steiner H. (1982):** Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Lett* **137** (2), 283-7
- Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F. (1998):** *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Env Microbiol* **64**, 2256-61.
- Stothard, DR., Schroeder-Diedrich, JM., Awwad, MH., Gast, RJ. , Ledee, DR., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, CL., Fuerst, PA., Byers, TJ. (1998):** The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* **45**, 45–54.
- Thom, S., Warhurst, D., Drasar, B. (1992):** Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol* **36**, 303-6
- Tomlinson, G., Jones, EA. (1962):** Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochim Biophys Acta* **63**, 194-200
- Torno, MS., Jr., Babapour, R., Gurevitch, A., Witt., MD. (2000):** Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J Am Acad Dermatol* **42**, 351–354
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (9), 4350-4
- Ulsamer, AG., Smith, FR., Korn, ED. (1969):** Lipids of *Acanthamoeba castellanii*. Composition and effects of phagocytosis on incorporation of radioactive precursors. *J Cell Biol* **43**, 105-114

- Ulsamer, AG., Wright, PL., Wetzel, MG., Korn, ED. (1971):** Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* **51**, 193-215
- Utsugi, T., Schroit, AJ., Connor, J., Bucana, CD., Fidler, IJ. (1991):** Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* **51**, 3062-3066
- Valeva, A., Walev, I., Pinkernell, M., Walker, B., Bayley, H., Palmer, M., Bahkdi, S. (1997):** Transmembrane β -barrel of staphylococcal α -toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7659-63
- Van Klink, F., H. Alizadeh, G. L. Stewart, M. S. Pidherney, R. E. Silvano, Y. He, J. P. McCulley, J. Y. Niederkorn (1992):** Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. *Curr Eye Res* **11**, 1207-1220
- Visvesvara, GS., Martinez, AJ., Schuster, FL., Leitch GJ., Wallace, SV., Sawyer, TK., Anderson, M. (1990):** Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J Clin Microbiol* **28**, 2750-2756
- Visvesvara, GS., Schuster, FL., Martinez, AJ. (1993):** *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp. agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* **40**, 504-514.
- Volkonsky, M. (1931):** *Hartmannella castellanii* Douglas et classification des Hartmannelles. *Arch Zool Exp Gen* **72**, 317-339
- Walochnik, J., Aspöck, H. (2005):** Die Diagnostik von Infektionen mit freilebenden Amöben (FLA). *J Lab Med* **29**, 446-456
- Wang, X. and DG. Ahearn (1997):** Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr Microbiol* **34**, 212-215
- Weiss, J., Victor, M, Elsbach, P. (1983):** Role of charge and hydrophobic interactions in the action of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils on Gram-negative bacteria. *J Clin Invest* **71**, 540-549
- Yang, Z., Z. Cao, Panjwani, N. (1997):** Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infect Immun* **65**, 439-445
- Zasloff, M. (1987):** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 5449-5453
- Zasloff, M. (2002):** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-95

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Matthias Leippe für die Überlassung des interessanten Themas und die gute wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Prof. Dr. Joachim Grötzinger danke ich für die Übernahme des Koreferats und die gute Zusammenarbeit, auch er war mir immer ein hilfreicher Ansprechpartner.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. M. Leippe bedanken, wobei ich namentlich meinen Ko-Doktoranden Dr. Jürgen Fritsch, Dipl.-Biol. Henning Fedders und Mareike Stanisak für ein Stück gemeinsam gegangenen Weges danke. Zudem war Jürgen immer ein großartiger Netzwerkadministrator, der die Computer jederzeit am Laufen hielt.

Dr. Kerstin Isermann möchte ich herzlich für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und Gespräche danken, die wir hoffentlich auch weiterhin führen werden

Großer Dank gebührt vor allem meinen Eltern Marita und Gerd Simanski sowie ihren Lebenspartnern, deren ständige Unterstützung mir diese Arbeit ermöglicht hat.

Ebenso große Unterstützung habe ich auch von meinem Onkel Joachim Singbartl erfahren, dem ich hiermit ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte. Danke auch an Martin für Alles.

DANKE!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung meines Doktorvaters, selbständig durchgeführt und verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die von mir aus der Literatur entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Kiel, den 27. September 2007

Maren Simanski